



Doctorat ParisTech

THÈSE

pour obtenir le grade de docteur délivré par

**L'Institut des Sciences et Industries
du Vivant et de l'Environnement**

(AgroParisTech)

Spécialité : Microbiologie

présentée et soutenue publiquement par

Agnès HEBERT

le 20 septembre 2010

**Ecosystème fromager : de l'étude du métabolisme du soufre chez
Kluyveromyces lactis et *Yarrowia lipolytica* à l'interaction entre
Kluyveromyces lactis et *Brevibacterium aurantiacum***

Directeur de thèse : **Jean-Marie BECKERICH**
Co-encadrement de la thèse : **Sophie LANDAUD**

Jury

M. Claude GAILLARDIN, Professeur, UMR1319- MICALIS, AgroParisTech-INRA
Mme Sylvie DEQUIN, Directeur de Recherche, UMR1083-SPO, INRA
M. Jean LABARRE, Directeur de Recherche, iBiTec-S / SBIGeM / LBI, CEA
Mme Pascale DARAN-LAPUJADE, Professeur, Kluyver laboratory, Université de Delft
Mme Sophie LANDAUD, Maître de Conférences, UMR782-LGMPA, AgroParisTech-INRA
M. Jean-Marie BECKERICH, Directeur de Recherche, UMR1319-MICALIS, AgroParisTech-INRA

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examinateur
Directeur de thèse
Directeur de thèse

A ma Mamie chérie,

A ta force et à ton courage

A toutes ces années partagées

A tout ces moments que je n'oublierais pas

A toi, qui pétille toujours du haut de tes cents ans

Merci pour tout...

Remerciements

En premier lieu, je souhaite remercier Mme Sylvie Dequin et M. Jean Labarre d'avoir été les rapporteurs de ce travail de thèse, Claude Gaillardin d'avoir accepté d'être le président du jury, ainsi que Mme Pascale Darand-Lapujade pour son implication en tant qu'examineur.

Je remercie Pascal Bonnarme d'avoir monté et coordonné le projet ANR EcoMet, et de m'avoir ainsi donné l'opportunité de travailler sur ce sujet avec vous tous. Un grand MERCI à Sophie Landaud et Jean-Marie Beckerich, mes directeurs de thèse, qui ont su m'encadrer et m'accompagner tout au long de ce travail. Merci pour tous vos précieux conseils, votre écoute, votre disponibilité ainsi que votre confiance en moi. Tout ceci m'a permis d'avancer des ces travaux, mais cela m'a aussi beaucoup apporté tant d'un point de vue professionnel que personnel.

Merci à tous, qui rendent la vie du laboratoire si chaleureuse et scientifiquement intéressante tant au sein de l'unité MGM qu'au LGMPA :

- * Roselyne Tâche (Merci d'avoir si bien veillé sur nous), Anne-Sophie Sarthou, Françoise Irlinger, Jérôme Delettre, Sandra Helinck, Armelle Delisle, Christophe Monnet, Eric Spinnler et tous les autres, sans oublier notre incomparable Baronne.*
- * Brigitte Tréton, Djamilia Onésime, Marie-Thérèse Le-Dall, Serge Casaregola, Aurélie Baliarda, Matthieu Jules, Ludovic Le-Chat et tous les autres. Un merci tout particulier pour Dominique Swennen, Catherine Madzak et Philippe Joyet, qui m'ont offert leur sympathie et une petite place dans leur laboratoire à mon arrivée en thèse.*

Merci aux filles, pour leur amitié qui me tient particulièrement à cœur, Julie Bailly, Soulaf Mansour, Pawinee Deetae, Reine Malek, Aline Rault, Perrine Roger et Amandine Cornu. Merci pour ces moments et pour tout le reste.

Mille mercis à Marie-Pierre Forquin, ma « jumelle » de thèse. Sans toi, ces trois années n'auraient pas été les mêmes. Merci pour ces rires, pour ta force et ta joie de vivre. Merci pour ton amitié qui m'est plus que précieuse. J'ai du mal à te voir partir, mais je sais que tu vas t'épanouir et que tu atteindras tes objectifs. Tous mes vœux de bonheur pour ton mariage. Merci encore pour ton soutien sans failles. Travailler avec quelqu'un d'autre va être très difficile maintenant que tu as placé la barre si haut! Que dire de plus Cocotte, les mots vont me manquer...Merci pour tous ces moments, merci pour tout le reste...Donnes-moi des nouvelles !

Un grand merci à Christophe Junot pour ces moments « métabolome », entre les galères d'Orbitrap au niveau du planning ou des manips qui plantent, nous avons passé des instants riches en échanges. Merci aux autres membres de l'équipe Aurélie, Jean-François, Geoffrey, Ying, Ludo, Jérôme sans oublier Sophie.

Merci aux membres du projet EcoMet qui ne sont pas cités ci-dessus, et tout particulièrement à Valentin Loux et Julie Aubert pour leur expertise et leurs conseils avisés, ainsi qu'au 3^{ème} thésard du projet alain Sourabié.

Je voudrais aussi remercier mes anciens collègues et amis de l'IBPC-UPR9073, qui m'ont accueilli si chaleureusement à deux reprises, lors d'un stage de licence et de mon stage de Master 2. Merci à Miklos de Zamaroczy et Liliana Mora pour m'avoir si bien encadré et donné l'envie de continuer lors de ce premier stage. Merci à Harlad Putzer et Léna Zig pour m'avoir encadré lors de mon M2, pour nos échanges scientifiques très riches et pour tout le reste. Un grand merci et une pensée amicale pour tous les autres, et particulièrement pour Joël Caillet (je te revois très bien m'entraîner pour mon premier oral, un grand moment !), Frédéric Allemand, Lionel Benard, Eliane Hajnsdorf, Dominique Brechemier-Bay, Olivier Pellegrini, sans oublier Laurence Gauthier.

Un grand merci à Nasslie Choonee, qui était en thèse lors de mon M2 à l'IBPC. Merci pour ton soutien, ton amitié, ainsi que tous nos échanges et nos éclats de rire... Je suis contente que tu aies trouvé ta voie.

Merci à mes amis de Normandie, Stéphanie Blottière (et Samuel Dreux!), Amandine Launay et Charles Mauger, pour leur amitié si précieuse et si forte (depuis le temps!). Merci d'avoir compris mes absences répétées pendant ces années de thèse. Je me rattraperais, promis...

Merci à mes amis de Fac, nous avons passé de sacrés moments (surtout hors des Amphis...). Merci à Sophie Julienne (Ma Fofie, toujours présente!), Valérie Maître, Katia Castrillo, Angélique Godet, Enguerrand Catillon, Roch Fontenoy, Julien Rondeau, et les associés au fil des ans David Viatgé, Stéphanie Salmann, Julien Guernon sans oublier Aude-Justine Fontenoy et la petite bidulette.

Un grand merci à mes parents, pour tout, pour m'avoir permis de faire des études et d'avoir cru en moi. A ma grand-mère, un doctorat ça compensera le fait de ne pas avoir eu de mention au bac! A ma grand-mère, encore, ainsi qu'à ma grand-tante, merci de m'avoir appris à lire, à écrire, à faire du vélo et des gâteaux... Merci pour votre complémentarité explosive, qui nous faisait parfois bien rire. Merci, toujours à ma grand-mère, pour toutes ses histoires de jeunesse. Merci aux frangins, on s'est bien chamaillé petits! Merci à Tante Claudie et Oncle William, à Tonton Danny ainsi que Pénélope et Steven pour leur affection et toutes leurs attentions.

Et pour finir bien sûr, à mon cher et tendre, Jean Formigé, qui a su me supporter et me soutenir pendant ces trois années de thèse. Je me demande si je n'ai pas passé plus de temps que toi derrière mon ordinateur pendant ces trois années... Merci d'avoir accepté ma non disponibilité, ma fatigue et mes humeurs. Je t'aime...

Un dernier merci à tous ceux que j'ai connu grâce à toi et qui m'ont accueilli les bras ouverts, ta maman Flo, Cédric et Marie-Pierre (et maintenant Mathieu), aux amis et à tous les autres que je n'ai pas cité mais qui sont chers à mon cœur...

Publications-Communications orales

Publication dans des revues à comité de lecture

Interactions between *Kluyveromyces lactis* and *Brevibacterium aurantiacum*, two cheese-ripening micro-organisms

Forquin M P and Hébert A, Aubert J, Lандаud S, Martin-Verstraete I, Bonnarme P, Beckerich J M. (En rédaction)

An extensive investigation of sulfur metabolism in the yeast *Yarrowia lipolytica*

Hébert A, Forquin M P, Roux A, Aubert J, Junot C, Heilier J F, Lандаud S, Bonnarme P, Beckerich J M. (Version 1)

Exploration of sulfur metabolism in the yeast *Kluyveromyces lactis*

Hébert A, Forquin M P, Roux A, Aubert J, Junot C, Loux V, Heilier J F, Bonnarme P, Beckerich J M, Lандаud S. (Eukaryotic Cell, Soumis)

Biodiversity in the sulfur metabolism in hemiascomycetous yeasts

Hébert A, Casaregola S, Beckerich J M. (FEMS Yeast Research, Soumis)

Global regulation in response to sulfur availability in the cheese-related bacterium, *Brevibacterium aurantiacum*

Forquin M P, **Hébert A**, Roux A, Aubert J, Proux C, Heilier J F, Lандаud S, Junot C, Bonnarme P and Martin-Verstraete I. (Appl. Environ. Microbiol., Soumis)

Sulphur metabolism of the cheese-ripening yeast *Yarrowia lipolytica*

Hébert A, Beckerich J M, Lандаud S, Bonnarme P. (Microbiology Monographs, Sous presse)

Transcriptional analysis of L-methionine catabolism in the cheese-ripening yeast *Yarrowia lipolytica* in relation to volatile sulfur compound biosynthesis

Cholet O, Hénaut A, **Hébert A**, Bonnarme P. (Appl. Environ. Microbiol. 2008)

Communications orales

***Kluyveromyces lactis* : une levure de l'écosystème fromager.** JMI 2010 (Congrès Journées des microbiologistes de l'INRA, du 5 au 7 mai 2010). Poster.

An integrative picture of the sulphur metabolism in the yeasts *K. lactis* and *Y. lipolytica*. (Séminaire externe IBPC UPR 9073, 25 novembre 2009). Conférence.

An integrative picture of the sulphur metabolism in the yeasts *K. lactis* and *Y. lipolytica*. Congrès ISSY27 (International Specialized Symposium on Yeast, du 26 au 29 août 2009). Poster.

Biologie intégrative du métabolisme du soufre et affinage des fromages. LMO8 (Congrès Levures Modèles et Outils VIII, du 26 au 29 octobre 2008). Conférence.

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique
ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire
AHL : Acyl homosérine lactone
AI : Auto-inducteur
AOC : Appellation d'origine contrôlée
APS : Adénosine 5'-phosphosulfate
ARN : Acide ribonucléique
ATP : Adénosine triphosphate
CoA : Co-enzymeA
CSVs : Composés soufrés volatils
DMDS : Diméthyldisulfure
DMS : Diméthylsulfure
DMTS : Diméthyltrisulfure
DMQS : Diméthyltétrasulfure
GC : Chromatographie en phase gazeuse
GRX : Glutaredoxine
GSH : Glutathion réduit
GSSG : Glutathion oxydé
GSSP : Complexe glutathion-protéine
KMBA : acide 2-céto-4-méthylthiobutyrique
MGL : Méthionine γ -lyase
LC : Chromatographie en phase liquide
LTQ : Linear trap quadrupole
MCD : Milieu chimiquement défini
MS : Spectrométrie de masse
MTA : Méthylthioadénosine
MTAc : Méthylthioacétate
MTL : Méthanethiol
NADP : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydé
NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit
OAS : *O*-Acétylsérine
PAPS : Adénosine 3'-phosphate 5'-phosphosulfate
PSH : Protéine réduite
QS : Quorum sensing
QTL : Quantitative trait locus
SAH : *S*-adénosylhomocystéine
SAM : *S*-adénosylméthionine
THF : Tétrahydrofolate
TMD : Domaine transmembranaire
TRX : Thiorédoxine
WGD : Whole genome duplication

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION.....	21
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....	27
I. METABOLISME DU SOUFRE CHEZ LES LEVURES HEMIASCOMYCETES.....	27
I. A. Assimilation du sulfate inorganique	29
I. A. 1. Transport	29
I. A. 2. Activation	31
I. A. 3. Réduction	32
I. A. 4. Intégration du soufre dans une chaîne carbonée	34
I. B. Biosynthèse de la cystéine	35
I. B. 1. Transport	35
I. B. 2. Transsulfuration.....	36
I. B. 3. Sulfhydratation.....	37
I. C. Métabolisme du glutathion	38
I. C. 1. Transport	38
I. C. 2. Synthèse	39
I. C. 3. Protection	40
I. C. 4. Dégradation	45
I. D. Biosynthèse de la méthionine.....	45
I. D. 1. Transport	45
I. D. 2. Cycle du méthyle.....	46
I. E. Synthèse des polyamines et cycle du méthylthioadénosine	49
I. E. 1. Transport	49
I. E. 2. Synthèse des polyamines.....	50
I. E. 3. Cycle du méthylthioadénosine	51
I. F. Régulation	52
I. F. 1. Système de régulation	52
I. F. 2. Effet des apports nutritionnels sur la régulation	54
II. FROMAGE, SOUFRE ET ECOSYSTEME	55
II. A. La fabrication fromagère, une source de diversité.....	55
II. A. 1. Le lait.....	56
II. A. 2. Formation du caillé.....	58
II. A. 3. Egouttage.....	58
II. A. 4. Affinage.....	59
II. B. Composition et rôle de l'écosystème d'affinage	65
II. B. 1. Levures hémi-ascomycètes	65
Genre Saccharomyces	65
Genre Kluyveromyces.....	66

	Genre Debaryomyces	67
	Genre Yarrowia	67
	Genre Geotrichum	68
II. B. 2.	Bactéries	69
	Bactéries à Gram négatif	69
	Genre Staphylococcus	69
	Bactéries Corynéformes	70
II. C.	Composés aromatiques soufrés	71
II. C. 1.	Caractéristiques aromatiques	71
II. C. 2.	Catabolisme de la méthionine	72
	Première voie de dégradation de la méthionine.....	72
	Deuxième voie de dégradation de la méthionine.....	72
	Voie de Ehrlich.....	73
	Le méthane-thiol : un précurseur de composés soufrés volatils.....	73
II. C. 3.	Sulfite, sulfure et cystéine	76
II. D.	L'écosystème : interactions et communication cellulaire.....	79
II. D. 1.	Interactions microbiennes.....	79
	Compétition.....	81
	Amensalisme	81
	Parasitisme	82
	Commensalisme	82
	Mutualisme.....	83
II. D. 2.	Communication cellulaire : le quorum sensing	84
	Communication intra-espèce	84
	Communication inter-espèces	87

RESULTATS-DISCUSSION **93**

I.	Métabolisme du soufre chez les levures hémiascomycètes.....	93
I. A.	Introduction	93
I. B.	Article n°1 : Métabolisme du soufre chez la levure d'affinage <i>Yarrowia lipolytica</i>	94
I. C.	Article n°2 : Biodiversité du métabolisme du soufre chez les levures hémiascomycètes	117
I. D.	Conclusion	154
II.	Influence de l'apport soufré sur le métabolisme du soufre chez les levures <i>Kluyveromyces lactis</i> et <i>Yarrowia lipolytica</i>.....	155
II. A.	Introduction.....	155
II. B.	Article n°3 : Exploration du métabolisme du soufre chez la levure <i>Kluyveromyces lactis</i>	158

II. C.	Article n°4 : Etude approfondie du métabolisme du soufre chez la levure <i>Yarrowia lipolytica</i>	187
II. D.	Conclusion	218
III.	Etude de l'interaction entre <i>Kluyveromyces lactis</i> et <i>Brevibacterium aurantiacum</i>	221
III. A.	Introduction	221
III. B.	Résultats-Discussion : Interaction entre <i>K. lactis</i> et <i>B. aurantiacum</i>	222
III. C.	Conclusion	237
<u>CONCLUSION-PERSPECTIVES</u>		241
<u>FICHES TECHNIQUES</u>		249
	Fiche n°1 : Milieu Chimiquement Défini (MCD)	249
	Fiche n°2 : Dosage des sources de carbone par HPLC.....	252
	Fiche n°3 : Extraction des ARN totaux	253
	Fiche n°4 : Etude du transcriptome par puces à ADN.....	255
	Fiche n°5 : RT-PCR quantitative.....	256
	Fiche n°6 : Analyse des métabolites intracellulaires par LC/MS	258
	Fiche n°7 : analyse des composés volatils.....	261
	Fiche n°8 : mesure de l'H ₂ S	263
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>		267

TABLE DES ILLUSTRATIONS

FIGURES

Figure 1. Phylogénie.....	23
Figure 2. Composés soufrés organiques et inorganiques.	28
Figure 3. Structure des transporteurs de la famille SulP.	30
Figure 4. Assimilation du sulfate.	32
Figure 5. Synthèse du sirohème.	33
Figure 6. Synthèse de l'homosérine.	34
Figure 7. Synthèse de la cystéine.	36
Figure 8. Métabolisme du glutathion.	40
Figure 9. Système glutathion/glutaredoxine et système thioredoxine.	41
Figure 10. Détoxification du cadmium.....	42
Figure 11. Cycle du méthyle.	47
Figure 12. Métabolisme du folate, origine du groupe méthyle.	48
Figure 13. Synthèse des polyamines et cycle du méthylthioadénosine.....	52
Figure 14. Principales étapes de la fabrication fromagère.....	57
Figure 15. Répartition des 45 fromages AOC Français.	63
Figure 16. Les 75 descripteurs d'arômes utilisés pour décrire les fromages.....	64
Figure 17. Voies de synthèse des composés soufrés à partir de la méthionine et de la cystéine.....	75
Figure 18. Surproduction de sulfite chez <i>S. cerevisiae</i>	77
Figure 19. Gènes impliqués dans la production d'H ₂ S chez <i>S. cerevisiae</i>	78
Figure 20. Exemple de mutualisme entre <i>S. thermophilus</i> et <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	84
Figure 21. Mécanismes du Quorum Sensing.....	85
Figure 22. Communication intra- et inter-espèces.	88
Figure 23. Métabolisme du soufre chez <i>K. lactis</i> et <i>Y. lipolytica</i> : effet d'une forte concentration en méthionine comparée à une faible concentration en méthionine.	220
Figure 24. Analyses physiologiques et biochimiques des cultures pures et de la co-culture.	224
Figure 25. Evolution du pH, consommation du lactose et biomasse de <i>K. lactis</i> en culture pure et co-culture.....	225

Figure 26. Interaction entre <i>K. lactis</i> et <i>B. aurantiacum</i> : métabolisme carboné.	230
Figure 27. Interaction entre <i>K. lactis</i> et <i>B. aurantiacum</i> : métabolisme de la biotine.	231
Figure 28. Coloration de <i>K. lactis</i> au calcofluor white à 92h.	233
Figure 29. Observation microscopique de <i>K. lactis</i> à 92h.	233
Figure 30. Les deux voies de synthèse de la cystéine.	241

TABLEAUX

Tableau 1. Stress H ₂ O ₂ et arsenite.	43
Tableau 2. Stress cadmium.	44
Tableau 3. Métabolisme du soufre, effets des apports nutritionnels.	54
Tableau 4. Composition moyenne du lait (g/L).	56
Tableau 5. Principales transformations biochimiques au cours de l'affinage.	60
Tableau 6. Représentation des 45 fromages AOC Français par catégorie fromagère.	62
Tableau 7. Les composés soufrés volatils couramment retrouvés dans le fromage	71
Tableau 8. Gènes impliqués dans catabolisme méthionine chez les levures technologiques.	74
Tableau 9. Interactions microbiennes dans les produits laitiers	80
Tableau 10. Exemples de Quorum Sensing.	86
Tableau 11. Consommation des acides aminés par la co-culture et les cultures pures (%).	223
Tableau 12. Rendements de biomasse et de production d'éthanol chez <i>K. lactis</i> en culture pure et co-culture.	225
Tableau 13. Catégorie fonctionnelle des gènes différentiellement exprimés chez <i>K. lactis</i>	233
Tableau 14. Gènes différentiellement exprimés chez <i>K. lactis</i> discutés dans ce travail.	234
Tableau 15. Catégorie fonctionnelle des gènes différentiellement exprimés chez <i>B. aurantiacum</i>	236
Tableau 16. Gènes différentiellement exprimés chez <i>B. aurantiacum</i> discutés dans ce travail.	236

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Les procédés de fermentations alimentaires sont utilisés depuis plusieurs milliers d'années dans le monde entier. Ils permettent non seulement de conserver de nombreuses matières premières périssables (lait, céréales, viande...), d'augmenter leur valeur nutritionnelle mais aussi de développer d'intéressantes qualités organoleptiques. Ainsi, ces produits ont perduré au cours de l'Histoire, donnant lieu à des spécialités culinaires particulières selon les régions du monde, dépendantes des produits locaux. Cette richesse a été évaluée à 5000 produits fermentés. Les produits représentatifs de la France sont essentiellement le vin, le pain et le fromage.

Après la phase de coagulation du lait, la fabrication fromagère est constituée de plusieurs étapes qui, par la variété de leur mode de conduite, ont rendu possible la grande diversité fromagère que nous connaissons actuellement. Les fromages à pâte molle et à croûte lavée sont des produits typiques (Livarot, Munster, Epoisses, Langres...) aux qualités organoleptiques remarquables et pour lesquels la formation de composés soufrés volatils (CSVs) lors de l'affinage est primordiale. Ces composés clefs sont produits par les micro-organismes d'affinage (bactéries, levures) qui se développent lors de cette dernière étape.

Cependant, le métabolisme du soufre est encore peu connu chez les micro-organismes de cet écosystème, notamment chez les levures d'affinage, dont font partie *Kluyveromyces lactis* et *Yarrowia lipolytica*.

Ces levures appartiennent au phylum des hémiascomycètes, au même rang que la levure modèle *Saccharomyces cerevisiae*, chez qui le métabolisme du soufre possède une place centrale et a donc été largement étudié. En effet, ce métabolisme intervient notamment dans le cycle cellulaire (Iida & Yahara, 1984; Drebot *et al.*, 1990; Patton *et al.*, 2000), la défense contre le stress oxydatif (Penninckx, 2002; Pócsi *et al.*, 2004) et la synthèse de cofacteurs indispensables (Marobbio *et al.*, 2003). Par ailleurs, *S. cerevisiae* est le premier organisme eucaryote dont le génome a été séquencé (en 1996). Depuis, le séquençage de nombreux autres organismes de ce phylum a pu être réalisé (Feldmann, 2000) (<http://www.genolevures.org/>), créant une situation unique pour l'étude de l'évolution des eucaryotes.

Nous avons donc décidé d'étudier de façon exhaustive le métabolisme du soufre chez les levures fromagères *Kluyveromyces lactis* et *Yarrowia lipolytica* en nous appuyant sur les connaissances de *S. cerevisiae*. Cependant les micro-organismes du phylum des

hémiascomycètes sont séparés par d'importantes distances évolutives (Dujon, 2006), et *S. cerevisiae* est très désaxée dans cette phylogénie (Figure 1). Il est donc possible que le métabolisme du soufre chez *S. cerevisiae* ne soit pas représentatif de celui de tous les hémiascomycètes. Nous avons donc choisi de nous appuyer sur d'autres organismes modèles eucaryotes unicellulaires : *Neurospora crassa*, *Aspergillus nidulans* et *Schizosaccharomyces pombe* (Figure 1).

S. cerevisiae est non seulement la levure modèle du phylum des hémiascomycètes, mais elle est aussi une levure technologique, au même titre que *Kluyveromyces lactis* et *Yarrowia lipolytica*. Cependant, ces deux dernières sont impliquées dans l'affinage fromager alors que *S. cerevisiae* est majoritairement impliquée dans la fabrication du pain, du vin et de la bière. La production de composés soufrés volatils a été étudiée chez *S. cerevisiae*, lors de son utilisation pour la fabrication de ces produits. En effet, les composés soufrés volatils participent pleinement aux qualités organoleptiques du vin et de la bière, ainsi qu'à celles du fromage. Il est important de noter que ces molécules soufrées peuvent être intéressantes dans certains aliments (fromage) alors qu'elles peuvent avoir un impact organoleptique néfaste dans d'autres produits (vin, bière) si leur concentration dépasse un certain seuil. Par ailleurs, ces matrices alimentaires ont des compositions très différentes et des caractéristiques physico-chimiques spécifiques (pH, potentiel d'oxydo-réduction...), orientant les réactions chimiques et biochimiques d'une manière spécifique. La chimie/biochimie du soufre est donc particulière dans chaque produit et non directement transposable d'un produit à l'autre.

Il est aussi important de garder à l'esprit que l'affinage fromager est réalisé par un écosystème complexe, pas uniquement composé de levures. Les partenaires de cet écosystème sont facilement cultivables, ouvrant d'intéressantes perspectives sur des études d'interactions microbiennes.

Ainsi, après avoir étudié de façon fondamentale et technologique le métabolisme du soufre chez *K. lactis* et *Y. lipolytica*, nous avons choisi d'étudier le comportement de *K. lactis* cultivé en association avec *Brevibacterium aurantiacum*, une bactérie d'affinage d'intérêt majeur pour les fromages à pâte molle à croûte lavée. Ces données participeront à la construction d'une base solide pour la compréhension de l'écosystème fromager.

Nous présenterons tout d'abord, sous forme d'une synthèse bibliographique, les connaissances actuelles concernant le métabolisme du soufre chez les levures hémiascomycètes, les grands principes de la fabrication fromagère ainsi que le rôle de l'écosystème fromager dans cette fabrication.

Ensuite, nous développerons les résultats obtenus selon trois axes : l'analyse *in silico* du métabolisme du soufre chez les levures hémiascomycètes, le métabolisme du soufre et la production de composés soufrés volatils en culture pure chez *K. lactis* et *Y. lipolytica* et enfin les conclusions concernant les cultures en association de *K. lactis* avec *B. aurantiacum*.

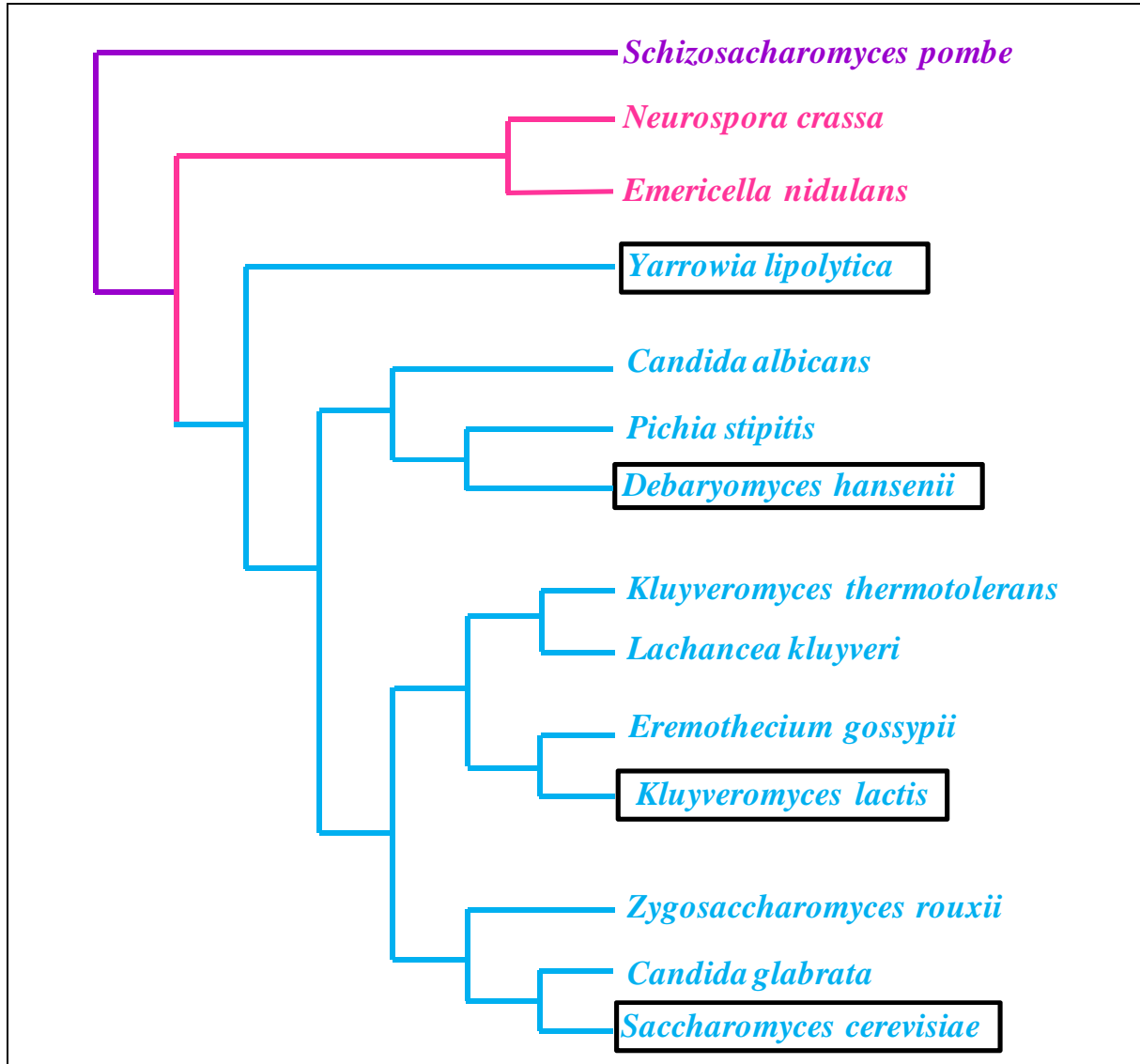


Figure 1. Phylogénie.

En bleu : La phylogénie des levures hémiascomycètes.

En noir : Les quatre principales levures technologiques dont le génome est disponible.

En violet : La levure archeascomycète modèle ;

En rose : Les deux champignons ascomycètes modèles.

Le champignon *Aspergillus nidulans* a récemment été renommé *Emericella nidulans*.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. METABOLISME DU SOUFRE CHEZ LES LEVURES HEMIASCOMYCETES

Le soufre est indispensable à la vie. Il permet en outre de produire la méthionine et la cystéine, les acides aminés soufrés essentiels, ainsi que de synthétiser des molécules clés pour la cellule, telles que le glutathion et la *S*-adénosylméthionine (SAM), qui seront décrites par la suite (en I. C et I. D respectivement). Les principaux intermédiaires soufrés abordés dans cette partie sont représentés dans la Figure 2. Pour se développer, les levures peuvent incorporer du soufre sous différentes formes, inorganiques (sulfate, sulfite, sulfure) et organiques (méthionine, cystéine, homocystéine, glutathion, *S*-adénosylméthionine, sulfonates) (Uria-Nickelsen *et al.*, 1993; Thomas & Surdin-Kerjan, 1997).

Le sulfate, qui est une source de soufre présente en abondance dans l'environnement, est assimilable par de nombreux organismes (plantes, bactéries, champignons et levures), excepté les mammifères. Il permet de synthétiser toutes les molécules soufrées organiques indispensables. Nous allons donc commencer par décrire son assimilation par la cellule.

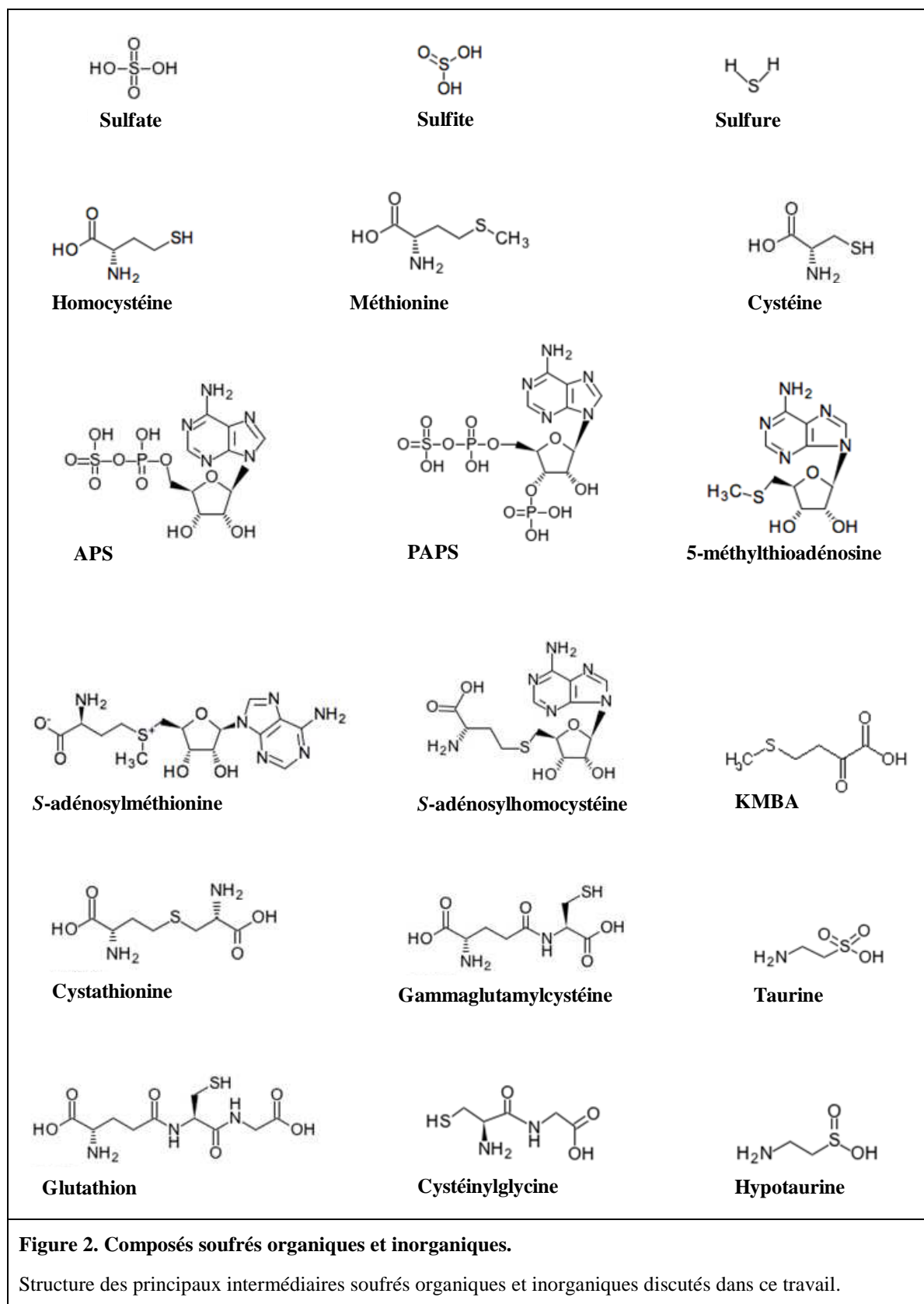


Figure 2. Composés soufrés organiques et inorganiques.

Structure des principaux intermédiaires soufrés organiques et inorganiques discutés dans ce travail.

I. A. Assimilation du sulfate inorganique

Le soufre possède différents degrés d'oxydation, le sulfate étant la forme la plus oxydée et le sulfure la forme la plus réduite. Après son transport, le sulfate doit être transformé en sulfite puis en sulfure pour être utilisé par la cellule. Cependant, la stabilité du couple sulfate/sulfite est telle que la cellule ne peut pas effectuer cette réduction directement, et doit tout d'abord activer le sulfate avant de le réduire. Les molécules générées lors de l'assimilation du sulfate sont indispensables, mais aussi très toxiques pour la cellule. Cette voie est par conséquent très régulée, de manière à éviter tout risque d'accumulation de ces composés.

Les différentes étapes du métabolisme du sulfate, de son transport à son intégration dans une chaîne carbonée, sont décrites par la suite.

I. A. 1. Transport

Le transport actif du sulfate a été mis en évidence chez la levure modèle *S. cerevisiae* par McCready (McCready & Din, 1974). Les deux perméases impliquées dans ce transport ont ensuite été identifiées (Breton & Surdin-Kerjan, 1977). Elles sont codées par les gènes *SUL1* (Smith *et al.*, 1995) et *SUL2* (Jin *et al.*, 1995). Ces deux transporteurs sulfate, qui ont été décrits comme perméases à haute affinité (Cherest *et al.*, 1997), appartiennent à la famille des sulfate perméases SulP. Cette famille ne regroupe pas uniquement des transporteurs sulfate. En effet, certains membres de cette famille transportent d'autres anions (Price *et al.*, 2004; Tejada-Jiménez *et al.*, 2007). Les perméases de la famille SulP sont retrouvées chez de nombreux organismes (bactéries, levures, champignons, plantes), et semblent être ubiquitaires. Ces transporteurs sont organisés en 12 segments transmembranaires (Figure 3). Il a été mis en évidence que les deux premières hélices jouent un rôle primordial dans le transport du sulfate (Leves *et al.*, 2008).

Il a récemment été montré que le chromate provoque une carence en soufre chez *S. cerevisiae* (Pereira *et al.*, 2008). Ce polluant hautement toxique entre en effet en compétition avec le sulfate au niveau du transport, mais pourrait aussi interagir au niveau de son métabolisme. En effet, des mutants dans la voie d'assimilation du sulfate (activation et première étape de réduction) sont résistants au chromate. Ceci peut-être dû à l'absence de synthèse d'un composé toxique ou à l'inhibition indirecte des transporteurs sulfate par l'accumulation d'un intermédiaire métabolique.

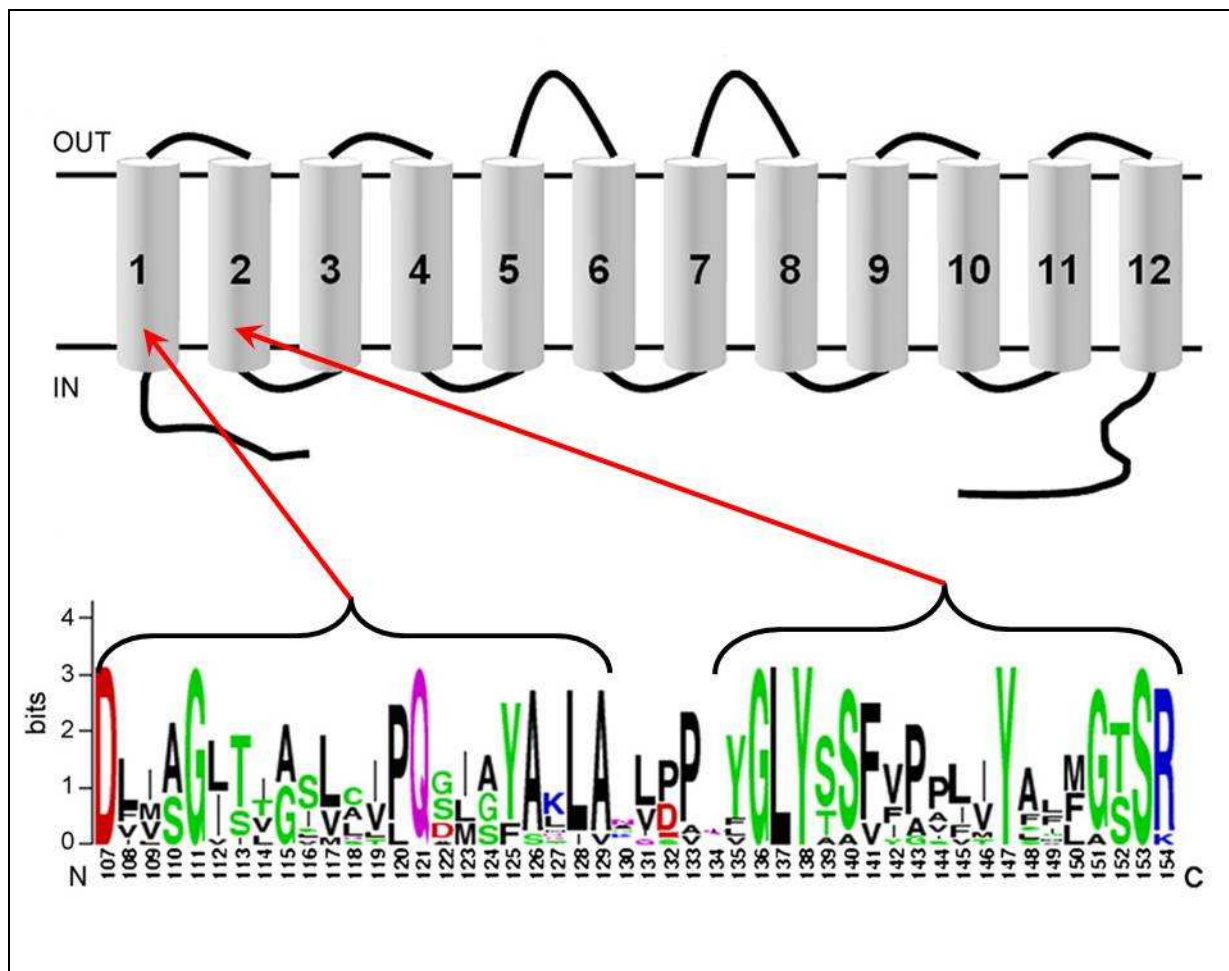


Figure 3. Structure des transporteurs de la famille SulP.

Les transporteurs de la famille SulP sont organisés en 12 segments transmembranaires. Cette figure représente la structure prédite du transporteur sulfate de la plante *Stylosanthes hamata*. L'analyse de la conservation des acides aminés des deux premières hélices a été faite à partir de 12 séquences de transporteurs eucaryotes. La taille globale de chaque position indique le niveau de conservation, et la taille de chaque lettre à une position donnée indique la fréquence à laquelle l'acide aminé a été retrouvé. Adapté de Leves *et al.* (Leves *et al.*, 2008).

Deux perméases présentant des similarités de séquence avec celles de *S. cerevisiae* ont été identifiées chez *Neurospora crassa* (Marzluf, 1997). Cependant, ces perméases, codées par *CYS13* et *CYS14*, sont régulés différemment. En effet, la mutation de l'ATP sulfurylase chez *Neurospora crassa* ne modifie pas le transport du sulfate alors que la mutation de cette même enzyme chez *Saccharomyces cerevisiae* provoque l'arrêt du transport du sulfate (Marzluf, 1974; Logan *et al.*, 1996).

Chez *Aspergillus nidulans* le transporteur sulfate est codé par *sB* (Arst, 1968). Il a été montré que la mutation du gène *sB* peut être complété par le gène *sutB* (van de Kamp *et al.*, 2000), qui code pour l'un des deux transporteurs sulfate de *Penicillium chrysogenum* (van de Kamp *et al.*, 1999). Récemment un nouveau transporteur sulfate a été décrit chez *Aspergillus nidulans* (Piłsyk *et al.*, 2007). Cependant, contrairement à tous les gènes décrits

jusqu'à présent, ce transporteur sulfate n'appartient pas à la famille SulP. Ce transporteur, codé par le gène *astA*, est apparenté à une famille complexe de transporteurs dont les spécificités sont encore peu définies (Hellborg *et al.*, 2008).

La connaissance des transporteurs sulfate chez les hémiascomycètes peut encore être approfondie, notamment par l'étude de leurs mécanismes de régulation ainsi que par une investigation plus approfondie de cette nouvelle famille de transporteurs.

I. A. 2. Activation

Le potentiel d'oxydoréduction du couple sulfate/sulfite est tellement faible que la réduction directe du sulfate ne peut pas avoir lieu. Par conséquent, le sulfate va subir deux étapes d'activation avant d'être réduit (Figure 4). Chacune de ces étapes nécessite l'utilisation d'une molécule d'ATP.

Le sulfate est tout d'abord transformé en adénosine 5'-phosphosulfate (APS) par une ATP-sulfurylase, puis en adénosine 3'-phosphate 5'-phosphosulfate (PAPS) par une APS-kinase. Chez *S. cerevisiae*, ces enzymes sont codées par les gènes *MET3* et *MET14* respectivement. Tous les gènes « MET » ont été identifiés comme étant impliqués dans la biosynthèse de la méthionine par Masselot *et al* (Masselot & De Robichon-Szulmajster, 1975).

Un mutant *met3* de *S. cerevisiae*, peut être complété par le gène codant pour l'ATP sulfurylase d'*Arabidopsis thaliana* (Leustek *et al.*, 1994). L'analyse de la structure de l'ATP sulfurylase de *S. cerevisiae* a révélé une organisation sous forme d'hexamère, ainsi qu'un nouveau mode de fixation de l'ATP (Ullrich *et al.*, 2001). Le domaine responsable de l'oligomérisation a récemment été identifié (Lalor *et al.*, 2003). L'ATP sulfurylase de graines de soja, présente une structure différente de celle de *S. cerevisiae*. En effet, celle-ci se trouve sous forme de dimère (Phartiyal *et al.*, 2006).

Le gène *MET22* de *S. cerevisiae* code pour une bisphosphate-3'-nucléotidase. Cette enzyme régule le pool de PAPS, qui est très toxique pour la cellule, en effectuant la réaction inverse de l'APS-kinase (Peng & Verma, 1995). Cependant, le rôle de cette enzyme ne semble pas se limiter à cette action. En effet, la délétion du gène *MET22* provoque une auxotrophie non seulement pour le sulfate mais aussi pour le sulfite et le sulfure, qui sont situés en aval du PAPS. Pourtant, toutes les enzymes de la voie d'assimilation du sulfate sont présentes et actives (Thomas *et al.*, 1990, 1992). Ceci relève la question du rôle de cette enzyme dans l'assimilation du sulfate. Il a été supposé que les enzymes de la voie

d'assimilation du sulfate pourraient former un complexe, déstabilisé par l'absence de la bisphosphate-3'-nucléotidase (Masselot & Surdin-Kerjan, 1977).

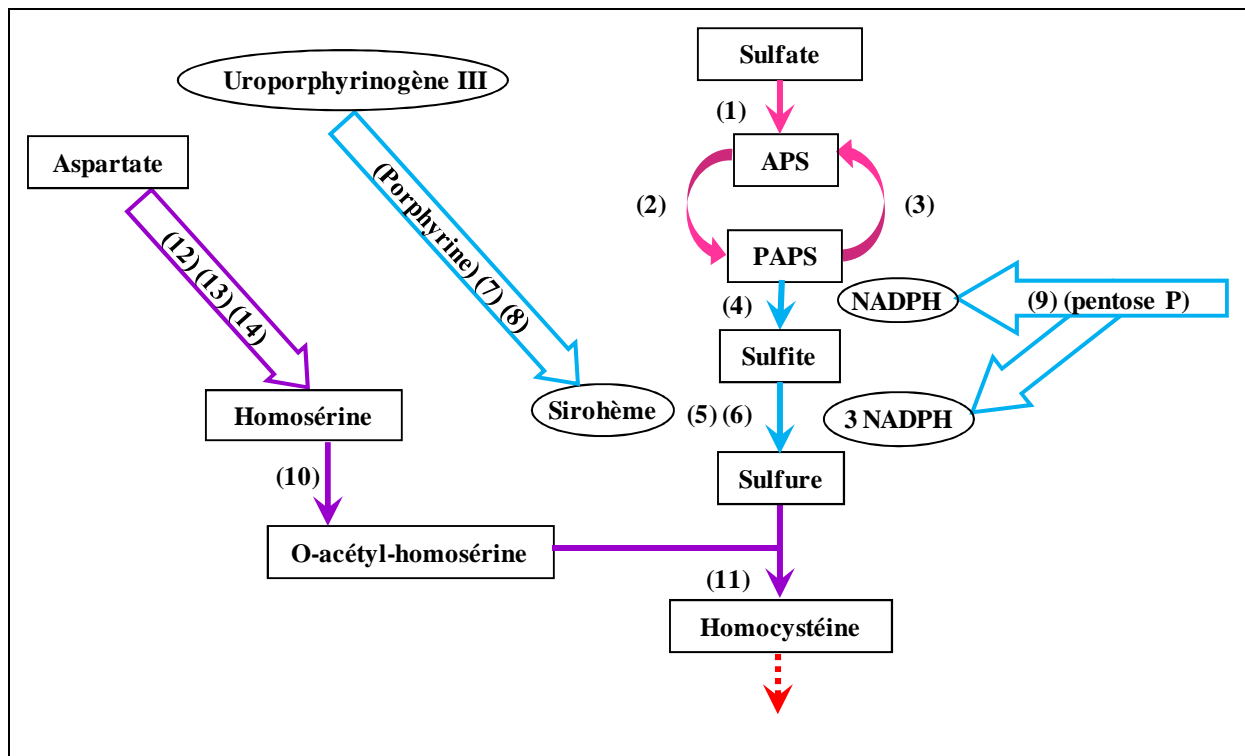


Figure 4. Assimilation du sulfate.

APS : adénosine 5'-phosphosulfate. **PAPS** : adénosine 3'-phosphate 5'-phosphosulfate. **NADPH** : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate.

En rose : Activation du sulfate. (1) ATP-sulfurylase, (2) APS-kinase, (3) bisphosphate-3'-nucléotidase.

En bleu : Etapes de réduction. (4) 3'-phosphoadénylsulfate réductase, (5) et (6) sulfite réductase, (7) uroporphyrinogène III transméthylase, (8) précorrine II déshydrogénase et ferrochélatase, (9) glucose-6-phosphate déshydrogénase.

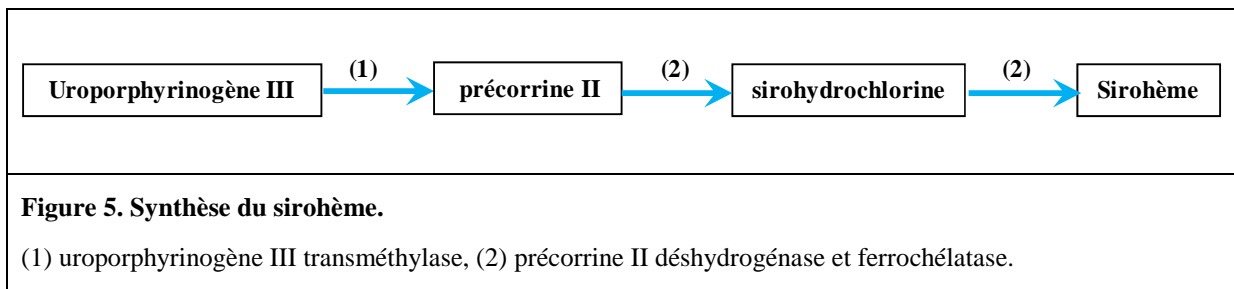
En violet : Incorporation du sulfure dans une chaîne carbonée. (10) homosérine-O-acetyltransférase, (11) O-acétylhomosérine sulfurylase, (12) aspartate kinase, (13) β-aspartyl semi-aldéhyde déshydrogénase, (14) homosérine déshydrogénase.

I. A. 3. Réduction

L'activation du sulfate est suivie par deux étapes de réduction (Figure 4), nécessitant l'intervention d'un coenzyme d'oxydoréduction, le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, nommé NADP sous sa forme oxydée et NADPH sous sa forme réduite. Ces étapes utilisent respectivement une et trois molécules de NADPH. Cette voie a donc un coût énergétique important pour la cellule. Tout d'abord, le PAPS est réduit en sulfite, par une 3'-phosphoadénylsulfate réductase. Le sulfite est ensuite réduit en sulfure par une sulfite réductase.

La 3'-phosphoadénylsulfate (PAPS) réductase de *S. cerevisiae* est codée par le gène *MET16* (Thomas *et al.*, 1990). La fonction de ce gène a été identifiée lors de l'étude de 6 loci (*MET4*, *MET1*, *MET8*, *MET16*, *MET22* et *MET25*¹) dont la mutation a pour effet l'absence d'activité PAPS réductase. Cependant, après avoir affiné leur technique de dosage enzymatique, Thomas *et al* (Thomas *et al.*, 1992) ont confirmé la perte d'activité PAPS réductase uniquement pour les loci *MET16* et *MET4*, codant respectivement pour la PAPS réductase et l'activateur transcriptionnel des gènes « MET », qui sera décrit par la suite (I. F).

La sulfite réductase de *S. cerevisiae* est un hétérodimère, dont les sous-unités sont codées par les gènes *MET5* et *MET10*. Pour être active, cette enzyme nécessite la présence de sirohème comme groupe prosthétique. Cette molécule particulière de hème rend possible la réduction du sulfite en sulfure (Murphy *et al.*, 1974). Chez *S. cerevisiae*, elle est synthétisée par deux enzymes codées par les gènes *MET1* et *MET8* (Hansen *et al.*, 1997; Raux *et al.*, 1999). Tout d'abord, l'uroporphyrinogène III va être méthylé par une uroporphyrinogène III transméthylase codée par le gène *MET1*. La précorrine II ainsi produite va ensuite subir deux autres réactions, dont les activités sont codées par le gène *MET8*, pour enfin former le sirohème. La structure de cette enzyme bifonctionnelle (activités précorrine II déshydrogénase et ferrochélatase) a été définie par Schubert *et al* (Schubert *et al.*, 2002). L'étude de mutants de cette protéine bifonctionnelle a permis à Schubert *et al* (Schubert *et al.*, 2002) d'identifier un site actif commun à ces deux activités enzymatiques.



Chez *S. cerevisiae*, le gène *MET19*² code pour une glucose-6-phosphate déshydrogénase, qui est la première enzyme de la voie des pentoses phosphate. Cependant, *MET19* avait été défini comme un gène impliqué dans le métabolisme du soufre (Masselot & De Robichon-Szulmajster, 1975), car sa mutation provoquait une auxotrophie pour la méthionine. En effet, un mutant *met19* n'est pas capable de croître en sulfate (Thomas *et al.*, 1991). La cause de l'interaction d'une enzyme de la voie des pentoses phosphate avec le métabolisme du soufre a

¹ *Met25* a été renommé *MET17*

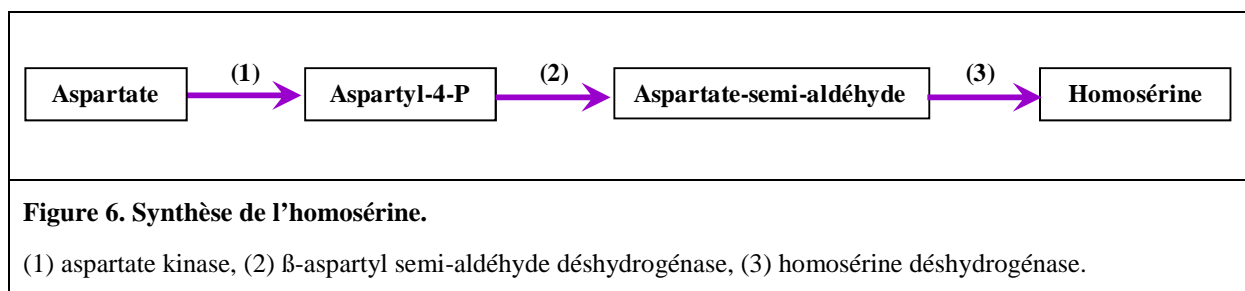
² *MET19* a été renommé *ZWF1*

été identifiée. Lors de son activité de glucose-6-phosphate déshydrogénase, l'enzyme codée par *MET19*, réduit du NADP en NADPH. Comme la voie d'assimilation du sulfate est très consommatrice de ce cofacteur sous sa forme réduite, l'absence d'une enzyme permettant de régénérer ce cofacteur a un fort impact sur le métabolisme du soufre.

I. A. 4. Intégration du soufre dans une chaîne carbonée

Le sulfure produit va ensuite être incorporé dans une chaîne carbonée (homosérine), fournie par le métabolisme de l'aspartate. Cette réaction va conduire à la formation d'homocystéine, qui est le premier acide aminé soufré synthétisé chez *S. cerevisiae* (Figure 4). Ainsi, l'homocystéine possède une place centrale dans le métabolisme du soufre, car cet acide aminé est le point de départ de la biosynthèse de toutes les molécules soufrées organiques de la cellule.

La synthèse de l'homosérine à partir de l'aspartate a lieu en trois étapes successives (Figure 6) (Robichon-Szulmajster *et al.*, 1966). Chez *S. cerevisiae*, une aspartate kinase, codée par *HOM3*, conduit à la formation d'aspartyl-4-P. La deuxième réaction, réalisée par une β -aspartyl semi-aldéhyde déshydrogénase codée par *HOM2*, permet la formation d'aspartate semi-aldéhyde. Ce dernier intermédiaire va finalement permettre la synthèse d'homosérine, sous l'action d'une homosérine déshydrogénase codée par *HOM6*. Cette voie métabolique est indispensable à la synthèse de la méthionine et de la thréonine.



L'homosérine va ensuite être activée en *O*-acétyl-homosérine par une homosérine-*O*-acétyltransférase codée par *MET2* chez *S. cerevisiae*. Sous l'action d'une *O*-acétyl-homosérine sulfurylase codée par le gène *MET17*, l'*O*-acétyl-homosérine va ensuite réagir avec le sulfure pour former l'homocystéine. Il a été démontré que le gène codant pour l'*O*-acétyl-homosérine sulfurylase de *Kluyveromyces lactis* complémente la mutation de *MET17* chez *S. cerevisiae* (Brzywczy & Paszewski, 1999). De plus, *MET17* et le gène de *K. lactis* sont soumis à la même régulation chez *S. cerevisiae*, suggérant une conservation des mécanismes de régulation chez ces deux espèces. Les deux enzymes de cette voie ont été

étudiées chez *A. nidulans*. L'homosérine-*O*-acétyltransférase et l'*O*-acétyl-homosérine sulfurylase sont codées par *metE* et *cysD* respectivement (Sieńko *et al.*, 1998; Grynberg *et al.*, 2001). Ces deux gènes sont réprimés par une forte concentration en méthionine.

Nous allons décrire dans les sections suivantes la synthèse des acides aminés soufrés et autres intermédiaires dont l'importance n'est plus à démontrer. L'assimilation directe de ces molécules donne un avantage non négligeable aux micro-organismes. Nous traiterons donc de leur transport au début de chaque section.

I. B. Biosynthèse de la cystéine

I. B. 1. Transport

La cystéine peut être directement transportée par différents transporteurs. Grenson *et al.*, ont mis en évidence une perméase générale à quasiment tous les acides aminés, codée par le gène *GAP1* (Grenson *et al.*, 1970).

Regenberg *et al* ont surexprimé quinze perméases à acides aminés (Regenberg *et al.*, 1999) chez *S. cerevisiae*. L'assimilation de cystéine a augmenté d'un facteur entre deux et quatre lors de la surexpression de quatre de ces perméases, codées par les gènes *AGP1*, *GNP1*, *BAP2* et *BAP3*. Düring-Olsen *et al* ont identifié deux autres perméases impliquées dans le transport de cystéine, codées par *TAT1* et *TAT2*. Ils ont ensuite étudié l'implication de ces six perméases dans le transport de cystéine selon la source d'azote utilisée (Düring-Olsen *et al.*, 1999).

La perméase à haute affinité pour la méthionine, codée par *MUP1*, est aussi impliquée dans le transport de la cystéine (Kosugi *et al.*, 2001). En effet, l'analyse d'une souche de *S. cerevisiae* déficiente pour le transport de la cystéine est complétée par le clonage du gène *MUP1*.

Un transporteur à haute affinité, codé par *YCT1*, a récemment été décrit chez *S. cerevisiae* (Kaur & Bachhawat, 2007). Il est intéressant de noter que ce transporteur fait partie de la même famille complexe que le transporteur sulfate récemment identifié chez *Aspergillus nidulans*. Ceci suggère que d'autres transporteurs de cette famille pourraient être impliqués dans le transport d'intermédiaires soufrés.

I. B. 2. Transsulfuration

Chez *Saccharomyces cerevisiae*, la voie de transsulfuration permet l'interconversion entre la cystéine et l'homocystéine via la cystathionine (Cherest *et al.*, 1993).

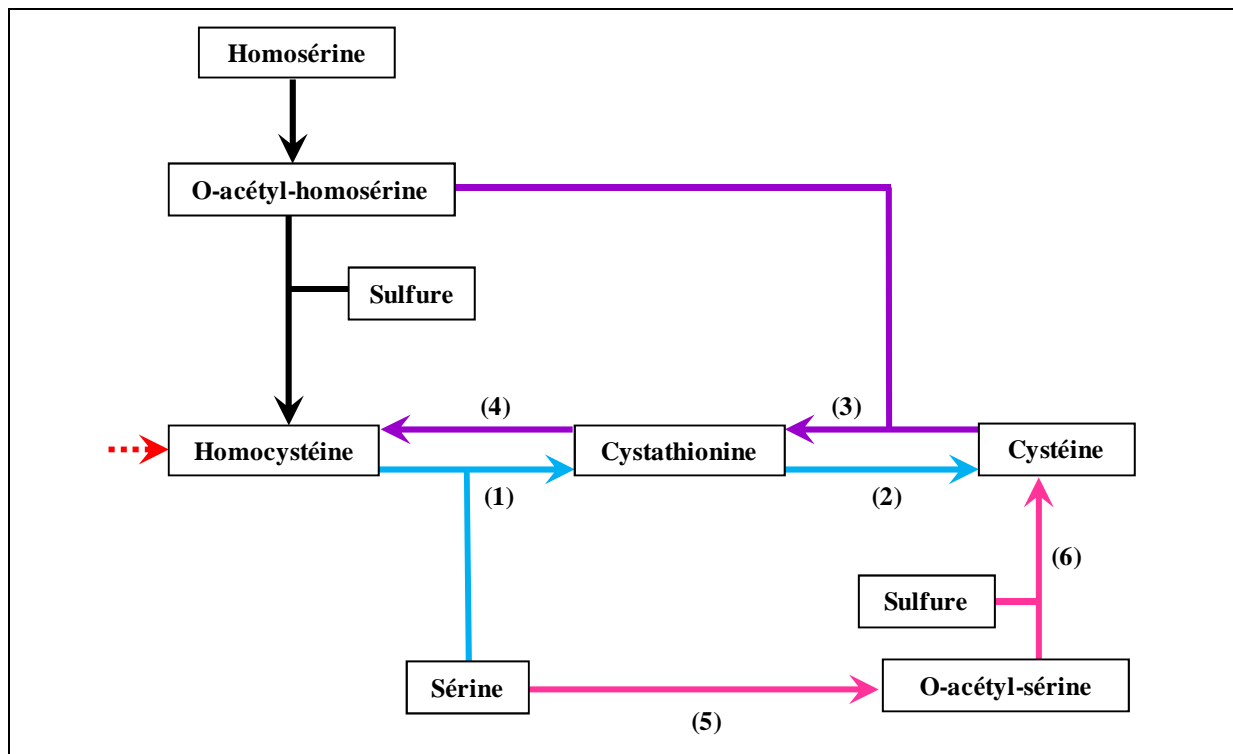


Figure 7. Synthèse de la cystéine.

En bleu : Transsulfuration inverse. (1) cystathionine β -synthase, (2) cystathionine γ -lyase.

En violet : Transsulfuration directe. (3) cystathionine γ -synthase, (4) cystathionine β -lyase.

En rose : Sulfhydratation. (5) *O*-acétyl-sérine sulfurylase, (6) cystéine synthase.

Chez *S. cerevisiae*, la synthèse de cystéine à partir de l'homocystéine est réalisée en deux étapes. Cette voie est appelée transsulfuration inverse. Tout d'abord, l'homocystéine va réagir avec de la sérine pour former de la cystathionine, sous l'action d'une cystathionine β -synthase codée par *CYS4*. La cystéine va ensuite être synthétisée à partir de la cystathionine par une cystathionine γ -lyase, codée par *CYS3*. Le site actif de la cystathionine β -synthase a récemment été étudié par mutagenèse dirigée, permettant l'identification de résidus indispensables au maintien de la conformation du site actif (Lodha *et al.*, 2009).

S. cerevisiae possède aussi la voie de transsulfuration directe, qui permet de synthétiser de l'homocystéine à partir de la cystéine. Cette voie confère à la cellule la faculté de croître sur cystéine. La première étape de cette voie, qui est réalisée par une cystathionine γ -synthase codée par *STR2*, conduit à la production de cystathionine à partir de la cystéine.

L'homocystéine va ensuite être produite à partir de la cystathionine sous l'action d'une cystathionine β -lyase, codée par le gène *STR3*. Ces deux voies sont conservées chez *Aspergillus nidulans* (Marzluf, 1997). La cystathionine β -lyase codée par *metG* a été caractérisée par complémentation (Sieńko & Paszewski, 1999).

Au contraire, *Schizosaccharomyces pombe* possède uniquement la voie de transsulfuration directe (Brzywczy & Paszewski, 1994; Brzywczy *et al.*, 2002). La synthèse de la cystéine se fait donc par une autre voie chez ce micro-organisme. Cette voie, nommée sulfhydratation est décrite ci-dessous.

I. B. 3. Sulfhydratation

La voie de sulfhydratation consiste en l'incorporation du sulfure dans une autre chaîne carbonée, l'*O*-acétyl-sérine. Cette molécule est obtenue par l'activation de la sérine par une sérine-*O*-acétyltransférase. L'*O*-acétyl-sérine réagit ensuite avec le sulfure, sous l'action d'une cystéine synthase, pour produire de la cystéine (Figure 7).

Cette voie de sulfhydratation n'est pas spécifique à *S. pombe*. Elle a en effet été identifiée chez *A. nidulans*, où elle est décrite comme voie principale pour la synthèse de cystéine (Marzluf, 1997). Grynberg *et al.* ont défini un nouveau type de sérine-*O*-acétyltransférase chez *A. nidulans* (Grynberg *et al.*, 2000). En effet, la séquence de cette enzyme est très différente des sérine-*O*-acétyltransférases bactériennes connues, et présente une forte similarité de séquence avec les homosérine-*O*-acétyltransférases. Plusieurs cystéine synthases ont été mises en évidence chez *A. nidulans* (Brzywczy *et al.*, 2007) et *S. pombe* (Fujita & Takegawa, 2004). La redondance de ces enzymes suggère l'importance de la voie de sulfhydratation pour la cellule. La fonctionnalité de la voie de transsulfuration inverse et de la voie de sulfhydratation a été démontrée chez *A. nidulans* (Brzywczy *et al.*, 2007). En effet, seul un mutant affecté dans les deux voies présente une auxotrophie à la cystéine. La coexistence de ces deux voies a aussi été observée chez *Yarrowia lipolytica* (Morzycka & Paszewski, 1979).

Chez *S. cerevisiae* la voie de sulfhydratation semble être incomplète. Une mutation au niveau de la voie de transsulfuration est suffisante pour provoquer une auxotrophie à la méthionine (Cherest & Surdin-Kerjan, 1992). De plus, il a récemment été montré que l'expression d'une sérine-*O*-acétyltransférase de plante chez une souche de *S. cerevisiae* peut rendre fonctionnelle la voie alternative de synthèse de cystéine (Mulet *et al.*, 2004).

Une activité sérine-*O*-acétyltransférase a été décrite chez certaines souches de *S. cerevisiae*. Cependant, le gène codant cette activité n'a jamais été identifié et cette voie ne permet pas la synthèse de cystéine *in vivo* (Ono *et al.*, 1999). Chez *S. cerevisiae* l'activité cystéine synthase a été décrite comme due à l'homosérine-*O*-acétyltransférase, codée par *MET17*. Il serait intéressant de déterminer si *S. cerevisiae* possède une ou plusieurs cystéine synthase et, le cas échéant, déterminer quelle enzyme est responsable de la synthèse de cystéine *in vivo*.

Ces différentes observations conduisent à s'interroger sur la présence de la voie de sulfhydruration chez les levures hémiascomycètes situées entre *S. cerevisiae* et *Y. lipolytica*.

I. C. Métabolisme du glutathion

Le glutathion est un tripeptide formé par la condensation d'acide glutamique, de cystéine et de glycine. Cette molécule particulière joue un rôle important au niveau cellulaire, en lui conférant une protection contre le stress oxydatif et les métaux lourds.

I. C. 1. Transport

Le transport du glutathion a récemment été mis en évidence. Le premier transporteur à haute affinité, codé par *HGT1*³, a été caractérisé chez *S. cerevisiae* (Bourbouloux *et al.*, 2000). La délétion de *HGT1* abolit le transport de glutathion, suggérant que ce gène code pour le principal transporteur du glutathion. La structure de ce transporteur n'a pas encore été caractérisée, cependant les travaux de Kaur *et al.* ont montré que deux résidus cystéine libres jouent un rôle primordial dans le transport du glutathion (Kaur *et al.*, 2009). Par ailleurs, la présence de deux glutamines, localisées respectivement dans les segments transmembranaires TMD4 et TMD9, semble indispensable à la spécificité du transporteur de glutathion chez *S. cerevisiae* (Kaur & Bachhawat, 2009). Le gène codant pour ce transporteur est induit en carence en soufre et réprimé en cystéine (Miyake *et al.*, 2002).

Le transport du glutathion a aussi été étudié chez *Oryza sativa* (riz) (Zhang *et al.*, 2004) et *S. pombe* (Dworeck *et al.*, 2009). Le clonage du gène d'*Oryza sativa* (*OsGT1*) chez *S. cerevisiae* complémente l'absence de *HGT1*. Cependant, ce transporteur présente une spécificité de substrat moins importante que celui de *S. cerevisiae*. Comme chez *S. cerevisiae*,

³ HGT1 a aussi été décrit comme le gène *OPT1* codant pour un transporteur d'oligopeptides

la délétion du gène de *S. pombe* (*SpOPT1*) conduit à l'absence de croissance sur glutathion comme seule source de soufre.

I. C. 2. Synthèse

Le glutathion est synthétisé à partir de la cystéine, via le γ -glutamyl-cystéine. Le métabolisme du glutathion a été caractérisé chez de nombreuses levures et champignons (Pócsi *et al.*, 2004). Chez *S. cerevisiae*, le glutathion est synthétisé en deux étapes, par une γ -glutamylcystéine synthétase codée par *GSH1*, et une glutathion synthétase codée par *GSH2* (Figure 8). Chez *S. cerevisiae*, une mutation $\Delta gsh1$ est létale en milieu non supplémenté en glutathion, contrairement à une mutation $\Delta gsh2$. Il a en effet été observé que le γ -glutamyl-cystéine possède aussi des propriétés anti-oxydantes, pouvant compenser partiellement l'absence de glutathion (Grant *et al.*, 1997). La glutathion synthase d'*Arabidopsis thaliana* a été caractérisée. Le clonage du gène d'*A. thaliana* complémente une souche $\Delta gsh2$ de *S. cerevisiae* (Ullmann *et al.*, 1996). Le glutathion régule sa propre synthèse en réprimant le gène *GSH1* (Wheeler *et al.*, 2002).

Le glutathion possède de nombreux rôles au niveau cellulaire (Penninckx, 2002; Pócsi *et al.*, 2004). L'implication du glutathion dans l'homéostasie redox et dans la détoxification (cadmium, arsenite) est décrite dans la section suivante.

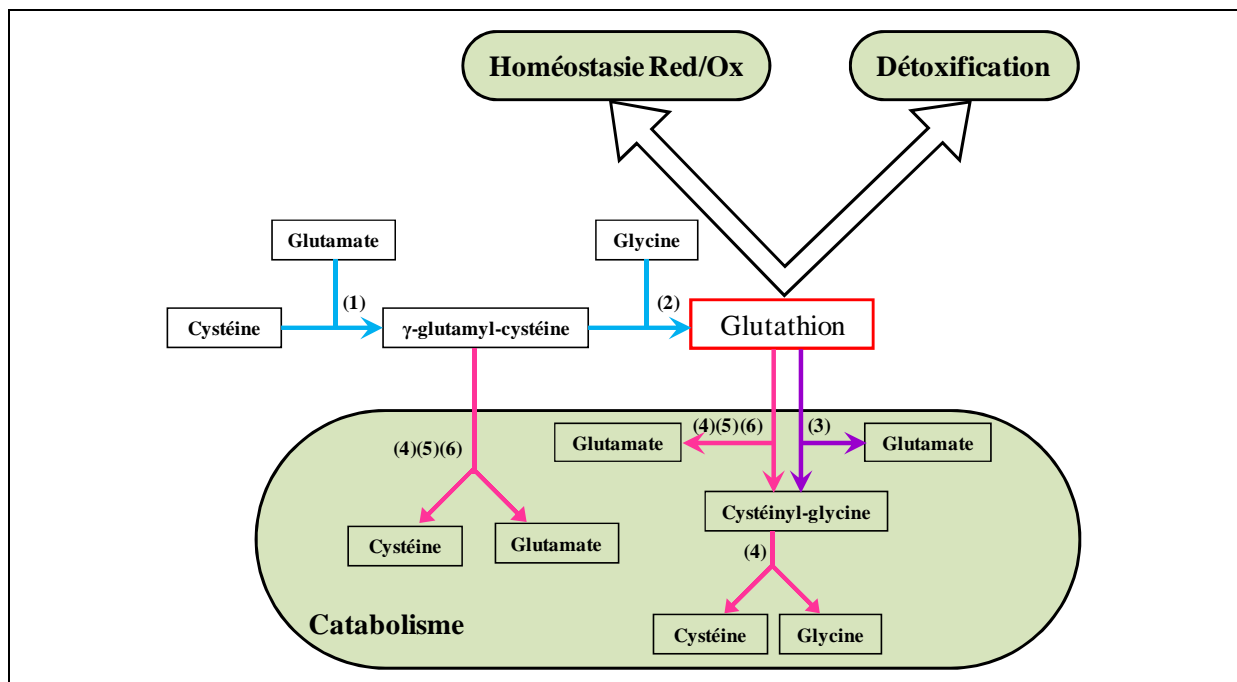


Figure 8. Métabolisme du glutathion.

En bleu : Synthèse du glutathion. (1) γ -glutamylcystéine synthétase, (2) glutathion synthétase.

En violet : Catabolisme du glutathion. (3) γ -glutamyltranspeptidase.

En rose : Catabolisme, voie alternative. (4) Cys-Gly métallo-di-peptidase, (5) probable di- et tri-peptidase, (6) probable glutamine amidotransferase.

I. C. 3. Protection

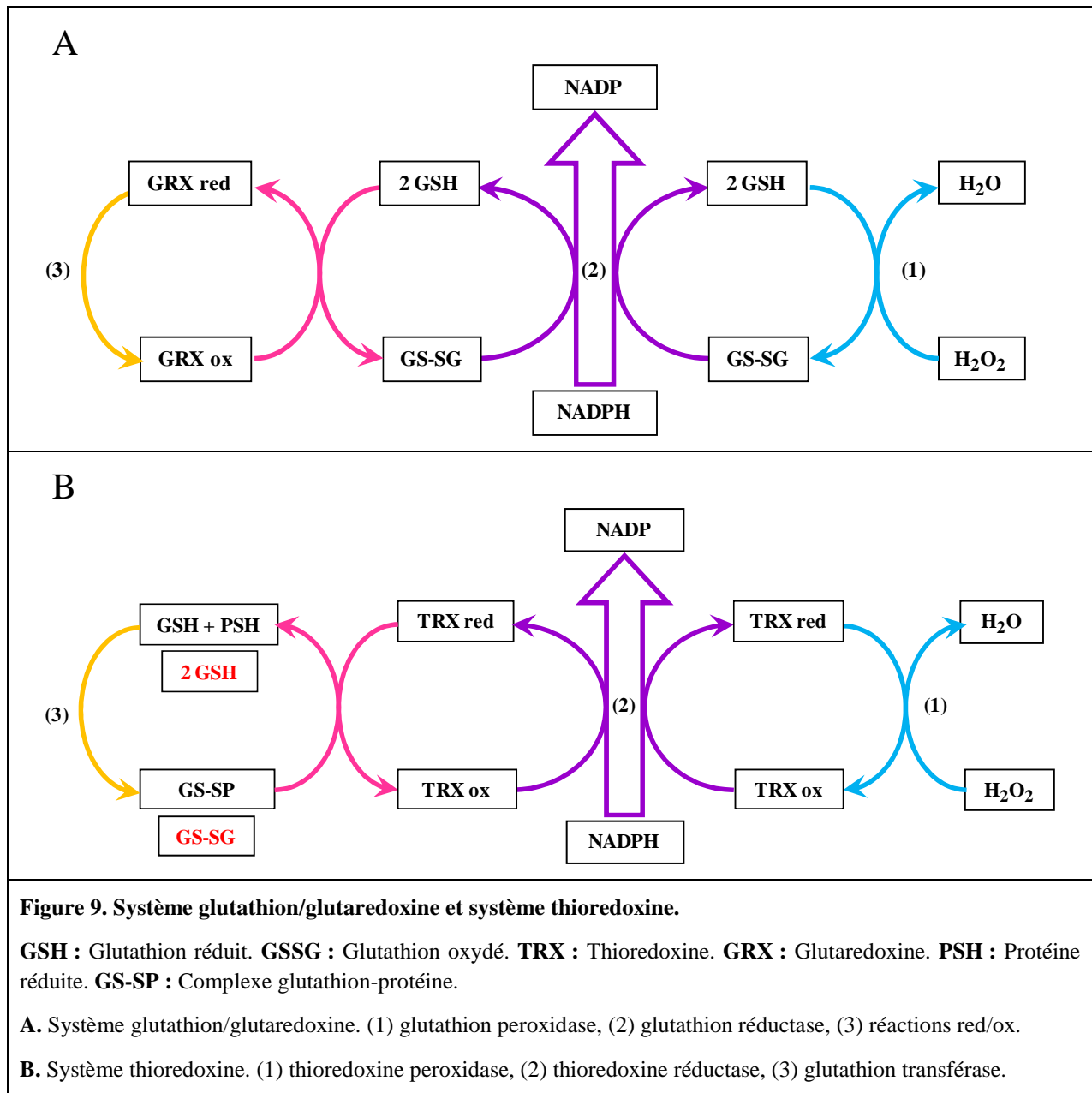
Le maintien de l'homéostasie redox est primordial. En effet, la perturbation de cet équilibre par un stress oxydatif provoque des dommages cellulaires irréversibles, qui peuvent même induire l'apoptose. Ainsi, pour contrecarrer les stress oxydatifs de nombreux systèmes coexistent dans la cellule. Chez *S. cerevisiae*, deux de ces systèmes sont reliés au glutathion : le système glutathion/glutaredoxine et le système thioredoxine (Figure 9) (Carmel-Harel & Storz, 2000; Grant, 2001; Toledano *et al.*, 2007).

Ce sont les fonctions $-SH$ (cystéine libre) du glutathion, des glutaredoxines et des thioredoxines qui permettent le maintien de l'homéostasie redox par réduction des radicaux oxydés libres. Ces réactions sont effectuées par des glutathion peroxidases et des thioredoxine peroxidases (Figure 9). Le glutathion, les glutaredoxines et les thioredoxines sont ensuite régénérés par réduction. Le système thioredoxine est fortement impliqué dans la défense contre le stress oxydatif (O_2 , H_2O_2) (Tableau 1).

La réduction des glutaredoxines et des thioredoxines est respectivement dépendante et indépendante du glutathion. Ainsi, les thioredoxines sont réduites de manière analogue au

glutathion, par une réductase spécifique dépendante du NADPH (codée par *GLR1* pour le glutathion et par *TRR1* et *TRR2* pour les thioredoxines). Il a été montré que le système thioredoxine est capable de réduire le glutathion *in vivo* (Tan *et al.*, 2010).

Le glutathion peut prévenir l'oxydation irréversible de protéines possédant des cystéines libres par glutathionylation. Le glutathion forme en effet un pont di-sulfure avec les protéines, les protégeant ainsi du stress oxydatif. Les protéines et le glutathion sont ensuite régénérés par le système thioredoxine (Greetham *et al.*, 2010).



Le glutathion est aussi impliqué dans la détoxification du cadmium, système très étudié notamment chez *S. cerevisiae* (Tableau 2) (Mendoza-Cozatl *et al.*, 2005; Baudouin-Cornu & Labarre, 2006).

Chez *S. cerevisiae*, le cadmium entre dans la cellule par le transporteur zinc (Figure 10) (Gomes *et al.*, 2002), ainsi que par les transporteurs de cations divalents (Gardarin *et al.*, 2010). La présence du cadmium induit des changements radicaux dans l'utilisation du soufre. Les flux sont augmentés et redirigés vers la synthèse de glutathion. En parallèle, les protéines riches en soufre sont remplacées par des isoenzymes pauvres en soufre (Fauchon *et al.*, 2002). Ainsi, le soufre économisé est disponible pour la synthèse du glutathion. Le pool de glutathion doit en effet être important pour lutter contre le stress cadmium. La détoxification commence par la neutralisation d'une molécule de cadmium par deux molécules de glutathion. Ce complexe est ensuite transporté dans la vacuole par un transporteur spécifique codé par *YCF1*. L'assimilation du cadmium est régulée par le pool cytoplasmique de glutathion-cadmium. En effet, si le transport vacuolaire est non fonctionnel, ce complexe s'accumule et réprime le transporteur zinc (Gomes *et al.*, 2002).

La détoxification de l'arsenite a aussi été étudiée chez *S. cerevisiae* (Tableau 1). Comme pour le cadmium, le métabolisme du soufre est induit et les pools d'intermédiaires soufrés sont augmentés. Il a aussi été observé que l'incorporation du soufre dans les protéines diminue en présence d'arsenite.

Dans la section suivante, nous discuterons des mécanismes de dégradation du glutathion et de ses conjugués.

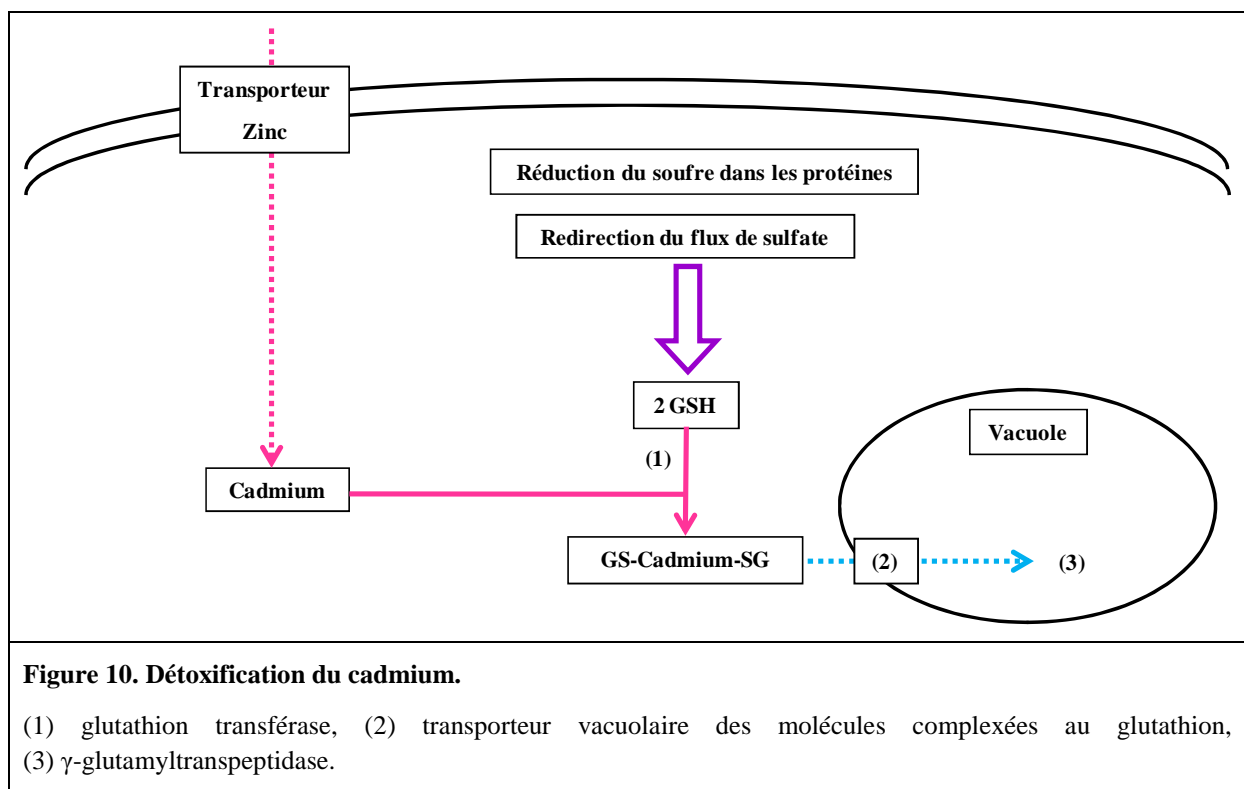


Tableau 1. Stress H₂O₂ et arsenite.

Etude	Stress	Gènes	Techniques globales	Observations-Conclusions
(Godon <i>et al.</i> , 1998)	H ₂ O ₂	-	Protéomique	L'exposition à l' H ₂ O ₂ induit de nombreuses protéines antioxydantes, dont le système thioredoxine.
(Delaunay <i>et al.</i> , 2000)	H ₂ O ₂	<i>YAPI</i>	-	L'activateur transcriptionnel codé par <i>YAPI</i> est autorégulé. Cette molécule est activée sous l'effet oxydatif de l' H ₂ O ₂ , qui provoque la formation d'un pont disulfure entre deux cystéines. Ceci induit un changement de la conformation protéique et par conséquent son accumulation nucléaire, permettant ainsi l'activation des gènes qu'il contrôle, dont le système thioredoxine qui le régulera par réduction.
(Le Moan <i>et al.</i> , 2006)	O ₂ H ₂ O ₂	-	Protéomique	Mise en évidence des protéines possédant des thiols oxydés en croissance en oxygène. Un stress oxydatif par de l'H ₂ O ₂ induit une augmentation de l'oxydation de ces mêmes protéines mais pas l'apparition de nouvelles protéines oxydées.
(Thorsen <i>et al.</i> , 2007)	Arsenite	<i>YAPI</i> <i>MET4</i>	Transcriptomique Protéomique Métabolomique	En présence d'arsenite, le métabolisme du soufre est induit (augmentation des transcrits et des protéines). Les pools des intermédiaires soufrés augmentent et l'incorporation du soufre dans les protéines diminue en présence d'arsenite. La réponse induite par l'arsenite dépend des facteurs de transcription codés par <i>YAPI</i> et <i>MET4</i> .

Tableau 2. Stress cadmium.

Etude	Gènes	Techniques globales	Observations-Conclusions
(Wemmie <i>et al.</i> , 1994)	<i>YCF1</i>	-	Le transporteur vacuolaire codé par <i>YCF1</i> transporte le complexe cadmium-glutathion.
(Dormer <i>et al.</i> , 2000)	<i>MET4</i> <i>GSH1</i>	-	L'induction de l'expression de <i>GSH1</i> en cadmium implique le complexe régulateur du métabolisme du soufre.
(Vido <i>et al.</i> , 2001)	<i>YAP1</i> <i>GSH1</i> <i>CYS3</i>	Protéomique	<u>Protéines induites</u> : assimilation du sulfate, synthèse du glutathion, protéines de stress et antioxydantes, dont le système thioredoxine qui est sous contrôle de l'activateur transcriptionnel codé par <i>YAP1</i> . Le glutathion et le système thioredoxine sont importants dans la réponse au cadmium.
(Fauchon <i>et al.</i> , 2002)	<i>MET4</i>	Transcriptomique Protéomique	En présence de cadmium, le flux de soufre est redirigé vers la synthèse du glutathion. Les protéines riches en soufre sont remplacées par des isozymes pauvres en soufre. Le régulateur codé par <i>MET4</i> joue un rôle important dans cette réponse.
(Gomes <i>et al.</i> , 2002)	<i>ZRT1</i> <i>GSH1</i> <i>YAP1</i>	-	L'assimilation du cadmium est régulée par le pool cytoplasmique de complexe cadmium-glutathion. Le cadmium entre dans la cellule en partie par le transporteur zinc codé par <i>ZRT1</i> .
(Barbey <i>et al.</i> , 2005)	<i>MET4</i>	-	Le régulateur codé par <i>MET4</i> est nécessaire pour la mise en place de la défense contre le cadmium. Le cadmium interagit avec le complexe régulateur de <i>MET4</i> , permettant une réponse rapide à ce stress.
(Lafaye <i>et al.</i> , 2005)	-	Protéomique Métabolomique	En présence de cadmium, le flux de soufre est redirigé vers la synthèse du glutathion, ce qui est corrélé avec une augmentation du pool de glutathion.
(Adamis <i>et al.</i> , 2009)	<i>GTT2</i> <i>YCF1</i> <i>ECM38</i>	-	La compartimentation vacuole / cytosol est importante dans la résistance au cadmium.

