HAL
open science

Etude de l'écosystème fromager par une approche biochimique et moléculaire

Orianne Cholet

To cite this version:

Orianne Cholet. Etude de l'écosystème fromager par une approche biochimique et moléculaire. Life Sciences [q-bio]. INAPG (AgroParisTech), 2006. English. NNT : 2006INAP0032 . pastel-00003111

HAL Id: pastel-00003111

https://pastel.hal.science/pastel-00003111

Submitted on 20 Nov 2007

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

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

INSTITUT NATIONAL AGRONOMIQUE PARIS-GRIGNON

Ecole Doctorale ABIES

UMR de Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires INRA / INA P-G

THESE

présentée et soutenue publiquement

le 13 décembre 2006 par

Orianne CHOLET

pour obtenir le grade de

Docteur de l'Institut National Agronomique Paris-Grignon

Discipline : ***Sciences des Aliments***

Etude de l'écosystème fromager par une approche biochimique et moléculaire

Membres du jury :

M. H. E. Spinnler	Professeur à l'INA P-G, Grignon	Président
Mme A. Lonvaud	Professeur à l'Université Victor-Segalen, Bordeaux	Rapporteur
M. P. Loubière	Directeur de recherches INRA/INSA, Toulouse	Rapporteur
Mme J. Reitz-Ausseur	Responsable du département de microbiologie aromatique, SOREDAB	Examinateur
M. S. Casarégola	Directeur de recherches INRA, Grignon	Examinateur
M. P. Bonnarme	Directeur de recherches INRA, Grignon	Directeur de thèse

à Régine et Jacky,
mes parents

à Mado et Pépito,
pour ces 10 ans

Identifier le rôle et la contribution de chaque flore au sein de l'écosystème fromager a déjà fait l'objet de nombreux travaux, mais les modes d'investigation sont restés trop souvent descriptifs par manque d'outils moléculaires. L'objectif principal de cette étude était d'élucider les voies métaboliques impliquées dans la désacidification et la production de composés soufrés chez trois levures (*Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces marxianus* et *Yarrowia lipolytica*) et une bactérie de surface (*Brevibacterium linens*) par une approche transcriptomique. La conception et l'utilisation d'une puce à ADN dédiée à ces quatre micro-organismes ont permis de mettre en évidence une divergence des voies cataboliques de la L-méthionine entre les levures et la bactérie d'affinage. L'ensemble des résultats obtenus a montré que la transamination est l'étape essentielle du catabolisme de la L-méthionine chez les levures. Elle s'accompagne d'une accumulation transitoire de l'acide α-céto-γ-méthylthiobutyrique chez *Y. lipolytica*, et essentiellement de sa forme réduite, l'acide α-hydroxy-γ-méthylthiobutyrique, chez *K. marxianus* et *D. hansenii*. La dégradation de ces composés se traduit par une augmentation de la production de méthanethiol et des composés soufrés volatils qui en résultent. Une étude plus approfondie réalisée sur *Y. lipolytica* a montré que les gènes *ARO8* et *BAT2* jouent un rôle prépondérant dans l'étape de transamination de la L-méthionine chez cette levure. En revanche, chez la bactérie *B. linens*, l'enzyme clef du catabolisme de la L-méthionine est la L-méthionine γ-lyase. L'apport de L-méthionine dans le milieu de culture induit fortement l'expression du gène *mgl* et génère une large gamme de composés soufrés volatils. L'étude des voies de dégradation du lactose et du lactate chez les levures a également permis d'obtenir des informations sur la part fonctionnelle de chaque espèce au cours de l'affinage. Ainsi, il semblerait qu'en culture mixte, *K. marxianus* soit plus impliqué dans la consommation du lactose *via* l'induction des gènes *LAC12* et *LAC4*, *D. hansenii* dans le métabolisme du pyruvate puis le catabolisme du lactate en fin de culture, et *Y. lipolytica* dans la dégradation de la L-méthionine *via* l'induction des gènes *ARO8* et *BAT2*. De façon plus globale, l'ensemble de nos résultats permet de mettre en évidence la possibilité de complémentarités métaboliques entre les levures d'affinage.

L'ensemble de ce travail a naturellement imposé la mise en place d'une démarche pluridisciplinaire. Cette thèse m'a donc permis d'aborder des domaines aussi divers que l'écriture de lignes de code sous Unix, les joies des multiples alignements de séquences, le plaisir des « manips à la paillasse » avec parfois des extractions d'ARN sans ARN, des marquages non marqués, des pannes de scanner juste avant les lectures de lames, le côté psychédélique des grilles d'acquisition de données avec leur multitude de points rouges à inspecter manuellement, le charme inestimable des calculs sous Excel et de l'analyse statistique avec GeneANOVA et bien sûr le casse-tête des voies métaboliques. Mais cette thèse m'a également offert la possibilité de travailler avec des personnes différentes. Et si elle existe aujourd'hui, c'est aussi un peu grâce …

A Georges Corrieu, qui m'a accueillie au sein du Laboratoire Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires à Grignon ;

A Pascal Bonnarme, qui a encadré ce travail avec une grande disponibilité. Je souhaite également t'adresser un grand merci pour les « interprétations biologiques », pour la confiance que tu m'as témoignée et l'autonomie que tu m'as laissée tout au long de ce projet ;

A Marie-Noëlle Leclercq-Perlat, qui s'est toujours montrée prête à répondre à mes questions. Je te remercie de m'avoir également accordée ta confiance un jour de janvier 2002 et d'avoir su me faire partager ta passion pour la Recherche.

Je tiens à remercier Madame Aline Lonvaud et Monsieur Pascal Loubière pour avoir accepté d'être rapporteurs de ce mémoire, Madame Joëlle Reitz-Ausseur et Monsieur Henry-Eric Spinnler pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Mes remerciements s'adressent également à Serge Casaregola pour son appui scientifique et ses conseils avisés tout au long de ce projet, à Alain Hénaut pour ses astuces, sa patience et sa bonne humeur, à Audrey Suleau pour m'avoir fait bénéficier de son expérience en « microarray », à Anne-Sophie Sarthou et Roselyne Tâche pour leur aide technique, à Sandra Helinck pour les fameux « livres de chevet » et à tous les membres du LGMPA, présents et partis.

Toute mon amitié va à Stéphanie, Valérie, Anne-Sophie, Benjamin et Haythem. Merci pour vos éclats de rire et vos « remontages » de moral.

SOMMAIRE

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. LE FROMAGE : *un écosystème microbien complexe* 11

1.1. L'aliment fromage en bref 11

1.2. Les fromages à pâte molle 12

1.3. La flore d'intérêt technologique 13

1.3.1. Les bactéries lactiques 13

1.3.1.1. Ferments lactiques et flore NSLAB (*Non Starter Lactic Acid Bacteria*) 13

1.3.1.2. Biodiversité dans les fromages à pâte molle 14

1.3.1.3. Activités métaboliques et impacts technologiques 14

Conversion du lactose en acide lactique

Production de composés aromatiques

1.3.2. Les levures 19

1.3.2.1. Biodiversité dans les fromages à pâte molle 19

1.3.2.2. Activités métaboliques et impacts technologiques 20

Fermentation du lactose

Utilisation des lactates

Activités protéolytiques

Activités lipolytiques

Production de composés aromatiques

1.3.3. Les moisissures 23

1.3.4. La flore bactérienne de surface 24

1.3.4.1. Biodiversité dans les fromages à pâte molle 24

Les bactéries corynéformes

Les staphylocoques

La flore à Gram-négatif

1.3.4.2. Activités métaboliques et impacts technologiques 27

Activités protéolytiques, lipolytiques et estérasiques

Production de composés aromatiques

Contribution à l'aspect et à la coloration de la croûte

1.4. Les phénomènes d'interaction entre flores 30

1.4.1. Les interactions positives 30

1.4.1.1. Cas des bactéries lactiques 30

1.4.1.2. Cas des levures 30

envers la flore bactérienne…

envers les moisissures et autres levures…

1.4.1.3. Cas des bactéries de surface 32

1.4.2. Les interactions négatives 32
1.4.2.1. Cas des bactéries lactiques 32
envers les moisissures…
envers les autres bactéries…
1.4.2.2. Cas des levures 33
envers les bactéries…
envers les moisissures et autres levures…
1.4.2.3. Cas des bactéries de surface 34
envers les autres bactéries…
envers les levures et moisissures…

2. APPROCHE DYNAMIQUE & FONCTIONNELLE D'UN ECOSYSTEME : *les techniques moléculaires* 36
2.1. Inventaire dynamique des espèces microbiennes 36
2.1.1. L'approche classique (culture-dépendante) 36
2.1.2. L'approche moléculaire directe (culture-indépendante) 36
2.1.2.1. Le clonage et le séquençage 37
2.1.2.2. L'*In Situ*-PCR (IS-PCR) et la PCR en temps réel 38
2.1.2.3. L'analyse de fragments 38
Sans restriction enzymatique
Avec restriction enzymatique
2.1.2.4. L'hybridation *in situ* ou sur support 41
Utilisation de sondes en « Dot Blot »
Hybridation in situ
Hybridation sur membrane ou sur lame de verre
2.2. Analyse fonctionnelle ciblée des populations 43
2.2.1. Mutagénèse dirigée 43
2.2.2. SAGE (*Serial Analysis of Gene Expression*) 44
2.2.3. DD (*Differential Display*) et ses variantes 45
2.3. Analyse fonctionnelle globale des génomes microbiens 46
2.3.1. Bio-informatique et génomique 46
2.3.2. Transcriptomique 47
2.3.2.1. Les filtres à haute densité 47
2.3.2.2. Les puces spottées 48
2.3.2.3. Les puces à oligonucléotides 48

PRESENTATION DE L'ETUDE

Contexte biologique ... 51
Contexte méthodologique ... 51

RESULTATS & DISCUSSION

1. Construction d'un *microarray* « multi-espèces » 53

2. Analyse transcriptomique du catabolisme de la L-méthionine chez la bactérie d'affinage *Brevibacterium linens* ATCC9175 [Article 1]..... 56

3. Analyse transcriptomique du catabolisme de la L-méthionine chez la levure d'affinage *Yarrowia lipolytica* [Article 2]..... 71

4. Suivi de l'expression des gènes chez trois levures d'affinage, cultivées séparément puis en association [Article 3]..... 105

5. Essais préliminaires sur fromages modèles 117

CONCLUSIONS & PERSPECTIVES 123

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 126

ANNEXES

Figures

01. ***Diagramme de fabrication des fromages à pâte molle* 153**

02. ***Principales voies de dégradation des acides aminés*..... 154**

03. ***Principales voies de dégradation de la L-méthionine chez les micro-organismes d'affinage* 155**

04. ***Diagramme des différentes approches moléculaires permettant d'évaluer la diversité génétique des communautés microbiennes* 156**

05. ***Principe de l'exploitation de bactéries marines par la technique de métagénomique* 157**

06. ***Vision schématique des techniques D/TGGE* 158**

07. ***Principe de la technique des puces à ADN* 159**

08. ***Principe général de l'analyse de l'expression transcriptionnelle sur une microarray* 160**

09. ***Cy3^{TM}-phosphoramidite et Cy5^{TM}-phosphoramidite* 161**

10. ***Principe général de la détection du signal* 161**

11. ***Représentation théorique des voies de biosynthèse et de dégradation du pyruvate* 162**

12. ***Représentation théorique des voies de biosynthèse et de dégradation de la L-méthionine* 162**

13. ***Plan expérimental suivi pour l'analyse transcriptionnelle des gènes de B. linens ATCC9175* 163**

14. ***pH et concentration en cellules viables cultivables (Cv) des tapis microbiens après 7, 21 et 35 jours d'affinage à 12 °C et à l'obscurité* 164**

15. ***Classement des fromages témoins (T) et des fromages ensemencés (F) en fonction de leur luminance L* après 7, 21 et 35 jours d'affinage à 12 °C et à l'obscurité*** **165**

16. ***Représentation graphique du positionnement des fromages témoins (T) et des fromages ensemencés (F) dans le plan a*b* après 7, 21 et 35 jours d'affinage à 12 °C et à l'obscurité*** **166**

17. ***Représentation graphique du positionnement des fromages témoins (T) et des fromages ensemencés (F) dans le plan C*h° après 7, 21 et 35 jours d'affinage à 12 °C et à l'obscurité*** **166**

18. ***Représentation du système L*a*b**** **167**

19. ***Représentation du système C*h°*** **167**

Tableaux

01. ***Composition moyenne (en g/100 g de fromage frais) en constituants majeurs de quelques familles de fromages*** **168**

02. ***Composition moyenne (en g/100 g de poids frais) en acides aminés d'un Camembert et d'un Gruyère*** **168**

03. ***Exemple de caractéristiques biochimiques d'intérêt technologique de quelques espèces de bactéries lactiques*** **169**

04. ***Principales aptitudes biochimiques de quelques levures d'affinage des fromages*** **170**

05. ***Exemples de bactériocines produites par les bactéries lactiques, pouvant être utilisées comme conservateurs dans les produits laitiers et fromagers*** **171**

06. ***Principaux types de puces à ADN*** **172**

07. ***Matrice des vecteurs propres (ACP) des données de transcriptomique obtenues pour les trois levures sur milieu synthétique fromager (à 36, 72 et 120 h) et sur fromage modèle (à 7 jours d'affinage)*** **173**

08. ***Gènes dont le niveau d'expression varie significativement (FDR ≤ 10 %) au cours du temps (36, 72 ou 120 h) sur milieu synthétique et/ou sur fromage modèle*** **174**

Fiches techniques

01. ***Bouillons utilisés*** **175**

02. ***Milieux gélosés utilisés*** **176**

03. ***Préparation des milieux de culture*** **177**

04. ***Fabrication d'un fromage modèle (fromage-agar)*** **178**

05. ***Suivi de la croissance microbienne*** **180**

06. ***Extraction des ARN totaux*** **181**

07. ***Electrophorèse sur gel d'agarose*** **183**

08. ***Marquage par synthèse d'ADNc*** **184**

09. ***Hybridation et lavages de la puce*** **186**

10. ***Dosage des métabolites par HPLC*** **187**

11. ***Analyse des composés soufrés volatils par GC-MS*** **189**

12. ***Mesure physique de la couleur de surface des fromages*** **191**

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1.

LE FROMAGE :
un écosystème microbien complexe

La fabrication du fromage est apparue il y a 8000 ans, peu après la domestication des animaux. A l'origine, l'intérêt majeur de la transformation du lait en fromage était de conserver les principaux constituants du lait. Aujourd'hui, il s'agit plutôt d'un aliment, possédant des qualités nutritionnelles indéniables. En 2003, la production mondiale de fromage était de $17{,}5.10^6$ tonnes, et plus de la moitié de cette production provenait de l'Europe (*Source* CNIEL).

1.1. L'aliment fromage en bref

Selon les traditions alimentaires de chaque société, le fromage constitue une denrée plus ou moins importante dans le régime alimentaire. Ainsi, la consommation moyenne par habitant pour l'année 2002 en France a été de 24,6 kg alors qu'elle se situait autour de 15,2 kg aux Etats-Unis et n'a pas dépassé 2,5 kg au Japon (*Source* CNIEL).

Sur le plan nutritionnel, le fromage est un aliment noble grâce à ses protéines de haute valeur biologique et à sa richesse minérale. Une enquête réalisée aux Etats-Unis en 1994 a permis de déterminer la contribution du fromage à l'apport alimentaire global en éléments nutritionnels. Cette enquête a révélé qu'environ 8 % des protéines totales ingérées, 23 % du calcium et 5 % de la riboflavine sont fournis par le fromage (Gerrior & Bente, 1997). Ces proportions sont encore plus importantes dans un pays tel que la France, où la consommation individuelle moyenne est de 60 % supérieure à la moyenne américaine. En effet, en France, le fromage apporte le tiers et le quart des apports journaliers conseillés pour un adulte en protéines et en calcium, respectivement (Dillon & Berthier, 1997).

Quatre ingrédients principaux interviennent dans la fabrication du fromage : le lait, la présure, les micro-organismes et le sel (Beresford *et al.*, 2001). La composition du fromage varie donc en fonction du type de lait utilisé et des paramètres technologiques appliqués. Ces variations se traduisent au niveau des proportions des grandes classes de composés (eau, lipides, glucides, protéines [**Tableau 1**]) qui constituent le fromage, mais également au niveau de la composition fine de chaque famille de composés (acides gras, acides aminés [**Tableau 2**], vitamines et minéraux). Plus de mille variétés de fromages sont actuellement recensées à travers le monde (Ross *et al.*, 2002 ; Fox & McSweeney, 2004). Selon leur procédé de fabrication, on les regroupe en 8 grandes familles : pâte fraîche, pâte molle, pâte persillée, pâte pressée, pâte dure, pâte filée, les fromages de lactosérum et, enfin, les fromages salés conservés en saumure (Ramet, 1997).

1.2. Les fromages à pâte molle

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

Malgré l'hétérogénéité des fromages à pâte molle, plusieurs points communs caractérisent la fabrication de ces fromages (**Figure 1**) :

→ la ***coagulation*** du lait conduit à la formation d'un gel. Pour la fabrication des fromages à pâte molle, cette coagulation est dite mixte puisqu'elle résulte à la fois d'une acidification par les bactéries lactiques et de l'action d'enzymes coagulantes telles que la présure. En effet, la température du milieu (28 à 35 °C) et le pH de l'emprésurage (6,3 et 6,4) permettent à la fois l'action des enzymes et le développement des bactéries lactiques. Il existe cependant des fabrications à caractère mixte mais à dominance lactique (ex. Epoisses) ou à dominance enzymatique (ex. Pont l'Evêque).

→ l'***égouttage*** du coagulum se fait de manière spontanée, à la différence des fromages à pâte pressée, mais il peut être accéléré par le tranchage du gel et le brassage. Le caillé qui en résulte est caractérisé par une teneur en matière sèche peu élevée (40 à 45 %), une faible minéralisation (0,3 à 0,5 % Ca), une cohésion de pâte modérée et un pH assez bas au démoulage (4,6 à 4,9). L'ensemble de ces facteurs fait que les fromages sont, de manière générale, de format moyen.

→ le ***salage*** des fromages permet dans un premier temps de compléter l'égouttage. Il contribue également à la formation de la croûte. Par la régulation de l'activité de l'eau (a_w), le sel module le développement des micro-organismes et favorise les activités enzymatiques au cours de l'affinage. De plus, il exalte ou masque certaines substances apparaissant au cours de la maturation du fromage. Deux procédés de salage peuvent être utilisés : le salage à sec (manuel ou mécanique) ou le salage par saumurage pour lequel les fromages sont immergés dans une solution habituellement saturée en chlorure de sodium. La plupart des fromages à pâte molle ont une teneur en sel de 1,5 à 2,0 %.

→ l'***affinage*** correspond à une succession de transformations biochimiques, réalisées à la fois par des enzymes déjà présentes dans le lait ou le caillé, et par des enzymes synthétisées par la microflore qui se développe au cours de la maturation (bactéries, levures et/ou moisissures) (Choisy *et al*, 1997a ; Mahaut *et al*., 2000). Le développement de cette microflore dite d'affinage est en partie induite par incorporation de « ferments du rouge », soit par pulvérisation des caillés, soit par trempage des caillés dans des bains de saumurage, soit par frottage de la surface avec des suspensions microbiennes. La température des caves d'affinage se situe autour de 12 à 14 °C avec une humidité relative de 85 à 95 % suivant la phase d'affinage. Le temps d'affinage varie en moyenne de 12 à 45 jours suivant les fromages et les qualités organoleptiques désirées.

1.3. La flore d'intérêt technologique

1.3.1. Les bactéries lactiques

Dans le processus de transformation du lait en fromage à coagulation lactique ou mixte, la microflore lactique est la première flore à intervenir. Les bactéries lactiques sont classées en différents genres, selon la composition de leur paroi cellulaire, leurs caractéristiques biochimiques et génétiques (Stiles & Holzapfel, 1997). Les genres *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* et *Streptococcus* sont majoritairement retrouvés dans les fromages. Du point de vue phylogénique, ces micro-organismes sont des bactéries à Gram-positif, catalase-négatives, asporulées, microaérophiles ou anaérobies facultatives, en forme de coques ou de bâtonnets. Leur ADN se caractérise par une teneur en G+C inférieure à 55 % (Stiles & Holzapfel, 1997). La fonction principale de ces bactéries est de dégrader le lactose, sucre majoritairement contenu dans le lait, pour produire de l'acide lactique (fermentation lactique). Du fait de cette propriété, l'utilisation des bactéries lactiques comme levain en fromagerie a été introduite par Weigmann en 1890 (Stiles & Holzapfel, 1997), principalement dans le but d'accomplir l'acidification du lait simultanément à sa coagulation.

1.3.1.1. Ferments lactiques et flore NSLAB (*Non Starter Lactic Acid Bacteria*)

Dès lors, on peut différencier les bactéries lactiques dites « sauvages » naturellement présentes au départ dans le lait de fabrication du fromage ou apportées par l'ambiance des ateliers de fabrication, des ferments lactiques qui correspondent aux bactéries lactiques ensemencées volontairement dans le lait. On distingue couramment deux types de ferments : les mésophiles et les thermophiles. Les levains mésophiles (ex. *Lactococcus*, *Leuconostoc*) sont en général utilisés pour des variétés de fromage dont la température des caillés pendant la phase d'acidification ne dépasse pas 40 °C, alors que les levains thermophiles (ex. *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii*) sont plutôt employés dans des variétés de fromage où la température dépasse 40 °C en début de fabrication (Fleet, 1999 ; Parente & Cogan, 2004). Le taux d'ensemencement des levains lactiques dans les laits de fromagerie varie entre 10^5 et 10^7 ufc/ml. Parallèlement à la synérèse du caillé, ces bactéries se développent rapidement pour atteindre une population de l'ordre de 10^9 ufc/g dans la majeure partie des fromages, un jour après ensemencement.

Les *Pediococcus* ainsi que certaines espèces de *Lactobacillus* mésophiles homo- ou hétérofermentaires sont généralement désignés sous le nom de *bactéries lactiques non-levain* (en anglais NSLAB). Ce terme décrit la flore lactique « fortuite », capable de croître dans des conditions sélectives lors de l'affinage des fromages, contrairement aux levains lactiques. Cette flore tolère en effet l'environnement hostile de l'affinage, caractérisé par un très faible taux d'humidité dans le produit (68 à 61 % de matière sèche), 4 à 6 % de sel, un pH variant de 4,9 à 5,3 et une déficience en nutriments (Fox *et al.*, 1998). *Lactobacillus casei* ssp. *casei*, *Lb. casei* ssp. *pseudoplantarum*, *Lb. paracasei* ssp. *paracasei*, *Lb. plantarum* et *Lb. curvatus* sont les espèces les plus couramment isolées et sont pour la plupart des hétérofermentaires facultatifs. Ces lactobacilles sont habituellement présents suite à une contamination après pasteurisation, mais constituent également une partie de la microflore du lait qui résiste à la pasteurisation (Martley & Crow, 1993).