I. C. 4. Dégradation

Le glutathion, qui est un métabolite présent en grande quantité au niveau cellulaire, peut servir comme réserve de soufre. La dégradation du glutathion est aussi nécessaire lors du processus de détoxification des xénobiotiques. Chez *S. cerevisiae*, le glutathion peut être dégradé par une γ -glutamyltranspeptidase vacuolaire, codée par *ECM38* (Jaspers & Penninckx, 1984; Mehdi *et al.*, 2001).

Kumar *et al* ont montré qu'il existe une autre voie de dégradation du glutathion (Kumar *et al.*, 2003). En effet, une souche déficiente en γ -glutamyltranspeptidase est capable de croître sur glutathion comme seule source de soufre. La voie alternative de dégradation du glutathion a récemment été mise en évidence par Ganguli *et al.* (Ganguli *et al.*, 2007). Cette voie implique trois enzymes, une cys-gly métallo-di-peptidase, une probable di- et tri-peptidase et une probable glutamine amidotransférase, codées par les gènes *DUG1*, *DUG2* et *DUG3* respectivement.

La cys-gly métallo-di-peptidase est suffisante pour dégrader l' α -glutathion et le cystéinyl-glycine. Par contre la présence des trois enzymes est indispensable à la dégradation du γ -glutamyl-cystéine et du γ - glutathion. La haute affinité de la cys-gly métallo-di-peptidase pour le cystéinyl-glycine a été confirmée. L'orthologue de *S. pombe* est la seule enzyme responsable de la dégradation du cystéinyl-glycine (Kaur *et al.*, 2009). Cette cys-gly métallo-di-peptidase est aussi impliquée dans la détoxification des xénobiotiques (Ubiyovk *et al.*, 2006).

I. D. **Biosynthèse de la méthionine**

I. D. 1. Transport

La méthionine est un acide aminé essentiel qui peut être directement prélevé du milieu extérieur par différents transporteurs soit synthétisé par le micro-organisme. Chez *Saccharomyces cerevisiae*, il existe deux transporteurs spécifiques de la méthionine. Ces transporteurs à forte et à faible affinité sont codés par *MUP1* et *MUP3* respectivement (Isnard *et al.*, 1996).

La méthionine peut aussi être transportée par des perméases moins spécifiques, telles que la perméase générale codée par *GAPI* (Grenson *et al.*, 1970). Lors de l'analyse de quinze perméases à acides aminés chez *S. cerevisiae*, Regenber *et al* ont montré que quatre de ces

perméases (codées par *GNP1*, *BAP2*, *BAP3* et *AGP1*) sont impliquées dans le transport de la méthionine. En effet, la surexpression de ces gènes a pour conséquence une augmentation de l'assimilation de méthionine d'un facteur entre deux et six (Regenberg *et al.*, 1999).

Le transport de la forme activée de la méthionine, la *S*-adénylméthionine, a été mis en évidence chez *S. cerevisiae*. Rouillon *et al.* ont caractérisé une *S*-adénylméthionine perméase à haute affinité, codée par le gène *SAM3* (Rouillon *et al.*, 1999).

I. D. 2. Cycle du méthyle

Le cycle du méthyle (Figure 11) conduit à la formation de méthionine et de sa forme activée la *S*-adénylméthionine (SAM). Cette dernière molécule possède une place importante dans le métabolisme cellulaire global, en intervenant dans de nombreuses réactions, en tant que donneur de méthyle, de méthylène, de ribosyl, de groupe amine, d'aminopropyl et de radical 5'-désoxyadényl (Fontecave *et al.*, 2004). La SAM est le premier donneur de méthyle, et son rôle est certainement encore sous-estimé (Katz *et al.*, 2003).

Il existe deux familles d'enzymes permettant la formation de méthionine par la méthylation de l'homocystéine : les méthionine synthases dépendantes de la cobalamine (vitamine B12) et les méthionine synthases indépendantes de la cobalamine. Les mammifères ne possèdent que des méthionine synthases dépendantes de la cobalamine, tandis que les plantes, les champignons et certaines bactéries ne possèdent que des méthionine synthases indépendantes de la cobalamine. Les micro-organismes possédant uniquement une enzyme indépendante à la cobalamine évoluent souvent dans des milieux où la disponibilité en cobalamine est faible, ou n'ont pas la capacité de l'assimiler ou de la synthétiser. Ces deux familles d'enzymes ne présentent pas de similarité de séquence, suggérant un mécanisme d'évolution convergente (González *et al.*, 1992). L'étude de ces deux familles a été facilitée par la coexistence de ces enzymes chez *Escherichia coli*.

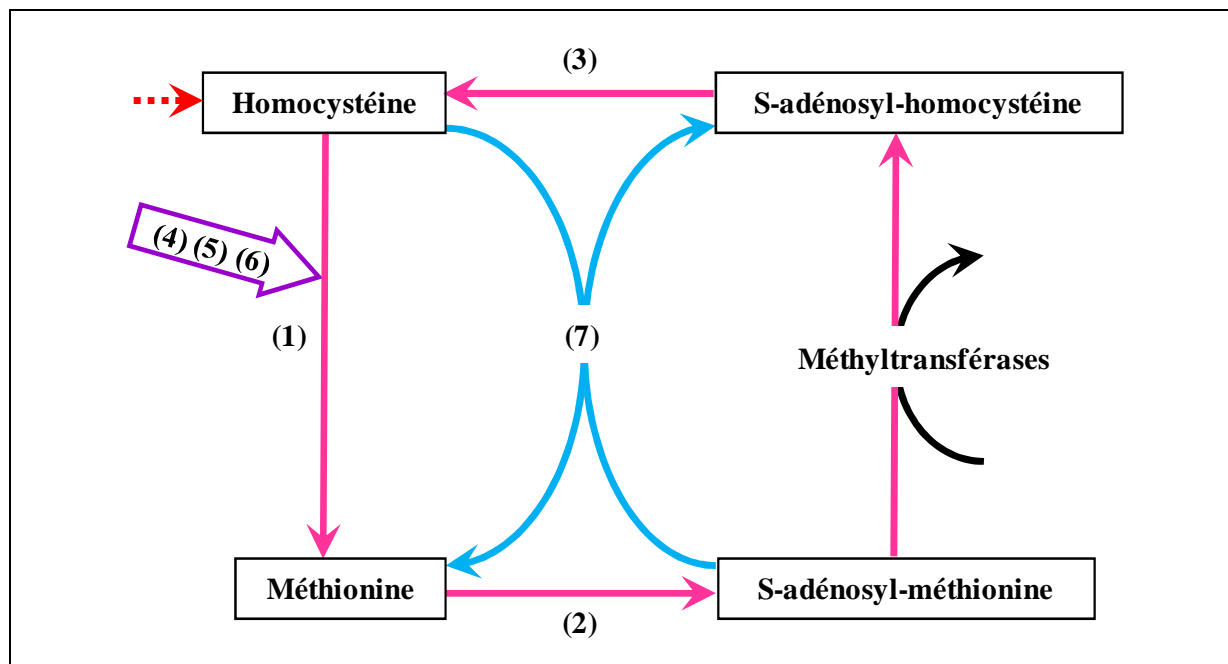


Figure 11. Cycle du méthyle.

En rose : Cycle du méthyle. (1) méthionine synthase, (2) S-adenosylméthionine synthétase, (3) S-adenosylhomocystéine hydrolase.

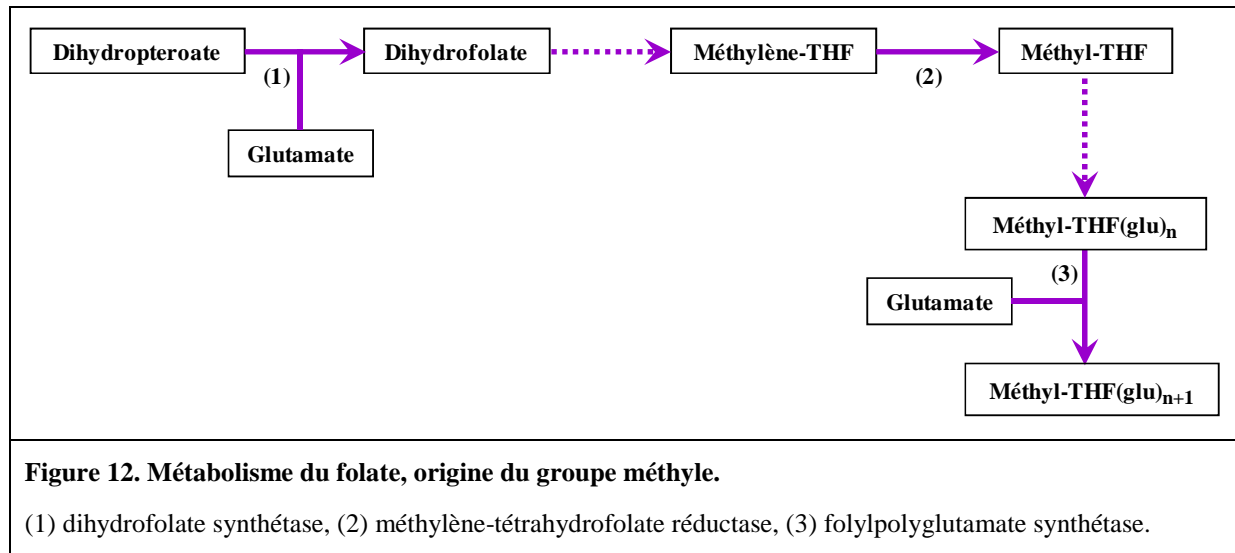
En violet : Métabolisme du folate, origine du groupe méthyle. (4) dihydrofolate synthétase, (5) méthylène-tétrahydrofolate réductase, (6) folylpolyglutamate synthétase.

En bleu : Voie de régulation du ratio Méthionine/SAM. (7) S-adenosylméthionine-homocystéine méthyltransférase.

La méthionine synthase indépendante de la cobalamine (codée par *MET6*) a été caractérisée chez les levures *S. cerevisiae* et *Candida albicans* (Suliman *et al.*, 2005). Il a été démontré que ces enzymes transfèrent le groupement méthyle du méthyltétrahydrofolate-polyglutamate à l'homocystéine pour former la méthionine.

Le méthyle transféré par la méthionine synthase provient du métabolisme du folate (Figure 12). La dihydrofolate synthétase fixe le premier glutamate sur le dihydropteroate, conduisant à la production de dihydrofolate. Le méthylène-tétrahydrofolate (méthylène-THF) est synthétisé après plusieurs étapes, dirigeant le métabolisme du folate vers le celui de la méthionine. Cette molécule est ensuite réduite en méthyl-THF sous l'action d'une méthylène-tétrahydrofolate réductase. Plusieurs résidus glutamate seront ensuite fixés sur le méthyl-THF par une folylpolyglutamate synthétase, pour enfin former le méthyltétrahydrofolate-polyglutamate. Cette voie a été décrite chez *S. cerevisiae*, où les rôles de la dihydrofolate synthétase et de la folylpolyglutamate synthétase, codées par *FOL3* et *MET7* respectivement, ont été caractérisés (Cherest *et al.*, 2000). Il a été mis en évidence que *S. cerevisiae* possède deux méthylène-tétrahydrofolate réductases, codées par *MET12* et *MET13* (Raymond *et al.*,

1999). L'enzyme codée par *MET13* serait la méthylène-tétrahydrofolate réductase principale, car la délétion de *MET13* cause une auxotrophie à la méthionine, tandis que celle de *MET12* n'induit pas de phénotype particulier.



La méthionine ainsi formée peut être activée en *S*-adénylméthionine par une *S*-adénylméthionine synthétase. Chez *S. cerevisiae*, deux SAM synthétases ont été identifiées. La présence de deux SAM synthétases a été suggérée pour la première fois par Chiang *et al.* (Chiang & Cantoni, 1977). L'analyse de mutants de *S. cerevisiae* a montré que deux mutations sont nécessaires pour obtenir une auxotrophie pour la SAM (Cherest & Surdin-Kerjan, 1978). Cherest *et al.* ont montré que les SAM synthétases de *S. cerevisiae* forment des homodimères *in vitro* (Cherest & Surdin-Kerjan, 1981). La formation d'hétérodimères reste hypothétique, cependant les travaux précédents de Cherest *et al.* suggèrent que l'hétérodimère formé par les SAM synthétases serait la forme la plus active *in vivo* (Cherest *et al.*, 1973; Cherest & Surdin-Kerjan, 1978).

Plusieurs études ont montré que les gènes codant pour les deux SAM synthétases de *S. cerevisiae* ne sont pas soumis au même type de régulation (Thomas *et al.*, 1988; Thomas & Surdin-Kerjan, 1991). Le gène *SAM1* semble être régulé de façon similaire aux gènes de biosynthèse de la méthionine via un motif conservé. Ce motif est aussi retrouvé en amont du gène *SAM2*. Cependant, la présence d'un autre motif, retrouvé habituellement en amont de gènes impliqués dans la biosynthèse des phospholipides, peut contribuer à l'explication de ces différences de régulation. Les gènes présentant ce motif sont en effet réprimés par l'ajout de myo-inositol ou de choline (Kodaki *et al.*, 2003).

Le gène codant pour la SAM synthétase de *Neurospora crassa* a été caractérisé. Cette enzyme est particulièrement bien conservée chez les bactéries, les champignons et les eucaryotes pluricellulaires (Mautino *et al.*, 1996).

Les réactions utilisant la SAM comme donneur de méthyle produisent de la S-adénosylhomocystéine (SAH), qui peut être transformée en homocystéine par la S-adénosylhomocystéine hydrolase et ainsi clore le cycle du méthyle (Figure 11). Chez *S. cerevisiae*, la S-adénosylhomocystéine hydrolase, codée par le gène *SAH1*, est aussi régulée comme les gènes impliqués dans la biosynthèse des phospholipides (Tehlivets *et al.*, 2004).

Chez *S. cerevisiae*, le ratio Méthionine/SAM est régulé par deux enzymes, une SAM-homocystéine méthyltransferase et une S-méthylméthionine-homocystéine méthyltransferase, codées par *SAM4* et *MHT1* respectivement (Thomas *et al.*, 2000). La forme active de la SAM, produite par la SAM synthétase est la (S,S)-SAM. Cependant, la forme racémique (R,S)-SAM peut être générée spontanément à partir de la forme (S, S)-SAM. La formation de la (R,S)-SAM est problématique pour la cellule, car elle n'est pas utilisée par la cellule et peut inhiber les réactions avec la (S,S)-SAM si elle est accumulée. Les enzymes codées par *SAM4* et *MHT1* ont été décrites comme impliquées dans l'élimination de la (R,S)-SAM, car elles catalysent préférentiellement la (R,S)-SAM (Vinci & Clarke, 2007).

I. E. Synthèse des polyamines et cycle du méthylthioadénosine

Il est difficile de parler du métabolisme du soufre sans aborder celui des polyamines. En effet, ces molécules non soufrées sont étroitement liées au métabolisme du soufre. La voie des polyamines est initiée à partir de la SAM, confirmant l'intérêt majeur de ce composé dans le métabolisme global de la cellule.

I. E. 1. Transport

Il a été récemment démontré que le transport des polyamines chez *S. cerevisiae* est principalement effectué par l'intermédiaire de deux perméases, codées par *SAM3* et *DUR3* (Igarashi & Kashiwagi, 2010). La S-adénosylméthionine perméase n'est donc pas uniquement impliquée dans le transport de la SAM, mais aussi des polyamines (Uemura *et al.*, 2007).

I. E. 2. Synthèse des polyamines

Chez *S. cerevisiae*, la synthèse des polyamines nécessite l'intervention de quatre enzymes (Figure 13). Tout d'abord, une SAM décarboxylase, codée par *SPE2*, génère de la S-adénylméthioninamine à partir de la SAM. Cette molécule est le substrat d'une spermidine synthase et d'une spermine synthase, codées par *SPE3* et *SPE4*, conduisant respectivement à la production de spermidine et de spermine. La synthèse de ces deux polyamines nécessite la formation de putrescine. Cette molécule est produite à partir d'ornithine par une ornithine décarboxylase, codée par *SPE1*. L'ornithine, dont le précurseur est l'arginine, est synthétisée au niveau du cycle de l'urée.

Hamasaki *et al.* ont montré qu'un mutant déficient en spermidine synthase est auxotrophe pour les polyamines tandis qu'un mutant déficient en spermine synthase n'est pas affecté dans sa croissance (Hamasaki-Katagiri *et al.*, 1997, 1998). Ce phénomène peut être dû à un rôle physiologique plus important de la spermidine par rapport à la spermine, mais aussi au fait que le mutant Δ *SPE3* est non seulement déficient en spermidine mais aussi en spermine.

Le rôle des polyamines semble plus important en croissance en aérobiose. Un mutant Δ *SPE2* présente en effet des anomalies cellulaires plus conséquentes en aérobiose (Balasundaram *et al.*, 1991). Il a en effet été montré que la croissance d'un mutant en aérobiose accumule des radicaux oxygénés libres, entraînant la mort cellulaire (Chattopadhyay *et al.*, 2006). Cet effet peut être limité par une croissance en anaérobiose, ainsi que par ajout de spermine lors d'une croissance en aérobiose. Ces résultats confirment ceux de Balasundaram *et al.* qui ont montré que la croissance d'un mutant Δ *SPE2* en aérobiose provoque la perte définitive de la capacité respiratoire, suggérant des dommages mitochondriaux liés à l'oxygène (Balasundaram *et al.*, 1993). Une des fonctions des polyamines serait donc de protéger la cellule contre le stress oxydatif.

Il a aussi été observé qu'un mutant Δ *SPE2* présente une sensibilité accrue aux températures élevées (Balasundaram *et al.*, 1996). Ceci indique que le rôle protecteur des polyamines contre les dommages cellulaires est sûrement encore très sous-estimé.

Une étude visant à déterminer l'importance des polyamines au niveau cellulaire a récemment été réalisée, en utilisant la technologie des puces à ADN (Chattopadhyay *et al.*, 2009). Pour étudier l'effet de la spermidine et de la spermine de façon indépendante, Chattopadhyay *et al.* ont construit un double mutant de *S. cerevisiae*. Les résultats montrent qu'une supplémentation en spermine d'un mutant Δ *SPE3* peut en effet être faussée par la

présence d'une enzyme capable de convertir la spermine en spermidine. Cette enzyme est une polyamine oxydase codée par le gène *FMS1*. Ces expériences ont donc été conduites dans un mutant $\Delta SPE3 \Delta FMS1$. Il a été observé que l'ajout de spermine n'a que peu d'effet, alors que l'ajout de spermidine modifie fortement le transcriptome.

Les enzymes codées par *SPE3* et *SPE4* produisent non seulement de la spermidine et de la spermine, mais aussi de la méthylthioadénosine. Ce composé, qui est impliqué dans le métabolisme de l'adénine, peut aussi servir de précurseur pour la synthèse de méthionine (Cone *et al.*, 1982). Cette voie, appelée cycle du méthylthioadénosine (ou recyclage de la méthionine), est décrite dans la section suivante.

I. E. 3. Cycle du méthylthioadénosine

Le cycle du méthylthioadénosine (MTA) a récemment été identifié chez *S. cerevisiae* (Figure 13). Cette voie de synthèse de la méthionine via le recyclage du MTA est une alternative moins coûteuse en énergie que la voie d'assimilation du sulfate. Les enzymes impliquées ont été précisément identifiées par Pirkov *et al.* (Pirkov *et al.*, 2008). Toutes les étapes de cette voie dépendent d'une enzyme spécifique, excepté la dernière qui peut être réalisée par différentes aminotransférases. Il a été mis en évidence que le cycle du MTA présente des variantes chez les bactéries, certaines étapes pouvant être réalisées en une étape au lieu de deux (Sekowska *et al.*, 2004).

Chez *S. cerevisiae*, le MTA est tout d'abord transformé en méthylthio-ribose 1-P par une méthylthioadénosine phosphorylase codée par *MEU1*. Le méthylthio-ribose 1-P subit ensuite une isomérisation puis une déshydratation, réalisées par une méthylthioribose-1-phosphate isomérase (codée par *MRI1*) et une méthylthioribulose-1-phosphate déshydratase (codée par *MDE1*) respectivement. Deux autres réactions sont nécessaires à la formation d'acide 2-céto-4-méthylthiobutyrique (KMBA), qui est le dernier intermédiaire avant la synthèse de méthionine. Ces réactions sont réalisées par une énolase-phosphatase (codée par *UTR4*) et une aciréductone dioxygénase (codée par *ADII*). La formation de méthionine à partir du KMBA dépend principalement de deux catégories d'enzymes, les aminotransférases à acides aminés branchés (codées par *BAT1* et *BAT2*) et aromatiques (codées par *ARO8* et *ARO9*).

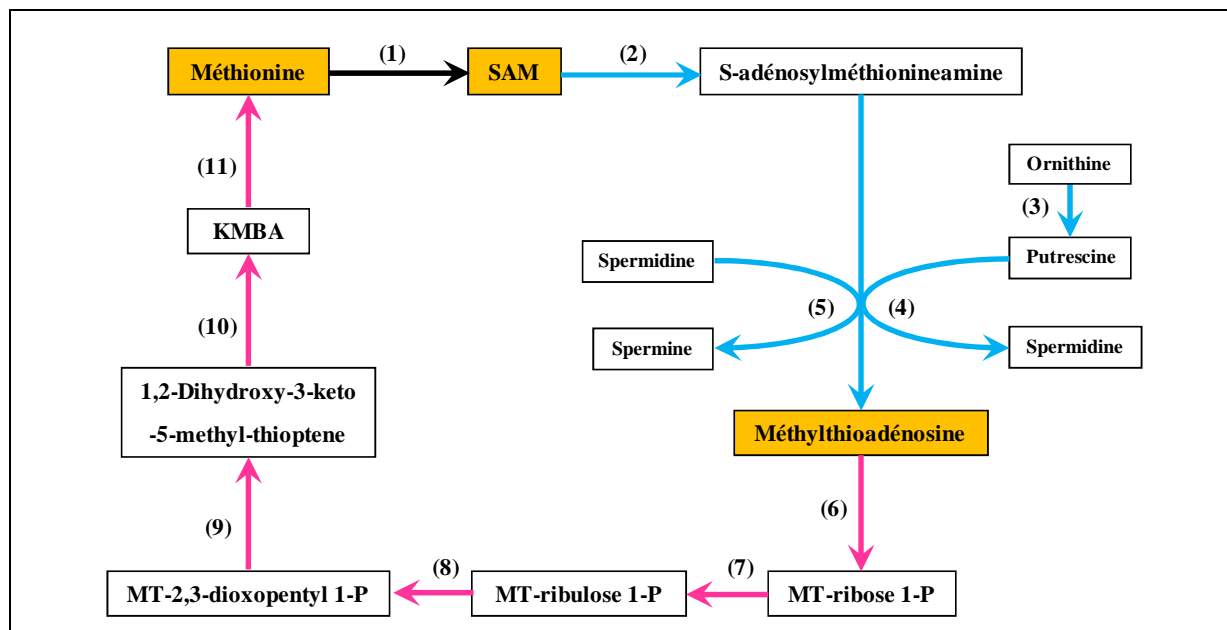


Figure 13. Synthèse des polyamines et cycle du méthylthioadénosine.

(1) *S*-adénosylméthionine synthétase.

En bleu : Synthèse des polyamines. (2) *S*-adénosylméthionine décarboxylase, (3) ornithine décarboxylase, (4) spermidine synthase, (5) spermine synthase.

En rose : Cycle du méthylthioadénosine. (6) méthylthioadénosine phosphorylase, (7) méthylthioribose-1-phosphate isomérase, (8) méthylthioribulose-1-phosphate déshydratase, (9) éno-lase-phosphatase, (10) aciréductone dioxigénase, (11) aminotransférase.

En orange : Molécules initiales et finales des deux voies étudiées.

I. F. Régulation

I. F. 1. Système de régulation

Dans les sections précédentes, nous avons vu l'importance du métabolisme du soufre pour la cellule. Par conséquent la régulation de ce métabolisme a été très étudiée, notamment chez *S. cerevisiae*. Cette régulation est complexe, car elle est non seulement due à un activateur transcriptionnel spécifique du métabolisme du soufre (codé par *MET4*), mais aussi à deux autres activateurs transcriptionnels impliqués dans la réponse globale aux carences en acides aminés (codé par *GCN4*) (Natarajan *et al.*, 2001) et aux stress oxydatifs (codé par *YAP1*) (Wheeler *et al.*, 2003).

Le métabolisme du soufre est aussi régulé au niveau de son utilisation dans les protéines. Il a été observé que dans les enzymes impliquées dans le métabolisme du soufre, les acides aminés soufrés sont sous-représentés (Baudouin-Cornu *et al.*, 2001; Perlstein *et al.*, 2007). De plus, le contenu global en résidus cystéine des protéines de *S. cerevisiae* est plus faible que chez la plupart des autres eucaryotes étudiés (*Caenorhabditis elegans*, *Dictyostelium*

discoideum, *Drosophila melanogaster*, *Gallus gallus*, *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Sus scrofa*) (Scheibel *et al.*, 1997). Tous les organismes étudiés qui possèdent une voie d'assimilation du sulfate (*Arabidopsis thaliana*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Candida albicans*, *Aspergillus nidulans*, *Saccharomyces cerevisiae*) présentent une composition protéique plus faible en résidus cystéine, suggérant un phénomène d'adaptation contre le stress provoqué par le chromate. De plus, cette voie étant très coûteuse en énergie, une faible proportion de résidus cystéine au sein des protéines présenterait un avantage non négligeable pour le développement de ces organismes.

Le régulateur codé par *MET4* ne peut pas se lier directement à l'ADN. La réponse via cet activateur transcriptionnel est donc modulée par la formation de complexes avec différents auxiliaires (codés par *CBF1*, *MET28*, *MET31* et *MET32*) (Kuras & Thomas, 1995; Blaiseau *et al.*, 1997; Blaiseau & Thomas, 1998). L'implication de chacune de ces protéines auxiliaires dans le mécanisme de régulation a été déterminée par délétion de chaque composant indépendamment (Lee *et al.*, 2010). Lee *et al.* ont identifié 45 cibles de Met4p, qui constituent le régulon principal, ainsi que le complexe impliqué dans la régulation de chaque cible. Cette étude a révélé que la présence de Met31p et Met32p est essentielle à l'expression du régulon. La présence de Met28p ou Cbf1p n'influe que sur l'expression d'une partie du régulon. La formation de différents complexes permet de moduler l'expression du métabolisme du soufre. Il a été mis en évidence que les cofacteurs SAGA et Médiateur, qui facilitent le recrutement de l'ARN polymérase II, sont impliqués dans l'expression des cibles de Met4p (Leroy *et al.*, 2006).

La régulation de Met4p se fait via le complexe de polyubiquitinylation SCF^{Met30p}. La polyubiquitinylation de Met4p a lieu au niveau de la lysine 163. Les liaisons entre les molécules d'ubiquitine se fait au niveau de la lysine 48, qui est en général caractéristique d'un adressage spécifique au protéasome. Cependant, la polyubiquitinylation induit la dégradation de Met4p uniquement en milieu minimum (Kaiser *et al.*, 2000; Flick *et al.*, 2004; Menant *et al.*, 2006). Il a été déterminé qu'en milieu riche la chaîne d'ubiquitine fixée à Met4p est plus courte. Met4p oligo-ubiquitinylé n'est plus impliqué dans l'activation des gènes « MET », mais reste impliqué dans l'expression des gènes « SAM » (Kuras *et al.*, 2002). En effet, même en milieu riche, la production de *S*-adénosylméthionine reste indispensable à la cellule.

L'effecteur de la régulation des gènes « MET » a été recherché parmi les molécules clefs du métabolisme du soufre. Il a été démontré que le pool de cystéine joue un rôle primordial dans la régulation du métabolisme du soufre (Hansen & Johannesen, 2000).

I. F. 2. Effet des apports nutritionnels sur la régulation

Des études transcriptomiques réalisées chez *S. cerevisiae* ont mis en relief cette régulation (Tableau 3).

Etude	Condition	Observations-Conclusions
(Boer <i>et al.</i> , 2003)	Limitation en soufre (sulfate)	La réponse à une carence en soufre induit une surexpression des gènes codant pour des transporteurs de molécules soufrées diverses ainsi que de nombreux gènes impliqués dans le métabolisme du soufre.
(Tai <i>et al.</i> , 2005)	Limitation en soufre (sulfate)	Une limitation en soufre induit une surexpression des gènes impliqués dans le métabolisme du soufre de façon similaire en aérobie et anaérobie.
(Boer <i>et al.</i> , 2007)	Comparaison de sources d'azote (dont la méthionine), La source de soufre utilisée est le sulfate	L'utilisation de la méthionine comme source d'azote induit la répression du métabolisme du soufre ainsi que des gènes codant pour des transporteurs de molécules soufrées. Ceci suggère que la méthionine est la source de soufre préférée de <i>S. cerevisiae</i> .

Tableau 3. Métabolisme du soufre, effets des apports nutritionnels.

Nous avons donc vu dans les parties précédentes que le métabolisme du soufre a un rôle primordial au niveau cellulaire. Dans les sections suivantes, nous allons aborder une autre dimension de ce métabolisme à travers son implication dans la production d'aliments fermentés et plus spécifiquement la thématique technologique fromagère. Pour cela, nous rappellerons tout d'abord les grands principes de la fabrication fromagère, puis nous développerons le rôle des micro-organismes et l'implication du métabolisme du soufre dans la qualité de ces produits.

II. FROMAGE, SOUFRE ET ECOSYSTEME

Dans cette section, nous allons décrire la diversité des processus de fabrication permettant de générer la diversité fromagère que nous connaissons. Nous aborderons ensuite les principaux genres de la flore d'affinage des fromages à pâte molle à travers leur implication dans la fabrication fromagère, et particulièrement dans la production d'arômes soufrés.

Bien que la matrice alimentaire soit très différente, les composés soufrés jouent aussi un rôle important dans la fabrication du vin et de la bière. Nous nous appuyerons donc sur cette source d'information complémentaire.

II. A. La fabrication fromagère, une source de diversité

La production fromagère se situe au carrefour de la culture et de la biologie. Issus d'un savoir faire acquis au cours des siècles, les fromages font en effet partie de notre patrimoine culturel. L'aspect biologique du fromage est retrouvé à trois niveaux : le domaine végétal (alimentation des animaux), le domaine animal (espèce et race des animaux producteurs de lait) et enfin le domaine microbiologique (flore : fermentation et affinage) (Berard & Marchenay, 2004).

Le lait est un aliment à hautes qualités nutritives, qui est cependant très périssable. La fabrication fromagère permet de répondre de façon avantageuse à ce problème. En effet, les qualités nutritionnelles du lait se retrouvent concentrées dans le fromage, qui se conserve plus longtemps tout en gagnant de nouvelles qualités organoleptiques.

Les premiers fromages sont apparus en même temps que la domestication des animaux, durant la Préhistoire. La diversité fromagère s'est ensuite largement développée au Moyen-Age par l'intermédiaire de l'activité Monastique à laquelle nous devons l'invention de nombreuses recettes fromagères, qui sont ensuite devenues des spécialités régionales, ainsi que la mise au point des premières techniques d'affinage. Au XV^e siècle, l'activité Paysanne a ensuite succédé à l'activité Monastique dans la fabrication fromagère, sous la pression des famines et des impôts laitiers. La découverte de la Pasteurisation au XIX^e siècle, suivie du développement de l'industrialisation au XX^e siècle, ont conduit à l'expansion de la production fromagère. Ceci a eu pour conséquence la mise en place de nombreuses réglementations telles que les normes d'hygiène, visant à protéger le consommateur, ainsi que l'apparition des appellations d'origine contrôlée (AOC), pour protéger l'héritage de l'Histoire : la diversité due au savoir-faire séculaire combinée à la variété des terroirs.

II. A. 1. Le lait

L'alimentation de l'animal joue un rôle primordial sur la qualité du lait (Coulon, 2000). En effet, la flaveur et la texture des fromages obtenus varie selon le type de pâturage ou de foin donné à l'animal. La composition du lait dépend non seulement de l'espèce animale (Tableau 4) mais aussi de la race. Cette composition influe sur les propriétés organoleptiques du fromage (Martin *et al.*, 2003).




	Eau	Extrait sec	Minéraux	Lactose	Lipides	Protéines	dont caséines
Vache 	900	130	8-10	45-50	35-40	30-35	27-30
Chèvre 	900	140	8-10	40-45	40-45	35-40	30-35
Brebis 	860	190	10-12	45-50	70-75	55-60	45-50

Tableau 4. Composition moyenne du lait (g/L).

Le lait cru contient une flore microbienne naturelle ainsi que des enzymes. Ces éléments participent pleinement à la fabrication des fromages au lait cru. Cependant, il a été observé que les normes d'hygiène, bien que nécessaires, appauvrissent le lait, notamment par l'usage de détergents. Cette flore naturelle fait pourtant partie du capital biologique du terroir. Ainsi, certains micro-organismes utiles et potentiellement bienfaisants risquent de disparaître avant d'avoir été identifiés et étudiés. La protection des fromages et des techniques de fabrication est donc nécessaire à la préservation d'une portion du monde vivant et des écosystèmes locaux (animaux, races, associations végétales, écosystèmes microbiens) (Berard & Marchenay, 2004).

Le lait peut êtreensemencé avec des micro-organismes dont les propriétés sont favorables à la fabrication fromagère. Le lait peut aussi être pasteurisé (62,8°C pendant 30 min ou 71,7°C pendant 15 sec) ou thermisé (62-65°C pendant 15-20 sec, parfois 1-2 min), ce qui

conduit à l'élimination de la flore naturelle. La fabrication des fromages au lait traité thermiquement dépend donc des ferments utilisés pour ensemercer le lait. Nous allons décrire dans les sections suivantes les principales étapes de la fabrication fromagère, qui sont résumées dans la Figure 14.

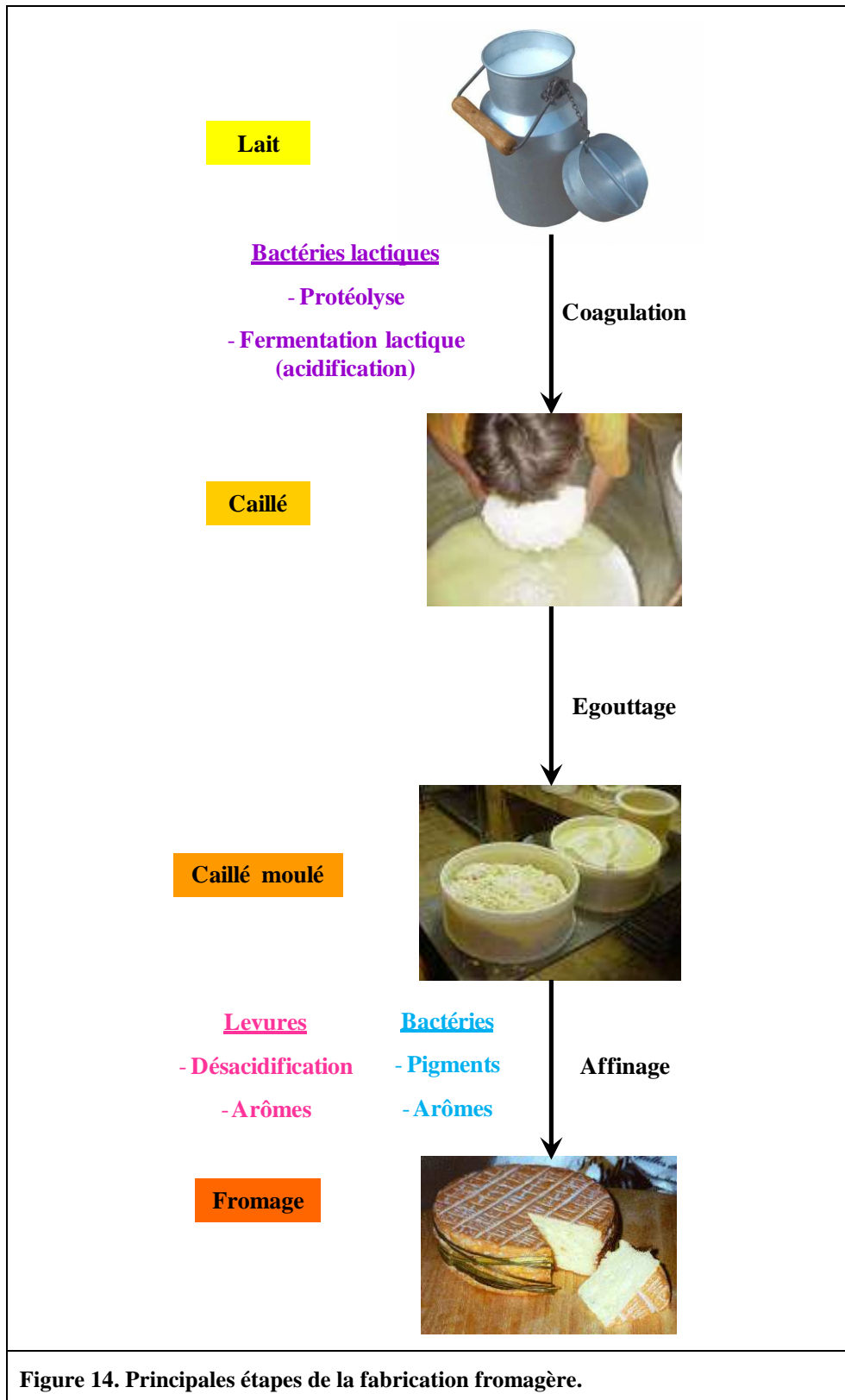


Figure 14. Principales étapes de la fabrication fromagère.

II. A. 2. Formation du caillé

La formation du caillé résulte de la coagulation des caséines du lait sous l'action de bactéries lactiques et/ou d'enzymes protéolytiques (présure, plasmine).

La présure est composée d'un mélange de deux enzymes issues de la caillette du jeune veau : la chymosine et la pepsine. Ces enzymes protéolytiques déstabilisent les caséines du lait provoquant ainsi leur coagulation. La plasmine contenue dans le lait cru peut aussi participer à cette réaction.

La formation du caillé sous l'action des bactéries lactiques est la conséquence de la fermentation du lactose en acide lactique. En effet, la production d'acide lactique provoque une chute de pH qui entraîne la coagulation des caséines. Les bactéries lactiques sont Gram positives, non mobiles, non sporulantes et anaérobies facultatives. Les genres *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* et *Streptococcus* sont généralement utilisés dans les processus fromagers (Fleet, 1999). Les genres *Lactobacillus*, *Lactococcus* et *Streptococcus* regroupent des bactéries de métabolisme homofermentaire (fermentation du lactose en acide lactique) tandis que les bactéries du genre *Leuconostoc* possèdent un métabolisme hétérofermentaire (fermentation du lactose en acide lactique, en éthanol et autres produits). Le genre de bactérie lactique choisi pour ensemer le lait dépend essentiellement du fromage fabriqué. En effet, les ferments lactiques doivent être en adéquation avec la technologie fromagère utilisée (vitesse d'acidification, métabolisme, température de croissance, tolérance au sel).

II. A. 3. Egouttage

L'étape d'égouttage va définir la teneur en eau du caillé, et ainsi le type de fromage obtenu. Moins le caillé est aqueux plus il se conserve longtemps. De nombreuses techniques ont été développées, permettant d'enrichir la diversité des fromages obtenus.

L'égouttage peut être fait par découpage du caillé, simple filtration ou centrifugation. Les fromages qui seront produits à partir de ces techniques présenteront une pâte souple. Ces fromages peuvent être regroupés en trois catégories : les fromages à pâte molle, les fromages à pâte persillée et les fromages frais. L'égouttage peut être rendu plus intense en utilisant différentes combinaisons de techniques. La combinaison des techniques de découpage, de brassage et de pression, associée ou non à une étape de broyage ou de cuisson donne des fromages à pâte plus ferme. Plus la pression imposée au caillé est intense plus la pâte du fromage sera ferme et appauvrie en eau. Ces fromages sont regroupés en deux catégories : les

fromages à pâte pressée cuite et les fromages à pâte pressée non cuite. L'importance de l'égouttage peut être quantifiée par le rendement fromager brut qui correspond à un poids de fromage issu d'une quantité définie de lait (Ramet, 1997).

Après l'égouttage, les fromages sont salés. L'incorporation du sel au fromage peut être réalisée soit par salage à sec (dans le caillé ou en surface) soit par saumurage (immersion dans une solution saturée en sel ou en surface). Le salage permet non seulement de compléter l'égouttage, mais conduit aussi à la formation de la croûte en créant une zone riche en sel et faible en eau. Hormis son importance dans le développement des qualités organoleptiques fromagères, le salage joue aussi un rôle dans l'inhibition de la flore indésirable type *Listeria*, tout en favorisant le développement de l'écosystème d'affinage.

II. A. 4. Affinage

A l'exception des fromages à pâte fraîche, tous les types de fromages sont affinés. L'affinage est en général fait en cave, étant donné que la température et le degré d'humidité doivent être maîtrisés. La durée de l'affinage peut varier de quelques semaines à plusieurs années selon le fromage fabriqué. Les conditions d'affinage vont avoir un impact crucial sur le développement de l'écosystème d'affinage. Or, la composition et l'évolution de cette flore joue un rôle primordial dans la typicité et la qualité du produit obtenu. En effet, lors de l'affinage, les fromages subissent des transformations biochimiques profondes dues au développement de l'écosystème fromager. Ces transformations, résumées dans le Tableau 5, ont un fort impact sur la texture, la flaveur et les qualités nutritionnelles du produit fini.

Substrats	Type de transformation	Principaux produits formés
Protéines, peptides	Protéolyse	Peptides, acides aminés
Acides aminés	Désamination, Décarboxylation, Dégradation des chaînes latérales	NH ₃ , CO ₂ , amines, acides α - cétoniques, phénols, indole, méthanethiol, et autres composés soufrés volatils
Amines	Désamination oxydative	NH ₃ , aldéhydes, acides
α -cétoacides	Décarboxylation	Aldéhydes
Triglycérides, glycérides partiels	Lipolyse	Acides gras, glycérides partiels, glycérol
Acides gras à chaîne moyenne ou courte	β -oxydation	Méthylcétones, CO ₂
Méthylcétones	Réduction	Alcools secondaires
Acides gras, éthanol, alcools aliphatiques ou aromatiques, thiols	Estérification	Esters Thioesters
Lactose	Fermentation lactique homofermentative	Acide lactique
	Fermentation lactique hétérofermentative	Acide lactique, éthanol, acide acétique, CO ₂
	Fermentation alcoolique	Ethanol, CO ₂ , acide acétique, acétaldéhyde
Acide citrique	Assimilation (bactéries lactiques)	CO ₂ , acétaldéhyde, acétoïne, diacétyle
Acide lactique	Fermentation propionique	Acide propionique, acide acétique, acide succinique, CO ₂

Tableau 5. Principales transformations biochimiques au cours de l'affinage.

Il existe six grandes catégories fromagères dans lesquelles chaque fromage possède sa propre technique de fabrication conduisant à des caractéristiques organoleptiques uniques. Le Tableau 6 présente les six grandes catégories fromagères (pâte fraîche, pâte molle croûte lavée, pâte molle croûte fleurie, pâte pressée non cuite, pâte pressée cuite, pâte persillée) à travers les 45 fromages AOC Français. Ces fromages sont produits dans des terroirs particuliers localisés sur la Figure 15. Les AOC ne représentent qu'une partie infime du

patrimoine fromager Français, qui est estimé à plus de 1000 fromages différents fabriqués sur le territoire. Cette richesse fromagère s'explique par la multitude de procédés existants combinés à la complexité et à la variété des écosystèmes fromagers. Le maintien de cette diversité ne peut s'expliquer uniquement par le fait que ces produits permettent de conserver le lait. En effet, l'engouement pour le fromage s'explique aussi par ses qualités organoleptiques nombreuses et variées : il ne faut pas moins de 75 descripteurs d'arômes pour décrire la richesse fromagère (Figure 16) (Bérodier *et al.*, 1997). Voici brièvement quelques exemples remarquables illustrant la diversité fromagère générée par les procédés et la flore d'affinage :

Les pâtes pressées cuites : *Propionibacterium freudenreichii* est indispensable à la fabrication des fromages pâte pressées cuites à ouvertures, tels que le gruyère et l'emmental. En effet, cette bactérie est capable d'effectuer la fermentation propionique qui produit un dégagement de CO₂. Le CO₂ va être piégé dans la pâte sous forme de bulles et ainsi créer les ouvertures. Cette fermentation donne naissance à des arômes caractéristiques de ce type de fromages.

Les pâtes persillées : Le développement du champignon *Penicillium roqueforti* à l'intérieur du caillé va donner au fromage cet aspect persillé ainsi que des qualités aromatiques bien typiques.

Les fromages à pâte molle à croûte fleurie : le développement de *Penicillium camemberti* est responsable de l'aspect blanc et duveteux de ce type de fromage. Ce champignon participe pleinement à la typicité de ces produits en apportant des qualités organoleptiques particulières.

Les fromages à pâte molle à croûte lavée : la fabrication de ce type de fromage nécessite l'apport de soins tout au long de l'affinage. Les fromages sont régulièrement retournés, brossés et lavés avec de la saumure. Ces traitements vont influencer la composition de l'écosystème d'affinage, en favorisant le développement de bactéries et levures halotolérantes.

Nous n'avons parlé ici que de quelques micro-organismes particuliers, il ne faut cependant pas perdre de vue que l'affinage dépend du développement de tout un écosystème complexe dans un milieu très riche, donnant naissance à une grande variété d'arômes. Nous allons nous concentrer par la suite sur la flore d'affinage des fromages à pâtes molles à croûtes lavées, ainsi que sur les arômes soufrés qui sont particulièrement importants pour les qualités organoleptiques de ces produits.

 LAIT DE VACHE				
Pâte molle		Pâte pressée		Pâte persillée
croûte lavée	croûte fleurie	non cuite	cuite	
Epoisses Mont-d'Or Langres Livarot Maroilles Munster Pont-l'Evêque	Brie de Meaux Brie de Melun Camembert de Normandie Chaource Neufchâtel	Laguiole Reblochon Salers Tome des Bauges Cantal Morbier Saint Nectaire	Abondance Beaufort Comté Gruyère	Bleu de Gex Bleu des Causses Bleu d'Auvergne Bleu du Vercors Fourme d'Ambert Fourme de Montbrison
 LAIT DE CHEVRE				
Pâte molle croûte fleurie		Pâte pressée non cuite		
Banon Chabichou du Poitou Crottin de Chavignol Mâconnais Pélardon Picodon Rigotte de Condrieu Rocamadour	Pouligny Saint Pierre Selles sur Cher Ste Maure de Touraine Valençay	Chevrotin des Aravis		
 LAIT DE BREBIS				
Fromage frais	Pâte pressée non cuite		Pâte persillée	
Brocciu (chèvre ou brebis)	Ossau Iraty		Roquefort	

Tableau 6. Représentation des 45 fromages AOC Français par catégorie fromagère.

En bleu : AOC au lait cru. En noir : AOC au lait cru et/ou pasteurisé.

II. B. Composition et rôle de l'écosystème d'affinage

L'écosystème d'affinage des fromages à pâte molle à croûte lavée a été très étudié. Celui-ci est composé de différents genres de bactéries et levures qui colonisent principalement la surface du fromage. Nous commencerons par décrire les levures, qui se développent en premier grâce à leurs propriétés acido-résistantes. La section II. C étant consacrée aux composés soufrés volatils, nous ne les aborderons que très brièvement dans les paragraphes qui suivent.

II. B. 1. Levures hémiascomycètes

De nombreux genres de levures hémiascomycètes sont retrouvés dans les fromages. En effet, ces micro-organismes sont particulièrement adaptés à ce type de substrat, car elles ont la capacité de se développer à basse température, à un faible pH et, pour certaines espèces, à de fortes concentrations en sel (Fleet, 1990). Le rôle le plus largement décrit de ces levures dans la fabrication fromagère est la consommation de l'acide lactique, qui provoque la désacidification du caillé rendant possible le développement des bactéries d'affinage acido-sensibles. La production d'ammoniac lors de la consommation des acides aminés participe aussi à la désacidification, avec une importance relative dépendant du type de levure.

Les levures sont aussi impliquées dans de nombreux phénomènes, tels que la protection contre l'implantation de micro-organismes indésirables (Goerges *et al.*, 2006) et l'excrétion de facteurs de croissance (vitamines-B, acide pantothénique, acide nicotinique, riboflavine et biotine) (Fleet, 1990). Les activités lipolytiques et protéolytiques des levures sont aussi très importantes dans la fabrication fromagère car elles se traduisent par la genèse de précurseurs d'arômes.

Genre *Saccharomyces*

Saccharomyces cerevisiae est généralement connue pour son implication dans l'élaboration du vin et de la bière, par la fermentation alcoolique (Fleet, 2003). Cependant, cette levure a été identifiée dans différents types de fromages (Viljoen & Greyling, 1995; Roostita & Fleet, 1996b; Romano *et al.*, 2001).

S. cerevisiae n'assimile ni le lactose ni l'acide lactique (Roostita & Fleet, 1996b; Hansen & Jakobsen, 2001). Sa croissance dans les produits laitiers serait donc liée à l'utilisation des

acides aminés comme source de carbone et d'azote. L'influence de *S. cerevisiae* sur les qualités organoleptiques fromagères n'a pas encore été caractérisée. Cependant, il a été observé que les souches retrouvées dans le fromage présentent une résistance accrue au sel (Hansen & Jakobsen, 2001).

Genre *Kluyveromyces*

Kluyveromyces lactis et *Kluyveromyces marxianus* sont deux levures retrouvées naturellement dans le lait et le fromage. Elles sont aussi utilisées en technologie fromagère, par leur ensemencement volontaire dans le lait. Ces levures très proches phylogénétiquement (Lachance, 2007) présentent cependant de grandes diversités physiologiques. *K. lactis*, comme la majorité des *Kluyveromyces*, est classée parmi les levures de type respiratoire, tandis que *K. marxianus* est une levure de type fermentaire. En effet bien que *K. lactis* soit capable de fermenter le lactose en éthanol, seulement 30% du glucose provenant de la dégradation du lactose est fermenté en présence d'oxygène contre 70% assimilé via le cycle de Krebs (Soulignac, 1995). Au contraire, *K. marxianus* dégrade majoritairement le glucose par voie fermentaire en condition d'aérobiose (le cas typique étant celui de *S. cerevisiae*). La régulation du métabolisme respiro-fermentaire chez *K. lactis* a fait l'objet de nombreuses revues bibliographiques (Breunig *et al.*, 2000; González-Siso *et al.*, 2000; Schaffrath & Breunig, 2000)(González-Siso *et al.*, 2000). Les gènes essentiels pour la croissance en aérobiose et en anaérobiose ont été identifiés par comparaison de *S. cerevisiae* avec *K. lactis* (Snoek & Steensma, 2006). D'importantes différences métaboliques ont été observées au sein même de l'espèce *Kluyveromyces lactis* lors de l'étude comparative de la souche de référence et d'une souche utilisée dans l'industrie fromagère (Suleau *et al.*, 2006).

Les levures du genre *Kluyveromyces* ont la capacité de consommer le lactate, et ainsi de participer à la désacidification de caillé (Kagkli *et al.*, 2006b; Cholet *et al.*, 2007).

Les levures du genre *Kluyveromyces* sont capables de produire des composés d'arôme variés, principalement des esters aux notes fruitées et des alcools. *K. lactis* peut produire des composés soufrés volatils (CSVs) comme le méthane-thiol (MTL), le diméthylsulfure (DMS), le diméthyldisulfure (DMDS), le diméthyltrisulfure (DMTS) ou encore le méthylthioacétate (MTAc) (Arfi *et al.*, 2002).

Genre *Debaryomyces*

Debaryomyces hansenii est la levure majoritaire des fromages à pâte molle et à croûte lavée. En effet, l'aptitude de *D. hansenii* à utiliser le lactose et l'acide lactique, à croître à basse température, en milieu acide et en présence de sel sont autant de raisons qui permettent à cette espèce de dominer dans les saumures et les fromages (Besançon *et al.*, 1992; Roostita & Fleet, 1996a; Fleet, 1999).

D. hansenii présente la particularité de consommer le lactose et l'acide lactique en même temps, mais avec des vitesses de consommation différentes (Soulignac, 1995). Cette levure désacidifie très rapidement le caillé lors de la fabrication fromagère (consommation de l'acide lactique et production d'ammoniac lors de la dégradation des acides aminés) (Mounier *et al.*, 2008).

D. hansenii possède aussi des capacités aromatiques intéressantes, notamment par la production de composés soufrés tels que le DMDS, DMTS et le MTAc (Bonnarme *et al.*, 2001; Cholet *et al.*, 2007).

Genre *Yarrowia*

Yarrowia lipolytica est une levure aérobie stricte retrouvée dans les matrices alimentaires riches en lipides et en protéines telles que les yaourts, les fromages et la charcuterie. Cette levure sécrète des protéases, des lipases, des phosphatases et des estérases qui favorisent son développement sur la matrice fromagère. Les protéases et les lipases de *Yarrowia lipolytica* sont hautement régulées (Guerzoni *et al.*, 2001; Suzzi *et al.*, 2001; Gonzalez-Lopez *et al.*, 2002) permettant une adaptation précise au milieu. Ceci suggère que ces activités jouent un rôle primordial dans le développement de *Yarrowia lipolytica*. Cette levure, considérée comme atypique, diverge considérablement des autres levures. Elle présente en effet un faible niveau de similarité de séquence avec les autres levures, ce qui la place à la frontière des levures hémiascomycètes et des champignons filamenteux ascomycètes.

Non seulement *Yarrowia lipolytica* ne consomme pas le lactose, mais elle utilise préférentiellement les acides aminés libres comme source de carbone par rapport à l'acide lactique (Mansour *et al.*, 2008). Du fait que dans les conditions fromagères, les acides aminés soient peu disponibles sous forme libre (caséines), *Y. lipolytica* participe activement à la protéolyse (protéases et transporteurs). Sa participation dans la désacidification du fromage pourrait donc être principalement due à la production d'ammoniac.

Les nombreuses activités enzymatiques de *Y. lipolytica* peuvent jouer un rôle important dans les caractéristiques organoleptiques de ces fromages, grâce à la production de composés d'arôme et/ou de leurs précurseurs (Roostita & Fleet, 1996b; Corsetti *et al.*, 2001). L'ajout de *Yarrowia lipolytica* lors de la fabrication de fromages italiens a révélé que les qualités organoleptiques fromagères varient selon la souche utilisée (Lanciotti *et al.*, 2005). D'autre part, il a été observé que cette levure s'implante très bien dans l'écosystème fromager, sans effet négatif sur les bactéries lactiques (Lanciotti *et al.*, 2005). Les fortes activités protéolytiques et lipolytiques de *Y. lipolytica* en font une levure technologique intéressante, mais la rendent difficile à maîtriser. Par conséquent, son ensemencement volontaire dans le lait est peu pratiqué, celle-ci étant généralement apportée par l'environnement.

Genre *Geotrichum*

La morphologie des *Geotrichum* est très différente de celle des autres levures hémiascomycètes. En effet, *Geotrichum candidum* a longtemps été classé parmi les champignons filamenteux à cause de sa capacité à former des hyphes mycéliens. Le séquençage du génome de cette levure permettrait entre autres de la situer dans la phylogénie des levures hémiascomycètes déjà séquencées (Figure 1) et de faciliter son étude.

G. candidum n'assimile pas le lactose, mais joue un rôle important dans la désacidification du fromage en consommant l'acide lactique et en produisant de l'ammoniac par la dégradation des acides aminés (Soulignac, 1995; Mounier *et al.*, 2008). *G. candidum* est l'un des micro-organismes d'affinage les plus sensibles au sel (Gueguen & Schmidt, 1992). Par conséquent, le saumurage des fromages à pâte molles à croûte lavée permet de contrôler la croissance de *Geotrichum candidum* et donc d'éviter « l'accident gras » (croûte en « peau de crapaud » qui se désolidarise du fromage) (Lenoir *et al.*, 1985). *G. candidum* possède un matériel enzymatique (lipases, protéases) intra- et extra- cellulaire lui permettant de produire d'importants composés d'arôme ou leurs précurseurs. L'étude des enzymes protéolytiques de 30 souches fromagères de *G. candidum*, a permis de distinguer deux groupes selon leur activité protéolytique extracellulaire. Il a été mis en évidence que le groupe présentant une forte activité protéolytique extracellulaire se composait majoritairement de souches isolées de fromages à pâte molle (Gueguen & Lenoir, 1975).

Cette espèce est particulièrement intéressante pour la fabrication de fromages à partir de lait pasteurisé. En effet, son développement conduit à la génération de propriétés sensorielles analogues à celles de fromages au lait cru (Boutrou & Guéguen, 2005).

II. B. 2. Bactéries

Les bactéries d'affinage appartiennent principalement à trois groupes. Le premier est constitué de bactéries à Gram négatif, dont la présence nécessaire dans les fromages est très controversée. En effet, la présence de bactéries à Gram négatif est généralement reliée à un manque d'hygiène. Nous verrons cependant que ce groupe contient aussi des bactéries dont l'intérêt technologique est non négligeable. Les deux autres groupes, constitués de bactéries à Gram positif, sont les staphylocoques et les bactéries corynéformes (Dahl *et al.*, 2000; Mounier *et al.*, 2005, 2008; Goerges *et al.*, 2008). Le rôle des bactéries à Gram positif lors de l'affinage a été très étudié. Leur développement influe fortement les qualités organoleptiques fromagères.

Bactéries à Gram négatif

Les bactéries à Gram négatif isolées des fromages à pâte molle font parties de 3 familles : les *Moraxellaceae*, les *Pseudomonadaceae* et enfin les *Enterobacteriaceae*, qui est la plus représentée. Des études récentes sur *Hafnia alvei*, *Psychrobacter* sp ou encore *Proteus vulgaris* montrent un impact positif sur la production de composés d'arôme (Dahl *et al.*, 2000; Deetae *et al.*, 2007, 2009a, b). En effet, ces espèces produisent des CSVs (MTL, DMDS, DMTS) mais aussi des esters, des aldéhydes et des alcools. Elles possèdent des propriétés protéolytiques (Morales *et al.*, 2003; Chaves-López *et al.*, 2006) et lipolytiques (Chaves-López *et al.*, 2006) impliquées dans le processus d'affinage de fromage.

Genre *Staphylococcus*

Le nom de « *Staphylococcus* » vient du mot *staphyle* qui signifie grappe de raisin et du mot latin *coccus* qui signifie grain. En général, on associe les staphylocoques à des pathogènes opportunistes, comme *Staphylococcus aureus* ou *Staphylococcus epidermidis*, qui sont des producteurs de coagulase et/ou d'entérotoxines. Mais, il existe des espèces à coagulase négative non-pathogènes qui sont présentes dans les écosystèmes fromagers (Irlinger, 2008). *Staphylococcus equorum*, *Staphylococcus vitulinus* et *Staphylococcus xylosus* sont les espèces les plus fréquemment retrouvées dans les fromages à croûtes lavées (Irlinger *et al.*, 1997; Hoppe-Seyler *et al.*, 2004). Les souches de staphylocoques isolées de fromage sont halotolérantes (Mounier *et al.*, 2007) et possèdent aussi des propriétés lipolytiques et protéolytiques qui participent au processus d'affinage (Curtin *et al.*, 2002).

Bactéries Corynéformes

Les bactéries corynéformes sont capables d'effectuer un cycle de transformation de bâtonnet en coque en fonction de leur stade de croissance. Ces bactéries sont non mobiles, acido-sensibles, et le plus souvent aérobies. Les bactéries corynéformes regroupent les genres *Brevibacterium*, *Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Brachybacterium*, *Microbacterium* et *Corynebacterium*.

Parmi les bactéries corynéformes du fromage, le genre le plus étudié est *Brevibacterium*. Une analyse phylogénétique récente du genre *Brevibacterium*, a révélé que les souches d'intérêt technologique peuvent être classées en trois espèces (*B. linens*, *B. auranticum* et *B. anticum*) (Forquin *et al.*, 2009). Le genre *Brevibacterium* ne consomme pas le lactose. Cependant, ces bactéries utilisent l'acide lactique comme source de carbone, ainsi que les acides aminés lorsque ce dernier est épuisé (Moreau *et al.*, 1998). Les *Brevibacteriaceae* produisent des caroténoïdes aromatiques à l'origine de la pigmentation orangée caractéristique de la croûte de certains fromages (Munster, Livarot) (Jones *et al.*, 1973; Dufossé *et al.*, 2001).

Les *Brevibacteriaceae* sont halotolérantes et possèdent des activités protéolytiques, lipolytiques et estérasiques favorisant leur développement sur matrice fromagère tout en conduisant à la synthèse de composés d'arômes qui participent à la flaveur des fromages (Lambrechts *et al.*, 1995; Lambrechts & Galzy, 1995; Curtin *et al.*, 2002; Adamitsch *et al.*, 2003). Ces bactéries produisent notamment de nombreux composés soufrés volatils tels que le méthane-thiol (MTL), le sulfure d'hydrogène (H₂S), les polysulfures comme le DMDS et le DMTS et de nombreux thioesters (Dias & Weimer, 1998a; Bonnarme *et al.*, 2000; Arfi *et al.*, 2006; Sourabié *et al.*, 2008).

Nous venons de voir que les différents genres microbiens qui constituent l'écosystème fromager jouent un rôle important dans les qualités organoleptiques des fromages, notamment par la production de composés soufrés. Nous allons décrire par la suite les caractéristiques aromatiques et les voies de biosynthèse de ces molécules.

II. C. Composés aromatiques soufrés

II. C. 1. Caractéristiques aromatiques

Les composés soufrés volatils retrouvés dans les fromages sont très divers (thiols, polysulfures, thioéthers, thioesters et aldéhydes). Ils apportent des notes aromatiques caractéristiques, qui sont d'une importance primordiale dans la flaveur des fromages (Tableau 7). Cependant, leurs voies de biosynthèse ne sont pas identifiées dans leur totalité. Ces composés sont produits par réactions enzymatiques (écosystème d'affinage), mais aussi par des réactions chimiques.

COMPOSE	NOTE AROMATIQUE	PRECURSEUR PROBABLE
THIOLS		
Sulfure (H ₂ S) Méthanethiol (MTL)	Oeuf pourri Chou cuit, chou fermenté	Cystéine Méthionine
POLYSULFURES		
Diméthyle disulfure (DMDS)	Chou, ail, fromage	MTL
Diméthyle trisulfure (DMTS)	Ail, gaz	MTL, H ₂ S
Diméthyle tétrasulfure (DMQS)	Chou, fromage, ail	MTL, H ₂ S
THIOETHERS		
Diméthyle sulfure (DMS)	Chou bouilli, soufré	S-méthyl méthionine, MTL
2,4-dithiapentane	Ail, chou, rance, gaz	Méthionine
3,4-dithiahexane	Ail	Méthionine
2,4,5-trithiahexane	Ail	Méthionine
3(methylthio)2,4-dithiapentane	Ail	Méthionine
THIOESTERS		
S-méthyl thioacétate	Chou, fromage, crabe	MTL + acétyl-CoA
S-méthyl thiopropionate	Chou, fromage, ail, crabe	MTL + propionyl-CoA
S-méthyl thiobutyrate	Chou, fromage, rance, ail	MTL + butyryl-CoA
S-méthyl thioisovalérate	Fromage, ail, chou	MTL + isovaléryl-CoA
S-méthyl thioisobutyrate	Ail, fromage, chou	MTL + isobutyryl-CoA
ALDEHYDES		
Méthional	Pomme de terre cuite	Méthionine
Méthylthioacétaldehyde	Pomme verte, floral, amande, champignon	Méthionine

Tableau 7. Les composés soufrés volatils couramment retrouvés dans le fromage

Adapté de Landaud *et al.* (Landaud *et al.*, 2008).

La méthionine est le principal précurseur de composés soufrés volatils. La méthionine est présente en concentration plus importante que la cystéine (facteur 5) dans les caséines. Sa

dégradation a donc été plus étudiée que celle de la cystéine. Cependant, la cystéine joue un rôle non négligeable, notamment par la production d'H₂S. Ce composé aromatique soufré, qui peut contribuer à la synthèse des polysulfures, participe pleinement à la diversité des composés soufrés volatils. Nous allons tout d'abord discuter des voies de dégradation de la méthionine, puis de la synthèse de l'H₂S.

II. C. 2. Catabolisme de la méthionine

Le principal composé soufré volatil produit à partir de la méthionine est le méthanethiol. Ce composé peut être produit en une ou deux étapes. La première voie de dégradation de la méthionine, produisant directement le méthanethiol, est due à une méthionine- γ -lyase (MGL) (Spinnler *et al.*, 2001; Bonnarne *et al.*, 2001). La seconde voie conduit tout d'abord à la production d'acide 2-céto-4-méthylthiobutyrique (KMBA) par une transaminase, puis au méthanethiol soit sous l'action d'une KMBA-déméthiolase soit par voie chimique (Bonnarme *et al.*, 2000).

Première voie de dégradation de la méthionine

Chez *Brevibacterium linens* cette réaction semble être la principale voie de dégradation de la méthionine. En effet, la disruption du gène codant pour la MGL entraîne une diminution de 97% de la production de CSVs (Amarita *et al.*, 2004). L'expression de ce gène est induit en présence de méthionine ou de peptides contenant de la méthionine (Ferchichi *et al.*, 1985; Amarita *et al.*, 2004). De plus, la concentration de méthionine libre dans le lait semble être suffisante pour stimuler l'activité de la MGL (Dias & Weimer, 1998b). Cette activité enzymatique a aussi été identifiée chez d'autres bactéries de surface (Bonnarme *et al.*, 2000).

Deuxième voie de dégradation de la méthionine

La première étape de cette voie de dégradation, initiée par la transamination de la méthionine par une aminotransférase, conduit à la formation d'un α -cétoacide, l'acide 2-céto-4-méthylthiobutyrique (KMBA). La transamination nécessite la présence d'un accepteur de groupement amine, qui est généralement l' α -cétoglutarate. Ce dernier sera transformé en glutamate lors de la réaction.

Il n'y a pas de transaminase spécifique de la méthionine chez les levures. Cependant les

transaminases ont souvent des spécificités assez larges, en particulier celles des acides aminés branchés ou aromatiques. Ainsi, certaines aminotransférases possèdent une affinité significative pour la méthionine en plus de leurs substrats préférentiels. Les aminotransférases ont la particularité de pouvoir participer aussi bien au catabolisme qu'à la biosynthèse des acides aminés.

Le KMBA produit lors de la transamination subit une déméthiolation pendant la deuxième étape de cette voie de dégradation. Cette déméthiolation, conduisant à la production de méthane-thiol, serait soit enzymatique soit chimique (Arfi *et al.*, 2003). Les activités méthionine aminotransférase et KMBA-déméthiolasase ont été détectées chez les levures *G. candidum*, *Kluyveromyces* sp., *D. Hansenii*, *Y. lipolytica* et *S. cerevisiae* (Bonnarme *et al.*, 2001; Arfi *et al.*, 2002, 2003; Kagkli *et al.*, 2006a). Cependant, l'accumulation de KMBA chez *G. candidum* et *Kluyveromyces* sp. suggère que l'activité méthionine aminotransférase est de loin la plus importante chez ces micro-organismes.

Les aminotransférases de certaines levures ont été étudiées pour leur activité sur la méthionine. Ces données sont récapitulées Tableau 8. Concernant l'activité KMBA-déméthiolasase, aucune enzyme n'a encore été identifiée.

Voie de Ehrlich

Le KMBA peut aussi être dégradé selon la voie d'Ehrlich (Hazelwood *et al.*, 2008). Cette voie de dégradation des acides aminés, conduit entre autres à la production de méthional et de méthionol dans le cas de la méthionine. L'enzyme responsable de la production de méthional chez *S. cerevisiae* est la phénylpyruvate décarboxylase (codée par *ARO10*) (Tableau 8).

Le méthane-thiol : un précurseur de composés soufrés volatils

La biosynthèse de la plupart des CSVs dans le fromage est associée à la production de MTL par la microflore d'affinage. Le MTL est le précurseur d'autres CSVs tels que le sulfure de diméthyle (DMS), le diméthyle de disulfure (DMDS), le diméthyle de trisulfure (DMTS) ou le diméthyle de tétrasulfure (DMQS) mais aussi des *S*-méthylthioesters (Helinck *et al.*, 2000; Arfi *et al.*, 2002, 2006). Les voies de synthèse des composés soufrés sont récapitulées Figure 17.

Tableau 8. Gènes impliqués dans catabolisme méthionine chez les levures technologiques.

Organisme	Gènes testés	Technique	Gènes impliqués	Références
Méthionine → KMBA				
<i>Yarrowia lipolytica</i>	<i>YIBAT1</i>	Surproduction par clonage	<i>YIBAT1</i>	(Bondar <i>et al.</i> , 2005)
<i>Kluyveromyces lactis</i>	<i>KIARO8-1</i> <i>KIARO8-2</i> <i>KIARO9</i> <i>KIBAT1</i> <i>KIAAT1</i> <i>KIAAT2</i>	Surproduction par clonage	<i>KIARO8-1</i> <i>KIARO8-2</i>	(Kagkli <i>et al.</i> , 2006a)
<i>Debaryomyces hansenii</i> <i>Kluyveromyces marxianus</i> <i>Yarrowia lipolytica</i>	<i>DhARO8</i> (3gènes) <i>DhBAT2</i> <i>KIBAT1</i> <i>KIARO8-1</i> <i>KIARO8-2</i> <i>KIARO9</i> <i>YIARO8</i> <i>YIARO9</i> <i>YIBAT1</i> <i>YIBAT2</i>	Transcriptomique	<i>YIARO8</i> <i>YIBAT2</i>	(Cholet <i>et al.</i> , 2007)
<i>Yarrowia lipolytica</i>	<i>YIARO8</i> <i>YIARO9</i> <i>YIBAT1</i> <i>YIBAT2</i>	Transcriptomique	<i>YIARO8</i> <i>YIBAT1</i> <i>YIBAT2</i>	(Cholet <i>et al.</i> , 2008)
KMBA → Méthional				
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>ScARO10</i> <i>ScPDC1</i> <i>ScPDC5</i> <i>ScPDC6</i> <i>ScTHI3</i>	Construction de mutants	<i>ScARO10</i>	(Perpète <i>et al.</i> , 2006)

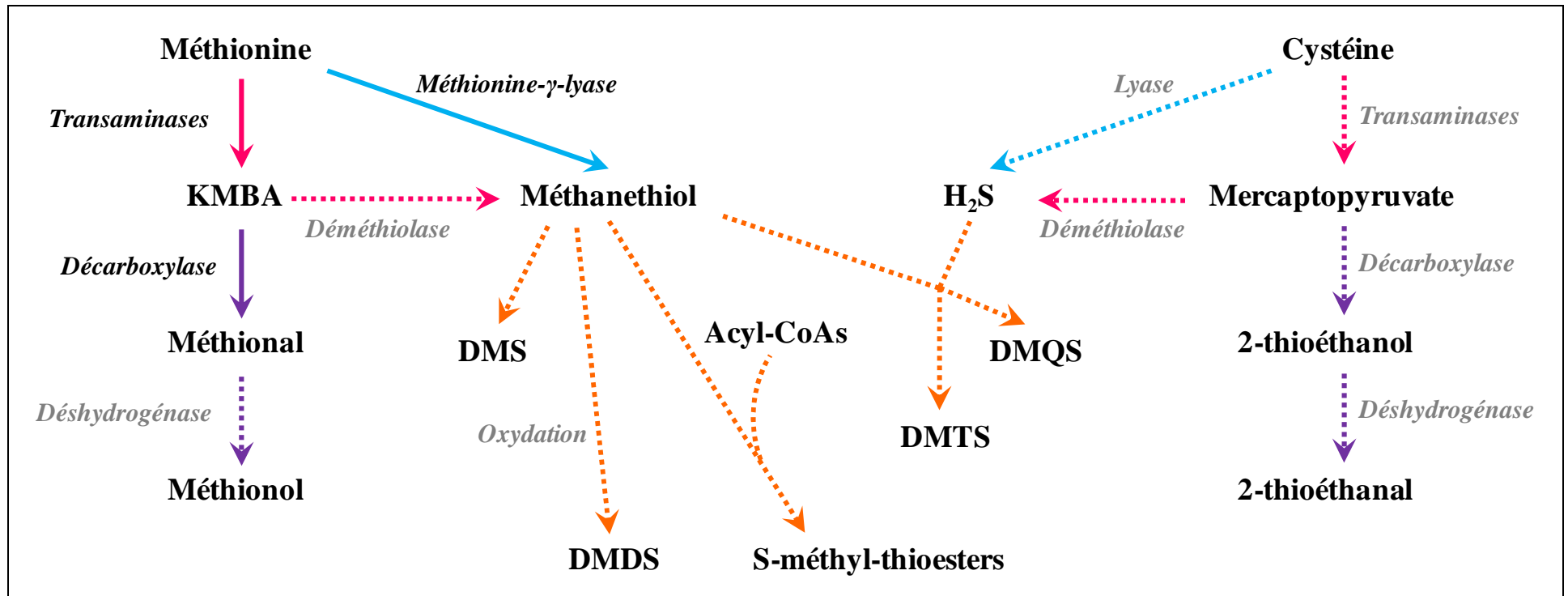


Figure 17. Voies de synthèse des composés sulfurés à partir de la méthionine et de la cystéine.

En bleu : Dégradation de la méthionine et de la cystéine en une étape. En Rose : Dégradation de la méthionine et de la cystéine en deux étapes.

En violet : Voie d'Ehrlich. En orange : Composés sulfurés produits à partir du méthanethiol et de l'H₂S.

Flèches pleines et noms en noir : Enzymes identifiées. Flèches en pointillés et noms en gris : Enzymes non identifiées.

II. C. 3. Sulfite, sulfure et cystéine

Le sulfite et le sulfure ont fait l'objet de nombreuses études, notamment lors des processus de fabrication du vin. En effet ces deux composés, qui sont des intermédiaires de la voie d'assimilation du sulfate (Figure 4), ont des caractéristiques influençant fortement la qualité de ces produits. La présence de sulfite est recherchée pour ses propriétés de conservateur et d'agent antimicrobien, tandis que le sulfure, favorable pour la flaveur des fromages, doit être limité dans le vin où il cause des défauts d'arômes.

Les molécules de la voie d'assimilation du sulfate sont toxiques lorsqu'elles sont accumulées. Il n'est donc pas surprenant d'observer des exportateurs de sulfite chez les micro-organismes. L'exportateur de *S. cerevisiae*, codé par *SSU1*, est sous contrôle de l'activateur transcriptionnel codé par *FZFI* (Park & Bakalinsky, 2000). Ces gènes jouent un rôle primordial dans la résistance au sulfite (Avram & Bakalinsky, 1997). Le gène codant l'exporteur de sulfite a aussi été identifié chez *Aspergillus fumigatus* ainsi que chez les dermatophytes étudiés (*Trichophyton rubrum* et *Arthroderma benhamiae*). Les gènes codant les exportateurs de sulfite sont nettement plus transcrits chez les dermatophytes que chez *A. fumigatus*. Cette observation a été reliée à la pathogénicité des dermatophytes. En effet, le sulfite excrété faciliterait la dégradation de la kératine par les protéases en réduisant les ponts disulfures (cystine) en cystéine et S-sulphocysteine (Lechenne *et al.*, 2007).

Lors de la fermentation alcoolique le sulfite doit être produit à partir de la fin de phase exponentielle. L'effet réducteur du sulfite en début de fermentation cause en effet des défauts d'arômes, notamment dans la bière (Dufour, 1991). Chez *S. cerevisiae*, la surexpression simultanée de *MET14* et *SSU1* conduit à une augmentation de la production de sulfite (Donalies & Stahl, 2002) (Figure 18). Pour contrecarrer les défauts d'arômes, la surexpression de ces gènes a été mise sous contrôle de promoteurs activés uniquement en fin de phase exponentielle et en phase stationnaire.

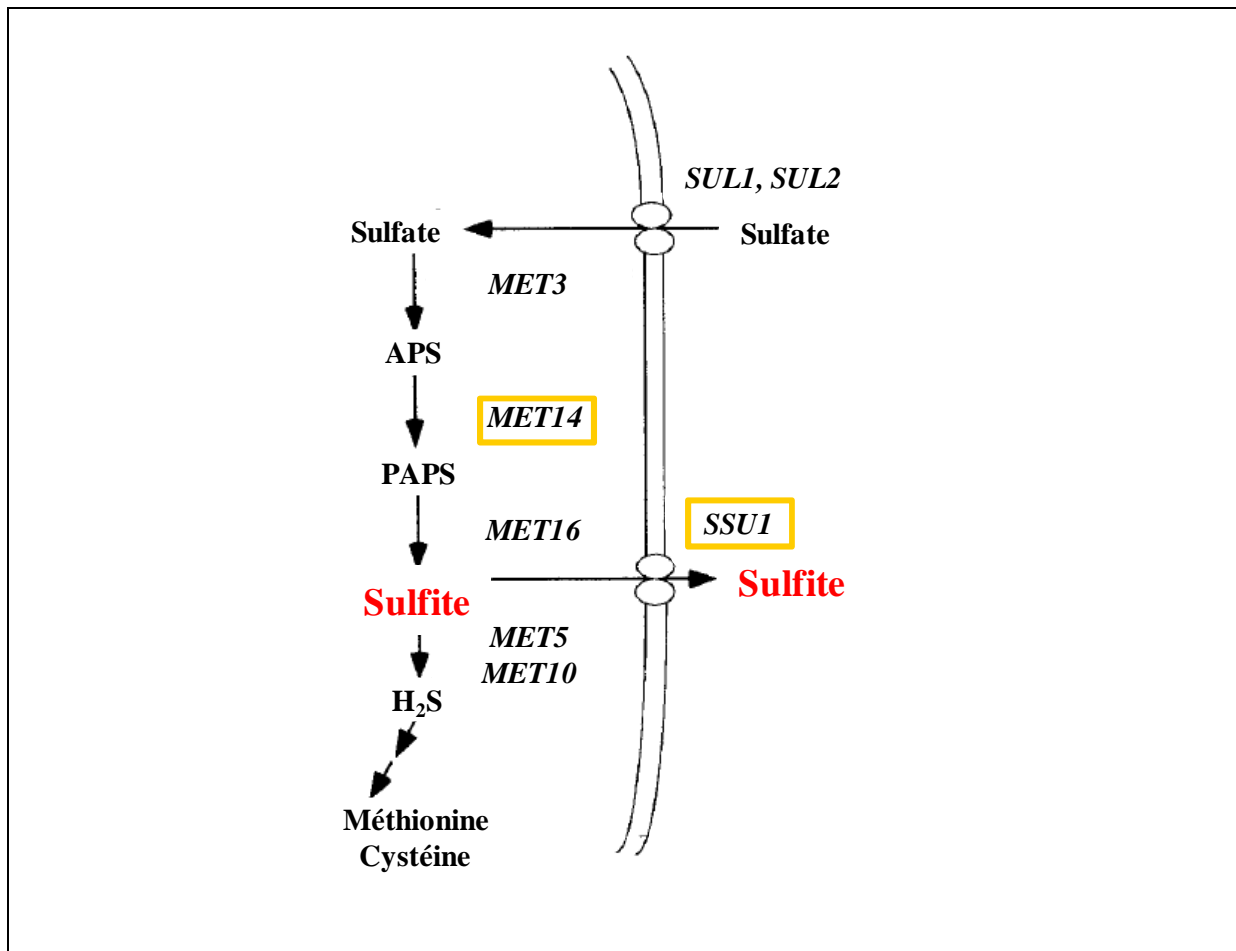


Figure 18. Surproduction de sulfite chez *S. cerevisiae*.

En orange : gènes dont la surexpression provoque une augmentation de production de sulfite.

D'après Donalies (Donalies & Stahl, 2002).

La quantité d'H₂S produite peut aussi être influencée génétiquement. La délétion des gènes *MET1*, *MET8*, *MET5* et *MET10*, codant pour des enzymes directement liées à la synthèse de sulfure, conduit de façon logique à l'absence de production d'H₂S (Linderholm *et al.*, 2008) (Figure 19). L'H₂S étant néfaste pour la qualité du vin, des souches de *S. cerevisiae* technologiques ont été mutées et étudiées pour leur faible production d'H₂S. Ainsi certains acides aminés de la sulfite réductase (codée par *MET5* et *MET10*) sont clefs pour la production d'H₂S (Cordente *et al.*, 2009). En effet, leur mutation provoque une diminution de la production d'H₂S de 50 à 99%.

La formation d'H₂S est augmentée par la délétion des gènes *HOM2*, *HOM6*, *MET17*, *CYS4* et *SER33* (Figure 19). Ces gènes codent pour des enzymes liées au métabolisme du soufre, qui interviennent au niveau de l'homocystéine, juste en aval du sulfure.

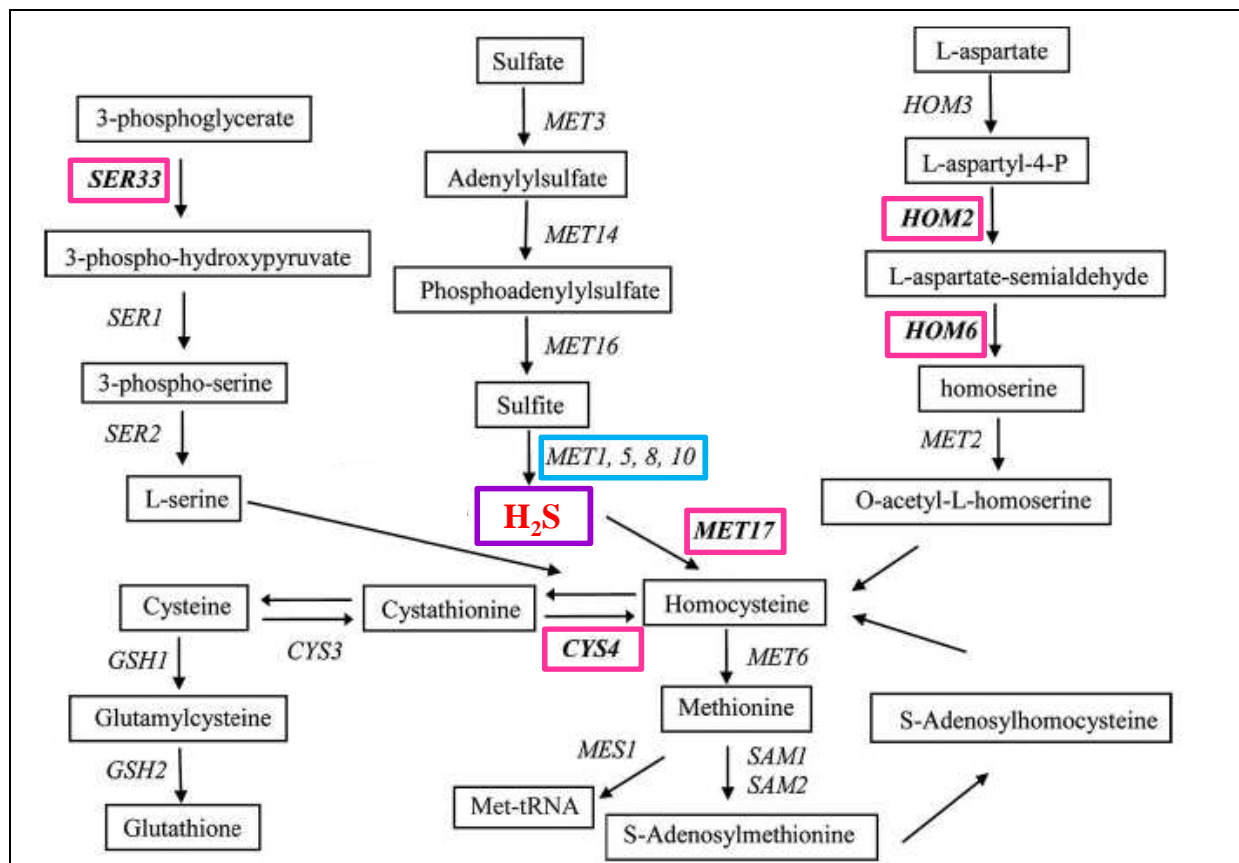


Figure 19. Gènes impliqués dans la production d'H₂S chez *S. cerevisiae*.

En rose : Gènes dont la mutation provoque une augmentation de la production d'H₂S.

En bleu : Gènes dont la mutation provoque une diminution de la production d'H₂S.

D'après Linderholm *et al.* (Linderholm *et al.*, 2008).

Alors que dans le vin et la bière l'H₂S proviendrait majoritairement de l'assimilation du sulfate inorganique (sulfate, sulfite) par le métabolisme des levures telles que *S. cerevisiae* (Thomas & Surdin-Kerjan, 1997; Landaud *et al.*, 2008), la présence de sulfure dans le fromage serait principalement due à la désulfuration de la cystéine lors de l'affinage (Landaud *et al.*, 2008). En effet, le caillé étant pauvre en sulfate, la production d'H₂S à partir de la voie d'assimilation du sulfate doit être très faible. La dégradation de la cystéine se ferait par des voies analogues à celles de la méthionine (Figure 17). Chez les bactéries, la dégradation serait due à une déméthiologie directe tandis qu'elle serait consécutive à une étape de transamination (déméthiologie du mercaptopyruvate) chez les levures (del Castillo-Lozano, 2007). Il a été démontré que chez ces micro-organismes, l'ajout de cystéine dans le milieu de culture a pour conséquence une augmentation de l'H₂S produit, directement corrélée à la consommation de la cystéine. La sélection de souches de levures et bactéries sur leur capacité à produire de l'H₂S a grandement été facilitée par le développement d'une nouvelle technique permettant de quantifier l'H₂S produit (del Castillo Lozano *et al.*, 2007).

II. D. L'écosystème : interactions et communication cellulaire

Chaque écosystème est composé d'une grande diversité de micro-organismes. La complexité de l'écosystème est fortement liée à cette diversité, ainsi qu'aux interactions microbiennes qui en résultent. Bonaïti *et al.* (Bonaïti *et al.*, 2005) ont mis au point un fromage modèle (type livarot) dont la flore microbienne a été réduite à 10 micro-organismes. Cette combinaison microbienne, suffisante pour maintenir les qualités olfactives du produit, a permis de simplifier l'étude de l'écosystème fromager en identifiant les partenaires indispensables (Bonaïti *et al.*, 2005). L'importance des interactions microbiennes a aussi été mise en évidence lors de la fabrication du vin (Howell *et al.*, 2006). En effet, un vin provenant de la fermentation par une combinaison de souches de *Saccharomyces* présente un profil aromatique différent du vin obtenu par le mélange des vins provenant de la fermentation par les mono-cultures.

Dans cette section, nous présenterons les différents types d'interactions microbiennes connues à travers des exemples liés aux produits laitiers. Nous aborderons aussi les moyens de communication intra- et inter-espèces via des signaux chimiques spécifiques.

II. D. 1. Interactions microbiennes

Dans les produits laitiers, l'évolution des conditions physico-chimiques et la disponibilité en nutriments influencent fortement le développement des micro-organismes. Ainsi, tout au long du processus de fabrication on observe une dynamique particulière à chaque population : certains micro-organismes se multiplient activement tandis que d'autres tendent à disparaître. Les interactions observées dans des cultures mixtes peuvent être classées en cinq catégories (Tableau 9), qui seront décrites de la plus néfaste à la plus bénéfique dans les paragraphes suivants.