1.3.1.2. Biodiversité dans les fromages à pâte molle

Les études décrivant la biodiversité de la flore lactique dans les fromages à pâte molle ont essentiellement porté sur le Camembert AOC de Normandie. La flore lactique du Camembert est quantitativement marquée par les lactocoques qui atteignent globalement 10^9 ufc/g au cours de l'affinage (Richard, 1984 ; Desmasures, 1995), avec une prédominance de l'espèce *Lactococcus lactis*. Au niveau intraspécifique, Corroler (1999) a mis en évidence une appartenance unique à la sous-espèce *L. lactis* ssp. *lactis* au plan phénotypique, alors que les mêmes souches se différenciaient en deux sous-espèces *L. lactis* ssp. *lactis* et *L. lactis* ssp. *cremoris* au plan génotypique. Les lactobacilles, dont la principale source serait le lait, représentent le second groupe de bactéries lactiques majoritairement retrouvées. Ils atteignent dans le Camembert une population de 3.10^7 ufc/g de fromage au cours de l'affinage, tant à l'intérieur qu'en surface (Choisy *et al*., 1997b ; Henri-Dubernet *et al*., 2004). *Lb. paracasei* et *Lb. plantarum* sont les deux espèces les plus fréquemment rencontrées (Henri-Dubernet *et al*., 2004). L'évolution de la flore lactique du Venaco, pâte molle à croûte lavée de Corse fabriquée à partir de lait cru de chèvre ou de brebis, a été suivie par Casalta (2003) à partir de fromages fabriqués sans ajout de ferments. Les bactéries dénombrées provenaient donc exclusivement de la flore naturelle du Venaco. Ainsi, Casalta (2003) a observé que les lactocoques, présents dans les laits à hauteur de 10^5 germes/ml, se développaient rapidement pour atteindre environ 10^9 ufc/g après 2 jours. Ce genre représente le principal agent acidifiant du Venaco. Les lactobacilles hétérofermentaires facultatifs, 10 fois plus nombreux dans les laits de chèvre (2.10^4) que dans ceux de brebis (10^3), constituent également l'une des flores quantitativement majoritaires du Venaco. Leur nombre augmente fortement au cours des premiers jours d'affinage pour atteindre environ 10^7 ufc/g après 15 jours. Les leuconostocs et entérocoques, initialement présents dans le lait de chèvre ou de brebis, sont aussi retrouvés au cours de l'affinage du Venaco (Casalta, 2003).

1.3.1.3. Activités métaboliques et impacts technologiques

Les bactéries lactiques utilisées comme ferment dans la fabrication fromagère ont pour principale fonction de produire de l'acide lactique et, dans certains cas, de produire des composés d'arôme ou des précurseurs. Les principales activités métaboliques impliquées sont la glycolyse, la lipolyse et la protéolyse. Les autres facteurs responsables de ces activités dans le fromage sont les levains secondaires, la flore NSLAB et des enzymes endogènes du lait et du coagulant. De plus, l'autolyse de certaines bactéries lactiques conduit à la libération de leurs enzymes intracellulaires dans la matrice fromagère (Gobbetti *et al*., 1999 ; Fitzsimons *et al*., 2001), ce qui peut ainsi accélérer l'affinage et contribuer au développement de la flaveur des fromages (Husson-Kao *et al*., 2000 ; Collins *et al*., 2003). Les paragraphes suivants porteront principalement sur les voies de dégradation du lactose en acide lactique et des acides aminés en composés d'arôme, seules données d'intérêt pour les travaux de cette thèse.

Conversion du lactose en acide lactique

Dans le lait, le sucre principal est le lactose. C'est un disaccharide, composé de glucose et de galactose, dont la dégradation conduit à la production d'énergie intracellulaire et d'acide lactique. L'évolution des concentrations en lactose et en acide lactique est variable suivant le type de pâte et la flore microbienne utilisée. Dans le cas des fromages de type Camembert, la quantité de lactose résiduel diminue rapidement en surface au cours des premiers jours d'affinage pour disparaître au bout du 10ème jour, alors qu'à cœur, sa dégradation est plus

lente et ne s'achève que vers le 30ème jour de maturation (Choisy *et al*., 1997a). La dégradation du lactose en acide lactique par la flore lactique comporte plusieurs étapes : le transport du lactose à travers la membrane cellulaire, le catabolisme du lactose selon une voie homofermentaire (donnant lieu à l'acide lactique comme unique produit de dégradation du glucose *via* la voie de Embden-Meyerhof-Parnas) ou hétérofermentaire (produisant des quantités équimolaires de lactate, éthanol et CO_2 à partir du glucose par la voie des pentoses phosphates) et, enfin, la formation et l'expulsion extracellulaire de l'acide lactique. Dans les fromages à pâte molle, la voie homofermentaire est prédominante en raison de l'utilisation de levains lactiques mésophiles homofermentaires (Gripon, 1993). Des mélanges de levains lactiques contenant une faible concentration de *Leuconostoc* hétérofermentaires sont parfois utilisés.

Pour le transport du lactose à travers la membrane cellulaire, les lactocoques utilisent principalement le système phosphotransférase (PTS) qui phosphoryle le diholoside en lactose-phosphate (de Vos & Vaughan, 1994 ; Cocaign-Bousquet *et al*., 1996). Celui-ci est ensuite clivé par une phospho-β-galactosidase en glucose et galactose-6-phosphate. Le glucose est catabolisé en pyruvate *via* la voie métabolique d'Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) (ou voie glycolytique). Chez *St. thermophilus* et *Lb. bulgaricus*, le transport du lactose implique une lactose perméase (LacS) localisée dans la membrane cytoplasmique (Atlan, 1996 ; Zirnstein & Hutkins, 2000 ; Geertsma *et al*., 2003). Le gène *lacS* de *St. thermophilus* a été cloné et exprimé chez *Escherichia coli* par Poolman *et al*. (1989). Cette perméase fonctionne comme un système de symport avec une entrée simultanée d'ions H^+. En cas de forte accumulation intracellulaire de galactose, la perméase agit en antiport avec expulsion du galactose parallèlement à l'entrée du lactose (Atlan, 1996 ; Curry & Crow, 2003 ; Pearce & Flint, 2003). Quel que soit son mode de transport, le lactose entre donc sous forme de disaccharide non phosphorylé chez *St. thermophilus* et *Lb. bulgaricus*. Il est ensuite hydrolysé par une β-galactosidase, codée par le gène *lacZ* (Atlan, 1996), pour former deux monosaccharides : le glucose et le galactose (Marshall & Tamine, 1997). L'activité de la β-galactosidase est inhibée par le galactose (Amoroso *et al*., 1989). Les souches qui ne peuvent pas métaboliser le galactose l'expulse hors de la cellule (Zourari *et al*., 1992 ; Robinson, 2003). Le glucose est directement métabolisé *via* la voie EMP.

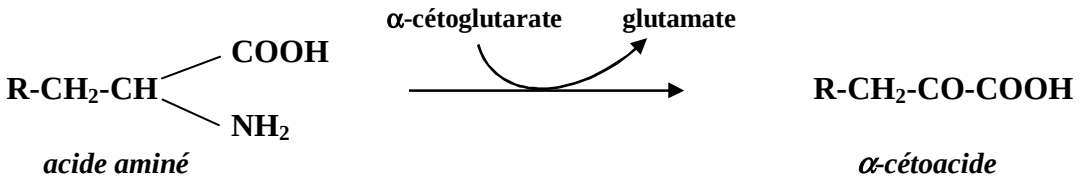
Chez les lactocoques, le pyruvate peut ensuite être dégradé par quatre enzymes différentes. La première est une lactate déshydrogénase (LDH) qui convertit le pyruvate en lactate. Cette réaction se produit majoritairement en excès de lactose ou de glucose dans le milieu, et entraîne un pH relativement bas, une concentration élevée de fructose diphosphate et de NADH stimulant l'activité LDH. La deuxième est une pyruvate-formate lyase qui, à partir du pyruvate, mène à la production de formate et d'acétyl-CoA à pH > 6. Cette enzyme est inhibée par l'oxygène et les trioses phosphates, lesquels sont présents en grande quantité pendant la fermentation homolactique (Cocaign-Bousquet *et al*., 1996 ; Arnau *et al*., 1997). La troisième est une pyruvate déshydrogénase (PDH) qui catalyse la décarboxylation oxydative du pyruvate en donnant de l'acétyl-CoA et du CO_2. Elle est active en condition aérobie et à pH acide, mais elle est inhibée par le NADH. Enfin, la quatrième enzyme est l'α-acétolactate synthase qui condense 2 pyruvates en α-acétolactate et CO_2. Elle est active à des concentrations élevées de pyruvate et à pH acide. Chez *St. thermophilus* et *Lb. bulgaricus*, la réduction de l'acide pyruvique en acide lactique est catalysée par la LDH. Elle peut se présenter sous deux formes : L-LDH et D-LDH, conduisant respectivement aux isomères L(+) et D(-) de l'acide lactique (Fleming *et al*., 1985). A titre d'exemple, *St. thermophilus* produit l'acide L(+) lactique (Crow & Curry, 2003), alors que *Lb. bulgaricus* produit l'acide D(-) lactique (Robinson *et al*., 2002).

De manière générale, la conversion du lactose en lactate entraîne une chute de pH qui va avoir un impact sur la fabrication et l'affinage du fromage. En effet, l'acide produit accélère la coagulation des caséines pendant la fabrication du fromage et favorise la synérèse, c'est-à-dire l'expulsion du lactosérum du caillé. Il servira également de substrat à des flores secondaires telles que les bactéries lactiques « non-levain » ou les moisissures. Par ailleurs, le pH acide et la faible activité de l'eau réduisent la croissance de certains micro-organismes indésirables tels que les *Clostridium*, *Listeria* ou *Staphylococcus* (Holzapfel *et al.*, 1995) (**§ 1.4.2.1**). Enfin, les caractéristiques physico-chimiques créées par l'acidification préparent les conditions de développement des micro-organismes responsables de l'affinage (essentiellement levures et moisissures) et régulent l'activité des enzymes qui interviendront ultérieurement dans la modification des constituants du caillé (Adda *et al.*, 1982) (**§ 1.3.2.2**). La participation des bactéries lactiques à la qualité du produit fini a été décrite par de nombreux auteurs, notamment *via* la mise en évidence de certaines propriétés biochimiques pouvant agir pendant l'affinage (**Tableau 3**).

Production de composés aromatiques

A titre d'exemple, il est désormais établi que la maturation d'un fromage et ses qualités gustatives finales découlent, en grande partie, du potentiel enzymatique des ferments utilisés. Ces dernières années, de nombreux travaux ont démontré le rôle majeur du catabolisme des acides aminés dans l'aromatisation des fromages, notamment celui des acides aminés aromatiques, des acides aminés à chaîne carbonée ramifiée et de la L-méthionine. Chez les bactéries lactiques, deux voies sont principalement impliquées dans la conversion de ces acides aminés en composés d'arôme : la première est initiée par une réaction de transamination et la seconde par une réaction d'élimination (**Figure 2**).

Les aminotransférases (transaminases) sont les enzymes responsables de la réaction de transamination des acides aminés. Elles catalysent le transfert d'un groupement NH_2 d'un acide aminé vers un cétoacide et utilisent le phosphate de pyridoxal (PLP) comme cofacteur. L'acide aminé est donc transformé en α-cétoacide, alors que l'α-cétoacide accepteur (le plus fréquemment l'α-cétoglutarate) est converti en l'acide aminé correspondant (glutamate) (Roudot-Algaron & Yvon, 1998 ; Gummalla & Broadbent, 2001 ; Yvon & Rijnen, 2001 ; Helinck *et al.*, 2004) :



Bien que l'α-cétoglutarate soit le cétoacide préféré des aminotransférases chez *L. lactis* (Yvon *et al.*, 1997 ; Engels *et al.*, 2000 ; Yvon *et al.*, 2000), d'autres cétoacides tels que le pyruvate ou l'oxaloacétate peuvent être utilisés. Dans ce cas, les activités aminotransférases observées sont beaucoup plus faibles qu'avec l'α-cétoglutarate. Par contre, chez certains lactobacilles, le pyruvate est décrit comme un accepteur aussi efficace que l'α-cétoglutarate (Amárita *et al.*, 2001). Les aminotransférases sont généralement spécifiques d'un groupe d'acides aminés donné (acides aminés aromatiques, acides aminés ramifiés ou acide aspartique), mais leurs spécificités se recouvrent. Etant donné la réversibilité de la réaction, ces enzymes peuvent catalyser aussi bien la première étape du catabolisme des acides aminés que la dernière étape de biosynthèse des acides aminés. Une aminotransférase aromatique (AraT) a été purifiée et caractérisée chez *L. lactis* ssp. *cremoris* NCDO763 (Yvon *et al.*,

1997) et chez *L. lactis* ssp. *lactis* S3 (Gao & Steele, 1998). Ces deux enzymes sont actives sur les acides aminés aromatiques, la leucine et la L-méthionine en utilisant l'α-cétoglutarate comme accepteur du groupement aminé, mais les préférences de substrat varient légèrement. Ainsi, l'AraT de la souche NCDO763 est plus active sur la phénylalanine, alors que l'AraT de la souche S3 est plus active sur le tryptophane. Bien que l'activité AraT de la souche NCDO763 soit optimale à une température de 30 à 45 °C et à un pH compris entre 6,0 et 8,0, elle reste non négligeable dans des conditions proches de l'affinage des fromages (10 °C ; pH 5,5 ; 4 % NaCl). A titre d'exemple, elle a été détectée dans des fromages expérimentaux de type Cheddar et retrouvée dans des cellules de lactocoques incubées durant trois semaines dans des fromages modèles (Engels, 1997 ; Gao *et al*., 1997 ; Yvon *et al*., 1997). Yvon *et al*. (1999) ont également observé que la transamination était essentielle pour la conversion d'acides aminés en composés d'arôme dans un fromage de type Saint-Paulin, fabriqué avec un levain de lactocoques. En effet, l'utilisation d'une souche de *L. lactis araT*-négative dans la fabrication du Saint-Paulin aboutit à des fromages contenant moins de composés issus de la dégradation des acides aminés aromatiques (Rijnen *et al*., 1999b). Cette étude a également montré que l'α-cétoglutarate était le premier facteur limitant l'activité aminotransférase de *L. lactis* dans le fromage, puisque son addition intensifie fortement la flaveur du fromage (Yvon *et al*., 1998). L'activité AraT conduit à la production d'isovalérate (arôme de fromage affiné), de 2-méthylbutanal (arôme fruité, malté), de benzaldéhyde (arôme d'amande amère) et de composés soufrés tels que le méthanethiol (arôme de chou) (Rijnen *et al*., 2003). Une activité aminotransférase chez des souches de *Lactobacillus* industrielles ou isolées du Cheddar a également été mesurée sur phénylalanine et tyrosine (Gummalla & Broadbent, 2001 ; Williams *et al*., 2001 ; Williams *et al*., 2002). Par ailleurs, une aminotransférase intervenant dans la dégradation des acides aminés branchés (BcaT) a été purifiée chez *L. lactis* ssp. *cremoris* NCDO763 (Yvon *et al*., 2000) et le gène séquencé (Yvon *et al*., 2000). Son rôle dans le catabolisme des acides aminés a été étudié *in vitro* en utilisant une souche modifiée dans laquelle le gène *bcaT* était inactivé (Yvon *et al*., 2000). Les auteurs ont ainsi pu mettre en évidence le rôle essentiel de cette enzyme dans le catabolisme des trois acides aminés à chaîne ramifiée, sa participation à la dégradation de la L-méthionine et à un niveau plus faible sur la phénylalanine. Ces résultats montrent également que les spécificités de substrat pour la leucine et la L-méthionine se recouvrent avec celles des AraT. L'activité BcaT est assez stable dans des conditions physico-chimiques proches de celles de l'affinage puisqu'elle a été détectée dans des fromages expérimentaux (Yvon *et al*., 2000). Toutefois, comme pour l'aminotransférase aromatique, la quantité d'α-cétoglutarate disponible dans les fromages est le premier facteur limitant pour son activité (Yvon *et al*., 1998). Elle conduit principalement à la production d'isobutyrate, d'isovalérate (arôme de fromage affiné), d'aldéhydes et d'alcools (arôme fruité ou malté ou de fromage affiné) (Rijnen *et al*., 2003). Ces mêmes auteurs ont également démontré qu'aucune enzyme autre que les aminotransférases AraT et BcaT n'intervenait de façon significative dans la dégradation des acides aminés et de la L-méthionine chez *L. lactis*. En effet, l'inactivation des deux gènes aminotransférases conjointement (*araT*/*bcaT*) empêche complètement la production de composés d'arôme dérivés des acides aminés aromatiques, ramifiés et de la L-méthionine (Rijnen *et al*., 1999b ; Rijnen *et al*., 2003). Une activité aminotransférase a également été mesurée chez plusieurs espèces de *Lactobacillus* isolées du Cheddar (Williams *et al*., 2001 ; Williams *et al*., 2002), notamment active sur la leucine, l'isoleucine et la valine chez *Lb. paracasei* (Hansen *et al*., 2001). Récemment, Kieronczyk *et al*. (2004) ont montré que, chez les lactobacilles, la nature des composés issus du catabolisme des acides aminés dépend du niveau des différentes activités aminotransférases présentes dans la souche. Ainsi, la présence d'une activité aspartate aminotransférase élevée dans des souches de lactobacilles entraîne une importante dégradation d'aspartate, conduisant à la production de diacétyle et

d'acétoïne (Kieronczyk *et al*., 2004). Chez *Lactobacillus mesenteroides* et *Lb. paracasei*, Tavaria et Malcata (2003) émettent également la possibilité d'une transformation de la L-méthionine en α-céto γ-méthylthiobutyrate (KMTBA) par une déshydrogénase. Le processus de transformation du KMTBA en méthanethiol est moins bien connu. Gao *et al*. (1998) ont néanmoins montré par chromatographie en phase gazeuse que le KMTBA était le précurseur direct du méthanethiol et que la réaction était probablement enzymatique puisque la quantité de méthanethiol était beaucoup plus élevée dans un mélange de réaction contenant des cellules entières de lactocoques que dans un mélange contrôle. L'action d'une enzyme de type lyase dans la conversion du KMTBA en méthanethiol a été suggérée par Bonnarme *et al*. (2000) et Spinnler *et al*. (2001). Cependant, chez les lactocoques, l'intervention d'une cystathionine lyase et de la L-méthionine γ-lyase dans cette conversion a été exclue lors des essais conduits par Alting *et al*. (1995) et Dias et Weimer (1998b), respectivement. Enfin, il semblerait que le KMTBA puisse être transitoirement transformé en α-hydroxy γ-méthylthiobutyrate (HMTBA), *via* une hydroxyacide déshydrogénase, avant sa transformation en méthanethiol. Parmi les micro-organismes fromagers, cette réduction n'a toutefois été mesurée que chez une souche de *L. lactis* et sept souches de *Lactobacillus* (Gao *et al*., 1998 ; Amárita *et al*., 2001). D'après ces mêmes auteurs, l'activité hydroxyacide déshydrogénase est favorisée par la présence de glucose dans le milieu.

La production d'arôme par les réactions d'éliminations se fait en une seule étape chez les bactéries lactiques. Ces réactions sont catalysées par des lyases, spécifiques d'un acide aminé (**Figure 2**). Chez certains lactobacilles mésophiles et thermophiles, la synthèse d'acétaldéhyde est liée au métabolisme de la thréonine *via* une thréonine aldolase (Frank & Hassan, 1998 ; Ott *et al*., 2000 ; Teixeira, 2000 ; Béal & Sodini, 2003). L'activité de cette enzyme dépend toutefois de la souche utilisée, du pH du milieu et de la disponibilité des cations bivalents (Crow & Curry, 2003). Deux autres enzymes, capables de produire du méthanethiol directement à partir de la L-méthionine, ont été isolées et caractérisées chez *L. lactis* ssp. *cremoris*. Il s'agit de la cystathionine γ-lyase (CGL) isolée à partir de la souche SK11 (Bruinenberg *et al*., 1997) et de la cystathionine β-lyase (CBL) isolée à partir de la souche B78 (Alting *et al*., 1995). Ces enzymes catalysent l'élimination α-β et α-γ de la cystathionine, en produisant de la cystéine ou de l'homocystéine en plus de l'α-cétobutyrate et de l'ammoniac. Elles sont également capables de catalyser l'élimination γ de la L-méthionine (Dobric *et al*., 2000) avec, toutefois, une activité moindre sur substrat L-méthionine (environ 100 fois moins) que sur substrat cystathionine (Alting *et al*., 1995 ; Bruinenberg *et al*., 1997). En fait, la fonction première de ces enzymes n'est pas liée au catabolisme des acides aminés mais à la biosynthèse de la L-méthionine. Une inhibition significative de ces activités lyases chez *L. lactis*, en présence de L-méthionine et/ou de cystéine dans le milieu, même à de faibles concentrations telles que celles présentes dans le fromage, a été démontrée par Weimer *et al*. (1997). À cette étude s'ajoute celle de Fernandez *et al*. (2000) qui ont observé que l'inactivation du gène codant la CBL (*metC*) inhibe 90 % de l'activité de la souche sur la cystathionine mais n'affecte pas son activité sur la L-méthionine. La CBL n'est donc pas essentielle pour la conversion de la L-méthionine en composés volatils chez *L. lactis* (Fernandez *et al*., 2000). De plus, selon ces mêmes auteurs, le gène *metC* forme un opéron avec le gène qui code la cystéine synthase (*cysK*), ce qui suggère une régulation combinée de l'expression du gène *metC* par la L-méthionine et la cystéine chez *L. lactis* (Fernandez *et al*., 2000). Une activité CBL a également été détectée chez des souches de *Lb. delbrueckii*. Elle est codée par le gène *patC* (Aubel *et al*., 2002).

Comme il est décrit dans les paragraphes précédents, le catabolisme des acides aminés dans la production d'arôme est essentiel chez les lactocoques, mais également chez la plupart

des bactéries lactiques. La comparaison de fromages expérimentaux (type Comté) fabriqués à partir de lait cru, lait pasteurisé (72 °C-30 s) ou microfiltré (épuration du lait écrémé à 35 °C, avec pasteurisation de la crème) a mis en évidence le rôle prépondérant de la microflore naturelle du lait cru sur la qualité finale des fromages. En effet, l'élimination de la microflore indigène du lait entraîne une diminution de l'intensité du goût, de la typicité, ainsi qu'une augmentation de l'amertume et du mauvais goût (Bouton & Grappin, 1995 ; Beuvier *et al.*, 1997). Selon les différentes flores en présence, la nature et la quantité des composés d'arôme varient ce qui conduit, en fin d'affinage, à la typicité de chaque fromage.

1.3.2. Les levures

Le caractère acido-tolérant des levures hémiascomycètes justifie leur présence dans les fromages au lait cru et dans les fromages au lait pasteurisé. Les espèces les plus fréquemment isolées et identifiées en fromagerie appartiennent aux genres *Candida*, *Debaryomyces*, *Geotrichum*, *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, *Torulaspora* et *Yarrowia* (Fröhlich-Wyder, 2003). Les principales sources de contamination en levures proviennent de la saumure, qui à elle seule peut fournir jusqu'à 10^3 ufc/g de levures (Viljoen *et al.*, 2003), et des locaux de fabrication et d'affinage (air, sols, murs, étagères, équipement et saumure) (Baroiller & Schmidt, 1990 ; Fleet, 1990 ; Viljoen *et al.*, 2003). L'évolution de la flore levure est donc différente d'un type de fromage à l'autre. Il existe également des variations pour un même type de fromage, d'un atelier à l'autre, voire d'un fromage à l'autre au sein d'un même atelier (Eliskases-Lechner & Ginzinger, 1995b). Dans les fromages à pâte molle, on estime que les concentrations en cellules viables sont de 100 à 1000 fois plus importante sur la croûte qu'au cœur de la pâte (Lenoir *et al.*, 1983 ; Leclercq-Perlat *et al.*, 1999). *A contrario*, dans les fromages de type bleu, la flore levure est plus importante à cœur (Besançon *et al.*, 1992).