PRODUIT LAITIER	MICRO-ORGANISMES	REFERENCES
COMPETITION (A-, B-)		
Yaourt	<i>S. thermophilus, L. delbrueckii</i> subsp, <i>bulgaricus</i>	(Zourari <i>et al.</i> , 1992)
Produits laitiers	Levures, bactéries	(Narvhus & Gadaga, 2003) (Nouaille <i>et al.</i> , 2009)
AMENSALISME (A=, B-)		
Produits laitiers	Bactéries lactiques, <i>Listeria monocytogenes</i>	(Balasubramanyam & Varadaraj, 1998)
Yaourt	<i>S. thermophilus, L. delbrueckii</i> subsp, <i>bulgaricus</i>	(Balasubramanyam & Varadaraj, 1998) (Benkerroum <i>et al.</i> , 2002)
Surface de fromage affiné	<i>Lactobacillus plantarum, Listeria monocytogenes</i>	(Loessner <i>et al.</i> , 2003)
PARASITISME (A+, B-)		
Lait	Bactéries, phages	(Brussow, 2001) (Sturino & Klaenhammer, 2004)
COMMENSALISME (A+, B=)		
Produits laitiers	Bactéries lactiques	(Narvhus & Gadaga, 2003) (Xu <i>et al.</i> , 2005)
Yaourt	<i>S. thermophilus, L. delbrueckii</i> subsp, <i>bulgaricus, bactérie propionique</i>	(Xu <i>et al.</i> , 2005)
Yaourt et produits laitiers	Bactéries lactiques, bactéries propioniques	(Xu <i>et al.</i> , 2005)
Lait	Levures, bactéries	(Narvhus & Gadaga, 2003) (Gadaga <i>et al.</i> , 2001)
Surface de fromage affiné	Bactéries lactiques, <i>Debaryomyces hansenii, Geotrichum candidum, Arthrobacter sp. Brevibacterium linens, Corynebacterium ammoniagenes, staphylococci</i>	(Mounier <i>et al.</i> , 2005)
Lait fermenté, yaourt, fromage	Levures, bactéries	(Viljoen, 2001)
MUTUALISME (A+, B+)		
Yaourt	<i>S. thermophilus, L. delbrueckii</i> subsp, <i>bulgaricus</i>	(Courtin & Rul, 2004) (Herve-Jimenez <i>et al.</i> , 2009)
Produits laitiers	Bactéries lactiques	(Narvhus & Gadaga, 2003)
Lait	Bactéries lactiques + Levures	(Narvhus & Gadaga, 2003)
Surface de fromage affiné	Différents types de moisissures, levures et bactéries	(Corsetti <i>et al.</i> , 2001)

Tableau 9. Interactions microbiennes dans les produits laitiers

A : Micro-organisme 1 ; B : Micro-organisme 2 ; - : effet négatif ; = : pas d'effet ; + : effet positif.

D'après Sieuwerts *et al.* (Sieuwerts *et al.*, 2008).

Compétition

Lorsque plusieurs micro-organismes sont présents dans un même milieu, ils peuvent entrer en compétition pour certains nutriments. Ce type d'interaction est donc préjudiciable pour les deux populations, surtout si la ressource visée est en faible concentration.

Dans les produits laitiers, les acides aminés sont essentiellement sous forme de caséines. L'accessibilité à la source d'azote est donc souvent limitante, et les micro-organismes se retrouvent en compétition pour la faible fraction d'acides aminés et de peptides libres (Juillard *et al.*, 1995, 1996; Sieuwerts *et al.*, 2008). Ainsi, les micro-organismes capables de dégrader les caséines (protéases, peptidases et transporteurs) sont généralement dominants dans les produits laitiers.

En présence de *Staphylococcus xylosus*, la croissance de la levure *Yarrowia lipolytica* est fortement inhibée. Ces micro-organismes entreraient en compétition pour certains acides aminés (glutamate, proline, histidine, aspartate, alanine, thréonine, serine et glycine) (Mansour *et al.*, 2009). Cette hypothèse est soutenue par le fait que *Y. lipolytica*, qui est particulièrement adaptée à la protéolyse, utilise préférentiellement les acides aminés libres comme source de carbone par rapport au lactate (Mansour *et al.*, 2008).

Certains genres bactériens retrouvés dans l'écosystème fromager (*Brevibacterium*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium ssp*) possèdent des systèmes spécifiques (sidérophores) pour capter le fer, (Noordman *et al.*, 2006; Mounier *et al.*, 2009). Ceci suggère l'existence d'une compétition pour le fer, celui-ci étant en faible concentration dans les produits laitiers (Gaucheron F., 2000).

Amensalisme

On parle d'amensalisme lorsque la croissance d'un micro-organisme inhibe celle des autres sans en obtenir de bénéfices. Cette inhibition résulte en général de la production de certains métabolites tels que le lactate, l'acétate et certains agents antimicrobiens (bactériocines) (Caplice & Fitzgerald, 1999; van de Guchte *et al.*, 2001; Sieuwerts *et al.*, 2008).

Les interactions de type amensalisme sont observées dans les produits laitiers. En effet, les bactéries lactiques produisent du lactate (voie homofermentaire) ou un mélange de lactate et d'acétate (voie hétérofermentaire) lors de la fermentation du lactose.

Ces acides organiques baissent le pH conduisant ainsi à l'inhibition de la croissance des bactéries appartenant au genre *Listeria*, *Staphylococcus* ou *Clostridium* et des bactéries des flores de surface acido-sensibles (Oh & Marshall, 1993; Holzapfel *et al.*, 1995; Dahl *et al.*, 2000).

Parasitisme

Le parasitisme est une interaction où un micro-organisme tire profit d'un autre au dépend de ce dernier. Les bactériophages des bactéries lactiques sont un exemple connu de parasitisme. Lors de la fermentation, les phages peuvent subitement conduire à la lyse des souches dominantes, causant ainsi une altération du produit fermenté mais aussi des importantes pertes économiques pour les industriels (Siewerts *et al.*, 2008). Néanmoins, les phages portent dans leur génome des séquences permettant des transferts horizontaux de gènes entre populations bactériennes et accélèrent donc le processus d'évolution des communautés bactériennes. Ils contribuent à la diversité des cultures fermentaires mixtes (Weinbauer & Rassoulzadegan, 2004; Weinbauer, 2004).

Commensalisme

Le commensalisme est une interaction où un micro-organisme bénéficie de la présence d'un autre, sans que ce dernier en tire profit (Siewerts *et al.*, 2008). Différentes études montrent l'impact positif des levures, principalement *D. hansenii* et *G. candidum*, dans la désacidification du fromage et donc dans l'implantation de bactéries acido-tolérantes. Ses levures consomment le lactate produit par les bactéries lactiques dans le caillé et dégradent les acides aminés libérant ainsi des métabolites alcalins tels que l'ammoniac. Ainsi, la flore bactérienne aérobie acido-sensible qui inclut *B. aurantiacum*, *Arthrobacter* spp, *C. casei*, *Micrococci* et *Staphylococci* peut se développer (Mounier *et al.*, 2008). Les levures et les bactéries lactiques sont également capables d'excréter des nucléotides, des peptides ou des métabolites servant de substrats aux bactéries de surface contribuant au développement de la flore bactérienne (Roostita & Fleet, 1996b; Addis *et al.*, 2001; Toelstede & Hofmann, 2009). *Penicillium roquefortii*, *Y. lipolytica* et *C. catenulata* produisent dans le camembert ou les fromages bleus, des acides aminés libres et des peptides qui favorisent la croissance de la flore bactérienne présente. Dans les fromages à pâte pressée cuite, les bactéries propioniques

se développent grâce à l'utilisation de l'acide lactique produit par les bactéries lactiques (Sieuwerts *et al.*, 2008).

Mutualisme

Le mutualisme est une interaction dans laquelle tous les micro-organismes impliqués obtiennent un bénéfice. L'interaction entre *S. thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, bien que très complexe, peut être classée dans le mutualisme. En effet, la vitesse d'acidification et la croissance de ces deux micro-organismes dans le lait sont stimulées en cocultures (Amoroso *et al.*, 1989; Spinnler & Corrieu, 1989; Herve-Jimenez *et al.*, 2008).

Les hypothèses avancées pour expliquer ce phénomène sont récapitulées Figure 20. En premier lieu, la forte capacité protéolytique de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* aurait un effet positif sur la croissance de *S. thermophilus* par la libération d'acides aminés libres à partir des caséines (Abu-Tarboush, 1996). A son tour, *S. thermophilus* stimulerait la croissance de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* par la production de différents produits tels que le CO₂, l'acide formique ou l'acide folique (Ascon-Reyes *et al.*, 1995). En effet, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* est incapable de produire ces deux acides impliqués dans la biosynthèse des purines. Ainsi, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* les assimilerait afin de produire les purines nécessaires à son développement.

Une étude récente semble étayer cette hypothèse. En effet, lorsque *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* est en présence de *S. thermophilus*, cette dernière réprime la voie de biosynthèse des purines et sur-exprime un gène codant pour une protéine potentiellement impliquée dans le transport de xanthine et/ou uracile (Herve-Jimenez *et al.*, 2008). Les auteurs suggèrent que *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* produit les purines et les excrète dans le milieu ; elles sont ensuite assimilées par *S. thermophilus* (Herve-Jimenez *et al.*, 2008).

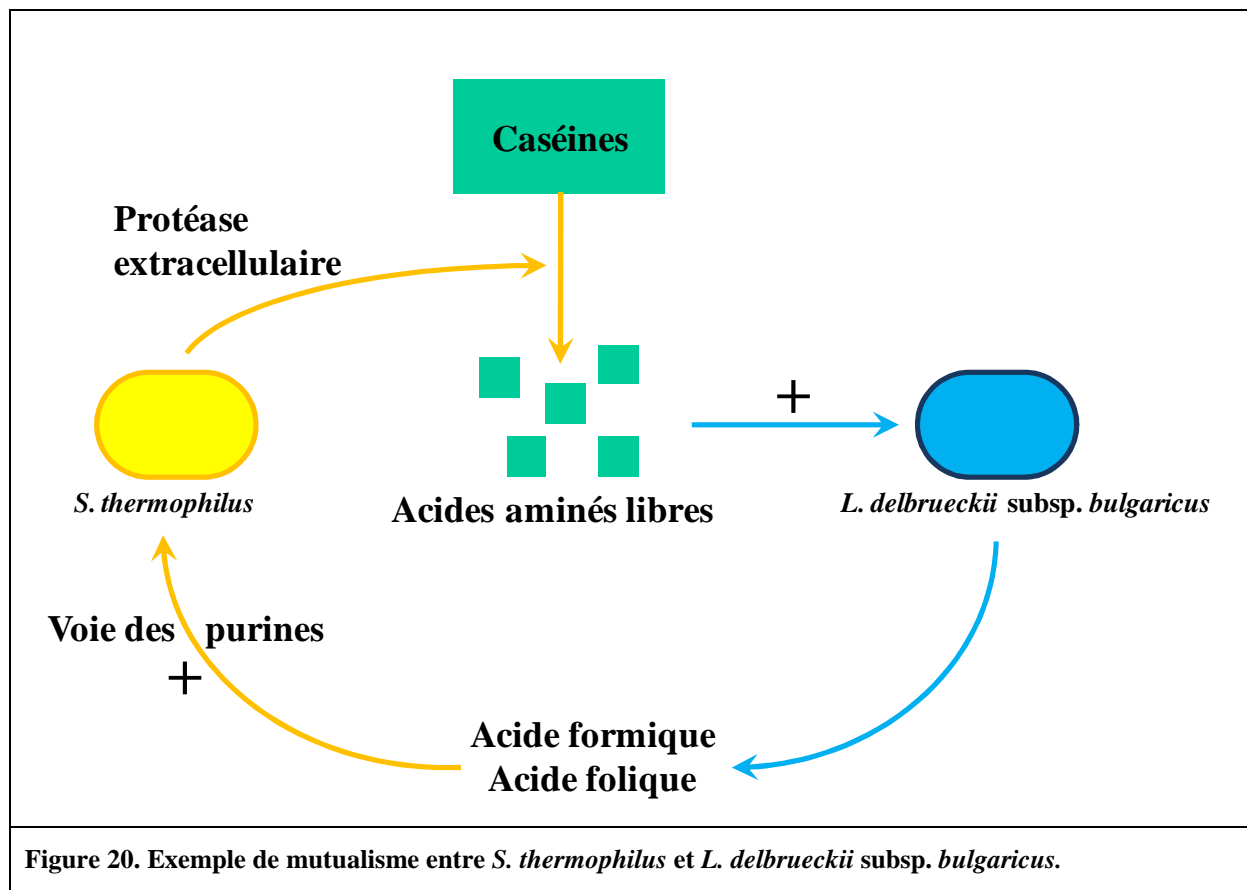


Figure 20. Exemple de mutualisme entre *S. thermophilus* et *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*.

II. D. 2. Communication cellulaire : le quorum sensing

La communication entre les micro-organismes via des signaux chimiques, bien étudiée chez les bactéries, est encore peu connue chez les levures. Monds et O'Toole (Monds & O'Toole, 2009) ont proposé une méthodologie pour identifier ces interactions : i) le signal excrété doit être bien identifié ; ii) le signal est non toxique pour la cellule cible aux concentrations physiologiques ; iii) il doit exister un mécanisme qui capte le signal et entraîne une réponse spécifique iv) cette réponse est dissociable du signal excrété ; v) un signal purifié reproduit la même réponse dans les conditions physiologiques ; vi) le signal est captable par la communauté.

Communication intra-espèce

La communication intra-espèce via des molécules chimiques (auto-inducteurs) répond en général à une densité cellulaire particulière du micro-organisme donné. Par conséquent, ce mécanisme a été nommé le quorum sensing (Sprague & Winans, 2006).

Chez les bactéries à Gram négatif, une enzyme synthétise une molécule de type Acyl-

Homosérine Lactone (AHL) qui se fixe sur un régulateur de type LuxR. Le complexe LuxR-AHL se lie à l'ADN et induit la transcription des gènes cibles (Waters & Bassler, 2005) (Figure 21-A). Chaque complexe est spécifique d'un micro-organisme, permettant ainsi une communication intra-espèce souvent associée à une détection de la densité cellulaire, et dans le cas de bactéries pathogènes à une induction de facteurs de virulence.

Chez les bactéries à Gram-positif, la communication se fait via des peptides et le plus souvent d'un système à deux composants (Figure 21-B) (Waters & Bassler, 2005). Ce système est composé d'une protéine histidine kinase appelée senseur qui transmet le signal à un régulateur. Suite à la fixation du peptide sur le senseur qui possède un domaine récepteur du signal et un domaine d'autophosphorylation, cette protéine se phosphoryle puis transfère le groupement phosphate vers le domaine receveur du régulateur de réponse. La majorité des régulateurs de réponse ainsi activés vont se lier à des régions d'ADN pour contrôler l'expression des gènes cibles.

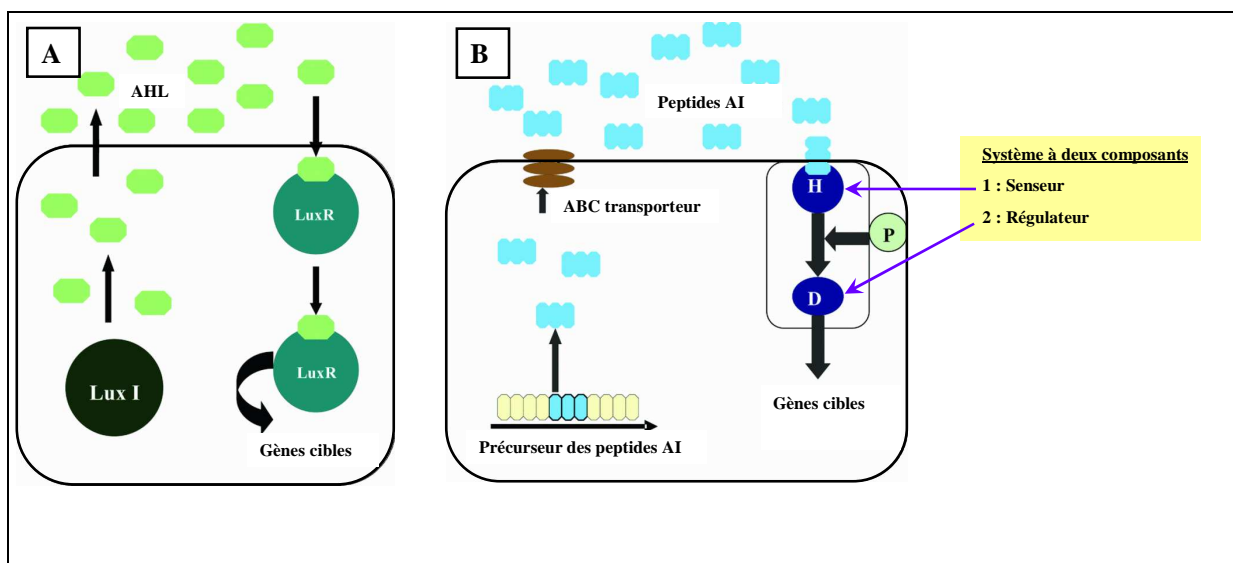


Figure 21. Mécanismes du Quorum Sensing.

A : Chez les bactéries à Gram négatif

B : Chez les bactéries à gram positif

AHL : Acyl-Homoserine Lactone, **AI :** Auto-Inducteurs. **H :** Histidine **D :** Aspartate. **P :** Phosphorylation

Adapté de Raina *et al.* (Raina *et al.*, 2009).

Quelques exemples de quorum sensing sont récapitulés Tableau 10. Les exemples en rapport avec l'alimentation et les levures sont détaillés dans les paragraphes suivants.

	Micro-organisme	Type de signal	Réponse
Gram-négatif	<i>Vibrio fischeri</i>	AHL	Bioluminescence
Gram-négatif	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	AHL	Virulence
Gram-négatif	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	Bactériocine (nisine)	Protéine d'immunité, mort des cellules cible
Gram-positif	<i>Staphylococcus aureus</i>	Peptide	<u>Population faible</u> : adhérence et colonisation <u>Population forte</u> : toxines et protéases
Levure	<i>Candida albicans</i>	(1) Tyrosol (2) Farnesol	<u>Population faible</u> : (1) filamentation <u>Population forte</u> : (2) sporulation
Levure	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Phényléthanol Tryptophol	Morphologie cellulaire

Tableau 10. Exemples de Quorum Sensing.

Le quorum sensing a été observé chez certaines souches de *L. lactis* ssp. *lactis*. Cette bactérie alimentaire produit une bactériocine du genre lantibiotique : la nisine. Les lantibiotiques sont des peptides qui contiennent des acides aminés inhabituels généralement soufrés modifiés post-traductionnellement comme la lanthionine et la β -méthyl lanthionine (McAuliffe *et al.*, 2001). La nisine est à la fois la molécule du quorum sensing, contrôlant ainsi son transport, sa propre régulation ainsi que celle des gènes impliqués dans l'immunité, mais aussi la réponse au quorum sensing par son rôle de bactériocine. La nisine tue les micro-organismes ne possédant pas le système d'immunité en formant des pores dans leur membrane cellulaire (Entian & de Vos, 1996; Kleerebezem, 2004).

Candida albicans est la levure la plus étudiée pour les phénomènes de quorum sensing. Cette levure est un champignon pathogène humain dimorphique (mycélium et spores). Deux molécules de « quorum sensing » contrôlent sa morphogénèse (Figure 22-A et -B). Le tyrosol active la croissance et induit la formation du mycélium à faible densité cellulaire, tandis que le farnesol inhibe la forme filamenteuse à haute densité cellulaire. Le farnesol est sécrété proportionnellement à la quantité de cellules dans le milieu, ce qui permet au micro-organisme d'évaluer sa concentration cellulaire (Hornby *et al.*, 2001; Nickerson *et al.*, 2006). Un ajout de tyrosol dans le milieu réduit la phase de latence et induit la forme filamenteuse (Chen *et al.*, 2004). La réponse de *C. albicans* face au farnesol a été étudié en parallèle morphologiquement et transcriptomiquement, ouvrant de nouvelles perspectives sur la compréhension de ce phénomène (Cao *et al.*, 2005).

S. cerevisiae produit deux alcools aromatiques impliqués dans le quorum sensing : le

phényléthanol et le tryptophol. La production de ces molécules, qui exercent un rétrocontrôle sur leur production respective, semble être dépendante de la densité cellulaire (Chen & Fink, 2006). Le phényléthanol et le tryptophol sont induits lors d'une carence en azote, provoquant des changements morphologiques ainsi que l'induction du gène *FLO11*, impliqué dans le phénomène de floculation. Le tryptophol et le tyrosol sont des molécules produites par la voie d'Ehrlich, lors de la dégradation du tryptophane et de la tyrosine respectivement (Hazelwood *et al.*, 2008).

L'ammoniac pourrait aussi être une molécule du quorum sensing chez les levures (Palková & Váchová, 2003). En cas de carence azotée, on observe une augmentation du pH en corrélation avec la production d'ammoniac. Cette alcalinisation induit une inhibition de la croissance des levures qui rentrent ainsi en phase de latence, permettant aux levures de minimiser leur consommation d'énergie et donc d'être plus résistantes face au stress nutritionnel. Une fois la carence azotée levée la production d'ammoniac se réduit, provoquant une chute de pH et une induction de la croissance des levures (Palková & Váchová, 2003). De plus, l'inhibition de l'expansion des mycéliums de *G. candidum* dans un caillé modèle pourrait être due à la production d'ammoniac par *Y. lipolytica* (Mounier *et al.*, 2008). L'ammoniac jouerait aussi un rôle dans la mort cellulaire programmée des levures. Ce système, surprenant chez des organismes unicellulaires, prend tout son sens via le quorum sensing. En cas de carence nutritionnelle chez *S. cerevisiae*, les levures situées au cœur de la colonie meurent, libérant ainsi des nutriments, au profit du reste de la colonie. Il a été mis en évidence que les colonies formées par des levures incapables de produire de l'ammoniac meurent plus rapidement (Váchová & Palková, 2005).

Communication inter-espèces

La communication inter-espèces impliquant des signaux chimiques entre les bactéries et les levures est très peu connue. Certaines molécules de « quorum sensing » comme des bactériocines jouent un rôle indirect sur cette interaction mais d'autres sont capables d'agir directement sur le « quorum sensing » d'une autre espèce. Le cas le mieux étudié est l'interaction entre *P. aeruginosa* et *C. albicans*. Ces micro-organismes sont des pathogènes opportunistes généralement présents dans les systèmes respiratoires de personnes immunodéprimées.

P. aeruginosa produit une Acyl-Homosérine Lactone (AHL) qui induit la production de facteurs de virulence dont des protéines responsables de son adhésion aux cellules. Ces

protéines confèrent à *P. aeruginosa* la capacité de se fixer uniquement sur la forme filamenteuse de *C. albicans* et peut tuer la levure grâce à ses facteurs de virulence. Mais la levure est capable d'intercepter l'AHL produite par *P. aeruginosa* et, pour se défendre, *C. albicans* va favoriser la formation de spores par la production de farnesol (Hogan *et al.*, 2004). De plus, la production de farnesol par la levure réprime les gènes impliqués dans le « quorum sensing » de *P. aeruginosa*. Ces deux micro-organismes ont donc mis en place un système complexe via une signalétique moléculaire qui leur assure une co-existence au sein d'un environnement donné (Figure 22-C). Cet exemple montre la complexité qui existe dans les phénomènes de communication inter-espèces via des molécules chimiques (De Sordi & Mühlischlegel, 2009).

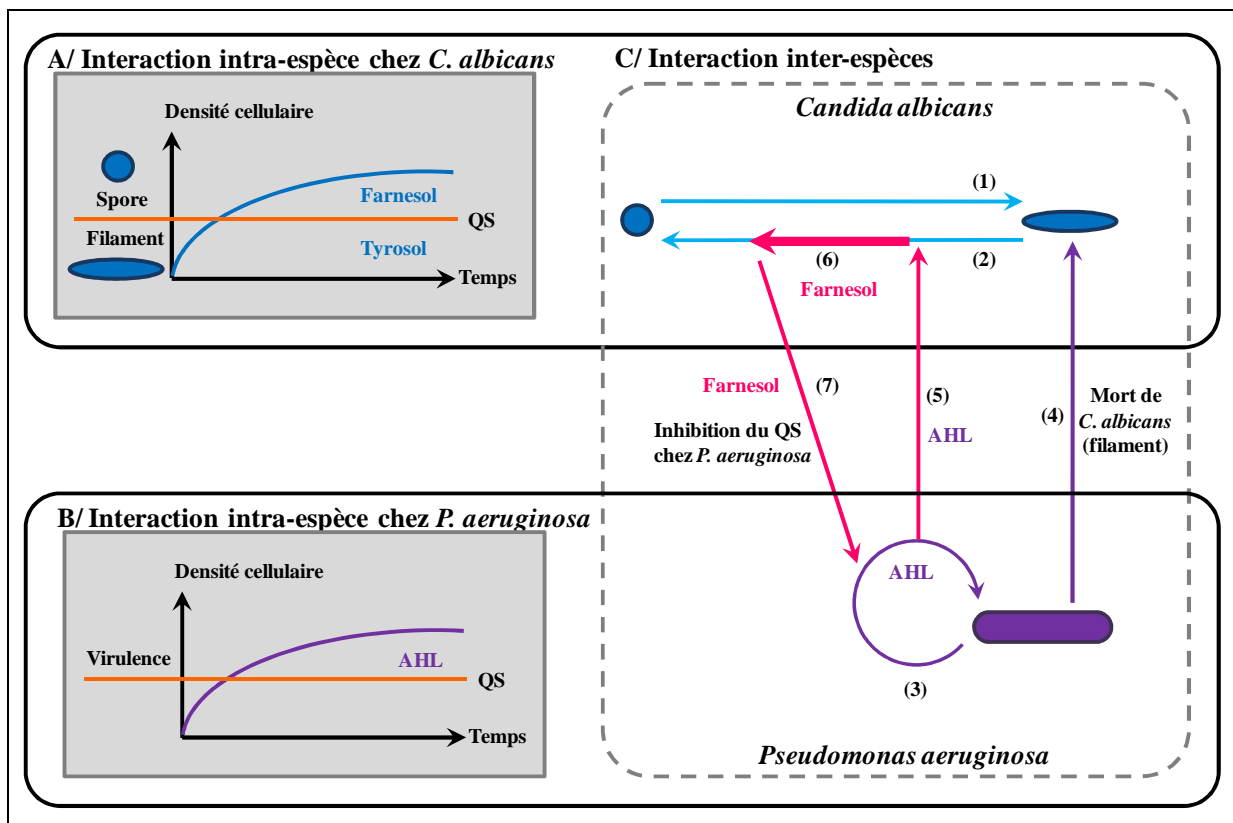


Figure 22. Communication intra- et inter-espèces.

QS : Quorum Sensing. **AHL** : Acyl-Homosérine Lactone.

(1) (2) : Equilibre entre la forme filament (basse densité cellulaire) sous l'action du tyrosol et la forme spore (haute densité cellulaire) de *C. albicans* sous l'action respective du tyrosol et du farnesol.

(3) : Stimulation des facteurs de virulence de *P. aeruginosa* sous l'action de l'AHL. (4) : *P. aeruginosa* activé par l'AHL tue *C. albicans* sous forme filament.

(5) : *C. albicans* capte l'AHL produit par *P. aeruginosa*. (6) : La détection de l'AHL provoque le production de farnesol par *C. albicans*, déplaçant l'équilibre vers la forme spore. (7) : Le farnesol inhibe le quorum sensing de *P. aeruginosa*.

Pour conclure, la transformation du lait en fromage résulte de nombreux savoir-faire ainsi que du développement d'un écosystème microbien complexe. Chaque partenaire de cet écosystème joue un rôle important dans la genèse des qualités organoleptiques fromagères, notamment par la modification des propriétés physico-chimiques (lait ; caillé ; fromage) et par la production de composés aromatiques. Parmi ces molécules, les composés soufrés volatils jouent un rôle primordial dans la saveur des fromages à pâte molle à croûte lavée. La complexité du milieu (lait), des procédés de fabrication et de l'écosystème rend l'étude des micro-organismes difficile.

Afin d'obtenir des données génériques sur les micro-organismes d'affinage, leur interaction, ainsi que sur la genèse des composés soufrés volatils, nous avons choisi de structurer ce travail en trois temps :

- Réalisation d'un bilan de l'état des connaissances et reconstitution des voies du métabolisme du soufre chez les levures hémiascomycètes par analyse *in silico*.

- Etude approfondie du métabolisme du soufre chez deux levures hémiascomycètes, *Kluyveromyces lactis* et *Yarrowia lipolytica*, par une combinaison de techniques exploratoires (Transcriptome, Métabolome, Chromatographie en phase Gazeuse coupée à la Spectrométrie de Masse (GC-MS)).

- Etude de l'interaction entre deux micro-organismes d'affinages, *Kluyveromyces lactis* et *Brevibacterium aurantiacum*, par une approche transcriptomique couplée à l'analyse des modifications physiologiques et biochimiques.

RESULTATS-DISCUSSION

RESULTATS-DISCUSSION

I. Métabolisme du soufre chez les levures hémiascomycètes

I. A. Introduction

Les levures du phylum des hémiascomycètes sont séparées par de grandes distances évolutives. Ces organismes eucaryotes unicellulaires, possédant une organisation et un niveau de complexité similaires, sont une ressource intéressante pour l'étude de l'évolution du métabolisme notamment grâce à la disponibilité de nombreux génomes séquencés.

Nous avons tout d'abord choisi de faire un bilan des connaissances du métabolisme du soufre chez *Yarrowia lipolytica*, la levure étudiée la plus divergente de la levure modèle *Saccharomyces cerevisiae*. Cette levure est étudiée notamment pour ces capacités à produire des composés soufrés volatils via le catabolisme des acides aminés soufrés. Ces données sont présentées dans la section I. B.

Les connaissances des voies de biosynthèse des acides aminés et autres intermédiaires soufrés chez *Y. lipolytica* s'appuient essentiellement sur celles générées par l'étude de *S. cerevisiae*. Cependant *Y. lipolytica* est phylogénétiquement plus proche des champignons filamenteux. Nous avons donc réalisé une étude phylogénétique du phylum des hémiascomycètes (sur 11 levures dont les génomes sont séquencés et annotés) en nous appuyant sur les connaissances du métabolisme du soufre chez *S. cerevisiae* mais aussi sur d'autres micro-organismes modèles : *Schizosaccharomyces pombe*, *Neurospora crassa* et *Emericella nidulans*. Les résultats de cette étude, qui nous a permis d'avoir une vision du métabolisme du soufre à travers le phylum entier, sont présentés dans la section I. C.

I. B. Article n°1 : Métabolisme du soufre chez la levure d'affinage
Yarrowia lipolytica

Sulphur metabolism of the cheese-ripening yeast *Yarrowia lipolytica*.

Agnès Hébert^{1,2}, Jean Marie Beckerich², Sophie Landaud¹, Pascal Bonnarme^{1*}

¹AgroParisTech-INRA, UMR782 Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires,

²AgroParisTech-INRA, UMR1319 Micalis, 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

Due to their importance in flavouring capacities (eg: production of volatile sulphur compounds (VSCs)), their role in redox regulation (eg: production of thiols), and their possible role in microbial interactions, sulphur compounds play a key role in traditional fermented products. A better knowledge and control of their microbial production is therefore of major interest not only to maintain the high quality of these foodstuffs, but also to get generic knowledge on sulphur metabolism in the microbial world. *Yarrowia lipolytica* is a commonly found yeast in numerous cheeses, and its enzymatic feature gives this microorganism a competitive superiority over other yeasts species found in cheese. Several studies have shown that this yeast could efficiently degrade sulphur aminoacids, leading to VSCs production.

The main knowledge on *Y. lipolytica* sulphur metabolism is presented in this chapter. A metabolic reconstruction of *Y. lipolytica* sulphur metabolism is first presented. The common occurrence of *Y. lipolytica* in cheeses is demonstrated together with the importance of VSCs in cheese flavouring. Then, L-methionine and L-cysteine catabolisms state of the art is presented. Likely *Y. lipolytica* L-methionine and L-cysteine degradation pathways are also presented.

Keywords *Yarrowia lipolytica*; Sulphur metabolism; Volatile sulphur compounds; transcriptome; L-methionine; transamination; biochemical pathway.

Contents

1 Introduction

2 Metabolic reconstruction of sulphur metabolism in *Yarrowia lipolytica*

3 *Yarrowia lipolytica* in cheese ecosystems

4 Importance of volatile sulphur compounds on the quality of cheeses

5 L-methionine and L-cysteine catabolisms and volatile sulphur compounds biosynthesis in *Y. lipolytica*

5.1 L-cysteine catabolism

5.2 Evidence of transamination as a key step for L-methionine degradation to volatile sulphur compounds

5.3 *In silico* analyses of genes encoding branched chain aminoacid aminotransferases (BAT) or aromatic acid aminotransferases (ARO)

5.4 *Y. lipolytica* transcriptome analysis in response to various sulphur sources.

6 Future perspectives

References

1 Introduction

Yarrowia lipolytica is one of the most extensively studied non-conventional yeasts for it is quite different from other intensively studied yeasts like *Saccharomyces cerevisiae*. Its ecological niche encompasses lipid-rich food like margarine, olive oil and cheese. *Y. lipolytica* is non-pathogenic to human and has been approved for several industrial processes. It is the only species recognized within the *Yarrowia* genus (Barnett *et al.* 2000). It is an obligate aerobe which secretes large amounts of various metabolites and enzymes. On rich media, it naturally secretes an alkaline protease at neutral pH or an acidic protease at low pH. Secreted RNase, phosphatase, lipase and esterase were also detected under diverse growth conditions (Barth and Gaillardin 1997). These characteristic features give this microorganism a competitive superiority over other yeasts species found in various habitats including cheese (see § 3). As a consequence, *Y. lipolytica* which develops on the cheese surface constitutes an adventitious microorganism from the cheese environment (eg: brine, ripening shelves, and personnel), and they rapidly outnumber the commercial cultures (Mounier *et al.* 2006). *Y. lipolytica* is a ubiquitous, naturally developing yeast in many cheeses (Corsetti *et al.* 2001; Cosentino *et al.* 2001), and constitutes a part of the cheese surface microflora. 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 flavour compounds. Among flavour compounds, volatile sulphur compounds (VSCs) are estimated to represent about 10% of the volatile components detected in food and beverages (Boelans and van Gemert 1993). Such compounds are commonly found in dairy products, especially ripened cheeses (Berger *et al.* 1999). Their low odour thresholds make them important contributors to the odour and aroma of cheeses and may participate to the organoleptic properties of cheeses (Boelans and van Gemert 1993). However, the metabolism leading to the synthesis of VSCs and related sulphur metabolism has been, until recently, the subject of limited investigation. In cheese, VSCs essentially arise from L-methionine and L-cysteine - a 1:5 L-cysteine/L-methionine proportion was found in casein (Wood *et al.* 1985) - which are the major sulphur-bearing precursors found in casein.

L-methionine being the main sulphur amino acid found in cheese curd, its catabolism has been extensively investigated in several cheese-ripening yeasts and bacteria (Bonnarme *et al.* 2000; Bonnarme *et al.* 2001) with respect to VSCs production. It is well established that, in the cheese ecosystem, VSCs primarily arise from the degradation of L-methionine to methanethiol (MTL), the latter being subsequently converted to other sulphur-bearing

compounds, including the MTL oxidation products dimethyl disulphide (DMDS) and dimethyl trisulphide (DMTS), and other VSCs such as thioesters and thioethers (Landaud *et al.* 2008). In yeasts, L-methionine to MTL conversion proceeds via a two-step degradation pathway which is initiated by an aminotransferase, leading to the formation of the transamination product 4-methylthio-2-oxobutyric acid (KMBA) which is subsequently converted to MTL. Tracing experiments enabled to identify volatile and non volatile L-methionine degradation intermediates and end products (Arfi *et al.* 2006; Bonnarme *et al.* 2004). In contrast, owing to its low levels in cheese, the study of L-cysteine catabolism has been rather neglected until now in cheese-ripening microorganisms.

It has been established that *Y. lipolytica* produces many more VSCs than other commonly found cheese-ripening yeasts, such as *Debaryomyces hansenii* and *Kluyveromyces lactis* (Cernat-Bondar *et al.* 2005; Cholet *et al.* 2007). L-methionine and S-methyl-methionine degradation have been studied in several cheese-ripening yeasts, including *Y. lipolytica*, *Geotrichum candidum*, *K. lactis*, and *D. hansenii* (Spinnler *et al.* 2001). It was found that *Y. lipolytica* was an efficient VSCs producer leading to i) dimethyl sulphide (DMS) accumulation through S-methyl-methionine degradation, ii) MTL, DMDS, DMTS and methylthioacetate (MTAc) through L-methionine degradation.

The recent publications of the genomes of several yeasts involved in cheese ripening, among others *Y. lipolytica* (Dujon *et al.* 2004), opened up new opportunities to investigate the VSCs production abilities of this yeast of great technological interest at the molecular level.

2 Metabolic reconstruction of sulphur metabolism in *Yarrowia lipolytica*

From *in silico* analysis of the sequenced *Y. lipolytica* genome, a metabolic reconstruction of the sulphur metabolism of this yeast has been done and is presented below (Table 1; Figure 1). In order to efficiently assimilate sulphate from the extracellular medium, *Yarrowia lipolytica* possesses a high affinity sulphate transporter (*YALI0B17930g*). Once in the cell, sulphate requires several steps before it can be utilized. In fact, sulphate is too stable to be directly incorporated into a carbon chain. Sulphate is primarily activated and then reduced (Figure 1, black arrows), leading to the production of sulphide. The sulphate activation is realized in two successive steps. First, the ATP sulphurylase (*YALI0B08184g*) catalyzes the formation of adenylyl sulphate (APS) from ATP and sulphate. Secondly, the APS kinase (*YALIOE00418g*) realizes the phosphorylation of APS, producing PAPS. The sulphate activation is followed by the reduction of PAPS. This reduction requires the successive action

of two enzymes, the PAPS reductase (*YALIOB08140g*) which produces sulphite, and the sulphite reductase composed of two subunits (*YALIOE16368g* (alpha unit); *YALIOD11176g* (beta unit)), which finally leads to the production of sulphide. The sulphide produced can be incorporated into a carbon chain, the *O*-acetylhomoserine, to form homocysteine.

In yeasts, homocysteine plays a central role in sulphur metabolism. This molecule is at the crossroad of the transsulphuration pathway (grey arrows) and the methyl cycle (black arrows intermittent line), which lead respectively to the production of L-cysteine and L-methionine. The reverse transsulphuration pathway renders possible the conversion of homocysteine to L-cysteine via cystathionine. The enzymes involved in L-cysteine synthesis from homocysteine are the cystathionine β -synthase (*YALIOE09108g*) and the cystathionine γ -lyase (*YALIOF05874g*). The synthesis of homocysteine from L-cysteine, called transsulphuration pathway, involves the cystathionine γ -synthase (*YALIOD17402g*) and the cystathionine β -lyase (*YALIOD00605g*). Once produced, L-cysteine may lead to the production of glutathione (black arrows dotted line), via γ -glutamylcysteine. The two enzymes responsible for glutathione biosynthesis are the γ -glutamylcysteine synthase (*YALIOE30129g*) and the glutathione synthase (*YALIOC17831g*). Glutathione is an essential molecule involved in defense against oxidative stress.

Methionine is directly synthesized from homocysteine by the methionine synthase (*YALIOE12683g*). The methyl cycle leads to the production of an important molecule, *S*-adenosylmethionine (SAM) by the *S*-adenosylmethionine synthase (*YALIOB14509g*) SAM is the major donor of methyl in the cell, and is involved in several metabolisms. Methyltransferase converts SAM to *S*-adenosylhomocysteine, this latter molecule being the substrate of *S*-adenosylhomocysteine hydrolase (*YALIOF11759g*), which leads to *de novo* homocysteine synthesis.

Interestingly, *in silico* analysis revealed a striking redundance of putative L-methionine permease *MUP1* and/or *MUP3* genes in *Y. lipolytica* genome (*YALIOD16137g*, *YALIOF03498g*, *YALIOF25795g*, *YALIOD19646g* and *YALIOF07018g*), higher than in other cheese-ripening yeasts genomes, like *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis* and *Debaryomyces hansenii*. The same feature is also observed with GAP1, a general aminoacid permease, for which seven orthologs *YALIOB16522g*, *YALIOB19492g*, *YALIOB19800g*, *YALIOC09889g*, *YALIOC17237g*, *YALIOE10219g*, *YALIOF19866g* were found in *Y. lipolytica*.

This suggests that such aminoacid transporters may give a competitive advantage to *Y. lipolytica*, allowing it to rapidly grow on L-methionine. Interestingly, *MUP1*, which is a high affinity permease, could also be involved in cysteine uptake.

SULPHATE TRANSPORTER	
<i>YAL10B17930g</i>	High affinity sulphate permease
SULPHATE ASSIMILATION	
<i>YAL10B08184g</i>	ATP sulphurylase
<i>YAL10E00418g</i>	Adenosine-5 -phosphosulphate kinase
<i>YAL10B08140g</i>	3'-phosphoadenylsulphate reductase
<i>YAL10D11176g</i>	Sulphite reductase beta subunit
<i>YAL10E16368g</i>	Sulphite reductase alpha subunit
<i>YAL10E00836g</i>	L-homoserine- <i>O</i> -acetyltransferase
<i>YAL10D25168g</i>	<i>O</i> -acetyl homoserine- <i>O</i> -acetyl serine sulphhydrylase
METHYL CYCLE	
<i>YAL10E12683g</i>	Cobalamin-independent methionine synthase
<i>YAL10B14509g</i>	<i>S</i> -adenosylmethionine synthetase
<i>YAL10F11759g</i>	<i>S</i> -adenosyl-L-homocysteine hydrolase
TRANSSULPHURATION PATHWAY	
<i>YAL10E09108g</i>	Cystathionine beta-synthase
<i>YAL10F05874g</i>	Cystathionine gamma-lyase
<i>YAL10D17402g</i>	Cystathionine gamma-synthase
<i>YAL10D00605g</i>	Cystathionine beta-lyase
GLUTATHIONE SYNTHESIS	
<i>YAL10E30129g</i>	Gamma glutamylcysteine synthetase
<i>YAL10C17831g</i>	Glutathione synthetase

Table 1: Genes involved in sulphur metabolism in *Yarrowia lipolytica*. The genes were identified by an *in silico* comparison with the yeast model *Saccharomyces cerevisiae*. The databases utilized are the *Saccharomyces* Genome Database (<http://www.yeastgenome.org/>) and Genolevures (<http://www.genolevures.org/>).

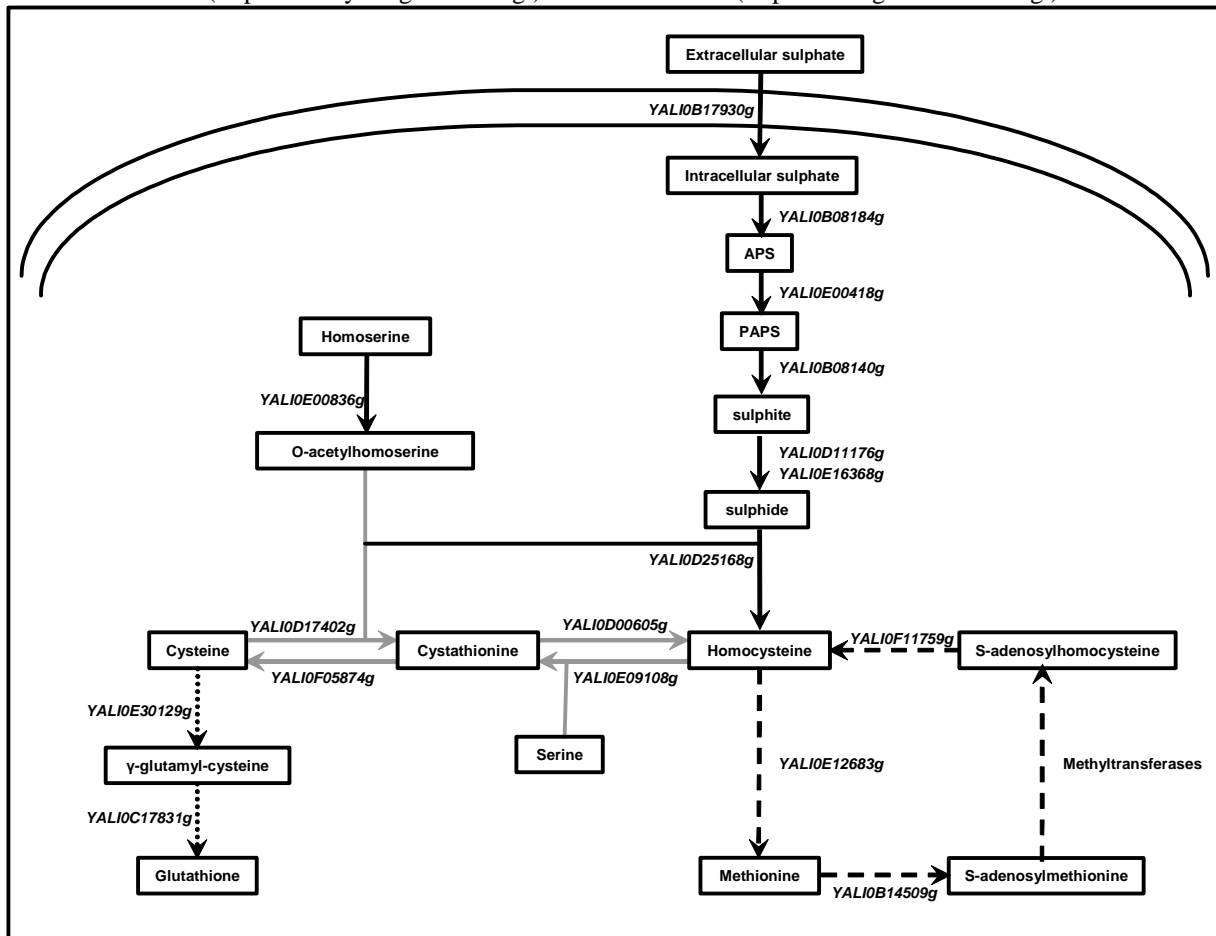


Figure 1: Survey of sulphur metabolism in *Yarrowia lipolytica*. Sulphate assimilation: black arrows. Transsulphuration pathway: grey arrows. Methyl cycle: black arrows intermittent line. Glutathione synthesis: black arrows dotted line.

3 *Yarrowia lipolytica* in cheese ecosystems

Y. lipolytica occurs frequently in milk products and, owing to its high catabolic activities (eg: proteolytic and lipolytic activities), this species can play an important role in the formation of aroma precursors such as aminoacids, fatty acids and esters, as well as their subsequent conversion to aroma-active or other bio-active compounds (Guerzoni *et al.* 2001; van den Tempel and Jakobsen 2000). Strains of the yeasts *D. hansenii* and *Y. lipolytica*, isolated from blue mould cheeses were examined for their technological characteristics and potential use as starter cultures in cheese ripening. *Y. lipolytica* was more sensitive to NaCl and did not assimilate lactose, contrary to *D. hansenii*. Furthermore, *Y. lipolytica* strains were much more lipolytic and proteolytic than *D. hansenii* (van den Tempel and Jakobsen 2000).

Due to its catabolic activities, *Y. lipolytica* can therefore strongly influence the organoleptic properties of cheese through the production of precursors from the cheese curd, leading to aroma compounds biosynthesis during the ripening process. For instance, chemico-physical parameters of major importance for cheese ripening (eg: pH, NaCl, milk fat) markedly influenced the lipolytic activity of *Y. lipolytica* strains with substantial changes in the free fatty acids (FFA) production profiles. Such FFA are known as potential aroma precursors (Guerzoni *et al.* 2001).

Y. lipolytica has been identified in many cheeses. For instance, in Camembert and Brie cheeses, although a broad spectrum of yeasts was isolated from both cheeses, *Y. lipolytica* and *D. hansenii* were the most abundant yeast species isolated (Viljoen *et al.* 2003). In the red-smear cheese, Livarot cheese, the microbial diversity of the cheese surface ecosystem was studied using culture-dependent and culture-independent approaches. It was found that *Y. lipolytica* accounted for 7.5% of the total culturable yeast microbiota (Mounier *et al.* 2009). Microbial interactions occurring within a cheese microbial community has been investigated using the Lotka-Volterra model and yeasts omissions studies to evaluate species interactions (Mounier *et al.* 2008). It was shown that negative interactions occurred between yeasts. Although mechanisms involved in such interactions still remained to be elucidated, the authors found that *Y. lipolytica* inhibited mycelial expansion of the yeast *G. candidum* a yeast of great importance in numerous soft cheeses such as Camembert or Livarot cheeses (Mounier *et al.* 2008).

The growth of *Y. lipolytica* can also be dramatically affected by the presence of other microorganisms of the ecosystem, especially the bacterium *Staphylococcus xylosus* (Mansour *et al.* 2009b). The presence of *S. xylosus* C2a resulted in a 100-fold decrease in the *Y.*

lipolytica cell count compared to the pure culture. It was postulated that competition for amino acids between *Y. lipolytica* and *S. xylosus* may explain this phenomenon, since the amino acids were dramatically consumed in *Y. lipolytica* - *S. xylosus* coculture compared to *Y. lipolytica* or *S. xylosus* mono-culture. As a result of the low amino acid concentration in the medium, the expression of *Y. lipolytica* genes involved in amino acid catabolism (*GDH2*, *BAT1*, *KAD*) was downregulated in the presence of *S. xylosus* compared to the yeast monoculture.

Gene expression and biochemical analyses were performed in a coculture of the yeasts *D. hansenii*, *Kluyveromyces marxianus*, and *Y. lipolytica* (Cholet *et al.* 2007). The time-course expression of target genes possibly involved in lactose/lactate catabolism and the biosynthesis of sulphur-flavoured compounds were studied in pure cultures of each yeast, as well as in coculture, and compared to biochemical data. A high expression of the *LAC* genes was observed in *K. marxianus*, a yeast which degrades lactose. Several lactate dehydrogenase encoding genes were also expressed essentially in *D. hansenii* and *K. marxianus*, which are two efficient deacidifying yeasts in cheese ripening. Contrary to *D. hansenii* and *K. marxianus*, several genes involved in L-methionine catabolism were highly expressed in *Y. lipolytica*. Biochemical analyses revealed that this yeast efficiently assimilates L-methionine, and also exhibited a high expression of the *S. cerevisiae* orthologs *BAT2* and *ARO8*, which are involved in the L-methionine degradation pathway (Cholet *et al.* 2007).

4 Importance of volatile sulphur compounds on the quality of cheeses

Due to their high reactivity, thiols such as MTL or H₂S are common precursors for a variety of other VSCs. Both thiols arise from the degradation of the sulphur aminoacids L-methionine and L-cysteine which are present in high amounts in the cheese matrix. VSCs are key compounds for the typicity and quality of ripened cheeses, giving various flavour notes to the product. However, owing to their reactivity, these thiols are not always easy to quantify in the cheese matrix. MTL is the first volatile degradation product of L-methionine (see § 5) and can be found to high amounts in numerous cheeses among others camembert, vintage cheddar, parmesan, pecorino, grana padano and blue cheese. Furthermore, works have reported a good correlation between cheese flavour intensity and MTL concentration, suggesting that MTL alone could be a key contributor of the cheese flavour (Landaud *et al.* 2008).

Another possible VSCs precursor is H₂S which is considered as the primary degradation product of L-cysteine. This thiol has the unpleasant odour of "rotten eggs", and has been reported in several cheeses including limburger and cheddar (Landaud *et al.* 2008).

MTL (and possibly H₂S) are subsequently oxidized to form other VSCs such as sulphides and thioesters (Figure 2) giving cheeses various flavour notes. For instance DMS was reported in several types of cheeses such as camembert, cheddar or parmesan. Its aroma descriptor was found to be "boiled cabbage, sulphurous", and its odour threshold is quite low (~1ppb), suggesting that this compound could be a contributor to the cheese aroma (Landaud *et al.* 2008). The most commonly sulphide reported in ripened cheese aroma is DMDS. DMDS has a low odour threshold (~20 ppb) and a typical "garlic" odour which is desired in the final aroma of numerous cheeses among others camembert, cheddar, parmesan, grana padano, maroilles, livarot, pont-l'Évêque, langres, and Époisses. Although present in very low amounts but, owing to their much lower detection threshold than DMDS, other sulphides like DMTS and dimethyl tetrasulphide (DMQS) are probably more important than DMDS for the cheese aroma (Landaud *et al.* 2008). It has been reported by Frank *et al.* (2004) that DMTS had a "strong" to "extremely strong" perceived intensity in vintage cheddar, parmesan, pecorino, grana padano and blue cheese. DMQS is less frequently detected in cheeses but, due to its much lower detection threshold (~1 ppb) compared to DMTS (~8 ppb) and DMDS (~23 ppb; Martin *et al.* 2004), it probably significantly influences cheese aroma, as reported in parmesan or grana padano (Frank *et al.* 2004).

Another family of VSCs, S-methylthioesters, has also been reported in several cheeses and extensively studied with respect to their detection thresholds - which ranged from 1 to 3 ppb - and flavour notes descriptors such as "cabbage", "garlic", "cheesy" (Martin *et al.* 2004; Landaud *et al.* 2008). For instance, S-methylthioacetate (MTAc) which has been detected in vacherin, pont-l'Évêque, langres and Époisses, has flavour descriptors such as "cabbage", "cheesy" and "crab".

Another VSC found in numerous cheeses including camembert, cheddar, blue cheese, parmesan, grana padano, pecorino, is methional (methylthio-propionaldehyde). It arises from the Erlich degradation of L-methionine (see § 5 and Figure 2). It has a typical "boiled potato" note and could probably play an important role in the typical cheesy aroma in the cheeses where it is present (Frank *et al.* 2004).

Among the above cited CSV, namely MTL, H₂S, DMS, DMDS, DMTS, MTAc and methional, have been shown to be produced to some extent by *Yarrowia lipolytica* depending

on culture media, precursors added and strain (Cholet *et al.* 2008 ; Spinnler *et al.* 2001 ; Arfi *et al.* 2002 ; Bonnarme *et al.* 2001). The production of MTL, DMS, DMDS, DMTS, MTAc and methional was induced by L-methionine supplementation to the culture medium. The effect of low (LM) or high (HM) concentration of L-methionine was studied for *Y. lipolytica* cultivated in a cheese-like medium with respect to VSCs production (Cholet *et al.* 2008). It was found that, in the HM medium, L-methionine consumption was accompanied by a transient accumulation of the transamination product of L-methionine, α -keto γ -methylthiobutyrate (KMBA), the latter being subsequently degraded to VSCs. MTL, DMS, DMDS and DMTS – methional being detected as traces - were detected only in the HM medium, which suggests a strong relationship between VSCs production and KMBA disappearance. Other results have shown that, using a medium supplemented with L-methionine, *Y. lipolytica* could also produce MTAc and consistent amounts (350 ppb) of methional together with MTL, DMDS and DMTS (Arfi *et al.* 2002). Substituting precursor L-methionine for *S*-methylmethionine, resulted in the production of only DMS by *Y. lipolytica* (Spinnler *et al.* 2001). In this case, it was speculated that enzymatic biosynthesis of DMS most probably proceeded through a demethiolation of *S*-methylmethionine. Nevertheless, the presence of *S*-methylmethionine in cheese still remains controversial. Another example of the importance of the precursor for VSCs production profile is illustrated by L-cysteine. In *Y. lipolytica*, it was found that H₂S was the major VSCs produced from L-cysteine degradation, relative importance of H₂S production being essentially strain-dependent (López del Castillo-Lozano *et al.* 2007a).

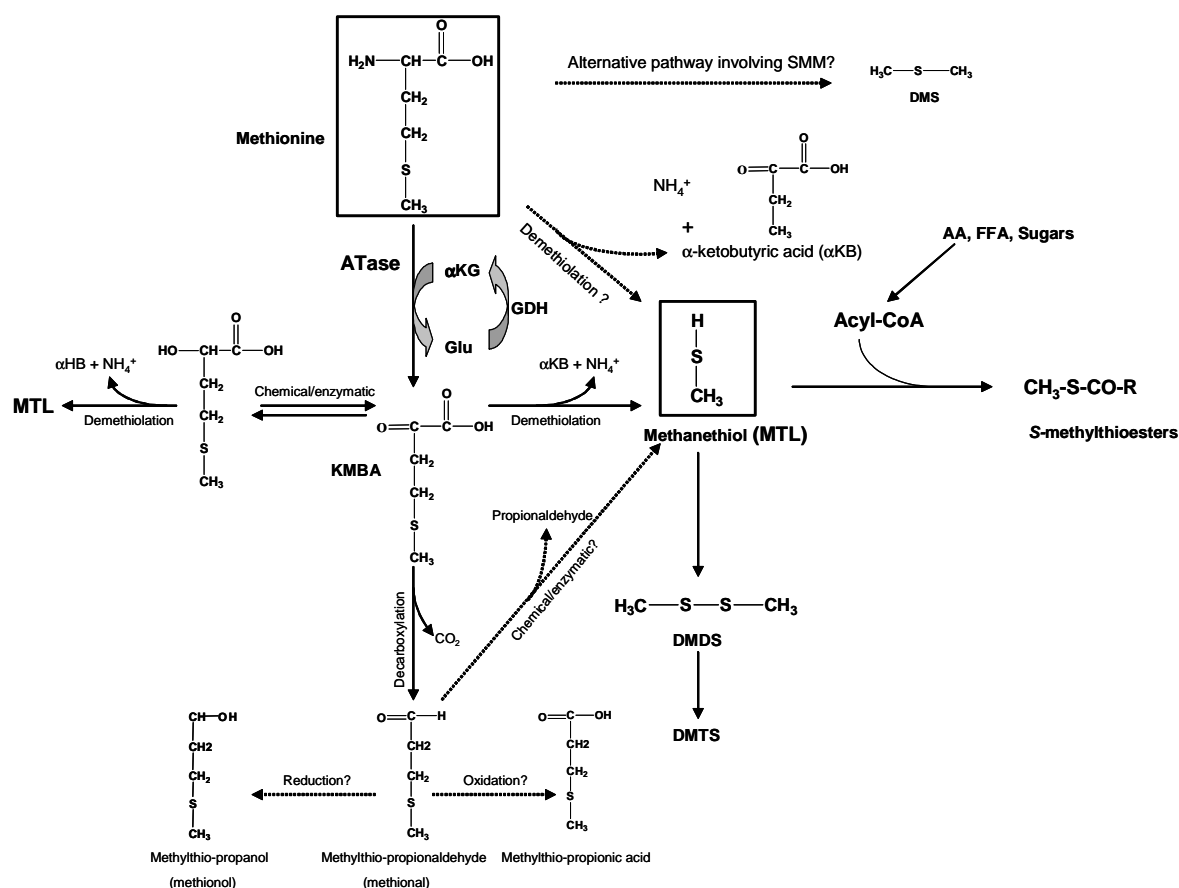


Figure 2: Likely pathways of L-methionine catabolism to volatile sulphur compounds in *Y. lipolytica*. ATase: aminotransferase; α -KG: alpha ketoglutarate; Glu: glutamate; GDH: glutamate dehydrogenase; SMM: S-methylmethionine; MTL: methanethiol; KMBA: α -keto γ -methylthiobutyrate; AA: amino acid; FFA: free fatty acid; DMS: dimethyl sulphide; DMDS: dimethyl disulphide; DMTS: dimethyl trisulphide. Dashed lines are for hypothetical routes

5 L-methionine and L-cysteine catabolisms and volatile sulphur compounds biosynthesis in *Y. lipolytica*

5.1 L-cysteine catabolism

The catabolism of L-cysteine has been investigated in several yeasts and bacteria from cheese origin (López del Castillo-Lozano *et al.* 2007a). It was found that hydrogen sulphide (H_2S) production was dramatically enhanced in media supplemented with L-cysteine. Although H_2S production capabilities greatly varied depending on strain, it clearly appeared that yeast strains, especially *Y. lipolytica* YL200 ($53.00 \mu\text{g ml}^{-1} \pm 1.37$), were greater producers of H_2S than bacteria. Furthermore, a linear relation was found between L-cysteine consumption and H_2S production for all yeasts producing large amounts of H_2S (López del Castillo-Lozano *et al.* 2007a). However, in some cases including *Y. lipolytica* strains, L-cysteine was consumed without H_2S production, suggesting that γ -elimination is perhaps not

the only catabolic pathway for L-cysteine. It has been hypothesized that a transamination step could be involved in the first step of L-cysteine catabolism leading to the formation mercapto-pyruvate (Figure 3). The transamination product mercapto-pyruvate i) could be converted to H₂S and pyruvate by a chemical reaction, or ii) could be reduced to the corresponding aldehyde (mercapto-ethanal) as suggested in the yeast *S. cerevisiae* (Vermeulen *et al.* 2006) through the Ehrlich pathway (Figure 3). However, the transsulphuration pathway and glutathion synthesis cannot be ruled out in *Y. lipolytica*, this pathway being quite active in the yeast *S. cerevisiae* as demonstrated by a combined metabolome and proteome approach (Lafaye *et al.* 2005).

In an attempt to study the possible effect of L-cysteine on aroma compounds production, VSCs biosynthesis was studied in culture media supplemented with L-methionine or L-methionine/L-cysteine mixtures, using five cheese-ripening yeasts (López del Castillo-Lozano *et al.* 2007b). It was found that *Y. lipolytica* YL200 produced DMDS and trace amounts of DMTS, 2-methyl-tetrahydrothiophen-3-one and *S*-methylthioacetate were also produced to some extent by *Y. lipolytica*. However, VSCs production diminished in a strain-dependent behaviour when L-cysteine was supplemented, even at a low concentration (0.2 g l⁻¹). This effect was attributed to a significant decrease in L-methionine consumption in all the yeasts except YL200, for cultures supplemented with L-cysteine. Hydrogen sulphide produced through L-cysteine catabolism did not seem to contribute to VSCs generation at the acid pH of yeast cultures.

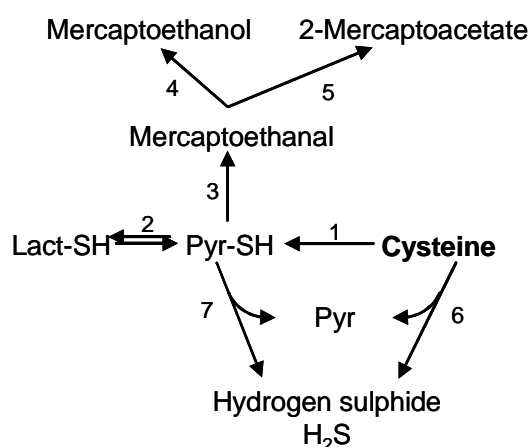


Figure 3: Putative L-cysteine degradation pathways. PyrSH: Mercaptopyruvate; Pyr: pyruvate; Lact-SH: Mercaptolactate. Enzymes: 1) Transaminase; 2) Reductase; 3) Decarboxylase; 4) Alcohol dehydrogenase; 5) Oxydase; 6) Desulphhydrase; 7) Lyase.

5.2 Evidence of transamination as a key step for L-methionine degradation to volatile sulphur compounds

In several microorganisms isolated from cheese, the degradation of aminoacids is initiated by an aminotransferase in which the amino group of an aminoacid is transferred to an α -keto acid (e.g., α -ketoglutarate), resulting in the formation of the corresponding aminoacid (e.g., glutamate) and keto acids, which are degraded to flavour compounds (Yvon and Rijnen, 2001; Landaud *et al.* 2008). Evidence of a transamination as the initial degradation step of L-methionine to VSCs was first demonstrated in the yeast *G. candidum* (Bonnarme *et al.* 2001). In this yeast, L-methionine transamination leads to the transient accumulation of the transamination product α -keto γ -methylthiobutyrate (KMBA) which is subsequently converted to MTL and its direct oxidation products (eg: DMDS, DMTS) as well as thioesters (Figure 2). Several yeasts, among which *Y. lipolytica*, *G. candidum*, *S. cerevisiae*, *K. lactis*, *D. hansenii*, were compared with respect to their ability to degrade L-methionine to VSCs (Arfi *et al.* 2002). It was found that all yeasts could produce VSCs to some extent while degrading L-methionine. Apart from *S. cerevisiae* cultures where L-methionine was poorly consumed (9–10%), all strains had consumed almost all ($\geq 85\%$) of the L-methionine after 48 h. However, although KMBA was produced by all the yeasts, it was much more significantly accumulated by *Y. lipolytica* than did the other four yeasts; this strongly suggests that L-methionine transamination is of major importance in this yeast. Quite interestingly, while *Y. lipolytica* produced substantial amounts (350 ppb) of methional, this compound was not detected or poorly produced in the other yeasts. Methional has been detected in various types of cheeses, including cheddar and camembert (Dunn and Lindsay 1985; Kubickova and Grosch 1998). It was generally associated with a broth-like or potato odour. The production of methional by *Y. lipolytica* is likely to result from the enzymatic decarboxylation of the KMBA via the Ehrlich pathway. This suggests the occurrence of a decarboxylase activity in this yeast which converts KMBA to methional.

The availability of the genome sequence of *Y. lipolytica* enabled to carry out the functional analysis of genes putatively involved in L-methionine catabolism. However, due to the wide specificity of substrates of aminotransferases, the functional analysis of genes possibly involved in L-methionine transamination has been initiated. For instance, the enzymatic properties of the purified aromatic aminotransferase Aro8 of *Y. lipolytica* have been investigated. Its K_m s for several aminoacid substrates ranged from 2.6 mM for L-phenylalanine to 12.1 mM for L-methionine and to 61.4 mM for L-cysteine. Attempt for

heterologous production of other putative aminotransferases of *Y. lipolytica* has been carried out but without success until now (Nathalie Merault, personal communication). In this yeast, it has been found that L-methionine degradation via transamination, by a branched-chain aminotransferase (*BAT1*), could be involved in VSCs formation. In *Y. lipolytica*, the functional analysis of a branched-chain aminotransferase gene (*Y1BCA1*) has shown that the corresponding enzyme was able to convert L-methionine to KMBA, this compound being degraded to VSCs (Cernat Bondar *et al.* 2005). The *Y1BCA1* gene was overexpressed in a *BCA1* transformant for which the ability to degrade L-methionine to VSCs was compared to the parental strain. A 62% increase in KMBA biosynthesis, which is in agreement with an increase in aminotransferase activity, was obtained in the *BCA1* transformant as compared to the parental strain. This is consistent with a 55% increase in VSCs production in the modified strain. Furthermore, the thiol-producing-activity was increased 2.5 fold on L-methionine in the transformant strain as compared to the parental one (Cernat Bondar *et al.* 2005).

Concerning the decarboxylation of KMBA to methional in *Y. lipolytica*, gene *YALI0D06930g* putatively assigned as *Y1PDC6* (pyruvate decarboxylase) has been renamed *Y1ARO10* (phenylpyruvate decarboxylase), and could be a good candidate for this degradation step. In agreement with this, it was found that *Y1ARO10* was highly expressed at late stationary phase in a medium supplemented with a high concentration of L-methionine (Cholet *et al.* 2008). A combined proteome and transcriptome analysis of *Y. lipolytica* has been performed in response to aminoacids supplementation (Mansour *et al.* 2009a). Following aminoacids addition, yeast cells reorganize their metabolism towards aminoacids catabolism. In this process, the expression of *Y1GAP1* gene encoding a membrane protein involved in aminoacids transport was highly (72-fold) induced. Furthermore, the comparison of the proteome and the transcriptome data revealed a concordance of the observed effect for *Y1ARO10* and *Y1BAT2* which were both highly induced in response to aminoacids supplementation. Production of DMDS following aminoacids addition, is an indicator of L-methionine catabolism.

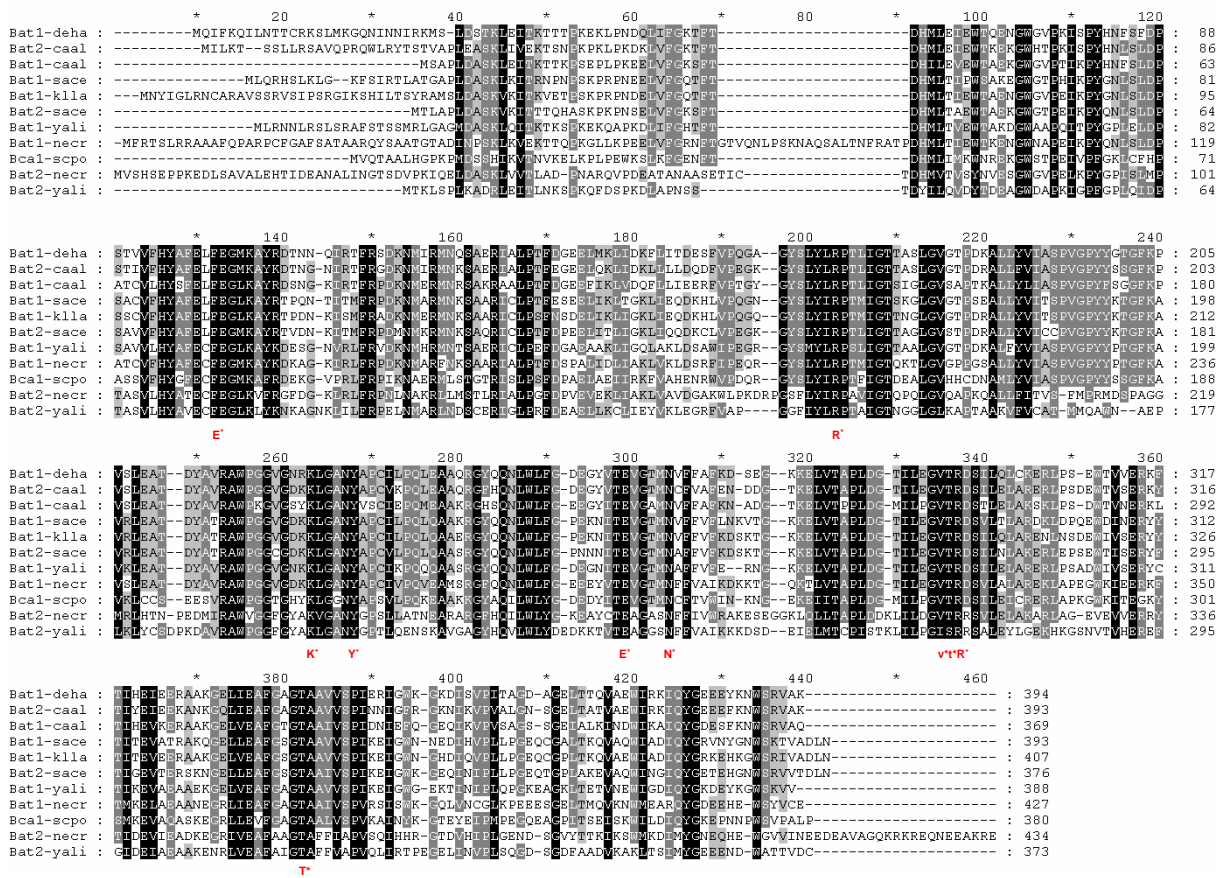
5.3 In silico analyses of genes encoding branched-chain aminoacid aminotransferases (BAT) or aromatic acid aminotransferases (ARO)

A search for genes encoding aminotransferases in the full genome of *Y. lipolytica* (Génolevures: Genomic Exploration of the Hemiascomycete Yeasts – <http://www.genolevures.org/>) has been done.

In yeasts, aminoacid aminotransferases are able to catalyse the first step of the catabolism of most of the aminoacids. Aminotransferases are pyridoxal phosphate (PLP)-dependent enzymes catalysing the transfer of the amino group of the aminoacid to α -keto glutarate generating the corresponding α -ketoacid. The biochemical structure and functioning of several aminotransferases have been well studied and classified. BATs essentially catalyse the transamination of the branched-chain aminoacids leucine, isoleucine, and valine. Except for the *Escherichia coli* and *Salmonella* proteins, which are homohexamers arranged as a double trimer, BATs are homodimers. Structurally, the BATs belong to the fold type IV class of PLP enzymes. Catalysis is on the *re* face of the PLP cofactor, whereas in other classes, catalysis occurs from the *si* face of PLP. Crystal structures of the fold type IV proteins show that they are distinct from the fold type I aspartate aminotransferase family and represent a new protein fold. Because the fold type IV enzymes catalyze diverse reactions, it is not surprising that the greatest structural similarities involve residues that participate in PLP binding rather than residues involved in substrate binding (Hutson 2001). Since these enzymes have a wide specificity of substrates, several enzymes can perform the transamination of the same aminoacid. This is the case for L-methionine which has no specific aminotransferase to be catabolized but relies on branched-chain aminoacid aminotransferases (BATs) or aromatic acid aminotransferases (AROs).

BATs are widely distributed in the microbial kingdom, where they are involved in the synthesis/degradation of branched-chain aminoacids. However, bacteria contain one single BAT whereas, in eukaryotes, there are generally two isozymes, one is mitochondrial and the other is cytosolic. In *Y. lipolytica*, two gene products belonging to the BAT protein family are found as already shown in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *BAT1* encodes a protein with a mitochondrial targeting sequence, whereas *BAT2* encodes a cytoplasmic protein (Figure 4). In *S. cerevisiae*, *BAT1* and *BAT2* have been reported as an ohnolog pair, which means that they would result from a whole genome duplication (Byrne and Wolfe 2005). The ohnologs that have undergone functional divergence are particularly interesting because they may indicate the adaptation of a species to a certain environment or ecological niche.

A



B

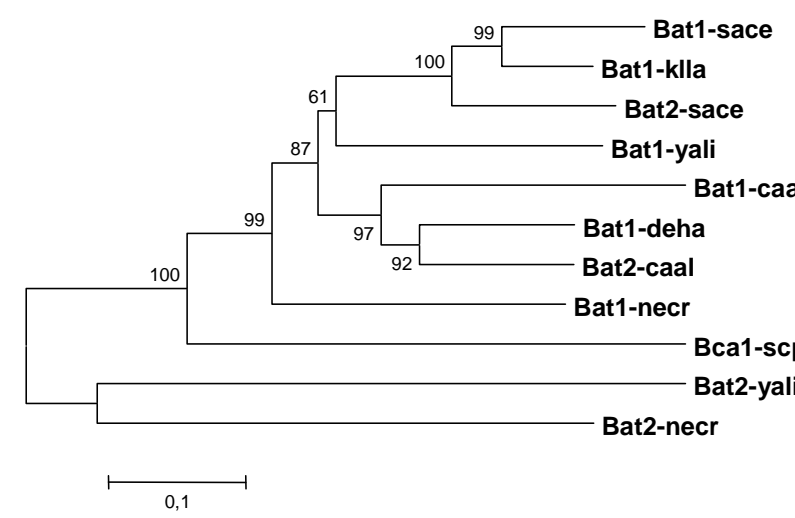


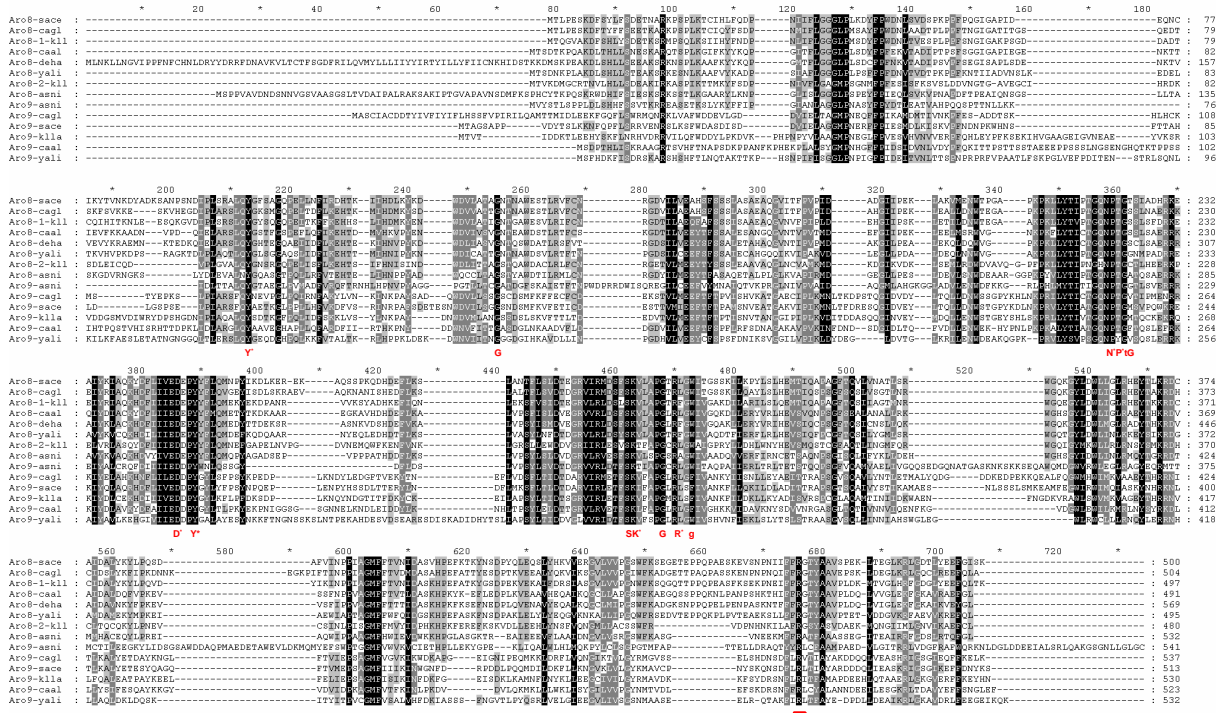
Figure 4: A: Alignments of branched-chain amino acid aminotransferases. The sequences are as follows: Bat1-Sace (*S. cerevisiae* YHR208W); Bat2-sace (*S. cerevisiae* YJR148W); Bat1-klla (KLLA0A10307g); Bat1-yali (YALI0D01265g); Bat2-yali (YALI0F19910g); Bat1-caal (CaO19.797); Bat2-caal (CaO19.6994); Bat1-deha (DEHA2D06952p); Bca1-scpo (SPBC428.02c); Bat1-necr (NCU04754); Bat2-necr (NCU04292). The alignment created with clustalX was formatted using Genedoc 2.6. The positions interacting with the pyridoxal phosphate are indicated underneath in red.

B: A tree of the selected BAT sequences built using the clustalX v1.81 software and the MEGA 3.1 package. The test of phylogeny was a bootstrap of the neighbour-joining test using the default values.

The mitochondrial location of BATs from *Y. lipolytica* was deduced from the presence of an N-terminal extension enriched in serine, threonine and polar aminoacids. The aminoacid sequences alignment of these genes with those of several other organisms has been performed using the ClustalX multiple sequence alignment program. Residues identical or similar in all proteins of these sequences are dashed in black (Figure 4A). Some species such as *S. cerevisiae* or *Y. lipolytica* have two BAT genes, one with a mitochondrial targeting signal and the second which is cytoplasmic. In other species, there is only one BAT gene and it has either cytoplasmic features as in *D. hansenii* or mitochondrial features as in *K. lactis*, suggesting that there is no preferential compartmentation for BAT. More precisely, it was found that both *Y. lipolytica* BAT genes exhibited in conserved positions, all the aminoacid residues interacting with the pyridoxal-phosphate attachment site deduced from structural studies carried out on crystallized enzymes such as human BCAT1 and BCAT2 (Yennawar *et al.* 2001). This was highlighted in the alignment. In ylBAT1, the residue Lys²³⁵ is involved in the formation of the Schiff base intermediate with pyridoxal phosphate (Kispal *et al.* 1996). Contrary to the aromatic aminoacid aminotransferases (see below), there is no BAT1 and BAT2 aminotransferase subfamilies but one single family of branched aminoacid aminotransferase. This was shown in the tree (Figure 4B) where the BAT sequences are interspersed. For instance, several yeast species such as *K. lactis*, *D. hansenii*, *Saccharomyces kluyveri* or *Zygosaccharomyces rouxi* having only a mitochondrial homologue are not clustered, but species displaying this feature are dispersed along the clade of the hemiascomycetous yeasts (Figure 4).

Concerning aromatic aminoacid aminotransferases, there is one homologue of ScARO8 and one homologue of ScARO9 in *Y. lipolytica*. In the euascomycetes clade, both genes can be clustered in two subfamilies as shown on the tree (Figure 5B). Neither ARO8, nor ARO9 display any targeting signals. Their differences are scattered along the sequences (Figure 5A). Moreover, ARO9 partners have a short N-terminal extension without identifiable function. In *S. cerevisiae*, both ARO8 and ARO9 control aromatic aminoacid catabolism. In the case of *D. hansenii*, only an ARO8 ortholog can be identified (Figure 5). According to Jensen and Wei Gu (1996), they belong to the family I of the aminotransferases superfamily and anchor residues involved mainly in pyridoxal phosphate binding can be easily identified and are indicated on Figure 5.

A



B

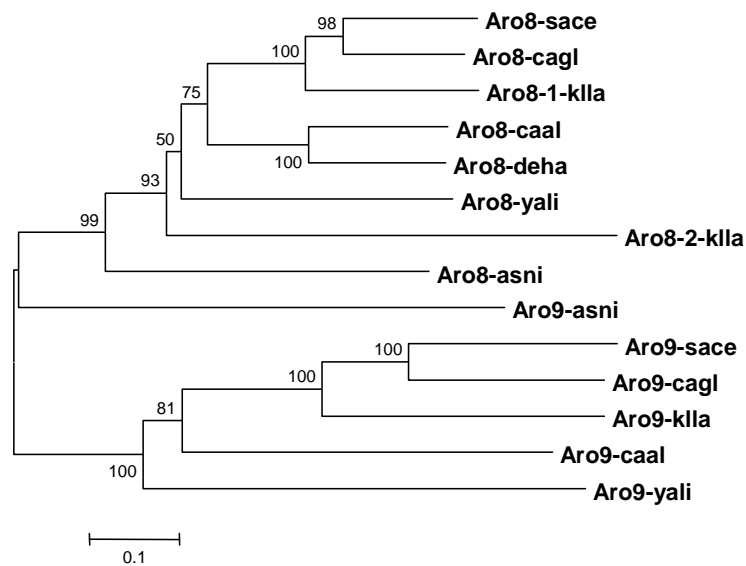


Figure 5: A: Alignments of the aromatic acid aminotransferases. The sequences are as follows: Aro8-sace (*S. cerevisiae* YGL202w); Aro9-sace (*S. cerevisiae* YHR137w); Aro8-cagl (CAGL0G01254g); Aro9-cagl (CAGL0G06028g); Aro8-1-klla (KLLA0F10021g); Aro8-2-klla (KLLA0A04906g); Aro9-klla (KLLA0D11110g); Aro8-deha (DEHA2A06886g); Aro8-caal (CaO19.9645); Aro9-caal (CaO19.1237); Aro8-yali (YAL10E20977g); Aro9-yali (YAL10C05258g); Aro8-asni (An02g05540); Aro9-asni (An09g05080). The alignment created with clustalX was formatted using Genedoc 2.6. The positions interacting with the pyridoxal phosphate are indicated underneath in red. R boxed in RED indicates a residue interacting with the substrate according Jensen *et al.*

B: A tree of the selected ARO sequences built using the clustalX v1.81 software and the MEGA 3.1 package. The test of phylogeny was a bootstrap of the neighbour-joining test using the default values.

5.4 *Y. lipolytica* transcriptome analysis in response to various sulphur sources.

The regulation of genes related to sulphur metabolism has been carried out in *Y. lipolytica* in response to various sulphur sources, among others L-methionine which is the main sulphur source in casein. Expression levels of several genes predicted to be associated with L-methionine catabolism and pyruvate metabolism were simultaneously investigated at transcriptional level in *Y. lipolytica*. Gene expression profilings were analyzed and compared when *Y. lipolytica* cells were grown in a cheese-like medium under high L-methionine (HM) or low L-methionine (LM) concentration (Cholet *et al.* 2008). In Cholet's experiments, gene expression was measured in late stationary phase when L-methionine was largely consumed. A rearrangement in the expression of some genes was observed when the L-methionine concentration was changed in the growth medium. Among them, the *YIARO8*, *YIBAT1* and *YIBAT2* genes (predicted to be involved in amino acid transamination pathway) were found to be modulated by L-methionine concentration, strongly suggesting their involvement in the L-methionine transamination step in *Y. lipolytica*. The *YIARO8* gene is the most strongly modulated in HM medium. Furthermore, *YIARO8* gene product has been overproduced in *Escherichia coli* and purified. It was found that *YIAro8p* had transaminase activity and was highly active on L-methionine.

Cholet *et al.* (2008) also reported that the *YIBAT1* gene was highly induced by L-methionine: it is in good agreement with results showing that the overexpression of the *YIBAT1* gene significantly increased L-methionine transamination as well as VSCs production (Cernat Bondar *et al.* 2005). In contrast, the expression levels of *YIARO9* gene were hardly modulated by L-methionine concentration. However, the observation that the L-methionine transamination step is highly active in *Y. lipolytica* was confirmed. A transient accumulation of the transamination product – KMBA – was measured in HM medium, which coincides with the maximum rate of L-methionine consumption and VSCs production.

In other experiments in progress in our laboratory (A. Hébert, PhD work), the regulation of sulphur metabolism in response to various sulphur sources (eg: L-methionine, cystine, sulphate) is being studied using an ORFeomic microarray containing the probes of all the identified ORFs from the *Y. lipolytica* genome. The growth conditions were different from Cholet's experiments for which cells were grown on a cheese-like medium supplemented with 6.7 mM (LM) or 40.3 mM (HM) L-methionine in late stationary phase. The work of A. Hébert was focused on the identification of the genes possibly induced by an excess of sulphur substrates. The cells were grown on a chemically defined medium mimicking a

technological cheese medium and optimized to control its sulphur content. In this case, the high L-methionine concentration was fixed to 10 mM and the low L-methionine concentration was 10 μ M. The same concentrations ratios were used when comparing cystine and sulphate as sulphur source. These concentrations allowed the same growth rate and the cultures were kept to exponential phase for at least ten generations in order to get a steady state expression level. Under such conditions, a few genes have their expression modified under high and low sulphur concentration. However, yIBAT1 appeared the only aminotransferase to be induced on L-methionine as well as on cystine although the *BAT1* gene product should not be very active on cystine.

6 Future perspectives

Owing to its metabolic features, the non-conventional yeast *Y. lipolytica* represents a unique model microorganism which is also of great technological interest. This review shows that the unique metabolism of *Y. lipolytica* - especially well adapted to milk derived media such as cheese - is currently being investigated. This is now well established that this species is a very efficient VSC producer compared to other yeasts (Cholet *et al.* 2007; Cholet *et al.* 2008).

A next step would be to study sulphur metabolism in an integrated way in pure culture by comparative genomics (e.g., conservation of pathways, regulation), functional genomics using the tools of molecular biology (eg gene expression), proteomics (eg synthesis of the corresponding enzyme), and metabolomics (eg identification of metabolic intermediates). A more in depth knowledge of sulphur metabolism and its regulation is currently under investigation in this yeast. This will probably provide a better understanding of the metabolic machinery of this atypical yeast and could be of great interest for the understanding of sulphur metabolism in other microorganisms. Preliminary data strongly suggest that *Y. lipolytica* obeys quite distinct regulation mechanisms – compared to other yeasts such as *S. cerevisiae*, *K. lactis* or *D. hansenii* – when supplemented with various sulphur sources (eg L-methionine, L-cysteine, sulphate). It may also be questioned whether VSCs are only secondary products arising from sulphur aminoacids catabolism produced under conditions of relative abundance of these amino-acids, or possess a still unidentified role in the cell life. Owing to the reductive effect of many sulphur compounds, especially thiols, a possible role of VSCs could be a regulative effect of the redox balance of the cell.

Another important step towards a better knowledge of the adaptative metabolism of *Y. lipolytica* is to study this yeast in the presence of many other species of the cheese ecosystem. It is therefore to be expected that its behaviour and metabolic adaptation may be dramatically influenced by other microbial species, including other yeasts and bacteria (Mansour *et al.* 2009b). So-called meta-approaches (meta-genome, meta-transcriptome, meta-metabolome) are emerging and surely will provide answers for the functional analysis of complex microbial ecosystems in which *Y. lipolytica* is involved.