1.3.2.1. Biodiversité dans les fromages à pâte molle

Les surfaces des fromages à pâte molle sont un habitat particulièrement favorable à la croissance des levures en raison du caractère acide des caillés (limitant ainsi le développement des flores bactériennes) et de l'abondance d'oxygène. Les levures peuvent ainsi atteindre des populations de l'ordre de 10^9 ufc/g de fromage (Roostita & Fleet, 1996b). Il s'agit le plus souvent de levures à métabolisme plutôt respiratoire, telles que *Kluyveromyces* sp., *Debaryomyces hansenii* et *Yarrowia lipolytica* (Fleet, 1999). Des études portant sur la diversité de la flore levure du Camembert ont montré que l'importance relative des diverses espèces était toutefois variable selon l'origine des camemberts. Ainsi, *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces lactis*, *Candida sphaerica*, *Saccharomyces cerevisiae* et *Zygosaccharomyces rouxii* prédominent dans le Camembert de Normandie (Baroiller & Schmidt, 1990), tandis que *D. hansenii*, *Y. lipolytica* et quelques espèces du genre *Candida* constituent l'essentiel de la flore levure de camemberts fabriqués en Afrique du Sud (Viljoen *et al.*, 2003). De même, une étude réalisée sur la diversité microbienne à la surface du Livarot a montré que les levures les plus fréquemment isolées au cours de l'affinage appartenaient aux espèces *D. hansenii*, *Geotrichum candidum* (à noter qu'avant de faire partie intégrante des levures, *Geotrichum* a longtemps été classé soit parmi les champignons levuriformes, soit rattaché aux moisissures), *K. lactis* et *Y. lipolytica* (Gente *et al.*, 2007 ; Larpin *et al.*, 2006). Dans la flore superficielle du Tilsit, la présence de trois espèces principales (*D. hansenii*, *G. candidum* et *Trichosporon beigelii*) a été révélée, *D. hansenii* étant parfois la seule espèce retrouvée à la surface de certaines fabrications (Eliskases-Lechner & Ginzinger, 1995b). Les travaux de Wyder et Puhan (1999) menés sur la composition de la flore levure trouvée à la

surface du Limburger et du Munster ont montré que *D. hansenii*, *G. candidum* et *Y. lipolytica* étaient les trois espèces dominantes sur ces deux fromages. Qualitativement, les espèces dominantes diffèrent d'un fromage à l'autre, excepté pour *D. hansenii* qui semble être une flore de fond dans les fromages à pâte molle. L'aptitude de *D. hansenii* à utiliser le lactose, les acides lactique et citrique, sa croissance importante à basse température, en milieu acide, en présence de sel et probablement son activité « killer » sont autant de raisons qui permettent à cette espèce de dominer dans les saumures et les fromages (Besançon *et al.*, 1992 ; Roostita & Fleet, 1996b ; Fleet, 1999). Ces caractéristiques sont probablement le résultat d'une sélection naturelle en faveur des souches les mieux adaptées à l'environnement fromager (Rohm *et al.*, 1992), d'autant plus que certains isolats retrouvés en grand nombre dans le lait ne le sont que sporadiquement dans les fromages (Baroiller & Schmidt, 1990). Aussi, le processus technologique semble influer l'implantation de la flore levure (Wyder & Puhan, 1999 ; Bockelmann *et al.*, 2005).

1.3.2.2. Activités métaboliques et impacts technologiques

Le rôle des levures au cours de l'affinage commence au cours de l'égouttage et se poursuit pendant la maturation. La désacidification progressive de la surface des fromages par les levures est une étape primordiale de l'affinage, à partir de laquelle toutes les actions majeures suivantes découlent. Elle est principalement due à l'assimilation du lactate, à la formation de métabolites alcalins et à la libération de facteurs de croissance. Elle permet notamment l'implantation et le développement de la flore bactérienne superficielle acido-sensible et halotolérante, comme les bactéries corynéformes et les staphylocoques (Eliskases-Lechner & Ginzinger, 1995a ; Corsetti *et al.*, 2001). La neutralisation de la pâte contribue aux modifications de la texture (Vassal *et al.*, 1986), à l'optimisation de l'activité enzymatique (Lenoir *et al.*, 1985) et à la répartition des minéraux au sein du fromage (Vassal *et al.*, 1986). Certaines levures possèdent également des enzymes intéressantes capables d'intervenir dans la protéolyse, la lipolyse ou encore dans le catabolisme des acides aminés ou des acides gras. Ces activités se traduisent notamment par la libération de composés aromatiques, et contribuent donc directement à l'élaboration des caractéristiques sensorielles des fromages.

Fermentation du lactose

Comme il a été décrit précédemment (**§ 1.3.1.3.**), le lactose est largement transformé en acide lactique par la flore lactique lors de la fabrication du caillé. Certaines levures appartenant aux genres *Kluyveromyces* et *Debaryomyces* peuvent toutefois dégrader le lactose résiduel au cours des premiers jours de maturation (Leclercq-Perlat *et al.*, 1999 ; Leclercq-Perlat *et al.*, 2000 ; Cosentino *et al.*, 2001), sous l'action d'une β-galactosidase. Cette enzyme a été identifiée chez *K. lactis*, *K. marxianus* et *D. hansenii* (Fleet, 1990 ; Roostita & Fleet, 1996a ; van den Tempel & Jakobsen, 2000 ; Zhou & Chen, 2001). A titre d'exemple, *K. lactis* est capable de croître sur lactose comme unique source de carbone, grâce à ses gènes *LAC4* et *LAC12* qui codent respectivement pour la β-galactosidase et la lactose perméase. La lactose perméase assure un transport actif du lactose et du galactose. Elle est la seule entrée possible pour le lactose à l'intérieur de la cellule, alors que le galactose peut également pénétrer par diffusion facilitée ou *via* le transporteur Kht3p (Wiedemuth & Breunig, 2005). Après action de la β-galactosidase, le glucose est directement engagé dans la glycolyse, tandis que le galactose est préalablement transformé en glucose-1-phosphate (*via* la voie de Leloir) avant d'intégrer la glycolyse (Caplice & Fitzgerald, 1999 ; Prescott *et al.*, 1999). A l'issue de la glycolyse, se forme le pyruvate qui est ensuite transformé en CO_2 et H_2O *via* le cycle de Krebs. Dans les fromages à pâte persillée, le CO_2 produit à la fois par certaines levures et les

Leuconostoc permet la création de petites ouvertures dans la pâte, ce qui favorise l'implantation du *Penicillium roqueforti* (Choisy *et al*., 1997b). Des mécanismes fermentaires mineurs peuvent également avoir lieu chez certaines levures fromagères en présence d'oxygène, notamment chez *K. lactis*, *K. marxianus* et *D. hansenii*, aboutissant à la formation de composés volatils comme l'éthanol ou l'acétaldéhyde à partir du pyruvate (Fleet & Mian, 1987 ; Pereira-Dias *et al*., 2000).

Utilisation des lactates

Les fromages à pâte molle sont les fromages où le métabolisme du lactate est le plus intense (Fox *et al*., 1990). La dégradation du lactate en surface des fromages est amorcée en début de maturation par *G. candidum* et les levures telles que *D. hansenii*, pour atteindre des concentrations quasi-nulles (< 0,02 %) en fin d'affinage (Gripon, 1993 ; Choisy *et al*., 1997a ; McSweeney & Sousa, 2000). Dans un fromage à pâte molle modèle, ensemencé avec *D. hansenii*, les meilleures conditions pour obtenir à la fois une désacidification du caillé et une bonne apparence du fromage sont une température de 12 °C et une humidité relative proche de 95 % (Bonaïti *et al*., 2004). Les mécanismes de dégradation du lactate demeurent cependant peu étudiés chez les levures d'affinage. Selon Sztajer *et al*. (1996), *G. candidum* possède une lactate oxydase FMN-dépendante lui permettant de dégrader le lactate en pyruvate et peroxyde d'hydrogène, en présence d'oxygène. Une autre enzyme a été identifiée par Hang et Woodman (1992) chez *G. candidum*. Il s'agit de la lactate déshydrogénase NAD-dépendante. De manière générale, le développement de *G. candidum* et des levures s'accompagne d'une consommation de l'acide lactique et d'une libération d'ammonium. Ces deux phénomènes contribuent à la remontée du pH, ce qui favorise l'implantation des micro-organismes acido-sensibles tels que ceux de la flore de surface (Lenoir, 1984 ; Choisy *et al*., 1997b). Leur croissance est également favorisée par l'abondance de nutriments, notamment les acides aminés et le glycérol, issus de la protéolyse et de la lipolyse respectivement (McSweeney & Sousa, 2000).

Activités protéolytiques

Le système protéolytique des levures a, quant à lui, fait l'objet de nombreux travaux. Une protéinase intracellulaire neutre de type sérine (Vicente-Soler & Gacto, 1991) et une enzyme intracellulaire ressemblant à la chymotrypsine (Litthauer *et al*., 1996) ont été mises en évidence chez *G. candidum*. L'activité de ces enzymes est liée à la croissance de *G. candidum* ; elle augmente au cours de la phase exponentielle de croissance pour être maximale en phase stationnaire (Hannan & Guéguen, 1985). Guéguen et Lenoir (1975) ont également mis en évidence une activité protéolytique extracellulaire chez *G. candidum*. Les souches isolées de fromages à pâte molle présentaient toutefois une activité protéolytique plus forte que celle de souches isolées de fromages à pâte pressée. Un système aminopeptidasique et un système carboxypeptidasique ont également été identifiés chez *G. candidum* (Auberger *et al*., 1997). Toutes ces informations ont été obtenues *in vitro* mais, récemment, Boutrou *et al*. (sous presse) ont déterminé la contribution *in situ* de *G. candidum* dans la protéolyse du Camembert. Il est capable d'intervenir dans la protéolyse primaire en hydrolysant les caséines α_{S1} et β. Cette hydrolyse est particulièrement intéressante en fromagerie car elle permet de générer de petits peptides qui, hydrolysés à leur tour, libèrent des acides aminés au cours d'une seconde protéolyse. Ces derniers conduisent à la production de nombreux composés volatils qui contribuent à la flaveur typique de certaines pâtes (Choisy *et al*., 1997b). Une étude récente a également mis en évidence la capacité de *Y. lipolytica* à hydrolyser la caséine α_{S1} *in vitro* et à induire l'hydrolyse des protéines dans le lait écrémé (Lucia *et al*., 2001). L'importante activité tyrosinase de certaines souches de *Y. lipolytica* serait responsable de la

production de pigments bruns à la surface des fromages (van den Tempel & Jakobsen, 2000 ; Carreira *et al*., 2001).

Activités lipolytiques

Certaines levures participent également à la dégradation des lipides au cours de l'affinage. A titre d'exemple, *G. candidum* est probablement responsable de la modification du profil des acides gras libres en faveur des acides insaturés dans les fromages de type Camembert, *via* la production de lipases (Choisy *et al*., 1997a). Dans le fromage de chèvre Armada, où *G. candidum* est l'espèce dominante pendant les premiers stades de l'affinage, Tornadijo *et al*. (1998) ont également observé une très forte lipolyse, comparable à celle observée dans les fromages à pâte persillée, avec principalement la libération d'acides gras insaturés à longue chaîne (C_{18}). Parmi les lipases étudiées, selon la souche de *G. candidum* et les conditions de culture employées, il existe toutefois des différences dans les séquences génétiques ainsi que dans la spécificité des substrats (Holmquist *et al*., 1997). Pour la souche *G. candidum* ATCC3416, quatre lipases ont été recensées, une lipase dite majeure (lipase I) et trois autres lipases dites mineures (lipase II, III et IV) (Sugihara *et al*., 1991). La lipase I possède une spécificité unique pour les acides gras insaturés, avec une préférence pour l'acide oléique, sur des positions particulières des doubles liaisons. Les trois autres ont une affinité pour la trioléine (Sugihara *et al*., 1994). *Y. lipolytica* est également capable de produire des lipases extracellulaires (Guéguen & Schmidt, 1992), ce qui pourrait expliquer que cette levure soit beaucoup plus lipolytique que *D. hansenii* ou *S. cerevisiae* (van den Tempel & Jakobsen, 2000). Trois gènes codant pour des triacylglycérol hydrolases (lipases extracellulaires) ont été identifiés chez *Y. lipolytica* : *LIP2* (Pignède *et al*., 2000), *LIP7* et *LIP8* (Fickers *et al*., 2005).

Production de composés aromatiques

Les levures contribuent à la flaveur des fromages affinés soit directement par la production d'une grande variété de composés volatils (Molimard & Spinnler, 1996), soit indirectement par la production d'enzymes protéolytiques et lipolytiques (Lenoir, 1984 ; Choisy *et al*., 1997b ; Leclercq-Perlat *et al*., 2004b). Par exemple, *K. lactis* et *K. marxianus* produisent de nombreux esters, dont l'acétate d'éthyle aux notes fruitées (Arfi *et al*., 2002 ; Leclercq-Perlat *et al*., 2004b). Cette production est en corrélation avec la croissance de cette levure et provient du métabolisme de l'éthanol et du lactose (Leclercq-Perlat *et al*., 2004a ; Leclercq-Perlat *et al*., 2004b). Les acides aminés sont également les précurseurs de nombreux composés aromatiques. Une désamination des acides aminés, acide glutamique ou aspartique, leucine ou phénylalanine, conduit à la formation d'aldéhydes. A l'aide d'une déshydrogénase, l'aldéhyde est transformé en alcool. Une phénylalanine déshydrogénase a par exemple été identifiée chez *G. candidum* (Hemme *et al*., 1982). La phénylalanine peut ainsi donner du phényléthanol aux senteurs florales (Molimard & Spinnler, 1996). De même, les levures sont capables de convertir la L-méthionine en divers composés soufrés caractéristiques des fromages à pâte molle.

Ainsi, chez *S. cerevisiae*, la L-méthionine peut être transportée par la perméase générale des acides aminés (GAP1) et par trois autres perméases spécifiques. Parmi ces systèmes spécifiques se trouvent une perméase à haute affinité MUP1 (K_M = 13 µM) et deux perméases à faible affinité MUP2 (K_M = 0,26 mM) et MUP3 (K_M = 1 mM) (Isnard *et al*., 1996). Seuls les gènes des systèmes MUP1 et MUP3 ont été identifiés (Isnard *et al*., 1996). Les levures utilisent ensuite différentes voies enzymatiques pour convertir la L-méthionine en composés soufrés (**Figure 3**). Les activités L-méthionine déméthiolase, KMTBA déméthiolase et L-méthionine aminotransférase ont été détectées chez *G. candidum*, *Kluyveromyces* sp.,

D. hansenii, *Y. lipolytica* et *S. cerevisiae* (Bonnarme *et al*., 2001 ; Arfi *et al*., 2002 ; Arfi *et al*., 2003 ; Kagkli *et al*., 2006b). L'activité L-méthionine aminotransférase est de loin l'activité la plus importante chez *G. candidum* et *Kluyveromyces* sp., avec une accumulation transitoire de KMTBA. Récemment, Kagkli *et al*. (2006a) ont montré que les gènes Kl*ARO8.1* et KL*ARO8.2* jouaient un rôle prépondérant dans l'étape de transamination de la L-méthionine chez *K. lactis*. Une aminotransférase active sur la L-méthionine, codée par le gène Yl*BAC1*, a également été identifiée chez *Y. lipolytica* (Cernat Bondar *et al*., 2005) par homologies de séquence avec l'aminotransférase ScBAT1 de *S. cerevisiae* (Eden *et al*., 1996 ; Kispal *et al*., 1996). Deux aminotransférases aromatiques (ScARO8 et ScARO9) actives sur la L-méthionine ont par ailleurs été décrites chez *S. cerevisiae* (Urrestarazu *et al*., 1998). Une KMTBA déméthiolase permet ensuite la conversion du KMTBA en α-cétobutyrate (α-KB) et méthanethiol, puis en ses produits d'oxydation (essentiellement le disulfure de diméthyle (DMDS) et le trisulfure de diméthyle (DMTS)) (Bonnarme *et al*., 2001 ; Arfi *et al*., 2002 ; Kagkli *et al*., 2006b). Chez *S. cerevisiae*, l'activité L-méthionine déméthiolase semble toutefois prédominer, indiquant une conversion directe de la L-méthionine en méthanethiol (Kagkli *et al*., 2006b). Le méthanethiol peut aussi être produit en une seule étape chez *G. candidum* (Demarigny *et al*., 2000).

Par ailleurs, pour que les acides gras puissent contribuer positivement à l'arôme, ils doivent se trouver dans des proportions bien définies au sein de la matrice fromagère. Une lipolyse poussée peut entraîner un défaut de rancidité (Molimard *et al*., 1997), de même qu'un fromage allégé en matière grasse peut développer un arôme défectueux (Milo & Reineccius, 1997). Les acides acétique, butyrique, 3-méthylbutyrique et caprique (C_{10}) sont les acides gras ayant l'impact odorant le plus important sur le Camembert (Kubickova & Grosch, 1997 ; Kubickova & Grosch, 1998). Différents systèmes enzymatiques ou groupes d'enzymes ont pour substrats ces acides gras. Ils peuvent alors être dégradés pour former d'autres molécules à vocation aromatique, comme des méthylcétones, des lactones, des esters ou des alcools (McSweeney & Sousa, 2000). La plupart des souches de *G. candidum* sont capables de produire ces composés volatils. En effet, à la surface des fromages à croûte fleurie, *G. candidum* contribue à la formation de méthylcétones (Molimard & Spinnler, 1996). Dans les fromages de type Camembert, les composés carbonylés sont les plus abondamment produits, notamment *via* un système enzymatique que possède *G. candidum* (mais aussi *P. camemberti*) et qui permet de dévier la voie de la β-oxydation des acides gras (Molimard & Spinnler, 1996). La nonan-2-one, dégageant une senteur fruitée et de moisi, et l'heptan-2-one, dégageant une note de « fromage bleu », sont les deux méthylcétones principalement retrouvées dans le Camembert (Molimard *et al*., 1997). Les levures forment donc une flore très importante dans les fromages, tant par leur participation directe au processus d'affinage (**Tableau 4**), que par les interactions qu'elles établissent avec la flore bactérienne et fongique (**§ 1.4.-**) (Jakobsen & Narvhus, 1996).

1.3.3. Les moisissures

La présence de moisissures internes ou superficielles caractérise divers types de fromages. Sur le plan technologique, les espèces les plus étudiées appartiennent au genre *Penicillium*. Elles contribuent, en métabolisant l'acide lactique, à la neutralisation de la pâte et produisent de nombreuses enzymes qui participent à la maturation du fromage. Elles présentent deux voies de reproduction : voie sexuée (par ascospores) et voie asexuée (par conidiospores). Cette dernière étant plus favorable à la dissémination, des suspensions de conidiospores sont souvent utilisées dans l'industrie fromagère. Elles sont soit directement

inoculées dans le lait servant à la fabrication du fromage (10^{10} spores pour 1000 L de lait), soit pulvérisées sur les caillés (Bockelmann *et al*., 1999).

Penicillium camemberti est le champignon des fromages à pâte molle et à croûte fleurie, type Camembert, Brie ou Carré de l'Est (Lenoir *et al*., 1983), ou de certains fromages de chèvre (Choisy *et al*., 1997b). A la surface du Camembert, il est visible après 6 à 7 jours d'affinage. Il recouvre ensuite toute la surface du fromage d'un feutrage blanc. Sa croissance est rapide. Ce champignon possède un système protéolytique complexe et une activité lipasique importante, ce qui lui confère un rôle important dans l'aromatisation des fromages. *P. camemberti* joue également un rôle majeur dans la maturation des fromages à croûte fleurie, notamment en consommant le lactate et en produisant de grandes quantités de CO_2 qui changent l'environnement gazeux des hâloirs. De plus, en se développant, le mycélium de *P. camemberti* forme une barrière qui empêche la prolifération de bactéries pathogènes et de moisissures indésirables (**§ 1.4.-**) (Bockelmann *et al*., 1999). Il possède donc certaines caractéristiques biochimiques qui en font un micro-organisme indispensable à la maturation des fromages à pâte molle et à croûte fleurie. A *contrario*, plusieurs espèces de *Penicillium*, comme *P. roqueforti*, *P. expansum*, *P. janthinellum* ou *P. viridicatum*, peuvent fortement déprécier l'aspect des fromages à pâte molle. Présents en trop grande quantité, ils peuvent provoquer l'apparition de tâches bleu-vert plus ou moins grandes à l'intérieur de la pâte ou en surface. Ces défauts d'aspect sont connus sous le nom d'accident du « bleu ».

D'autres moisissures peuvent également contaminer les fromages à pâte molle pendant l'affinage. Si les *Mucor* font partie de la flore fongique normale de certains fromages à pâte pressée (Tomme de Savoie ou Saint-Nectaire) (Marcellino & Benson, 1992 ; Michel *et al*., 2001), ils sont principalement incriminés dans l'accident du « poil de chat » des fromages à pâte molle. La surface du fromage est alors recouverte de touffes duveteuses plus ou moins blanches (les sporangiophores), terminées par de petites boules grises, brunes ou noires (les sporanges gorgés de spores). La présence de *Cladosporium herbarum* est également indésirable sur de nombreux fromages à pâte molle, pressée ou persillée. Elle se manifeste le plus souvent en fin d'affinage, par des tâches de couleur vert foncé à noir à la surface des fromages, dépréciant ainsi fortement leur aspect.

1.3.4. La flore bactérienne de surface

Une flore bactérienne technologique non lactique est également retrouvée à la surface de différents types de fromages, comme les pâtes molles (Camembert, Munster, Livarot), les pâtes persillées (Roquefort) ou les pâtes cuites (Comté, Gruyère), suite à un ensemencement naturel et/ou dirigé. Cette flore est généralement aérobie, mésophile et halotolérante mais acido-sensible. Les genres et les espèces impliqués sont nombreux et leur taxonomie a énormément évolué ces 10 dernières années grâce à l'évolution des techniques moléculaires, notamment le séquençage des ADNr 16S.

1.3.4.1. Biodiversité dans les fromages à pâte molle

On entend généralement par « bactéries d'affinage », les bactéries corynéformes et les staphylocoques. Au cours de l'affinage du Camembert, l'évolution de ces bactéries à Gram-positif est particulièrement caractéristique (Lenoir, 1984 ; Richard, 1984 ; Choisy *et al*., 1997ab). Leur nombre augmente fortement au cours des 20 premiers jours passant de 10^6 vers le cinquième jour à 10^9 ufc/g en fin de maturation, et constitue alors avec les lactocoques l'une des flores quantitativement majoritaires de la croûte. En revanche, leur comportement

au coeur du Camembert est très différent, avec une teneur constante voisine de 10^6 ufc/g à tous les stades de la maturation, dû au pH inférieur ou égal à 6 (bactéries acido-sensibles) et à la semi-anaérobiose (bactéries majoritairement aérobies). Une flore bactérienne à Gram-négatif est également capable de se développer à la surface des fromages à pâte molle au cours de l'affinage, dont certaines espèces peuvent présenter des propriétés technologiques intéressantes.