References

- Arfi K, Landaud S, Bonnarme P (2006) Evidence for distinct L-methionine catabolic pathways in the yeast *Geotrichum candidum* and the bacterium *Brevibacterium linens*. *Appl Environ Microbiol* 72:2155-2162
- Arfi K, Spinnler HE, Tâche 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*. *Appl Microbiol Biotechnol* 58:503-510
- Barnett JA, Payne RW, Yarrow D (2000) *Yarrowia lipolytica* in: Barnett JA, Payne RW, Yarrow D (ed) *Yeasts: characteristics and identification*, Third edition. Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp 785-786
- Barth G, Gaillardin C (1997) Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiol. Rev.* 19:219-237
- Berger C, Martin N, Collin S, Gijs L, Khan JA, Piraprez G, Spinnler HE, Vulfson EN (1999) Combinatorial approach to flavor analysis: II. Olfactory investigation of a library of S-methylthioesters and sensory evaluation of selected components. *J Agric Food Chem* 47:3247-3279
- Boelans MH, van Gemert LJ (1993) Sensory properties of optical isomers. *Perfumer Flavorist* 18:2-16
- Bonnarme P, Amarita F, Chambellon E, Semon E, Spinnler HE, Yvon M (2004) Methylthioacetaldehyde, a possible intermediate metabolite for the production of volatile sulphur compounds from L-methionine by *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiol Lett* 236:85-90
- Bonnarme P, Lapadatescu C, Yvon M, Spinnler HE (2001) L-methionine degradation potentialities of cheese-ripening microorganisms. *J Dairy Res* 68:663-674
- Bonnarme P, Psoni L, Spinnler HE (2000) Diversity of L-methionine catabolism pathways in cheese-ripening bacteria. *Appl Environ Microbiol* 66 : 5514-5517
- Byrne KP, Wolfe KH (2005) The Yeast Gene Order Browser: Combining curated homology and syntenic context reveals gene fate in polyploid species. *Genome Res* 15:1456-1461
- Cernat Bondar D, Beckerich JM, Bonnarme P (2005) Involvement of a branched-chain aminotransferase in production of volatile sulfur compounds in *Yarrowia lipolytica*. *Appl Environ Microbiol* 71:4585-4591

- 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. *Appl Environ Microbiol* 73:2561-2570
- Cholet O, Henaut A, Hebert A, Bonnarme P (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
- Corsetti A, Rossi J, Gobbetti M (2001) Interactions between yeasts and bacteria in the smear surface-ripened cheeses. *Int J Food Microbiol* 69:1-10
- Cosentino S, Fadda ME, Deplano M, Mulargia AF, Palmas F. (2001) Yeasts associated with Sardinian ewe's dairy products. *Int J Food Microbiol* 69:53-58
- Dujon B, Sherman D, Fischer C, Durrens P, Casaregola S, Lafontaine I, De Montigny J, Marck C, Neugeglise C, Talla E, Goffard N, Frangeul L, Aigle M, Anthouard V, Babour A, Barbe V, Barnay S, Blanchin S, Beckerich JM, Beyne E, Bleykasten C, Boisrame A, Boyer J, Cattolico L, Confanioleri 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 JM, Nikolski M, Oztas S, Ozier-Kalogeropoulos O, Pellenz S, Potier S, Richard GF, Straub ML, 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 JL (2004) Genome evolution in yeasts. *Nature* 430:35-44
- Dunn HC, Lindsay RC (1985) Evaluation of the role of microbial Strecker-derived aroma compounds in unclean-type flavors of cheddar cheese. *J Dairy Sci* 68: 2859-2874
- for production of Danablu. *Int Dairy J* 10:263-270
- Frank DC, Owen CM, Patterson J (2004) Solid phase microextraction (SPME) combined with gas-chromatography and olfactory-mass spectrometry for characterization of cheese aroma compounds. *Lebensm Wiss u Technol* 37:139-154
- Guerzoni ME, Lanciotti R, Vannini L, Galgano F, Favati F, Gardini F, Suzzi G (2001) Variability of the lipolytic activity in *Yarrowia lipolytica* and its dependence on environmental conditions. *Int J Food Microbiol* 69:79-89
- Hutson S (2001) Structure and function of branched chain aminotransferases. *Progress in Nucleic Acids Research and Molecular Biology*. 70:175-206.
- Jensen RA, Wei Gu (1996) Evolutionary recruitment of biochemically specialized subdivisions of family I within the protein superfamily of aminotransferases. *J Bacteriol* 178:2161-2171
- Kispal G, Steiner H, Courts DA, Rolinski B, Lill R (1996) Mitochondrial and cytosolic branched-chain amino acid transaminases from yeast, homologs of the *myc* oncogene-regulated Eca39 protein. *J Biol Chem* 271:24458-24464
- Kubickova J, Grosch W (1998) Quantification of potent odorants in camembert cheese and calculation of their odour activity values. *Int Dairy J* 8:17-23
- Lafaye A, Junot C, Pereira Y, Lagniel G, Tabet JC, Ezan E, Labarre J (2005) Combined proteome and metabolite-profiling analyses reveal surprising insights into yeast sulfur metabolism. *J Biol Chem* 280:24723-24730

- Landaud S., Helinck S, Bonnarme P (2008) Formation of volatile sulfur compounds and metabolism of methionine and other sulfur compounds in fermented food. *Appl Microbiol Biotechnol* 77:1191-1205
- López del Castillo-Lozano M, Tâche R, Bonnarme P, Landaud S (2007a) Evaluation of a quantitative screening method for hydrogen sulfide production by cheese-ripening microorganisms: the first step towards L-cysteine catabolism. *J Microbiol Meth* 69:70-77
- López del Castillo-Lozano M, Delile A, Spinnler HE, Bonnarme P, Landaud S (2007b) Comparison of volatile sulphur compound production by cheese-ripening yeasts from methionine and methionine–cysteine mixtures. *Appl Microbiol Biotechnol* 75:1447-1454
- Mansour S, Bailly J, Delettre J, Bonnarme P (2009a) A proteomic and transcriptomic view of amino acids catabolism in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Proteomics* 9:4714-4725
- Mansour S, Bailly J, Landaud S, Monnet C, Sarthou AS, Coccagn-Bousquet M, Leroy S, Irlinger F, Bonnarme P (2009b) Investigation of associations of *Yarrowia lipolytica*, *Staphylococcus xylosum*, and *Lactococcus lactis* in culture as a first step in microbial interaction analysis. *Appl Environ Microbiol* 75:6422-6430
- Martin N, Neelz V, Spinnler HE (2004) Suprathreshold intensity and odour quality of sulphides and thioesters. *Food Qual Pref* 15:247-257
- Mounier J, Goerges S, Gelsomino R, Vancanneyt M, Vandemeulebroecke K, Hoste B, Brennan NM, Scherer S, Swings J, Fitzgerald GF, Cogan TM (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. *Int J Food Microbiol* 133:31-37
- Mounier J, Monnet C, Vallaeyts T, Arditi R, Sarthou AS, Helias A, Irlinger F (2008) Microbial interactions within a cheese microbial community. *Appl Environ Microbiol* 74:172-181
- Spinnler HE, Berger C, Lapadatescu C, Bonnarme P (2001) Production of sulfur compounds by several yeasts of technological interest for cheese ripening. *Int Dairy J* 11:245-252
- van den Tempel T, and Jakobsen M (2000) The technological characteristics of *Debaryomyces hansenii* and *Yarrowia lipolytica* and their potential as starter cultures for production of Danablu. *Int Dairy J* 10:263-270
- Vermeulen C, Lejeune I, Tran T.T.H, Collin S (2006) Occurrence of polyfunctional thiols in fresh lager beers. *J Agric Food Chem* 54:5061-5068
- Viljoen BC, Khoury AR, Hattingh A (2003) Seasonal diversity of yeasts associated with white-surface mould-ripened cheeses. *Food Res Int* 36:275-283
- Wood AF, Aston JW, Douglas GK (1985) The determination of free aminoacids in cheese by capillary column gas liquid chromatography. *Aust J Dairy Technol* 40:166-169
- Yennawar NH, Dunbar J, Conway ME, Hutson SM, Farber GK (2001) The structure of human mitochondrial branched-chain aminotransferase. *Acta Crystallogr D* 57:506-515
- Yvon M, Rijnen L (2001) Cheese flavour formation by amino acid catabolism. *Int Dairy J* 11:185-201

I. C. Article n°2 : Biodiversité du métabolisme du soufre chez les levures hémiascomycètes

Biodiversity in the sulfur metabolism in hemiascomycetous yeasts

Agnès Hébert, Serge Casaregola, Jean-Marie Beckerich§

UMR MICALIS, AgroParisTech-INRA, CBAI, BP 01, 78850 Thiverval Grignon, France

§Corresponding author

Email addresses:

AH: agnes.hebert@gmail.com

SC: serge.casaregola@grignon.inra.fr

JMB: beck@grignon.inra.fr

Abstract

The evolution of the sulfur compounds metabolism among yeasts species was investigated. Differences between species were observed in the cysteine biosynthesis pathway. Most yeast species possess two pathways leading to cysteine production, the transsulfuration pathway and the OAS pathway, except *S. cerevisiae* and *C. glabrata* that only display the transsulfuration pathway, and *S. pombe* that only has the OAS pathway. An examination of the components of the regulatory network in the different species shows that it is conserved in all the species analyzed since its central component Met4p was shown to keep its functional domains and that its partners were shown to be present. The study for the first time of the amino acids catabolic pathway shows that it is evolutionary conserved in the sulfur metabolism and leads us to propose a role for two gene families which appeared to be highly conserved. Altogether, this survey has given ways to understand the diversity of sulfur metabolism products among yeast species through the reconstruction of these pathways. This diversity could account for the difference in metabolic potentialities of the species with a biotechnological interest.

Introduction

Sulfur metabolism is well known in the hemiascomycetous yeast model *S. cerevisiae*, from the assimilation of inorganic sulfate to the synthesis of sulfur amino acids by the transsulfuration pathway (cysteine) and the methyl cycle (methionine). Sulfur metabolism is involved in numerous metabolisms through *S*-adenosylmethionine (SAM), a source of methyl groups, methylene groups, ribosyl groups, amino groups, aminopropyl groups and 5'-deoxyadenosyl radicals (Fontecave *et al.*, 2004). Sulfur metabolism plays an important role in the response to oxidative stress by the intermediary of glutathione (Fauchon *et al.*, 2002). The archeascomycetous yeast, *Schizosaccharomyces pombe*, presents divergent sulfur metabolism pathways, in comparison to *S. cerevisiae*. In fact, *S. pombe* has an incomplete transsulfuration pathway that does not lead to cysteine production (Baudouin-Cornu & Labarre, 2006). The synthesis of cysteine is carried out by the O-acetyl-serine pathway (OAS pathway) that does not exist in *S. cerevisiae*. The euascomycetes *Neurospora crassa* and *Emericella nidulans*, possess both cysteine synthesis pathways.

Some studies have revealed that yeasts transform sulfur amino acids into characteristic volatile sulfur compounds (VSC) that have a considerable impact on food flavor, notably in wine (Perpète *et al.*, 2006) and cheese (Bonaiti *et al.*, 2005). Sulfur metabolism has not been extensively studied in the hemiascomycete phylum, except in *S. cerevisiae*. Since the species of this phylum, which have similar morphology and unicellular lifestyle, display more sequence divergences than in the whole chordates taxon (Dujon, 2006), a comparative genomic study was undertaken to provide an insight into the evolution of the sulfur pathways in hemiascomycetes.

Results and Discussion

Using blastp and tblastn, the annotated genes involved in sulfur metabolism of *S. cerevisiae* and of the archeascomycete *S. pombe* were used as bait against 10 complete and carefully annotated genomes of hemiascomycetes (Fig. 1), which cover the whole hemiascomycete evolutionary tree (Dujon, 2006). *Yarrowia lipolytica*, *Kluyveromyces lactis*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Lachancea kluyveri*, *Kluyveromyces thermotolerans*, *Debaryomyces hansenii*, *Candida glabrata*, *Eremothecium gossypii*, *Pichia stipitis*, *Candida albicans*. We also searched for genes involved in sulfur metabolism in two euascomycetes *Neurospora crassa* and *Emericella nidulans* (Fitzpatrick *et al.*, 2006). The genes of these two

fialamenous fungi were used both as outgroups and as internal controls of the distribution of sulfur metabolism genes in ascomycetes, *S. pombe* being somewhat distantly related to the hemiascomycetes.

Unless otherwise stated, genes and proteins names refer to *S. cerevisiae*. For each gene studied, information on orthologues is available in additional file 1, ‘List of genes involved in sulfur metabolism’, and additional file 2, ‘Table of proteins studied’. It is necessary to take into account that the ancestor of *S. cerevisiae* and *C. glabrata* has undergone a whole genome duplication (WGD), followed by massive differential gene loss. The genes duplicated during this event are called ohnologues (Byrne & Wolfe, 2005). Since *Candida albicans* is a diploid yeast, only one allele was utilized in order not to destabilize the phylogenetic trees obtained.

In this paper, we primarily deal with the following three topics: (1) sulfur metabolism on the basis of three axes (sulfate assimilation, sulfur amino acid biosynthesis, the methionine salvage pathway); (2) the sulfur amino acid catabolic pathway; and (3) regulatory proteins.

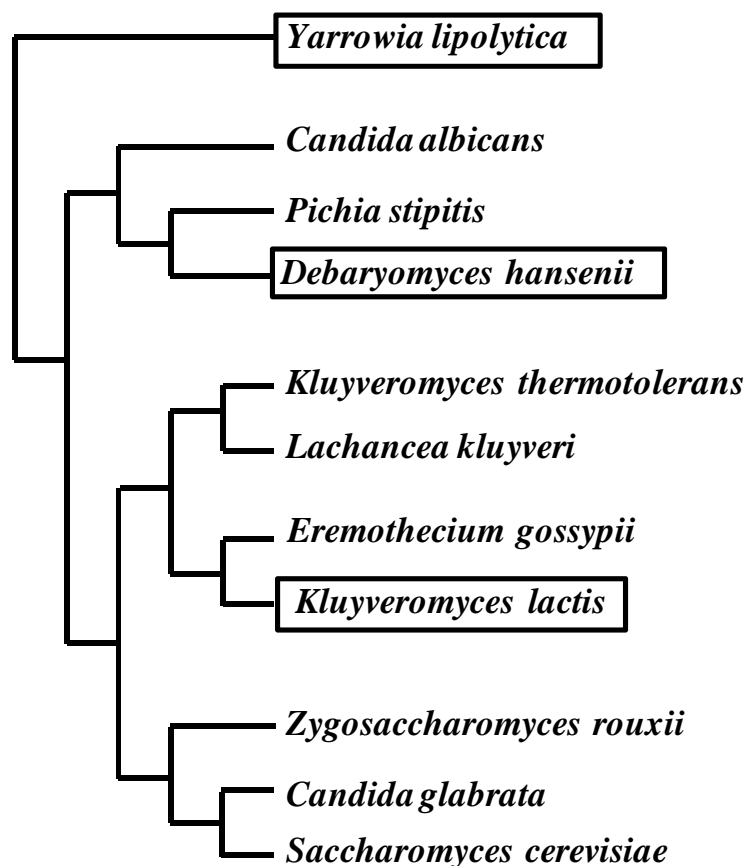


Figure 1 - Accepted phylogeny of the 11 hemiascomycetous yeasts

The tree was derived from Dujon (Dujon, 2006). The yeasts in the boxes are the three cheese ripening yeasts.

Sulfate assimilation

The first steps of sulfate assimilation: In *S. cerevisiae*, when sulfate is assimilated, it cannot be directly used (Thomas & Surdin-Kerjan, 1997). Instead, sulfate needs to be transformed into sulfide to be incorporated into a carbon chain. However, this reaction requires several steps. In fact, the electropotential of sulfate is too strong to be directly reduced by NADPH, therefore sulfate has to be activated in two steps by the ATP sulfurylase, and the APS kinase (Fig. 2). The first enzyme (encoded by *MET3*) catalyzes the formation of adenylyl sulfate (APS) from ATP and sulfate and the second (encoded by *MET14*) carries out the phosphorylation of APS to yield PAPS. The latter compound has a sufficient electropotential to be reduced by NADPH. Although the ATP sulfurylase sequences are tightly conserved among the considered species, *Y. lipolytica* ATP sulfurylase displays a divergent C-terminal end (from Gly426 to the end Asn572) from the other yeasts. The APS kinase-related genes are highly conserved.

The reduction of PAPS involves two enzymes that act successively. These enzymes (Fig. 2) are the PAPS reductase (encoded by *MET16*), which produces sulfite, and the sulfite reductase, which finally leads to the production of sulfide. The fungal PAPS reductase enzymes present a divergent N-terminal sequence compared to that of yeasts, including an insertion of about 30 amino acids. The sulfite reductase is composed of two subunits (encoded by *MET5* and *MET10*) (Fig. 2). Since PAPS is toxic when it is accumulated in the cell, its concentration is regulated by the reverse reaction (Fig. 2) and catalyzed by the bisphosphate-3'-nucleotidase (encoded by *MET22*). The characteristics of the *D. hansenii* orthologue were extensively studied by Aggarwal *et al.* (Aggarwal *et al.*, 2008), who linked this enzyme to the high halotolerance of *D. hansenii*. *C. albicans* displays a duplication of the gene *MET22*. Besides these peculiarities, all these genes could be found in the studied species, underlining the importance of this system for yeasts.

The production of homocysteine: Homoserine corresponds to a crossroads between sulfur and threonine metabolism. Three enzymes lead to homoserine production from aspartate (Fig. 2): the aspartate kinase (encoded by *HOM3*), the aspartic semi-aldehyde dehydrogenase (encoded by *HOM2*) and the homoserine dehydrogenase (encoded by *HOM6*). The synthesis of homocysteine from homoserine requires the action of two enzymes. First, the L-homoserine-O-acetyltransferase (encoded by *MET2*) synthesizes O-acetyl-homoserine. Then, the O-acetyl homoserine sulphhydrylase (encoded by *MET17*) catalyzes the reaction between O-acetyl-homoserine and sulfide, which leads to the production of homocysteine

(Fig. 2). The good conservation of this pathway in all the organisms studied demonstrates the importance of homocysteine, which is the base of the biosynthesis of sulfur amino acids. Only *C. albicans* displays a duplication of the gene *HOM3*.

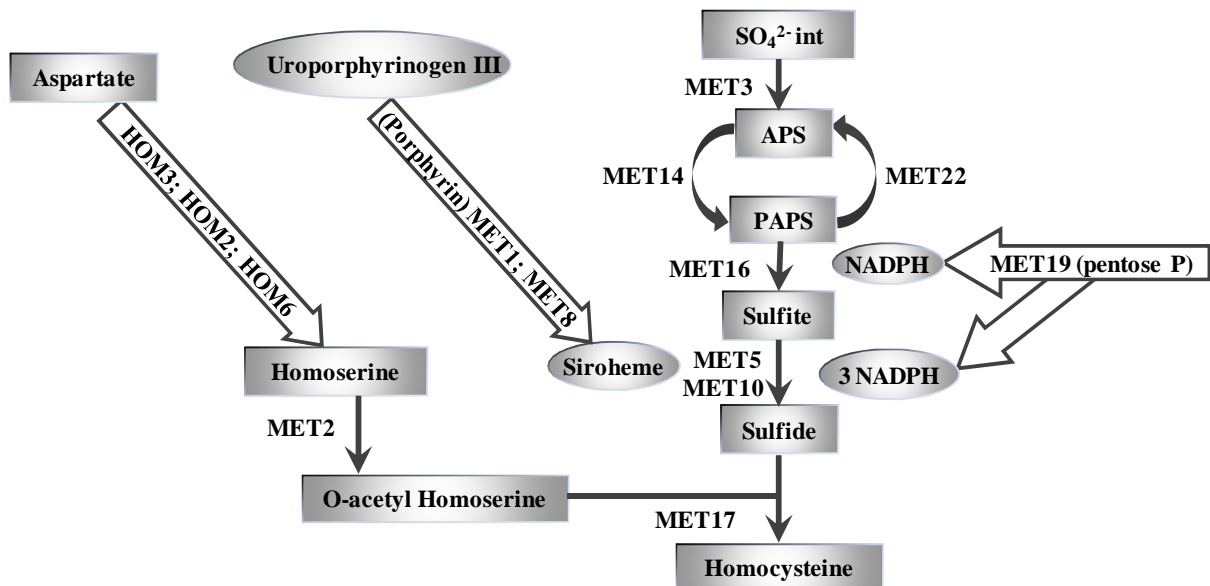


Figure 2 - Sulfate assimilation in hemiascomycetous yeasts

The gene names indicated in this figure are those of *S. cerevisiae*. The function of these genes is indicated in additional file 2: ‘Table of proteins studied’. This figure depicts the essential steps for the incorporation of sulfate into a carbon chain, leading to homocysteine production.

Siroheme biosynthesis: Met10p/Met5p sulfite reductase requires the synthesis of siroheme to function (Hansen *et al.*, 1997), since this heme is the only molecule known to react with sulfite. In fact, siroheme possesses the exceptional capacity to perform the six-electron reduction of sulfite to obtain sulfide (Murphy *et al.*, 1974). The enzymes (Fig. 2) involved in siroheme biosynthesis act on uroporphyrinogen III to produce siroheme in three successive steps (Raux *et al.*, 1999). First, *MET1*, which encodes the S-adenosyl-L-methionine uroporphyrinogen III transmethylase activity, produces precorrin-2. Secondly, *MET8*, which encodes the dehydrogenase and chelatase activities, produces sirohydrochlorin and, finally, siroheme. All the genes coding for these enzymes were found in our species of interest, *MET1* being duplicated in *D. hansenii*.

NADPH supply: The glucose-6-phosphate dehydrogenase (encoded by *MET19*) (Fig. 2), which is the first enzyme of the pentose-phosphate pathway, was previously described as an enzyme involved in methionine metabolism (Masselot & De Robichon-Szulmajster, 1975). A

met19 mutant strain of *S. cerevisiae* requires an organic sulfur source such as methionine, S-adenosylmethionine, cysteine, glutathione or homocysteine. The Met19p glucose-6-phosphate dehydrogenase produces reduced NADPH, which is essential to the function of Met16p and Met5-10p enzymes (Thomas *et al.*, 1991). This key enzyme of the pentose phosphate pathway and sulfur activation is highly conserved in the species tested. It is noteworthy that *S. pombe* displays three glucose-6-phosphate dehydrogenases.

Sulfur amino acid biosynthesis

In *S. cerevisiae*, homocysteine is the central molecule in the biosynthesis of sulfur amino acids, since it is (i) the starting point of the synthesis of cysteine by the transsulfuration pathway and (ii) the substrate of cobalamin-independent methionine synthase (Suliman *et al.*, 2005), which produces methionine (Fig. 3).

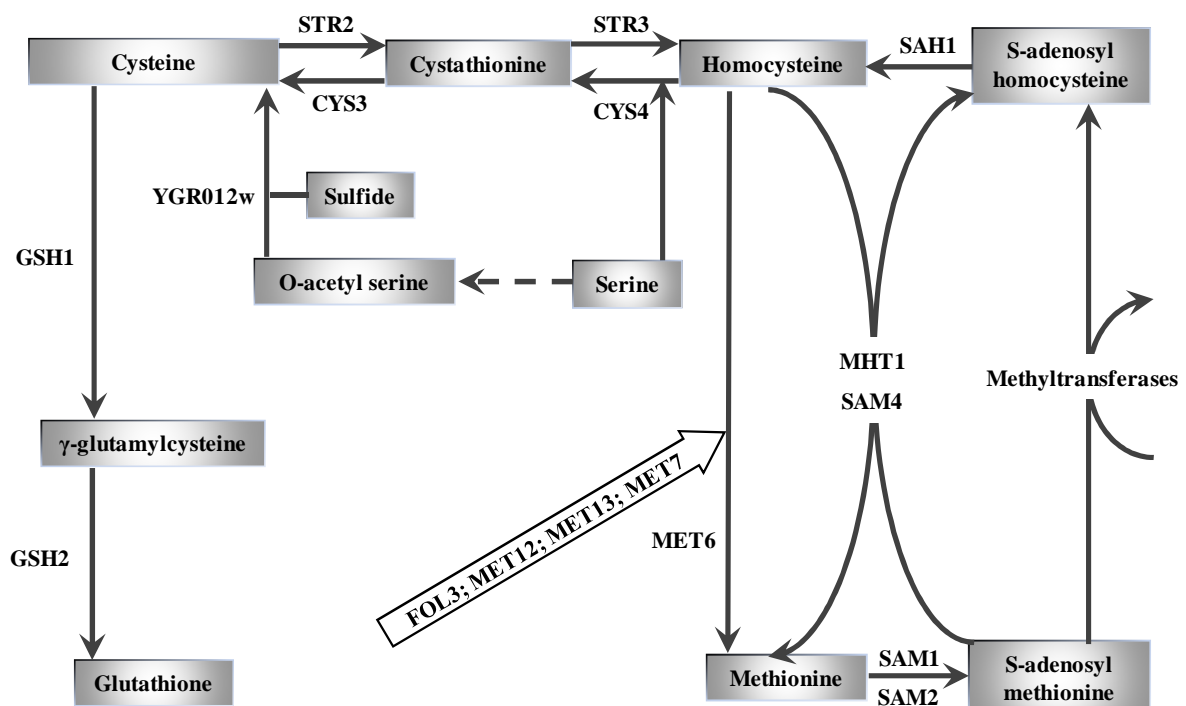


Figure 3 - Methionine and cysteine synthesis in hemiascomycetous yeasts: similarities and divergences

The gene names indicated in this figure are those of *S. cerevisiae*. The function of these genes is indicated in additional file 2: 'Table of proteins studied'. This figure represents methionine biosynthesis via the methyl cycle and cysteine biosynthesis via the transsulfuration pathway. The pathway that leads to glutathione production is also indicated. The enzyme of the OAS pathway that is absent in *S. cerevisiae* and *C. glabrata* is represented in gray.

The transsulfuration pathway: Two major pathways lead to cysteine: the transsulfuration pathway and the O-acetyl-serine (OAS) pathway. *S. pombe* has an incomplete transsulfuration pathway (Brzywczy *et al.*, 2002). Only the synthesis of homocysteine from cysteine takes place in this organism, but not the reverse reaction. Therefore, the supply of cysteine in *S. pombe* relies on the OAS pathway. The OAS pathway (Fig. 3, in gray) is composed of two enzymes, the cysteine synthase (encoded by *YGR012w*) and the serine-O-acetyltransferase. There are two cysteine synthases in all of the organisms studied, but *D. hansenii*, *C. glabrata* and *S. cerevisiae* have only one. The cysteine synthases can be separated into two groups. The first, which is present in all the organisms studied, and the second, which is less conserved (Brzywczy *et al.*, 2007). Interestingly, the gene coding for the serine-O-acetyltransferase enzyme is present in all the organisms studied, except *S. cerevisiae* and *C. glabrata*, the two species that underwent WGD. This could be the result of a concerted loss as, for example, already observed for specific pathways in *C. glabrata* (Dujon *et al.*, 2004). This enzyme is very different from serine-O-acetyltransferases with homology to the bacterial enzymes and presents a strong sequence similarity with homoserine-O-acetyltransferases (Fig. 4) (Grynberg *et al.*, 2000). Phylogenetic analysis performed on the two groups of enzymes strengthens our observations. This result indicates that the only functional pathway for the cysteine synthesis in *S. cerevisiae* and *C. glabrata* is the transsulfuration pathway. To reinforce this result, we searched for this gene in the 37 strains of *S. cerevisiae* and the 37 strains of *Saccharomyces paradoxus*, which were sequenced by the *Saccharomyces* resequencing project at the Sanger Institute (Liti *et al.*, 2009). We did not find orthologues in any of these strains. There is a great deal of literature concerning this hypothetical pathway in *S. cerevisiae*, with controversial results. A serine-O-acetyltransferase activity was described in *S. cerevisiae* (Ono *et al.*, 1999) in whole cell extract and was, consequently, not associated with a gene. Furthermore, the genes *CYS1* and *CYS2*, which are reported to encode the serine-O-acetyl transferase activity, are not mapped in the *S. cerevisiae* genome, and Cherest *et al.* (Cherest & Surdin-Kerjan, 1992) demonstrated that the OAS pathway is not functional in *S. cerevisiae*.

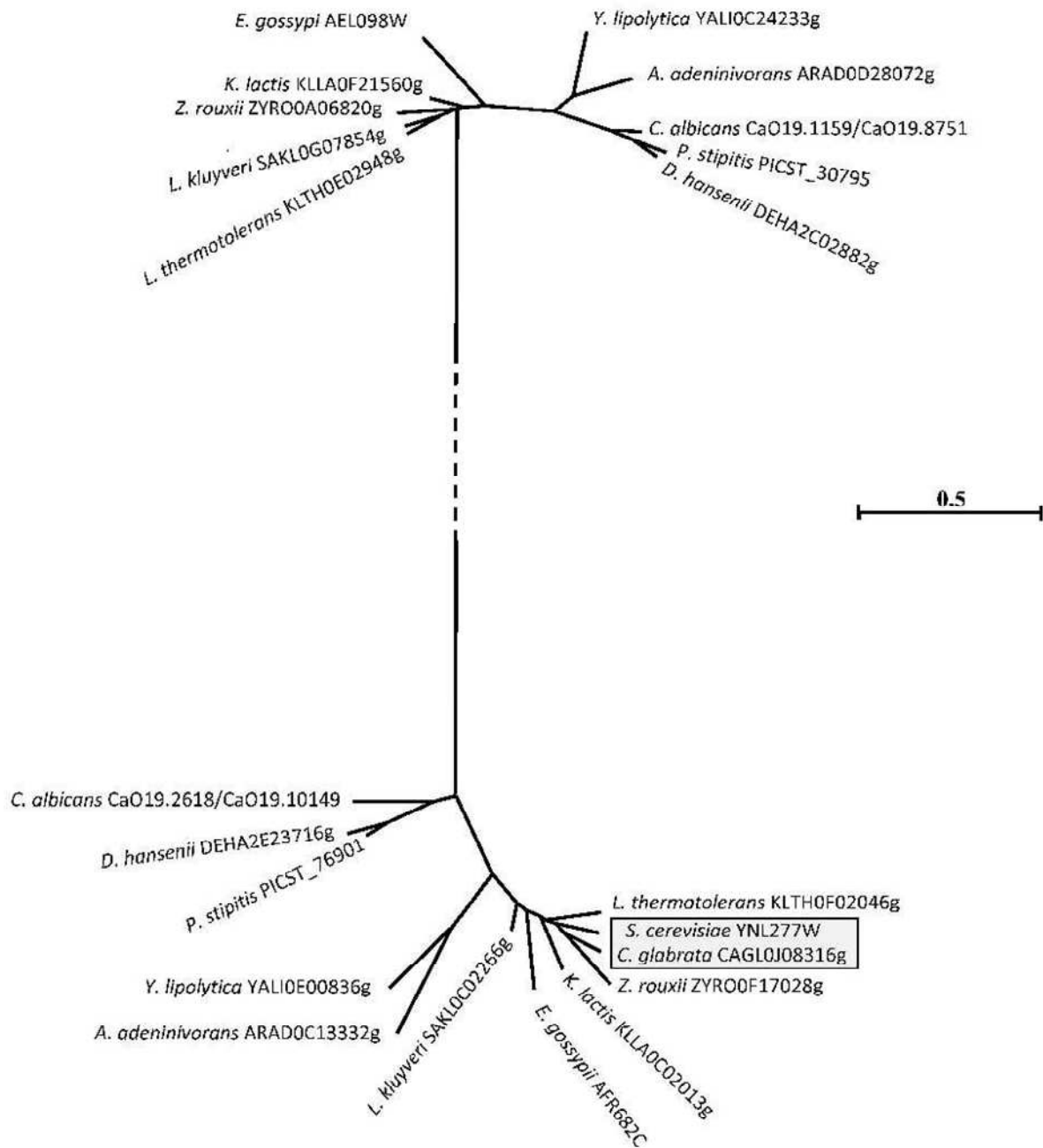


Figure 4 - Phylogram of homoserine-O-acetyltransferases and of serine-O-acetyltransferases in hemiascomycetous yeasts.

The gene tree was constructed as described in Materials and methods. All positions containing gaps and missing data were eliminated from the dataset. The *S. cerevisiae* and *C. glabrata* homoserine-o-acetyltransferase genes are boxed. The branch length linking the families is shortened. Bar, 0.5 substitutions per site.

The transsulfuration pathway leads to the production of cysteine from homocysteine and the reverse reaction, via cystathionine synthesis (Fig. 3). The two enzymes involved in cysteine biosynthesis are the cystathionine beta-synthase (encoded by *CYS4*) and the cystathionine gamma-lyase (encoded by *CYS3*). These enzymes are very well conserved in all of the organisms studied, except *S. pombe*, as already shown.

The reverse reactions are successively due to a cystathionine gamma-synthase (encoded by *STR2*) and a cystathionine beta-lyase (encoded by *STR3*). These genes are all present in the studied species and interestingly, the *STR2*-like gene is duplicated in several species; there are two orthologues in *Kluyveromyces thermotolerans* and three in *N. crassa*. *C. glabrata* contains two *STR2* orthologues, whereas *S. cerevisiae* presents three orthologues of *STR2*, of which *YJR130C* and *YML082W* are orthologues. Two *STR3* orthologues can be found in *S. cerevisiae*.

This group of genes belongs to a protein family sharing a common motif linked to the use of pyridoxal-5'-phosphate as a cofactor which is widespread from bacteria to higher eukaryotes (see additional file 2: 'Table of proteins studied'). In *S. cerevisiae*, this group is composed of four genes involved in sulfur metabolism (*MET17*, *CYS3*, *STR2* and *STR3*) and one ORF with no associated function *YHR112c* (see additional file 1: 'List of genes involved in sulfur metabolism'). The *YHR112c* gene family is well conserved, with a sequence similarity comprised between 43% and 73% over 98% of the sequence length, and it can therefore be inferred that it is subjected to a strong selection pressure. This gene is not essential in *S. cerevisiae*, but it could be involved in sulfur metabolism under as yet unidentified growth conditions. This gene is duplicated in *C. glabrata*, *Z. rouxii*, *D. hansenii* and *E. nidulans* further stressing its importance in the cell.

Glutathione synthesis: Sulfur metabolism leads to the production of a key molecule involved in the defense against oxidative stress, glutathione, from cysteine by way of γ -glutamylcysteine (Fig. 3). This pathway is composed of the γ -glutamylcysteine synthetase (encoded by *GSH1*) and the glutathione synthetase (encoded by *GSH2*), both present in the studied organisms.

Methionine synthesis: Methionine is synthesized by cobalamin-independent methionine synthase (encoded by *MET6*). To be functional, this enzyme needs the presence of polyglutamate on the methyltetrahydrofolate. The acquisition of polyglutamate on methyltetrahydrofolate involves four enzymes: the dihydrofolate reductase, two methylene

tetrahydrofolate reductases and the folylpolyglutamate reductase encoded respectively by *FOL3*, *MET12*, *MET13* and *MET7* (Fig. 3) (Cherest *et al.*, 2000).

Another important feature of sulfur metabolism is that methionine belongs to the methyl cycle (Fig. 3), which produces *S*-adenosylmethionine (SAM), the major donor of methyl in *S. cerevisiae* (Katz *et al.*, 2003). In *S. cerevisiae*, the methionine/SAM ratio is regulated (Thomas *et al.*, 2000) by *MHT1* encoding the *S*-methylmethionine-homocysteine methyltransferase and *SAM4* encoding the *S*-adenosylmethionine-homocysteine methyltransferase, which have been described as ohnologues. During methyl transfer reactions, *S*-adenosylmethionine is transformed into *S*-adenosylhomocysteine. The latter molecule is transformed into homocysteine by *S*-adenosyl-L-homocysteine hydrolase (encoded by *SAH1*), ending the methyl cycle. The ensemble of these genes can be found in one copy in the fungal species tested. However, *S. cerevisiae* carries two *FOL3* ohnologues. *S. cerevisiae* and *C. glabrata* have two ohnologues encoding *S*-adenosylmethionine synthetases. *C. glabrata* does not possess the regulators *MHT1* and *SAM4*.

Methionine salvage pathway

SAM is involved in polyamine biosynthesis (Fig.5). It is decarboxylated by the *S*-adenosylmethionine decarboxylase (encoded by *SPE2*) to yield *S*-adenosylmethioninamine which will be transformed into spermidine and spermine by the spermidine synthase and the spermine synthase encoded by *SPE3* and *SPE4*, respectively. Orthologues of *SPE3* are present in all the microorganisms studied, although *SPE4* was not found in *Eremothecium gossypii*, *S. pombe*, *N. crassa* or *E. nidulans*. In *S. cerevisiae*, spermidine is a polyamine essential for growth (Hamasaki-Katagiri *et al.*, 1997). In addition to the production of spermidine and spermine, Spe3p and Spe4p produce methylthioadenosine, which is recycled into methionine by the methionine salvage pathway.

The enzymes of this pathway were recently studied in detail by Pirkov *et al.* (Pirkov *et al.*, 2008) in *S. cerevisiae* (Fig. 5). The methionine salvage pathway is composed of five enzymes (encoded by *MEU1*, *MRI1*, *MDE1*, *UTR4* and *ADII*), leading to the production of keto-methyl thio butyrate (KMBA) from 5-methylthioadenosine. Each species has orthologues for each reaction of the cycle except *E. nidulans*, which lacks the enzyme encoded by *UTR4*.

The last step of the methionine salvage pathway, which produces methionine from KMBA, is carried out by a non-specific transaminase. On the basis of the results of Pirkov *et al.*

(Pirkov *et al.*, 2008), the branched-chain amino acid aminotransferases and aromatic amino acid aminotransferases are involved in this biosynthetic step as well as in the methionine catabolic pathway. Since all the enzymes of the methionine salvage pathway have a cytoplasmic location, the cytoplasmic aminotransferases should be involved in this metabolism but not the mitochondrial ones.

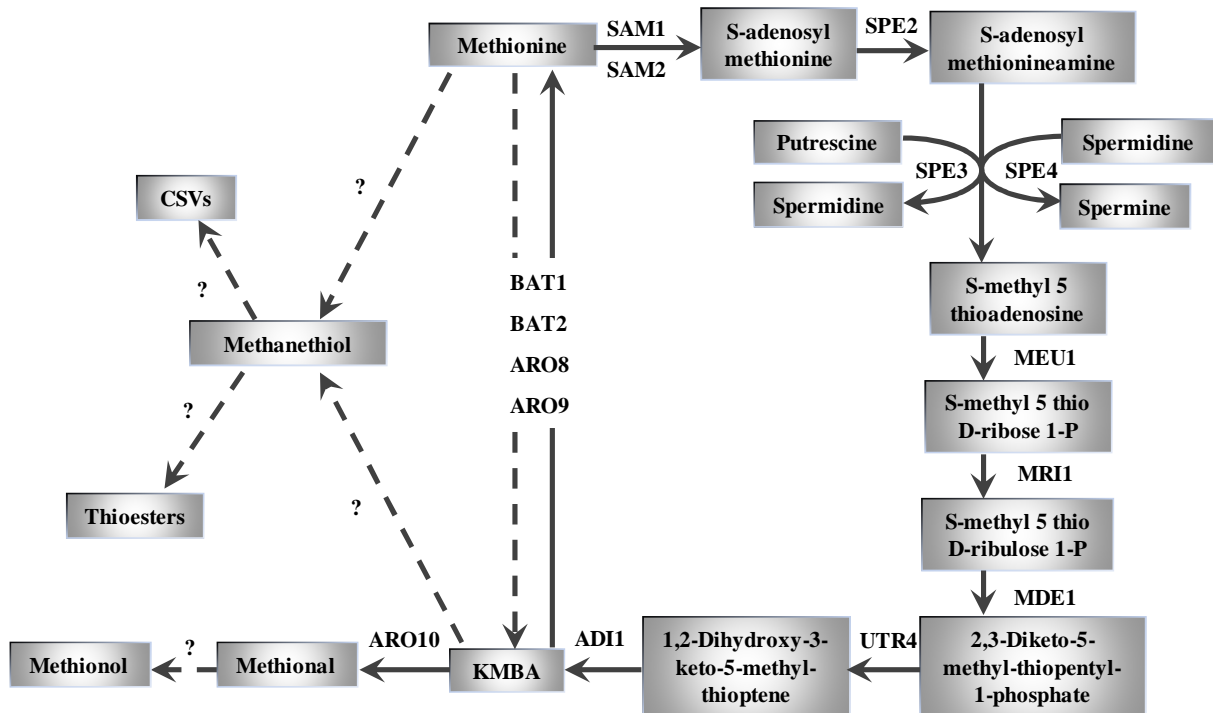


Figure 5 - Methionine salvage pathway and production of volatile sulfur compounds in yeasts

The right side of this figure represents the methionine salvage pathway. On the left, we retrieve the first steps of volatile sulfur compound production. The arrows on the dotted line indicate steps for which no enzymes have yet to be attributed.

Sulfur amino acid catabolism/VSC production

The catabolism of sulfur amino acids has been less extensively studied, nevertheless, it produces volatile sulfur compounds that are often important “character impact” compounds in many fermented foods such as beer, wine and smear ripened cheese. Previous studies were mainly focused on the identification and aromatic characterization of the sulfur compounds involved in the aroma of these products. However, their biosynthetic pathways are far from being understood (Fig. 5). Moreover, some steps seem to be purely spontaneous. A comprehensive review of these aspects has been recently published (Landaud *et al.*, 2008).

Despite our lack of knowledge, it is generally accepted that the catabolism of sulfur amino acids is initiated by a transamination step. Nevertheless, no specific aminotransferase for methionine has been identified in yeasts. This amino acid is therefore a substrate of enzymes

with a fuzzy specificity. Consequently, the effects of various transaminases were previously studied in our laboratory (Bondar *et al.*, 2005; Kagkli *et al.*, 2006; Cholet *et al.*, 2008). It was demonstrated that methionine can be a substrate for branched-chain amino acid aminotransferases and aromatic amino acid aminotransferases, and that an overexpression of some of these genes leads to an increased production of volatile sulfur compounds.

In *S. cerevisiae*, two branched-chain amino acid aminotransferases, the mitochondrial Bat1p and the cytoplasmic Bat2p, were described. Phylogenetic analysis of the all the Bat1p and Bat2p could not differentiate two clear groups (data not shown). We consequently took advantage of the presence/absence of the mitochondrial targeting sequence in this protein family to classify these proteins. Like *S. cerevisiae*, *C. glabrata*, *C. albicans* and *Y. lipolytica* display two enzymes with a different putative location. *K. thermotolerans*, *K. lactis*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *D. hansenii* and *Lachancea kluyveri* only have a single enzyme with a mitochondrial targeting sequence. *BAT2* of *S. kluyveri* was annotated as a pseudogene. *E. gossypii*, *D. hansenii* and *Pichia stipitis* only have the cytoplasmic enzyme Bat2p, the latter species carrying a duplication of this gene. The evolution of these genes in fungi is complex and needs to be extensively explored in relation with the functions they are associated with.

In *S. cerevisiae*, there are two cytoplasmic aromatic amino acid aminotransferases, Aro8p and Aro9p. Phylogenetic analysis of aromatic aminotransferases differentiated three groups of proteins, one of them being associated to the *S. cerevisiae* ORF with no known function *YER152c*. This group may be constituted of potential aromatic amino acids aminotransferases. This gene is well conserved with one copy in each genome and a duplication in *K. thermotolerans*. The strong conservation of this gene leads us to infer that this gene might play an important role under specific conditions. All these aromatic transaminases seem to be cytoplasmic except the Aro9p enzyme in *Y. lipolytica*, which presents a putative signal sequence for mitochondrial location. In the *ARO8* group, a duplication event apparently occurred after the divergence of the group constituted of *E. gossypii*, *K. lactis*, *K. thermotolerans* and *L. kluyveri*, but just before the divergence of these species from each other, since there are two *ARO8* orthologues in each of them (Fig. 6). At least one copy of *ARO8* is in fact present in all the tested species. The presence of the gene *ARO9* seems to follow different routes. In fact, this gene has been lost in two species, *E. gossypii* and *D. hansenii*, and has been duplicated in *P. stipitis*.

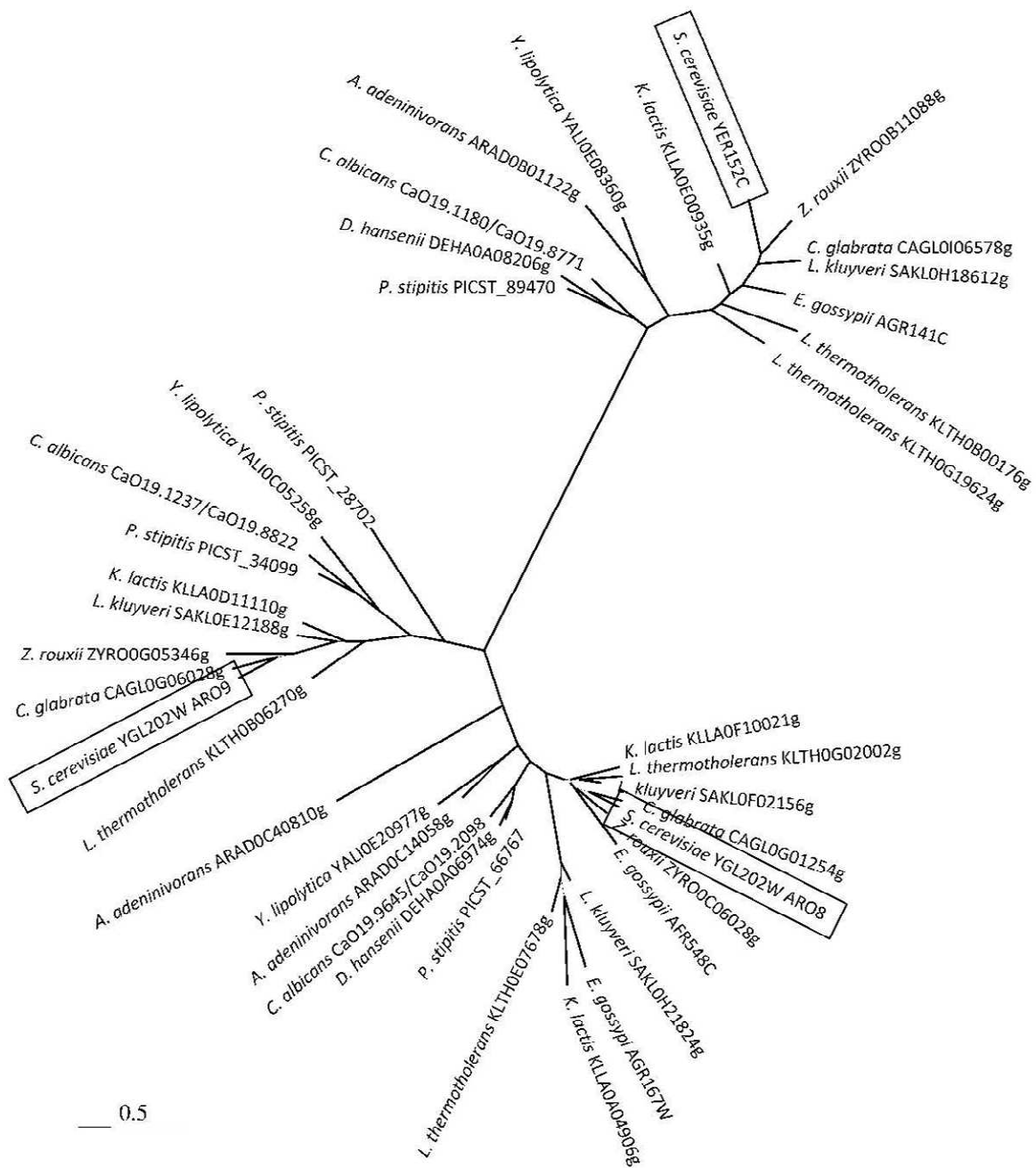


Figure 6 - Phylogram of the aminotransferases of the Aro8p and Aro9p families and of the related Yer152cp-like family in hemiascomycetous yeasts.

The gene tree was constructed as described in Material and methods. All positions containing gaps and missing data were eliminated from the dataset. The *S. cerevisiae* proteins are boxed. Bar, 0.5 substitutions per site.

We identified three combinations of the five enzymes described above (Bat1p, Bat2p, Aro8p, Aro9p, Yer152cp) in the hemiascomycetes. The first, which has all five of these enzymes, is found in *S. cerevisiae*, *C. glabrata*, *P. stipitis*, *C. albicans* and *Y. lipolytica*. The second, observed in *Z. rouxii*, *K. thermotolerans*, *L. kluyveri* and *K. lactis*, has all the enzymes except Bat2p. The third lacks Bat1 and Aro9 and is found in *E. gossypii* and *D. hansenii*.

This reveals that two enzymes are always present in all these yeasts: Aro8p and Yer152cp, stressing the importance of the aminotransferase, Aro8p, and of the protein of unknown function, Yer152cp. We observed that each of the three technological yeasts, *K. lactis*, *D. hansenii* and *Y. lipolytica*, have a different profile for aminotransferases. This could be indicative of different potentialities for the biosynthesis of volatile sulfur compounds in these three yeasts.

Methional is an important molecule for cheese flavor. This sulfur compound is a product of methionine degradation from KMBA, the first intermediary of methionine catabolism. In *S. cerevisiae*, the phenylpyruvate decarboxylase encoded by *ARO10* is thought to be responsible for this reaction (Vuralhan *et al.*, 2003, 2005). The phenylpyruvate decarboxylase is conserved in the 14 fungi of this study. The gene that we identified as *ARO10* in *Y. lipolytica* has been previously annotated as a *PDC6* orthologue. However, in light of our results, it seems that the gene *YALI0D6930g* is not the orthologue of the minor isoenzyme of pyruvate decarboxylase *PDC6*, but of the phenylpyruvate decarboxylase *ARO10*. *Y. lipolytica* possesses one ORF *YALI0D10131g* that produces a good alignment with the three genes of the pyruvate decarboxylases of *S. cerevisiae* (*PDC1*, *PDC5* and *PDC6*). This enzyme has been described as an orthologue of *PDC1*, but seems to be closer to *PDC6* according to this study (data not shown).

Regulatory proteins

In *S. cerevisiae*, the main regulator of transcription Met4p is regulated by the methionine and cysteine pools. This regulator not only plays a central role in the regulation of the sulfur amino acid biosynthetic pathway, but in the cell cycle as well. It is assisted in its functions by a number of regulatory cofactors: Met28p, Met31p/Met32p, Cbf1p and SCF^{Met30}. The latter is an ubiquitination complex composed of Skp1p, Cdc53p, Cdc34p, Rbx1p and Met30p as specific components. Models of regulation of cell metabolism by Met4p and its partners have been proposed (Chandrasekaran & Skowyra, 2008).

The majority components of the SCF^{Met30} complex are highly conserved. It can be observed that there is no orthologue of *RBX1* in the *N. crassa* genome. *CDC53* is slightly less conserved than other components of the SCF^{Met30} complex, with sequence similarities in the same range as that of *MET31/MET32*. *MET31* and *MET32* are orthologues and are also retrieved in *C. glabrata*. It can be observed that *MET31/MET32* appears to be absent or too

divergent in the *S. pombe* genome. *CBF1* is conserved in all of the species studied, but the BlastP analysis reveals a sequence alignment only in the C-terminal region.

In *S. cerevisiae*, Met4p is a 672 amino acid-long polypeptide that can be split into functional domains (Kuras & Thomas, 1995). These domains are involved in transcriptional activation, ubiquitinylation, interaction with the negative regulator Met30p, interaction with the Met31p/Met32p dimer and interaction with Met28p. The Met4p sequence also presents a degenerated leucine zipper (BZIP). This BZIP motif is not canonical since it is disrupted by a large insertion (D₅₀₄ to Q₅₉₉).

Met4p orthologues display large differences among the species studied. The family of *MET4*-related genes can be separated into two sub-families: a family of large polypeptides related to *S. cerevisiae* Met4p of about 670 to 710 amino acids, and a family of shorter polypeptides ranging from 319 to 371 amino acids, including *D. hansenii* and *Y. lipolytica*. This second family is related to fungal regulators such as *CYS3* and *METR* from *N. crassa* and *E. nidulans*, respectively. We can ask whether or not these orthologues carry all the interaction domains such as Met4p from *S. cerevisiae*.

One argument for the conservation of these interactions is that the partners of Met4p are globally conserved except for Met28p, which appeared to be absent in the clade of the short-length Met4p sub-family (see additional file 3: 'Summary of regulatory proteins studied'). However, the shorter Met4p sequences display a canonical BZIP motif with a basic region, allowing direct interaction with DNA, and a leucine zipper required for dimerization. It can be hypothesized that the shorter Met4p homologues with a complete B-ZIP domain can directly interact with DNA but do not depend on Met28p function. Therefore, Met28p which is not conserved in the studied species appeared to play an ancillary function.

The activation motif of *S. cerevisiae* (D₈₂ to F₁₀₀), which is highly conserved in neighbor species, is retrieved in *D. hansenii* (D₂₃ to L₄₁) but not in *Y. lipolytica*. On the contrary, the motif upstream from the ubiquitinylated lysine (K163 in *S. cerevisiae*) appeared to be well conserved among yeast species by homology and by hydrophobic cluster analysis (data not shown). The Met31p/Met32p binding domain of *S. cerevisiae* (L₃₇₆ to H₃₉₇) relatively well matches the L₁₈₂ to Q₂₀₃ region of *D. hansenii*. However, it is difficult to identify the sites of interaction with these regulators when distant Met4p orthologues are analyzed. For instance, in *Y. lipolytica*, it only can be hypothesized that the domain from Q₁₉₃ to Q₂₀₅ is related to the domain from Q₁₉₁ to Q₂₀₃ in *D. hansenii*.

In conclusion, it seems that the co-regulation network depicted in *S. cerevisiae* is conserved in all the yeast species although there is a very large variation in size and a wide divergence in the main component Met4p. It is clear that these hypotheses should be validated by mutagenesis experiments.

Conclusions

An overview of the sulfur amino acid pathways in hemiascomycetous yeasts was generated. It was important to investigate if the wealth of data accumulated in the model yeast *Saccharomyces cerevisiae* can be extended to species as distant of *S. cerevisiae* as *Yarrowia lipolytica* which have diverged from their common ancestor more than 600 million years ago. By and large, the pathways appeared to be conserved even beyond the yeast world in the whole phylum of fungi. This is probably foreseeable as this pathway plays a central role in the general metabolism and in the homeostasis of the cell.

Moreover, we propose that the regulation network in charge of the sulphur amino acids biosynthesis and its central component Met4p are conserved from *S. cerevisiae* to fungi. The *Kluyveromyces* clade and the *Saccharomyces sensu lato* have undergone a genetic event leading to the impairment of the B-ZIP motif of the regulator and need therefore the mediation of a B-ZIP partner of the MET28p family to bind the Met4p DNA targets. All the other partners appeared to be conserved along the evolutionary tree, especially *MET31* and *MET30* which are playing a central role in the specificity of the regulation.

The majority of the studied species possess two pathways leading to cysteine production, the transsulfuration pathway and the OAS pathway, except *S. cerevisiae* and *C. glabrata* that only display the transsulfuration pathway, and *S. pombe* that only has the OAS pathway (Table 1).

	Sulfate activation pathway	Transsulfuration pathway from homocysteine to cysteine	Transsulfuration pathway from cysteine to homocysteine	O-acetyl-serine pathway
WGD group (<i>S. cerevisiae</i> / <i>C. glabrata</i>)	+	+	+	-
Other hemiascomycetes	+	+	+	+
Ascomycetes fungi	+	+	+	+
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	+	-	+	+

Table 1. Summary of the components of the sulphur aminoacids pathway highlighting the differences in the cysteine synthesis according to the clades of yeast.

The study of the gene families involved in this metabolism conducted to the identification of well conserved gene families without described function although they are highly conserved and that they diverge at the same speed as the essential genes of the pathway. This is the case for *YHR112c* gene family belonging to the family of the PLP dependent enzymes such as the *CYS3*, *STR2*, *STR3* and *MET17* gene families. This is also the case in the catabolic pathway for the *YER152c* gene family related to the aromatic amino acid aminotransferase families without identified function in *S. cerevisiae*. Their conservation during the evolution leads to propose for them an important role in the metabolism of the sulfur compounds.

Concerning the catabolism of sulfur amino acids that leads to the production of VSC, the technological yeasts, *K. lactis*, *D. hansenii* and *Y. lipolytica*, have different sets of enzymes which should account for the difference in aroma production observed between these species. The results of this work remain to be confirmed by genetic and molecular studies.

Methods

Sulfur metabolism data

Data on sulfur metabolism from several databases including the *Saccharomyces* Genome Database (SGD: <http://www.yeastgenome.org/>) for *S. cerevisiae* and the KEGG database (<http://www.genome.jp/kegg/>) that regroups enzymatic activities of various species were combined.

Search for orthologues

Orthologues were searched for in complete genome databases using the BLASTP algorithm with the *S. cerevisiae* and the *S. pombe* protein sequences of interest as bait. Searches were completed using sequences from other genomes as bait. Further searches were performed on complete genome sequences using TBLASTN. The sources of complete sequences were SGD (<http://www.yeastgenome.org/>) for *S. cerevisiae*, Genolevures (<http://www.genolevures.org/>) for *Yarrowia lipolytica*, *Kluyveromyces lactis*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Lachancea kluyveri*, *Kluyveromyces thermotolerans*, *Debaryomyces hansenii* and *Candida glabrata*, and NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/genom_table.cgi?organism=fungi) and Swissprot (<http://www.expasy.ch/tools/blast/>) for *Eremothecium gossypii*, *Pichia stipitis*,

Saccharomyces cerevisiae, *Candida albicans*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Neurospora crassa* and *Emericella nidulans*). Complementary information was also obtained from the *Candida* Genome Database (CGD: <http://www.candidagenome.org/>), from the *Aspergillus* Genome Database (www.aspergillusgenome.org/) and from the *Saccharomyces* Resequencing Project (Sanger Institute; <http://www.sanger.ac.uk/Teams/Team118/sgrp/>). The search for specific functional domains was performed using the Pfam database (<http://pfam.sanger.ac.uk/>). The TargetP tool (www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/) was used to identify proteins that have a mitochondrial location.

Phylogenetic analysis

Primary protein sequence alignments were generated by using the MUSCLE program (Edgar, 2004) implemented on the platform phylogeny.fr ([http://www.phylogeny.fr](http://www.phylogeny.fr;); (Dereeper *et al.*, 2008)), unless otherwise stated. Alignments were manually adjusted with GeneDoc (<http://www.nrbsc.org/gfx/genedoc/>). Phylogenetic trees were reconstructed with the Phyml program (Guindon & Gascuel, 2003) implemented on the platform phylogeny.fr, with 100 bootstrap replicates. Phylogenetic trees were visualized with NJ-Plot (Perrière & Gouy, 1996).

Regulatory proteins analysis

The data obtained for the regulatory proteins analyzed were generated with the GAP software of GCG (gap weight = 2; length weight = 8).

Additional files

Additional file 1 –List of genes involved in sulfur metabolism in each species studied

A: table of gene names involved in sulfur metabolism

B: table of Swissprot accession numbers for proteins involved in sulfur metabolism

N.D.: not determined.

Additional file 2 –Table of proteins studied

This table regroups the function of each protein of sulfur metabolism included in this study and the description of the pfam motif, if any, contained in each sequence. Minimum: indicates the frequency of the motif in the genome in which it is the least represented. Maximum: indicates the frequency of the motif in the genome in which it is the most represented.

Additional file 3 –Summary of regulatory proteins studied

This table represents the sequence similarity percentages for each regulatory protein studied, in comparison with *S. cerevisiae*. The percentages indicated for the *MET31/MET32* column were generated using the Met31p sequence.

List of genes involved in sulfur metabolism in each species studied

A (1/7)

<i>S. cerevisiae</i> gene name	LOCUS Prefix	SULPHATE ACTIVATION						HOMOCYSTEINE SYNTHESIS	
		MET 3	MET 14	MET 22	MET 16	MET5	MET 10	MET 17	MET 2
<i>S. cerevisiae</i>		YJR010W	YKL001C	YOL064C	YPR167C	YJR137C	YFR030W	YLR303W	YNL277W
<i>C. glabrata</i>	CAGL	OB03839g	OL02321g	OC05247g	OI08503g	OM00374g	OD05280g	OD06402g	OJ08316g
<i>Z. rouxii</i>	ZYRO	OG11990g	OB01474g	OB05016g	OD01408g	OB08668g	OD15620g	OG22198g	OF17028g
<i>K. thermotolerans</i>	KLTH	OB01914g	OD06314g	OC08822g	OF18656g	OD17512g	OE04796g	OD03652g	OF02046g
<i>E. gossypii</i>	AGOS_	AGR322W	ABR001W	AEL088C	AEL259W	ABL077W	AGR237C	ADL031W	AFR682C
<i>K. lactis</i>	KLLA	OE09835g	OB13321g	OF24728g	OB10692g	OB03938g	OD15983g	OD04037g	OC02013g
<i>L. kluyveri</i>	SAKL	OG14124g	OA08844g	OC08734g	OF15686g	OG18590g	OF07260g	OH23892g	OC02266g
<i>C. albicans</i>	CaO	19.5025 19.12492	19.946 19.8561	19.105 19.7752 19.99 19.7746	19.3106 19.10618	19.4099	19.11557 19.4076	19.5645 19.13090	19.2618 19.10149
<i>D. hansenii</i>	DEHA	2D06138g	2E12804g	2E21274g	2B15774g	2F04972g	2B15070g	2F06094g	2E23716g
<i>P. stipitis</i>	PICST_	75451	90976	47423	49723	67906	83457	31162	76901
<i>Y. lipolytica</i>	YALI	OB08184g	OE00418g	OF27665g	OB08140g	OD11176g	OE16368g	OD25168g	OE00836g
<i>S. pombe</i>	SP	BC27.08c	AC1782.11	CC1753.04	AC13G7.06	AC10F6.01c	CC584.01c	BC428.11	BC56F2.11
<i>E. nidulans</i>	AN	4769.2	1194.2	1769.2	4770.2	7600.2	1752.2	8277.2	2229.2
<i>N. crassa</i>	NCU	1985	9896	4069	2005	5238	4077	1652	7001

List of genes involved in sulfur metabolism in each species studied

A (2/7)

<i>S. cerevisiae</i> gene name	LOCUS Prefix	HOMOSERINE SYNTHESIS			SYNTHESIS OF MET6'S COFACTOR				NADPH
		HOM 3	HOM 2	HOM 6	MET 12	MET 13	FOL 3	MET 7	MET 19
<i>S. cerevisiae</i>		YER052C	YDR158W	YJR139C	YPL023C	YGL125W	YMR113W YKL132C	YOR241W	YNL241C
<i>C. glabrata</i>	CAGL	0J02882g	0E01133g	0M00330g	0J09504g	0F07029g	0K03553g	0J03762g	0J07612g
<i>Z. rouxii</i>	ZYRO	0D16632g	0F13750g	0B08756g	0A02838g	0E01870g	0G20064g	0F07216g	0F15686g
<i>K. thermotolerans</i>	KLTH	0A04004g	0G11814g	0D17446g	0E11022g	0H06446g	0D04664g	0D11066g	0H00374g
<i>E. gossypii</i>	AGOS_	ADL086C	AGL175W	ABL080W	AFR457W	AAR170W	AEL310C	ACR134W	ABL206C
<i>K. lactis</i>	KLLA	0F27599g	0D16731g	0B03872g	0D12188g	0F09647g	0B12463g	0F11297g	0D19855g
<i>L. kluyveri</i>	SAKL	0F08294g	0H15180g	0G18678g	0H11836g	0A06952g	0E03872g	0H06732g	0G00374g
<i>C. albicans</i>	CaO	19.1235 19.8820 19.6959	19.1559 19.9132	19.10468 19.2951	19.12781 19.5321	19.288 19.7920	19.6908	19.11991 19.4516	19.12218 19.4754
<i>D. hansenii</i>	DEHA	2C7282g	2D11396g	2F01298g	2F08976g	2G01254g	2F21846g	2F08558g	2C10274g
<i>P. stipitis</i>	PICST_	69242	89195	57619	83803	71674	47181	71737	85065
<i>Y. lipolytica</i>	YALI	0D11704g	0D13596g	0D01089g	0B14465g	0B00572g	0A10032g	0E24497g	0E22649g
<i>S. pombe</i>	SP	BC19F5.04	CC1827.06c	BC776.03	AC343.10	AC56F8.10	AC227.09	BC1709.17	AC3A12.18 AC3C7.13c CC794.01c
<i>E. nidulans</i>	AN	8859.2	4793.2	2882.2	8215.2	5883.2	4384.2	3840.2	2981.2
<i>N. crassa</i>	NCU	4118	554	3935	9545	7690	1337	00892 00893	9111

List of genes involved in sulfur metabolism in each species studied

A (3/7)

<i>S. cerevisiae</i> gene name	LOCUS Prefix	METHIONINE SALVAGE PATHWAY							
		SPE2	SPE3	SPE4	MEU1	MRI1	MDE1	UTR4	ADI1
<i>S. cerevisiae</i>		YOL052C	YPR069C	YLR146C	YLR017W	YPR118W	YJR024C	YEL038W	YMR009W
<i>C. glabrata</i>	CAGL	OH02607g	OD01408g	OM04609g	OD03190g	OD04576g	OM07876g	OL01287g	OK08800g
<i>Z. rouxii</i>	ZYRO	OF12804g	OC16412g	OF14124g	OB10384g	OC12936g	OG11440g	OF05236g	OG01276g
<i>K. thermotolerans</i>	KLTH	OE14058g	OF10560g	OG11484g	OB03344g	OE05236g	OB01386g	OC03388g	OF12408g
<i>E. gossypii</i>	AGOS_	ABL061C	ADL340W	-	AAL160W	AAR098W	ACL126W	AFR359C	ADR021W
<i>K. lactis</i>	KLLA	OC14410g	OB09372g	OD17094g	OF15664g	OD15455g	OE16435g	OE22111g	OD14487g
<i>L. kluyveri</i>	SAKL	OB06292g	OB07876g	OH14828g	OG12826g	OF06622g	OG14652g	OD11836g	OF05544g
<i>C. albicans</i>	CaO	19.568 19.8199	19.9790 19.2250	19.4960 19.12425	19.14200 19.6938	19.2008 19.9559	19.4306 19.11782	19.1495 19.9072	19.2306 19.9842
<i>D. hansenii</i>	DEHA	2E12254g	2D10472g	2E16456g	2C12166g	2A01276g	2G06864g	2B04158g	2B15532g
<i>P. stipitis</i>	PICST_	85160	84352	40259	65182	40776	89976	44113	37619
<i>Y. lipolytica</i>	YALI	OE20361g	OE33143g	OE04763g	OB13420g	OA16698g	OC20427g	OD16797g	OA14498g
<i>S. pombe</i>	SP	BP4H10.05c	BC12C2.07c	-	AC16C9.02c	BC23E6.10c	AC20H4.05c	AC644.08	BC887.01
<i>E. nidulans</i>	AN	8231.2	687.2	-	1735.2	4290.2	3593.2	-	6576.2
<i>N. crassa</i>	NCU	1083	6727	-	3963	2226	9264	6228	147

List of genes involved in sulfur metabolism in each species studied

A (4/7)

<i>S. cerevisiae</i> gene name	LOCUS Prefix	SIROHEMESYNTHESIS		METHIONINE CATABOLISM					ND
		MET1	MET8	ARO10	BAT1	BAT2	ARO8	ARO9	YEY2
<i>S. cerevisiae</i>		YKR069W	YBR213W	YDR380W	YHR208W	YJR148W	YGL202W	YHR137W	YER152C
<i>C. glabrata</i>	CAGL	0G01903g	0K06677g	0A03102g	0F09207g	0M00176g	0G01254g	0G06028g	0I06578g
<i>Z. rouxii</i>	ZYRO	0B15774g	0C05038g	0G04378g	0G00396g	-	0C06028g	0G5346g	0B11088g
<i>K. thermotolerans</i>	KLTH	0F17226g	0H06820g	0F15510g	0D17094g	-	0G02002g 0E07678g	0B06270g	0B00176g 0G19624g
<i>E. gossypii</i>	AGOS_	AGR298C	AAR152W	ACR211W	-	ADL384W	AFR548C AGR167W	-	AGR141C
<i>K. lactis</i>	KLLA	0F16170g	0C05544g	0E02707g	0A10307g	-	0F10021g 0A04906g	0D11110g	0E00969g
<i>L. kluyveri</i>	SAKL	0G01254g	0A07348g	0G03036g	0B12496g	0G09064g	0F02156g 0H21824g	0E12188g	0H18612g
<i>C. albicans</i>	CaO	19.13233 19.5811	19.14072 19.6780	19.9405 19.1847	19.797	19.6994	19.9645 19.2098	19.1237 19.8822	19.1180 19.8771
<i>D. hansenii</i>	DEHA	2E07128g 2G21912g	2F02706g	2D10120g	-	2D06952g	2A06886g	-	2A08030g
<i>P. stipitis</i>	PICST_	31820	63116	62095	84005	34985	66767	28702 34099	89470
<i>Y. lipolytica</i>	YALI	0A01133g	0E11385g	0D06930g	0D01265g	0F19910g	0E20977g	0C05258g	0E08360g
<i>S. pombe</i>	SP	CC1739.06c	AC4D7.06c	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
<i>E. nidulans</i>	AN	4774.2	6710.2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
<i>N. crassa</i>	NCU	602	7585	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

List of genes involved in sulfur metabolism in each species studied

A (5/7)

<i>S. cerevisiae</i> gene name	LOCUS Prefix	TRANSULFURATION PATHWAY				CYSTEINE SYNTHESIS			REGULATION
		CYS 4	CYS 3	STR 2	STR 3	CYS K			RBX1
<i>S. cerevisiae</i>		YGR155W	YAL012W	YJR130C YML082W YLL058W	YGL184C YFR055W	YGR012W	-	-	YOL133W
<i>C. glabrata</i>	CAGL	0E03157g	0H06369g	0M00550g 0H04169g	0L06094g	0F08789g	-	-	0E01567g
<i>Z. rouxii</i>	ZYRO	0G07128g	0D05742g	0B08338g	0G19162g	0G11198g	0G20834g	0A06820g	0C03058g
<i>K. thermotolerans</i>	KLTH	0D04092g	0D02728g	0D17930g 0G00418g	0E06644g	0E08800g	0H10846g	0E02948g	0F19228g
<i>E. gossypii</i>	AGOS_	AGR012C	AEL341W	AER164C	ACL059C	AGR021C	AEL161W	AEL098W	ADL181W
<i>K. lactis</i>	KLLA	0F09317g	0F07909g	0B04378g	0C17028g	0C18029g	0F01815g	0F21560g	0E07151g
<i>L. kluyveri</i>	SAKL	0H23364g	0B09614g	0G18172g	0H24882g	0H23144g	0D07084g	0G07854g	0C13178g
<i>C. albicans</i>	CaO	19.12011 19.4536	19.13760 19.6402	19.1033 19.8635	19.2092 19.9639	19.5574 19.13020	19.7152	19.1159 19.8751	19.233.1
<i>D. hansenii</i>	DEHA	2C14586g	2C15686g	2D09350g	2A06798g	2B04004g	2F16236g	2C02882g	2F17666g
<i>P. stipitis</i>	PICST_	77227	77247	36608	54505	30734	59891	30795	37145
<i>Y. lipolytica</i>	YALI	0E09108g	0F05874g	0D17402g	0D00605g	0E08536g	0F14047g	0C24233g	0B17358g
<i>S. pombe</i>	SP	-	-	BC15D4.09c	CC11E10.01	AC3A12.17c	BC36.04	BC106.17c	AC23H4.18c
<i>E. nidulans</i>	AN	5820.2	1446.2	3456.2	7051.2	1513.2	8057.2	8565.2	8844.2
<i>N. crassa</i>	NCU	8216	9230	02430 05093 08117	7987	2564	6452	536	-

List of genes involved in sulfur metabolism in each species studied

A (6/7)

<i>S. cerevisiae</i> gene name	LOCUS Prefix	REGULATION								
		MET4	MET28	MET30	MET31	MET32	CBF1	SKP1	CDC53	CDC34
<i>S. cerevisiae</i>		YNL103W	YIR017C	YIL046W	YPL038W	YDR253C	YJR060W	YDR328C	YDL132W	YDR054C
<i>C. glabrata</i>	CAGL	OG06688g	OK08668g	OL00781g	OB02651g OL12562g		OH01815g	OM01364g	OJ09218g	OE04598g
<i>Z. rouxii</i>	ZYRO	OB09636g	OG04092g	OD16742g	OF08162g		OG04466g	OD10384g	OC09438g	OG12650g
<i>K. thermotolerans</i>	KLTH	OD09108g	OF13530g	OA04114g	OE11330g		OC02640g	OE03784g	OH02464g	OC04818g
<i>E. gossypii</i>	AGOS_	AFL231C	AAR010W	ADL082C	AGL246W		AFR414W	ADR295C	ADR106W	AGL203C
<i>K. lactis</i>	KLLA	OC13211g	OB11880g	OF27511g	OD11902p		OB13761g	OE16941g	OF05467g	OD09196g
<i>L. kluyveri</i>	SAKL	OE10428g	-	OF08404g	OH11440g		OD12650g	OG08382g	OF10054g	OD02530g
<i>C. albicans</i>	CaO	19.12772 19.5312	-	19.3301 19.10811	19.9326 19.1757		19.2876 19.10394	19.4427 19.11905	19.9243 19.1674	19.6529 19.13882
<i>D. hansenii</i>	DEHA	OC10252g	-	2D14652g	OF10307g		2B03828g	2F26004g	2D15444g	2C03168g
<i>P. stipitis</i>	PICST_	49214	67409	64825	67657		52442	32591	29770	84844
<i>Y. lipolytica</i>	YALI	OD04466g	-	OB09977g	OF03157g		OD24167g	OA10879g	OD12518g	OC06149g
<i>S. pombe</i>	SP	AC25G10.03	-	AC57A10.05c	-		AC3F10.12c	BC409.05	AC17G6.12	BC1105.09
<i>E. nidulans</i>	AN	4361.2	-	6359.2	8663.2		7734.2	2302.2	1019.2	226.2
<i>N. crassa</i>	NCU	3536	-	8563	10006		8999	8991	5204	1188

List of genes involved in sulfur metabolism in each species studied

A (7/7)

<i>S. cerevisiae</i> gene name	LOCUS Prefix	METHYL CYCLE						GLUTATHION SYNTHESIS		ND
		MET 6	SAM1	SAM2	SAH1	SAM4	MHT1	GSH1	GSH2	YHR2
<i>S. cerevisiae</i>		YER091C	YLR180W	YDR502C	YER043C	YPL273W	YLL062C	YJL101C	YOL049W	YHR112C
<i>C. glabrata</i>	CAGL	0I04994g	0J08415g 0B01122g		0C02189g		-	0L03630g	0F00825g	0I01276g 0K05665g
<i>Z. rouxii</i>	ZYRO	0B03036g	0F17248g		0E09042g	0G14212g		0F01936g	0D05390g	0F09768g 0F15664g
<i>K. thermotolerans</i>	KLTH	0C07018g	0F01782g		0G01188g	0C03850g 0H12716g		0D03322g	0D02398g	0E16566g
<i>E. gossypii</i>	AGOS_	ABR212C	AFR692C		AFR243C	AFR410W ABL125W		AFR086C	ACR284C	AER250C
<i>K. lactis</i>	KLLA	0E20065g	0C01782g		0A01199g	0D01551g		0F14058g	0F07557g	0E21319g
<i>L. kluyveri</i>	SAKL	0F12100g	0C01870g		0F01364g	0D01452g 0D09306g		0D05390g	0B09944g	0G02222g
<i>C. albicans</i>	CaO	19.2551 19.10083	19.657 19.8272		19.3911 19.11392	19.386 19.8016		19.5059 19.12526	19.13762 19.6404	19.7297
<i>D. hansenii</i>	DEHA	2A07414g	2E14212g		2G19910g	2A00616g		2F26444g	2C15620g	2A00814g 2A01144g
<i>P. stipitis</i>	PICST_	78051	65158		76463	30270		62151	43206	59680
<i>Y. lipolytica</i>	YALI	0E12683g	0B14509g		0F11759g	0F25641g		0E30129g	0C17831g	0C22088g
<i>S. pombe</i>	SP	AC9.09	BC14F5.05c		BC8D2.18c	AC57A7.07c		AC22F3.10c	AC3F10.04	AC23A1.14c
<i>E. nidulans</i>	AN	4443.2	1222.2		1263.2	3378.2		3150.2	10284	0681.2 9144.2
<i>N. crassa</i>	NCU	6512	2657		7930	799		1157	6191	522

List of genes involved in sulfur metabolism in each species studied

B (1/7)

<i>Saccharomyces cerevisiae</i> gene name	SULPHATE ACTIVATION						HOMO CYSTEINE SYNTHESIS	
	MET 3	MET 14	MET 22	MET 16	MET5	MET 10	MET 17	MET 2
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	P08536	Q02196	P32179	P18408	P47169	P39692	P06106	P08465
<i>Candida glabrata</i>	Q6FXQ8	Q6FLM3	Q6FWJ2	Q6FQ76	Q6FK83	Q6FVV5	Q6FVR1	Q6FNX4
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	C5E0E3	C5DQM3	C5DR25	C5DUU1	C5DRI3	C5DWK7	C5E1M5	C5DYZ8
<i>Kluyveromyces thermotolerans</i>	C5DCC5	C5DGL6	C5DEF8	C5DJS1	C5DFS4	C5DHJ4	C5DGA4	C5DK61
<i>Eremothecium gossypii</i>	Q74ZF6	Q75DL7	Q757V0	Q758M0	Q75DV0	Q74ZH0	Q75AE8	Q751Z3
<i>Kluyveromyces lactis</i>	Q6CNU6	Q6CVB5	Q6CIQ8	Q6CVN4	Q6CWI0	Q6CQM5	Q92441	Q6CUV3
<i>Candida albicans</i>	Q9Y872	Q5A500	Q59XQ1 P46594	Q5A0Z0	-	Q59X55	Q59US5	Q5A948
<i>Debaryomyces hansenii</i>	Q6BSU5	Q6BPK7	Q6BNJ1	Q6BVY3	Q6BMJ3	Q6BW16	Q6BME7	Q6BN89
<i>Pichia stipitis</i>	A3GI41	A3LZE9	A3LUV9	A3LZM8	A3LW26	A3LTZ0	A3LST3	A3LR19
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Q6CFD2	Q6C7J1	Q6C055	Q6CFD3	Q6C9H5	Q6C5P4	Q6C7U9	Q6C7H3
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	P78937	Q9P7G9	O94505	Q10270	Q1K9C2	Q09878	O13326	O60062
<i>Emericella nidulans</i>	Q12555	Q92203	Q5BCG1	Q5B3W0	Q5AVT0	Q5BCH8	P50125	Q9Y875
<i>Neurospora crassa</i>	Q7SE75	Q7S203	Q7RZE9	Q7SFM7	Q7S8U6	Q7RZE3	Q1K4Z1	Q1K8F9

List of genes involved in sulfur metabolism in each species studied

B (2/7)

<i>Saccharomyces cerevisiae</i> gene name	HOMOSERINE SYNTHESIS			SYNTHESIS OF MET6'S COFACTOR				NADPH
	HOM 3	HOM 2	HOM 6	MET 12	MET 13	FOL 3	MET 7	MET 19
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	P10869	P13663	P31116	P46151	P53128	Q12676 P36001	Q08645	P11412
<i>Candida glabrata</i>	Q6FPL5	Q6FVK7	Q6FK85	Q6FNS2	Q6FU20	Q6FN15	Q6FPH6	Q6FP06
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	C5DWQ0	C5DYK4	C5DRI7	C5DPF1	C5E412	C5E1D3	C5DXR5	C5DYT8
<i>Kluyveromyces thermotolerans</i>	C5DBN1	C5DMV0	C5DFS1	C5DIA7	C5E2N6	C5DGE5	C5DEZ7	C5E1X3
<i>Eremothecium gossypii</i>	Q75AL3	Q750W4	Q75DV3	Q752W6	Q75EA7	Q758R3	Q75BY6	Q75E77
<i>Kluyveromyces lactis</i>	Q6CID1	Q6CQJ0	Q6CW13	Q6CR34	Q6CKM1	Q6CVF4	Q6CKE5	P48828
<i>Candida albicans</i>	Q5A474 Q59ME9	Q5ALM0	Q5AIA2	Q5A5S8	Q5AEI0	Q59S44	Q59TB5	Q5APL0
<i>Debaryomyces hansenii</i>	Q6BUX0	Q6BS59	Q6BN01	Q6BM19	Q6BJM9	Q6BK10	Q6BM37	Q6BUJ0
<i>Pichia stipitis</i>	A3GF89	A3LUL1	A3LRB1	A3LW82	A3LUC7	A3LWH9	A3LUA8	A3LYR5
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Q6C9F1	Q6C968	Q6CAP2	Q6CEM7	Q6CG63	Q6CHD4	Q6C4Q7	Q6C4Y7
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	O60163	P78780	O94671	O74927	Q10258	Q9UTD0	O74742	O00091 O14137 O59812
<i>Emericella nidulans</i>	Q5AS71	Q5B3T7	Q5B998	Q5AU15	Q5B0P7	Q5B4Z6	Q5B6J0	P41764
<i>Neurospora crassa</i>	Q8NIW0	Q7SF95	Q7RZC2	Q7S2B6	Q7S830	Q9HEK9	O13492 Q7SFD9	Q7RV86

List of genes involved in sulfur metabolism in each species studied
B (3/7)

<i>Saccharomyces cerevisiae</i> gene name	METHIONINE SALVAGE PATHWAY							
	SPE2	SPE3	SPE4	MEU1	MRI1	MDE1	UTR4	ADI1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	P21182	Q12074	Q12455	Q6B1L0	Q06489	P47095	P32626	Q03677
<i>Candida glabrata</i>	Q6FS85	Q6FWB8	Q6FJP6	Q6FW39	Q6FVY2	Q6FJA5	Q6FLR5	Q6FME1
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	C5DYG3	C5DUF9	C5DYM0	C5DRQ6	C5DU12	C5E0B9	C5DXI0	C5E1T3
<i>Kluyveromyces thermotolerans</i>	C5DIP2	C5DL72	C5DMT5	C5DCI5	C5DHL1	C5DCA2	C5DDS4	C5DLE6
<i>Eremothecium gossypii</i>	Q75E84	Q75BA7	-	Q75FA2	Q75EI1	Q75CP5	Q753F5	Q75A97
<i>Kluyveromyces lactis</i>	Q6CT94	Q6CVU4	Q6CQH3	Q6CJV5	Q6CQP3	Q6CMZ9	Q6CM87	Q6CQT5
<i>Candida albicans</i>	Q59XF7	Q59Z50	Q5AL17	Q59ST1	Q5AD59	Q5AG73	Q5AM80	Q59WJ5
<i>Debaryomyces hansenii</i>	Q6BPN1	Q6BS99	Q6BP53	Q6BUB4	Q6BZH5	Q6BIX5	Q6BXC7	Q6BVZ4
<i>Pichia stipitis</i>	A3LZD3	A3LYB2	A3GHW1	A3LNX3	A3LN21	A3LVM9	A3LRM2	A3GFN2
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Q6C579	Q6C3P7	Q6C706	Q6CES3	Q6CGS4	Q6CBB0	Q6C8V1	Q6CH03
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Q9P7E3	Q09741	-	Q09816	O60185	Q9HE08	Q9P6Q2	O94286
<i>Emericella nidulans</i>	Q5ATZ9	Q96UK1	-	Q5BCJ5	Q5B590	Q5B787	-	Q5AQA3
<i>Neurospora crassa</i>	Q9Y7F3	Q9Y8H7	-	Q7RZA5	Q7S4G7	Q7SF46	Q7SBS7	Q7RXR1

List of genes involved in sulfur metabolism in each species studied

B (4/7)

<i>Saccharomyces cerevisiae</i> gene name	SIROHEME SYNTHESIS		METHIONINE CATABOLISM					ND
	MET 1	MET 8	ARO 10	BAT1	BAT2	ARO 8	ARO 9	YEY2
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	P36150	P15807	Q06408	P38891	P47176	P53090	P38840	P10356
<i>Candida glabrata</i>	Q6FTK0	Q6FMN1	Q6FYB3	Q6FTS6	Q6FK92	Q6FTM8	Q6FT20	Q6FQF8
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	C5DSC6	C5DT33	C5DZH1	C5E1Q1	-	C5DT73	C5DZL2	C5DRT1
<i>Kluyveromyces thermotolerans</i>	C5DJK7	C5E2Q3	C5DJD3	C5DFQ6	-	C5DLN0 C5DHW5	C5DCW2	C5DC58 C5DNT2
<i>Eremothecium gossypii</i>	Q74ZA5	Q75EC2	Q75BR0	-	Q75BE8	Q752M6 Q74ZN1	-	Q74ZQ7
<i>Kluyveromyces lactis</i>	Q6CJT1	Q6CUE3	Q6CPS1	Q6CX88	-	Q6CKK3 Q6CXX4	Q6CR82	Q6CPZ7
<i>Candida albicans</i>	Q5A0K1	Q5ADR1	Q59MU3	Q5AHJ9	Q59YS9	Q5ADA2	Q5A4C4	Q59S25
<i>Debaryomyces hansenii</i>	Q6BQA0 Q6BH25	Q6BMT6	Q6BSB5	-	Q6BSQ6	Q6BYU5	-	Q6BYP0
<i>Pichia stipitis</i>	A3LUM7	A3LZI7	A3LXV3	-	A3LNY1 A3LVU4	A3LMX7	A3GGR2 A3GF91	A3LUQ7
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Q6CI67	Q6C695	Q6CA04	Q6CAN4	Q6C120	Q6C551	Q6CCZ6	Q6C6L9
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	O74468	O14172	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
<i>Emericella nidulans</i>	Q5B3V6	Q5AYC0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
<i>Neurospora crassa</i>	Q7SI49	Q7SBH1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

List of genes involved in sulfur metabolism in each species studied

B (5/7)

<i>Saccharomyces cerevisiae</i> gene name	TRANSSULFURATION PATHWAY				CYSTEINE SYNTHESIS			REGULATION
	CYS 4	CYS 3	STR 2	STR 3	CYS K			RBX1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	P32582	P31373	P47164 Q04533 Q12198	P53101 P43623	P53206	-	-	Q08273
<i>Candida glabrata</i>	Q6FVB8	Q6FRS2	Q6FK75 Q6FS18	Q6FL54	Q6FTU3	-	-	B4UMZ3
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	C5DZT7	C5DVD2	C5DRG8	C5E197	C5E0A9	C5E1G7	C5DPX0	C5DSU4
<i>Kluyveromyces thermotolerans</i>	C5DGC1	C5DG64	C5DFU1 C5DLF9	C5DHS0	C5DI11	C5E370	C5DHB5	C5DJU6
<i>Eremothecium gossypii</i>	Q750E3	Q758U3	Q756W2	Q75CH8	Q750D4 Q758B3	Q758B3	Q757W0	Q75AV1
<i>Kluyveromyces lactis</i>	Q6CKN5	Q6CKV1	Q6CWG2	Q6CSX8	Q6CST5 Q6CLM7	Q6CLM7	Q6CJ47	Q6CP68
<i>Candida albicans</i>	Q59T95	Q5A362	Q59VR0	Q5ACX5	Q5ABX6	Q5A0E3 Q5ABX6	Q59TT5	-
<i>Debaryomyces hansenii</i>	Q6BU02	Q6BTV4	Q6BSE9	Q6BYU9	B5RT41	Q6BL57 A3LWK4	Q6BV64	Q6BKZ3
<i>Pichia stipitis</i>	A3LRC4	A3LSH7	A3LX62	A3LMX1	A3LRL7	A3LRL7	A3LRS6	A3LZW2
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Q6C6J2	Q6C2Q9	Q6C8S4	Q6CAR4	Q6C6L3 Q6C1R7	Q6C1R7	Q6CAU6	Q6CE99
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	-	-	O74314	O94350	P87131	O59701 P87131	Q10341	O13959
<i>Emericella nidulans</i>	Q5B0W0	Q5BDD4	Q5B7M4	Q5AXC9	Q5BD67	P50867 Q5BD67	Q5AT15	Q5AS86
<i>Neurospora crassa</i>	Q7S3M7	Q96VU7	P38675 Q872Z1 Q7SD09	Q96VU8	Q7SHQ1	Q7RYW6	Q7SDK8	-

List of genes involved in sulfur metabolism in each species studied

B (6/7)

<i>Saccharomyces cerevisiae</i> gene name	REGULATION								
	MET4	MET28	MET30	MET31	MET32	CBF1	SKP1	CDC53	CDC34
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	P32389	P40573	P39014	Q03081	Q12041	P17106	P52286	Q12018	P14682
<i>Candida glabrata</i>	Q6FSZ3	Q6FME6	Q6FLT6	Q6FXE1	Q6FKD0	Q6FSB6	Q9UVW8	Q6FNT4	Q6FV56
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	C5DRM4	C5DZF9	C5DWQ5		C5DXV8	C5DZH5	C5DVY4	C5DTL2	C5E0H1
<i>Kluyveromyces thermotolerans</i>	C5DGX7	C5DJ50	C5DBN6		C5DIC0	C5DDP4	C5DHE8	C5E264	C5DDY5
<i>Eremothecium gossypii</i>	Q755P4	Q75ER9	Q75AK9		Q751F2	Q753B0	Q759H8	Q75AG7	Q6FV56
<i>Kluyveromyces lactis</i>	Q6CTF0	Q6CVI1	Q6CID5		Q6CR47	P49379	O94228	Q6CL61	Q6CRG7
<i>Candida albicans</i>	Q5A5T7		Q5A933		Q59XU8	Q5A1E3	Q59WE2	Q5AJB7	Q5AH09
<i>Debaryomyces hansenii</i>	Q6BUN5	-	Q6BRQ3		Q6CR47	Q6BXE0	Q6BK01	Q6BRL6	Q6BVE8
<i>Pichia stipitis</i>	A3LYN0	A3LSF0	A3GFK1		A3LU82	A3GF22	A3LWU4	A3LP00	A3LY37
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Q6CAA6	-	-		Q6C327	Q6C7Z2	Q6CHA1	Q6C9B4	Q6CCV7
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Q10424	-	P87053		-	Q10186	Q9Y709	O13790	Q9Y818
<i>Emericella nidulans</i>	Q9Y8B4	-	Q00659		Q5ASR7	Q5AVE6	Q92229	Q5BEL1	Q5BGV4
<i>Neurospora crassa</i>	P22697	-	Q01277		Q7S3Z7	Q7S2X1	Q8NK13	Q7S9C8	Q7S7Z9