Les bactéries corynéformes

Le terme de bactérie corynéforme a regroupé pendant longtemps les bactéries dont la morphologie était décrite « en forme de massue » (étymologie grecque de corynébactérie) et capables d'effectuer un cycle de transformation de bâtonnet en coque. Sur le plan taxonomique, ce groupe a beaucoup évolué et les travaux de Stackebrandt *et al*. (1997) ont conduit à diviser le groupe des bactéries corynéformes en deux sous-ordres : *Micrococcineae* et *Corynebacterineae*. Parmi ceux-ci, les bactéries corynéformes les plus fréquemment retrouvées dans les fromages appartiennent aux genres *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Microbacterium* et *Micrococcus*.

Ainsi, plusieurs auteurs relatent la présence de souches d'*Arthrobacter*, particulièrement d'*Arthrobacter nicotianae* à la surface des fromages à morge (Eliskases-Lechner & Ginzinger, 1995a ; Valdés-Stauber *et al*., 1997 ; Corsetti *et al*., 2001 ; Feurer *et al*., 2004b) ou à croûte fleurie (Marcellino & Benson, 1992). Les espèces *Arthrobacter citreus* et *Arthrobacter globiformis* ont également été isolées de Tilsit (Eliskases-Lechner & Ginzinger, 1995a). Deux nouvelles espèces, isolées de la surface de fromages à croûte lavée, ont récemment été décrites. Il s'agit d' *Arthrobacter arilaitensis* et d' *Arthrobacter bergerei* (Feurer *et al*., 2004b ; Irlinger *et al*., 2004). La plupart des espèces du genre *Arthrobacter* sont définies comme des bactéries à Gram-positif, catalase-positives, non mobiles et obligatoirement aérobies. Toutefois, une étude plus récente a montré que deux espèces d'*Arthrobacter* pouvaient croître et utiliser un métabolisme énergétique anaérobie (Eschbach *et al*., 2003). En effet, lors de cette étude, les auteurs ont montré qu'en conditions anaérobies, *A. nicotianae* était capable de réduire le nitrate en ammoniac, alors qu'*A. globiformis* utilisait le nitrate comme accepteur d'électron terminal. Les espèces fromagères d'*Arthrobacter* montrent donc une importante versatilité nutritionnelle avec une large échelle de composés organiques.

Le genre *Brevibacterium*, dont l'espèce majoritairement rencontrée à la surface des fromages est *Brevibacterium linens*, peut constituer de 0,1 à 32 % de la flore totale selon le type de fromage analysé (Kollöffel *et al*., 1999). Sur les fromages à pâte molle, *B. linens* représente 30 % des bactéries de surface (Choisy *et al*., 1997b) alors qu'elle ne dépasse pas 10 % dans un fromage de type Gruyère (Kollöffel *et al*., 1999). A la surface du Gubbeen, malgré un ensemencement dirigé de *B. linens* en début d'affinage, Brennan *et al*. (2002) concluent que cette espèce ne s'implante pas de façon significative à la surface du fromage. Feurer *et al*. (2004b) font les mêmes conclusions sur une pâte molle à croûte lavée. En 2002, une grande hétérogénéité à l'intérieur de l'espèce *B. linens* a été mise en évidence grâce à l'utilisation de techniques moléculaires (Alves *et al*., 2002). Au vu des résultats de l'hybridation ADN/ADN, Gavrish *et al*. (2004) ont proposé de scinder l'espèce *B. linens* en quatre espèces différentes. Trois nouvelles espèces ont ainsi été décrites : *Brevibacterium aurantiacum*, *Brevibacterium antiquum* et *Brevibacterium permense*. La souche de référence, ATCC9175, dont la majorité des souches fromagères était très proche, est devenue la souche type de *B. aurantiacum*. Il se pourrait donc qu'un très grand nombre de souches isolées de fromages et identifiées comme *B. linens* soient reclassées dans l'espèce *B. aurantiacum*.

Quelques espèces du genre *Corynebacterium* font partie des constituants majeurs de la microflore de surface de certains fromages. *Corynebacterium ammoniagenes* et *Corynebacterium variabile* (anciennement *C. variabilis*) représentent 32 % des bactéries corynéformes isolées à partir de Brick (Valdés-Stauber *et al*., 1997). Dans le Gubbeen, 50 % des isolats sont représentés par une espèce récemment décrite, *Corynebacterium casei* (Brennan *et al*., 2002). La seconde espèce dominante dans ce fromage est *C. variabile*. D'après Gelsomino *et al.* (2005), *C. variabile* est un synonyme de *Corynebacterium mooreparkense* (Brennan *et al*., 2001a) qui représente 26 % des isolats.

Les espèces appartenant au genre *Microbacterium* sont retrouvées de façon sporadique et en petit nombre à la surface des fromages à croûte lavée, comme le Tilsit (Eliskases-Lechner & Ginzinger, 1995a) ou le Gubbeen (Brennan *et al*., 2002). Ainsi, 12 % des bactéries corynéformes identifiées sur le Gubbeen ont été assignées à l'espèce *Microbacterium gubbeenense*, nouvellement décrite par Brennan *et al.* (2001b ; 2002).

Enfin, le genre *Micrococcus*, phylogénétiquement très proche du genre *Arthrobacter*, possède des caractères morphologiques identiques aux staphylocoques. Ainsi, contrairement à ce que l'on a longtemps cru et écrit, les espèces du genre *Micrococcus* sont beaucoup plus rarement rencontrées que celles du genre *Staphylococcus* à la surface des fromages. Les isolats retrouvés représenteraient moins de 20 % des coques à Gram-positif (Michaux, 1983 ; Massa & Turtura, 1989).

Les staphylocoques

Le nom de « *Staphylococcus* » vient du grec *staphyle* qui signifie grappe de raisin et du mot latin *coccus* (dérivant lui-même du grec *kokkos*) qui signifie grain. Pendant longtemps, les staphylocoques ont été associés, d'un point de vue taxonomique, aux microcoques. A partir de 1997, la nouvelle classification hiérarchique de la classe des *Actinobacteria* par Stackebrandt *et al*. (1997) redéfinit la famille des *Micrococcaceae*, dont le genre *Staphylococcus* ne fait plus partie. Ce genre appartient désormais à la sous-branche des *Clostridium-Bacillus* qui comprend toutes les espèces à Gram-positif dont l'ADN présente un G+C % inférieur à 55. Certaines espèces, productrices de coagulase et/ou d'entérotoxines, sont potentiellement pathogènes (ex. *Staphylococcus aureus*). Par contre, les espèces à coagulase-négative ne sont pas pathogènes ou alors uniquement de façon opportuniste, et ce sont ces bactéries que l'on retrouve le plus fréquemment dans les écosystèmes fromagers.

Staphylococcus equorum, *Staphylococcus vitulinus* et *Staphylococcus xylosus* sont les espèces les plus fréquemment retrouvées sur les fromages à croûte lavée (Irlinger *et al*., 1997 ; Hoppe-Seyler *et al*., 2004). Bien que la répartition des espèces soit fonction du type de fromage considéré, il est toutefois admis que ces staphylocoques à coagulase-négative sont principalement rencontrés en début d'affinage et en très petit nombre en comparaison des bactéries corynéformes (Brennan *et al*., 2002). Ainsi, dans le Tilsit, l'ensemble des souches de staphylocoques isolées représente entre 5 et 15 % de la microflore présente (Bockelmann & Hoppe-Seyler, 2001) et seulement 2,5 % dans le Gubbeen (Brennan *et al*., 2002).

La flore à Gram-négatif

Dans les fromages, les espèces appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae* sont le plus souvent retrouvées. Cette flore est déjà présente dans les laits crus de vache entre 10^2 et 10^3 ufc/g et le stockage au froid ne fait qu'augmenter cette population (Tornadijo *et al*., 2001). Au cours de l'affinage du fromage, les entérobactéries peuvent atteindre un niveau de 10^6 à 10^7 ufc/g (Coiffier, 1992 ; Tornadijo *et al*., 2001). Cette population a la particularité de

se retrouver aussi bien à la surface des fromages qu'au cœur. Des études réalisées sur le Pont l'Evêque (Coiffier, 1992) ou le San Simon (Tornadijo *et al*., 2001) montrent que les espèces retrouvées ont des pourcentages de répartition différents entre la pâte et la croûte. L'inventaire des flores présentes dans ces deux types de fromages montre que les espèces dominantes à la surface sont *Citrobacter freundii*, *Hafnia alvei* et *Klebsiella oxytoca*. *Escherichia coli*, *H. alvei* et *K. oxytoca* ont été isolées du cœur (Coiffier, 1992 ; Tornadijo *et al*., 2001). Dans le Camembert, *E. coli* et *H. alvei* sont les espèces dominantes (Richard & Zadi, 1983 ; Nooitgedagt & Hartog, 1988 ; Ogier *et al*., 2002). Leur croissance semble suivre une évolution comparable dans les camemberts au lait cru et au lait pasteurisé. Leur nombre est maximal au démoulage, diminue jusqu'à un niveau minimal après environ une semaine d'affinage, puis augmente jusqu'à la fin de l'affinage (Richard, 1984).

1.3.4.2. Activités métaboliques et impacts technologiques

Les bactéries de surface jouent un rôle majeur dans l'affinage des fromages, par leurs activités protéolytiques, lipolytiques et estérasiques conduisant à la formation de nombreux composés d'arôme dans la matrice fromagère et à la coloration de la croûte (Mahaut *et al*., 2000).

Activités protéolytiques, lipolytiques et estérasiques

Le potentiel enzymatique élevé de *B. linens*, tant au plan de la protéolyse que de la lipolyse, lui confère une contribution déterminante dans l'acquisition des qualités organoleptiques des fromages (Frings *et al*., 1993 ; Holtz & Kunz, 1994). En effet, il est admis que *B. linens* participe activement à la protéolyse des fromages en libérant des acides aminés, précurseurs de nombreux composés d'arôme. Cette bactérie synthétise des enzymes protéolytiques diverses et actives durant sa croissance, notamment des protéinases extracellulaires capables d'hydrolyser l'α et la β-caséine en peptides de haut poids moléculaire (Rattray & Fox, 1999). *A. nicotianae* jouerait également un rôle important dans la protéolyse des fromages puisque la présence de deux protéinases extracellulaires (capables d'hydrolyser l'α et la β-caséine) ont été mise en évidence chez cette espèce (Smacchi *et al*., 1999).

Par ailleurs, *B. linens* est considérée comme une bactérie moyennement lipolytique. Lipases et estérases appartiennent au groupe des « esters hydrolases ». Selon les conditions d'action, les estérases permettent soit de libérer des acides gras à chaîne courte, soit de former à partir d'acides gras des esters ou des thioesters, certains de ces composés jouant un rôle dans les qualités organoleptiques des fromages (Boyaval & Desmazeaud, 1983).Une des propriétés technologiques importantes des *Micrococci* est leur forte activité estérasique (Ortiz de Apodaca *et al*., 1993). Par ailleurs, malgré leur capacité à hydrolyser la caséine, le rôle des microcoques dans la protéolyse durant l'affinage des fromages semble négligeable. Enfin, les staphylocoques d'origine fromagère, halotolérants et mésophiles, possèdent également des propriétés lipolytiques et protéolytiques qui participent à la formation de la morge (Curtin *et al*., 2002). Certaines souches ont des propriétés anti-microbiennes (Brennan *et al.*, 2002) ou agissent, au contraire, comme stimulateur de croissance (Bockelmann & Hoppe-Seyler, 2001).

Production de composés aromatiques

Les bactéries corynéformes les plus couramment isolées ont pour principale fonction la production de composés soufrés qui renforcent de façon incontestable les caractères

fromagers et affinés d'un fromage. Ainsi, *B. linens* est un micro-organisme important dans l'industrie fromagère puisqu'il est capable de produire des composés aromatiques comme le méthanethiol à partir de la L-méthionine, mais aussi du 2,5-diméthylpyrazine ou du trisulfure de diméthyle (Rattray & Fox, 1999). Un transporteur de la L-méthionine a été caractérisé chez *B. linens*. Il nécessite la présence d'ions Na^+ dans le milieu (Ferchichi *et al*., 1987). Le gène correspondant n'a pas encore été identifié. Chez *B. linens*, la synthèse du méthanethiol est catalysée par une seule enzyme : la L-méthionine γ-lyase. Cette voie enzymatique est une voie directe *via* une désamination et une déméthiolation simultanées de la L-méthionine, pour former du méthanethiol, de l'α-cétobutyrate et des ions ammonium (NH_4^+) (**Figure 3**). Cette enzyme utilise le pyridoxal 5'-phosphate comme cofacteur et dégrade *in vitro* la L-méthionine, mais aussi de nombreux autres substrats tels que l'éthionine, l'homocystéine, la cystéine, la *S*-méthylcystéine ou l'*O*-acétylsérine. Son activité est augmentée en présence de L-méthionine dans le milieu de culture (Ferchichi *et al*., 1985 ; Dias & Weimer, 1998a) ou de peptides contenant des résidus méthionyl (Weimer *et al*., 1997). La L-méthionine γ-lyase est encore active dans des conditions physico-chimiques proches de celles de l'affinage des fromages (Dias & Weimer, 1998b) ; par contre, elle est sensible à la protéolyse ce qui indique que son activité pourrait être perdue après lyse des cellules (Dias & Weimer, 1998a). Trois aminotransférases actives sur les acides aminés aromatiques ont été détectées chez *B. linens*. Deux d'entre elles ont été partiellement purifiées et classées comme aminotransférase aromatique et aspartate-aminotransférase, sur la base de leur préférence pour les acides aminés aromatiques et l'acide aspartique, respectivement (Lee & Desmazeaud, 1985). Chez *B. linens*, la présence d'une activité cystathionine β,γ-lyase qui permettrait également de jouer un rôle dans la dégradation de la L-méthionine en méthanethiol semble être une caractéristique souche-dépendante et, selon Dias et Weimer (1998a), ces activités sont vraisemblablement inhibées dans les conditions du fromage. Une activité L-méthionine déméthiolase a également été déterminée dans des extraits bruts de *Micrococcus luteus*, *S. equorum*, *Arthrobacter* sp. et *Corynebacterium glutamicum* (Bonnarme *et al*., 2000 ; Bonnarme *et al*., 2001). La plupart des souches de *C. casei* et *C. mooreparkense* sont capables de produire du méthanethiol à partir de la L-méthionine (Brennan *et al*., 2002). Curtin *et al*. (2002) ont aussi montré qu'une souche de *C. ammoniagenes* présentait des activités aminopeptidasique, estérasique et cystathionine lyase. *C. variabile* (NCDO2101) présente également une proline peptidase capable d'hydrolyser les peptides riches en proline en peptides de faible poids moléculaire, contribuant ainsi à l'affinage et à la flaveur des fromages (Gobbetti *et al*., 2001). Certains isolats de *M. gubbeenense* sont capables de produire du méthanethiol à partir de la L-méthionine et peuvent croître à des pH de l'ordre de 5,8 (Brennan *et al*., 2002).

Les staphylocoques d'origine fromagère sont halotolérantes. Elles possèdent des propriétés lipolytiques et protéolytiques qui participent à la formation de la morge (Curtin *et al*., 2002). Certaines souches de *Staphylococcus* fournissent également une grande diversité de notes aromatiques, allant du fruité solvant, vineux ou floral au chocolaté, qui sont souvent plus variées que celles des bactéries corynéformes (Irlinger *et al*., 1997).

La présence de bactéries à Gram-négatif dans les fromages est souvent associée à une mauvaise qualité hygiénique ou à un risque d'altération du produit. Outre l'implication de certaines souches dans des gastro-entérites à divers degrés de gravité, les coliformes sont en effet souvent associés à un défaut d'aspect, principalement dans les fromages à pâte molle. Il s'agit du gonflement précoce et de la formation de trous dans la pâte pendant la fabrication et les premiers jours d'affinage. Ces ouvertures sont le résultat d'une accumulation d'hydrogène, générée par la dégradation du formate issu du métabolisme du lactose (Fox *et al*., 2000). Néanmoins, peu d'études montrent l'impact technologique positif que pourrait avoir certains

représentants de cette flore. Pourtant, le développement des entérocoques pendant l'affinage peut s'accompagner d'une production d'estérases qui contribuent à la dégradation des lipides des caillés, et de protéases qui participent à la dégradation de la caséine (Trovatelli & Schiesser, 1987 ; Wessels *et al*., 1990 ; Freitas *et al*., 1999). De cette intense activité biochimique résulte la formation de certains composés d'arôme tels que l'acétaldéhyde, l'acétoïne et la 2,3-butanedione (Trovatelli & Schiesser, 1987). Plus récemment, dix souches d'entérobactéries d'origine laitière ont été inoculées dans un caillé frais et la production de composés volatils a été analysée. Des composés aromatiques, notamment soufrés, ont été détectés dès les deux premières heures de croissance. La souche la plus productrice appartient à l'espèce *Enterobacter sakazakii* (Morales *et al*., 2004). L'utilisation de cette espèce dans l'alimentation pourrait cependant être remise en cause puisque sa pathogénicité est actuellement suspectée. En effet, bien que l'utilisation des entérocoques dans la flore levain de certains fromages traditionnels soit autorisée ou suggérée dans de nombreux pays (ex. Grèce, Royaume-Uni, Espagne, Danemark et Italie), ces bactéries suscitent encore un débat très vif quant à leur implication dans de nombreuses infections nosocomiales ou opportunistes et, surtout, quant à leur résistance aux antibiotiques (Franz *et al*., 1999 ; Gardiner *et al*., 1999).

Contribution à l'aspect et à la coloration de la croûte

L'aspect et la couleur de la croûte des fromages sont des critères commerciaux essentiels. Environ 12 à 29 % des bactéries corynéformes sont pigmentées et au moins 16 genres différents (ex. *Brevibacterium*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*) interviennent activement dans la coloration des fromages à croûte lavée (Dufossé, 2001). Le nombre d'espèces au sein de chaque genre n'est par contre pas connu. Le pourcentage de souches pigmentées par rapport à la flore totale est très variable d'un fromage à un autre, voire d'une fabrication à l'autre (Bockelmann *et al*., 1997ab). Actuellement, *B. linens* est l'espèce la mieux connue et l'une des seules bactéries pigmentées qui soit commercialisée. En effet, *B. linens*/*B. aurantiacum*, nommée aussi « ferment du rouge », a longtemps été considérée comme la bactérie responsable de la coloration des fromages bien qu'elle ne soit pas l'espèce dominante de la majorité des morges (Bockelmann *et al*., 1997abc ; Bockelmann, 2002ab). Sa pigmentation est due à la production de 3 pigments caroténoïdes : l'isoréniératène, le 3-hydroxyisoréniératène et le 3,3'-dihydroxyisoréniératène) (Kohl *et al*., 1983 ; Krubasik & Sandmann, 2000 ; Dufossé *et al*., 2005). Des solutions diluées de ces composés sont jaune-orange. La production de ces pigments par *B. linens* est souche dépendante (Dufossé *et al*., 2001). Elle constituerait un mécanisme de défense des cellules vis-à-vis des stress extérieurs tels que la lumière ou les oxydants, dont l'oxygène (Guyomarc'h *et al*., 2000). L'implication d'autres micro-organismes dans le développement de la couleur des fromages est maintenant largement acceptée, comme le rôle pigmentaire d'autres bactéries de surface (Bockelmann *et al*., 1997c ; Bockelmann, 2002a ; Galaup *et al*., 2005) ou l'impact des levures sur la pigmentation bactérienne (Leclercq-Perlat *et al.*, 2004b). Ainsi, Bockelmann *et al*. (1997c ; 2002a) ont montré que quelques souches particulières d'*Arthrobacter*, de couleur jaune, participent à la pigmentation rouge-brun observée à la surface des fromages à croûte lavée. Cette couleur typique serait liée à la présence de produits de dégradation de la caséine, métabolisée par une flore fortement protéolytique comme *D. hansenii* ou *B. linens*, et ne serait produite par les *Arthrobacter* que pour des pH supérieurs à 5. De même, Leclercq-Perlat *et al.* (2004b) ont montré que l'intensité de la couleur d'un tapis bactérien de *B. linens* cultivé sur un milieu à base de fromage de Munster était directement liée à la levure utilisée lors de la désacidification. Il est donc désormais admis que l'aspect et la couleur des fromages est directement liée à la flore de surface, à la composition

du milieu « fromage » (teneur en sel, taux de matière sèche, pH, teneur en lactose, …) et aux interactions entre micro-organismes de la matrice fromagère.

1.4. Les phénomènes d'interaction entre flores

Au cours de la transformation du lait en fromage, puis de l'affinage, il est désormais établi que les différentes souches microbiennes s'entraident pour vivre, entrent en compétition, se supportent et se détruisent (élimination des pathogènes) les unes les autres. L'ensemble de ces interactions gouverne la structure des communautés microbiennes et leurs activités. On les classe en deux catégories : les interactions *positives* qui se caractérisent par la stimulation d'un ou de plusieurs micro-organismes et les interactions *négatives* qui correspondent à une inhibition de la croissance et de l'activité métabolique (Choisy *et al*., 1997b).

1.4.1. Les interactions positives

Quand on parle d'interactions positives, on différencie le *commensalisme* où l'un des partenaires est stimulé par la production d'une substance essentielle ou par la destruction d'un facteur inhibiteur, du *mutualisme* où, dans ce cas, l'interaction est bénéfique au deux partenaires.

1.4.1.1. Cas des bactéries lactiques

Une interaction positive a ainsi pu être observée lors de la croissance simultanée de *St. thermophilus* et de *Lactobacillus bulgaricus* dans le lait (Béal & Sodini, 2003). L'association de ces deux espèces s'accompagne d'un accroissement des concentrations bactériennes (Robinson *et al*., 2002 ; Pearce & Flint, 2003), d'une augmentation des vitesses d'acidification par rapport aux vitesses observées en cultures pures (Amoroso *et al*., 1989 ; Spinnler & Corrieu, 1989) et d'une amélioration de la stabilité physique du produit (Béal & Sodini, 2003). Ces phénomènes s'apparentent à une interaction de type *protocoopération* ou *mutualisme facultatif*. De fait, *Lb. bulgaricus*, très protéolytique, dégrade la caséine en acides aminés plus facilement assimilables par *St. thermophilus* (Abu-Tarboush, 1996) qui, à son tour, produit de petites quantités de CO_2 à partir de l'urée et stimule ainsi la croissance de *Lb. bulgaricus* (Ascon-Reyes *et al*., 1995 ; Zirnstein & Hutkins, 2000 ; Robinson *et al*., 2002). D'autre part, Bauquis *et al.* (2002) ont observé que la prématuration du lait par *L. lactis* ssp. *lactis* et *L. lactis* ssp. *cremoris* amplifiait les performances aromatiques des différentes combinaisons de bactéries lactiques et flores d'affinage étudiées lors de fabrications de camemberts.

1.4.1.2. Cas des levures

envers la flore bactérienne…

Comme évoquée précédemment (**§ 1.3.2.2.**), la désacidification progressive de la surface des fromages par les levures permet l'implantation et le développement de la flore bactérienne acido-sensible, telle que les bactéries corynéformes et les staphylocoques (Lenoir, 1984 ; Eliskases-Lechner & Ginzinger, 1995a ; Corsetti *et al*., 2001). A titre d'exemple, il est

possible d'observer des phénomènes d'activation entre *G. candidum* et *B. linens*. De fait, la remontée du pH (de 4,5 à 6,5) par *G. candidum* favorise le développement de *B. linens* qui présente une croissance maximale pour un pH compris entre 6,5 et 8,5 (Jollivet, 1991). Dans une gamme de pH lui étant favorable (6,5-7,5), *B. linens* peut, à son tour, activer assez fortement la croissance de *G. candidum* (Lecocq & Guéguen, 1994). La nature et l'amplitude des phénomènes dépendent toutefois des souches elles-mêmes et des conditions de culture comme la température, le pH et la teneur en NaCl du milieu. En effet, pour des concentrations croissantes en NaCl, la stimulation réciproque des deux souches s'atténue, notamment en raison de la grande sensibilité de *G. candidum* au sel (Lecocq & Guéguen, 1994). En milieu fromager, la nature de cette stimulation croisée entre *G. candidum* et *B. linens* semble bien plus complexe, les cinq couples *G. candidum*/*B. linens* étudiés par Lecocq *et al*. (1996) conduisant à des différences importantes d'aspect, de goût et de vitesse d'affinage. Les levures présentent également la capacité d'excréter des vitamines du groupe B (Addis *et al*., 2001). Ces substances, notamment l'acide pantothénique, sont indispensables pour une croissance optimale de *B. linens* (Purko *et al.*, 1951). Chazaud et Larpent (1980) ont également observé que l'extrait de levure stimulait la croissance de *Streptococcus salivarus* ssp. *thermophilus* et la production d'acide lactique par ce micro-organisme, avec comme principaux éléments actifs de cet extrait les acides aminés et, dans une moindre mesure, des bases azotées et quelques composés minéraux. De plus, au cours de l'affinage et notamment lors des soins de croûte, l'apport de sel fragilise les parois cellulaires des levures. Celles-ci éclatent et libèrent des nucléotides, des peptides, des vitamines et d'autres métabolites également favorables à la croissance des bactéries de surface.

envers les moisissures et autres levures…

Guéguen et Schmidt (1992) ont étudié l'action de *G. candidum* sur le développement des levures appartenant aux espèces *K. lactis*, *K. marxianus*, *D. hansenii*, *S. cerevisiae* et *Zygosaccharomyces rouxii*. Il s'est avéré que cette action était toujours de nature stimulante. Par exemple, l'association de *G. candidum* avec *K. lactis* et *P. camemberti* permet une désacidification plus rapide du caillé, ce qui agit favorablement sur le développement de la flore bactérienne acido-sensible. De façon plus macroscopique, cette association joue également sur l'aspect de la couverture de surface et sur l'amertume des fromages de type Camembert. En effet, l'incorporation de *G. candidum* conduit à une remontée de pH plus rapide en surface du fromage, responsable du développement moins dense de *Penicillium*. La surface est alors moins uniformément blanche, rappelant celle des camemberts traditionnels (Mourgues *et al.*, 1983). La protéase acide de *Penicillium* est également moins active et une dégradation plus lente des caséines a lieu expliquant la diminution de l'amertume dans ces camemberts (Vassal & Gripon, 1984). A cela s'ajoute l'action de l'aminopeptidase de *G. candidum* qui hydrolyse les peptides amers libérés par la protéase acide de *P. camemberti*. L'activité métabolique globale, déterminée expérimentalement par le nombre de cellules viables par unité de matière sèche, semble également plus intense en culture mixte qu'en culture pure (Molimard, 1994 ; Molimard *et al*., 1995). Il est donc intéressant d'associer *G. candidum* et *P. camemberti* en technologie fromagère, en particulier pour la fabrication des pâtes molles à croûte fleurie. Les bénéfices restent toutefois variables en fonction des souches présentes (Mourgues *et al.*, 1983) et certaines associations *G. candidum*/*P. camemberti* paraissent plus stables que d'autres au cours de fabrications répétées (Molimard, 1994 ; Molimard *et al*., 1995). Les auteurs n'ont cependant pas mis en évidence les mécanismes à l'origine de cette coopération entre *G. candidum* et *P. camemberti*, des métabolismes complémentaires et/ou la synthèse de substances stimulantes pouvant en être à la base. En étudiant les interactions entre levures lors de l'affinage de camemberts et de fromages à pâtes

persillées, Addis *et al*. (2001) ont remarqué que plusieurs souches de *D. hansenii* et de *S. cerevisiae* favorisaient la croissance de *Y. lipolytica* et de *K. marxianus*. Dans ces mêmes types de fromage, *Y. lipolytica* et *C. catenulata* sont capables de produire des acides aminés libres pouvant servir de substrats à des bactéries ou d'autres levures et, ainsi, permettre la production de composés d'arôme (Roostita & Fleet, 1996b).

1.4.1.3. Cas des bactéries de surface

La succession des microflores des fromages à morge ou à croûte lavée (levures, puis staphylocoques et enfin bactéries corynéformes) laisse supposer une possible interaction positive des staphylocoques sur les bactéries corynéformes. Cette hypothèse a récemment été renforcée par l'étude de Bockelmann *et al*. (2003), qui a montré que l'utilisation conjointe de *Staphylococcus equorum* et de *D. hansenii* dans le bain de saumure menait à une désacidification nettement plus rapide de la croûte pendant les 7 premiers jours de maturation qu'avec la technique de « old-young smearing », permettant ainsi une implantation beaucoup plus rapide des bactéries corynéformes acido-sensibles.

1.4.2. Les interactions négatives

Il existe divers mécanismes d'inhibition des micro-organismes entre eux. Si l'inhibition intervient par la production de substances inhibitrices et si un seul des deux micro-organismes est inhibé par l'autre, il convient de parler d'*amensalisme*. En revanche, si les mécanismes d'inhibition sont réciproques, il s'agit alors d'un phénomène de *compétition*. Cette compétition peut s'exercer vis-à-vis de l'espace disponible (inhibition de contact) et/ou de la disponibilité en substrats.

1.4.2.1. Cas des bactéries lactiques

envers les moisissures…

Plusieurs espèces de bactéries lactiques appartenant aux genres *Lactobacillus* et *Leuconostoc* ont été sélectionnées pour leurs activités anti-microbiennes. Un des composés actifs caractérisés est l'acide phényllactique (PLA) (Ström *et al*., 2002 ; Lavermicocca *et al*., 2003). Le PLA a été rapporté comme l'un des principaux acides aromatiques possédant des propriétés anti-bactériennes issus du miel (Weston *et al*., 1999). Une étude menée chez *Lactobacillus plantarum* a montré qu'à partir d'un milieu synthétique contenant de la phénylalanine comme seule source d'azote, il y avait bien production de PLA et que cette production était proportionnelle à la quantité de phénylalanine ajoutée (Valerio *et al*., 2004). *Lb. plantarum* est ainsi capable d'inhiber différentes moisissures comme *Aspergillus* et *Penicillium* (Lavermicocca *et al*., 2000). Dans les conditions utilisées par ces mêmes auteurs, une concentration de 50 mg/ml de PLA suffit à empêcher le développement de ces moisissures. D'autre part, les effets de certaines associations microbiennes sur l'aspect, la texture et le développement de la flaveur ont été étudiés lors de fabrications de camemberts (Mourgues *et al*., 1983 ; Bauquis *et al*., 2002 ; Carreira *et al*., 2002). A titre d'exemple, deux cultures lactiques mésophiles (A et B) ont été sélectionnées selon leur composition relative en lactocoques et leuconostocs : le levain A possédait une proportion très importante de souches acidifiantes, tandis que le levain B était plus riche en *L. lactis* ssp. *lactis* var. *diacetylactis* et leuconostocs (Bauquis *et al*., 2002). Associée à un mélange de cultures d'affinage (*P. camemberti* ssp. *caseicolum*, *G. candidum*, *B. linens* et *S. xylosus*), l'utilisation du ferment

lactique B s'est révélée avoir une meilleure influence sur l'aromatisation des fromages *via* l'interaction entre *Leuconostoc* et *Penicillium*. Selon les auteurs, la forte présence de leuconostocs dans le levain B conduit à une plus grande concentration d'éthanol dans le fromage, facteur qui a vraisemblablement un impact néfaste sur la densité du *P. camemberti* ssp. *caseicolum* en surface.

envers les autres bactéries…

Par ailleurs, la production d'acide lactique et l'abaissement du pH initial du lait, conséquences de la fermentation du lactose par la flore lactique, contribuent à l'inhibition de certains micro-organismes potentiellement dangereux pour le consommateur (flore pathogène) ou le produit (flore d'altération) (El-Gazzar & Marth, 1992). Cet effet bactériostatique sur les bactéries appartenant au genre *Listeria*, *Staphylococcus* ou *Clostridium* (Oh & Marshall, 1993 ; Holzapfel *et al*., 1995) dépend toutefois des stéréoisomères produits, l'acide L-lactique étant plus inhibiteur que la forme D (Benthin & Villadsen, 1995). En abaissant le pH du milieu, l'acide lactique permet aussi d'augmenter la toxicité de l'acide acétique (produit par voie hétérofermentaire) envers *L. monocytogenes* (Adams & Hall, 1988 ; Ahamad & Marth, 1989 ; Holzapfel *et al*., 1995). De même, bien que son mode d'action ne soit pas réellement connu, il semblerait que l'accumulation du dioxyde de carbone (CO_2) dans la bicouche lipidique membranaire puisse entraîner un dysfonctionnement de la perméabilité (Eklund, 1984) et, par conséquent, inhiber le développement de certains micro-organismes (Dacosta, 2000). En se substituant partiellement ou totalement à l'oxygène, il ralentirait le développement de la flore aérobie stricte et celui de la flore anaérobie facultative puisque les décarboxylations enzymatiques ne pourraient plus avoir lieu (Dacosta, 2000). Différentes études menées sur le caractère bactéricide des bactéries lactiques ont également permis d'isoler des bactériocines (**Tableau 5**). Il s'agit de substances de nature protéique synthétisée par la voie ribosomique. Elles ont une action bactériostatique ou bactéricide par leur fixation à des récepteurs de la cellule cible. Néanmoins, le potentiel inhibiteur qu'elles présentent sur une matrice laitière ou fromagère a été testé pour peu d'entre elles. A titre d'exemple, la nisine est synthétisée par certaines souches de *L. lactis* ssp. *lactis*. Elle possède un spectre d'action envers de nombreuses bactéries à Gram-positif (dont des streptocoques, staphylocoques, *Listeria* ou *Bacillus*) mais n'a toutefois pas toutes les qualités requises pour une bonne efficacité dans les fromages. En particulier, elle se révèle instable et inefficace aux pH proches de la neutralité qui sont les plus favorables aux bactéries que l'on souhaite éliminer (Desmazeaud, 1992). En effet, elle est incapable de réduire la croissance de *L. monocytogenes* durant l'affinage d'un Camembert artificiellement contaminé (Maisnier-Patin *et al*., 1992). Ce phénomène de résistance a également été rapporté pour la bactériocine pediocine AcH produite par une souche de *Lb. plantarum* d'origine fromagère. Testée lors de la fabrication d'un fromage à pâte molle et à croûte lavée modèle, artificiellement contaminé avec *L. monocytogenes*, cette bactériocine s'est révélée être incapable d'inhiber les douze souches de *L. monocytogenes* testées (fréquence de résistance variant de 10^{-3} à 10^{-6}) (Ennahar *et al*., 1996).

1.4.2.2. Cas des levures

envers les bactéries…

Les nombreuses potentialités inhibitrices de *G. candidum* envers certaines espèces de la flore lactique et de la flore d'affinage, ainsi qu'envers *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* et *Salmonella typhimurium* ont été rapportées dans une étude conduite par Guéguen en 1984. Dès lors, l'auteur avait souligné que les activités inhibitrices

dépendaient fortement du milieu et des conditions de culture et qu'il semblait difficile de prévoir le comportement de *G. candidum* en milieu fromager. Depuis, deux substances inhibitrices de *L. monocytogenes* ont été isolées et caractérisées par Dieuleveux *et al.* (1998b) à partir de la souche *G. candidum* ATCC204307 isolée du Pont l'Evêque. La première est l'acide D-3-phényllactique (PLA) et la seconde correspond à l'acide indollactique (ILA). Des essais *in situ* sur des caillés de Saint-Paulin avec le PLA purifié n'ont toutefois montré qu'une inhibition modérée de *L. monocytogenes* (Dieuleveux *et al.*, 1998a ; Dieuleveux & Guéguen, 1998). Des tests d'inhibition réalisés sur *Mucor* avec une fraction contenant les deux acides se sont également révélés être infructueux (Maheswari, 1993). Par ailleurs, peu de travaux font état du potentiel inhibiteur d'autres levures envers des bactéries. L'étude de Fatichenti *et al.* (1983) a pour autant montré que *D. hansenii* était capable d'inhiber la croissance de *Clostridium tyrobutyricum* et de *Cl. butyricum*, deux agents d'altération des fromages à pâte pressée cuite, grâce à la sécrétion de composés intra et extracellulaires. Des isolats de levures, récupérés à partir de camemberts et de fromages bleus fabriqués en Australie, ont récemment été confrontés à différentes espèces bactériennes (Addis *et al.*, 2001). Seuls quelques isolats de *Y. lipolytica* ont montré une faible activité inhibitrice envers *L. monocytogenes* et *Bacillus cereus*.

envers les moisissures et autres levures…

La capacité de *G. candidum* à inhiber les *Mucor* est également très variable d'une souche à l'autre et fortement influencée par le milieu de culture (Guéguen, 1984 ; Guéguen & Schmidt, 1992). Le comportement inhibiteur de la souche *G. candidum* IBT 97877 vis-à-vis de moisissures appartenant aux genres *Penicillium* et *Aspergillus* a également été étudié (Nielsen *et al.*, 1998). Une inhibition de type inhibition de contact et plus rarement une inhibition réciproque ont été observées. Il est cependant difficile d'extrapoler le comportement de l'espèce *G. candidum* à partir de celui de souches données, mises en œuvre dans des conditions opératoires fixées, et qui ne sont pas toujours celles rencontrées en milieu fromage. Une interaction significative entre *Y. lipolytica* et *P. camemberti* a par ailleurs été observée sur des camemberts par Carreira *et al.* (2002). Les auteurs ont observé qu'en présence de la souche *P. camemberti* ssp. *caseicolum* la plus protéolytique (donc la plus à même de produire des pigments bruns), les fromages inoculés avec *Y. lipolytica* montraient un brunissement et une teneur en tyrosine plus faibles que ceux non inoculés, ce qui suggère que la levure est capable de réduire voire d'inhiber la protéolyse de la moisissure. A côté de l'activité protéolytique, le taux de croissance et la densité de *P. camembertii* ssp. *caseicolum* sont des facteurs importants pour le contrôle de l'apparence et des défauts de coloration du fromage (Carreira *et al.*, 2002).

1.4.2.3. Cas des bactéries de surface

envers les autres bactéries…

Différentes études menées sur le potentiel antimicrobien des bactéries de surface ont permis d'identifier trois types de substances bactéricides : la linecine A chez *B. linens* ATCC9175 (reclassé en 2004 en *Brevibacterium aurantiacum*), la linocine M18 chez *B. linens* M18 et la linenscine OC2 chez *B. linens* OC2. Alors que la linecine A est active uniquement contre 3 souches de *B. linens* (Kato *et al.*, 1991), la linocine M18 et la linenscine OC2 ont pour cible différentes bactéries à Gram-positif (notamment des bactéries pathogènes), mais n'ont aucune action sur les bactéries à Gram-négatif (Valdés-Stauber & Scherer, 1994). En général, les gènes codant pour les bactériocines sont situés sur des

plasmides (Jack *et al*., 1995). Le gène codant pour la linocine M18 a quant à lui été localisé sur l'ADN chromosomique (Valdés-Stauber *et al*., 1996). Ces mêmes auteurs ont constaté que ce gène était largement distribué chez les bactéries corynéformes isolées de produits laitiers ou fromagers, notamment au sein des genres *Corynebacterium*, *Brevibacterium* et *Arthrobacter*. Plus particulièrement, *B. linens* et *Arthrobacter nicotianae* pourraient avoir un rôle actif dans le contrôle de croissance de *Listeria*, à condition qu'elles soient dominantes et qu'elles produisent au même moment des substances inhibitrices en quantité suffisante (Valdés-Stauber *et al*., 1991). De même, l'étude de Carnio *et al*. (1999) a montré qu'une partie des bactéries corynéformes (environ 10 %) isolées de la flore de surface de différents types de fromages allemands et français ont une action inhibitrice contre *L. monocytogenes*. Ces bactéries appartiennent aux genres *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Micrococcus* et *Microbacterium*. Les substances anti-*Listeria* produites semblent avoir une nature protéique proche de la linenscine (Boucabeille *et al*., 1997 ; Boucabeille *et al*., 1998). La capacité à produire une substance inhibant *L. monocytogenes* a également été attribuée à une souche de *Staphylococcus equorum* (Carnio *et al*., 2000). Son activité anti-*Listeria* a été testée *in vitro* sur 35 souches de *Listeria*, puis validée *in situ* lors de l'affinage de fromages à pâtes molles expérimentaux. Une diminution de 1 à 2 log de la croissance de *Listeria* a alors été constatée dans les fromages affinés avec la souche *S. equorum* WS2733. Néanmoins, Maoz *et al*. (2003) soulignent que l'activité anti-*Listeria* d'un consortium microbien, même évaluée *in situ* sur des fromages, n'est pas toujours stable au cours du temps. En effet, l'évolution du potentiel anti-*Listeria* est liée à la dynamique des espèces à l'intérieur de chaque consortium.

envers les levures et moisissures…

Chez les bactéries corynéformes, divers travaux ont également montré l'existence d'enzymes exocellulaires ayant la capacité de lyser des cellules de levures. A titre d'exemple, une sérine-protéase et une endo-β-1-3-glucanase (commercialisée maintenant sous le nom de lyticase) ont été identifiées chez des souches isolées d'eaux résiduaires de brasseries (Kitamura *et al*., 1974) ; des protéases, glucanases et mannanases chez *Arthrobacter globiformis* (Blechschmidt *et al*., 1982). De même, Bergère et Tourneur (1992) ont observé que des bactéries corynéformes isolées de la flore superficielle de fromages étaient capables de lyser les cellules des principales levures fromagères. En revanche, la majorité des études portant sur l'activité antifongique des bactéries de surface est orientée vers l'espèce *B. linens*. Grecz *et al*. (1961 ; 1962) ont d'abord suggéré la production d'un antibiotique par *B. linens*, capable d'inhiber la croissance de certaines moisissures, sans toutefois identifier une substance particulière. D'autres auteurs ont ensuite mentionné que le méthanethiol produit par les brévibactéries pouvait être responsable de l'inhibition de la croissance de champignons dermatologiques (Ryall *et al*., 1981). Le lien entre la propriété antifongique de *B. linens* et sa production de thiol a également été confirmé par Lewis (1982a ; 1982b) sur des moisissures isolées de différents aliments : *Penicillium expansum*, *P. roqueforti*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus nigricans* et *Mucor* sp.. Néanmoins, les études récentes d'Osman (2004) sur cette inhibition n'ont pas donné les mêmes conclusions. En effet, selon l'auteur, l'inhibition ne serait pas due à la production de composés soufrés mais de substances résistantes aux enzymes protéolytiques et d'autant plus actives à pH alcalin.

2.

APPROCHE DYNAMIQUE & FONCTIONNELLE D'UN ECOSYSTEME : *les techniques moléculaires*

Les micro-organismes sont les principaux agents biologiques contribuant à l'élaboration des fromages. Les diverses études sur la microbiologie des fromages montrent qu'il s'agit de véritables écosystèmes microbiens, à l'intérieur desquels il existe de nombreuses interactions entre les différents micro-organismes et avec le milieu dans lequel ils vivent. Ainsi, suivant les conditions physico-chimiques du milieu, de l'environnement, à un moment donné de l'affinage, certains micro-organismes se multiplient activement alors que d'autres tendent à disparaître. Les équilibres entre les différents groupes de micro-organismes et l'importance relative des populations sont donc en constante évolution.

2.1 Inventaire dynamique des espèces microbiennes

2.1.1. L'approche classique (culture-dépendante)

Avant la maîtrise des outils de biologie moléculaire, l'identification de la flore fromagère était uniquement basée sur des caractères phénotypiques, c'est-à-dire la connaissance des caractéristiques morphologiques, biochimiques et physiologiques des isolats obtenus. Le préalable requis à toute identification phénotypique était bien sûr la nécessité d'isoler et de cultiver les micro-organismes composant l'écosystème étudié et, par conséquent, de bien choisir les milieux de culture, la température d'incubation et le pH afin d'obtenir la diversité microbienne la plus proche possible de la réalité. Les limites de ces méthodes sont désormais bien connues. Elles sont d'abord, longues et fastidieuses, et sous-estiment généralement la diversité réelle de l'échantillon, du fait de la prédominance de certains micro-organismes ou de l'incapacité d'autres à se développer en dehors de leur environnement naturel (Amann *et al.*, 1995). L'étude d'écosystèmes complexes implique donc l'utilisation de méthodologies capables de détecter l'ensemble de la diversité microbienne, qu'elle soit cultivable ou non.

2.1.2. L'approche moléculaire directe (culture-indépendante)

L'avènement de la biologie moléculaire avec l'apparition de techniques permettant d'extraire l'ADN ou l'ARN présent dans l'écosystème a permis de définir de nouvelles bases pour étudier la diversité génétique et la structure d'écosystèmes microbiens au cours du temps, sans isolement et sans phase de culture préalables. Les gènes codant les ARN ribosomiques, dont la présence est universelle et la fonction conservée chez toute forme cellulaire, sont rapidement apparus comme des marqueurs de choix en phylogénie (Fox *et al.*,

1977 ; Woese & Fox, 1977). Les gènes codant les ARNr 16-18S (petite sous-unité ribosomique) sont couramment utilisés comme molécules de référence, du fait de la présence de séquences conservées, variables et hypervariables, et sont très largement représentés dans les banques de gènes. Ces marqueurs, ainsi que d'autres gènes de fonction, sont employés dans diverses techniques d'écologie microbienne (**Figure 4**).

2.1.2.1. Le clonage et le séquençage

La technique de clonage-séquençage est largement utilisée en écologie microbienne. Appliquée à l'ADN de la petite sous-unité ribosomique, elle a entre autres permis d'apprécier la diversité bactérienne d'un digesteur anaérobie (Godon *et al*., 1997), d'herbages hollandais (Felske *et al*., 1999) ou encore de fromage de Salers (Duthoit *et al*., 2003). L'une des étapes clés de cette méthode est l'extraction des acides nucléiques. Différentes techniques d'extraction et de purification de l'ADN ont été testées sur différents types d'échantillons, notamment à partir de matrices fromagères (Cappa & Cocconcelli, 2001 ; Randazzo *et al*., 2002 ; Duthoit *et al*., 2003 ; Bonaïti *et al*., 2006). Elles combinent généralement des méthodes de lyse chimique (ex. détergents, phénol), et/ou de lyse enzymatique (ex. protéinase K, lysozyme), et/ou de lyse mécanique (« bead-beater »). La région 16S est ensuite amplifiée sélectivement à partir de l'ADN extrait des différents échantillons, *in vitro*, à l'aide d'amorces universelles et d'une ADN polymérase thermostable. Les produits obtenus sont séparés par clonage en utilisant des méthodes standards (Giovannoni *et al*., 1990). Du fait de leur petite taille (environ 1500 pb), les ADNr 16S amplifiés sont généralement clonés dans des plasmides. Différents kits très efficaces et d'emploi facile sont commercialisés (ex. TOPO TA cloning Kit, Invitrogen). Les inserts de bonne taille sont ensuite séquencés, soit directement après extraction du plasmide, soit après réamplification de l'insert à partir d'amorces du plasmide flanquant les sites de clonage, et soumis à interrogation dans les bases de données.