List of genes involved in sulfur metabolism in each species studied

B (7/7)

<i>Saccharomyces cerevisiae</i> gene name	METHYL CYCLE						GLUTATHION SYNTHESIS		ND
	MET 6	SAM1	SAM2	SAH1	SAM4	MHT1	GSH1	GSH2	YHR2
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	P05694	P10659	P19358	P39954	Q08985	Q12525	P32477	Q08220	P38716
<i>Candida glabrata</i>	Q6FQM7	Q6FNX9 Q6FX78		Q6FWX3		-	Q6FLG3	Q6FUT4	Q6FR34 Q6FMS2
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	C5DQU3	C5DZ08		C5E4V4	C5E0N3		C5DX36	C5DVB6	C5DY28 C5DYT7
<i>Kluyveromyces thermotolerans</i>	C5DE81	C5DK50		C5DLJ4	C5DDU4 C5E3E4		C5DG89	C5DG49	C5DJ03
<i>Eremothecium gossypii</i>	Q75D10	Q751Y3		Q753T3	Q753B4 Q75DZ8		Q754I8	Q75BI7	Q756K4
<i>Kluyveromyces lactis</i>	Q6CMI0	Q6CUW4		Q6CYD7	Q6CSF1		Q6CK28	Q6CKW7	Q6CMC4
<i>Candida albicans</i>	Q5A9B4	Q59W67		Q5AKA9	Q59QD2		Q5A7H8	Q5A359	Q5A410
<i>Debaryomyces hansenii</i>	Q6BYS1	Q6BPE7		Q6BHB2	Q6BZK6		Q6BJY3	Q6BTV7	Q6BZI1 Q6BZJ6
<i>Pichia stipitis</i>	A3LVA0	A3LNJ6		A3LNU0	A3LQC9		A3LWV8	A3LSH4	A3LTQ0
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Q6C638	Q6CEM5		Q6C211	Q6C0D6		Q6C433	Q6CBL1	Q6CB42
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Q9UT19	O60198		O13639	P87138		Q09768	P35669	O42851
<i>Emericella nidulans</i>	Q5B4T7	Q5BE08		Q5BDW7	Q5B7V2		Q5B8I0	-	Q5BFJ9 Q5ARD6
<i>Neurospora crassa</i>	Q8X1E4	P48466		Q7S9Y8	Q7SFT2		Q8X0X0	Q7SBI1	Q7SCL5

Table of proteins studied (1/2)

<i>S. cerevisiae</i> gene name	EC number	Function-description (SGD)	pfam domain	Minimum	Maximum
MET3	2.7.7.4	ATP sulfurylase	ATP-sulfurylase(PF01747)	1	1
			APS-Kinase (PF01583)	0	1
MET14	2.7.1.25	adenylyl-sulfate kinase	APS-Kinase (PF01583)	1	2
MET22	3.1.3.7	Bisphosphate-3'-nucleotidase	Inositol_P (PF00459)	1	5
MET16	1.8.4.8	3'-phosphoadenylsulfate reductase	PAPS_reduct (PF01507)	2	3
			Flavodoxin_1 (PF00258)	4	11
MET5	1.8.1.2	Sulfite reductase beta subunit	NIR_SIR_ferr (PF03460)	2	5
			NIR_SIR (PF01077)	1	3
MET10	1.8.1.2	Subunit alpha of assimilatory sulfite reductase	FAD_binding_1 (PF00667)	3	6
			NAD_binding_1 (PF00175)	5	17
MET17	2.5.1.49	Methionine and cysteine synthase (O-acetyl homoserine-O-acetyl serine sulphydrylase)	Cys_Met_Meta_PP (PF01053)	5	9
MET2	2.3.1.31	L-homoserine-O-acetyltransferase	Abhydrolase_1 (PF00561)	11	33
HOM3	2.7.2.4	Aspartate kinase (L-aspartate 4-P-transferase)	AA_kinase (PF00696)	3	5
			ACT (PF01842)	2	8
HOM2	1.2.1.11	Aspartic beta semi-aldehyde dehydrogenase	Semialdehyde_dh (PF01118)	2	3
			Semialdehyde_dhC (PF02774)	2	3
HOM6	1.1.1.3	Homoserine dehydrogenase (L-homoserine:NADP oxidoreductase)	NAD_binding_3 (PF03447)	1	1
			Homoserine_dh (PF00742)	1	1
MET12	1.5.1.20	methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) activity in vitro	MTHFR (PF02219)	2	2
MET13		Major isozyme of methylenetetrahydrofolate reductase	MTHFR (PF02219)	2	2
FOL3		Dihydrofolate synthetase	Mur_ligase_M (PF08245)	1	2
MET7	6.3.2.17	Folylpolyglutamate synthetase	-	-	-
MET19	1.1.1.49	Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD)	G6PD_N (PF00479)	1	3
			G6PD_C (PF02781)	1	3
MET6	2.1.1.14	Cobalamin-independent methionine synthase	Meth_synt_1 (PF08267)	1	1
			Meth_synt_2 (PF01717)	1	1
SAM1			S-AdoMet_synt_N (PF00438)	1	2
SAM2	2.5.1.6	S-adenosylmethionine synthetase	S-AdoMet_synt_M (PF02772)	1	2
			S-AdoMet_synt_C (PF02773)	1	2
SAH1	3.3.1.1	S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase	AdoHcyase (PF05221)	1	1
			AdoHcyase_NAD (PF00670)	1	1
SAM4		S-adenosylmethionine-homocysteine methyltransferase	S-methyl_trans (PF02574)	1	3
MHT1	2.1.1.10	S-methylmethionine-homocysteine methyltransferase	S-methyl_trans (PF02574)	1	3
GSH1	6.3.2.2	Gamma glutamylcysteine synthetase	GCS (PF03074)	1	1
GSH2	6.3.2.3	Glutathione synthetase	GSH_synt_ATP (PF03917)	1	1
			GSH_syntase (PF03199)	1	1
YHR112c (YHR2)	-	Putative protein of unknown function	Cys_Met_Meta_PP (PF01053)	5	9

Table of proteins studied (2/2)

<i>S. cerevisiae</i> gene name	EC number	Function-description (SGD)	pfam domain	Minimum	Maximum
CYS 4	4.2.1.22	Cystathionine beta-synthase	PALP (PF00291) CBS (PF00571)	6 1	23 1
CYS 3	4.4.1.1	Cystathionine gamma-lyase	Cys_Met_Meta_PP (PF01053)	5	9
STR 2	2.5.1.48	Cystathionine gamma-synthase	Cys_Met_Meta_PP (PF01053)	5	9
STR 3	4.4.1.8	Cystathionine beta-lyase	Cys_Met_Meta_PP (PF01053)	5	9
YGR012W (CYSK)	2.5.1.47	Putative cysteine synthase	PALP (PF00291)	6	23
SPE2	4.1.1.50	S-adenosylmethionine decarboxylase	SAM_decarbox (PF01536)	1	1
SPE3	2.5.1.16	Spermidine synthase	Spermine_synth (PF01564)	1	2
SPE4	2.5.1.22	Spermine synthase	Spermine_synth (PF01564)	1	2
MEU1	2.4.2.28	Methylthioadenosine phosphorylase (MTAP)	PNP_UDP_1 (PF01048)	1	19
MR11	5.3.1.23	5'-methylthioribose-1-phosphate isomerase	IF-2B (PF01008)	4	5
MDE1	4.2.1.109	5'-methylthioribulose-1-phosphate dehydratase	Aldolase_II (PF00596)	1	5
UTR4	3.1.3.77	2,3-diketo-5-methylthiopentyl-1-phosphate enolase-phosphatases	Hydrolase (PF00702)	15	38
AD11	1.13.11.53	Acireductone dioxygenase involved in the methionine salvage pathway	ARD (PF03079)	1	1
MET1	1.13.11.54	S-adenosyl-L-methionine uroporphyrinogen III transmethyase	TP_methylase (PF00590)	2	3
MET8	2.1.1.107	Bifunctional dehydrogenase and ferrochelatase	-	-	-
	1.3.1.76				
	4.99.1.4				
ARO10	4.1.1.-	Phenylpyruvate decarboxylase	TPP_enzyme_N (PF02776) TPP_enzyme_M (PF00205) TPP_enzyme_C (PF02775)	4 4 4	7 7 7
BAT1	2.6.1.42	Mitochondrial branched-chain amino acid aminotransferase	Aminotran_4 (PF01063)	1	6
BAT2		Cytosolic branched-chain amino acid aminotransferase	Aminotran_4 (PF01063)	1	6
ARO8	2.6.1.-	Aromatic aminotransferase I	Aminotran_1_2 (PF00155)	11	28
ARO9		Aromatic aminotransferase II	Aminotran_1_2 (PF00155)	11	28
YER152c (YEY2)	-	Putative protein of unknown function	Aminotran_1_2 (PF00155)	11	28
MET4	-	Leucine-zipper transcriptional activator	-	-	-
MET28	-	Basic leucine zipper (bZIP) transcriptional activator in the Cbf1p-Met4p-Met28p complex	bZIP_2 (PF07716)	1	6
MET30	-	F-box protein containing five copies of the WD40 motif	F-box (PF00646)	1	23
MET31 MET32	-	Zinc-finger DNA-binding protein	zf-C2H2 (PF00096)	1	28
CBF1	-	Helix-loop-helix protein	HLH (PF00010)	1	18
SKP1	-	kinetochore protein	Skp1_POZ (PF03931)	1	3
CDC53	-	Cullin, structural protein of SCF complexes	Cullin (PF00888)	1	8
CDC34	6.3.2.19	ubiquitin-conjugating enzyme (E2) and catalytic subunit of SCF ubiquitin-protein ligase complex	UQ_con (PF00179)	1	21
RBX1	-	RING finger containing subunit of Skp1-Cullin-F-box ubiquitin protein ligases (SCF)	-	-	-

Summary of regulatory proteins studied

	MET4	MET28	MET31 MET32	CBF1	MET30	SKP1	RBX1	CDC53	CDC34
<i>E. nidulans</i>	25	-	27	25	46	61	53	30	52
<i>N. crassa</i>	26	-	31	30	43	62	-	29	48
<i>S. pombe</i>	23	-	-	30	45	61	55	30	47
<i>Y. lipolytica</i>	22	-	28	24	59	65	53	28	62
<i>D. hansenii</i>	28	-	34	34	55	70	57	28	64
<i>C. albicans</i>	28	-	37	39	55	67	59	27	64
<i>P. stipitis</i>	28	25	35	35	57	70	60	28	65
<i>K. lactis</i>	32	46	37	41	66	83	65	32	68
<i>K. thermotolerans</i>	36	50	52	52	66	85	82	37	77
<i>E. gossypii</i>	36	19	51	48	67	87	69	29	82
<i>L. kluyveri</i>	41	21	50	48	66	90	77	38	80
<i>Z. rouxii</i>	44	47	51	43	69	92	82	42	84
<i>C. glabrata</i>	40	50	32/40	30	73	89	85	40	82
<i>S. cerevisiae</i>	100	100	100/45	100	100	100	100	100	100

References

- Aggarwal M, Mondal AK & Kishan KVR (2008) Creation of salt-insensitive 3'(2'),5'-bisphosphate nucleotidase by modeling and mutagenesis approach. *Arch. Biochem. Biophys.* 469: 174-183.
- Baudouin-Cornu P & Labarre J (2006) Regulation of the cadmium stress response through SCF-like ubiquitin ligases: comparison between *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* and mammalian cells. *Biochimie* 88: 1673-85.
- Bonaïti C, Irlinger F, Spinnler HE & 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. *J. Dairy Sci.* 88: 1671-84.
- Bondar DC, Beckerich JM & Bonnarne P (2005) Involvement of a branched-chain aminotransferase in production of volatile sulfur compounds in *Yarrowia lipolytica*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 4585-91.
- Brzywczy J, Natorff R, Sieńko M & Paszewski A (2007) Multiple fungal enzymes possess cysteine synthase activity in vitro. *Res. Microbiol.* 158: 428-36.
- Brzywczy J, Sieńko M, Kucharska A & Paszewski A (2002) Sulphur amino acid synthesis in *Schizosaccharomyces pombe* represents a specific variant of sulphur metabolism in fungi. *Yeast* 19: 29-35.
- Byrne KP & Wolfe KH (2005) The Yeast Gene Order Browser: combining curated homology and syntenic context reveals gene fate in polyploid species. *Genome Res.* 15: 1456-1461.
- Chandrasekaran S & Skowrya D (2008) The emerging regulatory potential of SCFMet30 - mediated polyubiquitination and proteolysis of the Met4 transcriptional activator. *Cell Div.* 3: 11.
- Cherest H & Surdin-Kerjan Y (1992) Genetic analysis of a new mutation conferring cysteine auxotrophy in *Saccharomyces cerevisiae*: updating of the sulfur metabolism pathway. *Genetics* 130: 51-8.
- Cherest H, Thomas D & Surdin-Kerjan Y (2000) Polyglutamylation of folate coenzymes is necessary for methionine biosynthesis and maintenance of intact mitochondrial genome in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 275: 14056-63.
- Cholet O, Hénaut A, Hébert A & Bonnarne P (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: 3356-67.
- Dereeper A *et al.* (2008) Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Res* 36: W465-469.
- Dujon B (2006) Yeasts illustrate the molecular mechanisms of eukaryotic genome evolution. *Trends. Genet.* 22: 375-87.
- Dujon B *et al.* (2004) Genome evolution in yeasts. *Nature* 430: 35-44.
- Edgar RC (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* 32: 1792-1797.
- Fauchon M *et al.* (2002) Sulfur sparing in the yeast proteome in response to sulfur demand. *Mol. Cell* 9: 713-23.
- Fitzpatrick DA, Logue ME, Stajich JE & Butler G (2006) A fungal phylogeny based on 42 complete genomes derived from supertree and combined gene analysis. *BMC Evol. Biol.*

6: 99.

- Fontecave M, Atta M & Mulliez E (2004) S-adenosylmethionine: nothing goes to waste. *Trends. Biochem. Sci.* 29: 243-9.
- Grynberg M, Topczewski J, Godzik A & Paszewski A (2000) The *Aspergillus nidulans* *cysA* gene encodes a novel type of serine O-acetyltransferase which is homologous to homoserine O-acetyltransferases. *Microbiology* 146 (Pt 10): 2695-703.
- Guindon S & Gascuel O (2003) A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst. Biol* 52: 696-704.
- Hamasaki-Katagiri N, Tabor CW & Tabor H (1997) Spermidine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: polyamine requirement of a null mutant of the *SPE3* gene (spermidine synthase). *Gene* 187: 35-43.
- Hansen J, Muldbjerg M, Chérest H & Surdin-Kerjan Y (1997) Siroheme biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* requires the products of both the *MET1* and *MET8* genes. *FEBS Lett.* 401: 20-24.
- Kagkli DM, Bonnarme P, Neuvéglise C, Cogan TM & Casaregola S (2006) L-methionine degradation pathway in *Kluyveromyces lactis*: identification and functional analysis of the genes encoding L-methionine aminotransferase. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 3330-5.
- Katz JE, Dlakić M & Clarke S (2003) Automated identification of putative methyltransferases from genomic open reading frames. *Mol. Cell. Proteomics* 2: 525-40.
- Kuras L & Thomas D (1995) Functional analysis of *Met4*, a yeast transcriptional activator responsive to S-adenosylmethionine. *Mol. Cell. Biol.* 15: 208-216.
- Landaud S, Helinck S & Bonnarme P (2008) Formation of volatile sulfur compounds and metabolism of methionine and other sulfur compounds in fermented food. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 77: 1191-205.
- Liti G *et al.* (2009) Population genomics of domestic and wild yeasts. *Nature* 458: 337-341.
- Masselot M & De Robichon-Szulmajster H (1975) Methionine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. I. Genetical analysis of auxotrophic mutants. *Mol. Gen. Genet.* 139: 121-132.
- Murphy MJ, Siegel LM, Tove SR & Kamin H (1974) Siroheme: A New Prosthetic Group Participating in Six-Electron Reduction Reactions Catalyzed by Both Sulfite and Nitrite Reductases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 71: 612-616.
- Ono BI, Hazu T, Yoshida S, Kawato T, Shinoda S, Brzvwczy J & Paszewski A (1999) Cysteine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: a new outlook on pathway and regulation. *Yeast* 15: 1365-75.
- Perpète P, Duthoit O, De Maeyer S, Imray L, Lawton AI, Stavropoulos KE, Gitonga VW, Hewlins MJE & Dickinson JR (2006) Methionine catabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* 6: 48-56.
- Perrière G & Gouy M (1996) WWW-query: an on-line retrieval system for biological sequence banks. *Biochimie* 78: 364-369.
- Pirkov I, Norbeck J, Gustafsson L & Albers E (2008) A complete inventory of all enzymes in the eukaryotic methionine salvage pathway. *FEBS J.* 275: 4111-20.

- Raux E, McVeigh T, Peters SE, Leustek T & Warren MJ (1999) The role of *Saccharomyces cerevisiae* Met1p and Met8p in sirohaem and cobalamin biosynthesis. *Biochem. J.* 338 (Pt 3): 701-8.
- Suliman HS, Sawyer GM, Appling DR & Robertus JD (2005) Purification and properties of cobalamin-independent methionine synthase from *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 441: 56-63.
- Thomas D, Becker A & Surdin-Kerjan Y (2000) Reverse methionine biosynthesis from S-adenosylmethionine in eukaryotic cells. *J. Biol. Chem.* 275: 40718-24.
- Thomas D, Cherest H & Surdin-Kerjan Y (1991) Identification of the structural gene for glucose-6-phosphate dehydrogenase in yeast. Inactivation leads to a nutritional requirement for organic sulfur. *EMBO J.* 10: 547-553.
- Thomas D & Surdin-Kerjan Y (1997) Metabolism of sulfur amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61: 503-32.
- Vuralhan Z *et al.* (2005) Physiological characterization of the ARO10-dependent, broad-substrate-specificity 2-oxo acid decarboxylase activity of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 3276-84.
- Vuralhan Z, Morais MA, Tai S, Piper MDW & Pronk JT (2003) Identification and characterization of phenylpyruvate decarboxylase genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 4534-41.

Authors' contributions

AH was responsible for the initial phylogenetic studies, tree analysis, manuscript and figure preparation. JMB generated and analyzed the results concerning regulatory proteins, and participated in the writing of the manuscript. SC provided his expertise for the data analysis and the manuscript editing. All authors read and approved the manuscript.

Acknowledgements

We would like to thank Sophie Landaud for helpful comments on the manuscript, and the PNRA (French National Research Agency: www.agence-nationale-recherche.fr) for the financing of the EcoMet project (ANR-06-PNRA-014).

I. D. Conclusion

Nous avons étudié l'évolution du métabolisme du soufre à travers le phylum des levures hémiascomycètes. Lors de la reconstruction des voies métaboliques, nous avons constaté que ce métabolisme est bien conservé chez les micro-organismes étudiés.

Cependant, nous avons pu identifier des différences majeures, notamment au niveau de la biosynthèse de la cystéine. Comme les champignons *E. nidulans* et *N. crassa*, la plupart des espèces de levure possèdent deux voies menant à la production de cystéine, la voie de transsulfuration inverse et la voie de l'*O*-acétyl-sérine (OAS). Seules les levures étudiées ayant effectué la Whole Genome Duplication (WGD), *S. cerevisiae* et *C. glabrata*, ne présentent que la voie de transsulfuration inverse. *S. pombe*, qui possède seulement la voie de l'OAS, reste une exception isolée.

Bien que l'activateur transcriptionnel du métabolisme du soufre Met4p soit présent dans tous les micro-organismes étudiés, son interaction à l'ADN semble se faire soit directement, soit via Met28p. Hormis cette différence, tous les partenaires de Met4p et ainsi que leur domaines d'interaction semblent être conservés, suggérant le maintien des mécanismes de régulation dans la totalité du phylum.

Nous avons mis en évidence deux familles de gènes conservés de fonction non définie chez *S. cerevisiae* mais présentant des similarités de séquence avec des gènes de la biosynthèse et du catabolisme des acides aminés respectivement. La découverte de ces gènes, potentiellement impliqués dans le métabolisme du soufre, ouvre de nouvelles perspectives pour l'étude de ce métabolisme.

Nous avons réalisé pour la première fois une étude phylogénétique du catabolisme des acides aminés soufrés. Nous avons constaté que, bien que ce phénomène soit conservé, le set d'enzymes impliquées diverge d'un micro-organisme à l'autre. Ceci pourrait être une piste pour expliquer les différentes capacités aromatiques des espèces de levures possédant un intérêt technologique.

II. Influence de l'apport soufré sur le métabolisme du soufre chez les levures *Kluyveromyces lactis* et *Yarrowia lipolytica*

II. A. Introduction

L'analyse *in silico* nous a permis de reconstruire les voies du métabolisme du soufre chez les levures hémiascomycètes, nous donnant ainsi accès à une base solide pour poursuivre notre étude. Nous avons choisi d'étudier le métabolisme du soufre chez deux levures technologiques phylogénétiquement éloignées et possédant un métabolisme global très différent : *Kluyveromyces lactis* et *Yarrowia lipolytica*. Lors de cette étude, nous avons combiné plusieurs approches exploratoires :

Le transcriptome : Après avoir identifié les gènes du métabolisme du soufre, nous avons souhaité observer leur expression. En commençant cette étude, nous disposions déjà d'une puce à ADN du génome de *Y. lipolytica* (Eurogentec). Il nous manquait cependant une puce complète du génome de *K. lactis*. Ce travail de thèse a été réalisé dans le cadre du projet « Ecosystème fromager étude du Métabolisme du soufre » (EcoMet) financé par l'Agence Nationale de la Recherche (ANR). Par conséquent, ce projet a impliqué de nombreux partenaires, dont Valentin LOUX (INRA, Unité MIG) qui a mis au point le set d'oligonucléotides du génome de *K. lactis* nécessaire à la fabrication des puces (Agilent), ainsi que Julie AUBERT (AgroParisTech-INRA, Unité MIA) avec qui nous avons collaboré lors de l'analyse statistique des résultats transcriptomiques. Les résultats transcriptomiques ont été validés par PCR quantitative.

Le métabolome : Nous avons choisi d'associer l'étude du métabolome à celle du transcriptome, afin d'estimer les variations des concentrations intracellulaires de métabolites en relation avec le métabolisme du soufre. Cette étude a été réalisée dans un but exploratoire afin de mettre en évidence le maximum de molécules soufrées. Nous avons donc choisi d'utiliser un analyseur de type Orbitrap, qui permet d'accéder à la mesure de masse précise de chaque composé et par conséquent à sa composition élémentaire. Le plan d'expérience utilisé dans ce travail (voir ci-dessous) étant basé sur la comparaison relative entre différentes conditions, nous n'avons pas réalisé de quantification absolue.

La colonne utilisée favorise la séparation des composés polaires, dont font partie les

composés soufrés recherchés. Nous nous sommes confrontés au problème des molécules isomères, de même composition élémentaire mais de structure différente. Nous avons cependant pu distinguer le glutamate de l'*O*-acétylsérine ainsi que l'*O*-acétylhomosérine de l'acide aminoadipique par MSⁿ, grâce à l'absence et à la présence du fragment discriminant acétyl respectivement. Ainsi, nous avons pu confirmer l'absence d'*O*-acétylsérine et la présence d'*O*-acétylhomosérine dans les échantillons étudiés.

La validation de l'identification des molécules a été faite selon plusieurs critères : (i) la masse précise et la détection des composés isobares, (ii) la concordance avec la base de données spectrales du laboratoire (iii) l'identification dans les banques publiques (iiii) la réalisation d'expériences complémentaire de fragmentations séquentielles de type MSⁿ. Ces études ont été réalisées sous la direction de notre partenaire Christophe JUNOT (CEA, DSV/iBiTec-S/SPI).

Nous avons constaté que l'ionisation en mode positif, qui génère des ions pseudo-moléculaires protonés, était plus favorable à la détection des molécules soufrées que l'ionisation en mode négatif, qui génère des ions pseudo-moléculaires déprotonés dans les conditions utilisées. Nous présenterons donc uniquement les résultats obtenus lors de l'ionisation en mode positif.

Parmi les 4252 signaux détectés, nous avons recherché les molécules connues liées au métabolisme du soufre. Nous avons ensuite analysé les résultats en réalisant des analyses en composantes principales (ACP). Lors de cette étude, 382 signaux étaient significatifs pour au moins une des conditions utilisées. Lors de l'analyse de ces 382 signaux, nous avons identifié 268 composés, parmi lesquels nous avons retrouvé tous les composés liés au soufre. La grande majorité des 268 composés reste encore non identifiée. Nous avons cependant constaté la présence de nombreux acides aminés parmi ces composés discriminants. Au sein des composés inconnus, nous avons recherché les molécules soufrées en recherchant la présence de l'isotope S³⁴ (défaut de masse de 1.9959, 4.43% du pic principal) au niveau des spectres de masse. Nous avons retrouvé deux composés soufrés, le premier étant non identifiable par des expériences de type MSⁿ, le deuxième pouvant être du glutathion oxydé par une fonction –SH, comme le suggère la masse et la perte de S₂H.

Le résultat le plus remarquable de cette analyse est la détection de deux composés soufrés uniquement chez *Y. lipolytica* : la taurine et l'hypotaurine. Ceci révèle d'importantes différences métaboliques entre les deux levures étudiées.

La détection des composés soufrés volatils : L'analyse par Chromatographie en phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (GC-MS) nous a permis de compléter les données métabolomiques par la détection des composés soufrés volatils produits dans chaque condition étudiée. Le principal obstacle que nous avons rencontré lors de cette analyse est la production d'éthanol par *K. lactis*. En effet, la colonne capillaire utilisée pour ce genre d'analyse n'est pas adaptée à la présence de composés volatils en concentration supérieure au g/L. Le pic d'éthanol s'étend donc sur une partie du spectre et masque probablement les pics de certaines molécules d'intérêt.

Cette analyse par GC-MS a été complétée par l'utilisation d'un protocole spécifique à la détection de l'H₂S. En effet, cette molécule, d'un intérêt non négligeable pour nos travaux, n'est pas détectable par les équipements de GC-MS disponibles au laboratoire.

Plan d'expérience : Pour réaliser cette étude nous avons fixé avec précision les conditions expérimentales. Tout d'abord, nous avons choisi d'utiliser un milieu chimiquement défini (MCD, ou SM en anglais) plutôt que la matrice fromagère de manière à : (i) maîtriser la composition du milieu, (ii) faciliter l'extraction des ARN et des métabolites, (iii) avoir une grande souplesse au niveau de l'apport en soufre. La composition du milieu MCD est décrite dans la Fiche n°1 : Milieu Chimiquement Défini (MCD)

Notre plan d'expérience consiste à utiliser indépendamment trois sources de soufre (méthionine, cystine et sulfate d'ammonium) en comparant l'effet de leur présence à une concentration élevée versus une concentration faible (facteur 1000), afin de mettre en évidence les voies du catabolisme versus de la biosynthèse des acides aminés soufrés. Nous avons maintenu les levures en début de phase exponentielle durant 10 générations par repiquage pour les stabiliser dans un état physiologique précis et ainsi obtenir des conditions répétables et sans stress.

Les résultats obtenus sont présentés en deux publications distinctes, la première portant sur *K. lactis* et la seconde sur *Y. lipolytica*.

II. B. Article n°3 : Exploration du métabolisme du soufre chez la levure
Kluyveromyces lactis

Exploration of sulfur metabolism in the yeast *Kluyveromyces lactis*

Agnès Hébert¹, Marie-Pierre Forquin², Aurélie Roux³, Julie Aubert⁴, Christophe Junot³, Valentin Loux⁵, Jean-François Heilier⁶, Pascal Bonnarme², Jean-Marie Beckerich^{1*}, Sophie Landaud²

¹UMR MICALIS, AgroParisTech-INRA, CBAI, BP 01, 78850 Thiverval Grignon, France.

²INRA-AgroParisTech, UMR 782 Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires, Centre de Biotechnologies Agro-Industrielles, 78850, Thiverval-Grignon, France.

³CEA, Service de Pharmacologie et d'Immunoanalyse, DSV/iBiTec-S, CEA/Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette Cedex, France.

⁴UMR 518 Mathématiques et Informatiques Appliquées, AgroParisTech-INRA, 16 rue Claude Bernard 75231 Paris Cedex 05, France.

⁵INRA, Unité Mathématique, Informatique et Génome UR1077, 78352 Jouy-en-Josas, France.

⁶Université Catholique de Louvain, Louvain Center for Toxicology and Applied Pharmacology (LTAP), 1200 Brussels, Belgium.

*Corresponding author:

Jean-Marie Beckerich, UMR MICALIS, AgroParisTech-INRA, CBAI, BP 01, 78850 Thiverval Grignon, France. Phone: 33 1 30 81 54 43. Fax: 33 1 30 81 54 57. E-mail: beck@grignon.inra.fr

Abstract

Hemiascomycetes are separated by considerable evolutionary distances and, as a consequence, the mechanisms involved in sulfur metabolism in the extensively studied yeast, *S. cerevisiae*, could be different from those of other species of the phylum. This is the first time that a global vision of sulfur metabolism in the technological yeast *Kluyveromyces lactis* has been reported. It uses combined approaches based on DNA microarrays, liquid chromatography coupled to electrospray mass spectrometry-based metabolite profiling, and analysis of volatile sulfur compounds (VSCs). A comparison between high and low sulfur source supplies, i.e., sulfate, methionine or cystine, was carried out in order to identify key steps in the biosynthetic and catabolic pathways of the sulfur amino acids. When complementary data of transcriptomic and metabolic analyses were combined, our study provided relevant results. Firstly, the sulfur metabolism of *K. lactis* is mainly modulated by methionine, depending on its availability. Furthermore, since sulfur assimilation is highly regulated, genes coding for numerous transporters, key enzymes involved in sulfate assimilation and the interconversion of cysteine to methionine pathways are repressed under conditions of high sulfur supply. Consequently, as highlighted by metabolomic results, intracellular pools of homocysteine and cysteine are maintained at very low concentrations, while the cystathionine pool is highly expandable.

Moreover, our results suggest a new catabolic pathway for methionine to VSCs in this yeast: methionine is transaminated by the *ARO8* gene product into 4-methylthio-oxobutyric acid (KMBA), which could be exported outside of the cell by the transporter encoded by *PDR12* and demethylated by a spontaneous reaction into methanethiol and its derivatives.

Introduction

Sulfur metabolism has been extensively investigated at the genetic, enzymatic and regulatory levels in *Saccharomyces cerevisiae* due to its central role in many cellular processes (43). This metabolism is closely linked to the cell cycle since the regulation of the transcriptional activator of sulfur metabolism, encoded by *MET4*, is essential for G1-S transition (33). Some essential molecules are produced via sulfur metabolism. The first important organic sulfur molecule is homocysteine, which is at the crossroads of the reverse transsulfuration pathway that leads to cysteine, and the methyl cycle that leads to methionine and its activated form, *S*-adenosylmethionine (SAM). SAM is a key molecule in the cell due to its various functions and interactions with many metabolisms. SAM is a methyl donor in numerous transmethylation reactions of nucleic acids, proteins and lipids, and is also used as a precursor for the biosynthesis of polyamines, vitamins and modified nucleotides (13). Moreover, cysteine is the sensor of the metabolic state in the sulfur amino acid pathway (17) and is required for the synthesis of glutathione (GSH), an essential antioxidant molecule involved in oxidative stress response and detoxification (12).

Concerning the technological aspects, sulfur metabolism is also responsible for the generation of volatile sulfur compounds (VSCs). Owing to their low detection thresholds and their strong reactivity, VSCs significantly contribute to the quality and the typicality of many foodstuffs, particularly fermented products (wine, cheese, beer). Furthermore, some VSCs such as thiols have antioxidant properties that could also have an impact on the overall quality of the final product. Previous studies were mainly focused on the identification and aromatic characterization of the sulfur compounds involved in the flavor of these products. Meanwhile, their biosynthetic pathways are still not understood and some steps seem to be non-enzymatic. A comprehensive review of these aspects has recently been published (27).

Interest in *Kluyveromyces lactis* arose from its distinctive physiological properties compared to *S. cerevisiae*. Its “Crabtree negative” phenotype makes it as a good candidate for respiration studies and oxygen-linked regulation (37). Moreover, the ability of this species to use lactose as a carbon source has led to many studies with fundamental as well as applied objectives. *K. lactis* is one of the major yeasts in cheese. It plays a central role during the early steps of cheese making by modifying the pH of the curd and also contributes to the aromatic quality of numerous cheeses, particularly through VSC production (22, 23). Because of its important role in cheese ripening and VSC production, metabolic studies concerning the first step of methionine catabolism in *K. lactis* have been carried out. Tracing experiments done

with labeled methionine have confirmed that methionine transamination was the major pathway for the initial breakdown of methionine in *Geotrichum candidum* (2). Since there is no specific methionine aminotransferase, the expressions of branched-chain and aromatic aminotransferase-encoding genes from the *Kluyveromyces* genus were studied using a transcriptomic approach (7). Moreover, all the putative aminotransferase-encoding genes from *K. lactis* were cloned in an over-producing vector, and their effects on the production of VSCs were analyzed. *K. lactis* *ARO8.1* (*KLLA0F10021g*) and *ARO8.2* (*KLLA0A04906g*), the orthologues of the *S. cerevisiae* *ARO8* gene, encode enzymes that were found to be responsible for methionine aminotransferase activity. Transformants carrying these genes produced three times the amount of VSC as the control strain (22).

Despite the growing scientific literature concerning *K. lactis*, a general study of its sulfur metabolism is not available. Moreover, even if the catabolism of methionine by yeasts has been extensively studied using complementary approaches (biochemical (2), transcriptomic (8), gene overexpression (22)), it has never been analyzed using an industrial cheese-ripening strain of *K. lactis*.

A transcriptomic study of the carbon metabolism was carried out with a microarray containing an incomplete set of oligonucleotides to compare the properties of a lab strain to those of a cheese strain (40). The salient result was that despite the conservation of the genes studied, outstanding differences in gene expression were observed between these strains. We therefore chose to use a technological strain used in cheese manufacturing in order to obtain results potentially extendable to studies concerning cheese ecosystems.

Since hemiascomycetous yeasts are separated by considerable evolutionary distances (11), we carried out an *in silico* study of 11 organisms of this phylum beforehand so as to highlight variations in sulfur metabolism pathways (A. Hébert, S. Casaregola, and J. M. Beckerich, submitted for publication). This previous work gave us solid bases to perform a complete inventory of sulfur metabolism in *K. lactis*. To obtain a global vision of sulfur metabolism, we developed a complete DNA-microarray of *K. lactis*, as well as a new metabolomic approach. To our knowledge, this is the first time that an overview of sulfur metabolism in *K. lactis*, combining transcriptomic, metabolite profiling, and volatile compounds measurement (GC-MS), has been presented. This study provides the first global vision of sulfur metabolism in another member of the hemiascomycetous phylum.

Materials and Methods

Strain and culture conditions

The *Kluyveromyces lactis* strain (strain KL3550) supplied by Danisco (Dangé St Romain, France) was chosen for its interesting technological properties during cheese ripening. This strain was grown in a defined synthetic medium, adapted from the one described by Mansour *et al.* (31). We added NaCl at 20 g/L and pyridoxal phosphate at 0.6 mg/L. The concentrations of KH₂PO₄ and K₂HPO₄ were modified to obtain an initial pH of 7.0 (7.9 g/L and 16 g/L, respectively). To obtain a sulfur-free medium (SM), we removed methionine and cysteine. This SM was supplemented with sulfur sources as stated: 10 mM L-methionine, 1 mM L-cystine or 0.1 mM NH₃SO₄ for high concentrations, and 10 μM L-methionine, 1 μM L-cystine or 0.1 μM NH₃SO₄ for low concentrations. Cysteine, which is very reactive, can spontaneously dimerize and form cystine. We consequently used cystine instead of cysteine to improve the control of sulfur supply.

One hundred mL of the SM, supplied by sulfur substrate, were inoculated from a preculture carried out in the same medium (inoculation size = 3x10⁶ UFC.ml⁻¹). To avoid differences in the growth stage and stress inductions or limitations, we maintained the cells in an exponential phase for ten generations in a defined medium by seeding the cells in a fresh medium after two generations. Since the cells were harvested during exponential growth and at low cell density (~1.10⁷ UFC.ml⁻¹), we could thus consider that changes in medium composition were minimal during cell culture and that cells were harvested in a steady state of exponential growth. Under these conditions, the specific growth rate (0.23 h⁻¹ ± 0.014, 12 repetitions) is close to the maximum for this cheese-ripening yeast in comparison with published results (40). These precautions ensured highly reproducible growth conditions (16).

All the cultures were carried out in 500-mL flasks at 25°C with an orbital agitation (150 rpm). Three independent cultures were made for each sulfur condition. Samples for transcriptomic, metabolomic and GC-MS experiments were taken from these cultures and then stored at -80°C.

RNA isolation and labeling

Exponentially grown cells were collected and broken with glass beads in a Fastprep apparatus (Bio 101). Total RNA was then extracted by Trizol treatment (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). RNA quality was assessed with an Agilent 2100 Bioanalyser. RNA was labeled with either Alexa 555 or Alexa 647 fluorescent dye (Invitrogen) using the SuperScript

Indirect cDNA labeling system kit (Invitrogen) with anchored Oligo(dT)₂₀ primer, according to the manufacturer's recommendations. The levels of Alexa 555 and Alexa 647 incorporation were quantified by absorbance measurement.

***Kluyveromyces lactis* microarray design**

K. lactis NRRL Y-1140 genome version 3 (S. Casaregola, personal communication) was used as a reference for microarray design. Probe design was performed using ROSO (35) completed with in-house scripts. ROSO takes a number of parameters into account to design effective oligonucleotide probes: (i) uniqueness among the genomes and lack of cross-hybridization against exclusion genomes; (ii) melting temperature (T_m); (iii) lack of secondary structures; and (iv) distance from the 3' end of the gene. ROSO was run on the 5,270 candidate target genes. Our objective was to obtain one probe with a length of between 40 and 60 nucleotides per target gene. Probes have to be in exons and are preferably located at the 3' end of the gene. The genomes of *Arthrobacter aureescens* TC1, *Arthrobacter sp.* (strain FB24), *Corynebacterium glutamicum*, *Lactococcus lactis* IL1403, *Debaryomyces hansenii* CBS767, *Brevibacterium aurantiacum* ATCC9174 (formerly *B. linens*) and *Yarrowia lipolytica* CLIB99 were used as exclusion genomes, creating prospects for transcriptomic ecosystem studies. The *B. aurantiacum* genome was obtained and annotated as described by Forquin *et al.* (14). Three runs were progressively made, lowering the stringency of criteria on secondary structures and probe localization to maximize the number of probes.

There were no probes for 189 target genes (3.6%) due to their length, repetitions in the genome or composition. The microarrays were produced by Agilent (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Probes were replicated on the array to reach a final density of 15K probes per array. Three negative controls of length 40, 50 and 60 (randomly generated with the same GC% as *K. lactis* and no cross-hybridization) were also included in the array.

cDNA-array hybridization and data analysis

The expression profiles of *K. lactis* grown in the presence of various sulfur sources were analyzed using DNA microarrays (Agilent, USA). Hybridizations were performed for 17 h at 65°C in dedicated micro-chambers with 80 pmol of the different labeled samples. Dye swaps were included in the experimental design. Array scanning was carried out with a DNA-microarray scanner from Agilent in extended dynamic range (XDR), with a resolution of 5 nm per pixel. For further analysis, intensity-dependent normalization was performed with the LOESS (49) procedure followed by subtraction of the log-ratio median calculated over the values for an entire block from each individual log-ratio, using the *anapuce* package of R (10).

Differential analysis was performed with the *varmixt* package of R (10). Finally, the raw *P* values were adjusted by the Benjamini Hochberg (BH) method, which controls the family-wise error rate. We considered genes with both a *P* value ≤ 0.05 and a ratio higher than 2 to be differentially expressed.

Quantitative real-time PCR

After RNA extraction, the cDNA was synthesized using the SuperScript III first-strand synthesis system (Invitrogen) with Oligo(dT)₂₀, according to the manufacturer's recommendations. Primers were designed with LightCycler software (Roche, Mannheim, Germany) and synthesized by Eurogentec (Seraing, Belgium). The primers used are listed in Supplementary Material 1. The quantitative real-time PCR was performed using a LightCycler (Roche) and LightCycler FastStart DNA Master^{plus} SYBR Green I kit (Roche), according to the manufacturer's recommendations. In each sample, the quantity of cDNA for each gene was normalized to the quantity of the *ACT1* cDNA, which is considered to be a stably expressed gene. The relative change in gene expression was recorded as the ratio of normalized target concentrations ($\Delta\Delta ct$).

Volatile sulfur compound extraction and analysis

The volatile compounds were analyzed with a system composed of a dynamic headspace analyzer (Purge and Trap HP 3547A, Agilent Technologies) fitted with a sorbent trap (Tenax, 60 to 80 mesh, 0.25 g, 30 x 0.32 cm) and a cryofocusing module. The concentrator was coupled to a gas chromatograph (GC G1530A, Agilent Technologies) connected to a mass spectrometer detector (MSD 5973; Agilent Technologies). Five milliliters of the non-filtered culture was heated at 60°C and then purged for 15 min with high-purity helium at 15 mL.min⁻¹. The volatile compounds were concentrated by adsorption to the Tenax trap maintained at 40°C. Water was then removed by flushing the trap with helium for 3 min (dry purge). The trap was heated at 225°C for 2 min to desorb the volatile compounds, which were directly transferred at 150°C to the head of a capillary column and condensed by cryofocusing at -150°C. The condensed volatile compounds were then injected by heating (180°C) on a non-polar capillary column (HP-5MS, 30.0 m x 0.25 mm, film thickness: 0.25 μ m) flushed with high-purity helium at a constant flow (1.2 mL.min⁻¹). The oven temperature was maintained at 5°C for 8 min. The metabolites were eluted with a first linear gradient of 3°C.min⁻¹ from 5 to 20°C, followed by a second linear gradient of 10°C.min⁻¹ from 20 to 150°C. The temperature was then maintained at 150°C for 10 min. The column was directly connected to the mass-sensitive detector by an interface heated at 280°C. The electron impact energy was set at 70

eV, and data were collected in the range of 29 to 300 atomic mass units. Components were identified by their retention times and by comparison of their mass spectra with those of the Wiley275 mass spectral database (Agilent Technologies). The concentrations of each volatile compound produced were quantified using a standard curve of pure DMDS (99% purity, Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France). Measurements were made in triplicate for each concentration in the non-inoculated media, and the concentrations of volatile compounds were expressed as equivalents of DMDS in $\mu\text{g.kg}^{-1}$.

H₂S measurement

The production of H₂S was measured in each culture according to the method developed by Lopez *et al.* (28).

Extraction of intracellular metabolites

Intracellular metabolites of *K. lactis* cells were extracted as follows. Exponentially growing cells (1.10^8 yeasts) were centrifuged. The cells were washed with 20 mL of ultra-pure water to prevent contamination with SM and centrifuged again. The cells were then stored at -80°C . After the frozen cells were thawed for 15 min at 4°C , they were resuspended with 1 mL of 1% formic acid. The solution was then incubated for 10 min at 95°C and centrifuged for 30 min at 4°C . The supernatant was lyophilized and stored at -80°C .

Liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS)

Chromatographic separation was performed on a Discovery® HS-F5 (2.1x250 mm, 5 μm) from Supelco Analytical (Interchim, Montluçon, France) by using a Surveyor LC system (ThermoFisher Scientifics, Courtaboeuf, France). Before injection, samples were stored at 4°C in the autosampler tray. Separations were carried out using the following gradient at 200 $\mu\text{L}/\text{min}$: 0-3 min, 0% B; 3-20 min, from 0 to 100% B; 20-25 min, 100% B; 25-45, 0% B. Solvent A was water and solvent B was acetonitrile, both containing 0.1% formic acid. Column temperature was set to 30°C .

Mass spectrometric detection was performed using an LTQ/Orbitrap hybrid mass spectrometer (ThermoFisher Scientifics, Courtaboeuf, France) fitted with an electrospray source operated in the positive ionization mode. The detection was achieved from 75 to 1000 u at the maximum resolving power of 30000 (expressed as full width at half maximum for an ion at 400 u). The mass spectrometer was operated with capillary voltage at 4 kV and capillary temperature at 275°C . Nitrogen was used as the sheath and auxiliary gas, with pressures set at 45 and 10 (arbitrary units), respectively.

Data processing and statistical analysis for LC-MS

All data were processed using the Qualbrowser module of Xcalibur version 2.0.7 (Thermo Fisher Scientific, Les Ulis, France), and its chemical formula generator was used to provide elemental compositions. Our data processing procedure includes two steps, which consist of automatic peak detection and annotation of data sets.

Automatic peak detection. Automatic peak detection from LC/MS chromatograms was performed by using XCMS software (38), version 1.14.1 running under R version 2.8.1. The R language was installed on a Dell Eight-core Intel Xeon 3.00GHz Processor with 16 Go of RAM running Linux (Centos 5.2 x86_64). The matchedFilter algorithm was used and default values were set for all parameters except for fwhm, step, steps, mzdif, mzwid, bw and snthresh, which were set at 25, 0.01, 3, 0.1, 0.1, 5 and 3, respectively. A list of the areas of the peaks detected was generated for each sample using a combination of the retention time (RT) and the m/z ratio as an identifier. An arbitrary number was assigned to each of these RT- m/z pairs in the order of elution. The data were then combined into a single matrix by aligning peaks with the same mass-retention time pair together from each data file in the data set.

Annotation of the data sets. The data sets resulting from the XCMS process were annotated using tools developed in-house:

- The spectral database of the laboratory,
- An informatics tool for automatic query of metabolic and metabolomic public databases with the measured accurate masses,
- Mathematical and informatics tools for highlighting and grouping of the redundant information, i.e., isotope, in-source product and adduct ions. These ions were produced during the ionization process together with protonated or deprotonated ions, which were used for metabolite identification. Although informative, this type of signal redundancy slows down the identification procedure by increasing the number of variables that have to be investigated and by leading to unsuccessful database queries as well.

Commercial compounds were also analyzed at 5 $\mu\text{g/ml}$ in order to confirm metabolite identification on the bases of chromatographic retention time and MS/MS spectra similarities.

Table 1 summarizes the commercial compounds analysed and eventually detected, as well as compounds detected in our biological samples.

TABLE 1. Metabolites related to sulfur metabolism detected by LC coupled to LTQ-Orbitrap

Compound	Commercial Product	Sample
Methionine	+	+
Cystathionine	+	+
Cysteine	+	+
γ -glutamyl-cysteine	+	+
Glutathione	+	+
Cysteinylglycine	+	+
Spermine	+	+
Spermidine	+	+
Serine	+	+
<i>O</i> -acetyl-serine	+	-
KMBA	+	-
Homocysteine	+	-
S-adenosyl-homocysteine	+	-
S-adenosyl-methionine	-	-
<i>O</i> -acetyl-homoserine	/	+
5-methylthioadenosine	/	+
S-adenosyl-methioninamine	/	-
S-methylthio D-ribose 1-P	/	-
S-methylthio D-ribulose 1-P	/	-
2,3-Diketo-5-methyl-thiopentyl 1-P	/	-
1,2-Dihydroxy-3-keto-5methyl-thioptene	/	-

KMBA: keto-methyl thio butyrate, detected: +, not detected: -, product not commercially available: /.

Results

Experimental design

In order to study sulfur metabolism in the cheese-ripening yeast *Kluyveromyces lactis*, we hypothesized that, in excess of sulfur, the yeast metabolism could be oriented towards sulfur amino acid catabolism, whereas under lower sulfur concentration, biosynthesis of sulfur amino acids could be observed. Consequently, the studied yeast was grown with the different sulfur sources, methionine (M), cystine (C) and sulfate (S), at high (H) or low (L) concentrations, using the ratio 1000/1. High concentrations of methionine and cystine are close to their theoretical maximal concentrations in cheese caseins (48). Although there is no sulfate in milk, we completed this work by studying ammonium sulfate supplies in order to obtain a more complete picture of sulfur metabolism in this yeast. Because the growth of the studied strain was very weak with 10 mM of ammonium sulfate, we set the high sulfate concentration at 100 μ M while maintaining the high/low ratio (i.e., 1000/1) constant. The growth parameters appeared very similar under all the tested conditions.

This experimental design was used throughout this study for transcriptomic, metabolomic and VSC studies. To make the reading easier, we used the gene names of *S. cerevisiae* in the text, instead of the *K. lactis* orthologues. The “low level” sample was taken as the control to compare gene expression between sulfur catabolism versus anabolism by calculating the HM/LM, HC/LC or HS/LS ratios. These notations were used in the following text.

Modulation of gene expression according to sulfur supply

Regardless of the sulfur source, genes involved in sulfur metabolism represent 19.8% of the less expressed genes under high sulfur conditions (Supplementary Material 2). This result indicates that the yeast restricts sulfur assimilation and anabolism under conditions of sulfur excess. It is essential to note that one third of the genes differentially expressed in this study encodes for unknown or poorly defined functions in *K. lactis*, like in the model yeast *S. cerevisiae*. Since growth of *Kluyveromyces lactis* is the same in all the experiments (see Materials and Methods, Strain and culture conditions), we can reasonably assume that this yeast was not in conditions of limitation or inhibition. Table 2 provides a summary of all the sulfur metabolism genes, including the sulfur related genes, differentially expressed under at least one of our experimental conditions. We can see on Table 2 that the main effect is obtained with methionine. Thirty-one sulfur metabolism genes are differentially expressed in methionine, compared to 13 and 8 genes in sulfate and cystine, respectively. We therefore first focused the presentation of our results on methionine conditions. The validation of the transcriptomic experiment by qPCR is available in Supplementary Material 1.

Methionine (HM/LM)

Under high methionine (HM) supplementation conditions, numerous genes encoding transporters are highly repressed (Table 2), especially high affinity transporters of methionine (*MUPI*), cysteine (*YCT1*) and sulfate (*SUL1-SUL2*). Furthermore, genes of less specific transporters (*GAPI* and *OPT1*), which are a general amino acid transporter and an oligopeptide/glutathione transporter, respectively, are also repressed. *DUR3*, a gene encoding a transporter of urea and polyamines is also repressed.

We also observed that under HM supplementation conditions, numerous genes involved in sulfate assimilation are repressed (Table 2). Concerning the first step of sulfate activation, the two genes, *MET3* and *MET14*, encoding an ATP sulfurylase and an APS kinase, respectively, are strongly repressed. Moreover, the *MET22* gene encoding the enzyme responsible for the inverse reaction of APS kinase is also repressed to a lesser extent. Regarding the following sulfate reduction stage, the *MET16* gene encoding a PAPS reductase is repressed. The next enzymatic step is carried out by a sulfite reductase, which is a heterodimer encoded by *MET5/MET10*. Only *MET10* is repressed in HM. We can also observe that sulfite reductase requires siroheme to be functional, and that *MET1*, whose product is involved in siroheme biosynthesis, is repressed in HM. The sulfur metabolism interacts with aspartate metabolism

through homoserine production, which is the last common intermediate of sulfur and threonine metabolism. *HOM2*, the second of the three genes involved in homoserine production, is repressed in HM, just like *MET2* that encodes a homoserine-*O*-acetyltransferase. This last enzyme synthesizes *O*-acetyl-homoserine (OAH). The next reaction, leading to homocysteine production (precursor of methionine and cysteine), is not under transcriptional regulation under our conditions.

Methionine leads to the production of *S*-adenosyl-methionine (SAM) via the methyl cycle. The two genes involved in the synthesis of these two compounds are repressed in HM (*MET6* and *SAM1-SAM2*, respectively). Moreover, we observed the repression of *ADII*, encoding an enzyme of the methionine salvage pathway. This pathway was recently extensively defined in *S. cerevisiae* by Pirkov *et al.* (26).

We observed that *CYS3* and *STR3*, involved in reverse and direct transsulfuration, respectively, are repressed in HM. These two genes encode enzymes that catalyze the conversion of cystathionine to cysteine (*CYS3*) or homocysteine (*STR3*), respectively. Cysteine and homocysteine are reactive molecules that are involved in sulfur metabolism regulation as well. We also observed the repression of two genes involved in serine biosynthesis, *SER33* and *SER1*. Serine is required for cysteine synthesis via two described pathways (transsulfuration and the OAS pathway). The transsulfuration pathway plays an important role, modulating the fluxes to the methyl cycle and to glutathione metabolism. *GSH1*, encoding a gamma glutamylcysteine synthetase, is repressed in HM. This enzyme is responsible for the first step of glutathione synthesis. This is in agreement with our observations of *CYS3* regulation. A novel complex (encoded by *DUG1*, *DUG2* and *DUG3*) involved in the catabolism of intermediates of the glutathione pathway has recently been identified (15, 24). *DUG2* and *DUG3*, which are repressed in HM, are necessary for γ -glutamylcysteine utilization as a sulfur source, together with *DUG1*. On the contrary, *DUG1*, which is not regulated in HM, is involved in glutathione and cysteinylglycine catabolism, without the intervention of *DUG2* and *DUG3*.

We observed that the genes involved in sulfur metabolism are mainly repressed. We investigated the overexpression of aminotransferases possibly involved in methionine catabolism. In light of our results, only one of all the candidate genes seems to be particularly interesting. This gene (*KLLA0A04906g*), encoding an aromatic amino acid aminotransferase, is overexpressed in HM (Table 2).

<i>S. cerevisiae</i> gene name	<i>K. lactis</i> gene name	Ratio Met	p value Met	Ratio Sul	p value Sul	Ratio Cys	p value Cys	Function
TRANSPORTERS RELATED TO SULFUR METABOLISM								
MUP1	KLLA0B13233g	0.16	0	0.45	5.13E-04	-	-	High affinity methionine permease
YCT1	KLLA0C18678g	0.29	5.66E-09	0.40	2.80E-05	-	-	High-affinity cysteine-specific transporter with similarity to the Dal5p family
SUL1-SUL2	KLLA0F19338g	0.08	0	0.31	1.05E-06	-	-	High affinity sulfate permease
DUR3	KLLA0C18909g	0.12	0	0.24	2.48E-09	-	-	Plasma membrane transporter for both urea and polyamines
GAP1	KLLA0A06886g	0.47	1.41E-03	-	-	-	-	General amino acid permease
OPT1	KLLA0E00397g	0.21	8.72E-14	-	-	-	-	Oligopeptide transporter. Also transport glutathione.
OPT2	KLLA0D15378g	-	-	-	-	0.34	4.67E-05	Oligopeptide transporter
SEO1	KLLA0D12716g	-	-	-	-	2.40	2.57E-03	Putative allantoinase permease, mutation confers resistance to ethionine sulfoxide
SULFUR METABOLISM								
MET14	KLLA0B13321g	0.05	0	0.49	1.80E-02	2.86	2.17E-03	Adenylylsulfate kinase
MET3	KLLA0E09835g	0.08	0	0.32	2.02E-06	-	-	ATP sulfurylase
GSH1	KLLA0F14058g	0.40	2.18E-04	0.50	1.40E-03	-	-	Gamma glutamylcysteine synthetase
MET2	KLLA0C02013g	0.16	0	-	-	2.09	1.82E-02	L-homoserine-O-acetyltransferase
MET22	KLLA0F24728g	0.46	3.20E-04	-	-	-	-	Bisphosphate-3'-nucleotidase
MET16	KLLA0B10692g	0.44	2.23E-04	-	-	-	-	3'-phosphoadenylylsulfate reductase
MET1	KLLA0F16170g	0.27	1.15E-10	-	-	-	-	uroporphyrin-III C-methyltransferase
MET10	KLLA0D15983g	0.11	0	-	-	-	-	Subunit alpha of assimilatory sulfite reductase
HOM2	KLLA0D16731g	0.42	1.78E-04	-	-	-	-	Aspartic beta semi-aldehyde dehydrogenase
MET6	KLLA0E20065g	0.20	1.11E-09	-	-	-	-	Cobalamin-independent methionine synthase
STR3	KLLA0C17028g	0.47	1.41E-03	-	-	-	-	Cystathionine beta-lyase
CYS3	KLLA0F07909g	0.22	1.13E-12	-	-	-	-	Cystathionine gamma-lyase
SAM1-SAM2	KLLA0C01782g	0.32	1.13E-04	-	-	-	-	S-adenosylmethionine synthetase
ADI1	KLLA0D14487g	0.32	6.30E-07	-	-	-	-	Acireductone dioxygenase
DUG2	KLLA0F01991g	0.49	1.72E-03	-	-	-	-	Probable di- and tri- peptidase, forms a complex with Dug1p and Dug3p to degrade glutathione and others peptides containing a gamma-glu-X bond
DUG3	KLLA0D08668g	0.33	1.37E-06	-	-	-	-	Probable glutamine amidotransferase, forms a complex with Dug1p and Dug2p to degrade glutathione and others peptides containing a gamma-glu-X bond
SER33	KLLA0C09306g	0.25	3.92E-11	-	-	-	-	3-phosphoglycerate dehydrogenase: serine and glycine biosynthesis
SER1	KLLA0C04818g	0.41	1.12E-04	-	-	-	-	3-phosphoserine aminotransferase: serine and glycine biosynthesis
CYS4	KLLA0F09317g	-	-	0.50	1.80E-02	-	-	Cystathionine beta-synthase
SAH1	KLLA0A01199g	-	-	-	-	0.36	1.10E-03	S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase
SULFUR RELATED GENES								
YIL166C	KLLA0F09405g	0.26	1.07E-09	0.25	2.01E-09	-	-	similarity to the allantoinase permease
YHR112c	KLLA0E21319g	0.23	4.67E-12	0.42	3.28E-04	0.49	1.44E-02	Protein of unknown function, similarity with CYS3, STR3, MET17 and STR2
JLP1	KLLA0E14433g	0.30	1.37E-07	0.39	7.76E-05	-	-	Fe(II)-dependent sulfonate/alpha-ketoglutarate dioxygenase: sulfonates catabolism
JLP1	KLLA0F26158g	0.09	8.72E-14	0.19	1.52E-12	-	-	Flavin-containing monooxygenase, catalyses oxidation of biological thiols to maintain the ER redox ratio for correct folding of disulfide-bonded proteins
FMO1	KLLA0B14619g	0.15	0	0.39	9.57E-05	-	-	Protein of unknown function, possible role in glutathione metabolism
GTT3	KLLA0A11396g	-	-	-	-	0.40	1.13E-03	Hydroperoxide and superoxide-radical responsive heat-stable glutathione-dependent disulfide oxidoreductase
GRX1	KLLA0C01298g	-	-	-	-	2.03	2.11E-02	
GENES POTENTIALLY INVOLVED IN METHIONINE CATABOLISM								
ARO8	KLLA0A04906g	4.80	3.51E-11	-	-	-	-	Aromatic aminotransferase I
PDR12	KLLA0B09702g	2.41	5.60E-04	-	-	-	-	Plasma membrane ATP-binding cassette (ABC) transporter

Ratio Met: High/Low Methionine; Ratio Sul: High/Low Sulfate; Ratio Cys: High /Low Cystine

TABLE 2. Transcriptomic response of *K. lactis* to sulfur supply

Sulfate (HS/LS)

Under sulfate supplementation conditions, we observed an expression pattern of genes involved in sulfur metabolism that was quite similar to the one observed under methionine supplementation conditions. In fact, less genes involved in sulfur metabolism are repressed and with a lower intensity. With the exception of the less specific transporters encoded by *OPT1* and *GAP1*, the same genes encoding transporters are repressed. We also observed a repression of two genes involved in sulfate activation (*MET3*, *MET14*), while others are not differentially expressed. This regulation could be necessary to reduce the production of toxic molecules (APS, PAPS) in HS. The only gene involved in sulfur metabolism that is regulated in sulfate and not in methionine is *CYS4*, encoding a cystathionine β -synthase. This gene is repressed in HS, together with *GSH1*, suggesting a regulation of the sulfur flux directed towards cysteine and glutathione.

Cystine (HC/LC)

The cystine supplementation condition presents an expression pattern of genes involved in sulfur metabolism that is very different from methionine and sulfate. Contrary to the two other sulfur sources, we observed an overexpression of *MET14* and *MET2* in HC. *MET2* could be overexpressed to increase the flux of *O*-acetyl-homoserine and, consequently, the sulfur flux towards homocysteine and/or cystathionine. *SAH1*, encoding the last enzyme of the methyl cycle, is also repressed in HC. The transporters regulated in cystine are different from those regulated in methionine and sulfate. *OPT2*, encoding an oligopeptide transporter, is repressed in HC, while *SEO1*, encoding a poorly defined transporter of the allantoin family, is overexpressed. It is surprising to observe the lack of regulation concerning genes encoding specific sulfur transporters. This could be due to a poor assimilation of cystine by the cell.

Volatile sulfur compounds and intracellular sulfur metabolites

The production of VSCs was quantified using gas chromatography coupled to mass spectrometry. The major VSC observed is dimethyl disulfide (DMDS), which is produced under all of the tested conditions. However, its production is on average 27-fold higher in HM. In accordance with this result, we only observed dimethyl trisulfide (DMTS) and hydrogen sulfide (H₂S) in HM (Table 3).

COMPOUND ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Ratio Met	Ratio Sul	Ratio Cys	HM	LM	HS	LS	HC	LC
DMS	25.7	n.s.	n.s.	11.57 ± 0.35	0.45 ± 0.07	0.77 ± 0.08	0.90 ± 0.03	0.29 ± 0.05	0.27 ± 0.05
DMTS	-	-	-	0.73 ± 0.54	-	-	-	-	-
H ₂ S ^a	-	-	-	14.32 ± 0.65	-	-	-	-	-

^a in mg/kg. H: high; L: low; M: methionine; S:sulfate; C: cystine. Ratio Met: HM/LM; Ratio Sul: HS/LS; Ratio Cys: HC/LC

Results are the mean values \pm the standard errors of the means of the results from three independent cultures.

TABLE 3. Production of volatile sulfur compounds depending on sulfur supply

The metabolite profiling analyses were performed with an LC coupled to an LTQ-Orbitrap mass spectrometer fitted with an electrospray source. The LTQ-Orbitrap accurately measures molecular mass and discriminates the isobaric ions, thereby improving the determination of the elemental composition of ions and identification procedures. In the course of this study, we decided to interpret the data in a targeted way, by focusing on metabolites involved in the sulfur metabolism pathways. To do this, ions related to metabolites of interest were taken from the data matrices generated by the peak detection software and further annotated using our procedures (see the Materials and Methods section for more details).

A list of metabolites of interest is given in Table 1, which also summarizes the detection of sulfur intermediates in samples and their availability as commercial references. Some commercially-available metabolites were detected but never observed and, consequently, not accumulated in our samples. This was the case for homocysteine, *S*-adenosyl-homocysteine, *O*-acetyl-serine and KMBA. With the experimental protocol utilized, the *S*-adenosylmethionine pool was neither detected in the commercial compound solution nor in our samples. Moreover, variations in the SAM pool are very difficult to discuss. In fact, SAM can be stored as a "sulfur reservoir" in the vacuole (21). Moreover, a large variation of the SAM pool in *S. cerevisiae* only has a low impact on the cellular physiology (6). The presence of some intermediaries, not commercially available, has been investigated. However, only two of them, *O*-acetyl-homoserine and 5-methylthioadenosine, were identified in our samples. Their identities were confirmed by MS-MS. Data concerning intermediates of sulfur metabolism are given in Table 4. These data will be further reported and discussed throughout the paper.

COMPOUND	AREA						RATIO		
	HM	LM	HS	LS	HC	LC	Met	Sul	Cys
<i>O</i> -acetyl-homoserine	8.26E+05 [7.30; 9.63]E+05	4.82E+06 [3.91; 6.19]E+06	5.21E+05 [3.57; 6.40]E+05	2.80E+06 [2.27; 3.13]E+06	1.50E+06 [0.87; 2.19]E+06	1.68E+06 [1.41; 2.02]E+06	0.17	0.19	n.s.
Methionine	1.64E+08 [1.35; 1.84]E+08	2.68E+07 [1.87; 3.48]E+07	1.47E+07 [0.93; 2.03]E+07	2.34E+07 [1.97; 2.58]E+07	2.79E+07 [2.66; 3.00]E+07	3.10E+07 [2.37; 3.71]E+07	6.12	n.s.	n.s.
5-methylthioadenosine	2.14E+09 [2.05; 2.19]E+09	2.65E+08 [2.34; 3.02]E+08	2.04E+08 [1.64; 2.43]E+08	2.40E+08 [2.10; 2.57]E+08	2.90E+08 [2.80; 2.94]E+08	2.68E+08 [2.44; 2.87]E+08	8.09	n.s.	n.s.
Spermine	1.55E+07 [1.86; 2.78]E+07	1.70E+06 [0.01; 4.26]E+06	-	-	-	-	13.62	-	-
Spermidine	3.89E+07 [3.51; 4.34]E+07	4.85E+07 [4.31; 5.44]E+07	4.01E+07 [3.14; 4.86]E+07	5.87E+07 [5.71; 6.00]E+07	5.33E+07 [4.79; 5.97]	4.43E+07 [3.47; 5.15]E+07	n.s.	0.68	n.s.
Cystathionine	7.83E+07 [6.88; 8.74]E+07	3.52E+06 [2.41; 4.74]E+06	4.32E+06 [2.94; 5.48]E+06	4.71E+06 [3.84; 5.27]E+06	4.13E+06 [3.86; 4.42]E+06	4.92E+06 [4.12; 5.54]E+06	22.50	n.s.	n.s.
Cysteine	4.44E+06 [3.49; 6.11]E+06	1.05E+06 [0.99; 1.12]E+06	1.02E+06 [0.74; 1.37]E+06	1.44E+06 [1.32; 1.66]E+06	1.07E+06 [0.98; 1.26]E+06	1.35E+06 [1.31; 1.39]E+06	4.24	n.s.	0.79
γ -glutamyl-cysteine	1.04E+07 [0.84; 1.25]E+07	2.84E+06 [2.08; 3.49]E+06	1.89E+06 [1.04; 2.52]E+06	3.77E+06 [3.19; 4.08]E+06	3.23E+06 [3.09; 3.34]E+06	4.02E+06 [3.45; 4.34]E+06	3.66	0.50	0.80
Glutathione	2.40E+08 [2.06; 2.78]E+08	1.45E+08 [1.09; 1.67]E+08	9.08E+07 [5.07; 11.56]E+07	1.66E+08 [1.33; 1.95]E+08	1.84E+08 [1.80; 1.87]E+08	1.92E+08 [1.60; 2.10]E+08	1.65	0.55	n.s.
Cysteinylglycine	2.15E+07 [1.76; 2.68]E+07	9.97E+06 [0.72; 1.15]E+07	6.51E+06 [3.50; 8.56]E+06	1.50E+07 [1.21; 1.74]E+07	1.46E+07 [1.40; 1.51]E+07	1.60E+07 [1.27; 1.79]E+07	2.16	0.43	n.s.
Serine	1.13E+07 [0.96; 1.28]E+07	4.17E+07 [3.14; 4.76]E+07	2.42E+07 [1.81; 3.01]E+07	4.84E+07 [4.34; 5.21]E+07	4.15E+07 [3.89; 4.42]E+07	6.22E+07 [5.05; 7.07]E+07	0.27	0.50	0.67

H: high; L: low; M: methionine; S:sulfate; C: cystine. Ratio Met: HM/LM; Ratio Sul: HS/LS; Ratio Cys: HC/LC. The areas indicated are means of three independent experiments. Extreme values are indicated in bracket.

TABLE 4. Metabolomic response of *K. lactis* to sulfur supply

Methionine

Under HM supplementation conditions, some sulfur intermediates are highly accumulated, of which cystathionine is the major one (HM/LM ratio: 22.5) (Table 4).

We observed that the intracellular pool of methionine is six-fold higher in HM than in LM. The concentrations of intermediates of glutathione metabolism are also increased by factors of 1.6 to 4 in HM (4.24 for cysteine, 3.66 for γ -glutamylcysteine, 1.65 for glutathione and 2.16 for cysteinylglycine), compared to LM supplementation conditions. Furthermore, pools of 5-methylthioadenosine and spermine, which are produced during polyamine biosynthesis, were significantly increased under HM supplementation conditions by factors of 8.09 and 13.62, respectively. It can be observed that spermine is only detected under methionine supplementation conditions. On the contrary, the concentrations of *O*-acetyl-homoserine and serine pools, which are related to sulfur metabolism, are decreased in HM.

By taking the differences of electrospray ionization recoveries observed for the sulfur reference compounds of interest (data not shown) into account, we can assume that under HM conditions, the intracellular concentration of cystathionine in our samples is considerably higher than that of all of the other sulfur compounds detected, except for glutathione. Furthermore, even if the cysteine pool increased under HM conditions, its concentration remained lower than that of methionine, cystathionine and glutathione.

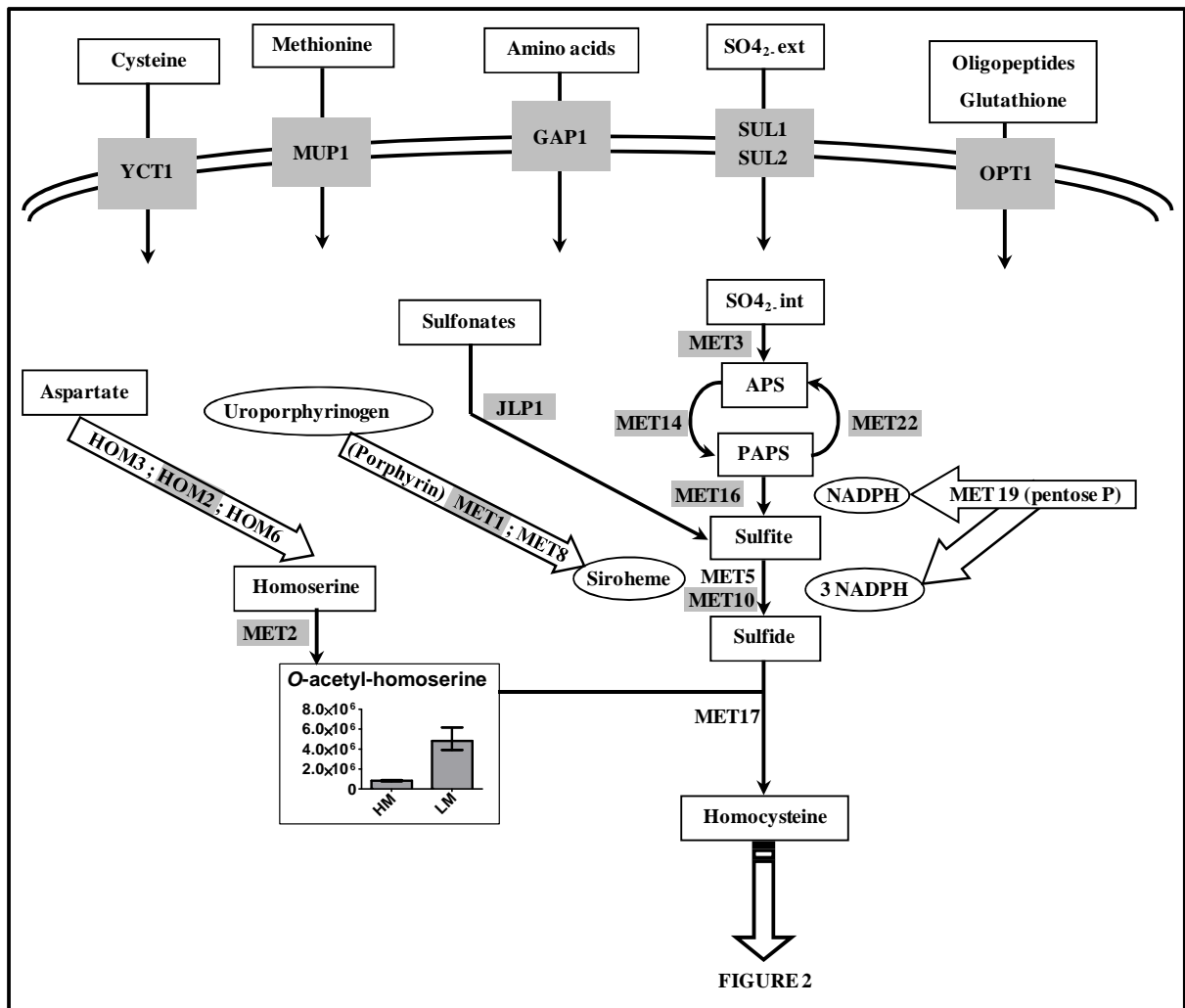
Sulfate and cystine

Metabolomic results clearly demonstrate that the intracellular concentrations of sulfur intermediates were less modified in cystine and sulfate than under methionine supplementation conditions (Table 4). Finally, the variations of metabolite concentrations observed under these conditions are less pronounced than those obtained with the two other supplementation conditions (i.e., HC/LC and HS/LS ratios < 1), highlighting the particular state of sulfur metabolism induced by methionine supply.

Discussion

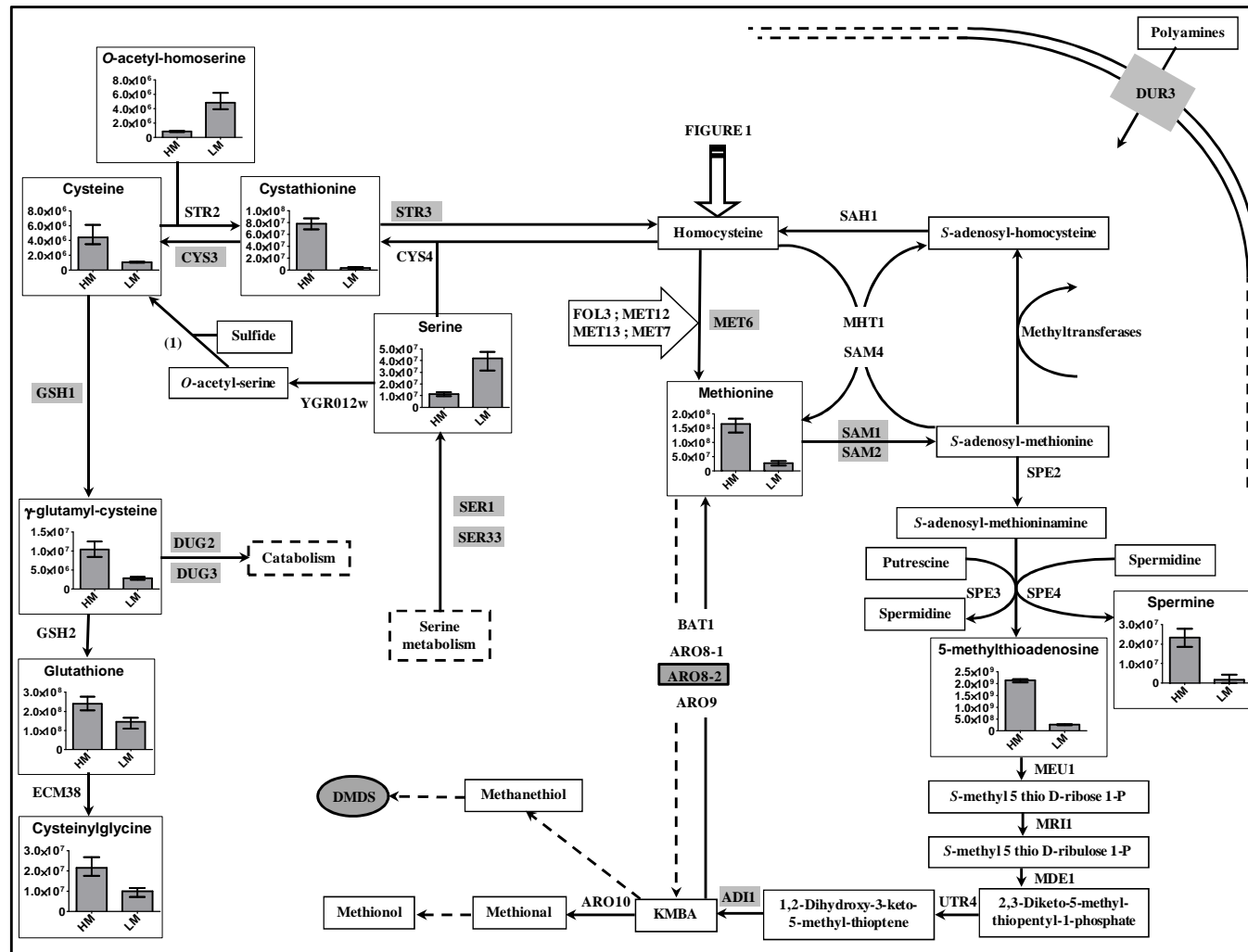
Methionine supply deeply modifies sulfur metabolism in *K. lactis*

In order to provide a global vision of sulfur metabolism of the yeast *K. lactis*, we have summarized the results obtained in methionine (HM/LM) in two diagrams (Fig. 1 and Fig. 2).



Genes underlined in gray are repressed in high methionine
 Genes in black boxes and underlined in gray are overexpressed in high methionine
 Error bars in histograms represent extremes values

FIGURE 1. Overview of sulfur metabolism in *K. lactis* in high versus low methionine (part 1: transport and sulfur sources utilization)



(1) Serine-*O*-acetyl-transferase. The gene encoding this enzyme is absent in *S. cerevisiae*.

Genes underlined in gray are repressed in high methionine ; Genes in black boxes and underlined in gray are overexpressed in high methionine

The reactions realized by not identified or an assortment of enzymes are indicated with dotted arrows.

VSCs more produced in high methionine are surrounded in black and underlined in gray. Values and error bars in histograms represent means with extremes values

FIGURE 2. Overview of sulfur metabolism in *K. lactis* in high versus low methionine (part 2: organic and volatile sulfur compounds synthesis)

The genes represented in these diagrams that are not differentially expressed under at least one of our six conditions are listed in Supplementary Material 3. As shown in Fig. 1, genes involved in the transport and utilization of many sulfur sources (sulfate, cysteine, methionine, glutathione, sulfonates) are repressed in HM. In the well-studied yeast *S. cerevisiae*, it was determined that the genes involved in sulfur metabolism are mainly regulated by the cell's cysteine pool (17). In our case, the intracellular pools of various sulfur intermediates, including cysteine, increased in HM (Fig. 2), leading us to look for one or several effectors of the observed transcriptomic repression.

It was surprising to observe repression of the genes, *MET14* and *MET22*, involved in the APS-PAPS cycle (Fig. 1), since these two genes encode opposite activities. It is known that this cycle is necessary to regulate PAPS production, which is toxic when accumulated (34). When *MET22* is deleted, *S. cerevisiae* cannot use sulfate, sulfite or sulfide as sulfur sources. However, the mutant has wild-type activities of the enzymes involved in sulfate assimilation and sulfur uptake (41, 42). The absence of sulfite utilization in the *met22* mutant is difficult to explain. However, the hypothesis of a protein complex involved in sulfate assimilation could explain both the absence of growth in sulfite for the *met22* mutant and the repression of two genes encoding opposite activities (32). The fact that *MET14* is more repressed than *MET22* in HM could be due to co-regulation of the APS-PAPS cycle and regulation of the proportion of the partners involved in the hypothetical complex.

The dramatic decrease in the intracellular pool of *O*-acetyl-homoserine in HM could be related to the repression of *MET2* and *HOM2* (Fig. 1). We observed that the serine pool is particularly low in HM compared to all other tested conditions. This can be logically related to the repression of genes involved in serine biosynthesis (Fig. 2).

Considering the reverse and direct transsulfuration, the considerable accumulation of cystathionine should be noted since it correlates perfectly with the repression of *CYS3* and *STR3* genes. Furthermore, since its concentration is somewhat higher than the other sulfur compounds (except for glutathione), its accumulation could be due to the fact that it is less reactive and less toxic for microbial cells in comparison with its direct products, i.e., cysteine and homocysteine. Consequently, cystathionine could be the sulfur reservoir in the event of sulfur “flood”, at no risk to the cell.

As a result of the ESI efficiencies obtained with reference products, we can assume that the glutathione pool is the biggest sulfur pool, regardless of the conditions. Meanwhile, if the glutathione pool is increased under HM conditions, its concentration remains relatively stable.

It is known that this pool is strongly regulated in *S. cerevisiae*. The regulation of glutathione synthesis, mediated through *GSH1* expression, depends on the gene regulator involved in sulfur metabolism encoded by *MET4*, as well as on a regulator that mediates the response to oxidative stress (encoded by *YAP1*) (47). It was also shown that the glutathione pool directly represses *GSH1* expression (46). This accurate regulation system leads to an adapted production of glutathione in response to oxidative or toxic metal stress (44). The stability of the glutathione pool under our conditions suggests that the cells are neither stressed nor in sulfur starvation conditions.

Concerning sulfate and cystine, we observed that many genes encoding ribosomal proteins are repressed in LS and LC, indicating a dramatic reduction in translation. Therefore, the transcriptomic analysis revealed that, despite the same exponential growth rate, the cells seem to anticipate a hypothetical starvation stress that slowed down their protein synthesis apparatus. This observation reinforces the view that the *K. lactis* strain 3550 would not be adapted to these two sulfur substrates. This could be a specific adaptation of this technological strain to milk where sulfate is absent and cystine is poorly accessible.

The catabolism of methionine and, consequently, VSC production is discussed in the next section.

Metabolism of KMBA and VSC production

The catabolism of methionine in *K. lactis* seems to be closely linked to the overexpression of the gene *ARO8-2* (*KLLA0A04906g*) encoding aminotransferase. This result is in good agreement with data from Kagli *et al.* (22), although the strain used and the culture conditions were different. In their study, all the putative aminotransferase-encoding genes from *K. lactis* were cloned and their effects on the production of VSCs were analyzed. Two genes, *KIARO8.1* and *KIARO8.2*, were found to be responsible for L-methionine aminotransferase activity and their overexpression led to a three-fold increase in VSC production.

Methionine catabolism has also been investigated in the yeast *Yarrowia lipolytica* (8). The *BAT1*, *BAT2* and *ARO8* genes, encoding aminotransferases, are overexpressed in high methionine concentrations. In our experiment, the branched-chain amino acid aminotransferase expression levels were not modified in *K. lactis*.

Considering the following pathways, the transamination of methionine leads to KMBA whose pool is never accumulated in the cells under our culture conditions. Meanwhile, we

observed the high production of VSCs, the main products of KMBA degradation in yeasts, under HM conditions.

Extracellular accumulation of KMBA was largely observed in previous works (23). In our case, the overexpression of the gene *KLLA0B9702g* (*PDR12* in *S. cerevisiae*), coding for a carrier of long-chain acids (18), leads us to suppose that KMBA, which is potentially toxic, would be actively exported. KMBA can then be degraded on different VSCs, depending on the physicochemical properties of the extracellular medium (pH, redox, ionic strength). Under our conditions, KMBA was mainly degraded into methanethiol and DMDS. KMBA could then be converted into methional and methionol, like in beer, or into 3-methylthiopropionic acid, like in wine (27). The importance of microbial versus chemical reaction in the degradation of KMBA has not yet been determined. In our case, the absence of the accumulation of KMBA in cells and the overexpression of *KLLA0B9702g* has given us new insights into VSC production by *K. lactis*. In this yeast, the first transamination step of methionine and KMBA excretion should be the main microbial steps for VSC production.

Taken together, these results suggest that *ARO8-2* and *KLLA0B9702g* could consequently be good candidates to evaluate the capacity of *K. lactis* strains to produce VSCs using, for example, Quantitative RT-PCR.

It has been demonstrated that cysteine catabolism was important for H₂S production (28) and VSC diversity (29). In our case, cystine instead of cysteine supply gives very different results. It could be interesting to investigate and compare the mechanisms of cysteine and cystine assimilation and catabolism.

This study also revealed other genes that could be involved in sulfur metabolism. The whys and wherefores are discussed below.

Genes potentially related to sulfur metabolism

This global study of sulfur metabolism has revealed the repression of *YIL166C*, encoding a poorly defined transporter. This transporter belongs to the complex allantoate transporter family, including the recently defined high-affinity cysteine transporter (encoded by *YCT1*) (19, 25). These results are in agreement with those of Boer *et al.* (5), who identified *YIL166c* in *S. cerevisiae* as a gene induced under sulfur limitation. These observations suggest that this transporter could be linked to sulfur metabolism.

We observed the repression of a poorly defined gene in high sulfur concentrations

(*KLLA0E21319g*). The *S. cerevisiae* orthologue, which has been poorly studied up until now, presents sequence similarities with other genes related to sulfur metabolism (*CYS3*, *MET17*, *STR2* and *STR3*). Its sequence similarity with genes involved in sulfur metabolism suggests its involvement in sulfur metabolism. Hansen *et al.* (17) have already disrupted this gene in *S. cerevisiae*. The mutant strain is able to grow on methionine, glutathione or cystathionine. No function has yet been attributed to the product of this gene. These difficulties may be due to the high sequence similarities with four other genes involved in sulfur metabolism. The overexpression of this gene could provide new insights into sulfur metabolism, as was the case for branched-chain and aromatic amino acid aminotransferase studies (22).

In *S. cerevisiae*, *JLP1* encodes a sulfonate/alpha-ketoglutarate dioxygenase (20) involved in sulfonates catabolism (45), which is overexpressed in sulfur starvation (50). Our results support these observations since the two orthologues of *JLP1* in *K. lactis* are repressed in HM.

Three poorly studied genes in *S. cerevisiae* are regulated in *K. lactis*: (i) *FMO1*, which is repressed in HM and HS; and (ii) *GTT3* and *GRX1*, which are repressed and overexpressed, respectively, in HC (Table 2). The enzymes encoded by *GTT3*, *GRX1* and *FMO1* are involved in glutathione metabolism (36), defense against oxidative stress (30) and folding of disulfide-bond proteins in endoplasmic reticulum (39), respectively. Their precise role in sulfur metabolism remains to be determined.

Regulation of sulfur metabolism in yeasts

Under sulfur limitation, Boer *et al.* (5) observed the induction of numerous sulfur-related transporters in *S. cerevisiae*, as well as the induction of genes involved in sulfate and sulfonate utilization. The investigation of the transcriptional response of *S. cerevisiae* to six nitrogen sources (4) has revealed that genes involved in sulfur metabolism (sulfate assimilation, transporters and regulators) are specifically repressed in methionine. Three amino acids, including methionine, induce the expression of genes involved in the Ehrlich pathway (*ARO9*, *ARO10*) and the export of long-chain acids produced (*PDR12*). An overview of *S. cerevisiae* metabolism, combining 170 chemostats and 55 cultures conditions, has been investigated by transcriptomics (26). In this study, results demonstrate that sulfur starvation leads to strong overexpression of sulfur assimilation genes, while methionine supply leads to the repression of these genes. These results, as well as ours, suggest that a similar sulfur regulation system could exist in *S. cerevisiae* and *K. lactis*. However, it should be noted that the set of genes regulated in *S. cerevisiae* and *K. lactis* are slightly different. For example, the

genes *HOM3* and *HOM6* of the homoserine synthesis pathway from aspartate are regulated in *S. cerevisiae*, while the target gene is *HOM2* in *K. lactis*.

Considering the specific behavior of the yeast *K. lactis*, its defective growth under high sulfate concentrations could indicate a weak regulation of sulfate assimilation and an accumulation of toxic intermediates such as PAPS or sulfite. Despite the fact that enzymes involved in this pathway are highly conserved in yeasts, Cordente *et al.* (9) established that punctual mutations are sufficient to modify sulfite reductase activity. This implies that one enzyme of the sulfate assimilation pathway could have a modified activity that leads to toxic intermediate accumulation. Aranda *et al.* (1) demonstrated that sulfite resistance in the wine yeast *S. cerevisiae* is related to both sulfur and adenine metabolism. The sensitivity to sulfur of *K. lactis* could be explained by a non-functional exporter of sulfite, which is of primary importance in *S. cerevisiae* (3).