Pour être représentatif de l'écosystème, le nombre de clones doit être assez conséquent ce qui rend la méthode lourde à gérer en pratique. Une nouvelle approche, la *métagénomique* (ou *écogénomique*), consiste donc à cloner de très grands fragments de génomes dans des chromosomes artificiels de bactérie (BAC: *Bacterial Artificial Chromosome*) (inserts de 200 kb) (Béjà *et al*., 2000), des Cosmides (25-35 kb) (Entcheva *et al*., 2001) ou des Fosmides (40 kb) (Béjà *et al*., 2002). Ces vecteurs sont ensuite transférés dans des cellules standard comme *E. coli* (Henne *et al*., 2000). Après séquençage, l'analyse informatique des fragments du métagénome permet d'apprécier la diversité génomique d'une communauté microbienne (Rondon *et al*., 2000 ; Riesenfeld *et al*., 2004) et, au-delà de l'analyse descriptive des micro-organismes non cultivables, d'accéder directement aux informations contenues dans leurs génomes (Rondon *et al*., 2000 ; Ginolhac *et al*., 2004 ; Streit & Schmitz, 2004) (**Figure 5**). Il est même parfois possible de reconstituer le génome complet des micro-organismes particulièrement abondants, ce qui donne une vue plus riche de leur potentiel biologique dans leur environnement naturel. Lorsque l'on cherche à favoriser une activité microbienne en particulier, une approche culturale est parfois ajoutée en utilisant l'organisme hôte comme souche à tester. Le but de la *métagénomique* est d'exploiter au mieux la biodiversité d'une communauté microbienne en identifiant la fonction et la séquence des génomes de tous les micro-organismes qui ne peuvent pas être cultivés (Handelsman, 2004). Parallèlement, l'augmentation progressive du nombre de séquences disponibles dans les banques de données améliore la précision des filiations déterminées pour chaque séquence nouvelle et facilite la construction d'amorces spécifiques destinées à inventorier la diversité des membres de groupes peu connus (Whitby *et al*., 1999) ou d'une nouvelle division (Dojka *et al*., 2000).

2.1.2.2. L'*In Situ*-PCR (IS-PCR) et la PCR en temps réel

L'IS-PCR est une technique qui permet d'identifier et de caractériser génétiquement des cellules isolées à l'intérieur de mélanges complexes. Elle implique l'amplification de séquences d'acides nucléiques spécifiques à l'intérieur de cellules intactes, suivie par une détection par fluorescence du produit PCR par microscopie à épifluorescence. Les cibles potentielles en IS-PCR sont les gènes individuels, l'ARN messager ou l'ARN ribosomique, ce qui permet de détecter l'information taxonomique d'une cellule individuelle, ainsi que ses traits génétiques et leur expression. L'IS-PCR a primitivement été appliquée en milieu biomédical pour détecter la présence de gènes spécifiques dans des cellules eucaryotes (Gressens *et al*., 1994). En 1995, Hodson *et al*. ont développé un protocole d'IS-PCR adapté aux procaryotes et ont montré qu'il était possible de détecter spécifiquement des cellules de *Pseudomonas* exprimant le gène *nahA* (naphtalène dioxygénase) dans une communauté bactérienne marine modèle.

La PCR en temps réel est une méthode qui permet de quantifier de l'ADN ou de l'ARN de façon plus reproductible et précise que tout autre technique basée sur de l'amplification (Heid *et al*., 1996). Elle repose sur la détection et la quantification d'un marqueur fluorescent. Il peut s'agir d'une sonde fluorescente (TaqMan®) spécifique du fragment à amplifier ou bien d'un agent fluorescent intercalant (le Sybr®Green) non spécifique de l'ADN. La quantité de fluorescence détectée à chaque cycle est enregistrée. Il est alors possible de suivre l'apparition du produit au fur et à mesure des cycles d'amplification. En théorie, l'amplification suit la loi exponentielle : $N = No \times 2^n$, où n représente le nombre de cycles, N la quantité de produit PCR au cycle n, No la quantité initiale de séquence cible. L'efficacité de l'amplification est néanmoins souvent inférieure à 100 % et tend à diminuer au cours de l'amplification. Cette diminution résulte en partie de la compétition entre l'hybridation des amorces et la renaturation des produits d'amplification entre eux. Elle est également due à la baisse de la concentration en réactifs et à l'inhibition de la polymérase par des produits de la réaction. Cette technique est particulièrement appropriée pour comparer l'expression des gènes. En outre, quelques études ont montré son intérêt dans la connaissance et l'étude de la dynamique d'écosystèmes microbiens complexes (Furet *et al*., 2004 ; Matsuki *et al*., 2004 ; Song *et al*., 2004 ; Kamra, 2005) ou encore pour la détection et l'identification de la flore levure dominante et sous-dominante du Livarot (Gente *et al*., 2007 ; Larpin *et al*., 2006). Elle est également adaptée pour détecter et quantifier des contaminants présents en très faible quantité, notamment des pathogènes. Ainsi, *Staphylococcus aureus* a pu être retrouvé dans un fromage artificiellement contaminé (Hein *et al*., 2001), de même que des souches appartenant au genre *Candida*, potentiellement pathogènes, ont pu être dénombrées dans de l'eau (Brinkman *et al*., 2003).

2.1.2.3. L'analyse de fragments

Les techniques d'*empreinte génomique* sont également très utiles en écologie microbienne pour recueillir des informations sur la diversité et la dynamique des espèces présentes. Elles reposent sur l'extraction des acides nucléiques, l'amplification par PCR des séquences d'intérêt et l'analyse d'une partie de l'information génétique par migration électrophorétique différentielle sur gel d'agarose ou de polyacrylamide. En fonction de la spécificité des amorces utilisées, les profils de bandes obtenus seront représentatifs de la globalité de la communauté ou d'une partie seulement. Cette empreinte génétique de l'écosystème à un instant donné permet également de suivre la dynamique des populations en terme de présence et/ou en terme d'activité.

Sans restriction enzymatique

Sur matrice fromagère, les techniques d'empreinte actuellement les plus prisées incluent la DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*), la TGGE (*Temperature Gradient Gel Electrophoresis*) et la SSCP (*Single Strand Conformation Polymorphism*).

L'analyse par D/TGGE consiste à discriminer par électrophorèse des fragments d'ADN de taille identique ou quasi-identique mais de composition différente. L'amplification vise principalement l'ADN ribosomique avec l'utilisation de nombreuses amorces amplifiant les régions variables de l'ADNr 16S pour les bactéries et de l'ADNr 26S ou 18S pour les eucaryotes. La séparation est basée sur les changements de mobilité électrophorétique des fragments amplifiés migrant dans un gel vertical de polyacrylamide, à des concentrations croissantes d'agents chimiques dénaturants (DGGE) ou à des températures croissantes (TGGE) (**Figure 6**). Ces méthodes, très sensibles, sont particulièrement intéressantes pour évaluer la diversité microbienne au sein d'écosystèmes complexes et suivre la dynamique des populations au cours du temps sans recourir à la construction de banques de clones (Muyzer & Smalla, 1998 ; Giraffa & Neviani, 2001 ; Ercolini, 2004). Dans les produits laitiers, notamment les fromages, la dynamique des communautés bactériennes a été étudiée par DGGE dans le Stilton (Ercolini *et al*., 2003b), le Ragusano (Randazzo *et al*., 2002), la Mozzarella (Ercolini *et al*., 2001), et par TTGE dans différents fromages tels que le Roquefort, la Tomme de Savoie, le Saint-Nectaire, le Livarot, le Reblochon, le Brie et le Camembert au lait cru ou pasteurisé (Ogier *et al*., 2002 ; Henri-Dubernet *et al*., 2004 ; Sohier & Lortal, 2004). Ces techniques, adaptées à la caractérisation de divers écosystèmes laitiers, ont également permis d'enrichir et de diversifier la collection de bactéries d'intérêt laitier de l'INRA, connue sous le sigle CNRZ (Centre National de Recherches Zootechniques). A ce jour, la collection renferme près de 2500 souches appartenant aux genres *Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Streptococcus, Weissella, Propionibacterium, Enterococcus, Staphylococcus, Pediococcus, Arthrobacter, Brevibacterium, Corynebacterium, Brachybacterium* … L'un des avantages de ces techniques est que l'on peut également exciser du gel des bandes individuelles d'ADN, les séquencer et accéder ainsi directement à l'identification des micro-organismes par interrogation dans les bases de données. La co-migration de bandes de différentes espèces ou la formation de plusieurs bandes pour une même espèce sont toutefois des limites de ces méthodes, en particulier pour l'étude d'écosystèmes complexes (Henri-Dubernet *et al*., 2004).

L'analyse par SSCP repose sur le comportement électrophorétique d'un fragment d'ADN simple brin dans un gel de polyacrylamide. Après extraction des acides nucléiques totaux et amplification par PCR d'une zone variable des ADNr (16S chez les bactéries et 18S chez les levures), ceux-ci sont dénaturés en ADN simple brin puis déposés sur gel de polyacrylamide. Dans des conditions non dénaturantes, la structure secondaire de l'ADN simple brin est affectée par des interactions intramoléculaires. La mobilité électrophorétique des ADN simple brin se fait donc en fonction de leur masse moléculaire et de leur structure secondaire, à une température basse ne permettant pas le dépliement des structures secondaires ni les réassociations des brins complémentaires (Bonaïti, 2004). Une communauté microbienne est alors représentée par un profil de pics où chaque pic correspond à une séquence, l'aire de chaque pic donnant une indication sur l'abondance du micro-organisme au sein de la communauté. La sensibilité de cette technique est très élevée. Elle permet de détecter le changement d'une seule base dans le produit PCR si celui-ci ne dépasse pas 400 bases (Vaneechoutte, 1996). La SSCP est particulièrement appropriée pour effectuer des suivis de populations (Godon *et al*., 2001). Elle a notamment été utilisée pour suivre la dynamique bactérienne et celle de la communauté levure du fromage de Salers (Godon *et al*., 2001 ; Duthoit *et al*., 2003 ; Duthoit *et al*., 2005 ; Callon *et al*., 2006) ou encore pour

comparer la flore bactérienne présente à la surface de fromages à croûte lavée soit fermiers, soit pasteurisés (Feurer *et al*., 2004a).

Couplées au clonage et au séquençage, les analyses par D/TGGE et SSCP deviennent encore plus puissantes. Outre les biais pouvant être engendrés par l'échantillonnage ou l'extraction d'ADN total, les étapes de choix des amorces et d'amplification par PCR sont fondamentales (Giraffa & Neviani, 2001 ; Ercolini, 2004). Une amplification préférentielle ou partielle peut en effet avoir lieu au sein d'un mélange complexe d'ADN microbien (Ercolini *et al*., 2003b). En outre, le choix du couple d'amorces et de la région cible semble important selon l'analyse considérée. En effet, il a été montré dans le Stilton que *Leuconostoc* pouvait être détecté seulement lorsque la région V4-V5, et non la région V3 de l'ADNr 16S, était visée (Ercolini *et al*., 2003b). De plus, ces techniques permettent la détection des espèces dominantes de l'écosystème considéré. En effet, les espèces sous-dominantes doivent représenter plus de 0,1 % des espèces les plus dominantes pour être amplifiées. Dans le cas contraire, elles font alors partie du bruit de fond (Muyzer *et al.*, 1993 ; Heuer & Smalla, 1997 ; Zoetendal *et al*., 1998 ; Ogier *et al*., 2002 ; Sohier & Lortal, 2004). Enfin, d'autres limites inhérentes à ces deux techniques sont observables lors de la migration. Si chaque pic SSCP ou chaque bande D/TGGE peut être relié à une espèce, quelques exceptions peuvent être observées comme (i) la co-migration d'espèces différentes ayant des régions amplifiées de séquences, de température de demi-dénaturation ou de conformation identiques ou (ii) des profils multi-bandes car certaines espèces présentent un polymorphisme entre les différents opérons de l'ADNr dans la région ciblée (Giraffa & Neviani, 2001 ; Ercolini, 2004).

Avec restriction enzymatique

La dynamique des populations bactériennes à la surface du Tilsit (Rademaker *et al*., 2005) a récemment été suivie par T-RFLP (*Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism*). Cette technique, plus simple à mettre en œuvre que les analyses par D/TGGE, consiste à hydrolyser par des enzymes de restriction des séquences d'ADN amplifiées par PCR. L'amplification est réalisée avec des amorces universelles dont une est marquée en 5' par un fluorochrome. Le produit PCR obtenu est ensuite digéré avec une ou plusieurs enzymes de restriction, générant des fragments de diverses longueurs selon la séquence de l'ADN et la spécificité de l'enzyme. Seuls les fragments de restriction terminaux marqués avec le fluorochrome sont visualisés et mesurés par un séquenceur automatique. La T-RFLP est une technique sensible et rapide (Marsh, 1999) permettant d'accéder rapidement à la diversité microbienne de différents environnements (Liu *et al*., 1997 ; Moeseneder *et al*., 1999 ; Osborn *et al*., 2000 ; Lueders & Friedrich, 2003). Pour obtenir la représentativité la plus large de l'écosystème étudié, il est toutefois nécessaire d'utiliser plusieurs enzymes de restriction (Buchan *et al*., 2003).

Une variante de la RFLP, la technique ARDRA (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*), est également utilisée pour l'étude de communautés microbiennes provenant de divers habitats (Giraffa & Neviani, 2001). Elle s'applique spécifiquement aux ADN ribosomiques. Son principe consiste à amplifier l'ADN génomique extrait de l'échantillon avec des amorces universelles correspondant à des motifs nucléotidiques conservés des régions 16S ou 18S. La diversité des séquences amplifiées est ensuite évaluée en digérant ces fragments par des enzymes de restriction et en analysant les produits de digestion obtenus sur gel de polyacrylamide. Une étude a démontré que l'utilisation de 2 endonucléases reconnaissant des sites de restriction à 4 nucléotides permettait de discriminer la majeure partie des ADNr 16S présents au sein d'un mélange complexe et, par comparaison des différents profils obtenus, de décrire la diversité de la population et sa structure (Moyer *et al*.,

1994). Cette méthode a récemment été utilisée pour évaluer la diversité fongique dans les sols de prairies Galloises (Hunt *et al*., 2004).

2.1.2.4. L'hybridation *in situ* ou sur support

L'analyse comparative de la structure de différentes communautés microbiennes peut également s'effectuer grâce à des techniques d'hybridation, basées sur l'appariement par liaison hydrogène de séquences complémentaires entre la sonde et les acides nucléiques recherchés. Des hybrides ADN-ADN, ADN-ARN et ARN-ARN peuvent ainsi être formés, les premiers étant les plus stables. Les différents paramètres de l'hybridation doivent être optimisés de façon rigoureuse à chaque étape (Bouvier & del Giorgio, 2003). Classiquement, les sondes utilisées sont des fragments amplifiés par PCR ou des oligonucléotides de synthèse, marqués par radioactivité ou par fluorescence. L'alternance de domaines conservés, variables et hypervariables observée sur l'ADNr permet de dessiner des sondes au spectre de spécificité plus ou moins large, depuis l'espèce jusqu'au domaine. Après détermination d'une sonde *in silico*, il est toutefois essentiel de tester sa spécificité sur des ADN et des ARN de souches pures, ciblées ou non par la sonde, puis sur des mélanges de souches pures (Harmsen *et al*., 1997). L'accessibilité de la sonde à la molécule cible, en général l'ARNr 16S en écologie microbienne, constitue l'un des facteurs déterminants de la qualité d'une sonde (Fuchs *et al*., 2000 ; Bouvier & del Giorgio, 2003). De manière générale, l'optimisation des conditions de stringence est également essentielle pour obtenir une hybridation de bonne qualité et empêcher les hybridations aspécifiques. La stringence d'une hybridation dépend de 2 paramètres clés : la température et la concentration en sels du tampon d'hybridation. Elle est proportionnelle à la température et inversement proportionnelle à la concentration en sels. La température correspondant à 50 % d'hybrides est appelée température de fusion ou *Tm* (*Temperature of melting)*. Empiriquement, la température d'hybridation est déterminée en fonction de la *Tm* et de la nature de la sonde (la *Tm* dépend de la teneur en GC des brins). Pour une sonde oligonucléotidique de 20 à 30 mers, on choisit généralement une température d'hybridation de 5 °C en dessous de la *Tm*, ce qui permet d'obtenir une hybridation spécifique et un nombre convenable d'hybrides stables. Pour éviter de modifier la température d'hybridation lors de la mise au point d'une sonde, on peut modifier la concentration en formamide. Ainsi, la température peut être artificiellement augmentée par addition de formamide (l'addition de 1 % de formamide abaisse la température d'hybridation de 0,65 °C pour l'ADN et de 0,72 °C pour l'ARN). La concentration en ions monovalents Na^+ influence également la stabilité des hybrides (généralement on utilise une concentration de Na^+ de 660 mM).

Utilisation de sondes en « Dot Blot »

La simple fixation en *Dot Blot* consiste à fixer le mélange d'ADN (ou d'ARN) après dénaturation sur membrane, puis à ajouter les sondes radiomarquées. Après lavage, seules les sondes appariées avec des acides nucléiques complémentaires restent fixées sur le support et sont révélées par autoradiographie. Cette technique permet ainsi de savoir si, dans le mélange d'acides nucléiques testé, il existe une ou plusieurs séquences complémentaires de celle de la sonde. La quantification du groupe reconnu par la sonde se fait par comparaison avec les résultats d'hybridation obtenus avec une sonde à spectre plus large (universelle). Un maximum de précautions doit donc être pris lors de l'étape d'extraction des acides nucléiques pour conserver une représentation équilibrée des acides nucléiques au sein de l'échantillon. Cette approche a primitivement été appliquée pour suivre l'évolution des populations microbiennes du rumen de bœuf suite à l'introduction d'un antibiotique dans cet écosystème

(Stahl *et al*., 1988). Plus récemment, l'identification de bactéries lactiques par hybridation en *Dot Blot* a été réalisée dans des fromages, des yaourts, des saucisses, de la choucroute (Ehrmann *et al*., 1994) et pendant la fermentation du pozol, boisson mexicaine à base de pâte de maïs (Ampe *et al*., 1999).

Hybridation in situ

Avec l'apparition de logiciels de détermination de sondes performants et l'enrichissement en séquences des banques de données (Amann & Ludwig, 2000 ; Pernthaler *et al*., 2000 ; Pernthaler *et al*., 2002), l'hybridation *in situ* est devenue une technique puissante en écologie microbienne pour réaliser des quantifications spatio-temporelles de micro-organismes. Le principe de la FISH (*Fluorescent In Situ Hybridization*) repose sur l'utilisation de sondes d'une vingtaine de bases, marquées à l'aide d'un fluorophore spécifique, qui vont pénétrer directement dans les cellules et se fixer à la région homologue de l'ARNr. Les cellules sont préalablement fixées, évitant ainsi la lyse, et perméabilisées. Après excitation des marqueurs fluorescents, les cellules sont visualisées par microscopie à épifluorescence ou détectées par cytométrie en flux (Amann *et al*., 1990 ; Amann *et al*., 1995 ; Wagner *et al*., 2003). Cette technique permet d'identifier rapidement et spécifiquement des cellules microbiennes individuelles dans leur environnement naturel, avec un seuil limite de détection d'une cellule cible parmi 10^6 cellules non-cibles (Amann *et al*., 1995 ; Amann & Ludwig, 2000). Elle a surtout été appliquée aux environnements marins (Brinkmeyer *et al*., 2003 ; Takai *et al*., 2004), aux micro-organismes symbiotiques (Amann *et al*., 1991 ; Schramm *et al*., 2003) ou aux écosystèmes du sol où les micro-organismes sont souvent très difficiles à cultiver (Hahn *et al*., 1992). La FISH a également été utilisée pour identifier et quantifier différentes espèces de bactéries lactiques en mélange dans des laits fermentés ou des levains (Matte-Tailliez *et al*., 2001), ou pour explorer la diversité microbienne dans des fromages tels que le Stilton (Ercolini *et al*., 2003ab) ou le Gruyère (Kollöffel *et al*., 1999). Les principaux avantages de cette technique sont sa rapidité et sa sensibilité à détecter les populations présentes en faible nombre (Dorigo *et al*., 2005). Couplée à la micro-autoradiographie avec des substrats radioactifs, elle permet d'évaluer la structure globale d'un écosystème donné et d'identifier l'incorporation des substrats par des cellules individuelles au sein de l'écosystème (Lee *et al*., 1999 ; Ouverney & Fuhrman, 1999 ; Nielsen *et al*., 2002). La difficulté majeure reste toutefois l'étape de perméabilisation des cellules. En effet, certaines cellules comme les cellules âgées ou les bactéries à Gram-positif (corynéformes ou staphylocoques) ne sont pas facilement perméables (Gory *et al*., 1999). Par ailleurs, une méthodologie permettant la perméabilisation de cellules à Gram-positif n'est pas forcément adaptée à celle de cellules à Gram-négatif ou eucaryotes, également présentes dans l'écosystème à étudier, et peut entraîner la lyse totale des cellules les plus perméables. Par conséquent, cette technique est plus adaptée à la détection d'un groupe spécifique d'espèces qu'à la détection de la diversité totale (Dahllöf, 2002). Compte tenu du nombre restreint de marqueurs fluorescents disponibles (fluorescéine, coumarine, rhodamine), elle est souvent limitée à l'identification simultanée de 2 ou 3 groupes microbiens.