It could be interesting to determine if this phenomenon is due to an adaptation of our technological strain to its environment. In fact, due to the lack of sulfate in milk and cheeses, there is no selective pressure that would allow the conservation of active enzymes involved in sulfate utilization. This could consequently lead to a defective sulfate assimilation pathway in *K. lactis* strains isolated from cheeses.

Finally, it is important to keep in mind that transcriptomic studies exclude all genes with constitutive expression. Since genes involved in sulfur amino acid catabolism could not be related to sulfur metabolism (22), their regulation by sulfur supply remains hypothetical. The study of QTL characters would be a good strategy to investigate genes involved in VSC production.

Acknowledgments

This work was supported by the EcoMet program (ANR-06-PNRA-014) funded by the French National Research Agency (ANR). AH and MPF are grateful to the ANR (French National Research Agency: www.agence-nationale-recherche.fr <<http://www.agence-nationale-recherche.fr/>>) for a PhD scholarship. We would also like to thank Armelle Delile, Roselyne Tâche and Emmanuelle Rebours for their helpful technical assistance.

Supplementary material

Oligonucleotides	<i>S. cerevisiae</i> gene name	<i>K. lactis</i> gene name	Ratio Met	Ratio Sul	Ratio Cys
CAGAACAAAGAGATCCTAAAGGT_F TAAGAGCACATTCTCAACTGAC_R	MET14	KLLA0B13321g	0.01 ± 0.01	0.19 ± 0.07	3.17 ± 0.23
TCGGTGAAGGGTATCATGG_F CCGTACGGGTAACTGG_R	YHR112c	KLLA0E21319g	0.43 ± 0.09	0.39 ± 0.18	n.v.
TACGCTGAGGAATACGGC_F CCGTACGGGTAACTGG_R	JLP1	KLLA0F26158g	0.03 ± 0.02	0.00 ± 0.00	-
TATAGCATGTGTTATTGGTGGTTC_F CCCATCAAGATACTTCGGG_R	MET2	KLLA0C02013g	0.46 ± 0.13	-	2.91 ± 0.55
TGGACTGCTACGAATTTGG_F GGAATTAATCACAATTCTTGCTCCTA_R	DUG2	KLLA0F01991g	0.32 ± 0.07	-	-
ACCAACTGTCATCCTTTTCAC_F CTCAGAGGCTGGATCGT_R	DUG3	KLLA0D08668g	0.31 ± 0.06	-	-
GTTGGCATGTTCTTCCTGGT_F CGTTCTGCATCTTCTCAGCA_R	ARO8	KLLA0A04906g	19.07 ± 6.15	-	-
TACGTCTATCCAAGCTGT_F TATCTCTACCAGCCAAGTCG_R	ACT1	KLLA0D05357g	-	-	-

Ratio Met: high/low methionine; Ratio Sul: high/low sulfate; Ratio Cys: high /low cystine; n.v.: not validated.

Values indicated are means of three experiments, with ecart-type.

SUPPLEMENTARY MATERIAL 1. Validation of transcriptomic results by quantitative PCR

A.

Genes differentially expressed	-	+
73 genes in HM/LM	57	16
89 genes in HS/LS	30	59
159 genes in HC/LC	26	123

H: high; L: low; M: methionine; S:sulfate; C: cystine.

B.

Genes differentially expressed	244	
	96* -	145* +
Unknown / Poorly defined	26.0%	33.1%
Miscellaneous metabolism	20.8%*	8.3%*
Sulfur metabolism	19.8%*	0.0%*
Transport	6.3%	2.1%
Protein biosynthesis related	6.3%	21.4%
Cell organization	5.2%	13.1%
Stress	4.2%	2.8%
Sulfur related transport	3.1%	0.7%
Amino acids bioynthesis	3.1%	0.7%
Maintenance	2.1%	6.2%
Protein modification	1.0%	2.8%
Transcription	1.0%	6.9%
Catabolism	1.0%	2.1%

* Three genes are excluded from these values, as they have different expression profile in HM/LM, HS/LS and HC/LC comparisons.

SUPPLEMENTARY MATERIAL 2. Global results of transcriptomic study

<i>S. cerevisiae</i> gene name	<i>K.lactis</i> gene name	Function-description (SGD)
MET5	KLLA0B03938g	Sulfite reductase beta subunit
MET 17	KLLA0D04037g	Methionine and cysteine synthase (O-acetyl homoserine-O-acetyl serine sulfhydrylase)
HOM 3	KLLA0F27599g	Aspartate kinase (L-aspartate 4-P-transferase)
HOM 6	KLLA0B03872g	Homoserine dehydrogenase (L-homoserine:NADP oxidoreductase)
MET 12	KLLA0D12188g	methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) activity in vitro
MET 13	KLLA0F09647g	Major isozyme of methylenetetrahydrofolate reductase
FOL 3	KLLA0B12463g	Dihydrofolate synthetase
MET 7	KLLA0F11297g	Folylpolyglutamate synthetase
MET 19	KLLA0D19855g	Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD)
SAM4		S-adenosylmethionine-homocysteine methyltransferase
MHT1	KLLA0D01551g	S-methylmethionine-homocysteine methyltransferase
GSH2	KLLA0F07557g	Glutathione synthetase
STR 2	KLLA0B04378g	Cystathionine gamma-synthase
SPE2	KLLA0C14410g	S-adenosylmethionine decarboxylase
SPE3	KLLA0B09372g	Spermidine synthase
SPE4	KLLA0D17094g	Spermine synthase
MEU1	KLLA0F15664g	Methylthioadenosine phosphorylase (MTAP)
MR11	KLLA0D15455g	5'-methylthioribose-1-phosphate isomerase
MDE1	KLLA0E16435g	5'-methylthioribulose-1-phosphate dehydratase
UTR4	KLLA0E22111g	2,3-diketo-5-methylthiopentyl-1-phosphate enolase-phosphatases
MET 8	KLLA0C05544g	Bifunctional dehydrogenase and ferrochelatase
BAT1	KLLA0A10307g	Mitochondrial branched-chain amino acid aminotransferase
ARO8	KLLA0F10021g	Aromatic aminotransferase I
ARO9	KLLA0D11110g	Aromatic aminotransferase II
DUG1	KLLA0A01001g	Cys-Gly metallo-di-peptidase
YGR012w	KLLA0C18029g	Putative cysteine synthase
YGR012w	KLLA0F01815g	Putative cysteine synthase
(1)	KLLA0F21560g	Serine-O-acetyl-transferase

(1) Serine-O-acetyl-transferase. The gene encoding this enzyme is absent in *S. cerevisiae*.

SUPPLEMENTARY MATERIAL 3. Genes involved in sulfur metabolism not regulated in our experimental conditions

References

1. Aranda A., E. Jimenez-Marti, H. Orozco, E. Matallana, and M. del Olmo. 2006. Sulfur and adenine metabolisms are linked, and both modulate sulfite resistance in wine yeast. *J. Agric. Food Chem.* 54:5839-5846.
2. Arfi K., S. Landaud, and P. Bonnarme. 2006. Evidence for distinct L-methionine catabolic pathways in the yeast *Geotrichum candidum* and the bacterium *Brevibacterium linens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:2155-62.
3. Avram D., and A. T. Bakalinsky. 1997. SSU1 encodes a plasma membrane protein with a central role in a network of proteins conferring sulfite tolerance in *Saccharomyces*

- cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 179:5971-5974.
4. Boer V. M., S. L. Tai, Z. Vuralhan, Y. Arifin, M. C. Walsh, M. D. W. Piper, J. H. de Winde, J. T. Pronk, and J. M. Daran. 2007. Transcriptional responses of *Saccharomyces cerevisiae* to preferred and nonpreferred nitrogen sources in glucose-limited chemostat cultures. *FEMS Yeast Res.* 7:604-620.
 5. Boer V. M., J. H. de Winde, J. T. Pronk, and M. D. W. Piper. 2003. The genome-wide transcriptional responses of *Saccharomyces cerevisiae* grown on glucose in aerobic chemostat cultures limited for carbon, nitrogen, phosphorus, or sulfur. *J. Biol. Chem.* 278:3265-74.
 6. Chan S. Y., and D. R. Appling. 2003. Regulation of S-adenosylmethionine levels in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 278:43051-9.
 7. Cholet O., A. Hénaut, 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.* 73:2561-70.
 8. Cholet O., A. Hénaut, A. Hébert, and P. Bonnarne. 2008. Transcriptional analysis of L-methionine catabolism in the cheese-ripening yeast *Yarrowia lipolytica* in relation to volatile sulfur compound biosynthesis. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:3356-67.
 9. Cordente A. G., A. Heinrich, I. S. Pretorius, and J. H. Swiegers. 2009. Isolation of sulfite reductase variants of a commercial wine yeast with significantly reduced hydrogen sulfide production. *FEMS Yeast Res.* 9:446-459.
 10. Delmar P., S. Robin, and J. J. Daudin. 2005. VarMixt: efficient variance modelling for the differential analysis of replicated gene expression data. *Bioinformatics* 21:502-508.
 11. Dujon B. 2006. Yeasts illustrate the molecular mechanisms of eukaryotic genome evolution. *Trends. Genet.* 22:375-87.
 12. Fauchon M., G. Lagniel, J. C. Aude, L. Lombardia, P. Soularue, C. Petat, G. Marguerie, A. Sentenac, M. Werner, and J. Labarre. 2002. Sulfur sparing in the yeast proteome in response to sulfur demand. *Mol. Cell* 9:713-23.
 13. Fontecave M., M. Atta, and E. Mulliez. 2004. S-adenosylmethionine: nothing goes to waste. *Trends. Biochem. Sci.* 29:243-9.
 14. Forquin M., H. Duvergey, C. Proux, V. Loux, J. Mounier, S. Landaud, J. Coppée, J. Gibrat, P. Bonnarne, I. Martin-Verstraete, and T. Vallaëys. 2009. Identification of *brevibacteriaceae* by multilocus sequence typing and comparative genomic hybridization analyses. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:6406-6409.
 15. Ganguli D., C. Kumar, and A. K. Bachhawat. 2007. The alternative pathway of glutathione degradation is mediated by a novel protein complex involving three new genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 175:1137-1151.
 16. Godard P., A. Urrestarazu, S. Vissers, K. Kontos, G. Bontempi, J. van Helden, and B. Andre. 2007. Effect of 21 different nitrogen sources on global gene expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 27:3065-3086.
 17. Hansen J., and P. F. Johannesen. 2000. Cysteine is essential for transcriptional regulation of the sulfur assimilation genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* 263:535-542.
 18. Hazelwood L. A., S. L. Tai, V. M. Boer, J. H. de Winde, J. T. Pronk, and J. M. Daran. 2006. A new physiological role for Pdr12p in *Saccharomyces cerevisiae*: export of aromatic and branched-chain organic acids produced in amino acid catabolism. *FEMS Yeast Res.* 6:937-45.
 19. Hellborg L., M. Woolfit, M. Arthursson-Hellborg, and J. Piskur. 2008. Complex evolution of the DAL5 transporter family. *BMC Genomics* 9:164.

20. Hogan D. A., T. A. Auchtung, and R. P. Hausinger. 1999. Cloning and characterization of a sulfonate/alpha-ketoglutarate dioxygenase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 181:5876-5879.
21. Jacquemin-Faure I., D. Thomas, J. Laporte, C. Cibert, and Y. Surdin-Kerjan. 1994. The vacuolar compartment is required for sulfur amino acid homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet* 244:519-529.
22. Kagkli D. M., P. Bonnarme, C. Neuvéglise, T. M. Cogan, and S. Casaregola. 2006. L-methionine degradation pathway in *Kluyveromyces lactis*: identification and functional analysis of the genes encoding L-methionine aminotransferase. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:3330-5.
23. Kagkli D. M., R. Tâche, T. M. Cogan, C. Hill, S. Casaregola, and P. Bonnarme. 2006. *Kluyveromyces lactis* and *Saccharomyces cerevisiae*, two potent deacidifying and volatile-sulphur-aroma-producing microorganisms of the cheese ecosystem. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 73:434-42.
24. Kaur H., C. Kumar, C. Junot, M. B. Toledano, and A. K. Bachhawat. 2009. Dug1p Is a Cys-Gly peptidase of the gamma-glutamyl cycle of *Saccharomyces cerevisiae* and represents a novel family of Cys-Gly peptidases. *J. Biol. Chem.* 284:14493-14502.
25. Kaur J., and A. K. Bachhawat. 2007. Yct1p, a novel, high-affinity, cysteine-specific transporter from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 176:877-90.
26. Knijnenburg T. A., J. M. G. Daran, M. A. van den Broek, P. A. Daran-Lapujade, J. H. de Winde, J. T. Pronk, M. J. T. Reinders, and L. F. A. Wessels. 2009. Combinatorial effects of environmental parameters on transcriptional regulation in *Saccharomyces cerevisiae*: a quantitative analysis of a compendium of chemostat-based transcriptome data. *BMC Genomics* 10:53.
27. Landaud S., S. Helinck, and P. Bonnarme. 2008. Formation of volatile sulfur compounds and metabolism of methionine and other sulfur compounds in fermented food. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 77:1191-205.
28. Lopez del Castillo Lozano M., R. Tâche, P. Bonnarme, and S. Landaud. 2007. Evaluation of a quantitative screening method for hydrogen sulfide production by cheese-ripening microorganisms: the first step towards l-cysteine catabolism. *J. Microbiol. Methods* 69:70-7.
29. López Del Castillo-Lozano M., A. Delile, H. E. Spinnler, P. Bonnarme, and S. Landaud. 2007. Comparison of volatile sulphur compound production by cheese-ripening yeasts from methionine and methionine-cysteine mixtures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 75:1447-54.
30. Luikenhuis S., G. Perrone, I. W. Dawes, and C. M. Grant. 1998. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* contains two glutaredoxin genes that are required for protection against reactive oxygen species. *Mol. Biol. Cell* 9:1081-1091.
31. 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.
32. Masselot M., and Y. Surdin-Kerjan. 1977. Methionine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. II. Gene-enzyme relationships in the sulfate assimilation pathway. *Mol. Gen. Genet.* 154:23-30.
33. Patton E. E., C. Peyraud, A. Rouillon, Y. Surdin-Kerjan, M. Tyers, and D. Thomas. 2000. SCF(Met30)-mediated control of the transcriptional activator Met4 is required for the G(1)-S transition. *EMBO J.* 19:1613-1624.
34. Peng Z., and D. P. Verma. 1995. A rice HAL2-like gene encodes a Ca(2+)-sensitive 3'(2'),5'-diphosphonucleoside 3'(2')-phosphohydrolase and complements yeast met22

- and *Escherichia coli* *cysQ* mutations. *J. Biol. Chem.* 270:29105-29110.
35. Reymond N., H. Charles, L. Duret, F. Calevro, G. Beslon, and J. M. Fayard. 2004. ROSO: optimizing oligonucleotide probes for microarrays. *Bioinformatics* 20:271-273.
 36. Samanta M. P., and S. Liang. 2003. Predicting protein functions from redundancies in large-scale protein interaction networks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100:12579-12583.
 37. Schaffrath R., and K. D. Breunig. 2000. Genetics and molecular physiology of the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Fungal Genet. Biol.* 30:173-190.
 38. Smith C. A., E. J. Want, G. O'Maille, R. Abagyan, and G. Siuzdak. 2006. XCMS: processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification. *Anal. Chem.* 78:779-787.
 39. Suh J. K., L. L. Poulsen, D. M. Ziegler, and J. D. Robertus. 1999. Yeast flavin-containing monooxygenase generates oxidizing equivalents that control protein folding in the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96:2687-2691.
 40. Suleau A., P. Gourdon, J. Reitz-Ausseau, and S. Casaregola. 2006. Transcriptomic analysis of extensive changes in metabolic regulation in *Kluyveromyces lactis* strains. *Eukaryot. Cell* 5:1360-1370.
 41. Thomas D., R. Barbey, D. Henry, and Y. Surdin-Kerjan. 1992. Physiological analysis of mutants of *Saccharomyces cerevisiae* impaired in sulphate assimilation. *J. Gen. Microbiol.* 138:2021-2028.
 42. Thomas D., R. Barbey, and Y. Surdin-Kerjan. 1990. Gene-enzyme relationship in the sulfate assimilation pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. Study of the 3'-phosphoadenylylsulfate reductase structural gene. *J. Biol. Chem.* 265:15518-15524.
 43. Thomas D., and Y. Surdin-Kerjan. 1997. Metabolism of sulfur amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61:503-32.
 44. Thorsen M., G. Lagniel, E. Kristiansson, C. Junot, O. Nerman, J. Labarre, and M. J. Tamás. 2007. Quantitative transcriptome, proteome, and sulfur metabolite profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* response to arsenite. *Physiol. Genomics* 30:35-43.
 45. Uria-Nickelsen M. R., E. R. Leadbetter, and W. Godchaux. 1993. Sulfonate-sulfur assimilation by yeasts resembles that of bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 114:73-77.
 46. Wheeler G. L., K. A. Quinn, G. Perrone, I. W. Dawes, and C. M. Grant. 2002. Glutathione regulates the expression of gamma-glutamylcysteine synthetase via the Met4 transcription factor. *Mol. Microbiol.* 46:545-56.
 47. Wheeler G. L., E. W. Trotter, I. W. Dawes, and C. M. Grant. 2003. Coupling of the transcriptional regulation of glutathione biosynthesis to the availability of glutathione and methionine via the Met4 and Yap1 transcription factors. *J. Biol. Chem.* 278:49920-49928.
 48. Wood A. F., J. W. Aston, and G. K. Douglas. 1985. The determination of free aminoacids in cheese by capillary column gas liquid chromatography. *Aust. J. Dairy Technol.* 40:166-169.
 49. Yang Y. H., S. Dudoit, P. Luu, D. M. Lin, V. Peng, J. Ngai, and T. P. Speed. 2002. Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. *Nucleic Acids Res.* 30:e15.
 50. Zhang N., C. Merlotti, J. Wu, T. Ismail, A. N. El-Moghazy, S. A. Khan, A. Butt, D. C. Gardner, P. F. Sims, and S. G. Oliver. 2001. Functional Analysis of six novel ORFs on the left arm of Chromosome XII of *Saccharomyces cerevisiae* reveals three of them responding to S-starvation. *Yeast* 18:325-334.

II. C. Article n°4 : Etude approfondie du métabolisme du soufre chez la levure *Yarrowia lipolytica*

An extensive investigation of sulfur metabolism in the yeast *Y. lipolytica*

Agnès Hébert¹, Marie-Pierre Forquin², Aurélie Roux³, Julie Aubert⁴, Christophe Junot³, Jean-François Heilier⁵, Sophie Landaud², Pascal Bonnarme², Jean-Marie Beckerich^{1*}

¹UMR MICALIS, AgroParisTech-INRA, CBAI, BP 01, 78850 Thiverval Grignon, France.

²INRA-AgroParisTech, UMR 782 Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires, Centre de Biotechnologies Agro-Industrielles, 78850, Thiverval-Grignon, France.

³CEA, Service de Pharmacologie et d'Immunoanalyse, DSV/iBiTec-S, CEA/Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette Cedex, France.

⁴UMR 518 Mathématiques et Informatiques Appliquées, AgroParisTech-INRA, 16 rue Claude Bernard 75231 Paris Cedex 05, France.

⁵Université Catholique de Louvain, Louvain Center for Toxicology and Applied Pharmacology (LTAP), 1200 Brussels, Belgium.

*Corresponding author: Jean-Marie Beckerich, beck@grignon.inra.fr

Abstract

Hemiascomycetes are separated by considerable evolutionary distances and, as a consequence, the realities of sulfur metabolism in the extensively studied yeast *S. cerevisiae* could be different from other species of the phylum. We here report for the first time a global vision of sulfur metabolism in the yeast *Yarrowia lipolytica*, the most distant studied yeast from *S. cerevisiae*, using combined approaches based on DNA microarrays, liquid chromatography coupled to electrospray mass spectrometry based metabolite profiling and analysis of the volatile sulfur compounds (VSCs). A comparison between high and low sulfur source supplies, i.e. sulfate, methionine or cystine, was carried out in order to identify key steps in the biosynthetic and catabolic pathways of the sulfur amino acids. When complementary data of transcriptomic and metabolic analyses were combined, our study foregrounds relevant results. Firstly, the sulfur metabolism of *Y. lipolytica* is differentially modulated by each sulfur source, depending on its availability. The strongest repression of sulfate assimilation pathway is observed in high methionine supply, altogether with important accumulation of sulfur intermediates and VSCs production. A high sulfate supply seems to provoke an important cellular stress via sulfite production and consequently a decrease of sulfur intermediates of glutathione pathway. The lowest effect is observed in cystine supply suggesting that intracellular cysteine level is more controlled than methionine and sulfate. Furthermore, we observed that *Y. lipolytica* is able to store sulfur by the production of hypotaurine and taurine. Metabolomic results had highlighted that some intracellular pools are strongly regulated while others are very expandable.

Furthermore, our results suggest a new catabolic pathway for methionine to VSCs in this yeast: methionine is transaminated by the *BATI* gene product into 4-methylthio-oxobutyric acid (KMBA) which could be exported outside of the cell by a transporter presenting sequence similarities with Jen1p of *S. cerevisiae* and then demethylated by a spontaneous reaction into methanethiol and its derivatives.

Introduction

Yarrowia lipolytica is one of the most extensively studied non-conventional yeasts. *Y. lipolytica* possesses strong proteolytic, lipolytic and esterase activities, leading to its powerful adaptability in complex medium (16, 17, 34). This non pathogenic yeast is frequently retrieved in food, like cheese and sausages (12). The strong enzymatic activities of *Y. lipolytica* are particularly interesting in cheese ripening. However, its inoculation comes generally from environment (e.g. brine, ripening shelves and personnel). In fact, voluntary inoculation is not realized in cheese manufacturing, as the powerful enzymatic activities of *Y. lipolytica* lead to a strong increase of its population and consequently to the destabilization of cheese ecosystem development.

Meanwhile, *Y. lipolytica* produces higher variety and quantity of volatile sulfur compounds (VSCs) than other commonly found cheese-ripening yeasts, such as *Debaryomyces hansenii* and *Kluyveromyces lactis* (6, 10). In fact, the comparison of several cheese-ripening yeasts, including *Y. lipolytica*, *Geotrichum candidum*, *K. lactis*, and *D. hansenii*, highlights that *Y. lipolytica* is an efficient VSCs producer leading to methanethiol (MTL), dimethyl disulfide (DMDS), dimethyl trisulfide (DMTS) and methylthioacetate (MTAc).

The organoleptic qualities of ripened-cheeses depend notably of VSCs production. Their low odor thresholds make them important contributors to the odor and aroma of cheeses. However, the pathways leading to the synthesis of VSCs and related sulfur metabolism has been, until recently, the subject of limited investigation. In cheese, VSCs essentially arise from catabolism of methionine and cysteine contained in caseins (ratio 1:5 cysteine/methionine) (1).

Methionine being the main sulfur amino acid found in cheese curd, its catabolism has been extensively investigated in several cheese-ripening yeasts and bacteria with respect to VSCs production (7, 8). It is well established that, in the cheese ecosystem, VSCs primarily arise from the degradation of methionine to methanethiol (MTL), the latter being subsequently converted to other sulfur-bearing compounds, including the MTL oxidation products dimethyl disulphide (DMDS) and dimethyl trisulphide (DMTS), and other VSCs such as thioesters and thioethers (27).

In yeasts, methionine to MTL conversion proceeds via a two-step degradation pathway. This pathway is initiated by a non-specific aminotransferase, leading to the formation of the transamination product 4-methylthio-2-oxobutyric acid (KMBA) which is subsequently

converted to MTL (2). In *Y. lipolytica*, a branched chain aminotransferase gene (*YIBC1*) was amplified. This resulted in an increase in the VSC-producing ability and in the aminotransferase activity in the genetically modified strain compared to the parental strain (6).

Due to its low concentration in caseins, cysteine catabolism was less studied. Nevertheless, sulfate level being very low in fresh curd cheese, the cysteine desulfhydration mechanism is suspected to be the main source of H₂S during the cheese ripening process. In the study of Lopez (29), several cheese-ripening bacteria and yeast strains were selected with high capacities in H₂S production and cysteine assimilation. A first metabolic study using these selected strains was realized. If direct demethiolation, leading to H₂S, pyruvate and ammonia seems to be predominant in bacteria, the transamination step, leading to mercaptopyruvate, could initiate the process in the yeast strains (30).

Despite an increasing scientific literature concerning *Y. lipolytica*, a general study of its sulfur metabolism is not available. Important differences in global metabolism between *Y. lipolytica* and other ripening yeasts, like *Debaryomyces hansenii* or *Kluyveromyces lactis*, have already been highlighted. While these yeasts first assimilate lactate like carbon source and then amino acids, *Y. lipolytica* degrades preferentially amino acids as carbon source (31). As the degradation products of amino acids have a major impact on cheese organoleptic properties, the study of sulfur metabolism in *Y. lipolytica* is of major interest for VSCs production comprehension. As the hemiascomycetous yeasts are separated by important evolutionary distances (14), we have previously realized an *in silico* study of eleven organisms of this phylum in order to bring to light variations in sulfur metabolism pathways (A. Hébert, S. Casaregola, and J. M. Beckerich, submitted for publication). This previous work gave us solid bases to perform a complete inventory of sulfur metabolism in *Y. lipolytica*. We present for the first time an overview of sulfur metabolism in *Y. lipolytica*, combining transcriptomic, metabolite profiling, and volatile compounds measurement (GC-MS). Concerning cysteine biosynthesis, we observed regulation of the *O*-acetyl-serine pathway while the inverse transsulfuration pathway is not regulated. This result confirms that the hemiascomycetous yeast *Y. lipolytica* is closer to fungi than the yeast model *S. cerevisiae*. Furthermore, we noticed that *Y. lipolytica* is able to produce hypotaurine and taurine. A complementary phylogenetic study revealed that the biosynthetic pathway of these compounds, which is incomplete in *S. cerevisiae*, is also present in fungi. This yeast is a good

model to obtain evolutionary vision of sulfur metabolism and VSCs production in hemiascomycetous yeasts.

Materials and Methods

Strain and culture conditions

The *Yarrowia lipolytica* strain (strain 1E07, isolated from livarot) was chosen for its interesting technological properties during cheese ripening. This strain was grown in a defined synthetic medium, adapted from the one described by Mansour *et al.* (31). We added NaCl at 20 g/L and pyridoxal phosphate at 0.6 mg/L. The concentrations of KH₂PO₄ and K₂HPO₄ were modified to obtain an initial pH of 7.0 (7.9 g/L and 16 g/L, respectively). To obtain a sulfur-free medium (SM), we removed methionine and cysteine. This SM was supplemented with sulfur sources as stated: 10 mM L-methionine, 1 mM L-cystine or 10 mM NH₃SO₄ for high concentrations and 10 μM L-methionine, 1 μM L-cystine or 10 μM NH₃SO₄ for low concentrations. Cysteine, which is very reactive, can spontaneously dimerize and form cystine. We consequently used cystine instead of cysteine to improve the control of sulfur supply.

One hundred mL of the SM, supplied by sulfur substrate, were inoculated from a preculture carried out in the same medium (inoculation size=1x10⁶ UFC.ml⁻¹). To avoid differences in the growth stage and stress inductions or limitations, we maintained the cells in an exponential phase for ten generations in a defined medium by seeding the cells in a fresh medium after two generations. Since the cells were harvested during exponential growth and at low cell density (~5x10⁶ UFC.ml⁻¹), we could thus consider that changes in medium composition were minimal during cell culture and that cells were harvested in a steady state of exponential growth. Under these conditions, the specific growth rate is of 0.28 h⁻¹ ± 0.01 (12 repetitions). These precautions ensured highly reproducible growth conditions (15).

All the cultures were carried out in 500 mL flasks at 25°C with an orbital agitation (150 rpm). Three independent cultures were made for each sulfur condition. Samples for transcriptomic, metabolomic and GC-MS experiments were taken from these cultures and then stored at -80°C.

RNA isolation and labeling

Exponentially grown cells were collected and broken with glass beads in a Fastprep apparatus (Bio 101). Total RNA was then extracted by Trizol treatment (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). RNA quality was assessed with an Agilent 2100 Bioanalyser. RNA was labeled with either Alexa 555 or Alexa 647 fluorescent dye (Invitrogen) using the SuperScript Indirect cDNA labeling system kit (Invitrogen, Carlsbad, USA) with anchored Oligo(dT)₂₀ primer, according to the manufacturer's recommendations. The levels of Alexa 555 and Alexa 647 incorporation were quantified by absorbance measurement.

cDNA-array hybridization and data analysis

The expression profiles of *Y. lipolytica* grown in the presence of various sulfur sources were analyzed using DNA microarrays (Eurogentec, Seraing, Belgium). Hybridizations were performed for 17 h at 65°C in dedicated micro-chambers with 100 pmol of the different labeled samples. Dye swaps were included in the experimental design. Array scanning was carried out with a DNA-microarray scanner from Agilent in extended dynamic range (XDR), with a resolution of 5 nm per pixel. For further analysis, intensity-dependent normalization was performed with the LOESS (36) procedure followed by subtraction of the log-ratio median calculated over the values for an entire block from each individual log-ratio using, the *anapuce* package of R (13). Differential analysis was performed with the *varmixt* package of R (13). Finally, the raw *P* values were adjusted by the Bonferroni method, which controls the family-wise error rate. We considered genes with both a *P* value ≤ 0.05 and a ratio higher than 2 to be differentially expressed.

Quantitative real-time PCR

After RNA extraction, the cDNA was synthesized using the SuperScript III first-strand synthesis system (Invitrogen) with Oligo(dT)₂₀, according to the manufacturer's recommendations. Primers were designed with LightCycler software (Roche, Mannheim, Germany) and synthesized by Eurogentec (Seraing, Belgium). The primers used are listed in Supplementary Material 1. The quantitative real-time PCR was performed using a LightCycler (Roche) and LightCycler FastStart DNA Master^{plus} SYBR Green I kit (Roche), according to the manufacturer's recommendations. In each sample, the quantity of cDNA for each gene was normalized to the quantity of the *ACT1* cDNA, which is considered to be a

stably expressed gene. The relative change in gene expression was recorded as the ratio of normalized target concentrations ($\Delta\Delta ct$).

Volatile sulfur compound extraction and analysis

The volatile compounds were analyzed with a system composed of a dynamic headspace analyzer (Purge and Trap HP 3547A, Agilent Technologies) fitted with a sorbent trap (Tenax, 60 to 80 mesh, 0.25 g, 30 x 0.32 cm) and a cryofocusing module. The concentrator was coupled to a gas chromatograph (GC G1530A, Agilent Technologies) connected to a mass spectrometer detector (MSD 5973; Agilent Technologies). Five milliliters of the non-filtered culture was heated at 60°C and then purged for 15 min with high-purity helium at 15 ml.min⁻¹. The volatile compounds were concentrated by adsorption to the Tenax trap maintained at 40°C. Water was then removed by flushing the trap with helium for 3 min (dry purge). The trap was heated at 225°C for 2 min to desorb the volatile compounds, which were directly transferred at 150°C to the head of a capillary column and condensed by cryofocusing at -150°C. The condensed volatile compounds were then injected by heating (180°C) on a non-polar capillary column (HP-5MS, 30.0 m x 0.25 mm, film thickness: 0.25 µm) flushed with high-purity helium at a constant flow (1.2 mL.min⁻¹). The oven temperature was maintained at 5°C for 8 min. The metabolites were eluted with a first linear gradient of 3°C.min⁻¹ from 5 to 20°C, followed by a second linear gradient of 10°C.min⁻¹ from 20 to 150°C. The temperature was then maintained at 150°C for 10 min. The column was directly connected to the mass-sensitive detector by an interface heated at 280°C. The electron impact energy was set at 70 eV, and data were collected in the range of 29 to 300 atomic mass units. Components were identified by their retention times and by comparison of their mass spectra with those of the Wiley275 mass spectral database (Agilent Technologies). The concentrations of each volatile compound produced were quantified using a standard curve of pure DMDS (99% purity, Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France). Measurements were made in triplicate for each concentration in the non-inoculated media, and the concentrations of volatile compounds were expressed as equivalents of DMDS in µg.kg⁻¹.

H₂S measurement

The production of H₂S was measured in each culture according to the method developed by Lopez *et al.* (29).

Extraction of intracellular metabolites

Intracellular metabolites of *Y. lipolytica* cells were extracted as follows. Exponentially growing cells (10^8 yeasts) were centrifuged. The cells were washed with 20 mL of ultra-pure water to prevent contamination with SM and centrifuged again. The cells were then stored at -80°C . After the frozen cells were thawed for 15 min at 4°C , they were resuspended with 1 mL of 1% formic acid. The solution was then incubated for 10 min at 95°C and centrifuged for 30 min at 4°C . The supernatant was lyophilized and stored at -80°C .

Liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS)

Chromatographic separation was performed on a Discovery® HS-F5 (2.1x250 mm, 5 μm) from Supelco Analytical (Interchim, Montluçon, France) by using a Surveyor LC system (ThermoFisher Scientific, Courtaboeuf, France). Before injection, samples were stored at 4°C in the autosampler tray. Separations were carried out using the following gradient at 200 $\mu\text{L}/\text{min}$: 0-3 min, 0% B; 3-20 min, from 0 to 100% B; 20-25 min, 100% B; 25-45, 0% B. Solvent A was water and solvent B was acetonitrile, both containing 0.1% formic acid. Column temperature was set to 30°C .

Mass spectrometric detection was performed using an LTQ/Orbitrap hybrid mass spectrometer (ThermoFisher Scientific, Courtaboeuf, France) fitted with an electrospray source operated in the positive ionization mode. The detection was achieved from 75 to 1000 u at the maximum resolving power of 30000 (expressed as full width at half maximum for an ion at 400 u). The mass spectrometer was operated with capillary voltage at 4 kV and capillary temperature at 275°C . Nitrogen was used as the sheath and auxiliary gas, with pressures set at 45 and 10 (arbitrary units), respectively.

Data processing and statistical analysis for LC-MS

All data were processed using the Qualbrowser module of Xcalibur version 2.0.7 (Thermo Fisher Scientific, Les Ulis, France), and its chemical formula generator was used to provide elemental compositions. Our data processing procedure includes two steps, which consist of automatic peak detection and annotation of data sets.

Automatic peak detection. Automatic peak detection from LC/MS chromatograms was performed by using XCMS software (32), version 1.14.1 running under R version 2.8.1. The

R language was installed on a Dell Eight-core Intel Xeon 3.00GHz Processor with 16 Go of RAM running Linux (Centos 5.2 x86_64). The matchedFilter algorithm was used and default values were set for all parameters except for fwhm, step, steps, mzdif, mzwid, bw and snthresh, which were set at 25, 0.01, 3, 0.1, 0.1, 5 and 3 respectively. A list of the areas of the peaks detected was generated for each sample using a combination of the retention time (RT) and the m/z ratio as an identifier. An arbitrary number was assigned to each of these RT- m/z pairs in the order of elution. The data were then combined into a single matrix by aligning peaks with the same mass-retention time pair together from each data file in the data set.

Annotation of the data sets. The data sets resulting from the XCMS process were annotated using tools developed in-house:

- The spectral database of the laboratory,
- An informatics tool for automatic query of metabolic and metabolomic public databases with the measured accurate masses,
- Mathematical and informatics tools for highlighting and grouping of the redundant information, i.e., isotope, in-source product and adduct ions. These ions were produced during the ionization process together with protonated or deprotonated ions, which were used for metabolite identification. Although informative, this type of signal redundancy slows down the identification procedure by increasing the number of variables that have to be investigated and by leading to unsuccessful database queries as well.

Commercial compounds were also analyzed at 5 $\mu\text{g/ml}$ in order to confirm metabolite identification on the bases of chromatographic retention time and MS/MS spectra similarities.

Table 1 summarizes the commercial compounds analysed and eventually detected, as well as compounds detected in our biological samples.

Compound	Commercial Product	Sample
Methionine	+	+
Cystathionine	+	+
Cysteine	+	+
γ -glutamyl-cysteine	+	+
Glutathione	+	+
Cysteinyglycine	+	+
Spermidine	+	+
Serine	+	+
Taurine	+	+
<i>O</i> -acetyl-serine	+	-
KMBA	+	-
Homocysteine	+	-
S-adenosyl-homocysteine	+	-
S-adenosyl-methionine	-	-
Hypotaurine	/	+
<i>O</i> -acetyl-homoserine	/	+
5-methylthioadenosine	/	+
S-adenosyl-methioninamine	/	-
1,2-Dihydroxy-3-keto-5methyl-thioptene	/	-

KMBA: keto-methyl thio butyrate. detected: +, not detected: -, product not commercially available: /.

TABLE 1. Metabolites related to sulfur metabolism detected by HPLC coupled to LTQ-Orbitrap

Results

Experimental design

In order to study sulfur metabolism in the cheese-ripening yeast *Yarrowia lipolytica*, we have hypothesized that, in excess of sulfur, the yeast metabolism could be oriented towards sulfur amino acid catabolism, whereas under lower sulfur concentration, biosynthesis of sulfur amino acids could be observed. Consequently, the studied yeast was grown with the different sulfur sources, methionine (M), cystine (C) and sulfate (S), at high (H) or low (L) concentrations, using the ratio 1000/1. High concentrations of methionine and cystine are close to their theoretical maximal concentrations in cheese caseins (35), while low concentrations were 1000 times lower. Although there is no sulfate in milk, we completed this work by studying ammonium sulfate supplies in order to obtain a more complete picture of sulfur metabolism in this yeast.

This experimental design was used throughout this study for transcriptomic, metabolomic and VSCs studies. To make the reading easier, we used the gene names of *S. cerevisiae* in the text, instead of the *Y. lipolytica* orthologues.

Modulation of gene expression according to sulfur supply

Regardless of the sulfur source, genes involved in sulfur metabolism represent 10.1% of the less expressed genes under high sulfur conditions (Supplementary Material 2). This result indicates that the yeast restricts sulfur assimilation and anabolism under conditions of sulfur excess. It is essential to note that one third of the genes differentially expressed in this study encodes for unknown or poorly defined functions in *Y. lipolytica*, like in the model yeast *S. cerevisiae*. Since growth of *Yarrowia lipolytica* is the same in all the experiments (see Materials and Methods, Strain and culture conditions), we can reasonably assume that this yeast was not in conditions of limitation or inhibition. The “low sulfur” sample was taken as the control to compare gene expression between sulfur catabolism versus anabolism by calculating the ratios H/L (High concentration /Low concentration). As the majority of sulfur related genes are regulated in the three sulfur sources (Table 2), we have chosen to describe the three conditions in the same time, using the following notation: H/L(M and/or C and/or S).

Genes differentially expressed in :	Comparison High versus Low sulfur conditions						
	All sulfur sources	Methionine and Cystine	Methionine and Sulfate	Cystine and Sulfate	Methionine only	Cystine only	Sulfate only
Notation in text	H/L(MCS)	H/L(MC)	H/L(MS)	H/L(CS)	H/L(M)	H/L(C)	H/L(S)
Genes	23	7	1	0	17	0	1
Percent	47%	14%	2%	0%	35%	0%	2%

H: high; L: low; M: methionine; C: cystine ; S:sulfate.

TABLE 2. Repartition of sulfur related genes differentially expressed depending of sulfur supply

All the genes of sulfur metabolism, catabolism and related genes which have differential expression in at least one of the sulfur source studied are summarized Table 3 and Table 4. The validation of transcriptomic experiment by qPCR is available in supplementary material 1.

<i>S. cerevisiae</i> gene name	<i>Y. lipolytica</i> gene name	Ratio Met	p value Met	Ratio Cys	p value Cys	Ratio Sul	p value Sul	Function
Sequence similarity with DUR3	YALIOE28622g	0.03	1.39E-12	0.03	0	0.06	0	Transporter for both urea and polyamines
	YALIOE33583g	0.02	0	0.04	1.41E-12	0.06	0	
	YALIOB04202g	-	-	-	-	-	-	
	YALIOC15807g	-	-	-	-	-	-	
Sequence similarity with GAP1	YALIOF19866g	6.55	2.78 E -12	3.93	1.02 E -08	2.32	4.08 E -03	General amino acid permease
	YALIOB19800g	0.44	8.69 E -04	-	-	-	-	
	YALIOB16522g	-	-	-	-	-	-	
	YALIOC17237g	-	-	-	-	-	-	
	YALIOE10219g	-	-	-	-	-	-	
Sequence similarity with MUP1	YALIOF09889g	-	-	-	-	-	-	High affinity methionine permease
	YALIOB19492g	-	-	-	-	-	-	
	YALIOF25795g	0.05	1.39 E -12	0.20	1.13 E -11	0.27	8.71 E -08	
	YALIOD16137g	0.02	0	0.03	0	0.04	0	
	YALIOF03498g	0.46	4.74 E -02	-	-	0.37	1.54 E -03	
Sequence similarity with OPT2	YALIOD19646g	0.32	2.22 E -07	-	-	-	-	Oligopeptide transporter
	YALIOF07018g	-	-	-	-	-	-	
	YALIOF09691g	0.11	0	0.20	7.07E-12	0.35	3.96 E -04	
	YALIOA00110g	0.29	1.35 E -09	-	-	-	-	
	YALIOC18491g	-	-	-	-	-	-	
	YALIOB07898g	-	-	-	-	-	-	
	YALIOC20823g	-	-	-	-	-	-	
	YALIOF30041g	-	-	-	-	-	-	
	YALIOF18964g	-	-	-	-	-	-	
	YALIOB04642g	-	-	-	-	-	-	
	YALIOF13959g	-	-	-	-	-	-	
	YALIOA03949g	-	-	-	-	-	-	
	YALIOE19294g	-	-	-	-	-	-	
	YALIOB02090g	-	-	-	-	-	-	
YALIOE17589g	-	-	-	-	-	-		
YALIOF10241g	-	-	-	-	-	-		
YALIOB02398g	-	-	-	-	-	-		
YALIOC22616g	-	-	-	-	-	-		
Sequence similarity with SEO1	YALIOC17281g	0.14	0	0.10	0	0.14	0	Putative allantate permease
	YALIOC17303g	0.06	0	0.03	0	0.04	0	
	YALIOF13607g	0.05	0	0.22	1.55 E -11	0.17	0	
	YALIOE35200g	0.33	2.28E-07	-	-	-	-	
	YALIOC00627g	-	-	-	-	-	-	
*YALIOB01904g	-	-	-	-	-	-		
SSU1	YALIOE24167g	-	-	-	-	5.23	2.83E-12	Sulfite pump, required for efficient sulfite efflux
SUL1- SUL2	YALIOB17930g	0.01	1.39 E -12	0.09	0	0.16	0	High affinity sulfate permease
Sequence similarity with TPO1	YALIOF07062g	0.43	1.61E-03	-	-	-	-	Polyamine transporter
	YALIOA15576g	-	-	-	-	-	-	
	YALIOF08063g	-	-	-	-	-	-	
	YALIOE21241g	-	-	-	-	-	-	
Sequence similarity with YIL166c	YALIOA18902g	-	-	-	-	-	-	Similarity to the allantate permease
	YALIOD00407g	0.01	0	0.03	1.41 E -12	0.03	0	
Sequence similarity with JEN1	YALIOB16412g	0.36	1.71 E -04	0.44	1.49 E -02	0.34	1.81 E -04	Lactate transporter, required for uptake of lactate and pyruvate
	YALIOC15488g	26.58	1.39E-12	5.43	0	3.61	2.35E-07	
	YALIOD20108g	-	-	-	-	-	-	
	YALIOD24607g	-	-	-	-	-	-	
	YALIOE32901g	-	-	-	-	-	-	
YALIOC21406g	-	-	-	-	-	-		
*YALIOB19470g	-	-	-	-	-	-		

Ratio Met: High/Low Methionine; Ratio Cys: High /Low Cystine ; Ratio Sul: High/Low Sulfate

TABLE 3. Transcriptomic response of *Y. lipolytica* to sulfur supply (part 1: transporters)

<i>S. cerevisiae</i> gene name	<i>Y. lipolytica</i> gene name	Ratio Met	p value Met	Ratio Cys	p value Cys	Ratio Sul	p value Sul	Function
SULFUR METABOLISM								
MET 3	YALIOB08184g	0.03	0	0.15	9.89 E -12	0.29	7.35 E -04	ATP sulfurylase
MET 16	YALIOB08140g	0.02	4.17 E -12	0.12	1.41 E -12	0.16	1.42 E -12	3'-phosphoadenylsulfate reductase
GSH2	YALIOC17831g	0.34	5.23 E -07	0.32	1.62 E -05	0.37	3.38 E -05	Glutathione synthetase
SPE3	YALIOE33143g	2.63	2.03 E -05	2.66	2.60 E -04	2.32	1.59 E -02	Spermidine synthase
ADI1	YALIOA14498g	0.26	9.32 E -11	0.34	2.12 E -05	0.41	5.09 E -03	Acireductone dioxygenase
ARO9	YALIOC05258g	0.21	0	0.16	0	0.28	2.31 E -07	Aromatic aminotransferase II
MET10	YALIOE16368g	0.18	0	0.33	2.49 E -05	-	-	Subunit alpha of assimilatory sulfite reductase
MET17	YALIOD25168g	0.11	0	0.36	6.74 E -04	-	-	O-acetyl homoserine-O-acetyl serine sulphydrylase
MET30	YALIOB09977g	0.38	3.66E-05	0.48	2.85 E -02	-	-	F-box protein, controls sulfur metabolism; regulates Met4p
MET4	YALIOD04466g	0.19	2.78E-12	0.32	8.72 E -06	-	-	Transcriptional activator, regulation of the sulfur amino acid pathway
MET 2	YALIOE00836g	0.27	1.26 E -09	-	-	-	-	L-homoserine-O-acetyltransferase
MET 14	YALIOE00418g	0.40	1.14 E -04	-	-	-	-	Adenylsulfate kinase
MET 1	YALIOA01133g	0.32	3.00 E -07	-	-	-	-	uroporphyrin-III C-methyltransferase
MET13	YALIOB00572g	0.40	6.99 E -05	-	-	-	-	Major isozyme of methylenetetrahydrofolate reductase
SAM1 SAM2	YALIOB14509g	0.30	1.84 E -08	-	-	-	-	S-adenosylmethionine synthetase
YGR012W	YALIOE08536g	0.34	1.31 E -06	-	-	-	-	Putative cysteine synthetase
	YALIOF14047g	0.38	3.08 E -04	-	-	-	-	
SULFUR RELATED GENES								
-	YALIOA06743g	0.16	0	0.19	1.41 E -12	0.24	1.56 E -11	Glutathione transferase
	YALIOF25575g	0.08	2.78 E -12	0.15	0	0.33	5.13 E -05	
JLP1	YALIOF22825g	0.01	1.39 E -12	0.05	0	0.06	0	Fe(II)-dependent sulfonate/alpha-ketoglutarate dioxygenase
	YALIOA12177g	0.17	0	0.09	1.41 E -12	0.14	0	
	YALIOD17622g	0.03	0	0.03	1.41 E -12	0.05	0	
	YALIOB21472g	0.02	0	0.07	2.83 E -12	0.10	0	
	YALIOA21439g	0.21	1.39E-12	0.29	3.33 E -06	0.42	4.23 E -02	
	YALIOD21098g	0.10	0	0.06	1.41 E -12	0.19	0	
FMO1	YALIOD21076g	0.12	1.39E-12	0.11	2.83E-12	0.12	0	Flavin-containing monooxygenase, catalyses oxidation of biological thiols to maintain the ER redox ratio for correct folding of disulfide-bonded proteins
YHR112c	YALIOC22088g	0.25	4.17E-12	0.44	2.87E-02	-	-	Protein of unknown function, similarity with CYS3, STR3, MET17 and STR2
PRX1	YALIOA19426g	0.13	0	0.43	2.45E-02	-	-	Mitochondrial peroxiredoxin with thioredoxin peroxidase activity
	YALIOF08195g	0.29	2.60E-09	-	-	-	-	
MXR1	YALIOB03916g	0.12	0	-	-	-	-	Methionine-S-sulfoxide reductase
	YALIOE20119g	0.49	1.75 E -02	-	-	-	-	
TSA1	YALIOB15125g	0.4	4.47E-04	-	-	-	-	Thioredoxin peroxidase
TRX1	YALIOE23540g	0.46	9.56E-03	-	-	-	-	Cytoplasmic thioredoxin
GENES POTENTIALLY INVOLVED IN METHIONINE CATABOLISM								
BAT1	YALIOD01265g	2.43	1.85 E -04	2.13	4.29 E -02	-	-	Mitochondrial branched-chain amino acid aminotransferase
JEN1	YALIOC15488g	26.58	1.39E-12	5.43	0	3.61	2.35E-7	Lactate transporter

Ratio Met: High/Low Methionine; Ratio Cys: High /Low Cystine; Ratio Sul: High/Low Sulfate

**TABLE 4. Transcriptomic response of *Y. lipolytica* to sulfur supply
(part 2: sulfur metabolism and catabolism)**

Transporters

According to its important proteolytic activities, *Yarrowia lipolytica* possess a large variety of transporters (Table 3). This yeast also presents frequently two or more genes presenting sequence similarities with a given transporter of the model yeast *S. cerevisiae*. Thus it is difficult to identify the orthologues of *S. cerevisiae* genes encoding transporters in *Y. lipolytica*. We can hypothesize that among each *Y. lipolytica* transporters family, each gene may possess specific substrate specificity.

We observed that when *Yarrowia lipolytica* has some homologues for one transporter, they are not regulated in the same way (Table 3). From the five *Yarrowia lipolytica* homologues from the *S. cerevisiae* high affinity methionine permease (encoded by *MUP1*), four are regulated in our conditions. Two of these genes are repressed in H/L(MCS) conditions, while the two others are repressed only in H/L(MS) and H/L(S) respectively. The high affinity sulfate transporter of *Yarrowia lipolytica* is highly repressed in H/L(MCS).

The polyamine metabolism is directly linked to sulfur metabolism. In consequence, is it not surprising to observe the repression of some genes (*DUR3*, *TPO1*) involved in polyamines transport. However, the homologues of these two genes are not similarly regulated. Among the four homologues of *DUR3*, two are repressed in H/L(MCS), while among the four homologues of *TPO1*, one is repressed in H/L(M).

Only two of the sixteen homologues of the *S. cerevisiae* oligopeptide transporter (encoded by *OPT2*) are repressed in H/L(MCS) and H/L(M) respectively. In *Yarrowia lipolytica*, there are eight homologues of the gene *GAPI*, which encodes general amino acids transporter in *S. cerevisiae*. Two of these genes are regulated in our conditions. The first is repressed in H/L(M) while the second is overexpressed in H/L(MCS). We have also observed that the sulfite exporter (encoded by *SSU1*) is specifically overexpressed in H/L(S). The sulfate transporter (encoded by *SUL1-SUL2*) is repressed in H/L(MCS). We noticed that among the six genes presenting sequence similarity with *JEN1* (only in a quarter of the sequence), encoding a lactate transporter, only one *Y. lipolytica* gene is differentially expressed. This gene is overexpressed in H/L(MCS), and particularly in high methionine.

We observed that transporters probably involved in sulfur assimilation are repressed in one or more of our conditions (H/L), suggesting that the sulfur supply is in excess in high conditions. The differences in regulation in a same group of homologues suggest that the regulation and specificity of *Yarrowia lipolytica* transporters is very complex and accurate.

Sulfate assimilation

We observed that numerous genes involved in sulfate assimilation are regulated (Table 4). Concerning the first step of sulfate activation, the two genes *MET3* (encoding an ATP sulfurylase) and *MET14* (encoding an APS kinase), are repressed in H/L(MCS) and in H/L(M) respectively. Regarding the following sulfate reduction stage, the gene *MET16*, encoding a PAPS reductase, is repressed in H/L(MCS). The next enzymatic step is realized by a sulfite reductase, which is a heterodimere encoded by *MET5/MET10*. Only *MET10* is repressed in H/L(MC). We can also notice that sulfite reductase needs siroheme to be functional, and that *MET1*, whose product is involved in siroheme biosynthesis, is repressed in H/L(M). The sulfur metabolism interacts with aspartate metabolism through homoserine production, which is the last common intermediate of sulfur and threonine metabolism. *MET2*, which encodes a homoserine-*O*-acetyltransferase, is repressed in H/L(M). This latest enzyme synthesizes *O*-acetyl-homoserine (OAH). The *O*-acetylhomoserine sulfhydrylase, encoded by *MET17*, leads to homocysteine production (precursor of methionine and cysteine). This gene is repressed in H/L(MC).

Cysteine and glutathione metabolism

Surprisingly, the direct and reverse transsulfuration pathways are not regulated in all the conditions tested. However, the two genes encoding cysteine synthases (*YAL10E08536g* and *YAL10F14047g*, two orthologues of *S. cerevisiae* gene *YGR012w*), involved in the second pathway of cysteine metabolism, are repressed in H/L(M). The gene *GSH2* encoding glutathione synthase is repressed in H/L(MCS).

Methionine metabolism

Methionine leads to the production of *S*-adenosyl-methionine (SAM) via the methyl cycle. The gene leading to SAM synthesis is repressed in H/L(M). While *MET6* is not regulated, the repression of *MET13* H/L(M), involved in the synthesis of MET6' cofactor, leads to an indirect repression of methionine synthesis. The methionine salvage pathway leads to polyamines biosynthesis and production of 5MTA, which can be recycled to methionine. The gene *SPE3*, leading to spermidine synthesis is overexpressed H/L(MCS). There are two genes repressed in H/L(MCS) of methionine salvage pathway: *AD11* and *ARO9*. This pathway has recently been extensively defined in *S. cerevisiae*, by Pirkov *et al* (26).

Regulation (H/L MCS)

Two genes (*MET4* and *MET30*) involved in sulfur regulation are repressed in H/L(MC). *MET4* encodes the transcriptional activator of sulfur metabolism, and *MET30* encodes a F-box protein involved in regulation of Met4p.

Catabolism (H/L MCS)

We have investigated the overexpression of aminotransferases potentially involved in methionine catabolism, the branched-chain aminotransferases Bat1p and Bat2p and the aromatic aminotransferases Aro8p and Aro9p. In the light of our results, only one of all the candidate genes seems to be particularly interesting. Indeed, this gene (*YALI0D01265g*), encoding the branched-chain amino acids aminotransferase Bat1p is overexpressed in H/L(MC) (Table 4).

Volatile sulfur compounds and intracellular sulfur metabolites

The production of VSCs was quantified using gas chromatography coupled with mass spectrometry (Table 5). The major VSC produced is dimethyl disulfide (DMDS), which is produced in all the tested conditions. However its production is on average 47 and 2.4 fold higher in HM and HS respectively. In cystine condition, the concentration of DMDS is nearly unchanged even lowered in HC condition. Concerning others aromatic compounds, dimethyl trisulfide (DMTS) and hydrogen sulfide (H₂S) are produced only in HM and HS (Table 5). Furthermore, the great variety of aromatic compounds obtained in HM underlines the remarkable aromatic properties of *Y. lipolytica*.

COMPOUND ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Ratio Met	Ratio Cys	Ratio Sul	HM	LM	HC	LC	HS	LS
DMDS	47.3	0.8	2.4	74.78 \pm 3.77	1.58 \pm 0.43	1.3 \pm 0.21	1.7 \pm 0.23	3.85 \pm 0.29	1.61 \pm 0.16
DMTS	n.s.	n.s.	n.s.	2.38 \pm 0.87	-	-	-	0.14 \pm 0.05	-
Methanethiol	n.s.	n.s.	n.s.	0.4 \pm 0.02	-	-	-	-	-
DMS	n.s.	n.s.	n.s.	0.36 \pm 0.03	-	-	-	-	-
Methional	n.s.	n.s.	n.s.	0.31 \pm 0.07	-	-	-	-	-
H ₂ S ^a	n.s.	n.s.	n.s.	23.60 \pm 3.60	-	-	-	23.53 \pm 0.39	-

^a in mg/kg. H: high; L: low; M: methionine; C: cystine, S:sulfate. Ratio Met: HM/LM; Ratio Cys: HC/LC; Ratio Sul: HS/LS

Results are the mean values \pm the standard errors of the means of the results from three independent cultures.

TABLE 5: Production of volatile sulfur compounds depending on sulfur supply

The metabolite profiling analyses were performed with an LC coupled to an LTQ-Orbitrap mass spectrometer fitted with an electrospray source. The LTQ-Orbitrap accurately measures molecular mass and discriminates the isobaric ions, thereby improving the determination of the elemental composition of ions and identification procedures. In the course of this study, we decided to interpret the data in a targeted way, by focusing on metabolites involved in the sulfur metabolism pathways. To do this, ions related to metabolites of interest were taken from the data matrices generated by the peak detection software and further annotated using our procedures (see the Materials and Methods section for more details).

A list of metabolites of interest is given in Table 1, which also summarizes the detection of sulfur intermediates in samples and their availability as commercial references. Some commercially-available metabolites were detected but never observed and, consequently, not accumulated in our samples. This was the case for homocysteine, S-adenosyl-homocysteine, O-acetyl-serine and KMBA. With the experimental protocol used, the S-adenosylmethionine pool was neither detected in the commercial compound solution nor in our samples. Moreover, variations in the SAM pool are very difficult to discuss. In fact, SAM can be stored as a "sulfur reservoir" in the vacuole (22). Moreover, a large variation of the SAM pool in *S. cerevisiae* only has a low impact on the cellular physiology (9). The presence of some intermediaries, not commercially available, has been investigated. However, only two of them, O-acetyl-homoserine and 5-methylthioadenosine, were identified in our samples. Their identities were confirmed by MS-MS. Data concerning intermediates of sulfur metabolism are given in Table 6. These data will be further reported and discussed throughout the paper.

COMPOUND	AREA						RATIO		
	HM	LM	HC	LC	HS	LS	Met	Cys	Sul
5-methylthioadenosine	1.30E+09 [1.19; 1.37]E+09	3.92E+08 [3.38; 4.72]E+08	4.04E+07 [3.32; 4.94]E+07	2.54E+08 [1.85; 2.92]E+08	9.54E+07 [8.24; 10.70]E+07	3.40E+08 [2.60; 4.13]E+08	3.32	0.16	0.28
Cystathionine	1.74E+08 [1.48; 2.24]E+08	1.64E+07 [1.21; 1.88]E+07	1.93E+06 [1.45; 2.80]E+06	8.87E+06 [4.72; 12.70]E+06	5.75E+06 [5.07; 6.71]E+06	1.01E+07 [0.92; 1.13]E+07	10.67	0.22	0.57
Hypotaurine	2.89E+07 [2.53; 3.55]E+07	1.45E+06 [1.39; 1.55]E+07	2.68E+06 [2.22; 3.21]E+06	9.03E+05 [6.29; 11.70]E+05	1.76E+06 [0.97; 2.22]E+06	1.16E+06 [0.05; 2.12]E+06	19.91	2.97	-
Spermidine	4.37E+08 [4.30; 4.49]E+08	3.56E+08 [3.13; 4.06]E+08	2.34E+08 [2.29; 2.39]E+08	2.70E+08 [2.43; 3.04]E+08	3.68E+08 [3.19; 4.03]E+08	3.75E+08 [3.36; 4.14]E+08	1.23	0.87	-
Taurine	8.72E+06 [7.66; 9.70]E+06	1.98E+06 [1.80; 2.07]E+06	2.65E+06 [2.47; 2.81]E+06	1.11E+06 [0.83; 1.28]E+06	3.15E+06 [2.29; 4.04]E+06	1.50E+06 [0.46; 3.47]E+06	4.41	2.39	-
Cysteine	1.23E+07 [1.11; 1.33]E+07	6.36E+06 [6.03; 6.70]E+06	5.82E+06 [5.26; 6.28]E+06	4.89E+06 [3.87; 5.81]E+06	1.58E+05 [0.76; 2.49]E+05	4.35E+06 [3.00; 5.24]E+06	1.94	-	0.04
γ -glutamyl-cysteine	4.24E+06 [3.49; 5.08]E+06	6.96E+06 [6.80; 7.23]E+06	5.17E+06 [4.63; 6.26]E+06	5.01E+06 [3.40; 5.87]E+06	8.36E+05 [5.50; 12.50]E+05	7.44E+06 [5.05; 11.80]E+06	0.61	-	0.11
Methionine	1.21E+08 [0.94; 1.94]E+08	1.79E+07 [1.76; 1.82]E+07	9.13E+06 [8.43; 9.76]E+06	1.22E+07 [0.83; 1.48]E+07	1.78E+07 [1.37; 2.13]E+07	1.80E+07 [1.38; 2.54]E+07	6.75	-	-
Serine	2.03E+07 [1.86; 2.31]E+07	5.53E+07 [5.39; 5.79]E+07	4.08E+07 [3.57; 4.97]E+07	3.63E+07 [2.64; 4.45]E+07	4.86E+07 [3.62; 5.72]E+07	5.29E+07 [4.77; 5.74]E+07	0.37	-	-
Glutathione	4.67E+08 [4.18; 5.43]E+08	5.03E+08 [4.73; 5.53]E+08	4.55E+08 [4.01; 5.50]E+08	3.81E+08 [2.96; 4.25]E+08	2.22E+08 [2.00; 2.52]E+08	5.05E+08 [4.31; 6.50]E+08	-	-	0.44
Cysteinylglycine	5.82E+07 [5.16; 6.73]E+07	6.45E+07 [5.79; 7.43]E+07	5.96E+07 [5.31; 7.10]E+07	5.01E+07 [4.23; 5.46]E+07	3.32E+06 [2.31; 3.96]E+06	6.01E+07 [4.87; 7.60]E+07	-	-	0.06
O-acetyl-homoserine	9.43E+04 [3.27; 12.90]E+04	9.20E+04 [4.82; 11.73]E+04	4.67E+04 [1.77; 8.77]E+04	4.70E+04 [3.40; 6.44]E+04	2.99E+04 [0.76; 4.48]E+04	1.68E+04 [4.29; 14.59]E+04	-	-	-

H: high; L: low; M: methionine; C: cystine; S: sulfate. Ratio Met: HM/LM; Ratio Cys: HC/LC; Ratio Sul: HS/LS. The areas indicated are means of three independent experiments.

Extreme values are indicated in bracket.

TABLE 6. Metabolomic response of *Y. lipoytica* to sulfur supply

Methionine (HM/LM)

In HM supplementation condition, some sulfur intermediates are highly accumulated. We observed that the intracellular pool of cystathionine and methionine are 10.67 fold and 6.75 fold higher in HM than in LM respectively. The pools of 5-methylthioadenosine, cysteine and spermidine are also higher in HM than in LM, but in a lesser extent (ratio of 3.32, 1.94 and 1.23 respectively).

On the contrary, the pools of γ -glutamylcysteine and serine are lower in HM than in LM (ratios of 0.61 and 0.37 respectively).

Moreover, we observed pools of two specific sulfur compounds: hypotaurine and taurine. Their pools are higher in HM than in LM (ratios of 19.91 and 4.41 respectively).

Cystine (HC/LC)

In HC versus LC, we have observed a slightly increase of hypotaurine and taurine (ratios of 2.97 and 2.39 respectively). On the contrary, pools of 5-methiothioadenosine, cystathionine and spermidine are lower in HC than in LC (ratios of 0.16, 0.22 and 0.87 respectively).

Sulfate (HS/LS)

In HS versus LS, all the pools of glutathione pathway intermediates are decreased (ratios of 0.04 for cysteine, 0.57 for cystathionine, 0.11 for γ -glutamylcysteine, 0.44 for glutathione and 0.06 for cysteinylglycine). The pool of 5-methylthioadenosine is also lower in HS than in LS (ratio of 0.28).

Discussion

Considering the three sulfur sources tested, we observed that *Yarrowia lipolytica* develops a specific response to each substrate. Consequently, we will discuss in a first part the effects of each sulfur source using three summary diagrams. In a second part, the VSCs production and the related genes will be considered. Finally, we will conclude with the regulation of sulfur metabolism regulation in hemiascomycetous yeasts.

The genes represented in the diagrams which are not differentially expressed under at least one of our six conditions are listed in supplementary material 3.

Accumulation of sulfur intermediates in methionine supply

In high methionine supply we observed an expected repression of sulfate assimilation pathway (Figure 1). The intracellular excess of sulfur is distributed between numerous sulfur intermediates, such as methionine, 5-methylthioadenosine, cystathionine and cysteine pools. Meanwhile, in high methionine supply, the serine and γ -glutamylcysteine pools are decreased. The decrease of serine pool could be a consequence of the methionine pool increase. As the indirect transsulfuration pathway leading to cysteine biosynthesis is not regulated, the increase of methionine pool could provoke a sulfur flux toward cysteine synthesis. As serine is involved in cysteine synthesis, the flux modification could be the cause of serine pool decrease.

Considering the two cysteine biosynthesis pathways (transsulfuration inverse and OAS pathways), only OAS pathway is regulated in high methionine. Interestingly, this pathway is absent in *S. cerevisiae*. *K. lactis*, a hemiascomycetous yeast closer to *S. cerevisiae*, also possess these two pathways. Meanwhile, we have observed in *K. lactis* the absence of regulation of OAS pathway and a regulation of transsulfuration pathway identical to that observed in *S. cerevisiae* (A. Hébert *et al.*, submitted for publication) (26). This suggests that cysteine biosynthesis could be differently regulated in *Y. lipolytica*.

We also observed another important metabolic difference between *Y. lipolytica* and *S. cerevisiae*. The metabolomic analysis has revealed that *Y. lipolytica* is able to produce hypotaurine and taurine. We performed an *in silico* study, which leads to the identification of the biosynthesis pathway of these compounds which is complete in *Y. lipolytica* but incomplete in *S. cerevisiae* (Figure 2). The pools of hypotaurine and taurine, which are increased in high methionine, could serve as reservoir of sulfur. Furthermore, the slight decrease of γ -glutamylcysteine in high methionine supply could be due to this sulfur flux modification toward taurine and hypotaurine. Meanwhile, as glutathione pool is not modified in these two conditions, this mechanism could also preserve glutathione concentration and availability.

Maintain of a steady state of sulfur metabolism in cystine supply

In high cystine supply, we observed a logical repression of sulfate assimilation pathway (Figure 3). The intracellular pools are rather stable, suggesting that cystine metabolism is highly regulated. In the well-studied yeast *S. cerevisiae*, it was determined that the genes

involved in sulfur metabolism are mainly regulated by the cysteine pool (18). Excess of sulfur seems to be directed to hypotaurine and taurine synthesis, thus protecting the steady state of intermediate of glutathione synthesis.

Drastic decrease of glutathione intermediates in sulfate supply

In high sulfate supply (Figure 4), we observed repression of genes involved in sulfite production, as well as overexpression of an exporter of sulfite. The produced sulfite seems to provoke an important stress, as all pools of intermediates of glutathione pathway are decreased in high sulfate. It has been demonstrated that exporter of sulfite is of first importance for sulfite resistance in *S. cerevisiae* (3).

Methionine catabolism and VSCs production conditions

VSCs production was mainly observed in high methionine supply. Concerning aminotransferases genes possibly involved in methionine catabolism (*ARO8* and *ARO9* aromatic aminotransferase genes and *BAT1* and *BAT2* branched-chain aminotransferasesaminotransferase genes), only *BAT1* is overexpressed in high methionine. Thus, this gene could be a good candidate for methionine catabolism. Bondar *et al.* has demonstrated that overexpression of *BAT1* in *Y. lipolytica* is correlated with an increase of VSCs produced (6). *BAT1* is also overexpressed in high cystine without increase of VSCs production. However, this gene, which is not principally involved in sulfur metabolism, could be overexpressed due to other metabolic regulations.

As methionine pool is increased only in high methionine, we hypothesized that methionine accumulation is associated with *BAT1* overexpression and VSCs production. Furthermore, as we did not observe an intracellular pool of KMBA, we have hypothesized it could be actively exported because of its toxic potential. We propose that the transporter *YALI0C15488g*, overexpressed in high methionine could be responsible for KMBA export. This hypothesis is supported by the previous observation of extracellular KMBA accumulation (24). This phenomenon has been suggested in *K. lactis*, where *PDR12*, encoding a carrier of long-chain acids, was overexpressed in high methionine supply (A. Hébert *et al.*, submitted for publication) (19).

KMBA can then be degraded on different VSCs, depending on the physicochemical properties of the extracellular medium (pH, redox, ionic strength).

We observed the production of H₂S only in high methionine and high sulfate. We suppose that this production in high methionine supply is due to cysteine catabolism, such as previously described (30), according to the increase of cysteine pool, whereas the production in high sulfate supply could result from sulfate assimilation pathway. The H₂S production from sulfate could be the consequence of a high sulfur flux in the sulfur assimilation pathway, leading to a H₂S leak before its incorporation into a carbon chain. These two phenomena have already been described, in cheese and wine respectively. We confirm here that H₂S production strongly depends on sulfur supply and not on differences in biosynthesis pathway. In wine, where sulfate is predominant, the H₂S will be produced through sulfate assimilation pathway (11) (28). On the contrary, in cheese, where sulfur is mainly retrieved in methionine and cysteine, the production of H₂S could arise from cysteine catabolism (27) (29).

Finally, the absence of H₂S production in high cystine was quite surprising because addition of cysteine is strictly correlated to H₂S production in several yeasts (30). As a consequence, we can postulate that cystine assimilation and/or catabolism are different from those of its reduced form cysteine.

New insights concerning genes related to sulfur metabolism

Transporters

This global study has revealed the repression of genes presenting sequence similarities with *YIL166C* and *SEO1*, encoding poorly defined transporters (Table 3). These transporters belong to the complex allantoate transporter family, including the recently defined high affinity cysteine transporter (encoded by *YCT1*) (20, 25). These results are in agreement with those of Boer *et al* (5), who have identified *YIL166c* in *S. cerevisiae* as a gene induced under sulfur limitation. These observations suggest that this transporter could be linked to sulfur metabolism. However, the specificity of *Yarrowia lipolytica* transporters are far to be understood because of phylogenetic divergences and multiplicity of transporters.

Sulfonates catabolism

In *S. cerevisiae*, *JLPI* encodes a sulfonate/alpha-ketoglutarate dioxygenase (21) involved in sulfonates catabolism which is overexpressed in sulphur starvation (37). In *Y. lipolytica*, six homologues of *JLPI* belonging to the TauD protein family (Pfam Pf02668) have been identified. All of them are repressed by the high sulphur conditions (Methionine, cysteine and sulphate). This multiplicity of genes and their strong regulation by the sulphur

supply indicate that *Y. lipolytica* rely on the sulfonates metabolism as sulphur source. This is coherent with the existence of taurine and hypotaurine pools which appeared to be modulated by the sulphur source. This is the first time to our knowledge that such pools have been described. They could contribute to the adaptation to the milk environment which is relatively rich in taurine.

Gene related to transsulfuration pathway

We noticed the repression of a poorly defined gene in H/L(MC) (*YALI0C22088g*; Table 4). The *S. cerevisiae* orthologue, which was poorly studied, presents sequence similarity with other genes related to sulfur metabolism (*CYS3*, *MET17*, *STR2* and *STR3*) that suggests its involvement in sulfur metabolism. Hansen *et al* (18) have already disrupted this gene in *S. cerevisiae*. The mutant strain is able to growth on methionine, glutathione or cystathionine. No function was attributed to the product of this gene yet. These difficulties may be attributable to the high sequences similarities with four other genes involved in sulfur metabolism. The overexpression of this gene could give interesting insight, as it was the case for branched chain and aromatic amino acid aminotransferases investigations (23).

Genes involved in “oxidoreduction” homeostasis via sulfur metabolism

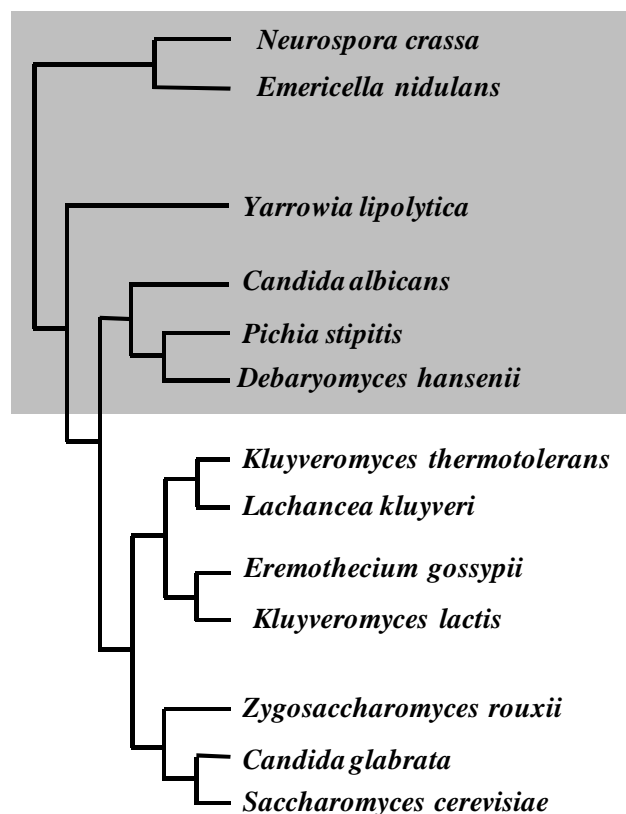
Genes encoding glutathione transferases, orthologues to fungi genes, are repressed in H/L(MCS). *PRX1*, *TSA1*, *TRX1*, encoding thioredoxin peroxidases, are essentially repressed in H/L(M). Genes poorly studied in *S. cerevisiae* are regulated in *Y. lipolytica*: *FMO1* and *MXR1*, repressed in H/L(MCS) and in H/L(M) respectively. The enzymes encoded by *FMO1* and *MXR1* are respectively involved in folding of disulfide-bond proteins in endoplasmic reticulum (33) and response to oxidative stress. Their precise role in sulfur metabolism remains to be determined.

Regulation of sulfur metabolism in yeasts

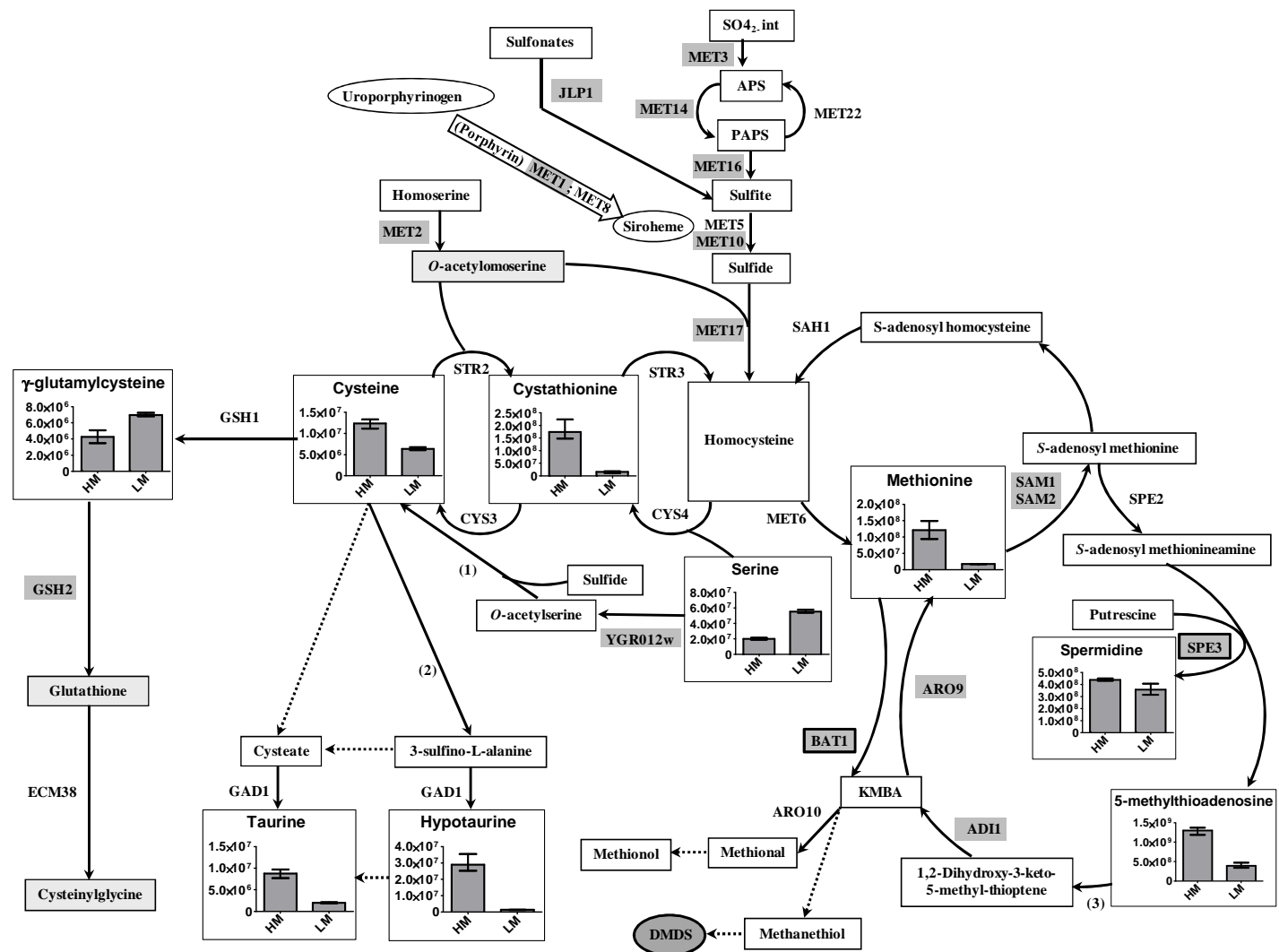
Under sulfur limitation, Boer *et al* (5) have observed the induction of numerous sulfur related transporters in *S. cerevisiae* as well as the induction of genes involved in sulfate and sulfonate utilization. The investigation of transcriptional response of *S. cerevisiae* to six nitrogen sources (4) have bring to light that genes involved in sulfur metabolism (sulfate

assimilation, transporters and regulators) are specifically repressed in methionine. An overview of *S. cerevisiae* metabolism, combining 170 chemostats and 55 cultures conditions, has been investigated by transcriptomics (26). This demonstrates that sulfur starvation leads to strong overexpression of sulfur assimilation genes while methionine supply leads to the repression of these genes. Our results confirm the specific position of *Y. lipolytica*, between the yeast model *S. cerevisiae* and fungi. Our study concerning the sulfur metabolism of the yeast *Kluyveromyces lactis* (A. Hébert *et al.*, submitted for publication) has confirmed these results. In fact, cysteine biosynthesis in *K. lactis* seems to be closer to the one of *S. cerevisiae*, while *Y. lipolytica* seems to be more similar to fungi. Meanwhile *K. lactis* also possesses the two cysteine pathways like *Y. lipolytica* and fungi, and contrary to *S. cerevisiae* (A. Hébert, S. Casaregola, and J. M. Beckerich, submitted for publication). Finally, *Yarrowia lipolytica* is of first interest for studies related to the evolution of metabolisms.

It is important to keep in mind that transcriptomic studies exclude all genes with constitutive expression. As genes involved in sulfur amino acid catabolism are possibly not related to sulfur metabolism, their regulation by sulfur supply remain hypothetical. The study of QTL characters would be a good strategy to investigate genes involved in VSCs production.

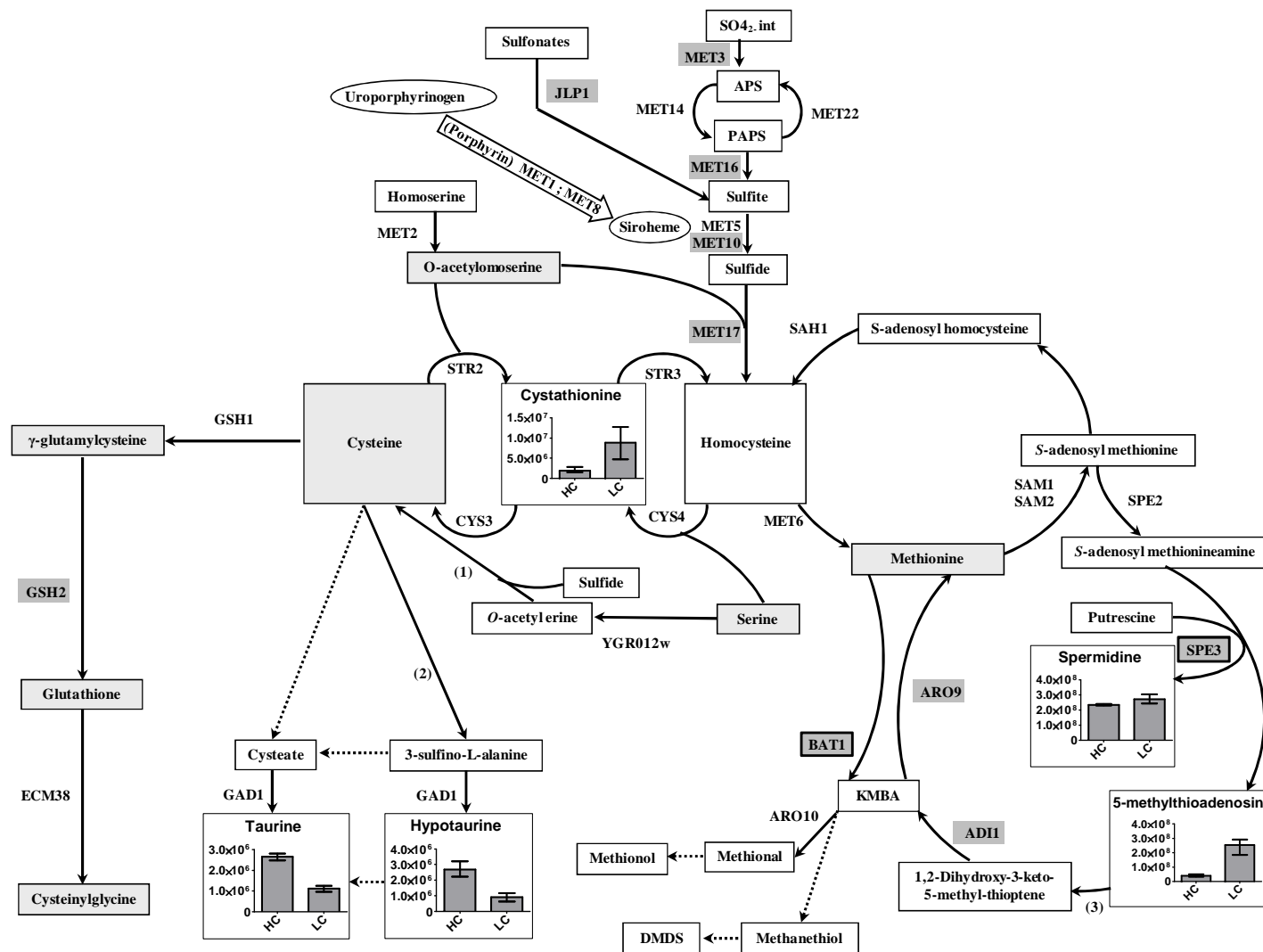


In grey: yeast with complete taurine and hypotaurine pathway
Figure 2: Phylogeny of hemiascomycetous yeasts



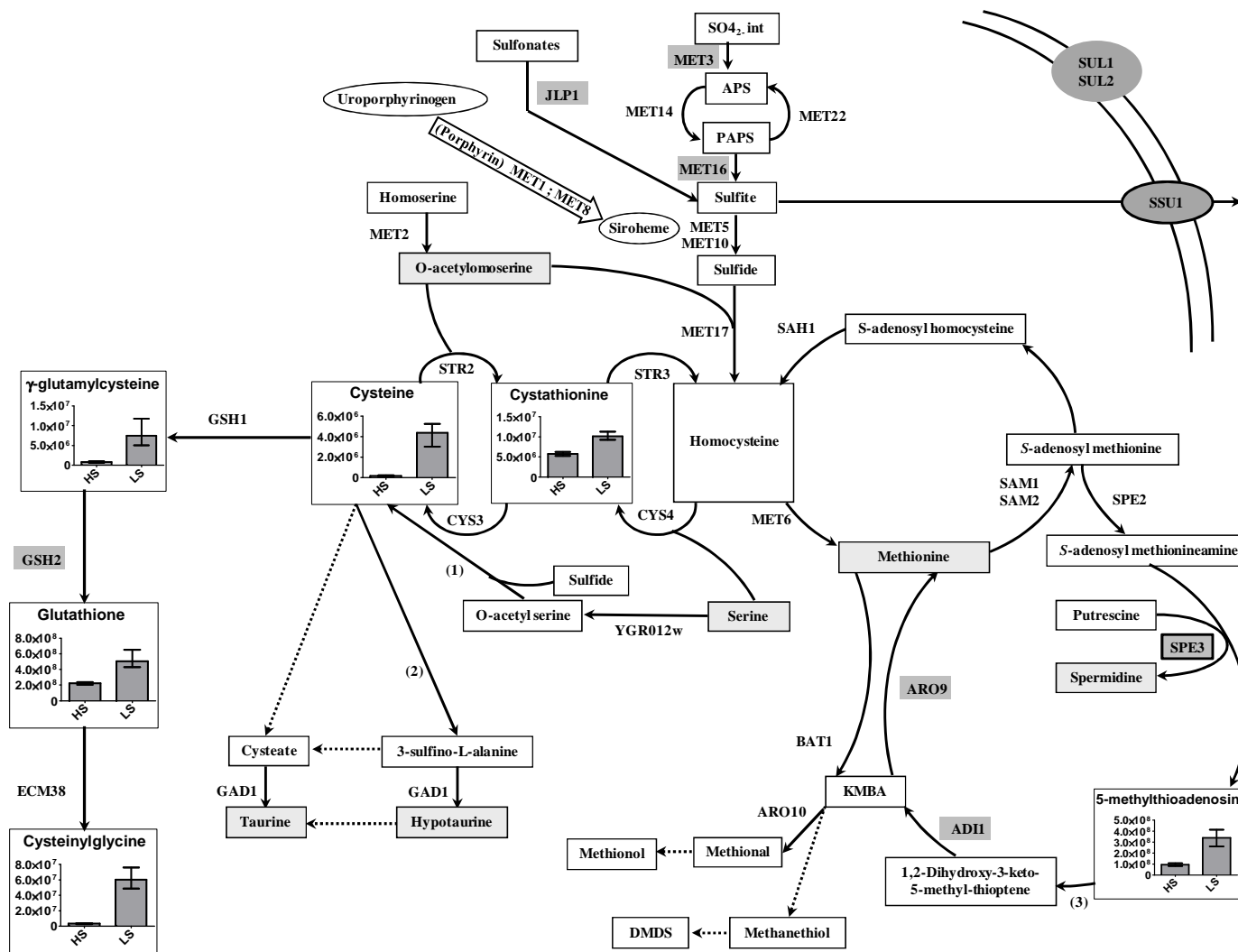
(1) Serine-O-acetyl-transferase. (2) Cysteine dioxygenase. The genes encoding these two enzymes are absent in *S. cerevisiae*. (3) Methionine salvage pathway. Genes underlined in gray are repressed in high methionine. Genes in black boxes and underlined in gray are overexpressed in high methionine. The reactions realized by not identified or an assortment of enzymes are indicated with dotted arrows. Pools of intermediates in light gray are not modified. VSCs more produced in high methionine are surrounded in black and underlined in gray. Values and error bars in histograms represent means with extremes values.

Figure 1: Overview of sulfur metabolism in *Y. lipolytica* in high versus low methionine



(1) Serine-*O*-acetyl-transferase. (2) Cysteine dioxygenase. The genes encoding these two enzymes are absent in *S. cerevisiae*. (3) Methionine salvage pathway. Genes underlined in gray are repressed in high methionine ; Genes in black boxes and underlined in gray are overexpressed in high methionine The reactions realized by not identified or an assortment of enzymes are indicated with dotted arrows. Pools of intermediates in light gray are not modified.

Figure 3: Overview of sulfur metabolism in *Y. lipolytica* in high versus low cystine



(1) Serine-*O*-acetyl-transferase. (2) Cysteine dioxygenase. The genes encoding these two enzymes are absent in *S. cerevisiae*. (3) Methionine salvage pathway. Genes underlined in gray are repressed in high methionine ; Genes in black boxes and underlined in gray are overexpressed in high methionine The reactions realized by not identified or an assortment of enzymes are indicated with dotted arrows. Pools of intermediates in light gray are not modified.