Hybridation sur membrane ou sur lame de verre

La technologie des puces à ADN, réservée en premier lieu pour la recherche médicale, a récemment été introduite en écologie microbienne (Wu *et al*., 2001 ; Denis *et al*., 2003 ; Peplies *et al*., 2003 ; Taroncher-Oldenburg *et al*., 2003). Si la mise en œuvre est assez compliquée, le principe est relativement simple (**Figure 7**). Des oligonucléotides ou des fragments d'ADN amplifiés par PCR (les *sondes*) sont immobilisés sur un support solide (membrane nylon ou lame de verre). Ce dispositif est ensuite mis au contact des acides

nucléiques à analyser, les *cibles* (ADN ou ARN extrait de l'échantillon), qui ont préalablement été marquées radioactivement ou par fluorescence. Après l'étape d'hybridation sonde/cible, puis lavage du matériel fixé de manière non spécifique, le signal radioactif ou fluorescent est quantifié au niveau de chaque sonde. Sa valeur reflète la quantité de molécules marquées complémentaires de la sonde dans l'échantillon de départ. Après conversion des signaux d'intensité en valeurs numériques, une analyse statistique des données d'hybridation est réalisée *in silico* afin d'identifier et de quantifier les espèces présentes dans l'échantillon. L'utilisation des puces à ADN en écologie microbienne n'est toutefois pas aussi aisée que dans le cas d'une étude sur cultures pures. Ainsi, Wu *et al*. (2001) ont démontré que la diversité des séquences cibles dans un environnement complexe ainsi que la longueur variable des sondes utilisées rendaient difficile l'optimisation des conditions d'hybridations (*Tm* différent entre les séquences) et influençaient l'intensité du signal d'hybridation obtenu. Seule l'utilisation de sondes oligonucléotidiques de longueur identique, de GC % similaire et de structure secondaire minimale permettrait alors d'optimiser uniformément les conditions d'hybridation. Aussi, en 2002, Cho et Tiedje ont établi que des puces à ADN constituées de sondes d'ADNc optimisées (produits PCR de 700 pb) n'étaient pas capables de détecter les gènes de populations constituant moins de 5 % d'une communauté totale. Mieux vaut donc utiliser des puces constituées d'oligonucléotides et un marquage à la TSA (Tyramine Signal Amplification) pour détecter les gènes d'un organisme ne constituant que 1 % ou plus d'une communauté (Denef *et al*., 2003). Malgré tout, les puces à ADN trouvent de nombreuses applications en écologie microbienne, que se soit dans l'industrie ou dans le domaine médical. A titre d'exemple, cette technique a pu être appliquée dans les secteurs de l'agro-alimentaire et de l'environnement lors de contrôles *Qualité* (contrôle des micro-organismes utilisés dans certaines fabrications, détection des séquences provenant d'organismes génétiquement modifiés, détection des agents infectieux dans l'alimentation, l'air ou l'eau) (Guschin *et al*., 1997). Parallèlement aux programmes de séquençage à très haut débit, la technique des puces à ADN est également un outil de choix pour détecter la présence de gènes particuliers et, par conséquent, de discriminer rapidement les fractions conservées des fractions variables du génome chez un grand nombre d'individus. Une telle démarche a récemment permis d'évaluer l'importance du transfert de gènes chez les micro-organismes hyperthermophiles dans leur processus d'adaptation aux habitats à haute température (Johnson et *al*., 2004).

2.2 Analyse fonctionnelle ciblée des populations

2.2.1. Mutagénèse dirigée

Dans les projets d'analyse fonctionnelle, une première approche expérimentale vise à inactiver tous les gènes d'un organisme. Des collections de mutants, chacun porteur d'un gène inactivé, peuvent ainsi être créées. Les analyses phénotypiques menées sur un mutant donné permettront de mettre en évidence ce qui, chez lui, est altéré et d'en déduire la fonction du gène inactivé (génétique inverse). Cette technique a par exemple été utilisée pour identifier des aminotransférases chez *E. coli*. Un auxotrophe de l'isoleucine a été facile à déceler chez *E. coli* car l'Ile ne peut être synthétisée que par la BcaT. Toutefois, cette méthode ne donne pas toujours de résultats, notamment lorsqu'il existe des recouvrements de spécificité des enzymes pour leur substrat. Par exemple, chez *E. coli*, la leucine peut être synthétisée par la BcaT et par l'AraT et les acides aminés aromatiques par l'AraT et l'AspaT. Il faut donc muter deux gènes pour trouver un auxotrophe de ces acides aminés. Un autre problème est qu'après inactivation d'un gène codant pour une certaine aminotransférase, la gamme de substrats des autres aminotransférases est souvent élargie. Ainsi, bien que l'AspaT n'ait pas un rôle

détectable dans la synthèse de la leucine chez *E. coli*, un double mutant BcaT/AraT n'est plus auxotrophe pour la leucine quand l'AspaT est surexprimée. Une seconde stratégie consiste à effectuer une complémentation d'une souche auxotrophe pour certains acides aminés, à l'aide d'une banque génomique, suivie d'un criblage des clones devenus prototrophes. Cette approche a par exemple été utilisée avec succès pour identifier les gènes *araT* de *Citrobacter freundii* (Anazawa *et al*., 1997). Cependant, elle n'aboutit pas toujours à un résultat car le gène recherché peut être interrompu ou ne pas être cloné, ce qui fait qu'un clone ayant le gène fonctionnel n'est pas obtenu.

Une autre démarche consiste à purifier l'enzyme ayant l'activité recherchée, puis de séquencer le N-terminal et des fragments internes pour synthétiser des oligonucléotides dégénérés et ainsi amplifier le gène. Cette méthode, beaucoup plus longue, a permis d'identifier l'AraT de *L. lactis* (Rijnen *et al*., 1999a). Un fragment interne du gène *araT* a d'abord été amplifié à l'aide de deux oligonucléotides dégénérés. Le N- et le C-terminal du gène ainsi que les régions flanquantes ont ensuite été amplifiés en utilisant la technique de PCR inverse, puis le gène séquencé. L'expression du gène a été étudiée en utilisant des gènes rapporteurs, placés sous le contrôle de la région promotrice d'*araT* avec ou sans inactivation d'*araT*. Le mutant négatif a été construit par interruption du gène avec un plasmide contenant un fragment interne du gène pour permettre la recombinaison homologue. Le rôle de l'AraT dans le catabolisme a été évalué par comparaison de la dégradation des acides aminés par le mutant et la souche sauvage, en utilisant des acides aminés marqués ajoutés comme traceurs dans des milieux liquides. Son rôle dans la biosynthèse des acides aminés a été estimé par suivi des croissances du mutant négatif et de la souche sauvage dans des milieux sans un ou plusieurs acides aminés. Le principal avantage de cette approche est de permettre l'identification très précise du gène puisque l'on connaît préalablement la spécificité de l'enzyme correspondante.

Néanmoins, la compréhension des interactions entre micro-organismes est essentielle en écologie microbienne et devient impossible quand on dissocie l'écosystème par l'étude d'isolats. De plus, les informations obtenues sur la régulation des gènes s'avèrent peu fiables car le fait d'étudier les gènes individuellement supprime les relations existant entre l'organisme et son environnement naturel. Ainsi, certains caractères très fortement influencés par les facteurs environnementaux (tels que le milieu de culture sur lequel le micro-organisme s'est développé, la température d'incubation, …), non exprimés lorsque l'organisme est considéré isolément, peuvent potentiellement apparaître à un niveau d'organisation biologique supérieur. Des méthodes ont donc été mises au point par les scientifiques pour quantifier l'expression de plusieurs gènes simultanément. L'analyse des ARN messagers (ARNm) en tant que marqueurs de l'expression des gènes à un instant donné se révèle donc particulièrement intéressante dans l'étude des groupes fonctionnels actifs d'un environnement (Nogales *et al*., 1999 ; Wilson *et al*., 1999 ; Nogales *et al*., 2002). Elle nécessite préalablement l'extraction et la purification de l'ARN total ou des ARNm, suivies d'un contrôle qualitatif et quantitatif de l'ARN avant l'analyse (Bastard et *al.*, 2002). Les paragraphes suivants porteront principalement sur deux types d'approche : l'analyse en série de l'expression des gènes (SAGE) et la technique du *Differential Display* (DD).

2.2.2. SAGE (*Serial Analysis of Gene Expression*)

Cette technique repose sur l'idée qu'une courte séquence de 10 à 14 nucléotides suffit pour constituer une étiquette caractéristique de chacun des ARNm d'une cellule (Velculescu *et al*., 1995). L'ADNc généré après purification des ARNm est ici digéré par une suite d'enzymes de restriction (enzymes d'ancrage puis enzymes d'étiquetage). Les fragments

obtenus sont ensuite concaténés et clonés dans des plasmides en vue du séquençage. L'analyse informatique permet de donner le niveau d'expression de chaque ARNm dans la cellule étudiée par le nombre de fois où chaque étiquette correspondante est détectée. En pratique, un clone contient 30 à 35 étiquettes-SAGE différentes, ce qui allège amplement la tâche de séquençage à accomplir. Cette technique présente aussi l'avantage de permettre la découverte de nouveaux gènes puisque les étiquettes, quel que soit leur mode de génération, sont produites à partir de tous les ARNm produits dans une cellule. Elle demeure cependant exigeante en qualité et en quantité de matériel de base (ARNm). Les gènes faiblement exprimés restent peu accessibles car ils sont représentés par moins de molécules d'ARNm et donc par moins d'étiquettes. De plus, ces étiquettes étant générées à partir des extrémités 3' ou 5' des ADNc, la couverture de la séquence n'est pas forcément complète, notamment dans la partie centrale. Les différents ADNc issus de l'épissage alternatif d'un même ARNm ne sont donc pas toujours différenciés. L'étude de cinétiques ou la comparaison d'échantillons nombreux est quasiment impossible par cette technique puisqu'un nombre très important de séquences doit être obtenu pour chaque point de comparaison.

2.2.3. DD (*Differential Display*) et ses variantes

Inventé en 1992, le *Differential Display* (DD) peut être considéré comme un dérivé des marqueurs RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*) appliqué aux ADNc. La première étape de cette technique consiste à convertir les ARNm des cellules en un premier brin d'ADNc, en utilisant trois amorces oligo-dT individuelles ancrées qui diffèrent les unes des autres par la dernière base en 3' non T (Liang & Pardee, 1992). L'utilisation de ces amorces ancrées rend possible l'initiation homogène de la synthèse d'ADNc au début de la queue poly-A de n'importe quel ARNm. Les trois populations d'ADNc obtenues sont ensuite amplifiées et marquées, soit avec des isotopes, soit avec des fluorochromes par PCR, en présence d'un lot d'amorces courtes (optimales à 13 mers) et de séquences arbitraires. La séquence de ces amorces est prévue pour que statistiquement chacune reconnaisse de 50 à 100 ARNm différents dans les conditions de PCR. Les produits d'amplification (fragments d'ADNc) sont ensuite séparés les uns des autres sur gel de polyacrylamide dénaturant. La comparaison des profils de bandes sur gel permet de visualiser les gènes différentiellement exprimés dans les conditions testées, sans aucun *a priori* sur leur nature. Après excision, clonage et séquençage de ces fragments d'ADNc, il est possible d'identifier les gènes correspondants. Un des attraits de cette méthode est qu'elle n'est pas spécifique d'une espèce (Liang & Pardee, 1992 ; Liang, 2002), ce qui permet de comparer plusieurs populations d'ARN de façon simultanée. Théoriquement, un génome complet peut même être étudié par DD mais cela nécessite des centaines de PCR pour chaque échantillon d'ARN comparé. L'inconvénient majeur de cette méthodologie reste la présence de faux positifs dans les gènes initialement identifiés, mais un certain nombre d'améliorations, de mises au point et de conseils permettent d'utiliser cette technique avec succès (Zhao *et al*., 1995 ; Liang, 1998).

Plusieurs autres méthodes très proches conceptuellement du DD existent, comme l'*Arbitrarily Primed*-PCR (AP-PCR) (Navarro & Jorcano, 1999) et la *Selective Amplification via Biotin and Restriction-mediated Enrichment* (SABRE) (Lavery *et al*., 1997). Ces techniques n'ont été que peu utilisées dans l'étude de l'expression génique en comparaison du DD. D'autres utilisent en plus des enzymes de restriction pour effectuer une subdivision des ARNm, comme la *Restriction Fragment Length Polymorphism*-DD (RFLP-DD). Cette méthode et les autres techniques dérivées *Genecalling* (Green *et al*., 2001), *Total Gene Expression Analysis* (TOGA) (Sutcliffe *et al*., 2000), *Restriction Enzyme Analysis of Differentially Expressed Sequences* (READS) (Prashar & Weissman, 1996) présentent le

désavantage par rapport au DD de nécessiter plus d'étapes de manipulation, augmentant les risques d'artéfacts. A ce jour, on ne possède que peu de recul sur leur utilité.

2.3 Analyse fonctionnelle globale des génomes microbiens

Grâce à l'avancée rapide du séquençage à haut débit (les séquences des premiers organismes, dont la bactérie *Haemophilus influenzae* (Fleischmann *et al*., 1995) et la levure *S. cerevisiae* (Goffeau *et al*., 1996), ne datent que de dix ans), les génomes complets de plus de 300 micro-organismes ont été entièrement décodés et plus d'une centaine de génomes microbiens sont actuellement en cours de séquençage. Les scientifiques ont désormais accès à un nombre considérable de gènes dont les fonctions demeurent inexpliquées. L'approche *génomique fonctionnelle* vise à exploiter cette base de connaissances afin de relier le génome aux diverses fonctions des cellules et des organismes. Cette discipline met en œuvre des compétences aussi diverses que la bio-informatique, la génétique, la physiologie et la biochimie.

2.3.1. Bio-informatique et génomique

En premier lieu, il est possible d'approcher la fonction des gènes par le biais de programmes informatiques. Le principe général de l'analyse est le suivant : une fois le génome séquencé, des ORFs (*Open Reading Frames*) et différentes séquences laissant croire à la présence d'un gène sont recherchés afin d'identifier des gènes dits *putatifs*. Cette première partie de l'annotation faite, des alignements de séquences sont réalisés sur des bases de données de manière à associer une fonction possible aux différents gènes putatifs isolés. Différents algorithmes existent, l'algorithme BLAST (*Basic Local Alignement Search Tool*) (Altschul *et al*., 1990) étant majoritairement utilisé. Il se décline en plusieurs programmes qui permettent de réaliser les recherches d'homologies avec des séquences nucléotidiques (BLASTN), des séquences protéiques (BLASTP), mais aussi de lancer une recherche sur une banque protéique en utilisant la traduction dans les six cadres de lecture d'une séquence nucléotidique (BLASTX). Les résultats de recherche sont évalués par un score et par un indice de probabilité : l'*expected value* (*E-value*). Cet indice indique la probabilité de trouver une séquence présentant les mêmes homologies en tenant compte de la taille de la banque dans laquelle la recherche a été effectuée. Plus le nombre de génomes entièrement séquencés augmente, plus ce type d'approche *in silico* se généralise.

A titre d'exemple, l'analyse comparée des génomes de *K. lactis*, *D. hansenii*, *Y. lipolytica* et *Candida glabrata* (Dujon *et al*., 2004) a permis de mettre en évidence des différences subtiles entre les espèces et, notamment, d'expliquer ce qui différencie la physiologie de *K. lactis* de celle de *S. cerevisiae* (Bolotin-Fukuhara *et al*., 2005). Ainsi, la majorité des gènes impliqués dans l'anaérobiose chez *S. cerevisiae* n'ont pas d'homologues chez *K. lactis* et *Y. lipolytica*, deux espèces strictement aérobies (Bolotin-Fukuhara *et al*., 2005). La présence ou l'absence de certains gènes chez *K. lactis* pourraient être étroitement corrélée à la différence de physiologie entre levure aérobie stricte et levure aérobie facultative. Par exemple, chez *S. cerevisiae*, des gènes existent sous plusieurs isoformes et sont exprimés suivant les conditions (aérobiose ou anaérobiose). Seules les formes impliquées en aérobiose ont un homologue chez *K. lactis*. De même, les gènes de la glycolyse et ceux impliqués dans le stockage des réserves ont tendance à être moins redondants chez *K. lactis* que chez *S. cerevisiae* (Bolotin-Fukuhara *et al*., 2005), ce qui coïncide avec ce que l'on connaît de sa physiologie.

De manière générale, ce type d'analyse informatique conduit à une meilleure évaluation de la biodiversité génétique et à une meilleure compréhension des processus impliqués dans la régulation des gènes, la génétique, la phylogénie, la physiologie et le métabolisme des micro-organismes. Toutefois, malgré cet effort, encore peu de séquences précisément annotées (fonction précise) sont disponibles. De plus, aucune information relative à leur profil d'expression ou encore à la spécificité liée aux conditions de culture ne complète ces séquences. L'existence de gènes paralogues, dont les fonctions peuvent être identiques ou différentes, est également un problème récurrent dans les projets d'analyse fonctionnelle des génomes. Il faut donc rappeler que ce type d'approche n'est qu'une prédiction qui doit être confirmée par des études *in vitro* pour être considérée comme un réel résultat.

2.3.2. Transcriptomique

Pour répondre à ces questions de *génomique fonctionnelle*, la technologie aujourd'hui la plus utilisée est celle des puces à ADN. Elle permet de quantifier simultanément l'expression de l'ensemble des gènes d'une cellule ou d'un groupement microbien et, par conséquent, d'avoir accès à un nombre considérable de gènes dont les fonctions et les interactions dans les cellules et les organismes qui les portent demeuraient jusqu'à présent inexpliquées. Cette définition moléculaire précise d'une cellule à un moment donné est appelée *transcriptome*. Il existe plusieurs transcriptomes possibles pour une même cellule au cours de son évolution et selon l'environnement dans lequel elle évolue.

D'abord conçues sur des membranes poreuses de nylon (appelées *macroarrays* par opposition aux *microarrays*), les puces à ADN ont progressivement été mises au point sur des lames de verre. La miniaturisation, rendue possible par l'utilisation d'un support solide, de marqueurs fluorescents et par les progrès de la robotique, permet aujourd'hui de fabriquer des puces comportant une très haute densité de spots, susceptibles de recouvrir l'intégralité d'un génome d'un organisme sur une simple lame de microscope. Plusieurs types de puces sont actuellement disponibles (**Tableau 6**). Elles diffèrent par leur mode de fabrication, par la densité des spots, par la forme de l'ADN que l'on y fixe (simple ou double brin) et par les méthodes d'hybridation.

2.3.2.1. Les filtres à haute densité

La technologie des *macroarrays* (Martin *et al*., 1998) consiste à déposer sur des membranes de nylon des produits de PCR. Les membranes sont ensuite hybridées avec des cibles radioactives marquées au ^{33}P. En génomique comparée, ces cibles sont des ADN géniques, tandis qu'en transcriptomique, ces cibles sont des ADNc (synthétisés à partir d'ARN extraits de cellules, tissus ou organismes entiers). Le support nylon possède de très bonnes propriétés pour la fixation des sondes mais la surface ne permet pas un dépôt à très forte densité. Cette technologie est encore couramment utilisée et reste très performante (Cao *et al*., 2002). Des membranes du type *High Density Colony Array* (HDCA) ont toutefois été développées et utilisées par Chen *et al*. (2003). Cette technique est basée sur le dépôt direct de colonies bactériennes contenant comme insert les fragments issus des banques à cribler. En plus du moindre coût engendré par l'absence de purification des ADNc déposés, cette stratégie a l'avantage d'être d'une grande simplicité de mise en oeuvre. En effet, les colonies bactériennes agencées en plaques sont directement déposées sur les membranes à l'aide d'un robot de dépôt. Les membranes sont ensuite incubées à la température optimale de croissance des colonies. Les cellules sont alors lysées et les acides nucléiques sont fixés à la membrane à l'aide de rayons UV. Le marquage utilisé est de type radioactif. Cette technique a pour défaut

le manque d'uniformité de la quantité d'insert déposé sur les membranes, ce qui engendre des problèmes d'analyse relative d'expression. Sa simplicité de mise en place et son faible coût en font une technique bien adaptée pour réaliser un criblage sans *a priori*.

2.3.2.2. Les puces spottées

Un *microarray* permet de détecter l'expression simultanée de quelques centaines à plusieurs milliers de gènes en une seule étape d'hybridation. La technologie consiste à déposer sur des lames de verre des produits PCR ou des oligonucléotides longs (50 à 70 mers), représentatifs de chacun des gènes que l'on souhaite étudier (Schena *et al*., 1995 ; Ramsay, 1998 ; Rockett & Dix, 2000). Pour l'ensemble des puces spottées qui sont classiquement utilisées, l'étude du niveau d'expression des gènes est basée sur la détermination des variations de niveau d'expression d'un organisme dans deux conditions différentes. Il s'agit donc d'une mesure différentielle de l'expression des gènes. En pratique, pour réaliser cette mesure, les cibles constituant deux échantillons d'étude sont couplées à deux fluorochromes différents (**Figure 8**). Les plus couramment utilisés appartiennent à la famille des cyanines, Cy3 (vert) et Cy5 (rouge) (**Figure 9**). Les cibles marquées sont ensuite mélangées et hybridées en même temps sur la puce. Après hybridation, l'expression d'un gène dans une situation donnée est donc en corrélation directe avec la quantité de marqueur présent sur le *spot* correspondant. Après lavage du matériel fixé de manière non spécifique, la puce est lue à l'aide d'un scanner, ce qui permet de quantifier le signal au niveau de chaque sonde. La détection ou non d'un *spot* au niveau de chaque sonde indique la présence ou l'absence de l'ARNm correspondant dans la population d'ARNm fixée. De plus, la couleur des *spots* présents (rouge, vert ou un mélange des deux) indique la population d'origine de l'ARNm fixé (**Figure 10**). L'intensité de ces *spots* révèle également la quantité d'ARNm fixé. Il s'en suit des étapes d'extraction de données, de normalisation, puis une analyse statistique des données (Quackenbush, 2001 ; Didier *et al*., 2002 ; Draghici, 2002 ; Pan, 2002 ; Troyanskaya *et al*., 2002 ; Carpentier *et al*., 2004). C'est à ce niveau que l'on peut déterminer les gènes différentiellement exprimés entre les deux populations.

2.3.2.3. Les puces à oligonucléotides

L'utilisation de puces à oligonucléotides de type *Affymetrix* (Fodor *et al*., 1991), *Nimblegen* (Nuwaysir *et al*., 2002), *Agilent* (Kronick, 2004), permet, en théorie, de quantifier l'abondance absolue de chaque ARNm transcrit. Les ARNm de l'échantillon à analyser sont amplifiés, fragmentés et marqués par un système de couplage biotine-streptavidine pour l'hybridation sur la puce. Chaque gène est donc représenté sur la puce par une série de dix à vingt sondes réparties sur toute la séquence du gène. A chacune de ces sondes PM (*Perfect Match*) est associée une sonde MM (*MisMatch*) dont la séquence est identique à la séquence des sondes PM, excepté une mutation ponctuelle située en position centrale. Cette sonde MM permet de quantifier la part du signal aspécifique (bruit de fond) associé à la sonde PM. Le calcul du niveau d'expression d'un gène est relativement complexe, mais peut être considéré, en première approximation, comme une moyenne pondérée des différences (PM-MM) de chaque paire de sondes associées à ce gène (Chudin *et al*., 2002). Basés sur ce principe, des chercheurs essayent actuellement de concevoir une puce universelle contenant des sondes qui représentent l'ensemble des combinaisons possibles de séquences d'ADN. Le problème majeur est de définir la taille optimale des sondes. Un modèle a été réalisé pour concevoir une puce dédiée à la fois à la Souris et à la levure (van Dam & Quake, 2002). Une première puce universelle appelée *UMAS* (*Universal Micro-Array System*) a même vu le jour. Elle contient pour sondes toutes les combinaisons possibles d'hexamères et son utilisation combinée avec

une étape enzymatique de fractionnement des cibles permettrait de générer des profils d'expression pour n'importe quel organisme (Roth *et al.*, 2004).