Figure 4: Overview of sulfur metabolism in *Y. lipolytica* in high versus low sulfate

Supplementary material

Supplementary material 1. Validation of transcriptomic results by quantitative PCR

Oligonucleotides	<i>S. cerevisiae</i> gene name	<i>Y. lipolytica</i> gene name	Ratio Met	Ratio Cys	Ratio Sul
CGGAGACATTGACCACTT_F TAGTTCTTTCGGATAATGGCG_R	MET3	YALI0B08184g	0.04 ± 0.02	0.19 ± 0.07	0.35 ± 0.09
ACGACAAGTTCATTTCTGACCGTT_F GGTTGGGAAGAGCTCCAGAGAT_R	ARO9	YALI0C05258g	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00
TGTCTGAGCCCATGCAA_F GCAGAGCAGTCACAAAGC_R	JLP1		0.01 ± 0.00	0.06 ± 0.04	0.06 ± 0.02
ACCGAGCGAGACGAGTA_F GGCCTCATCAATGTCACAGA_R	SPE3	YALI0E33143g	3.49 ± 0.02	2.98 ± 0.48	2.74 ± 0.19
CTCTCGGCGTCGGAACC_F GTTGGCTCCCAGCTTCTTGT_R	BAT1	YALI0D01265g	3.57 ± 1.27	3.37 ± 0.51	-
ACCATGATTCTTCCCATCG_F TGACAAACCCAAAGGCG_R	SSU1	YALI0E24167g	-	-	29.79 ± 4.29
TCCAGGCCGTCCTCTCCCF_F GGCCAGCCATATCGAGTCGCA_R	ACT1		-	-	-

Ratio Met: high/low methionine; Ratio Cys: high /low cystine; Ratio Sul: high/low sulfate.

Values indicated are means of three experiments, with ecart-type.

Supplementary material 2 . Global results of transcriptomic study

A.

Genes differentially expressed	-	+
450 genes in HM/LM	243	207
213 genes in HC/LC	131	82
151 genes in HS/LS	100	51

H: high; L: low; M: methionine; C: cystine ; S:sulfate.

B.

Genes differentially expressed	516	
	278 -	238 +
Unknown / Poorly defined	32.6%	28.3%
Miscellaneous metabolism	19.1%	6.3%
Sulfur metabolism	10.1%	0.8%
Cell organization	8.3%	2.5%
Stress	7.2%	0.4%
Sulfur related transport	6.5%	0.8%
Transport	6.1%	0.8%
Protein modification	4.7%	5.5%
Maintenance	2.2%	5.9%
Protein biosynthesis related	1.1%	44.1%
Amino acids bioynthesis	0.7%	2.5%
Catabolism	0.7%	0%
Transcription	0.7%	2.1%

Supplementary material 3. Genes involved in sulfur metabolism not regulated in our experimental conditions

<i>S. cerevisiae</i> gene name	<i>Y. lipolytica</i> gene name	Function-description (SGD)
MET5	YAL10D11176g	Sulfite reductase beta subunit
MET 8	YALI0E11385g	Bifunctional dehydrogenase and ferrochelatase
MET22	YALI 0F27665g	Bisphosphate-3'-nucleotidase
STR 2	YALI 0D17402g	Cystathionine gamma-synthase
STR3	YALI 0D00605g	Cystathionine beta-lyase
CYS3	YALI 0F05874g	Cystathionine gamma-lyase
CYS4	YALI 0E09108g	Cystathionine beta-synthase
GAD1	YALI0F08415g	Glutamate decarboxylase
GSH1	YALI 0E30129g	Gamma glutamylcysteine synthetase
ECM38	YALI0C11363g	Gamma-glutamyltranspeptidase
MET6	YALI 0E12683g	Cobalamin-independent methionine synthase
SAH1	YALI 0F11759g	S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase
SPE2	YALI 0E20361g	S-adenosylmethionine decarboxylase
ARO10	YALI 0D06930g	Phenylpyruvate decarboxylase
(1)	YALI 0C24233g	Serine-O-acetyl-transferase
(2)	YALI0F11627g	cysteine dioxygenase

(1) and (2): genes absent in *S. cerevisiae*.

References

1. **Wood A. F., J. W. Aston, and G. K. Douglas.** 1985. The determination of free aminoacids in cheese by capillary column gas liquid chromatography. *Aust. J. Dairy Technol.*
2. **Arfi K., S. Landaud, and P. Bonnarme.** 2006. Evidence for distinct L-methionine catabolic pathways in the yeast *Geotrichum candidum* and the bacterium *Brevibacterium linens*. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**:2155-62.
3. **Avram D., and A. T. Bakalinsky.** 1997. SSU1 encodes a plasma membrane protein with a central role in a network of proteins conferring sulfite tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **179**:5971-5974.
4. **Boer V. M., S. L. Tai, Z. Vuralhan, Y. Arifin, M. C. Walsh, M. D. W. Piper, J. H. de Winde, J. T. Pronk, and J. M. Daran.** 2007. Transcriptional responses of *Saccharomyces cerevisiae* to preferred and nonpreferred nitrogen sources in glucose-limited chemostat cultures. *FEMS Yeast Res.* **7**:604-620.
5. **Boer V. M., J. H. de Winde, J. T. Pronk, and M. D. W. Piper.** 2003. The genome-wide transcriptional responses of *Saccharomyces cerevisiae* grown on glucose in aerobic chemostat cultures limited for carbon, nitrogen, phosphorus, or sulfur. *J. Biol. Chem.* **278**:3265-74.
6. **Bondar D. C., J. M. Beckerich, and P. Bonnarme.** 2005. Involvement of a branched-chain aminotransferase in production of volatile sulfur compounds in *Yarrowia lipolytica*. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:4585-91.
7. **Bonnarme P., C. Lapadatescu, M. Yvon, and H. E. Spinnler.** 2001. L-methionine degradation potentialities of cheese-ripening microorganisms. *J. Dairy Res* **68**:663-674.

8. **Bonnarme P., L. Psoni, and H. E. Spinnler.** 2000. Diversity of L-methionine catabolism pathways in cheese-ripening bacteria. *Appl. Environ. Microbiol* **66**:5514-5517.
9. **Chan S. Y., and D. R. Appling.** 2003. Regulation of S-adenosylmethionine levels in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **278**:43051-9.
10. **Cholet O., A. Hénaut, 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**:2561-70.
11. **Cordente A. G., A. Heinrich, I. S. Pretorius, and J. H. Swiegers.** 2009. Isolation of sulfite reductase variants of a commercial wine yeast with significantly reduced hydrogen sulfide production. *FEMS Yeast Res.* **9**:446-459.
12. **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.
13. **Delmar P., S. Robin, and J. J. Daudin.** 2005. VarMixt: efficient variance modelling for the differential analysis of replicated gene expression data. *Bioinformatics* **21**:502-508.
14. **Dujon B.** 2006. Yeasts illustrate the molecular mechanisms of eukaryotic genome evolution. *Trends. Genet.* **22**:375-87.
15. **Godard P., A. Urrestarazu, S. Vissers, K. Kontos, G. Bontempi, J. van Helden, and B. Andre.** 2007. Effect of 21 different nitrogen sources on global gene expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **27**:3065-3086.
16. **Gonzalez-Lopez C. I., R. Szabo, S. Blanchin-Roland, and C. Gaillardin.** 2002. Genetic control of extracellular protease synthesis in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Genetics* **160**:417-427.
17. **Guerzoni M. E., R. Lanciotti, L. Vannini, F. Galgano, F. Favati, F. Gardini, and G. Suzzi.** 2001. Variability of the lipolytic activity in *Yarrowia lipolytica* and its dependence on environmental conditions. *Int. J. Food Microbiol* **69**:79-89.
18. **Hansen J., and P. F. Johannesen.** 2000. Cysteine is essential for transcriptional regulation of the sulfur assimilation genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* **263**:535-542.
19. **Hazelwood L. A., S. L. Tai, V. M. Boer, J. H. de Winde, J. T. Pronk, and J. M. Daran.** 2006. A new physiological role for Pdr12p in *Saccharomyces cerevisiae*: export of aromatic and branched-chain organic acids produced in amino acid catabolism. *FEMS Yeast Res.* **6**:937-45.
20. **Hellborg L., M. Woolfit, M. Arthursson-Hellborg, and J. Piskur.** 2008. Complex evolution of the DAL5 transporter family. *BMC Genomics* **9**:164.
21. **Hogan D. A., T. A. Auchtung, and R. P. Hausinger.** 1999. Cloning and characterization of a sulfonate/alpha-ketoglutarate dioxygenase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **181**:5876-5879.
22. **Jacquemin-Faure I., D. Thomas, J. Laporte, C. Cibert, and Y. Surdin-Kerjan.** 1994. The vacuolar compartment is required for sulfur amino acid homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* **244**:519-529.
23. **Kagkli D. M., P. Bonnarme, C. Neuvéglise, T. M. Cogan, and S. Casaregola.** 2006. L-methionine degradation pathway in *Kluyveromyces lactis*: identification and functional analysis of the genes encoding L-methionine aminotransferase. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**:3330-5.
24. **Kagkli D. M., R. Tâche, T. M. Cogan, C. Hill, S. Casaregola, and P. Bonnarme.** 2006. *Kluyveromyces lactis* and *Saccharomyces cerevisiae*, two potent deacidifying and volatile-sulphur-aroma-producing microorganisms of the cheese ecosystem. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **73**:434-42.
25. **Kaur J., and A. K. Bachhawat.** 2007. Yct1p, a novel, high-affinity, cysteine-specific transporter from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **176**:877-90.
26. **Knijnenburg T. A., J. M. G. Daran, M. A. van den Broek, P. A. Daran-Lapujade, J.**

- H. de Winde, J. T. Pronk, M. J. T. Reinders, and L. F. A. Wessels.** 2009. Combinatorial effects of environmental parameters on transcriptional regulation in *Saccharomyces cerevisiae*: a quantitative analysis of a compendium of chemostat-based transcriptome data. *BMC Genomics* **10**:53.
27. **Lандаud S., S. Helinck, and P. Bonnarme.** 2008. Formation of volatile sulfur compounds and metabolism of methionine and other sulfur compounds in fermented food. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **77**:1191-205.
28. **Linderholm A. L., C. L. Findleton, G. Kumar, Y. Hong, and L. F. Bisson.** 2008. Identification of genes affecting hydrogen sulfide formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**:1418-27.
29. **Lopez del Castillo Lozano M., R. Tâche, P. Bonnarme, and S. Landaud.** 2007. Evaluation of a quantitative screening method for hydrogen sulfide production by cheese-ripening microorganisms: the first step towards l-cysteine catabolism. *J. Microbiol. Methods* **69**:70-7.
30. **Lopez del Castillo-Lozano M., A. Delile, H. E. Spinnler, P. Bonnarme, and S. Landaud.** 2007. Comparison of volatile sulphur compound production by cheese-ripening yeasts from methionine and methionine-cysteine mixtures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **75**:1447-54.
31. **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.
32. **Smith C. A., E. J. Want, G. O'Maille, R. Abagyan, and G. Siuzdak.** 2006. XCMS: processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification. *Anal. Chem.* **78**:779-787.
33. **Suh J. K., L. L. Poulsen, D. M. Ziegler, and J. D. Robertus.** 1999. Yeast flavin-containing monooxygenase generates oxidizing equivalents that control protein folding in the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**:2687-2691.
34. **Suzzi G., M. T. Lanorte, F. Galgano, C. Andrighetto, A. Lombardi, R. Lanciotti, and M. E. Guerzoni.** 2001. Proteolytic, lipolytic and molecular characterisation of *Yarrowia lipolytica* isolated from cheese. *Int. J. Food Microbiol* **69**:69-77.
35. **Wood A. F., J. W. Aston, and G. K. Douglas.** 1985. The determination of free aminoacids in cheese by capillary column gas liquid chromatography. *Aust. J. Dairy Technol.* **40**:166-169.
36. **Yang Y. H., S. Dudoit, P. Luu, D. M. Lin, V. Peng, J. Ngai, and T. P. Speed.** 2002. Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. *Nucleic Acids Res.* **30**:e15.
37. **Zhang N., C. Merlotti, J. Wu, T. Ismail, A. N. El-Moghazy, S. A. Khan, A. Butt, D. C. Gardner, P. F. Sims, and S. G. Oliver.** 2001. Functional Analysis of six novel ORFs on the left arm of Chromosome XII of *Saccharomyces cerevisiae* reveals three of them responding to S-starvation. *Yeast* **18**:325-334.

Acknowledgments

This work was supported by the EcoMet program (ANR-06-PNRA-014) funded by the French National Research Agency (ANR). AH and MPF are grateful to the ANR (French National Research Agency: www.agence-nationale-recherche.fr <<http://www.agence-nationale-recherche.fr/>>) for a PhD scholarship. We would also like to thank Armelle Delile, Roselyne Tâche and Emmanuelle Rebours for their helpful technical assistance.

II. D. Conclusion

La présentation de ces résultats sous forme d'articles séparés nous a conduit à étudier de façon approfondie le métabolisme du soufre de chaque levure. Nous n'avons cependant pas eu l'occasion de réaliser une étude comparative du métabolisme du soufre chez *K. lactis* et *Y. lipolytica*. Nous allons donc nous y employer à travers cette conclusion.

Chez *Y. lipolytica*, nous observons une forte diminution des pools des intermédiaires de la voie du glutathion lors d'un apport élevé en sulfate d'ammonium. Concernant *K. lactis*, même si les concentrations de sulfate utilisées sont beaucoup plus faibles, nous observons également une baisse de la concentration des pools des intermédiaires de la voie du glutathion (concentration élevée versus faible). Ceci suggère que le sulfate d'ammonium générerait un stress chez les deux levures. Ce stress pourrait être dû à une production de sulfite trop importante. La surexpression d'un exportateur de sulfite chez *Y. lipolytica* va dans le sens de cette hypothèse.

La réponse des deux levures aux concentrations de cystine utilisées est totalement différente. Actuellement, nous n'avons pas d'hypothèse pertinente pour expliquer ce phénomène. Nous ne nous attarderons donc pas sur cette condition.

Nous avons constaté que la comparaison la plus pertinente est celle de *K. lactis* et *Y. lipolytica* dans les conditions d'apport en méthionine (concentration élevée versus faible) (Figure 23). En effet, de nombreux gènes sont différentiellement exprimés de manière similaire chez les deux levures, notamment au niveau de la voie d'assimilation du sulfate (activation et réduction) et de l'utilisation des sulfonates. Les pools de la majorité des intermédiaires soufrés discutés dans ce travail fluctuent aussi de la même manière chez *K. lactis* et *Y. lipolytica*, ainsi que la production de composés soufrés volatils.

Il existe cependant des différences flagrantes au niveau du métabolisme du soufre chez ces deux levures. Nous avons identifié précédemment deux voies de synthèse de la cystéine chez les levures *K. lactis* et *Y. lipolytica* (I. D). Cependant, nous avons observé que seule la voie de transsulfuration (directe et inverse) est régulée chez *K. lactis*, conduisant à une forte accumulation de cystathionine, ainsi qu'une augmentation plus modérée, des intermédiaires de la voie du glutathion. Chez *Y. lipolytica*, seule la voie de l'*O*-acétylsérine est régulée. Nous observons une accumulation de cystathionine, mais plus faible que chez *K. lactis*. Chez *Y. lipolytica*, le flux de soufre est dirigé vers la synthèse d'hypotaurine et de taurine, limitant la modification des pools des intermédiaires de la voie du glutathion. Nous avons déterminé

précédemment que cette voie de synthèse est incomplète chez *K. lactis*.

Nous avons aussi observé des différences au niveau de l'expression des gènes codant pour les aminotransférases potentiellement impliquées dans le catabolisme de la méthionine et donc de la production de composés soufrés volatils. En effet, nous avons observé la surexpression des gènes codant pour une aminotransférase à acides aminés aromatiques chez *K. lactis* (*ARO8-2*) et respectivement à acides aminés branchés chez *Y. lipolytica* (*BATI*). Ceci pourrait être une piste pour l'étude des différentes capacités aromatiques de ces levures. De plus, nous avons constaté que l'augmentation du pool de méthionine serait indispensable à la production des CSVs. Nous avons aussi émis l'hypothèse que le KMBA, formé lors de la première étape de dégradation de la méthionine, pourrait être exporté dans le milieu extracellulaire puis transformé en composés soufrés volatils.

Nous avons mis en évidence les différents effets de 3 sources de soufres chez chaque levure, mais aussi les différents effets d'une même source de soufre selon la levure étudiée. Ce travail montre qu'il est intéressant d'avoir des outils de comparaison inter-espèces pour avoir une vision affinée d'un métabolisme donné.

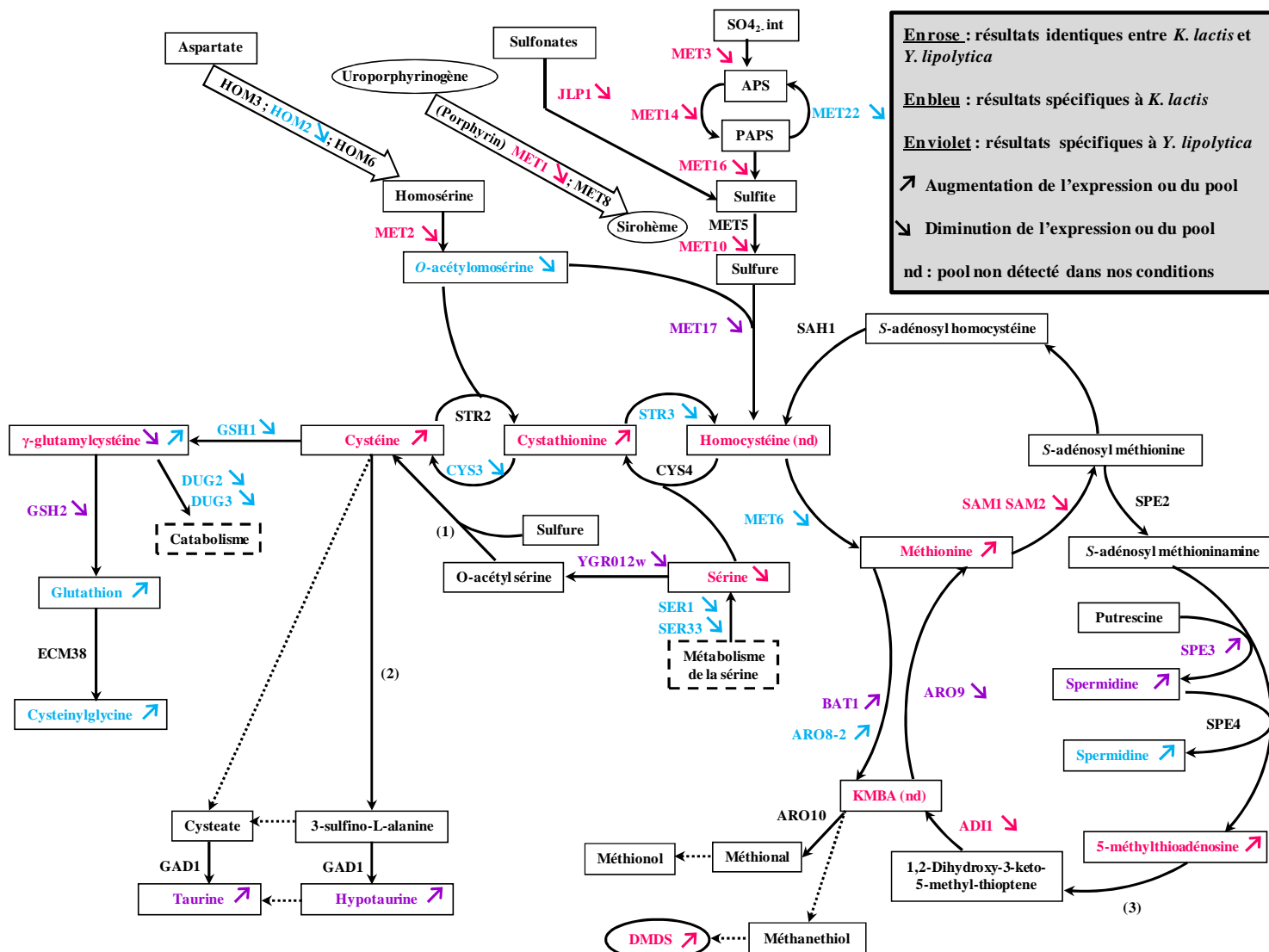


Figure 23. Métabolisme du soufre chez *K. lactis* et *Y. lipolytica* : effet d'une forte concentration en méthionine comparée à une faible concentration en méthionine.

(1) Cystéine synthase (2) Cystéine dioxygénase (3) Voie de recyclage de la méthionine.

III. Etude de l'interaction entre *Kluyveromyces lactis* et *Brevibacterium aurantiacum*

III. A. Introduction

Nous avons étudié le métabolisme du soufre chez deux levures d'affinage, notamment pour acquérir de nouvelles connaissances sur la production de composés soufrés volatils indispensables à la flaveur des fromages. Cependant, dans les conditions fromagères, les micro-organismes constituent un écosystème complexe en évolution constante. La croissance de chaque partenaire de cet écosystème influe sur celle des autres, ainsi que sur leur métabolisme. La richesse de l'écosystème fromager rend ces interactions microbiennes difficiles à analyser. Cependant, cet aspect ne doit pas être négligé.

Nous avons donc choisi d'étudier l'interaction entre deux micro-organismes d'affinage, *Kluyveromyces lactis* et *Brevibacterium aurantiacum*, dans un milieu chimiquement défini (MCD) supplémenté en méthionine et en cystine. Le métabolisme du soufre de la bactérie d'affinage *Brevibacterium aurantiacum* a lui aussi été amplement étudié lors de la thèse de Marie-Pierre FORQUIN (Forquin, 2010). Notre partenaire, Valentin LOUX, qui a mis au point les sets d'oligonucléotides pour la création des puces à ADN de *K. lactis* et *B. aurantiacum*, a veillé à ce que l'étude de micro-organismes en association par transcriptomique puisse être réalisée. Pour cela, chaque oligonucléotide a été réalisé de manière à éviter les hybridations croisées avec le génome de l'autre espèce.

Nous avons ainsi pu étudier cette interaction à un niveau transcriptionnel, mais aussi par la mesure de paramètres physiologiques et biochimiques. Ces travaux sont réalisés en miroir avec ceux de la thèse de Marie-Pierre FORQUIN. Nous avons respectivement comparé les cultures pures de *K. lactis* et *B. aurantiacum* à la co-culture afin de mettre en évidence les possibles interactions métaboliques.

III. B. Résultats-Discussion : Interaction entre *K. lactis* et *B. aurantiacum*

*Croissances de *K. lactis* et *B. aurantiacum**

Nous avons suivi la croissance en MCD, supplémenté en méthionine (10 mM) et en cystine (1mM), de chaque micro-organisme en culture pure ainsi qu'en association par dénombrement (Figure 24-A).

Nous avons observé que la croissance de *K. lactis* n'est pas affectée par celle de *B. aurantiacum*. *K. lactis* se développe exponentiellement de 0h à 58h de culture, avec un temps de doublement de 3h20' dans la monoculture et la coculture, jusqu'à une biomasse d'environ 6.10^8 UFC/ml. Sa croissance est alors fortement ralentie jusqu'à 78h de culture ($X_{78h}=10^9$ UFC/ml). Nous pouvons souligner que *K. lactis* possède une remarquable capacité d'adaptation à son environnement.

Au contraire, la croissance de *K. lactis* influence fortement celle de *B. aurantiacum*. Lors des 30 premières heures de culture, la croissance de *B. aurantiacum* est stimulée en présence de *K. lactis*. En effet, le temps de doublement passe de 5h en culture pure à 3h en co-culture. Cette observation suggère une interaction de type commensalisme en faveur de la bactérie. Cependant, la phase exponentielle de *B. aurantiacum* est plus courte en co-culture (30h) qu'en culture pure (58h), suggérant un phénomène de limitation et/ou d'inhibition à partir de 30h en co-culture. Cette hypothèse est renforcée par une chute des UFC/ml en co-culture, au-delà de 58h de culture. Ceci nous indique la présence d'interactions complexes entre les deux micro-organismes, se traduisant par une première phase de commensalisme suivie par une phase de compétition et/ou d'amensalisme affectant uniquement *B. aurantiacum*.

Evolution du pH

Nous avons mesuré le pH dans les deux cultures pures ainsi que dans la culture en association (Figure 24-B). Le pH initial de chaque culture est proche de 7,0. Nous avons constaté que le pH est stable jusqu'à 30 heures dans les cultures pures ainsi que dans la co-culture. Nous avons observé que le pH est assez stable (varie entre 6,8 et 7,2) lors de la croissance de *K. lactis*, avec une légère chute suivie d'une remontée. Au contraire, le pH augmente lors de la croissance de *B. aurantiacum* (jusque 7,8). Durant la croissance de la co-culture, le pH est assez stable (varie entre 6,8 et 7,2), avec un profil inverse de celui de *K. lactis* en culture pure (une augmentation suivie d'une chute).

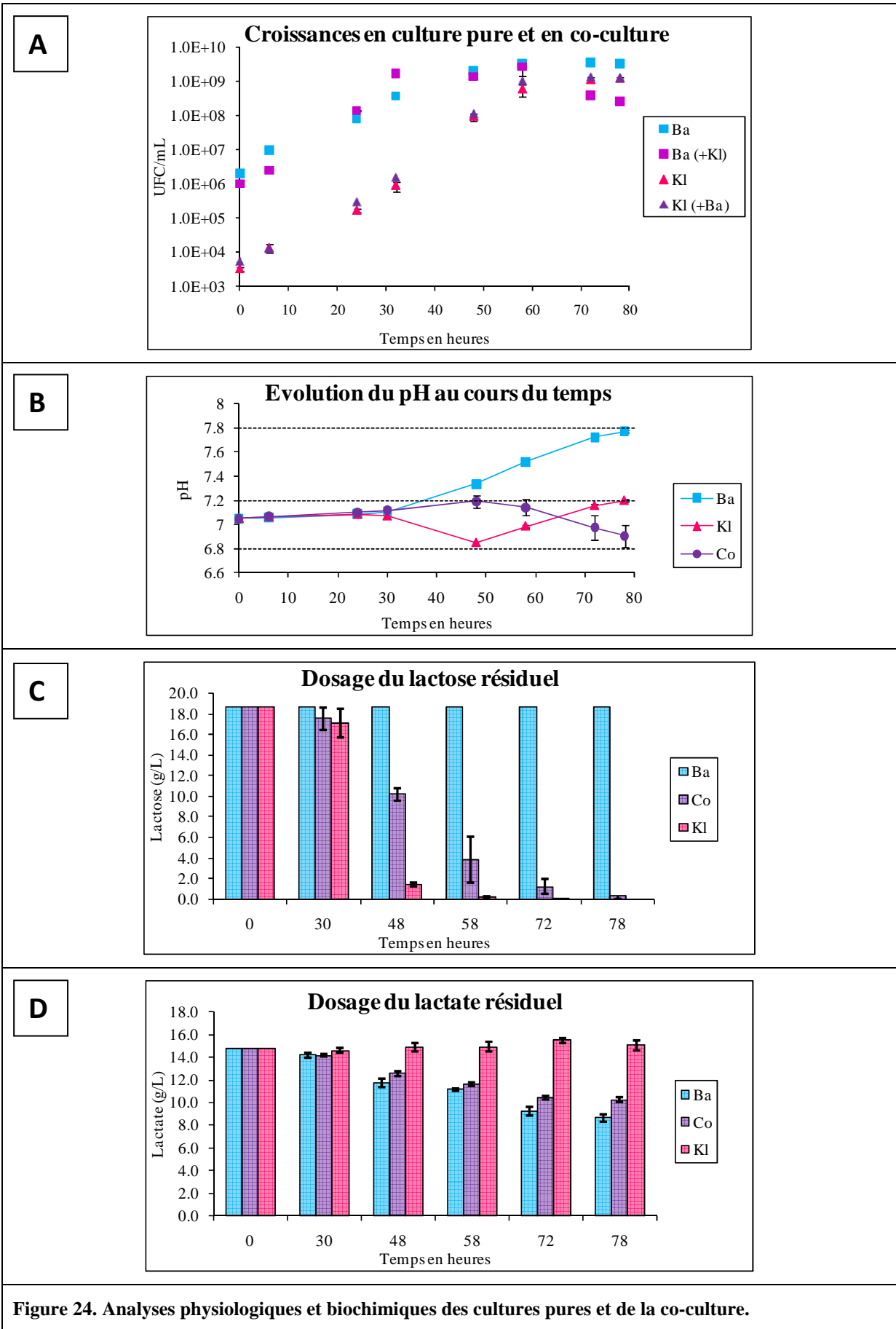
Consommation des sources de carbone et des acides aminés.

Nous avons dosé la présence résiduelle des deux sources de carbone, le lactose et le lactate (Figure 24-C et -D respectivement), ainsi que des acides aminés dans le milieu (Tableau 11). Le dosage du lactose et du lactate a révélé que, dans nos conditions, *K. lactis* et *B. aurantiacum* consomment respectivement le lactose et le lactate. Nous avons constaté que la consommation de lactate est corrélée à l'augmentation du pH lors de la croissance de *B. aurantiacum* en culture pure.

K. lactis consomme moins rapidement le lactose en co-culture qu'en culture pure. De plus, il n'y a pas de corrélation entre la consommation du lactate et le pH en co-culture. Ceci suggère des changements drastiques au niveau du métabolisme carboné. La croissance de *B. aurantiacum*, étant stimulée en co-culture jusqu'à 30h de culture nous pouvons émettre l'hypothèse que la levure synthétiserait au minimum un produit stimulant la bactérie en tant que substrat alternatif ou complément métabolique.

	<i>B. aurantiacum</i>	Co-culture	<i>K. lactis</i>	Co – (BA+KL)
Arginine	100.0	100.0	100.0	-100.0
Glutamine	95.3	71.2	14.9	- 39.0
Glutamate	91.9	81.9	38.3	- 48.3
Lysine	33.0	51.1	61.4	- 43.3
Thréonine	29.5	44.6	51.9	- 36.8
Asparagine	46.3	43.3	32.5	- 35.5
Isoleucine	33.3	45.9	31.3	- 18.7
Leucine	38.2	48.8	39.6	- 29.0
Méthionine	29.0	49.4	47.7	- 27.3
Phénylalanine	34.1	40.9	15.4	- 8.6
Sérine	32.8	39.6	28.7	- 21.9
Alanine	21.9	13.4	0.0	- 8.5
Glycine	30.1	33.0	5.4	- 2.5
Proline	33.2	34.3	7.7	- 6.6
Tyrosine	28.5	36.5	11.1	- 3.1
Valine	28.5	35.8	10.5	- 3.2
Cystéine	38.8	55.7	11.8	+5.1
Histidine	-	-	-	-
Tryptophane	-	-	-	-

Tableau 11. Consommation des acides aminés par la co-culture et les cultures pures (%).



Nous avons effectué des calculs théoriques de biomasse, en nous appuyant sur les relations établies lors de l'étude de *S. cerevisiae* (1g de matière sèche = $2,5 \times 10^8$ levures), ainsi que de rendement de croissance et de production d'éthanol sur lactose (Tableau 12) pour tenter de déterminer l'état physiologique de *K. lactis* en culture pure (Figure 25-A) et en co-culture (Figure 25-B).

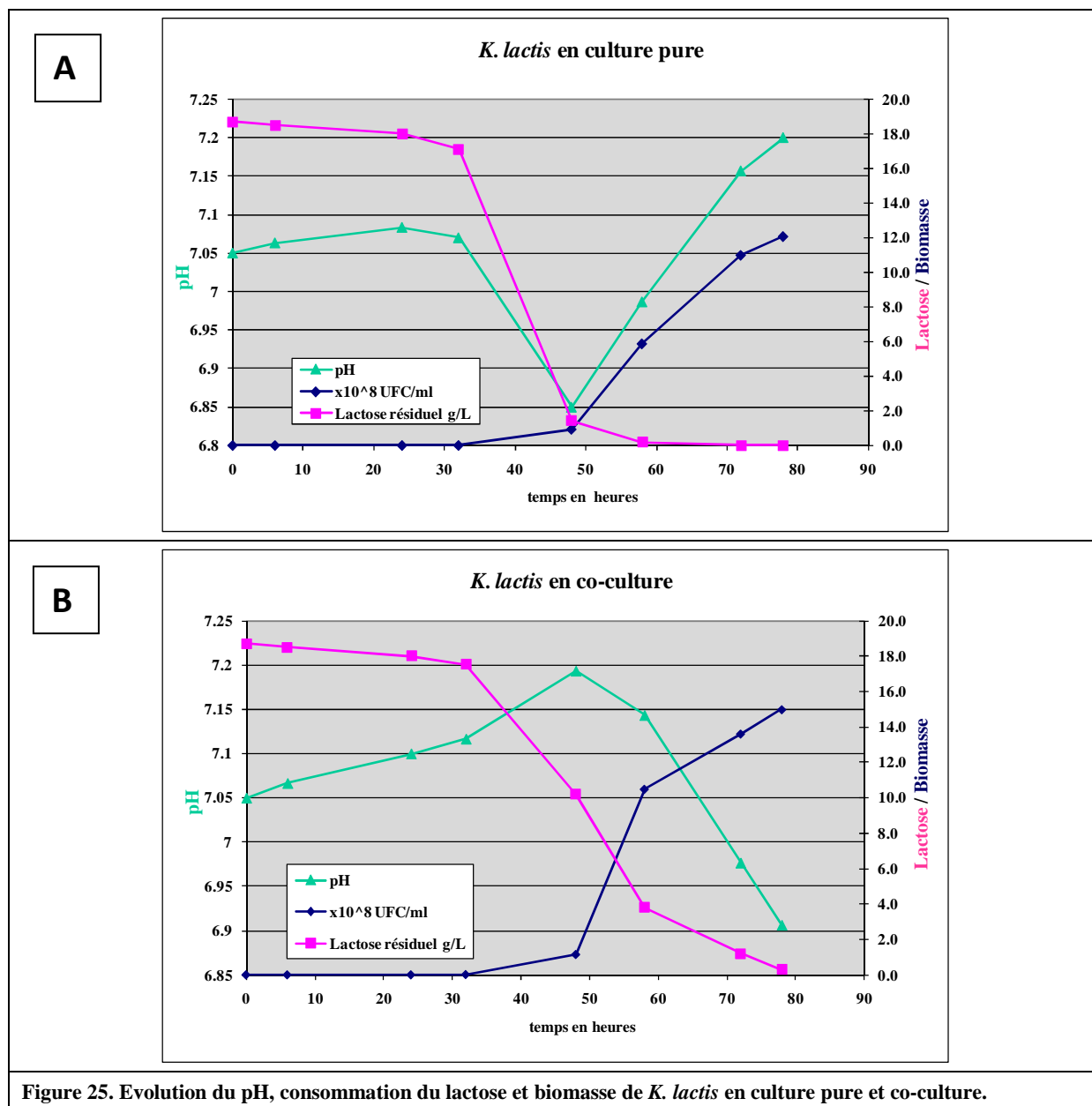


Figure 25. Evolution du pH, consommation du lactose et biomasse de *K. lactis* en culture pure et co-culture.

	58h				58h à 78h
<i>K. lactis</i>	Biomasse (g/l)	Lactose consommé (g/l)	Rendement de croissance en lactose (g/g)	Rendement de la production d'éthanol sur lactose (g/g)	Biomasse (g/l)
En culture pure	2,35	18	0,12	0,40	2,5
En co-culture	2,35	14	0,32	0,24	2,5

Tableau 12. Rendements de biomasse et de production d'éthanol chez *K. lactis* en culture pure et co-culture.

Ces données nous indiquent que *K. lactis* possède un métabolisme respiro-fermentaire en culture pure jusque 58h de croissance. Durant cette phase *K. lactis* se développe sur lactose comme source de carbone. Après 58h, la levure se développe plus lentement (phase de ralentissement) en consommant probablement un substrat alternatif comme source de carbone et d'énergie. Ce substrat alternatif assure une croissance plus lente mais avec un bon rendement de croissance. Cette deuxième phase de croissance pourrait être une phase de re-consommation d'éthanol par un métabolisme purement respiratoire. Le dosage d'éthanol n'ayant pas été effectué après 58h de culture cette hypothèse reste donc à confirmer. Le co-métabolisme lactose-éthanol est tout à fait envisageable chez *K. lactis* puisque les gènes codant pour les alcools déshydrogénases mitochondriales sont exprimés même en présence de sucre chez cette levure (Breunig *et al.*, 2000).

Par ailleurs, le milieu utilisé étant très riche en acides aminés, nous pouvons aussi émettre l'hypothèse que *K. lactis* pourrait utiliser un et/ou plusieurs acides aminés comme source alternative de carbone et d'énergie pendant cette deuxième phase de croissance. La remontée du pH en fin de culture pure est cohérente avec cette hypothèse, vu que le catabolisme des acides aminés génère de l'ammoniac.

Lors de la croissance de *K. lactis* en coculture, nous avons constaté que la vitesse de consommation du lactose est plus lente tandis que les paramètres de croissance restent inchangés. Si nous considérons que le lactose est la seule source de carbone utilisée par *K. lactis*, son métabolisme respiro-fermentaire serait plus respiratoire qu'en culture pure (Tableau 12). Cependant, ces résultats sont très surprenants puisqu'en co-culture la disponibilité en oxygène devrait être moindre, *B. aurantiacum* étant aérobic stricte. Ainsi, nous avons émis l'hypothèse qu'en co-culture un produit du métabolisme de la bactérie pourrait être métabolisé par la levure. Ceci expliquerait le ralentissement de l'assimilation du lactose et l'obtention d'un rendement de croissance « apparent » sur lactose très élevé, donc sur-estimé.

Lors du dosage des acides aminés (Tableau 11), nous avons détecté 17 des 19 acides aminés contenus dans le milieu. Il est important de noter que les acides aminés sont la principale source d'azote de ce milieu (l'apport en azote par les acides aminés est 22 fois supérieur à celui du citrate d'ammonium). Les acides aminés peuvent être utilisés comme source d'azote et/ou de carbone par les micro-organismes. Nous avons observé une consommation totale (ou une concentration inférieure au seuil de détection) de l'arginine dans

les cultures pures ainsi que dans la co-culture. Nous avons constaté que la consommation de chaque acide aminé en co-culture est inférieure à la somme de la consommation de chaque acide aminé dans les deux cultures pures. Ceci suggère un changement de métabolisme se traduisant par la diminution de la consommation des acides aminés chez *K. lactis* et/ou *B. aurantiacum*.

Nous avons identifié les trois acides aminés les plus et les moins consommés dans les cultures pures et dans la co-culture. Nous avons observé que les trois acides aminés les plus consommés (arginine, glutamine, glutamate) en co-culture sont les mêmes que chez *B. aurantiacum*, tandis que les trois acides aminés les moins consommés (alanine, glycine, proline) en co-culture sont les mêmes que chez *K. lactis*. L'analyse de la consommation des acides aminés a révélé que les acides aminés les plus consommés en culture pure par les deux micro-organismes présentent une consommation moindre en co-culture, suggérant que *B. aurantiacum* et/ou *K. lactis* s'adapte(nt) à la présence de l'autre micro-organisme, en réduisant sa consommation et/ou en produisant les acides aminés pour lesquels la compétition est la plus forte. Au contraire, cet effet est faible voire quasi inexistant pour les acides aminés les moins consommés. Nous avons observé une consommation légèrement supérieure de la cystéine en co-culture en comparaison à celle des deux cultures pures. Cet acide aminé est le seul pour lequel nous avons observé ce profil.

Le profil d'assimilation des acides aminés en co-culture étant beaucoup plus proche de celui de *B. aurantiacum* que de celui de *K. lactis*, nous pouvons émettre l'hypothèse d'une consommation majoritaire des acides aminés par la bactérie en culture pure et en co-culture, produisant dans les deux cas de l'ammoniac. En co-culture, cet ammoniac pourrait être assimilé par *K. lactis*. Cet apport d'azote provoquerait une diminution de la consommation des acides aminés par la levure. Cette production d'ammoniac par la bactérie couplée à une re-consommation par la levure semble assez cohérente avec le profil du pH en co-culture (pas de forte augmentation du pH). Par ailleurs, la production d'ammoniac par *B. aurantiacum* en culture pure peut aussi expliquer l'augmentation du pH, en plus de la consommation du lactate.

Analyse du transcriptome par Puces à ADN.

Nous avons complété ces analyses biochimiques par l'étude du transcriptome à 58h de la co-culture par rapport à chaque culture pure. Nous avons observé 323 et 509 gènes différentiellement exprimés chez *K. lactis* (Tableau 13 et Tableau 14) et *B. aurantiacum* (Tableau 15 et Tableau 16) respectivement. Le nombre de gènes différentiellement exprimés étant important, nous avons choisi dans un premier temps de nous focaliser sur les voies métaboliques en relation avec les observations biochimiques précédentes et sur les voies métaboliques dont les gènes sont différentiellement exprimés chez les deux micro-organismes (métabolisme du carbone, des acides aminés et de la biotine).

Métabolisme du carbone

En accord avec les résultats biochimiques, nous avons observé des modifications du métabolisme carboné chez les deux micro-organismes. Pour *K. lactis* ceci se traduit par la répression des gènes impliqués dans le cycle de Krebs, le cycle du glyoxylate et la gluconéogenèse, ainsi que par la surexpression des gènes impliqués dans la fermentation en co-culture. Nous avons émis l'hypothèse que la présence de la population bactérienne aérobie stricte rend l'accessibilité à l'oxygène plus difficile en co-culture.

Les mesures d'éthanol effectuées dans nos trois conditions montrent d'une part qu'il n'y a pas de production d'éthanol par *B. aurantiacum*, et que d'autre part la concentration en éthanol mesurée dans la culture pure de *K. lactis* est plus élevée que dans la co-culture (7,8g/L et 4,5g/L respectivement). Cette observation étant en contradiction avec les modifications du métabolisme de *K. lactis* relevées ci-dessus (plus de « fermentation en co-culture »), nous avons émis l'hypothèse que l'éthanol pourrait être consommé par *B. aurantiacum* en co-culture. En analysant le transcriptome de *B. aurantiacum*, nous avons constaté la surexpression de gènes impliqués dans le catabolisme de l'éthanol en co-culture. L'assimilation de l'éthanol comme source de carbone et d'énergie alternative par la bactérie semble aussi confirmée en co-culture par la surexpression de gènes impliqués dans le cycle de Krebs et la voie du glyoxylate. L'éthanol produit par *K. lactis* pourrait ainsi être responsable de la stimulation de *B. aurantiacum* en co-culture. Cette interaction métabolique est synthétisée dans la Figure 26.

Métabolisme des acides aminés

Chez *K. lactis* en culture pure, nous avons observé la surexpression de gènes impliqués dans le catabolisme des acides aminés en culture pure ainsi que la surexpression des voies de biosynthèse de deux des acides aminés les plus consommés (arginine et lysine). Ces données

transcriptomiques sont en accord avec les observations biochimiques précédentes. En effet, ceci suggère que les acides aminés sont moins consommés par *K. lactis* en co-culture. De plus *K. lactis* semble moins limitée en lysine et en arginine (acides aminés les plus consommés par *K. lactis* en culture pure) en co-culture. Nous pouvons émettre l'hypothèse que *K. lactis* se trouve en présence d'une source d'azote alternative en co-culture. Celle-ci pourrait être produite par *B. aurantiacum*, sous forme d'ammoniac, lors du catabolisme des acides aminés. Lors de l'étude métabolomique de *B. aurantiacum* en culture pure (Forquin, 2010), de nombreux di- et tripeptides intracellulaires ont été identifiés. Certains de ces peptides contenaient notamment de l'arginine et de la lysine. Nous pouvons aussi supposer que *B. aurantiacum* pourrait libérer certains de ces peptides dans le milieu extracellulaire dans le cadre d'un phénomène de communication intra- ou inter- espèces. Par ailleurs, nous avons observé la surexpression d'un transporteur d'oligopeptides (*OPT2*) chez *K. lactis*. Ainsi, ces peptides pourraient être consommés par *K. lactis*.

L'analyse du transcriptome de *B. aurantiacum*, a révélé la surexpression de la voie de biosynthèse de l'arginine en co-culture. *K. lactis* et *B. aurantiacum* semblent être en compétition pour ce composé. L'épuisement total de l'arginine du milieu arriverait plus tôt en co-culture, ce qui aurait pour effet la stimulation de la voie de biosynthèse de ce composé en co-culture chez *B. aurantiacum*. Cette voie de synthèse produit non seulement de l'arginine mais aussi du fumarate. Cette production peut expliquer la forte répression du gène *SdhA* succinate déshydrogenase chez *B. aurantiacum* en co-culture (Figure 26). Cette répression, couplée à l'activation du shunt glyoxylique, peut donner lieu à un excès de divers acides organiques (fumarate, succinate, malate) qui peuvent être excrétés par la bactérie en co-culture. Ces acides organiques pourraient éventuellement servir de source alternative de carbone à *K. lactis* en co-culture. En l'état actuel des choses, nous avons uniquement proposé des hypothèses. Ces phénomènes d'interaction sont complexes et leur étude mérite d'être approfondie.

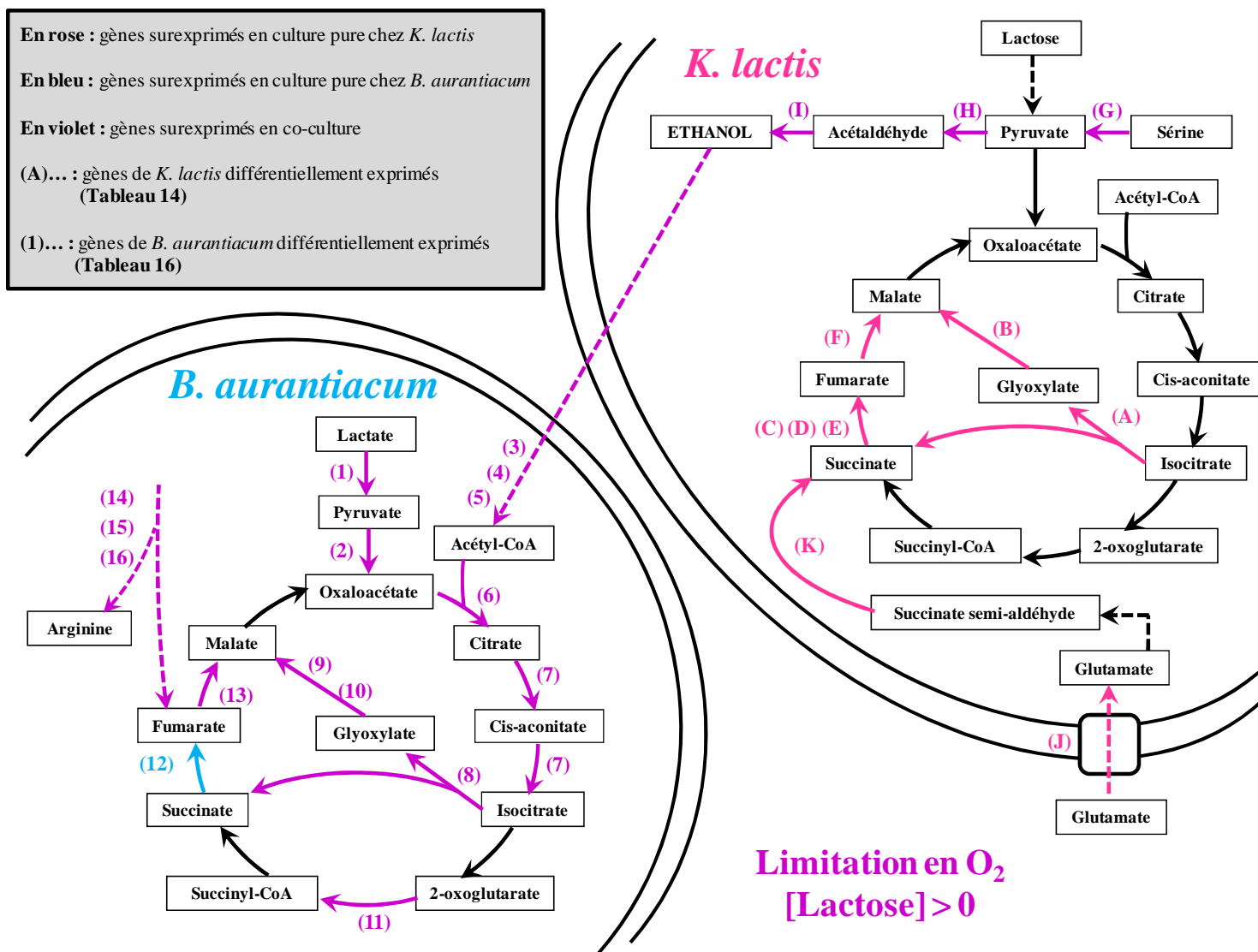


Figure 26. Interaction entre *K. lactis* et *B. aurantiacum* : métabolisme carboné.

Nous pouvons nous attendre à ce que la biotine du milieu soit consommée plus rapidement en coculture que dans les cultures simples. Nous avons observé un phénomène suggérant une coopération métabolique au niveau de la synthèse de la biotine. En effet, *K. lactis* est auxotrophe pour cette vitamine, sa voie de biosynthèse étant incomplète (absence du début de la voie). Cependant, *K. lactis* surexprime un gène de la voie de biosynthèse de la biotine ainsi qu'un gène codant pour le transporteur du 7,8-diaminonanoate en co-culture. Cette molécule est un intermédiaire de la voie de biosynthèse de la biotine. Chez *B. aurantiacum*, la voie de synthèse de biotine est complète. Nous avons constaté la surexpression d'un transporteur codant un transporteur de biotine, ainsi que la répression d'un gène du début de la voie de synthèse. Notre hypothèse serait que *B. aurantiacum* exporterait du 7,8-diaminonanoate, qui serait ensuite assimilé par *K. lactis*. *K. lactis* synthétiserait ensuite de la biotine, nécessaire à sa croissance. La surexpression du gène codant pour un transporteur de biotine en co-culture chez *B. aurantiacum* va dans le sens d'une limitation plus importante de ce composé en co-culture. Nous n'avons cependant pas d'explication pertinente en ce qui concerne la répression du gène de la voie de la synthèse de la biotine chez *B. aurantiacum*. Cette hypothèse est récapitulée dans la Figure 27.

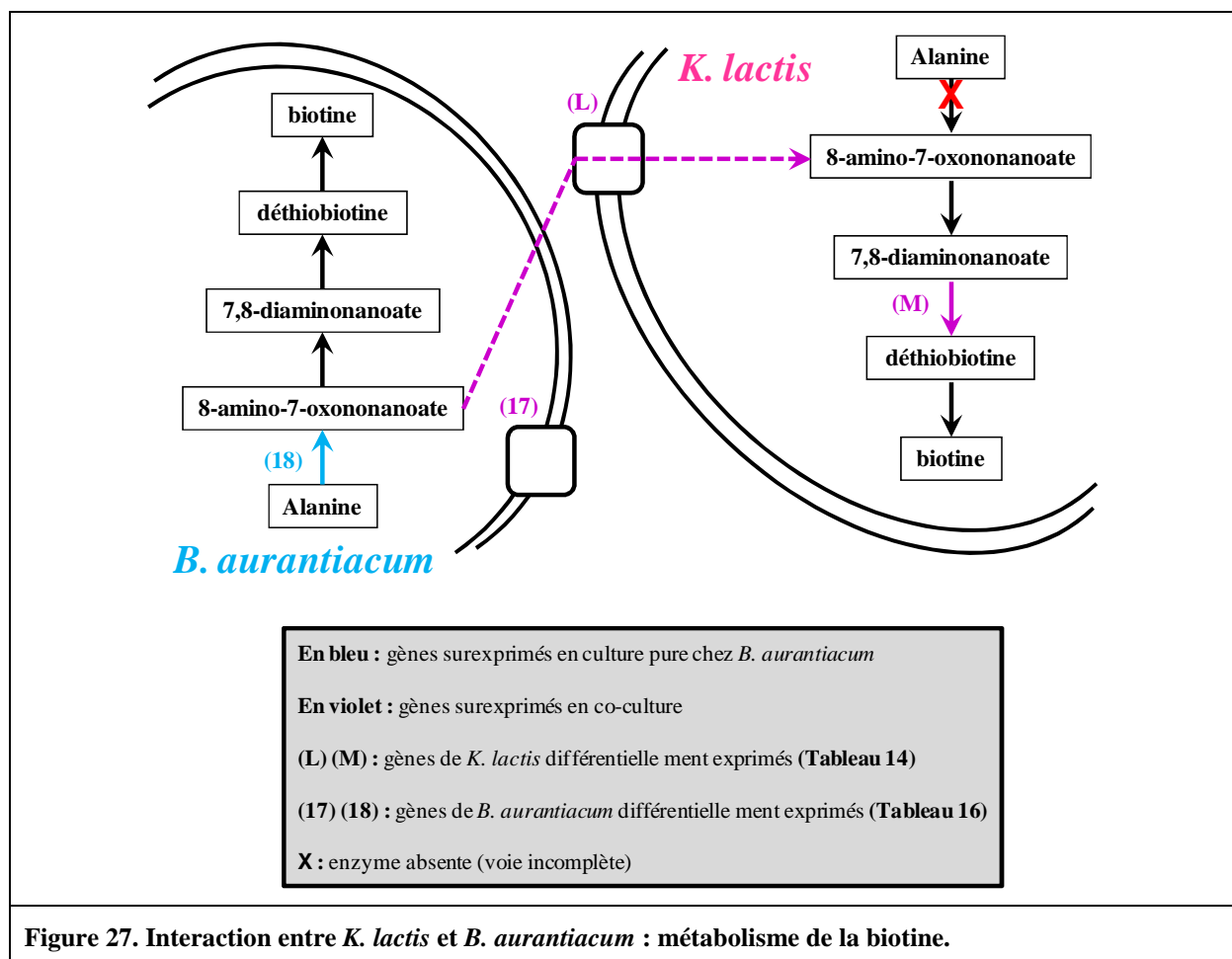


Figure 27. Interaction entre *K. lactis* et *B. aurantiacum* : métabolisme de la biotine.

Nous avons observé la surexpression de gènes impliqués dans la biosynthèse des pigments caractéristiques de *B. aurantiacum*. Ces pigments sont induits lors d'un stress oxydatif ou osmotique. Nous avons émis l'hypothèse que l'éthanol produit par *K. lactis* pourrait influencer sur la production de ces pigments. La réalisation d'un pulse éthanol sur une culture de *B. aurantiacum* conduit à la surexpression de gènes impliqués dans la biosynthèse des pigments (RT-qPCR). L'éthanol pourrait donc faire partie des facteurs induisant la production de pigments chez *B. aurantiacum*.

Les interactions entre *B. aurantiacum* et *K. lactis* semblent être très complexes. En effet, nous avons constaté d'importants réarrangements cellulaires chez *K. lactis* (Tableau 14) ainsi que la surexpression de nombreux régulateurs chez *B. aurantiacum* (Tableau 16). Ces constatations peuvent ouvrir de nouvelles pistes pour l'étude des interactions microbiennes.

En effet, l'analyse du transcriptome de *K. lactis* en co-culture a révélé la stimulation de la transcription de gènes impliqués dans le remaniement de la paroi cellulaire. Il est tout à fait surprenant qu'outre des gènes codant pour des composants de la paroi, des gènes impliqués dans la transduction du signal « stress de la paroi » soient ainsi observés, car ces gènes ont une expression relativement constitutive. Ceci pourrait expliquer que seulement quelques composants des voies de transduction de signal sont ainsi mis en évidence.

L'induction de *MID2*, le senseur du stress dans la paroi, va dans le sens de notre hypothèse d'un stress de paroi en co-culture. Les composants des voies de transduction de signal, *FUS3*, *PHO85*, *GLC7*, *STE50* sont surexprimés. Chez *S. cerevisiae*, ils ne relèvent pas des mêmes voies de transcription de signal mais il existe un cross talk entre les voies selon les conditions physiologiques. Ainsi *STE50* et *BUD6* sont associés à la voie HOG de résistance au stress osmotique. Plus surprenante est la surproduction de *MSG5* qui est le régulateur de *FUS3*. Ce signal de stress de paroi se traduit par l'induction de gènes codant des protéines de la paroi telles que *FLO5*, *FLO9*, *GAS1*, *SCW10*, *TOS6*, *EXG1* et *KRE9*.

Cette hypothèse peut être corrélée avec une modification de l'aspect microscopique des cellules de *K. lactis*. Nous avons en effet observé la formation d'amas cellulaires en coculture.

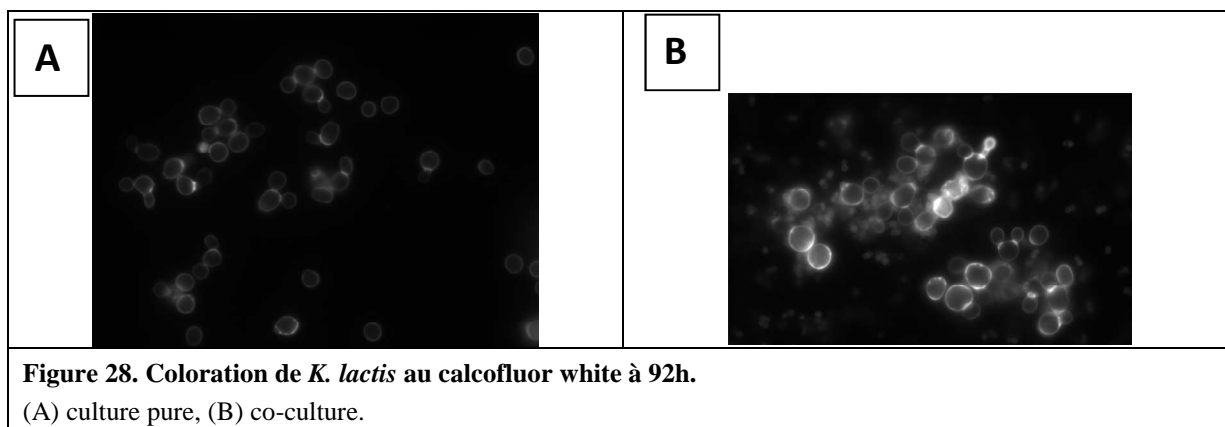


Figure 28. Coloration de *K. lactis* au calcofluor white à 92h.

(A) culture pure, (B) co-culture.

Ces amas sont formés d'agrégats de levures et de bactéries en co-culture. En outre, comme les concentrations en calcofluor white et le temps d'exposition sont identiques (10ms), on peut penser que la quantité de chitine dans la paroi est plus importante en coculture. Chez les levures, c'est un phénomène classique en cas de choc osmotique. Nous avons aussi remarqué qu'une partie des bactéries sont colorées. Une coloration à l'encre de chine a montré que ces bactéries ont développé une capsule d'exopolysaccharides.

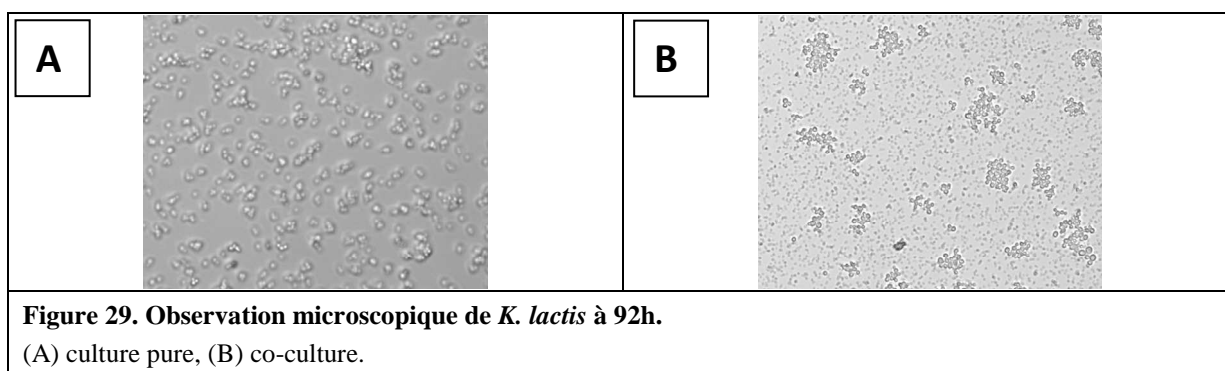


Figure 29. Observation microscopique de *K. lactis* à 92h.

(A) culture pure, (B) co-culture.

CATEGORIE	<i>K. lactis</i>
Fonction inconnue	94
Organisation cellulaire	69
Métabolismes divers	47
Traduction	23
Signal	18
Métabolisme carboné	16
Transporteurs	16
Transcription	15
Stress	8
Régulateurs	7
Respiration	4
Fermentation	3
Métabolisme des vitamines	3
TOTAL	323

Tableau 13. Catégorie fonctionnelle des gènes différentiellement exprimés chez *K. lactis*.

Gènes	Fonctions/similarités	<i>K. lactis</i>	
		Co/KI	P value
Métabolisme carboné			
<i>Cycles de Krebs et du glyoxylate</i>			
(A) KLLA0C08107g	ICL1, Isocitrate lyase	0.20	2.38E-05
(B) KLLA0F23914g	MLS1, Malate synthase	0.23	3.30E-03
(C) KLLA0E00683g	SDH2, Iron-sulfur protein subunit of succinate dehydrogenase	0.37	7.56E-03
(D) KLLA0D18117g	SDH4, Membrane anchor subunit of succinate dehydrogenase	0.32	2.49E-02
(E) KLLA0E13333g	EMI5, Subunit of succinate dehydrogenase	0.22	2.93E-06
(F) KLLA0D00902g	FUM1, Fumarase	0.18	1.88E-08
<i>Gluconeogenèse</i>			
KLLA0A00484g	PCK1, Phosphoenolpyruvate carboxykinase, regulated by CAT8	0.12	2.00E-07
KLLA0C13541g	RKI1, Ribose-5-phosphate ketol-isomerase	0.42	4.68E-02
KLLA0D01452g	CAT8, transcriptional activator (in non-fermentative conditions)	0.50	4.87E-02
KLLA0C13013g	GDS1, necessary for growth on glycerol	0.37	7.39E-03
KLLA0E00595g	GUT1, Glycerol kinase	0.29	1.74E-03
*KLLA0F26246g	STL1, Glycerol proton symporter	0.21	4.32E-06
<i>β-oxydation des acides gras</i>			
KLLA0E13817g	FOX2, 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase, enoyl-CoA hydratase	0.41	1.51E-02
KLLA0F10879g	POT1, 3-ketoacyl-CoA thiolase	0.09	0
KLLA0C04686g	ECI1, Peroxisomal delta3,delta2-enoyl-CoA isomerase	0.36	3.87E-03
Fermentation			
(G) **KLLA0F16962g	Pyruvate decarboxylase	10.23	1.08E-12
(H) **KLLA0E19889g	ADH6, NADPH-dependent medium chain alcohol dehydrogenase	6.88	9.44E-05
(I) **KLLA0C00440g	CHA1, Catabolic L-serine (L-threonine) deaminase	6.91	3.54E-10
Métabolismes divers			
<i>Métabolisme de l'acétate</i>			
KLLA0C07777g	ALD5, Mitochondrial aldehyde dehydrogenase	0.20	3.00E-03
*KLLA0E11881g	ADY2, Acetate transporter required for normal sporulation	0.24	2.08E-03
*KLLA0A00242g	ADY2, Acetate transporter required for normal sporulation	0.33	1.75E-02
<i>Catabolisme des acides aminés</i>			
Glycine			
KLLA0B06754g	GCV1, Mitochondrial glycine decarboxylase complex (T subunit)	0.23	1.82E-04
KLLA0D12738g	GCV2, Mitochondrial glycine decarboxylase complex (P subunit)	0.31	4.90E-03
Glutamate			
(J) *KLLA0E16281g	DIP5, Dicarboxylic amino acid permease	0.15	2.00E-09
(K) KLLA0F12628g	UGA2, Succinate semialdehyde dehydrogenase	0.35	1.13E-03
Acides aminés aromatiques			
KLLA0F10021g	ARO8, Aromatic aminotransferase I	0.30	1.91E-03
Leucine			
**KLLA0E02707g	ARO10, Phenylpyruvate decarboxylase	0.22	6.74E-06
<i>Biosynthèse des acides aminés</i>			
Lysine			
KLLA0E07987g	LYS1, Saccharopine dehydrogenase	0.36	1.62E-02
KLLA0C15125g	LYS4, Homoaconitase	0.29	1.06E-03
KLLA0E23695g	LYS21, Homocitrate synthase	0.25	1.02E-03
KLLA0D07073g	ODC1, exports 2-oxoglutarate from the mitochondrial matrix to the cytosol for lysine metabolism	0.47	3.20E-02
Arginine			
KLLA0F03190g	CPA2, Large subunit of carbamoyl phosphate synthetase	0.32	6.88E-04
KLLA0C04037g	ARG1, Arginosuccinate synthetase	0.38	6.60E-03
Métabolisme des vitamines (Biotine)			
(L) *KLLA0B00385g	BIO5, uptake of 7-keto 8-aminopelargonic acid	2.80	5.00E-03
(M) KLLA0B00407g	BIO4, Dethiobiotin synthetase	2.33	1.21E-02

*Transporteurs classés avec le métabolisme associé. **Gènes validés par RT-qPCR

Tableau 14. Gènes différentiellement exprimés chez *K. lactis* discutés dans ce travail.

(A)... : gènes de *K. lactis* représentés Figure 26 et Figure 27.

Gènes	Fonctions/similarités	<i>K. lactis</i>	
		Co/KI	P value
Transporteurs			
KLLA0D15378g	OPT2, Oligopeptide transporter	3.99	1.31E-03
KLLA0D02970g	DAL5, Allantoate permease, also transports dipeptides	2.09	4.47E-02
KLLA0E02905g	ATO3, possible role in export of ammonia from the cell	0.20	4.86E-06
KLLA0A06644g	ZRT3, transports zinc from storage in the vacuole to the cytoplasm	4.72	1.71E-04
KLLA0D00253g	MAL11, Maltose permease	0.13	1.23E-10
KLLA0B00264g	MAL11, Maltose permease	0.12	2.82E-07
KLLA0C08283g	FCY2, Purine-cytosine permease	0.24	3.29E-04
Signal			
KLLA0E19207g	SCY1, Putative kinase, suppressor of GTPase mutant	48.08	0
KLLA0E10539g	FUS3, Mitogen-activated serine/threonine protein kinase	2.52	2.78E-02
KLLA0D11990g	PHO85, Cyclin-dependent kinase	6.22	3.47E-09
KLLA0F12496g	GLC7, Serine/threonine protein phosphatase catalytic subunit	2.61	3.23E-02
KLLA0F03597g	MSG5, Dual-specificity protein phosphatase	2.53	5.67E-03
KLLA0F06490g	CLN1, G1 cyclin involved in regulation of the cell cycle	5.40	5.84E-07
KLLA0C01386g	STE50, Protein involved in mating response	5.10	3.79E-06
Organisation cellulaire			
<u>Bourgeoisement</u>			
KLLA0C18359g	BUD6, involved in actin cable nucleation and polarized cell growth	58.98	2.15E-12
KLLA0D05621g	BUD20, involved in bud-site selection	7.10	4.47E-06
<u>Paroi cellulaire</u>			
KLLA0A06468g	KRE9, Glycoprotein involved in cell wall beta-glucan assembly	5.57	3.07E-05
KLLA0A03201g	SCW10, Cell wall protein with similarity to glucanases	4.50	1.08E-02
KLLA0E21671g	SBE22, involved in the transport of cell wall components from the Golgi to the cell surface	4.16	4.63E-03
KLLA0C14091g	GAS1, β -1,3-glucanosyltransferase, required for cell wall assembly	4.04	1.52E-04
KLLA0A07315g	TOS6, Glycosylphosphatidylinositol-dependent cell wall protein	3.72	3.94E-05
KLLA0C05324g	EXG1, Major exo-1,3-beta-glucanase of the cell wall	3.59	3.15E-04
KLLA0A03179g	MID2, O-glycosylated plasma membrane protein that acts as a sensor for cell wall integrity	3.25	4.56E-04
<u>Floculation</u>			
KLLA0E14543g	FLO5, Lectin-like cell wall protein involved in flocculation	8.26	8.60E-12
**KLLA0C19316g	FLO9, Lectin-like protein with similarity to Flo1p	5.11	6.21E-07
KLLA0D00264g	FLO9, Lectin-like protein with similarity to Flo1p	2.99	1.71E-02
<u>Trafic intracellulaire</u>			
KLLA0D16654g	ENT5, involved in traffic between the Golgi and endosomes	87.04	1.08E-12
<u>Méiose</u>			
KLLA0E05963g	IME1, Master regulator of meiosis	0.29	8.11E-03
<u>Mitose</u>			
KLLA0B00759g	KIP1, Required for mitotic spindle assembly	4.66	1.23E-06
KLLA0F06534g	BBP1, required for mitotic functions of Cdc5p	3.61	1.62E-02
<u>Sporulation</u>			
KLLA0B10010g	AQY1, Spore-specific water channel	0.09	1.08E-12
<u>Epissage</u>			
KLLA0B00979g	NPL3, required for pre-mRNA splicing	52.47	2.15E-12
KLLA0F18018g	MSL5, Component of the commitment complex	18.28	2.15E-12
KLLA0C07304g	CEF1, Essential splicing factor	12.68	0

*Transporteurs classés avec le métabolisme associé. **Gènes validés par RT-qPCR

Tableau 14. Suite.

CATEGORIE	<i>B. aurantiacum</i>
Fonction inconnue	218
Processus cellulaire (réplication, transcription, traduction, respiration, ...)	111
Transporteurs	54
Métabolisme carboné	36
Régulateur	21
Biosynthèse et métabolisme des acides aminés	20
Biosynthèse et métabolisme Lipides	15
Biosynthèse et métabolisme des vitamines	12
Stress	12
Biosynthèse et métabolisme des nucléotides	7
Métabolisme secondaire (antibiotiques, pigments,...)	3
TOTAL	509

Tableau 15. Catégorie fonctionnelle des gènes différentiellement exprimés chez *B. aurantiacum*.

Gènes	Fonctions/similarités	<i>B. aurantiacum</i>	
		Co/Ba	P value
Métabolisme du Carbone			
(1) BL 1247	Ldh L-lactate déshydrogenase	3.3	1.74E-03
(2) BL 3088	Pyk pyruvate carboxylase	2.6	2.18E-03
(3) BL 1744	AldB aldehyde déshydrogenase B	2.0	4.48E-03
(4) BL 479	AldB2 aldehyde dehydrogenase B	2.5	2.03E-03
(5) BL 2715	Adh alcool déshydrogénase	1.6	2.02 E-02
(6) BL 1394	GltA Citrate synthase	2.5	3.27E-03
(7) BL 2786	Acn aconitate hydratase	2.2	1.42E-02
(8) BL 1907	AceA Isocitrate lyase	7.9	8.18E-04
(9) BL 1906	AceB1 Malate synthase 1	4.4	1.11E-04
(10) BL 1315	AceB2 Malate synthase 2	2.7	7.95E-04
(11) BL 3807	SucA alpha-ketoglutarate décarboxylase	2.1	1.07E-02
(12) BL 3154	SdhA succinate déshydrogenase	0.03	3.62E-13
(13) BL 847	Fum B fumarate hydratase	3.3	2.08E-03
Métabolisme des Acides Aminés et peptides			
(14) BL 3873	ArgJ Glutamate n-acetyltransferase	2.4	7.75E-03
(15) BL 3876	ArgF Ornithine carbamoyltransferase	2.2	2.66E-03
(16) BL 3879	ArgH Argininosuccinate lyase	2.2	2.03E-03
Métabolisme des Vitamines			
(17) BL2448	BioY, transporteur putatif de biotine	2.0	1.50E-02
(18) BL 3850	BioF 8-amino-7-oxononoate synthase	0.5	2.32E-03
Métabolisme des métabolites secondaires			
BL 2909	CrtU Bétacarotène désaturase	2.9	2.03E-03
BL 2905	Idi Isopentenyl-diphosphate delta-isomérase	3.4	6.84E-04
BL 2907	CrtY Lycopène cyclase	2.0	9.44E-03

Tableau 16. Gènes différentiellement exprimés chez *B. aurantiacum* discutés dans ce travail.

(1)... : gènes de *B. aurantiacum* représentés Figure 26 et Figure 27.

III. C. Conclusion

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à l'association de deux micro-organismes issus de l'écosystème fromager, *Kluyveromyces lactis* et *Brevibacterium aurantiacum*. Lors de cette étude nous avons observé un impact important de chaque micro-organisme sur l'autre.

Tout d'abord, le métabolisme carboné de *K. lactis* est modifié en présence de *B. aurantiacum*. La disponibilité en oxygène doit être amoindrie par la présence de la population fortement aérobie de *B. aurantiacum*. Par conséquent, *K. lactis* intensifie son métabolisme fermentaire ou respiro-fermentaire dès lors qu'elle est en co-culture avec *B. aurantiacum*, en réprimant le cycle de Krebs et la néoglucogénèse. Il y a donc une production accrue d'éthanol. Cependant, nous avons observé que l'éthanol résiduel contenu dans le milieu est en concentration plus faible en co-culture qu'en monoculture. L'analyse du transcriptome de *B. aurantiacum* nous a fourni une explication. En effet, *B. aurantiacum*, surexprime une voie métabolique permettant l'utilisation de l'éthanol produit par *K. lactis*. La mise en place de ce métabolisme, ainsi que la stimulation de la voie de synthèse de l'arginine induit le shunt glyoxylique du cycle de Krebs chez *B. aurantiacum*. Ce nouvel apport en carbone, en plus du lactate, pourrait être en lien avec la stimulation de la croissance de *B. aurantiacum* en co-culture.

Concernant le métabolisme azoté, des coopérations métaboliques semblent aussi se mettre en place en co-culture, même si les détails de ces mécanismes restent encore à élucider.

Par ailleurs, l'éthanol produit par *K. lactis* aurait aussi un effet stimulant sur la synthèse de pigments chez *B. aurantiacum*. Lors d'une expérience de pulse éthanol chez *B. aurantiacum* nous avons observé la stimulation des gènes de la synthèse de pigments. Les résultats obtenus nous ont aussi amené à proposer un mécanisme de complémentation métabolique au niveau du métabolisme de la biotine.

D'une manière plus large, l'effet de chaque micro-organisme sur l'autre se traduit par une profonde réorganisation cellulaire. Chez la levure, cela se traduit par des modifications au niveau de la synthèse de la paroi cellulaire, ainsi qu'au niveau de l'épissage, du bourgeonnement, de la floculation, du trafic intracellulaire, de la sporulation, de la mitose et de la méiose. Nous avons aussi observé l'induction de gènes codant pour des kinases et phosphatases, connues en tant que molécules de la transduction du signal au sein de la cellule. Chez *B. aurantiacum*, la présence de la levure se traduit par l'expression différentielle de

nombreux gènes codant pour des régulateurs ainsi que la surexpression de gènes codant pour des protéines impliquées dans la réponse au stress.

Cette première étude donne des résultats encourageants pour de futurs travaux élargis à l'étude de l'écosystème fromager. Nous avons montré que, dans nos conditions, les interactions entre *K. lactis* et *B. aurantiacum* sont complexes et, malgré l'observation de signaux de stress, plutôt favorables surtout pour la croissance de *B. aurantiacum*. Par la suite, il faudrait étudier ces interactions dans la matrice fromagère, mais aussi avec d'autres micro-organismes de l'écosystème.

CONCLUSION-PERSPECTIVES

CONCLUSION-PERSPECTIVES

Lors de ce travail, nous avons réalisé une reconstruction des voies métaboliques du soufre à travers le phylum des hémiascomycètes par une analyse *in silico*. Cette étude a mis en évidence des différences majeures, telles que la présence de deux voies de synthèse de la cystéine (Figure 30, transsulfuration inverse et voie de l'*O*-acétylsérine) chez toutes les levures étudiées, à l'exception de celles ayant effectué la Whole Genome Duplication (*Candida glabrata* et *Saccharomyces cerevisiae*). Lors de l'étude du métabolisme du soufre chez deux levures hémiascomycètes phylogénétiquement éloignées, *Kluyveromyces lactis* et *Yarrowia lipolytica*, nous avons constaté qu'une variation de l'apport en soufre (méthionine à concentration élevée versus faible) conduit à la régulation de la voie de transsulfuration chez *K. lactis* et, au contraire, à celle de l'*O*-acétylsérine chez *Y. lipolytica*. Il serait intéressant de vérifier la fonctionnalité de ces deux voies chez *K. lactis* et *Y. lipolytica*.

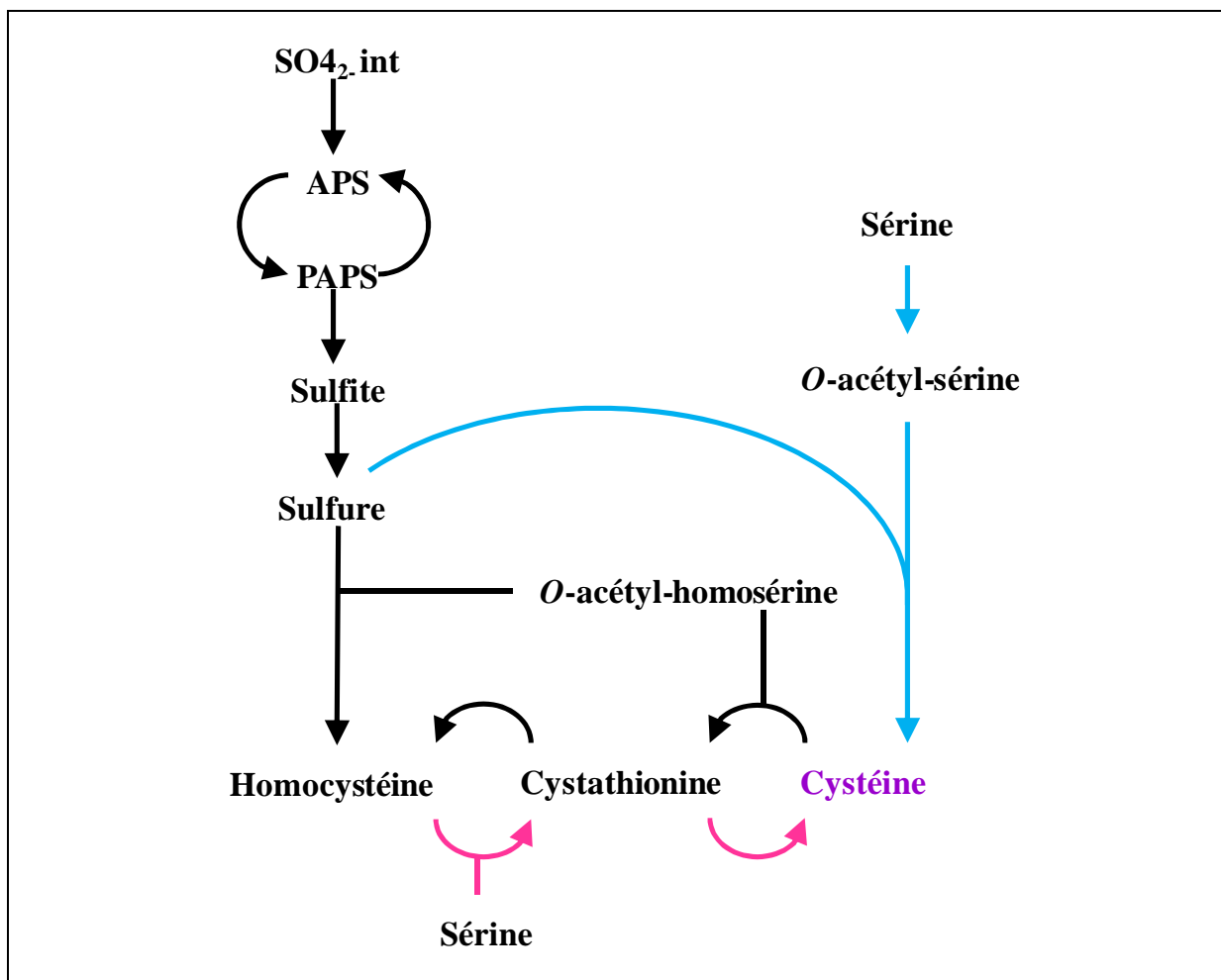


Figure 30. Les deux voies de synthèse de la cystéine.

En rose : Voie de transsulfuration inverse. En bleu : Voie de l'*O*-acétylsérine.

Pour cela, il faudrait construire des mutants de *K. lactis* et *Y. lipolytica* affectés dans la voie de transsulfuration inverse et/ou la voie de l'*O*-acétylsérine, et tester leur croissance sur cystéine. Nous avons réalisé notre étude sur des souches d'origine fromagère, qui ne possèdent pas de marqueur de sélection permettant de réaliser la mutagenèse. Cependant, nous avons vérifié, préalablement à cette étude, la transformabilité de ces souches. Nous avons d'ores et déjà construit une souche de *Yarrowia lipolytica* avec le marqueur de sélection ura^- , par la délétion du locus *URA3*. Il pourrait aussi être intéressant de muter la voie de l'*O*-acétylsérine au niveau de la deuxième réaction (Figure 30), pour observer s'il se produit une accumulation de l'*O*-acétylsérine, ce composé n'étant accumulé dans aucune des conditions testées.

L'analyse du métabolisme du soufre par métabolomique a révélé la présence de la voie de biosynthèse de l'hypotaurine et de la taurine, et ce uniquement chez *Y. lipolytica*. Cette voie pourrait servir comme réserve de soufre sous forme de sulfonates au sein de la cellule. En effet, nous avons observé lors de l'étude transcriptomique que les deux levures possèdent les enzymes nécessaires à l'utilisation des sulfonates comme source de soufre. Cependant, la possibilité de stocker des sulfonates au niveau intracellulaire doit conférer une plus grande adaptabilité à la cellule lors d'une carence en soufre ou d'un apport en excès. Nous avons aussi émis l'hypothèse que cette voie de synthèse de la taurine permettrait de préserver l'équilibre des intermédiaires de la voie du glutathion en « absorbant » l'excès de soufre assimilé. Pour vérifier cette hypothèse, il faudrait réaliser l'expérience en forte concentration en soufre sur la souche parentale de *Y. lipolytica* et un mutant déficient dans la biosynthèse de l'hypotaurine et de la taurine.

L'analyse du métabolisme du soufre par métabolomique nous a apporté des pistes intéressantes. Cependant, il pourrait être intéressant de compléter ces données par une analyse quantitative des intermédiaires soufrés. En effet, l'approche que nous avons utilisée ne nous a pas permis de comparer quantitativement les différents intermédiaires soufrés. Ces données nous permettraient de mieux identifier les flux métaboliques soufrés, et nous permettraient par la même occasion d'identifier les composés « réservoir ». Au vu de nos résultats, nous aurions tendance à proposer la 5-méthylthioadénosine comme candidat. En effet, bien que les valeurs observées ne soient pas pondérées par l'ionisation spécifique de cet intermédiaire, cette molécule semble tout de même très largement représentée.

Il serait aussi intéressant de poursuivre cette étude en utilisant une méthode d'analyse ayant déjà permis la détection de la S-adénosylméthionine pour évaluer le pool potentiel de SAM dans les différentes conditions testées.

Nous avons déterminé qu'une forte concentration en méthionine est nécessaire à la production de composés soufrés volatils. L'accumulation de ce composé au niveau intracellulaire ainsi que la surexpression d'aminotransférases semble nécessaire à la production de ces composés. En effet, chez *Y. lipolytica*, le gène codant pour l'aminotransférase à acides aminés branchés codée Bat1p est surexprimé en méthionine mais aussi en cystine. Cependant, nous n'avons pas observé d'augmentation de la production de CSVs en cystine, ni d'accumulation du pool de méthionine. Cette constatation permet d'apporter une nouvelle vision de la genèse des CSVs. Nous avons observé que la forte concentration en méthionine n'induit pas le même type d'aminotransférase chez *K. lactis* et *Y. lipolytica* (aminotransférase à acides aminés aromatiques et branchés respectivement). Ceci pourrait influencer sur la potentialité aromatique de ces levures. Nous savons que les aminotransférases ont de large spécificité de substrat. Cependant, leur différence d'affinité pour la méthionine ainsi que leur facteur d'induction pourraient être des pistes intéressantes pour sélectionner des souches productrices d'arômes soufrés. Nous devrions aussi nous tourner vers la recherche de locus à effets quantitatifs ou QTL (Quantitative Trait Locus). En effet, les gènes impliqués dans le catabolisme des acides aminés soufrés, probablement impliqués dans d'autres métabolismes, ne sont pas obligatoirement régulés comme les gènes impliqués dans le métabolisme du soufre. L'étude du transcriptome ne peut donc pas nous apporter toutes les réponses.

Nous avons été surpris de ne pas observer de production d'H₂S en forte concentration de cystine, alors qu'il est connu qu'une forte concentration en cystéine induit une telle production. Il serait intéressant d'effectuer une expérience exploratoire combinant transcriptome, métabolome et mesure d'H₂S sur des levures cultivées en présence de cystine ou de cystéine (avec une même concentration en soufre). Ceci pourrait donner des pistes sur les différences de métabolisme entre la cystéine et son dimère.

Lors de notre expérimentation, nous avons constaté un effet drastique du sulfate d'ammonium sur les pools des intermédiaires de la voie du glutathion, mais aussi sur la croissance de *K. lactis*. Ce défaut de croissance a aussi été observé lors de croissances en sulfate de potassium. La concentration de sulfate d'ammonium utilisée étant plus forte chez *Y. lipolytica*, nous avons observé une diminution plus importante des pools des intermédiaires de la voie du glutathion mais aussi la répression de gènes codant pour le transport et l'assimilation du sulfate ainsi que la surexpression d'un gène codant pour un exportateur de sulfite. Nous avons aussi mesuré une production d'H₂S. On peut émettre l'hypothèse que les étapes de réduction du sulfate sont limitantes par rapport au transport et à l'activation. L'excès de sulfite et d'H₂S produirait un stress pour la cellule et par conséquent la réponse au stress entraînerait l'utilisation du pool de glutathion et de ces intermédiaires. Il pourrait être intéressant de surproduire les enzymes impliqués dans les étapes de réduction ainsi que celles impliquées dans la synthèse du sirohème (cofacteur indispensable à la sulfite réductase). La mesure du pool de glutathion et autres intermédiaires couplée à un dosage d'H₂S pourrait indiquer si le phénomène observé est dû à un excès de sulfite et de sulfure. Le dosage d'H₂S en concentration élevée en méthionine est de même grandeur que celui réalisé en concentration élevée de sulfate chez *Y. lipolytica*. Cependant, nous n'avons pas observé de chute du pool des intermédiaires de la voie du glutathion en méthionine. Ceci suggère que l'effet pourrait être essentiellement dû à la production de sulfite.

Un autre aspect, non abordé dans nos travaux, concerne l'existence ou non d'un rôle physiologique des composés soufrés volatils produits. Par exemple, ces molécules pourraient être impliquées dans des phénomènes de défense ou de communication cellulaire. En effet, chez les plantes de la famille des Alliacées, les composés soufrés volatils sont utilisés comme défense contre les insectes parasites (Dugravot *et al.*, 2005).

Les phénomènes d'interactions intra- et inter-espèces sont en effet incontournables. Dans notre cas, les levures étudiées font partie de l'écosystème fromager. Nous avons choisi d'étudier l'une d'elles, *K. lactis* en présence d'une bactérie d'affinage, *Brevibacterium aurantiacum*. Leur interaction a été étudiée par transcriptomique, en utilisant une culture pure comme référence de chaque micro-organisme. Nous avons observé un effet important de chaque micro-organisme sur l'autre, notamment au niveau du métabolisme carboné. Par ailleurs, nous avons émis l'hypothèse d'une coopération métabolique pour le métabolisme de

la biotine. Les phénomènes que nous avons observés montrent une forte interaction entre les deux micro-organismes. Il pourrait être intéressant de comparer l'interaction des deux micro-organismes en fermenteur à membrane pour la comparer à leur interaction en fermenteur classique. Ceci pourrait nous donner des indications sur des phénomènes éventuels de quorum sensing. De plus, nous avons observé une forte réorganisation cellulaire de la levure au contact de la bactérie lors de notre étude transcriptomique. Il serait intéressant de déterminer si ces phénomènes sont dus au contact direct entre les micro-organismes. L'utilisation de la microscopie à fluorescence pourrait être une piste intéressante pour l'étude des réorganisations cellulaires, des phénomènes de floculation et des éventuelles interactions entre levures et bactéries.

Ces résultats nous ont apportés de pistes réelles encourageantes pour l'étude de l'écosystème fromager. Une étape importante serait de replacer ces résultats dans une étude plus globale dans un milieu fromager et au sein d'un écosystème complexe.

FICHES TECHNIQUES

FICHES TECHNIQUES

Fiche n°1 : Milieu Chimiquement Défini (MCD)

Principe

L'utilisation d'un milieu chimiquement défini rend possible le choix des différents composants ainsi que la maîtrise de leur concentration. Ceci rend possible l'étude d'un métabolisme précis en faisant varier le ou les composés concernés.

Méthode

Les 8 solutions sont préparées indépendamment avec de l'eau osmosée. Les quantités sont données pour la préparation d'un litre de milieu.

Composition du milieu

Solution 1A : sources de carbone (préparation à 10X)

Composé	Concentration 1X (g/l)	Concentration 1X (mM)
Lactose	20	55,50
Lactate de sodium 60 %	15	133,86

Solution 1B : sels 1 (préparation à 10X)

Composé	Concentration 1X (g/l)	Concentration 1X (mM)
Acétate de sodium	1	12,19
Citrate d'ammonium	0,6	2,65
KH ₂ PO ₄	7,9	58
K ₂ HPO ₄	16	91,8
NaCl	20	342

(Ajout du NaCl petit à petit après dissolution des autres composés)

Solution 2 : sels 2 (préparation à 50X)

Composé	Concentration 1X (g/l)	Concentration 1X (mM)
MgCl ₂ , 6H ₂ O	0,2	2,1
FeCl ₂ , 4 H ₂ O	0,011	0,087
CaCl ₂ , 2H ₂ O	0,050	0,45
ZnCl ₂ ,	0,005	0,037
CoCl ₂ , 6H ₂ O	0,0025	0,019

Solution 3 : acides aminés (préparation à 20X)

Composé	Concentration 1X (g/l)	Concentration 1X
Alanine	0,24	2,7mM
Arginine	0,12	570µM
Asparagine	0,34	2,6mM
Glutamate	0,68	3,5mM
Glutamine	0,51	2,3mM
Glycine	0,17	4mM
Histidine	0,11	520µM
Isoleucine	0,20	1,5mM
Leucine	0,47	3,6mM
Lysine	0,35	1,6mM
Proline	0,68	5,6mM
Sérine	0,34	3,2mM
Thréonine	0,23	2mM
Tryptophane	0,05	250µM
Valine	0,33	2,8mM

Ajouter quelques gouttes de KOH 10N pour dissoudre.

Solution 4 : Phénylalanine (préparation à 20X)

Composé	Concentration 1X (g/l)	Concentration 1X
Phénylalanine	0,28	1,7mM

Solution 5 : Tyrosine (préparation à 20X)

Composé	Concentration 1X (g/l)	Concentration 1X
Tyrosine	0,29	1,6mM

Ajouter quelques gouttes de KOH 10N pour dissoudre

Solution 6 : Bases (préparation à 50X)

Composé	Concentration 1X (g/l)	Concentration 1X
Adénine	0,010	70µM
Guanine	0,010	73µM
Uracile	0,010	90µM
Xanthine	0,010	65µM

Ajouter quelques gouttes de KOH 10N pour dissoudre.

Solution 7 : Vitamines (préparation à 20X)

Composé	Concentration (g/l)	Concentration 1X
Acide P-aminobenzoïque	0,010	72µM
Biotine	0,010	41µM
Cyano-cobalamine	0,001	0,75µM
Acide folique	0,001	2,3µM
Inosine	0,005	19µM
Acide nicotinique	0,001	8µM
Acide orotique	0,005	3,2µM
Pantothénate de calcium	0,001	2,1µM
Pyridoxamine	0,005	11,8µM
Pyridoxine	0,002	9,7µM
Riboflavine	0,001	2,6µM
Thiamine	0,001	3µM
Acide D,L 6-8 thioctique	0,0025	12,1µM
Thymidine	0,005	20,6µM
Pyridoxal-5-phosphate	0,0006	2,4µM

Solution 8: Source de soufre (préparation à 20X)

Composé	Concentration 1X (g/l)	Concentration 1X
Méthionine		Variable selon l'expérience
Cystine		Variable selon l'expérience
Sulfate d'ammonium		Variable selon l'expérience

Préparation du milieu

Les solutions sont stérilisées par filtration membranaire de 0,22 µm (TPP, vacuum filtration-system) ou par autoclavage (Solution 2) et mélangées dans l'ordre indiqué. De l'eau osmosée est ajoutée afin de compléter le volume final souhaité.

Solution	Concentration	Volume (mL)
Solution 1A	10x	100
Solution 1B	10x	100
Solution 2	50x	20
Solution 3	20x	50
Solution 4	20x	50
Solution 5	20x	50
Solution 6	50x	20
Solution 7	20x	50
Solution 8	20x	50
Eau osmosée	-	510
Volume final		1000

Fiche n°2 : Dosage des sources de carbone par HPLC

Principe

La chromatographie en phase 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

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 %).

Dosage 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 de débit de la phase mobile 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 l'éthanol. L'identification du lactate se fait à l'aide du détecteur UV Waters 486, dont la longueur d'onde est ajustée à 210 nm.

Fiche n°3 : Extraction des ARN totaux

Principe

L'utilisation du Trizol[®] reagent (Invitrogen, 15596-018), une solution monophasique de phénol et de guanidine isothiocyanate, et d'une méthode mécanique (Bead-beating) permet d'extraire les ARNs.

Méthode

Préparation des réactifs et du matériel

Les réactifs sont préparés dans de l'eau traitée au DEPC (Diéthyl Pyrocarbonate) (1:1000) et autoclavés à 120°C pendant 20 minutes. Les surfaces et les pipettes, réservées à cet usage, sont décontaminées avec la solution RNaseAway[®] (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 pour éviter toute contamination par des RNases.

Préparation des échantillons

Les cultures (10^9 cellules) sont centrifugées dans des tubes Falcon de 15 ml à 7000 rpm pendant 2 minutes à 4°C. Le surnageant est éliminé et les culots sont immédiatement congelés par de la carboglace puis stockés à -80°C. Les culots sont ensuite décongelés et resuspendus dans 400 µl de solution de resuspension (½ glucose (20%) + ½ Tris 25 mM pH 7,6 EDTA 10 mM) et 60 µl d'EDTA 0,5 M. Les cellules sont ensuite placées dans des tubes à vis de 2 ml préalablement remplis de 400mg de billes de zirconium (100µm, BioSpec Products), et 500µl de phénol acide. Chaque tube est ensuite vigoureusement agité au broyeur MP-FastPrep-24 pendant 60 secondes à 6,5 m/s puis incubé 5 minutes à 4°C après traitement. Les tubes sont agités trois fois dans ses conditions. Après refroidissement les tubes sont centrifugés 10 min à 13 000 g à 4°C. Le surnageant lipidique est transféré par pipetage dans un tube eppendorf de 2 ml à température ambiante contenant 1ml de trizol. Les tubes sont incubés 5 minutes à température ambiante permettant ainsi une meilleure dissociation des complexes nucléoprotéiques. Après incubation, 100 µl d'une solution de chloroforme/alcool isoamylique 24/1 (v/v) est ajouté à chaque tube. Ces derniers, sont mélangés doucement mais consciencieusement à la pipette puis incubés 3 minutes à température ambiante. Les tubes

sont alors centrifugés 5 minutes à 13 000 g à 3°C (la température doit être basse afin d'éviter que l'ADN reste en phase aqueuse). Le surnageant translucide contenant l'ARN est récupéré. La phase organique inférieure rose contient les protéines. 200 µl de la solution de chloroforme/ alcool isoamylique 24/1 (v/v) sont ajoutés au surnageant puis mélangés doucement mais consciencieusement à la pipette. Après une incubation de 5 minutes à température ambiante, les tubes sont centrifugés 5 minutes à 4°C. La phase aqueuse supérieure est mélangée à 500µl d'isopropanol puis incubée 15 minutes à 4°C. Les tubes sont ensuite centrifugés 15 minutes 4°C. Cette étape permet de précipiter l'ARN. Le culot est ensuite lavé 2 fois dans 800µl d'éthanol à 70%, puis séché au « speed vac » pendant 2 min. Le culot est resuspendu dans une solution Tris-HCl 10 mM pH 7,6 EDTA 1 mM pré-incubé à 37°C. L'ARN est ensuite traité deux fois avec de la turbo DNase (Ambion).

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 de 1 à 10 (RNA Integrity Number) aux échantillons d'ARN. Un échantillon est considéré de bonne qualité si son RIN est supérieur à 8,5.

Fiche n°4 : Etude du transcriptome par puces à ADN

Principe

Synthèse et marquage d'ADNc à partir des ARN totaux extraits, par l'utilisation du kit Superscript Indirect cDNA Labeling System (Invitrogen), pour l'étude du transcriptome par puces à ADN.

Méthode

La synthèse d'ADNc est faite à partir de 10µg d'ARN totaux en utilisant les oligo(dT)₂₀, suivant les recommandations du fabricant. Les ADNc ont ensuite été marqués soit avec des Alexa fluor 555 ou des Alexa fluor 647 suivant les recommandations du fabricant.

L'incorporation des Alexa fluor a en suite été dosée au Nanodrop. Nous avons comparé des conditions 2 à 2 (A et B). Pour chaque comparaison, 100pmol de A marqué aux Alexa fluor 555 et 100pmol de B marqué aux Alexa fluor 647 sont mélangés. Pour normaliser les résultats, nous avons effectué des dye-swap (marquage de B aux Alexa fluor 555 et marquage de A aux Alexa fluor 647). Les cibles marquées sont ensuite hybridées sur les puces à ADN, par incubation dans un four rotatif agilent (10rpm, 17h à 65°C) puis lavées selon les recommandations du fabricant (Agilent, Eurogentec).

Les lames ont ensuite été scannées par un scanner agilent, en utilisant une précision de 5µm en utilisant la fonction XDR (extended dynamic range).

Fiche n°5 : RT-PCR quantitative

Principe

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

La synthèse d'ADNc est faite à partir de 5µg d'ARN totaux en utilisant les oligo(dT)₂₀, suivant les recommandations du fabricant.

PCR quantitative selon 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) à été sélectionné. Les amorces ont été choisies à l'aide du logiciel LightCycler® Probe Design Software 2.0 (Roche Applied Science) et commandées chez Eurogentec.

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 rapporteur est analysé en parallèle des gènes d'intérêt. Ce gène dont l'expression n'est pas modifiée dans les différentes conditions biologiques permet de normaliser les résultats. Nous avons choisi le gène *Act1* codant pour l'actine.
- Un capillaire contenant de l'eau à la place de l'échantillon est indispensable afin de contrôler la non contamination (par de l'ADN) 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. 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, l'analyse les échantillons d'intérêts peut avoir lieu.

Fiche n°6 : Analyse des métabolites intracellulaires par LC/MS

Principe

L'obtention d'une empreinte métabolique repose essentiellement sur 3 étapes : la séparation par chromatographie en phase liquide (LC), la détection des molécules par spectrométrie de masse à haute résolution impliquant un instrument de type LTQ/Orbitrap (MS) et enfin une identification des composés réalisée d'une part, sur la base de la masse précise et d'autre part sur la comparaison du temps de rétention chromatographique et du spectre de fragmentation du composé à identifier avec ceux d'un composé de référence.

Méthode

Extraction des métabolites intracellulaires

Cette analyse a été conduite sur des échantillons issus de cultures en milieu chimiquement défini. Les échantillons sont centrifugés et lavés 2 fois dans de l'eau osmosée glacée. Puis, 10^8 cellules sont stockées à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Les culots sont ensuite décongelés 15 min à $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ puis resuspendus dans 1ml d'acide formique 1%. La solution est ensuite incubée 10 min à $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ puis centrifugée 30 min à $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Les surnageants sont lyophilisés et stockés à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Séparation des métabolites intracellulaires

Les échantillons sont repris dans 400 μl d'acide formique 1%, puis placés dans des flacons et mis dans le rail de l'injecteur automatique thermostaté à $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ de la chaîne chromatographique. Les composés sont séparés par chromatographie en phase liquide. La séparation est réalisée avec une colonne de type HS-F5 (2,1 x 250mm, 5 μm) avec un système d'élution impliquant l'utilisation d'un gradient eau (A) / acétonitrile contenant 0,1% d'acide formique (B) passé à 200 $\mu\text{l}/\text{min}$: 0-3 min: 0% B ; 3-20 min: augmentation linéaire de 0-100% de B ; 20-25 min: 100% de B ; 25-45 min: 0% de B.

Détection des métabolites intracellulaires

Le principe de fonctionnement d'un spectromètre de masse est basé sur la séparation des ions en fonction de leur rapport masse sur charge (m/z). Un spectromètre de masse comporte une source, qui permet d'ioniser les analytes, qui sont ensuite séparés dans un ou plusieurs analyseurs selon leurs rapports m/z .

L'ionisation électrospray : cette technique, développée par J.B. Fenn au milieu des années 1980 82, est utilisée en spectrométrie de masse pour produire des ions à partir de composés en solution. L'électrospray est produit par application à pression atmosphérique d'un fort champ électrique sur un liquide traversant un tube capillaire avec un faible débit. Le champ électrique est obtenu par application d'une différence de potentiel de 3 à 6 kV entre ce capillaire et la contre-électrode. Il provoque l'accumulation de charges à la surface du liquide, situé à l'extrémité du capillaire, qui va se rompre pour former des gouttelettes fortement chargées. L'évaporation du solvant contenu dans ces gouttelettes va provoquer la réduction de leur taille jusqu'au moment où les forces coulombiennes vont approcher le niveau des forces de cohésions de celles-ci et provoquer leur explosion. Alors une véritable cascade de fissions donne des gouttelettes de plus en plus petites, jusqu'au moment où le champ électrique en leurs surfaces devient suffisant pour provoquer la désorption des ions. Ceux-ci sont accélérés vers l'analyseur alors que les molécules non chargées sont éliminées. Les ions ainsi produits sont notamment des ions protonés (en mode positif) ou déprotonés (en mode négatif) qui permettent d'accéder à la masse moléculaire du composé intact.

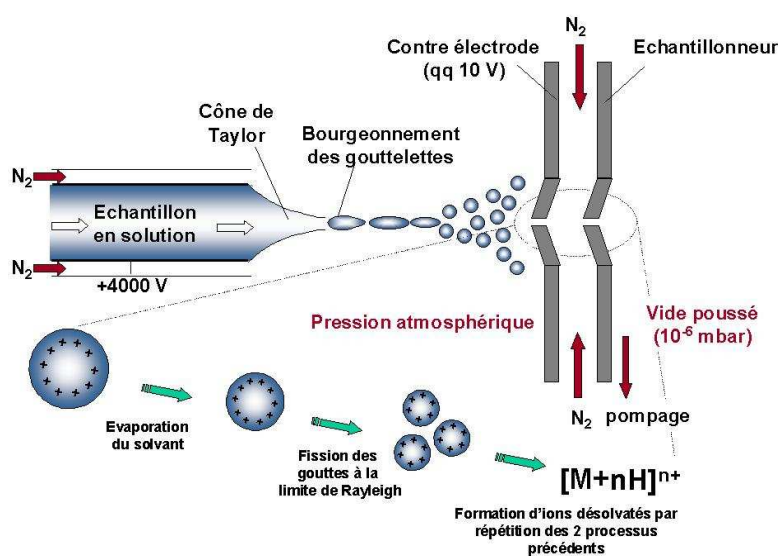


Schéma d'une source électrospray

Les analyseurs de type Orbitrap : ce sont des analyseurs à haute, voire ultra-haute résolution qui permettent d'accéder aux mesures de masses précises avec des erreurs de l'ordre de la partie pour million (ppm). L'Orbitrap est constitué de deux électrodes: la première est centrale et possède la forme d'un fuseau, la deuxième est extérieure et possède la forme d'un tonneau coupé en deux parties égales séparées par un espace étroit. Des tensions continues et un champ quadripolaire sont appliqués aux électrodes. Les ions sont injectés tangentiellement

par l'interstice séparant les deux moitiés de l'électrode externe. Les ions sont injectés à une énergie cinétique de quelques keV et se mettent à osciller suivant des spirales entremêlées autour de l'électrode centrale sous l'effet des tensions continues et de la géométrie du piège. Le vide y est poussé (10⁻¹⁰ torr). A chaque passage devant les ions génèrent un courant induit sur lequel sera appliqué une transformée de Fourier afin de convertir le signal en m/z.

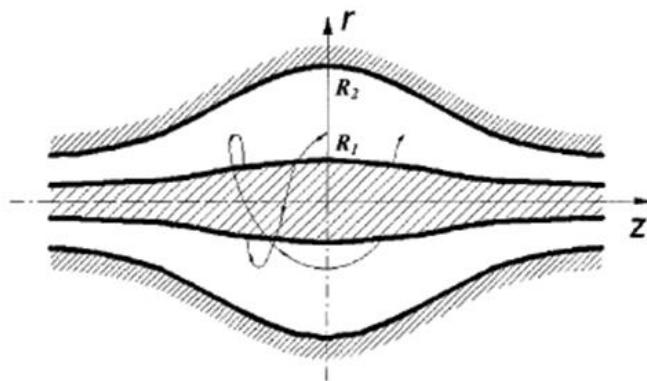


Schéma d'un piège électrostatique ou « orbitrap » d'après la description de A. Makarov

L'Orbitrap possède une vitesse de balayage très rapide ce qui lui permet d'accéder à l'ultra haute résolution sans utilisation de champ magnétique. Elle a été couplée par la société ThermoFisher scientifics avec un piège linéaire pour former un spectromètre de masse hybride, le LTQ Orbitrap™. Cet hybride permet ainsi de réaliser des expériences de fragmentation de type MSⁿ, les ions produits étant analysés avec la même résolution que celle de l'ion parent.

Identification des métabolites.

L'empreinte métabolique est ensuite traitée par le logiciel XCMS qui détecte les pics automatiquement et les aligne d'un chromatogramme à l'autre dans les domaines des masses et des temps de rétention. Puis, les temps de rétention et les masses exactes sont comparés à la base de données spectrale du laboratoire et aux bases de données publiques (KEGG, HMDB et METLIN).

Fiche n°7 : analyse des composés volatils

Principe

L'analyse des composés volatils repose essentiellement sur 3 étapes : l'extraction des composés par la technique de l'espace de tête dynamique (Purge and Trap), la séparation par chromatographie en phase gazeuse (GC) et l'identification des molécules par spectrométrie de masse (MS).

Dispositif instrumental

Les composés volatils sont analysés par extraction dynamique de l'espace de tête (Purge and Trap HP 3547A, Agilent Technologies) comprenant un piège absorbant (Tenax, 60 à 80 mesh, 0.25 g, 30 x 0.32 cm) couplé à un module de cryo-concentration. Ce module est couplé à un chromatogramme en phase gazeuse (GC G1530A, Agilent Technologies) assurant la séparation du mélange de composés extraits, lui-même équipé d'un spectromètre de masse (MSD 5973; Agilent Technologies) pour la détection/quantification.

Méthode

Extraction des composés volatils et séparation des composés

Cette analyse a été conduite sur des échantillons issus de cultures en milieu chimiquement défini. Les échantillons stockés à -80 °C après prélèvement, sont décongelés à 4 °C. Cinq millilitres de culture non filtrée sont préchauffés (3 min) puis maintenus à 60°C et subissent une extraction pendant 15 min sous un flux d'hélium ultra pur (qualité GC - débit de 15 ml.min⁻¹). Les composés volatils extraits sont retenus et concentrés par absorption sur le piège (Tenax) maintenu à 40°C. La vapeur d'eau extraite est ensuite éliminée par un balayage du piège par de l'hélium sec (3 min – dry purge). Le piège est alors chauffé à 225°C pendant 2 min pour désorber les composés volatils, qui sont directement transférés (via une ligne de transfert maintenue à 150°C) en tête de colonne capillaire et reconcentrés par le froid (cryo-concentration à -150°C). Les composés reconcentrés sont alors injectés par chauffage (180°C) et balayage à l'hélium du piège de cryo-concentration sur une colonne capillaire apolaire (HP-5MS, 30.0 m x 0.25 mm, 0.25µm épaisseur de film). Cette colonne est balayée par de l'hélium à un débit constant (1.2mL.min⁻¹). L'injection se fait en mode split/splitless (fermeture de la fuite pendant 1 min – débit de 24mL/min). Afin d'optimiser la séparation des composés du mélange complexe, un programme de montée en température de four du chromatogramme est appliqué : maintien de la température initiale (5°C) du four pendant 8

min ; augmentation de 5°C à 20°C à un gradient de 3°C.min⁻¹, suivi d'un deuxième gradient de 10°C.min⁻¹ de 20 à 150°C. La température du four est alors maintenue à 150°C pendant 10 min.

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.

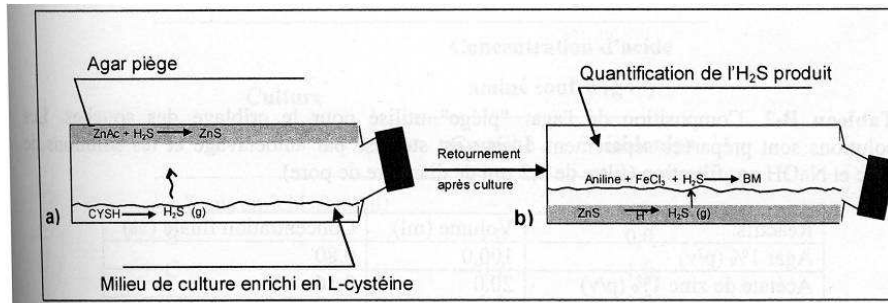
La détection. L'ion sortant de l'analyseur pénètre dans un photomultiplicateur d'électron. C'est une plaque métallique qui émet des électrons secondaires lors d'un choc avec des ions. Ces électrons sont multipliés et permettent l'élaboration d'un signal électrique d'intensité proportionnelle à la quantité d'ions reçus. L'ensemble des signaux émis par les ions permet d'obtenir un spectre de masse caractéristique de la molécule.

Identification. Les composés sont finalement identifiés par comparaison de leur spectre de masse avec ceux de la base de données spectrales Wiley275 (Agilent Technologies). Les temps de rétention sont aussi notés. La quantification se réalise en utilisant les composés du commerce (pureté GC) lorsqu'ils sont disponibles et en réalisant une courbe d'étalonnage (surface pic TIC-Total Ion Chromatogram / concentrations en µg/kg ou mg/kg). Si le composé n'est pas disponible, une quantification relative en équivalent d'un composé proche (même famille chimique) peut être utilisée. Cela sera précisé dans les résultats. Chaque dosage est réalisé en triple (3 échantillons biologiques indépendants) et les résultats sont exprimés par la moyenne ± écart type.

Fiche n°8 : mesure de l'H₂S

Principe

L'H₂S va être piégé dans un agar spécial, puis révélé par un réactif d'aniline. L'absorbance du mélange réactionnel à 670nm est proportionnelle à la quantité d'H₂S produit.



Méthode

Préparation du flacon piège

Nous utilisons des flacons de culture cellulaire de 50ml (Greiner Bio-one). L'agar piège (volume final 125ml) est composé de 100ml d'agar 1% (autoclavé à 120°C 20min), de 20ml d'acétate de zinc 1% et de 5ml de NaOH 12%. Lorsque la température de l'agar piège atteint 45°C mettre 5ml par flacon, et le faire prendre à 4°C.

Précultures et cultures

Les précultures sont effectuées en MCD pendant 24h à 25°C sous une agitation de 150rpm. Les cultures sont réalisées dans 5ml de MCD, à un ensemencement de 5.10⁶ cellules par ml, dans les flacons (agar piège vers le haut), pendant 48heures à 25°C sous une agitation de 90rpm.

Révélation de l'H₂S

On récupère préalablement le milieu de culture pour effectuer un suivi de croissance. 2ml de réactif d'aniline (pour 125ml final : 56,8ml HCl 37% + 68,2ml H₂O + 1g 4-amino-N,N-dimethylaniline) sont déposés sur l'agar piège. Le flacon est incubé 10min, puis 400µl de Chlorure de Fer (250ml final : 24,8ml HCl 37% + 225,2ml H₂O + 7,462g FeCl₃) sont ajoutés. Le flacon est à nouveau incubé, pendant 20min.

Mesure de l'H₂S

Les réactions sont diluées dans de l'eau au 1/8^{ème}. L'absorbance à 670nm est ensuite mesurée. L'absorbance zéro est faite à partir d'un flacon ayant contenu du milieu non ensemencé. La quantification se fait à partir d'une gamme réalisée avec du Na₂S.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- Abu-Tarboush, H. M. (1996). Comparison of Associative Growth and Proteolytic Activity of Yogurt Starters in Whole Milk from Camels and Cows. *J. Dairy Sci.* 79(3), 366-371.
- Adamis, P. D. B., Mannarino, S. C. & Eleutherio, E. C. A. (2009). Glutathione and gamma-glutamyl transferases are involved in the formation of cadmium-glutathione complex. *FEBS Letters* 583(9), 1489-1492.
- Adamitsch, B. F., Karner, F. & Hampel, W. A. (2003). High cell density cultivation of *Brevibacterium linens* and formation of proteinases and lipase. *Biotechnology Letters* 25(9), 705-708.
- 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(1-2), 25-36.
- Amarita, F., Yvon, M., Nardi, M., Chambellon, E., Delettre, J. & Bonnarne, P. (2004). Identification and functional analysis of the gene encoding methionine-gamma-lyase in *Brevibacterium linens*. *Applied and Environmental Microbiology* 70(12), 7348-7354.
- Amoroso, M. J., Manca de Nadra, M. C. & Oliver, G. (1989). The growth and sugar utilization by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* and *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* isolated from market yogurt. *Le Lait* 69(6), 519-528.
- Arfi, K., Amárita, 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(3), 245-53.
- Arfi, K., Landaud, S. & Bonnarne, P. (2006). Evidence for distinct L-methionine catabolic pathways in the yeast *Geotrichum candidum* and the bacterium *Brevibacterium linens*. *Applied and Environmental Microbiology* 72(3), 2155-62.
- Arfi, K., Spinnler, H. E., Tache, R. & Bonnarne, P. (2002). Production of volatile compounds by cheese-ripening yeasts: requirement for a methanethiol donor for S-methyl thioacetate synthesis by *Kluyveromyces lactis*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 58(4), 503-10.
- Arst, H. N. (1968). Genetic analysis of the first steps of sulphate metabolism in *Aspergillus nidulans*. *Nature* 219(5151), 268-270.
- 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. *J. Dairy Sci.* 78(1), 8-16.
- Avram, D. & Bakalinsky, A. T. (1997). SSU1 encodes a plasma membrane protein with a central role in a network of proteins conferring sulfite tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology* 179(18), 5971-5974.
- Balasubramanyam, B. V. & Varadaraj, M. C. (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(1), 97-102.
- Balasundaram, D., Tabor, C. W. & Tabor, H. (1993). Oxygen toxicity in a polyamine-depleted *spe2* delta mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90(10), 4693-4697.
- Balasundaram, D., Tabor, C. W. & Tabor, H. (1996). Sensitivity of polyamine-deficient *Saccharomyces cerevisiae* to elevated temperatures. *Journal of Bacteriology* 178(9), 2721-2724.

- Balasundaram, D., Tabor, C. W. & Tabor, H. (1991). Spermidine or spermine is essential for the aerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88(13), 5872-5876.
- Barbey, R., Baudouin-Cornu, P., Lee, T. A., Rouillon, A., Zarzov, P., Tyers, M. & Thomas, D. (2005). Inducible dissociation of SCF(Met30) ubiquitin ligase mediates a rapid transcriptional response to cadmium. *The EMBO Journal* 24(3), 521-32.
- Baudouin-Cornu, P. & Labarre, J. (2006). Regulation of the cadmium stress response through SCF-like ubiquitin ligases: comparison between *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* and mammalian cells. *Biochimie* 88(11), 1673-85.
- Baudouin-Cornu, P., Surdin-Kerjan, Y., Marlière, P. & Thomas, D. (2001). Molecular evolution of protein atomic composition. *Science (New York, N.Y.)* 293(5528), 297-300.
- Benkerroum, N., Oubel, H. & Ben Mimoun, L. (2002). Behavior of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in yogurt fermented with a bacteriocin-producing thermophilic starter. *Journal of food protection* 65(5), 799-805.
- Berard, L. & Marchenay, P. (2004). Produits de terroir, fromages, normes et biodiversité.
- Bérodier, F., Lavanchy, P., Zannoni, M., Casals, J., Herrero, L. & Adamo, C. (1997). Guide d'Évaluation Olfacto-Gustative des Fromages à Pâte Dure et Semi-dure. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* 30(7), 653-664.
- Besançon, X., Smet, C., Chabalier, C., Rivemale, M., Reverbel, J. P., Ratomahenina, R. & Galzy, P. (1992). Study of surface yeast flora of Roquefort cheese. *International Journal of Food Microbiology* 17(1), 9-18.
- Blaiseau, P. L., Isnard, A. D., Surdin-Kerjan, Y. & Thomas, D. (1997). Met31p and Met32p, two related zinc finger proteins, are involved in transcriptional regulation of yeast sulfur amino acid metabolism. *Molecular and Cellular Biology* 17(7), 3640-8.
- Blaiseau, P. L. & Thomas, D. (1998). Multiple transcriptional activation complexes tether the yeast activator Met4 to DNA. *The EMBO Journal* 17(21), 6327-36.
- Boer, V. M., Tai, S. L., Vuralhan, Z., Arifin, Y., Walsh, M. C., Piper, M. D. W., de Winde, J. H., Pronk, J. T. & Daran, J. M. (2007). Transcriptional responses of *Saccharomyces cerevisiae* to preferred and nonpreferred nitrogen sources in glucose-limited chemostat cultures. *Fems Yeast Research* 7(4), 604-620.
- Boer, V. M., de Winde, J. H., Pronk, J. T. & Piper, M. D. W. (2003). The genome-wide transcriptional responses of *Saccharomyces cerevisiae* grown on glucose in aerobic chemostat cultures limited for carbon, nitrogen, phosphorus, or sulfur. *The Journal of Biological Chemistry* 278(5), 3265-74.
- 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(5), 1671-84.
- Bondar, D. C., Beckerich, J. M. & Bonnarne, P. (2005). Involvement of a branched-chain aminotransferase in production of volatile sulfur compounds in *Yarrowia lipolytica*. *Applied and Environmental Microbiology* 71(8), 4585-91.
- Bonnarme, P., Lapadatescu, C., Yvon, M. & Spinnler, H. E. (2001). L-methionine degradation potentialities of cheese-ripening microorganisms. *The Journal of Dairy Research* 68(4), 663-674.
- Bonnarme, P., Psoni, L. & Spinnler, H. E. (2000). Diversity of L-methionine catabolism pathways in cheese-ripening bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 66(12), 5514-5517.

- Bourbouloux, A., Shahi, P., Chakladar, A., Delrot, S. & Bachhawat, A. K. (2000). Hgt1p, a high affinity glutathione transporter from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry* 275(18), 13259-13265.
- Boutrou, R. & Guéguen, M. (2005). Interests in *Geotrichum candidum* for cheese technology. *International Journal of Food Microbiology* 102(1), 1-20.
- Breton, A. & Surdin-Kerjan, Y. (1977). Sulfate Uptake in *Saccharomyces cerevisiae*: Biochemical and Genetic Study. *Journal of Bacteriology* 132(1), 224-232.
- Breunig, Bolotin-Fukuhara, Bianchi, Bourgarel, Falcone, Ferrero, Frontali, Goffrini, Krijger, Mazzoni, Milkowski, Steensma, Wésolowski-Louvel & Zeeman (2000). Regulation of primary carbon metabolism in *Kluyveromyces lactis*. *Enzyme and Microbial Technology* 26(9-10), 771-780.
- Brussow, H. (2001). Phages of dairy bacteria. *Annual Review of Microbiology* 55, 283-303.
- Brzywczy, J. & Paszewski, A. (1994). Sulfur amino acid metabolism in *Schizosaccharomyces pombe*: occurrence of two O-acetylhomoserine sulfhydrylases and the lack of the reverse transsulfuration pathway. *FEMS Microbiology Letters* 121(2), 171-174.
- Brzywczy, J., Natorff, R., Sieńko, M. & Paszewski, A. (2007). Multiple fungal enzymes possess cysteine synthase activity in vitro. *Research in Microbiology* 158(5), 428-36.
- Brzywczy, J. & Paszewski, A. (1999). Cloning and characterization of the *Kluyveromyces lactis* homocysteine synthase gene. *Yeast (Chichester, England)* 15(13), 1403-9.
- Brzywczy, J., Sieńko, M., Kucharska, A. & Paszewski, A. (2002). Sulphur amino acid synthesis in *Schizosaccharomyces pombe* represents a specific variant of sulphur metabolism in fungi. *Yeast (Chichester, England)* 19(1), 29-35.
- Cao, Y. Y., Cao, Y. B., Xu, Z., Ying, K., Li, Y., Xie, Y., Zhu, Z. Y., Chen, W. S. & Jiang, Y. Y. (2005). cDNA microarray analysis of differential gene expression in *Candida albicans* biofilm exposed to farnesol. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49(2), 584-9.
- Caplice, E. & Fitzgerald, G. F. (1999). Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology* 50(1-2), 131-149.
- Carmel-Harel, O. & Storz, G. (2000). Roles of the glutathione- and thioredoxin-dependent reduction systems in the *Escherichia coli* and *saccharomyces cerevisiae* responses to oxidative stress. *Annual Review of Microbiology* 54, 439-461.
- Chattopadhyay, M. K., Chen, W., Poy, G., Cam, M., Stiles, D. & Tabor, H. (2009). Microarray studies on the genes responsive to the addition of spermidine or spermine to a *Saccharomyces cerevisiae* spermidine synthase mutant. *Yeast (Chichester, England)* 26(10), 531-544.
- Chattopadhyay, M. K., Tabor, C. W. & Tabor, H. (2006). Polyamine deficiency leads to accumulation of reactive oxygen species in a *spe2Delta* mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast (Chichester, England)* 23(10), 751-761.
- Chaves-López, C., De Angelis, M., Martuscelli, M., Serio, A., Paparella, A. & Suzzi, G. (2006). Characterization of the Enterobacteriaceae isolated from an artisanal Italian ewe's cheese (Pecorino Abruzzese). *Journal of Applied Microbiology* 101(2), 353-360.
- Chen, H. & Fink, G. R. (2006). Feedback control of morphogenesis in fungi by aromatic alcohols. *Genes & Development* 20(9), 1150-1161.
- Chen, H., Fujita, M., Feng, Q., Clardy, J. & Fink, G. R. (2004). Tyrosol is a quorum-sensing molecule in *Candida albicans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(14), 5048-5052.

- Cherest, H., Surdin-Kerjan, Y., Antoniewski, J. & de Robichon-Szulmajster, H. (1973). Effects of regulatory mutations upon methionine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: loci eth2-eth3-eth10. *Journal of Bacteriology* 115(3), 1084-1093.
- Cherest, H., Davidian, J. C., Thomas, D., Benes, V., Ansorge, W. & Surdin-Kerjan, Y. (1997). Molecular characterization of two high affinity sulfate transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 145(3), 627-635.
- Cherest, H. & Surdin-Kerjan, Y. (1978). S-adenosyl methionine requiring mutants in *Saccharomyces cerevisiae*: evidences for the existence of two methionine adenosyl transferases. *Molecular & General Genetics: MGG* 163(2), 153-167.
- Cherest, H. & Surdin-Kerjan, Y. (1981). The two methionine adenosyl transferases in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for the existence of dimeric enzymes. *Molecular & General Genetics: MGG* 182(1), 65-69.
- Cherest, H. & Surdin-Kerjan, Y. (1992). Genetic analysis of a new mutation conferring cysteine auxotrophy in *Saccharomyces cerevisiae*: updating of the sulfur metabolism pathway. *Genetics* 130(1), 51-8.
- Cherest, H., Thomas, D. & Surdin-Kerjan, Y. (1993). Cysteine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* occurs through the transsulfuration pathway which has been built up by enzyme recruitment. *Journal of Bacteriology* 175(17), 5366-5374.
- Cherest, H., Thomas, D. & Surdin-Kerjan, Y. (2000). Polyglutamylation of folate coenzymes is necessary for methionine biosynthesis and maintenance of intact mitochondrial genome in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry* 275(19), 14056-63.
- Chiang, P. K. & Cantoni, G. L. (1977). Activation of methionine for transmethylation. Purification of the S-adenosylmethionine synthetase of bakers' yeast and its separation into two forms. *The Journal of Biological Chemistry* 252(13), 4506-4513.
- Cholet, O., Hénaut, 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(8), 2561-70.
- Cholet, O., Hénaut, A., Hébert, A. & Bonnarme, P. (2008). Transcriptional analysis of L-methionine catabolism in the cheese-ripening yeast *Yarrowia lipolytica* in relation to volatile sulfur compound biosynthesis. *Applied and Environmental Microbiology* 74(11), 3356-67.
- Cone, M. C., Marchitto, K., Zehfus, B. & Ferro, A. J. (1982). Utilization by *Saccharomyces cerevisiae* of 5'-methylthioadenosine as a source of both purine and methionine. *Journal of Bacteriology* 151(1), 510-515.
- Cordente, A. G., Heinrich, A., Pretorius, I. S. & Swiegers, J. H. (2009). Isolation of sulfite reductase variants of a commercial wine yeast with significantly reduced hydrogen sulfide production. *FEMS Yeast Research* 9(3), 446-459.
- Corsetti, A., Rossi, J. & Gobbetti, M. (2001). Interactions between yeasts and bacteria in the smear surface-ripened cheeses. *International Journal of Food Microbiology* 69(1-2), 1-10.
- Coulon, J. B. (2000). Etude du lien entre terroir et produit dans le cas des fromages AOC : influence de la composition floristique des fourrages sur les caractéristiques chimiques et sensorielles des fromages affinés.
- Courtin, P. & Rul, F. (2004). Interactions between microorganisms in a simple ecosystem: yogurt bacteria as a study model. *Le Lait* 84(1-2), 10.
- 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(3), 231-240.
- Dahl, S., Tavarua, F. K. & Xavier Malcata, F. (2000). Relationships between flavour and microbiological profiles in Serra da Estrela cheese throughout ripening. *International Dairy Journal* 10(4), 255-262.
- De Sordi, L. & Mühlischlegel, F. A. (2009). Quorum sensing and fungal-bacterial interactions in *Candida albicans*: a communicative network regulating microbial coexistence and virulence. *FEMS Yeast Research* 9(7), 990-999.
- Deetae, P., Bonnarme, P., 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(5), 1161-1171.
- Deetae, P., Mounier, J., Bonnarme, P., Spinnler, H. E., Irlinger, F. & Helinck, S. (2009a). Effects of *Proteus vulgaris* growth on the establishment of a cheese microbial community and on the production of volatile aroma compounds in a model cheese. *Journal of Applied Microbiology* 107(4), 1404-1413.
- Deetae, P., Spinnler, H. E., Bonnarme, P. & Helinck, S. (2009b). Growth and aroma contribution of *Microbacterium foliorum*, *Proteus vulgaris* and *Psychrobacter* sp. during ripening in a cheese model medium. *Applied Microbiology and Biotechnology* 82(1), 169-177.
- Delaunay, A., Isnard, A. D. & Toledano, M. B. (2000). H₂O₂ sensing through oxidation of the Yap1 transcription factor. *The EMBO Journal* 19(19), 5157-5166.
- Dias & Weimer (1998a). Conversion of methionine to thiols by lactococci, lactobacilli, and brevbacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 64(9), 3320-3326.
- Dias & Weimer (1998b). Purification and characterization of L-methionine gamma-lyase from brevbacterium linens BL2. *Applied and Environmental Microbiology* 64(9), 3327-3331.
- Donalies, U. E. B. & Stahl, U. (2002). Increasing sulphite formation in *Saccharomyces cerevisiae* by overexpression of MET14 and SSU1. *Yeast (Chichester, England)* 19(6), 475-484.
- Dormer, U. H., Westwater, J., McLaren, N. F., Kent, N. A., Mellor, J. & Jamieson, D. J. (2000). Cadmium-inducible expression of the yeast GSH1 gene requires a functional sulfur-amino acid regulatory network. *The Journal of Biological Chemistry* 275(42), 32611-32616.
- Drebot, M. A., Barnes, C. A., Singer, R. A. & Johnston, G. C. (1990). Genetic assessment of stationary phase for cells of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology* 172(7), 3584-9.
- Düring-Olsen, L., Regenber, B., Gjermansen, C., Kielland-Brandt, M. C. & Hansen, J. (1999). Cysteine uptake by *Saccharomyces cerevisiae* is accomplished by multiple permeases. *Current Genetics* 35(6), 609-617.
- Dufossé, L., Mabon, P. & Binet, A. (2001). Assessment of the coloring strength of brevbacterium linens strains: spectrophotometry versus total carotenoid extraction/quantification. *Journal of Dairy Science* 84(2), 354-360.
- Dufour, J. P. (1991). Influence of industrial brewing and fermentation working conditions on beer SO₂ level and flavour stability. In: *Proceedings of*, Lisbon, 1991. pp. 209-216. Lisbon: IRL Press at Oxford University Press: Oxford, UK.
- Dugravot, S., Mondy, N., Mandon, N. & Thibout, E. (2005). Increased sulfur precursors and volatiles production by the leek *Allium porrum* in response to specialist insect attack.

Journal of Chemical Ecology 31(6), 1299-314.

- Dujon, B. (2006). Yeasts illustrate the molecular mechanisms of eukaryotic genome evolution. *Trends in Genetics: TIG* 22(7), 375-87.
- Dworeck, T., Wolf, K. & Zimmermann, M. (2009). SpOPT1, a member of the oligopeptide family (OPT) of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, is involved in the transport of glutathione through the outer membrane of the cell. *Yeast (Chichester, England)* 26(1), 67-73.
- Entian, K. D. & de Vos, W. M. (1996). Genetics of subtilin and nisin biosyntheses: biosynthesis of lantibiotics. *Antonie Van Leeuwenhoek* 69(2), 109-117.
- Fauchon, M., Lagniel, G., Aude, J. C., Lombardia, L., Soularue, P., Petat, C., Marguerie, G., Sentenac, A., Werner, M. & Labarre, J. (2002). Sulfur sparing in the yeast proteome in response to sulfur demand. *Molecular Cell* 9(4), 713-23.
- Feldmann, H. (2000). Génolevures--a novel approach to 'evolutionary genomics'. *FEBS Letters* 487(1), 1-2.
- Ferchichi, M., Hemme, D., Nardi, M. & Pamboukdjian, N. (1985). Production of Methanethiol from Methionine by *Brevibacterium linens* CNRZ 918. *J Gen Microbiol* 131(4), 715-723.
- Fleet, G. H. (1990). Yeasts in dairy products. *The Journal of Applied Bacteriology* 68(3), 199-211.
- Fleet, G. H. (1999). Microorganisms in food ecosystems. *International Journal of Food Microbiology* 50(1-2), 101-117.
- Fleet, G. H. (2003). Yeast interactions and wine flavour. *International Journal of Food Microbiology* 86(1-2), 11-22.
- Flick, K., Ouni, I., Wohlschlegel, J. A., Capati, C., McDonald, W. H., Yates, J. R. & Kaiser, P. (2004). Proteolysis-independent regulation of the transcription factor Met4 by a single Lys 48-linked ubiquitin chain. *Nature Cell Biology* 6(7), 634-41.
- Fontecave, M., Atta, M. & Mulliez, E. (2004). S-adenosylmethionine: nothing goes to waste. *Trends in Biochemical Sciences* 29(5), 243-9.
- Forquin, M. P. (2010). *Étude de Brevibacterium aurantiacum, une bactérie d'affinage de fromage : de son métabolisme du soufre à son interaction avec Kluyveromyces lactis*. Diss. Thiverval Grignon: INRA-AgroParisTech.
- Forquin, M., Duvergey, H., Proux, C., Loux, V., Mounier, J., Landaud, S., Coppée, J., Gibrat, J., Bonnarme, P., Martin-Verstraete, I. & Vallaeys, T. (2009). Identification of brevibacteriaceae by multilocus sequence typing and comparative genomic hybridization analyses. *Applied and Environmental Microbiology* 75(19), 6406-6409.
- Fujita, Y. & Takegawa, K. (2004). Characterization of two genes encoding putative cysteine synthase required for cysteine biosynthesis in *Schizosaccharomyces pombe*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 68(2), 306-311.
- 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(1-2), 21-32.
- Ganguli, D., Kumar, C. & Bachhawat, A. K. (2007). The alternative pathway of glutathione degradation is mediated by a novel protein complex involving three new genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 175(3), 1137-1151.
- Gardarin, A., Chédin, S., Lagniel, G., Aude, J., Godat, E., Catty, P. & Labarre, J. (2010). Endoplasmic reticulum is a major target of cadmium toxicity in yeast. *Molecular*

Microbiology 76(4), 1034-1048.

- Gaucheron F. (2000). Iron fortification in dairy industry. *Trends in Food Science and Technology* 11, 403-409.
- Godon, C., Lagniel, G., Lee, J., Buhler, J. M., Kieffer, S., Perrot, M., Boucherie, H., Toledano, M. B. & Labarre, J. (1998). The H₂O₂ stimulon in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry* 273(35), 22480-22489.
- Goerges, S., Aigner, U., Silakowski, B. & Scherer, S. (2006). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by food-borne yeasts. *Applied and Environmental Microbiology* 72(1), 313-8.
- 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(7), 2210-7.
- Gomes, D. S., Fragoso, L. C., Riger, C. J., Panek, A. D. & Eleutherio, E. C. A. (2002). Regulation of cadmium uptake by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1573(1), 21-25.
- González, J. C., Banerjee, R. V., Huang, S., Sumner, J. S. & Matthews, R. G. (1992). Comparison of cobalamin-independent and cobalamin-dependent methionine synthases from *Escherichia coli*: two solutions to the same chemical problem. *Biochemistry* 31(26), 6045-6056.
- Gonzalez-Lopez, C. I., Szabo, R., Blanchin-Roland, S. & Gaillardin, C. (2002). Genetic control of extracellular protease synthesis in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Genetics* 160(2), 417-427.
- González-Siso, Freire-Picos, Ramil, González-Domínguez, Rodríguez Torres A & Cerdán (2000). Respiratory fermentative metabolism in *Kluyveromyces lactis*: Insights and perspectives. *Enzyme and Microbial Technology* 26(9-10), 699-705.
- Grant, C. M. (2001). Role of the glutathione/glutaredoxin and thioredoxin systems in yeast growth and response to stress conditions. *Molecular Microbiology* 39(3), 533-541.
- Grant, C. M., MacIver, F. H. & Dawes, I. W. (1997). Glutathione synthetase is dispensable for growth under both normal and oxidative stress conditions in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* due to an accumulation of the dipeptide gamma-glutamylcysteine. *Molecular Biology of the Cell* 8(9), 1699-1707.
- Greetham, D., Vickerstaff, J., Shenton, D., Perrone, G. G., Dawes, I. W. & Grant, C. M. (2010). Thioredoxins function as deglutathionylase enzymes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Biochemistry* 11, 3.
- Grenson, M., Hou, C. & Crabeel, M. (1970). Multiplicity of the amino acid permeases in *Saccharomyces cerevisiae*. IV. Evidence for a general amino acid permease. *Journal of Bacteriology* 103(3), 770-777.
- Grynberg, M., Piotrowska, M., Pizzinini, E., Turner, G. & Paszewski, A. (2001). The *Aspergillus nidulans* metE gene is regulated by a second system independent from sulphur metabolite repression. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1519(1-2), 78-84.
- Grynberg, M., Topczewski, J., Godzik, A. & Paszewski, A. (2000). The *Aspergillus nidulans* cysA gene encodes a novel type of serine O-acetyltransferase which is homologous to homoserine O-acetyltransferases. *Microbiology (Reading, England)* 146 (Pt 10), 2695-703.

- van de Guchte, M., Ehrlich, S. D. & Maguin, E. (2001). Production of growth-inhibiting factors by *Lactobacillus delbrueckii*. *Journal of Applied Microbiology* 91(1), 147-153.
- Gueguen, M. & Lenoir, J. (1975). Aptitude de l'espèce *Geotrichum candidum* à la production d'enzymes protéolytiques. Note complémentaire. *Le Lait* 55(549-550), 9 pages.
- Gueguen, M. & Schmidt, M. (1992). Les levures et *Geotrichum candidum*. In: *Les groupes microbiens d'intérêt laitier*. CEPIL., pp. 165-219. Paris: Hermier, J., Lenoir, J., Weber, F.
- Guerzoni, M. E., Lanciotti, R., Vannini, L., Galgano, F., Favati, F., Gardini, F. & Suzzi, G. (2001). Variability of the lipolytic activity in *Yarrowia lipolytica* and its dependence on environmental conditions. *International Journal of Food Microbiology* 69(1-2), 79-89.
- Hamasaki-Katagiri, N., Katagiri, Y., Tabor, C. W. & Tabor, H. (1998). Spermine is not essential for growth of *Saccharomyces cerevisiae*: identification of the SPE4 gene (spermine synthase) and characterization of a spe4 deletion mutant. *Gene* 210(2), 195-201.
- Hamasaki-Katagiri, N., Tabor, C. W. & Tabor, H. (1997). Spermidine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: polyamine requirement of a null mutant of the SPE3 gene (spermidine synthase). *Gene* 187(1), 35-43.
- Hansen, J. & Johannesen, P. F. (2000). Cysteine is essential for transcriptional regulation of the sulfur assimilation genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and General Genetics* 263(3), 535-542.
- Hansen, J., Muldbjerg, M., Chérest, H. & Surdin-Kerjan, Y. (1997). Siroheme biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* requires the products of both the MET1 and MET8 genes. *FEBS Letters* 401(1), 20-24.
- Hansen, T. K. & Jakobsen, M. (2001). Taxonomical and technological characteristics of *Saccharomyces* spp. associated with blue veined cheese. *International Journal of Food Microbiology* 69(1-2), 59-68.
- Hazelwood, L. A., Daran, J., van Maris, A. J. A., Pronk, J. T. & Dickinson, J. R. (2008). The Ehrlich pathway for fusel alcohol production: a century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism. *Applied and Environmental Microbiology* 74(8), 2259-66.
- Helinck, S., Spinnler, H. E., Parayre, S., Dame-Cahagne, M. & Bonnarme, P. (2000). Enzymatic versus spontaneous S-methyl thioester synthesis in *Geotrichum candidum*. *FEMS Microbiology Letters* 193(2), 237-41.
- Hellborg, L., Woolfit, M., Arthursson-Hellborg, M. & Piskur, J. (2008). Complex evolution of the DAL5 transporter family. *BMC Genomics* 9, 164.
- Herve-Jimenez, L., Guillouard, I., Guedon, E., Boudebbouze, S., Hols, P., Monnet, V., Maguin, E. & Rul, F. (2009). Postgenomic analysis of streptococcus thermophilus cocultivated in milk with *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*: involvement of nitrogen, purine, and iron metabolism. *Applied and Environmental Microbiology* 75(7), 2062-2073.
- Herve-Jimenez, L., Guillouard, I., Guedon, E., Gautier, C., Boudebbouze, 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(20), 4273-86.
- Hogan, D. A., Vik, A. & Kolter, R. (2004). A *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule influences *Candida albicans* morphology. *Molecular Microbiology* 54(5), 1212-23.
- 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(3), 343-362.

- 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 and Applied Microbiology* 27(2), 211-218.
- Hornby, J. M., Jensen, E. C., Lisec, A. D., Tasto, J. J., Jahnke, B., Shoemaker, R., Dussault, P. & Nickerson, K. W. (2001). Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. *Applied and Environmental Microbiology* 67(7), 2982-2992.
- Howell, K. S., Cozzolino, D., Bartowsky, E. J., Fleet, G. H. & Henschke, P. A. (2006). Metabolic profiling as a tool for revealing *Saccharomyces* interactions during wine fermentation. *FEMS Yeast Research* 6(1), 91-101.
- Igarashi, K. & Kashiwagi, K. (2010). Characteristics of cellular polyamine transport in prokaryotes and eukaryotes. *Plant Physiology and Biochemistry: PPB / Societe Francaise De Physiologie Vegetale* [online], Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20159658>. [Accessed 2010-03-25].
- Iida, H. & Yahara, I. (1984). Specific early-G1 blocks accompanied with stringent response in *Saccharomyces cerevisiae* lead to growth arrest in resting state similar to the G0 of higher eucaryotes. *The Journal of Cell Biology* 98(4), 1185-93.
- Irlinger, F., Morvan, A., Solh, N. E. & Bergère, J. L. (1997). Taxonomic characterization of coagulase-negative staphylococci in ripening flora from traditional French cheeses. *Systematic and applied microbiology* 20(2), 319-329.
- Irlinger, F. (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: coagulase-negative staphylococci. *International Journal of Food Microbiology* 126(3), 302-310.
- Isnard, A. D., Thomas, D. & Surdin-Kerjan, Y. (1996). The study of methionine uptake in *Saccharomyces cerevisiae* reveals a new family of amino acid permeases. *Journal of Molecular Biology* 262(4), 473-84.
- Jaspers, C. J. & Penninckx, M. J. (1984). Glutathione metabolism in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Evidence that gamma-glutamyltranspeptidase is a vacuolar enzyme. *Biochimie* 66(1), 71-74.
- Jin, Y. H., Jang, Y. K., Kim, M. J., Rad, M. R., Kirchrath, L., Seong, R. H., Hong, S. H., Hollenberg, C. P. & Park, S. D. (1995). Characterization of SFP2, a putative sulfate permease gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 214(2), 709-715.
- Jones, D., Watkins, J. & Erickson, S. K. (1973). Taxonomically significant colour changes in *Brevibacterium linens* probably associated with a carotenoid-like pigment. *Journal of General Microbiology* 77(1), 145-150.
- 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(8), 3024-3030.
- Juillard, V., Foucaud, C., Desmazeaud, M. & Richard, J. (1996). Utilization of nitrogen sources during growth of *Lactococcus lactis* in milk. *Le Lait* 76(1-2), 12.
- Kagkli, D. M., Bonnarme, P., Neuvéglise, C., Cogan, T. M. & Casaregola, S. (2006a). L-methionine degradation pathway in *Kluyveromyces lactis*: identification and functional analysis of the genes encoding L-methionine aminotransferase. *Applied and Environmental Microbiology* 72(5), 3330-5.
- Kagkli, D. M., Tâche, R., Cogan, T. M., Hill, C., Casaregola, S. & Bonnarme, P. (2006b). *Kluyveromyces lactis* and *Saccharomyces cerevisiae*, two potent deacidifying and volatile-

- sulphur-aroma-producing microorganisms of the cheese ecosystem. *Applied Microbiology and Biotechnology* 73(2), 434-42.
- Kaiser, P., Flick, K., Wittenberg, C. & Reed, S. I. (2000). Regulation of transcription by ubiquitination without proteolysis: Cdc34/SCF(Met30)-mediated inactivation of the transcription factor Met4. *Cell* 102(3), 303-14.
- van de Kamp, M., Schuur, T. A., Vos, A., van der Lende, T. R., Konings, W. N. & Driessen, A. J. (2000). Sulfur regulation of the sulfate transporter genes *sutA* and *sutB* in *Penicillium chrysogenum*. *Applied and Environmental Microbiology* 66(10), 4536-8.
- van de Kamp, M., Pizzinini, E., Vos, A., van der Lende, T. R., Schuur, T. A., Newbert, R. W., Turner, G., Konings, W. N. & Driessen, A. J. M. (1999). Sulfate transport in *Penicillium chrysogenum*: Cloning and characterization of the *sutA* and *sutB* genes. *Journal of Bacteriology* 181(23), 7228-7234.
- Katz, J. E., Dlakić, M. & Clarke, S. (2003). Automated identification of putative methyltransferases from genomic open reading frames. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP* 2(8), 525-40.
- Kaur, H., Kumar, C., Junot, C., Toledano, M. B. & Bachhawat, A. K. (2009). Dug1p Is a Cys-Gly peptidase of the gamma-glutamyl cycle of *Saccharomyces cerevisiae* and represents a novel family of Cys-Gly peptidases. *The Journal of Biological Chemistry* 284(21), 14493-14502.
- Kaur, J. & Bachhawat, A. K. (2007). Yct1p, a novel, high-affinity, cysteine-specific transporter from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 176(2), 877-90.
- Kaur, J. & Bachhawat, A. K. (2009). Gln-222 in transmembrane domain 4 and Gln-526 in transmembrane domain 9 are critical for substrate recognition in the yeast high affinity glutathione transporter, Hgt1p. *The Journal of Biological Chemistry* 284(35), 23872-23884.
- Kaur, J., Srikanth, C. V. & Bachhawat, A. K. (2009). Differential roles played by the native cysteine residues of the yeast glutathione transporter, Hgt1p. *FEMS Yeast Research* 9(6), 849-866.
- Kleerebezem, M. (2004). Quorum sensing control of lantibiotic production; nisin and subtilin autoregulate their own biosynthesis. *Peptides* 25(9), 1405-1414.
- Kodaki, T., Tsuji, S., Otani, N., Yamamoto, D., Rao, K. S., Watanabe, S., Tsukatsune, M. & Makino, K. (2003). Differential transcriptional regulation of two distinct S-adenosylmethionine synthetase genes (*SAM1* and *SAM2*) of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research. Supplement (2001)* (3), 303-304.
- Kosugi, A., Koizumi, Y., Yanagida, F. & Udaka, S. (2001). MUP1, high affinity methionine permease, is involved in cysteine uptake by *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 65(3), 728-31.
- Kumar, C., Sharma, R. & Bachhawat, A. K. (2003). Utilization of glutathione as an exogenous sulfur source is independent of gamma-glutamyl transpeptidase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for an alternative glutathione degradation pathway. *FEMS Microbiology Letters* 219(2), 187-194.
- Kuras, L., Rouillon, A., Lee, T., Barbey, R., Tyers, M. & Thomas, D. (2002). Dual regulation of the *met4* transcription factor by ubiquitin-dependent degradation and inhibition of promoter recruitment. *Molecular Cell* 10(1), 69-80.
- Kuras, L. & Thomas, D. (1995). Identification of the yeast methionine biosynthetic genes that require the centromere binding factor 1 for their transcriptional activation. *FEBS Letters* 367(1), 15-18.

- Lachance, M. (2007). Current status of *Kluyveromyces* systematics. *FEMS Yeast Research* 7(5), 642-5.
- Lafaye, A., Junot, C., Pereira, Y., Lagniel, G., Tabet, J. C., Ezan, E. & Labarre, J. (2005). Combined proteome and metabolite-profiling analyses reveal surprising insights into yeast sulfur metabolism. *Journal of Biological Chemistry* 280(26), 24723-24730.
- Lalor, D. J., Schnyder, T., Saridakis, V., Pilloff, D. E., Dong, A., Tang, H., Leyh, T. S. & Pai, E. F. (2003). Structural and functional analysis of a truncated form of *Saccharomyces cerevisiae* ATP sulfurylase: C-terminal domain essential for oligomer formation but not for activity. *Protein Engineering* 16(12), 1071-1079.
- Lambrechts, C., Escudero, J. & Galzy, P. (1995). Purification and properties of three esterases from *Brevibacterium* sp. R312. *Journal of applied bacteriology* 78(2), 180-188.
- Lambrechts, C. & Galzy, P. (1995). Esterase activities of *Brevibacterium* sp. R312 and *Brevibacterium linens* 62. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 59(8), 1464-1471.
- 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(2), 89-99.
- Landaud, S., Helinck, S. & Bonnarme, P. (2008). Formation of volatile sulfur compounds and metabolism of methionine and other sulfur compounds in fermented food. *Applied Microbiology and Biotechnology* 77(6), 1191-205.
- Le Moan, N., Clement, G., Le Maout, S., Tacnet, F. & Toledano, M. B. (2006). The *Saccharomyces cerevisiae* proteome of oxidized protein thiols: contrasted functions for the thioredoxin and glutathione pathways. *The Journal of Biological Chemistry* 281(15), 10420-10430.
- Lechenne, B., Reichard, U., Zaugg, C., Fratti, M., Kunert, J., Boulat, O. & Monod, M. (2007). Sulphite efflux pumps in *Aspergillus fumigatus* and dermatophytes. *Microbiology-Sgm* 153, 905-913.
- Lee, T. A., Jorgensen, P., Bogner, A. L., Peyraud, C., Thomas, D. & Tyers, M. (2010). Dissection of combinatorial control by the Met4 transcriptional complex. *Molecular Biology of the Cell* 21(3), 456-469.
- Lenoir, J., Lamberet, G., Schmidt, J. & Tourneur, C. (1985). La maîtrise du bioreacteur fromage. *Biofutur* (12), 23-50.
- Leroy, C., Cormier, L. & Kuras, L. (2006). Independent recruitment of mediator and SAGA by the activator Met4. *Molecular and Cellular Biology* 26(8), 3149-63.
- Leustek, T., Murillo, M. & Cervantes, M. (1994). Cloning of a cDNA encoding ATP sulfurylase from *Arabidopsis thaliana* by functional expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Physiology* 105(3), 897-902.
- Leves, F. P., Tierney, M. L. & Howitt, S. M. (2008). Polar residues in a conserved motif spanning helices 1 and 2 are functionally important in the SulP transporter family. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 40(11), 2596-2605.
- Linderholm, A. L., Findleton, C. L., Kumar, G., Hong, Y. & Bisson, L. F. (2008). Identification of genes affecting hydrogen sulfide formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology* 74(5), 1418-27.
- Lodha, P. H., Shadnia, H., Woodhouse, C. M., Wright, J. S. & Aitken, S. M. (2009). Investigation of residues Lys112, Glu136, His138, Gly247, Tyr248, and Asp249 in the active site of yeast cystathionine beta-synthase. *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie Et Biologie Cellulaire* 87(3), 531-540.

- 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(3), 1854-1857.
- Logan, H. M., Cathala, N., Grignon, C. & Davidian, J. C. (1996). Cloning of a cDNA encoded by a member of the *Arabidopsis thaliana* ATP sulfurylase multigene family. Expression studies in yeast and in relation to plant sulfur nutrition. *The Journal of Biological Chemistry* 271(21), 12227-12233.
- Lopez del Castillo Lozano, M., Tâche, R., Bonnarme, P. & Landaud, S. (2007). Evaluation of a quantitative screening method for hydrogen sulfide production by cheese-ripening microorganisms: the first step towards l-cysteine catabolism. *Journal of Microbiological Methods* 69(1), 70-7.
- Lopez del Castillo-Lozano, M. (2007). *Production d'arômes soufrés par les flores d'affinage: Catabolisme de la L-cystéine*. Diss. AgroParisTech.
- Mansour, S., Bailly, J., Landaud, S., Monnet, C., Sarthou, A. S., Cocaign-Bousquet, M., Leroy, S., Irlinger, F. & Bonnarme, P. (2009). Investigation of associations of *Yarrowia lipolytica*, *Staphylococcus xylosum*, and *Lactococcus lactis* in culture as a first step in microbial interaction analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 75(20), 6422-6430.
- Mansour, S., Beckerich, J. M. & Bonnarme, P. (2008). Lactate and amino acid catabolism in the cheese-ripening yeast *Yarrowia lipolytica*. *Applied and Environmental Microbiology* 74(21), 6505-6512.
- Marobbio, C. M. T., Agrimi, G., Lasorsa, F. M. & Palmieri, F. (2003). Identification and functional reconstitution of yeast mitochondrial carrier for S-adenosylmethionine. *The EMBO Journal* 22(22), 5975-5982.
- Martin, B., BUCHIN, S. & HURTAUD, C. (2003). Conditions de production du lait et qualités sensorielles des fromages. *Productions Animales*.
- Marzluf, G. A. (1974). Uptake and efflux of sulfate in *Neurospora crassa*. *Biochimica Et Biophysica Acta* 339(3), 374-381.
- Marzluf, G. A. (1997). Molecular genetics of sulfur assimilation in filamentous fungi and yeast. *Annual Review of Microbiology* 51, 73-96.
- Masselot, M. & De Robichon-Szulmajster, H. (1975). Methionine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. I. Genetical analysis of auxotrophic mutants. *Molecular & General Genetics: MGG* 139(2), 121-132.
- Masselot, M. & Surdin-Kerjan, Y. (1977). Methionine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. II. Gene-enzyme relationships in the sulfate assimilation pathway. *Molecular & General Genetics: MGG* 154(1), 23-30.
- Mautino, M. R., Barra, J. L. & Rosa, A. L. (1996). *eth-1*, the *Neurospora crassa* locus encoding S-adenosylmethionine synthetase: molecular cloning, sequence analysis and in vivo overexpression. *Genetics* 142(3), 789-800.
- McAuliffe, O., Ross, R. P. & Hill, C. (2001). Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiology Reviews* 25(3), 285-308.
- McCready, R. G. L. & Din, G. A. (1974). Active sulfate transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters* 38(3), 361-363.
- Mehdi, K., Thierie, J. & Penninckx, M. J. (2001). gamma-Glutamyl transpeptidase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and its role in the vacuolar transport and metabolism of

- glutathione. *The Biochemical Journal* 359(Pt 3), 631-637.
- Menant, A., Baudouin-Cornu, P., Peyraud, C., Tyers, M. & Thomas, D. (2006). Determinants of the ubiquitin-mediated degradation of the Met4 transcription factor. *The Journal of Biological Chemistry* 281(17), 11744-54.
- Mendoza-Cozatl, D., Loza-Tavera, H., Hernandez-Navarro, A. & Moreno-Sanchez, R. (2005). Sulfur assimilation and glutathione metabolism under cadmium stress in yeast, protists and plants. *Fems Microbiology Reviews* 29(4), 653-671.
- Miyake, T., Kanayama, M., Sammoto, H. & Ono, B. (2002). A novel cis-acting cysteine-responsive regulatory element of the gene for the high-affinity glutathione transporter of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Genetics and Genomics: MGG* 266(6), 1004-1011.
- Monds, R. D. & O'Toole, G. A. (2009). The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review. *Trends in Microbiology* 17(2), 73-87.
- Morales, P., Fernández-García, E. & Nuñez, M. (2003). Caseinolysis in cheese by Enterobacteriaceae strains of dairy origin. *Letters in Applied Microbiology* 37(5), 410-414.
- Moreau, A., Fillion, M., Truong-meyer, X. M., Pingaud, H. & Strehaiano, P. (1998). Study of lactic acid and amino acid catabolism of *Brevibacterium linens*. *Microbiologie, aliments, nutrition* 16(4), 251-258.
- Morzycka, E. & Paszewski, A. (1979). Two pathways of cysteine biosynthesis in *Saccharomycopsis lipolytica*. *FEBS Letters* 101(1), 97-100.
- 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. *International Journal of Food Microbiology* 133(1-2), 31-37.
- 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 and Environmental Microbiology* 73(23), 7732-7739.
- 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(11), 6489-500.
- Mounier, J., Monnet, C., Vallaes, T., Arditi, R., Sarthou, A., Hélias, A. & Irlinger, F. (2008). Microbial interactions within a cheese microbial community. *Applied and Environmental Microbiology* 74(1), 172-81.
- Mulet, J. M., Alemany, B., Ros, R., Calvete, J. J. & Serrano, R. (2004). Expression of a plant serine O-acetyltransferase in *Saccharomyces cerevisiae* confers osmotic tolerance and creates an alternative pathway for cysteine biosynthesis. *Yeast (Chichester, England)* 21(4), 303-12.
- Murphy, M. J., Siegel, L. M., Tove, S. R. & Kamin, H. (1974). Siroheme: A New Prosthetic Group Participating in Six-Electron Reduction Reactions Catalyzed by Both Sulfite and Nitrite Reductases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 71(3), 612-616.
- 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(1-2), 51-60.
- Natarajan, K., Meyer, M. R., Jackson, B. M., Slade, D., Roberts, C., Hinnebusch, A. G. & Marton, M. J. (2001). Transcriptional profiling shows that Gcn4p is a master regulator of gene expression during amino acid starvation in yeast. *Molecular and Cellular Biology*

21(13), 4347-4368.

- Nickerson, K. W., Atkin, A. L. & Hornby, J. M. (2006). Quorum sensing in dimorphic fungi: farnesol and beyond. *Applied and Environmental Microbiology* 72(6), 3805-3813.
- 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(3), 637-646.
- Nouaille, S., Even, S., Charlier, C., Le Loir, Y., Cocaïgn-Bousquet, M. & Loubière, P. (2009). Transcriptomic response of *Lactococcus lactis* in mixed culture with *Staphylococcus aureus*. *Applied and Environmental Microbiology* 75(13), 4473-4482.
- 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(4), 239-246.
- Ono, B. I., Hazu, T., Yoshida, S., Kawato, T., Shinoda, S., Brzvwczy, J. & Paszewski, A. (1999). Cysteine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: a new outlook on pathway and regulation. *Yeast (Chichester, England)* 15(13), 1365-75.
- Palková, Z. & Váchová, L. (2003). Ammonia signaling in yeast colony formation. In: *A Survey of Cell Biology*. pp. 229-272. Academic Press. (Volume 225). ISBN 0074-7696.
- Park, H. & Bakalinsky, A. T. (2000). SSU1 mediates sulphite efflux in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 16(10), 881-888.
- Patton, E. E., Peyraud, C., Rouillon, A., Surdin-Kerjan, Y., Tyers, M. & Thomas, D. (2000). SCF(Met30)-mediated control of the transcriptional activator Met4 is required for the G(1)-S transition. *The EMBO Journal* 19(7), 1613-1624.
- Peng, Z. & Verma, D. P. (1995). A rice HAL2-like gene encodes a Ca(2+)-sensitive 3'(2'),5'-diphosphonucleoside 3'(2')-phosphohydrolase and complements yeast met22 and *Escherichia coli* cysQ mutations. *The Journal of Biological Chemistry* 270(49), 29105-29110.
- Penninckx, M. J. (2002). An overview on glutathione in *Saccharomyces* versus non-conventional yeasts. *FEMS Yeast Research* 2(3), 295-305.
- Pereira, Y., Lagniel, G., Godat, E., Baudouin-Cornu, P., Junot, C. & Labarre, J. (2008). Chromate causes sulfur starvation in yeast. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology* 106(2), 400-412.
- Perlstein, E. O., De Bivort, B. L., Kunes, S. & Schreiber, S. L. (2007). Evolutionarily conserved optimization of amino acid biosynthesis. *Journal of Molecular Evolution* 65(2), 186-196.
- Perpète, P., Duthoit, O., De Maeyer, S., Imray, L., Lawton, A. I., Stavropoulos, K. E., Gitonga, V. W., Hewlins, M. J. E. & Dickinson, J. R. (2006). Methionine catabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research* 6(1), 48-56.
- Phartiyal, P., Kim, W., Cahoon, R. E., Jez, J. M. & Krishnan, H. B. (2006). Soybean ATP sulfurylase, a homodimeric enzyme involved in sulfur assimilation, is abundantly expressed in roots and induced by cold treatment. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 450(1), 20-29.
- Piśnyk, S., Natorff, R., Sieńko, M. & Paszewski, A. (2007). Sulfate transport in *Aspergillus nidulans*: a novel gene encoding alternative sulfate transporter. *Fungal Genetics and Biology: FG & B* 44(8), 715-25.
- Pirkov, I., Norbeck, J., Gustafsson, L. & Albers, E. (2008). A complete inventory of all enzymes in the eukaryotic methionine salvage pathway. *The FEBS Journal* 275(16), 4111-

- Pócsi, I., Prade, R. A. & Penninckx, M. J. (2004). Glutathione, altruistic metabolite in fungi. *Advances in Microbial Physiology* 49, 1-76.
- Price, G. D., Woodger, F. J., Badger, M. R., Howitt, S. M. & Tucker, L. (2004). Identification of a SulP-type bicarbonate transporter in marine cyanobacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(52), 18228-18233.
- Raina, S., De Vizio, D., Odell, M., Clements, M., Vanhulle, S. & Keshavarz, T. (2009). Microbial quorum sensing: a tool or a target for antimicrobial therapy? *Biotechnology and Applied Biochemistry* 54(2), 65-84.
- Ramet, J. P. (1997). Technologie comparée des différents types de caillés. In: *Le fromage. Technique & Documentation*, Lavoisier., pp. 333-364. Paris: A. Eck & J. C. Gillis.
- Raux, E., McVeigh, T., Peters, S. E., Leustek, T. & Warren, M. J. (1999). The role of *Saccharomyces cerevisiae* Met1p and Met8p in sirohaem and cobalamin biosynthesis. *The Biochemical Journal* 338 (Pt 3), 701-8.
- Raymond, R. K., Kastanos, E. K. & Appling, D. R. (1999). *Saccharomyces cerevisiae* expresses two genes encoding isozymes of methylenetetrahydrofolate reductase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 372(2), 300-308.
- Regenberg, B., Düring-Olsen, L., Kielland-Brandt, M. C. & Holmberg, S. (1999). Substrate specificity and gene expression of the amino-acid permeases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics* 36(6), 317-328.
- Robichon-Szulmajster, H., Surdin, Y. & Mortimer, R. K. (1966). Genetic and biochemical studies of genes controlling the synthesis of threonine and methionine in *Saccharomyces*. *Genetics* 53(3), 609-619.
- Romano, P., Ricciardi, A., Salzano, G. & Suzzi, G. (2001). Yeasts from Water Buffalo Mozzarella, a traditional cheese of the Mediterranean area. *International Journal of Food Microbiology* 69(1-2), 45-51.
- Roostita, R. & Fleet, G. H. (1996a). The occurrence and growth of yeasts in Camembert and blue-veined cheeses. *International Journal of Food Microbiology* 28(3), 393-404.
- Roostita, R. & Fleet, G. H. (1996b). Growth of yeasts in milk and associated changes to milk composition. *International Journal of Food Microbiology* 31(1-3), 205-219.
- Rouillon, A., Surdin-Kerjan, Y. & Thomas, D. (1999). Transport of sulfonium compounds. Characterization of the s-adenosylmethionine and s-methylmethionine permeases from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry* 274(40), 28096-105.
- Schaffrath, R. & Breunig, K. D. (2000). Genetics and molecular physiology of the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Fungal Genetics and Biology: FG & B* 30(3), 173-190.
- Scheibel, T., Bell, S. & Walke, S. (1997). *S. cerevisiae* and sulfur: a unique way to deal with the environment. *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 11(11), 917-921.
- Schubert, H. L., Raux, E., Brindley, A. A., Leech, H. K., Wilson, K. S., Hill, C. P. & Warren, M. J. (2002). The structure of *Saccharomyces cerevisiae* Met8p, a bifunctional dehydrogenase and ferrochelatase. *The EMBO Journal* 21(9), 2068-2075.
- Sekowska, A., Dénervaud, V., Ashida, H., Michoud, K., Haas, D., Yokota, A. & Danchin, A. (2004). Bacterial variations on the methionine salvage pathway. *BMC Microbiology* 4, 9.
- Sieńko, M. & Paszewski, A. (1999). The metG gene of *Aspergillus nidulans* encoding cystathionine beta-lyase: cloning and analysis. *Current Genetics* 35(6), 638-46.
- Sieńko, M., Topczewski, J. & Paszewski, A. (1998). Structure and regulation of cysD, the

- homocysteine synthase gene of *Aspergillus nidulans*. *Current Genetics* 33(2), 136-44.
- Siewewerts, 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(16), 4997-5007.
- Smith, F. W., Hawkesford, M. J., Prosser, I. M. & Clarkson, D. T. (1995). Isolation of a cDNA from *Saccharomyces cerevisiae* that encodes a high affinity sulphate transporter at the plasma membrane. *Molecular & General Genetics: MGG* 247(6), 709-715.
- Snoek, I. S. I. & Steensma, H. Y. (2006). Why does *Kluyveromyces lactis* not grow under anaerobic conditions? Comparison of essential anaerobic genes of *Saccharomyces cerevisiae* with the *Kluyveromyces lactis* genome. *FEMS Yeast Research* 6(3), 393-403.
- Soullignac, L. (1995). *Propriétés des levures fromagères : Influence des sources de carbones utilisées sur leur aptitudes a désacidifier les caillés et à former des composés d'arôme*. Diss. Paris: Institut National Agronomique Paris-Grignon.
- Sourabié, A. M., Spinnler, H., Bonnarne, P., Saint-Eve, A. & Landaud, S. (2008). Identification of a powerful aroma compound in munster and camembert cheeses: ethyl 3-mercaptopropionate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(12), 4674-4680.
- Spinnler, H. E., Berger, C., Lapadatescu, C. & Bonnarne, P. (2001). Production of sulfur compounds by several yeasts of technological interest for cheese ripening. *International dairy journal* 11, 245-252.
- Spinnler, H. E. & Corrieu, G. (1989). Automatic Method to Quantify Starter Activity Based on pH Measurement. *Journal of Dairy Research* 56(05), 755-764.
- Sprague, G. F. & Winans, S. C. (2006). Eukaryotes learn how to count: quorum sensing by yeast. *Genes & Development* 20(9), 1045-9.
- Sturino, J. M. & Klaenhammer, T. R. (2004). Bacteriophage defense systems and strategies for lactic acid bacteria. *Advances in Applied Microbiology* 56, 331-378.
- Suleau, A., Gourdon, P., Reitz-Ausseau, J. & Casaregola, S. (2006). Transcriptomic analysis of extensive changes in metabolic regulation in *Kluyveromyces lactis* strains. *Eukaryotic Cell* 5(8), 1360-1370.
- Suliman, H. S., Sawyer, G. M., Appling, D. R. & Robertus, J. D. (2005). Purification and properties of cobalamin-independent methionine synthase from *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 441(1), 56-63.
- 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(1-2), 69-77.
- Tai, S. L., Boer, V. M., Daran-Lapujade, P., Walsh, M. C., de Winde, J. H., Daran, J. M. & Pronk, J. T. (2005). Two-dimensional transcriptome analysis in chemostat cultures. Combinatorial effects of oxygen availability and macronutrient limitation in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry* 280(1), 437-47.
- Tan, S., Greetham, D., Raeth, S., Grant, C. M., Dawes, I. W. & Perrone, G. G. (2010). The thioredoxin-thioredoxin reductase system can function in vivo as an alternative system to reduce oxidized glutathione in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry* 285(9), 6118-6126.
- Tehlivets, O., Hasslacher, M. & Kohlwein, S. D. (2004). S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase in yeast: key enzyme of methylation metabolism and coordinated regulation with phospholipid synthesis. *FEBS Letters* 577(3), 501-6.

- Tejada-Jiménez, M., Llamas, A., Sanz-Luque, E., Galván, A. & Fernández, E. (2007). A high-affinity molybdate transporter in eukaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(50), 20126-20130.
- Thomas, D., Barbey, R., Henry, D. & Surdin-Kerjan, Y. (1992). Physiological analysis of mutants of *Saccharomyces cerevisiae* impaired in sulphate assimilation. *Journal of General Microbiology* 138(10), 2021-2028.
- Thomas, D., Barbey, R. & Surdin-Kerjan, Y. (1990). Gene-enzyme relationship in the sulfate assimilation pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. Study of the 3'-phosphoadenylylsulfate reductase structural gene. *The Journal of Biological Chemistry* 265(26), 15518-15524.
- Thomas, D., Becker, A. & Surdin-Kerjan, Y. (2000). Reverse methionine biosynthesis from S-adenosylmethionine in eukaryotic cells. *The Journal of Biological Chemistry* 275(52), 40718-24.
- Thomas, D., Cherest, H. & Surdin-Kerjan, Y. (1991). Identification of the structural gene for glucose-6-phosphate dehydrogenase in yeast. Inactivation leads to a nutritional requirement for organic sulfur. *The EMBO Journal* 10(3), 547-553.
- Thomas, D., Rothstein, R., Rosenberg, N. & Surdin-Kerjan, Y. (1988). SAM2 encodes the second methionine S-adenosyl transferase in *Saccharomyces cerevisiae*: physiology and regulation of both enzymes. *Molecular and Cellular Biology* 8(12), 5132-5139.
- Thomas, D. & Surdin-Kerjan, Y. (1991). The synthesis of the two S-adenosyl-methionine synthetases is differently regulated in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular & General Genetics: MGG* 226(1-2), 224-32.
- Thomas, D. & Surdin-Kerjan, Y. (1997). Metabolism of sulfur amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR* 61(4), 503-32.
- Thorsen, M., Lagniel, G., Kristiansson, E., Junot, C., Nerman, O., Labarre, J. & Tamás, M. J. (2007). Quantitative transcriptome, proteome, and sulfur metabolite profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* response to arsenite. *Physiological Genomics* 30(1), 35-43.
- Toelstede, S. & Hofmann, T. (2009). Kokumi-active glutamyl peptides in cheeses and their biogenesis by *Penicillium roquefortii*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57(9), 3738-3748.
- Toledano, M. B., Kumar, C., Le Moan, N., Spector, D. & Tacnet, F. (2007). The system biology of thiol redox system in *Escherichia coli* and yeast: differential functions in oxidative stress, iron metabolism and DNA synthesis. *FEBS Letters* 581(19), 3598-3607.
- Ubiyvovk, V. M., Blazhenko, O. V., Gigot, D., Penninckx, M. J. & Sibirny, A. A. (2006). Role of gamma-glutamyltranspeptidase in detoxification of xenobiotics in the yeasts *Hansenula polymorpha* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Biology International* 30(8), 665-671.
- Uemura, T., Kashiwagi, K. & Igarashi, K. (2007). Polyamine uptake by DUR3 and SAM3 in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry* 282(10), 7733-7741.
- Ullmann, P., Gondet, L., Potier, S. & Bach, T. J. (1996). Cloning of *Arabidopsis thaliana* glutathione synthetase (GSH2) by functional complementation of a yeast gsh2 mutant. *European Journal of Biochemistry / FEBS* 236(2), 662-669.
- Ullrich, T. C., Blaesse, M. & Huber, R. (2001). Crystal structure of ATP sulfurylase from *Saccharomyces cerevisiae*, a key enzyme in sulfate activation. *The EMBO Journal* 20(3), 316-329.
- Uria-Nickelsen, M. R., Leadbetter, E. R. & Godchaux, W. (1993). Sulfonate-sulfur assimilation by yeasts resembles that of bacteria. *FEMS Microbiology Letters* 114(1), 73-

- Váchová, L. & Palková, Z. (2005). Physiological regulation of yeast cell death in multicellular colonies is triggered by ammonia. *The Journal of Cell Biology* 169(5), 711-7.
- Vido, K., Spector, D., Lagniel, G., Lopez, S., Toledano, M. B. & Labarre, J. (2001). A proteome analysis of the cadmium response in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry* 276(11), 8469-8474.
- Viljoen, B. C. (2001). The interaction between yeasts and bacteria in dairy environments. *International Journal of Food Microbiology* 69(1-2), 37-44.
- Viljoen, B. C. & Greyling, T. (1995). Yeasts associated with Cheddar and Gouda making. *International Journal of Food Microbiology* 28(1), 79-88.
- Vinci, C. R. & Clarke, S. G. (2007). Recognition of age-damaged (R,S)-adenosyl-L-methionine by two methyltransferases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry* 282(12), 8604-12.
- Waters, C. M. & Bassler, B. L. (2005). Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 21, 319-346.
- Weinbauer, M. G. (2004). Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS Microbiology Reviews* 28(2), 127-181.
- Weinbauer, M. G. & Rassoulzadegan, F. (2004). Are viruses driving microbial diversification and diversity? *Environmental Microbiology* 6(1), 1-11.
- Wemmie, J. A., Szczypka, M. S., Thiele, D. J. & Moye-Rowley, W. S. (1994). Cadmium tolerance mediated by the yeast AP-1 protein requires the presence of an ATP-binding cassette transporter-encoding gene, YCF1. *The Journal of Biological Chemistry* 269(51), 32592-32597.
- Wheeler, G. L., Quinn, K. A., Perrone, G., Dawes, I. W. & Grant, C. M. (2002). Glutathione regulates the expression of gamma-glutamylcysteine synthetase via the Met4 transcription factor. *Molecular Microbiology* 46(2), 545-56.
- Wheeler, G. L., Trotter, E. W., Dawes, I. W. & Grant, C. M. (2003). Coupling of the transcriptional regulation of glutathione biosynthesis to the availability of glutathione and methionine via the Met4 and Yap1 transcription factors. *The Journal of Biological Chemistry* 278(50), 49920-49928.
- 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(23), 9064-9072.
- Zhang, M. Y., Bourbonloux, A., Cagnac, O., Srikanth, C. V., Rentsch, D., Bachhawat, A. K. & Delrot, S. (2004). A novel family of transporters mediating the transport of glutathione derivatives in plants. *Plant Physiology* 134(1), 482-491.
- Zourari, A., Accolas, J. & Desmazeaud, M. (1992). Metabolism and biochemical characteristics of yogurt bacteria. A review. *Le Lait* 72(1), 34.

ABSTRACT

Sulphur metabolism, which has a central role in the cell, is also important during the manufacturing of smear ripened cheeses. The cheese ecosystem degrades sulphur amino acids, producing volatile sulphur compounds (VSCs) indispensable for the flavour of these products.

We studied sulphur metabolism in two cheese-ripening microorganisms, the hemiascomycetous yeasts *Kluyveromyces lactis* and *Yarrowia lipolytica*. The *in silico* analysis of the phylum of hemiascomycetes gave us for the first time an evolutionary vision of this metabolism. We found fundamental differences at the level of cysteine synthesis, but also at the level of the enzymes involved in the production of VSCs. This analysis constitutes a solid basis for the study of sulphur metabolism.

Thus, we combined several exploratory approaches (transcriptome, metabolome, VSCs measurement) to have a global vision of this metabolism in *K. lactis* and *Y. lipolytica*. Major differences are observed in particular at the level of cysteine and taurine biosynthesis pathways. VSCs production seems to be connected to the surexpression of species-specific transaminases combined with the accumulation of intracellular methionine.

Cheese ripening being dependent on a whole ecosystem, we also studied the interaction between two cheese-ripening microorganisms, *K. lactis* and *Brevibacterium aurantiacum*, by a transcriptomic approach comparing the genes expression of a co-culture to that of the pure cultures. We observed profound metabolic modifications especially with respect to carbon and biotin metabolisms.

Keywords: *Kluyveromyces lactis*, *Yarrowia lipolytica*, Sulphur Metabolism, Transcriptome, Metabolome, Volatile Sulphur Compounds (VSCs), Yeast-Bacteria Interaction, *Brevibacterium aurantiacum*, Cheese, Microbial Ecology, Microbiology.

RESUME

Le métabolisme du soufre, qui occupe une place centrale au sein de la cellule, est aussi important lors de la fabrication des fromages à pâte molle à croûte lavée. L'écosystème fromager assimile les acides aminés soufrés et peut ainsi produire des composés soufrés volatils (CSVs) indispensables à la flaveur de ces produits.

Nous avons étudié le métabolisme du soufre chez deux micro-organismes d'affinage, les levures hémiascomycètes *Kluyveromyces lactis* et *Yarrowia lipolytica*. L'analyse *in silico* du phylum des hémiascomycètes nous a donné pour la première fois une vision évolutive de ce métabolisme. Nous avons relevé des différences fondamentales au niveau de la synthèse de la cystéine mais aussi au niveau des enzymes impliquées dans la production de CSVs. Cette analyse constitue une base solide pour l'étude du métabolisme du soufre.

Nous avons combiné plusieurs approches exploratoires (transcriptome, métabolome, dosage des CSVs) afin d'avoir une vision globale de ce métabolisme chez *K. lactis* et *Y. lipolytica*. Les différences observées se situent notamment au niveau des voies de synthèse de la cystéine et de la taurine. La production de CSVs semble liée à la surexpression de transaminases spécifiques à chaque espèce combinée à l'accumulation de méthionine intracellulaire.

L'affinage du fromage dépendant de tout un écosystème, nous avons également étudié l'interaction entre deux micro-organismes d'affinage, *K. lactis* et *Brevibacterium aurantiacum* via une approche transcriptomique, en comparant l'expression d'une co-culture à celle des cultures pures. Nous avons observé de profondes modifications métaboliques touchant notamment le métabolisme du carbone et celui de la biotine.

Mots clefs : *Kluyveromyces lactis*, *Yarrowia lipolytica*, Métabolisme du Soufre, Transcriptome, Métabolome, Composés Soufrés Volatils (CSVs), Interaction levure-bactérie, *Brevibacterium aurantiacum*, Fromage, Ecologie Microbienne, Microbiologie.