Le champ d'application des puces à ADN est très vaste. Actuellement, l'utilisation la plus courante concerne la quantification des ARN messagers d'un échantillon (transcriptome) afin de comparer les profils de transcription de deux échantillons obtenus dans des conditions de croissance différentes. Les puces à ADN permettent également une évaluation quantitative de l'expression ou de la présence des gènes fonctionnels d'une communauté microbienne, car une corrélation linéaire existe entre la quantité de gènes présents dans un échantillon et le signal détecté (Wu *et al*., 2001 ; Cho & Tiedje, 2002 ; Denef *et al*., 2003). Concrètement, cet outil constitue un réel moyen de comprendre la structure et la composition de communautés microbiennes, ainsi que leurs réponses et adaptations à des changements environnementaux (Guschin *et al*., 1997 ; Wu *et al*., 2001 ; Loy *et al*., 2002). Parallèlement, l'amélioration des techniques de dépôt et le séquençage complet de génomes procaryotes et eucaryotes ont amené à concevoir des puces sur lesquelles tout le génome est retrouvé. La levure est un des premiers organismes dont tout le transcriptome a été étudié en une seule expérience (Lee *et al*., 2002 ; Lyne *et al*., 2003). On trouve aussi des plantes telle que *Arabidopsis* (Zhu, 2003), des bactéries (Salama *et al*., 2000) ou encore l'embryon de Drosophile (Stathopoulos *et al*., 2002). Toutes ces analyses ont mis en évidence des variations ponctuelles d'expression des gènes, mais ont également permis de dévoiler des liens dans les régulations entre gènes, comme par exemple tous les gènes impliqués dans la réponse à un stimulus donné (Butte *et al*., 2000 ; Lee *et al*., 2002). Cette nouvelle approche globale de la génétique n'est possible qu'avec l'aide de logiciels sophistiqués (Eisen *et al*., 1998).

PRESENTATION DE L'ETUDE

Contexte biologique…

Comme nous l'avons vu, les fromages sont des écosystèmes complexes où cohabitent des bactéries, des levures et des moisissures. Les bactéries lactiques interviennent très tôt dans la transformation du lait en fromage, en contribuant à l'acidification et à la coagulation du lait. Puis, les levures, en métabolisant l'acide lactique produit par les bactéries lactiques, provoquent une remontée du pH qui favorise la croissance des bactéries d'affinage. Les moisissures interviennent plus tardivement dans l'affinage. Tout au long de la fabrication et de l'affinage, par une multitude d'activités enzymatiques, bactéries, levures et moisissures interagissent donc entre elles, avec les constituants du lait, puis du fromage. Les propriétés sensorielles (texture, saveur, odeur et arôme) du fromage obtenu résultent donc d'un équilibre entre les différentes populations microbiennes, à la fois complexe et variable selon le processus technologique, et sans cesse en évolution en cours de fabrication et d'affinage.

Contexte méthodologique…

Identifier le rôle et la contribution exacts de chaque flore au sein de l'écosystème fromager a déjà fait l'objet de nombreux travaux, mais les modes d'investigation sont restés trop souvent descriptifs par manque d'outils moléculaires. En effet, jusqu'à fin 2003, l'étude des mécanismes biologiques mis en oeuvre au sein de l'écosystème fromager n'était possible qu'à travers des dosages biochimiques et enzymatiques. Ces dosages ne permettaient cependant pas de distinguer les activités propres à chaque micro-organisme, ni d'attribuer à chaque activité clef le ou les gènes responsables et spécifiques à chaque micro-organisme. Lorsque mon projet de thèse a débuté, le génome de *Brevibacterium linens* était disponible à l'US Department of Energy Joint Genome Institute (JGI : http://www.jgi.doe.gov/), et le séquençage des génomes de *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces lactis* et *Yarrowia lipolytica* venait d'être effectué dans le cadre du projet Genomic Exploration of the Hemiascomycete Yeasts (2001-2004) (*Génolevures* : http://cbi.labri.fr/Genolevures). L'accessibilité à ces données de séquences (alors en cours d'annotation) m'a permis d'envisager la mise au point d'un outil moléculaire, permettant de mesurer l'expression des gènes chez ces quatre micro-organismes simultanément, et dans diverses conditions. L'objectif principal de cette étude était d'élucider les voies métaboliques impliquées dans la désacidification et la production de composés soufrés chez trois levures (*Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces marxianus* et *Yarrowia lipolytica*) et une bactérie de surface (*Brevibacterium linens*) au cours de l'affinage. A terme, une meilleure connaissance de tels phénomènes est déterminante pour la maîtrise du processus d'affinage dans son ensemble et de la formulation microbienne en particulier.

RESULTATS ET DISCUSSION

1.

Construction d'un *microarray* « multi-espèces »

Comme pour toute expérience scientifique, lorsque l'on conduit un projet d'analyse du transcriptome, il est important d'établir rigoureusement les conditions de l'étude biologique que l'on souhaite réaliser afin d'obtenir des résultats significatifs. Certains aspects spécifiques à la construction du *microarray* « multi-espèces » me sont apparus cruciaux et sont décrits ci-dessous.

1.1. Choix des activités cibles

La technique des puces à ADN a fait ses preuves pour décrire divers écosystèmes microbiens (***Revue bibliographique***, **§ 2.1.2.4.**), mais n'a jamais été appliquée à l'étude des flores d'affinage. Compte tenu de notre problématique, mes travaux ont d'abord porté sur la recherche d'un certain nombre d'activités cibles pouvant être impliquées dans la désacidification (*via* le catabolisme du lactate) ou dans la production d'arômes soufrés (*via* le catabolisme de la L-méthionine) chez quatre micro-organismes d'affinage. Pour ce faire, les cartes métaboliques de référence disponibles dans la base de données Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG : http://www.genome.ad.jp/kegg/pathway.html) ont été utilisées (**Figures 11 et 12**), puis complétées à partir des données bibliographiques. A titre d'exemple, les lactate déshydrogénases (EC1.1.2.3/4 ; EC1.1.1.27/28) et les pyruvate déshydrogénases (EC1.2.2.2 ; EC1.2.1.51 ; EC1.2.4.1) ont été retenues pour l'étude du catabolisme du lactate ; les aminotransférases (EC2.6.1.57/42), les cystathionine lyases (EC4.4.1.1/8), les cystathionine synthases (EC2.5.1.48 ; EC4.2.1.22) et la méthionine γ-lyase (EC4.4.1.11) ont été ciblées pour l'étude du catabolisme de la L-méthionine.

1.2. Analyse *in silico* des quatre génomes

Les ORFs (*Open Reading Frames*) et différentes séquences laissant croire à la présence d'un gène impliqué dans le catabolisme du lactate et/ou de la L-méthionine ont été recherchés dans chacun des quatre génomes (*D. hansenii* CBS767, *K. lactis* CLIB210, *Y. lipolytica* CLIB122 et *B. linens* BL2), par homologies de séquence avec les génomes de la levure *Saccharomyces cerevisiae* et de la bactérie lactique *Lactococcus lactis*. Pour procéder aux multiples alignements de séquences, les logiciels BLASTN (séquence nucléique contre base nucléique) et BLASTP (séquence protéique contre base protéique) (Altschul *et al.*, 1990 ; Altschul *et al.*, 1997) ont été utilisés. Ils sont disponibles sur le site de téléchargement du National Center for Biotechnology Information (NCBI : ftp://ftp.ncbi.nih.gov/*BLAST*/executables/).

1.3. Construction du *microarray* « multi-espèces »

En ce qui concerne la terminologie associée à la technique des puces à ADN, il est important de rappeler que les puces ne sont qu'un *Northern blotting* inversé, où la sonde est fixe alors que la cible marquée est en solution. Cependant cette différence est à l'origine d'une confusion entre les termes « cible » (*probe*) et « sonde » (*target*). Une nomenclature a donc été recommandée (Phimister, 1999) : les « sondes » correspondent aux acides nucléiques fixés sur la puce, alors que les « cibles » représentent l'ensemble des acides nucléiques libres étudiés.

Pour la construction du *microarray* « multi-espèces », l'utilisation de sondes oligonucléotidiques (58-70 mers) a été préférée à celle de sondes d'ADNc fabriquées à partir de produits de PCR. En effet, en ce qui concerne la spécificité du signal, l'utilisation de sondes oligonucléotidiques offre la possibilité de choisir :

- ✓ une région spécifique pour chacun des transcrits
  (⇨ limite l'apparition d'hybridations croisées entre les différentes espèces),
- ✓ des régions dépourvues de séquences répétées (ex. GGG, CCC)
  (⇨ réduit les risques d'hybridation aspécifique),
- ✓ des sondes possédant un même profil thermodynamique (ex. même *Tm*)
  (⇨ permet de définir la température de la réaction d'hybridation),
- ✓ et de vérifier l'absence de structures secondaires stables sur la sonde (ex. formation d'homodimères ou d'épingles à cheveux) qui gêneraient la réaction d'hybridation.

Sur la base de ces critères, 125 sondes d'intérêt ont été déterminées à l'aide du logiciel ROSO (Recherche et Optimisation de Sondes Oligonucléotidiques) (Reymond *et al.*, 2004). Ce logiciel possède une interface Web permettant son utilisation en ligne (http://pbil.univ-lyon1.fr/roso).

Afin d'évaluer la qualité du *microarray* et des résultats d'hybridations obtenus, il a également été nécessaire d'ajouter des sondes dites « témoins » sur la puce. L'idéal aurait été de connaître un ensemble de gènes invariants à l'intérieur même des échantillons étudiés. Les « gènes de ménage » (*housekeeping genes*), dont l'expression est supposée constante dans tous les types cellulaires et conditions physiologiques, sont fréquemment utilisés comme « témoins positifs ». Cette approche requiert un grand nombre de gènes de ce type, présentant un niveau d'expression constant, d'intensité moyenne à élevée, parmi une large gamme de conditions. Or, de tels gènes sont difficiles à sélectionner pour des micro-organismes encore peu étudiés (au niveau transcriptionnel) comme les nôtres. De plus, des études décrivent des variations parfois importantes de l'expression de ces gènes dits pourtant « de ménage » (van De Peppel *et al.*, 2003). Pour contourner cette difficulté, 6 sondes commerciales d'*Arabidopsis thaliana* (SpotReport® Oligo Array Validation System, Stratagen) ont été intégrées sur les puces ; les transcrits correspondant à ces témoins positifs (Stratagen) étant ajoutés à nos échantillons avant la réaction de marquage (**Fiche technique 08**).

1.4. Plan de dépôt

La définition du plan de dépôt des sondes constitue un des aspects critiques de la conception des puces à ADN. La répartition des plots sur la lame peut en effet avoir un impact important sur l'étape d'analyse des résultats (Yang *et al.*, 2002). Dans l'idéal, chaque lame devrait posséder un plan unique et aléatoire de dépôt. Cependant, les contraintes liées à l'utilisation de robots et la logistique de reconnaissance des plots rendent impossible ce type de distribution aléatoire. De plus, en ce qui concerne notre puce multi-espèces, les contraintes liées au stockage des oligonucléotides ne nous ont pas permis une répartition aléatoire des plots sur la puce. A chaque espèce correspond donc un « secteur » de dépôt. Chaque gène fait l'objet de deux dépôts (deux spots voisins sur la lame ou *duplicata*). Le spotting a été réalisé à la plate-forme Biopuces localisée à l'INSA de Toulouse (http://genopole.toulouse.inra.fr), sur une centaine de lames Corning UltraGAPS Coated Slides (Gamma Amino Propyl Silane surface; Corning Life Sciences).

Le *microarray* « multi-espèces » développé au cours de ce travail contient :

125 sondes d'intérêt (**30** pour *D. hansenii*, **29** pour *K. lactis/K. marxianus*, **27** pour *Y. lipolytica* et **39** pour *B. linens*) et **6** sondes « témoins » d'*A. thaliana*.

Les chapitres suivants présentent, sous forme de publications scientifiques, la méthodologie et les résultats discutés de l'analyse transcriptomique du catabolisme de la L-méthionine chez *B. linens* [**Article 1**] et chez *Y. lipolytica* [**Article 2**]. Un autre volet a porté sur le suivi de l'expression des gènes de *D. hansenii*, *K. marxianus* et *Y. lipolytica* cultivées, séparément ou en association, dans un milieu synthétique mimant la composition d'un caillé fromager en début d'affinage [**Article 3**]. Dans la dernière partie, sont présentés les résultats préliminaires obtenus sur fromages modèles. Enfin, des perspectives sont proposées conjointement à la conclusion générale.

2.

Analyse transcriptomique du catabolisme de la L-méthionine chez la bactérie d'affinage *Brevibacterium linens* ATCC9175*.

Brevibacterium linens est une bactérie de surface importante dans l'industrie fromagère. En particulier, cette bactérie est capable de produire des composés soufrés volatils comme le méthanethiol, le disulfure de diméthyle (DMDS) ou le trisulfure de diméthyle (DMTS) (Rattray & Fox, 1999 ; Arfi *et al*., 2003). Le gène codant pour une enzyme de type L-méthionine γ-lyase a récemment été identifié (*mgl* ; Amárita *et al*., 2004), mais aucun travail au niveau transcriptionnel n'a toutefois été effectué pour compléter cette étude. Nous avons donc choisi d'étudier les voies métaboliques impliquées dans la genèse des composés soufrés volatils chez cette bactérie à l'aide de notre puce multi-espèces. La souche *B. linens* ATCC9175 qui a fait l'objet de cette étude a été cultivée en Erlenmeyer, dans un milieu synthétique riche en lactate et supplémenté ou non en L-méthionine (milieu synthétique A ; **Fiche technique 03**). Pour chaque condition de culture, des prélèvements ont été réalisés en fin de phase exponentielle (72 h). Les ARNm ont été extraits et les ADNc synthétisés et marqués par incorporation de dCTP-Cy3 (**Fiches techniques 06** / **08** / **09**). La variabilité introduite par des facteurs non maîtrisés (biais éventuels qui peuvent être introduits par une variabilité biologique et/ou technique) a été estimée en répétant l'ensemble des expériences, cultures comprises, à deux jours différents. Le plan d'expérience est résumé sur la **figure 13**. Parallèlement à l'étude transcriptomique, les cinétiques de croissance et l'évolution du pH ont été suivies au cours du temps. Des analyses biochimiques (notamment la consommation de L-méthionine et la production de composés soufrés volatils) et enzymatiques (dosage de la L-lactate déshydrogénase) ont été réalisées, permettant ainsi de formuler des hypothèses quant à la régulation des gènes impliqués dans le catabolisme de la L-méthionine et/ou du lactate chez *B. linens*.

Cette étude a fait l'objet d'un article :

Cholet, O., Hénaut, A. & Bonnarme, P. (2007). Transcriptional analysis of L-methionine catabolism in *Brevibacterium linens* ATCC9175. *Applied Microbiology and Biotechnology*. [**Article 1**]

* avant que l'espèce *Brevibacterium aurantiacum* ne soit décrite par Gavrish *et al.* (2004), la souche de référence ATCC9175 était identifiée comme appartenant à l'espèce *Brevibacterium linens*. Nous avons choisi de conserver la dénomination « *Brevibacterium linens* ATCC9175 » par simplicité de langage.

Appl Microbiol Biotechnol
DOI 10.1007/s00253-006-0772-0

Article 1

GENOMICS AND PROTEOMICS

Transcriptional analysis of L-methionine catabolism in *Brevibacterium linens* ATCC9175

Orianne Cholet · Alain Hénaut · Pascal Bonnarme

Received: 4 September 2006 / Revised: 17 November 2006 / Accepted: 17 November 2006
© Springer-Verlag 2007

Abstract The expression of genes possibly involved in L-methionine and lactate catabolic pathways were performed in *Brevibacterium linens* (ATCC9175) in the presence or absence of added L-methionine. The expression of 27 genes of 39 selected genes differed significantly in L-methionine-enriched cultures. The expression of the gene encoding L-methionine γ-lyase (MGL) is high in L-methionine-enriched cultures and is accompanied by a dramatic increase in volatile sulfur compounds (VSC) biosynthesis. Several genes encoding α-ketoacid dehydrogenase and one gene encoding an acetolactate synthase were also up-regulated by L-methionine, and are probably involved in the catabolism of α-ketobutyrate, the primary degradation product of L-methionine to methanethiol. Gene expression profiles together with biochemical data were used to propose catabolic pathways for L-methionine in *B. linens* and their possible regulation by L-methionine.

Keywords Gene expression · Microarray · L-methionine · *Brevibacterium linens*

Introduction

The coryneform bacterium *Brevibacterium linens* is a surface microorganism that is present in the smear of most surface-ripened cheeses. Enzymatic potential and biochemical characteristics of this widely distributed bacterium makes it of great importance in the ripening and the development of final characteristics and quality of smear surface ripened cheese (Rattray and Fox 1999). Furthermore, coryneform bacteria such as *B. linens*, are ubiquitous in cheese-ripening microbial consortia (Mounier et al. 2006), and often represent the majority of the isolates from red-smear soft cheeses (Maoz et al. 2003) such as Limburger, Livarot, Pont L'Evêque, and Epoisses.

Among the major steps of smear cheeses ripening, (1) lactate [resulting from lactose conversion by lactic acid bacteria (LAB)] consumption and (2) sulfur aroma compounds biosynthesis from L-methionine catabolism, are of major importance. Surface cheese-ripening bacteria such as *B. linens* appear in the late stages of ripening after lactose has been converted to lactate by LAB and/or degraded by cheese-ripening yeasts (Leclercq-Perlat et al. 2000; McSweeney 2004). During the ripening process, amino acids like L-methionine are gradually released due to the hydrolysis of the casein matrix of the curd by LAB and yeasts. In the case of *B. linens*, it is to be expected that the release of L-methionine—and its subsequent consumption—not only affects sulfur aroma compounds but also lactate consumption which is used for its growth (Ferchichi 1984; Ferchichi et al. 1986). Indeed, lactate is the major carbohydrate source found in the cheese curd and is efficiently catabolized by *B. linens* (Ferchichi 1984). When it develops at the surface of the cheese, this microorganism gives a strong sulfurous aroma which essentially results from the one-step degradation of L-methionine to methanethiol (MTL) by a L-methionine γ-lyase (MGL). This latter enzyme has recently been evidenced in *B. linens* (Amarita et al. 2004; Dias and Weimer 1998; Weimer et al. 1999). MTL is, in turn, used as a common precursor for a wide

O. Cholet · P. Bonnarme (✉)
Institut National de la Recherche Agronomique,
UMR Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires,
CBAI, 78850 Thiverval-Grignon, France
e-mail: bonnarme@grignon.inra.fr

A. Hénaut
Laboratoire Génome et Informatique, UMR 8116,
Tour Evry 2,
91034 Evry, France

variety of volatile sulfur compounds (VSC) found in cheese (Arfi et al. 2006). An alternative degradation pathway, called transamination, for L-methionine conversion to VSCs also exists in LAB but produces only limited amounts of MTL (Bonnarme et al. 2004; Rijnen et al. 2003). Furthermore, this pathway initiated by an aminotransferase does not seem to be active in *B. linens* because the transamination product of L-methionine was not identified in this bacterium (Arfi et al. 2006).

Due to recent availability of the genome sequence of *B. linens* (US Department of Energy Joint Genome Institute) together with our knowledge of *B. linens* metabolism, we identified genes possibly involved in (1) L-methionine degradation pathways and in (2) lactate catabolism in the type strain *B. linens* ATCC9175. A DNA microarray was designed comprising 39 candidate genes. In this paper, transcriptional alterations of this bacterium in response to L-methionine supplementation are reported in relation with biochemical data.

Materials and methods

Culture conditions

B. linens ATCC9175 was precultured by inoculating a single colony in 20 ml of synthetic cheese medium in 100-ml Erlenmeyer flasks for 48 h at 25°C under agitation (150 rpm). Synthetic cheese medium is composed (per liter of distilled water) of 2 g yeast extract (Gibco, Heidelberg, Germany), 30 ml of a 60% sodium lactate stock solution (Prolabo, Fontenay-sous-Bois, France), 0.1 g $CaCl_2$ (Prolabo), 6.8 g KH_2PO_4 (Sigma–Aldrich, St-Quentin Fallavier, France), 20 g NaCl (Prolabo). After adjusting the pH to 7.0±0.1, the medium was autoclaved (120°C, 20 min). When necessary, 6.7 mM of L-methionine (Sigma–Aldrich) was added to the culture medium before inoculation. This L-methionine concentration was chosen because it corresponds to the maximum amount of free L-methionine present in the curd of a soft cheese-like Camembert. One milliliter of this cell suspension was then used to inoculate (1% *v*/*v*) 100 ml of synthetic cheese medium in 500-ml Erlenmeyer flasks. Cultures were incubated for at least 96 h using the same conditions described above.

Microbial analysis

Viable cell counts, expressed as colony-forming units (cfu ml^{-1}), were determined following a standard aerobic plate count procedure on Brain Heart Agar medium (Biokar Diagnostics, BK029, Paris, France). Surface inoculation was carried out by a spiral plater (Interscience, Saint-Nom-La-Bretèche, France) on Petri dishes to detect any microbial contamination. The plates were incubated at 25°C for at least 7 days and 30–300 colonies were counted. In parallel, the optical density of the cultures at 600 nm was measured using a Beckman DU640B spectrophotometer (Beckman Coulter, Fullerton, California).

Sequence analysis

The genome sequence of *B. linens* was obtained from US Department of Energy Joint Genome Institute. BLAST (Altschul et al. 1997) was used to screen sequence databases for homology to ensure that potential genes of interest in *B. linens* were present on the microarray. We also performed BLASTN against others 38 actinobacteria genomes available at the NCBI web site (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/genom_table.cgi) to obtain a complementary annotation support for the genomic sequences of *B. linens*.

Oligonucleotides design and printing

Long oligonucleotidic probes were designed using the ROSO software (http://www.pbil.univ-lyon1.fr/roso/Home.php). They were synthesized by Qiagen Operon (Qiagen Operon, Alameda, USA). Printing onto Corning Ultra-GAPS Coated Slides (Gamma Amino Propyl Silane surface; Corning Life Sciences, NY, USA) was performed at the Transcriptome-Biochips Platform in Toulouse (http://www.genopole.toulouse.inra.fr) using a spotter (VersArray ChipWriter Pro; Bio-Rad) with 12 pins (SMP3; Telechem International, Sunnyvale, CA, USA) in a 3×4 format. After printing, DNA elements were cross-linked to the slides by UV irradiation (Stratalinker UV Crosslinker; Stratagene) and stored in a vacuum chamber until use.

Extraction and purification of total RNA

All solutions were prepared with 0.1% diethylpyrocarbonate (DEPC; Sigma–Aldrich)-treated water and autoclaved at 121°C for 20 min. Plastic ware, surface, and pipettors were decontaminated by using RNase AWAY® (Molecular Bio-Products, California, USA).

Sample preparation After 72 h of incubation, cells were centrifuged for 5 min at 8,200×*g* and 4°C. The pellets were washed with Tris–EDTA buffer (TE 1×; 10 mM Tris–HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0; Sigma–Aldrich) and then resuspended in 150 µl of 10% *N*-lauroylsarcosine (Sigma–Aldrich) and 1 ml of RNeasy Lysis Buffer (RLT buffer; Qiagen, Hilden, Germany)-β-mercaptoethanol (Sigma–Aldrich) (1:0.01). The suspension was vortex mixed for approximately 3 min, poured in sterile 2 ml Eppendorf tubes (each aliquot containing 800 µl of suspension), and then stored at −80°C or used for the extraction.

Total RNA isolation For the RNA extraction, 200 mg of zirconium beads (diameter, 0.1 mm; BioSpec Products, Bartlesville, OK, USA) and 800 µl of RLT-β-mercaptoethanol were added into an aliquot. The mixture was shaken in a FastPrep FP120 bead beating system (Bio101, Vista, CA, USA) for 30 s at a machine speed setting of 6.0 m s^{-1}. Samples were cooled down on ice for 1 min and the shaking procedure was repeated a second time. Phase separation was carried out after a centrifugation for 5 min at 1,700×*g* and 4°C. The aqueous phase was transferred to a fresh tube and an equal volume of 70% ethanol was added after which the extraction was performed with the RNeasy® Midi kit (Qiagen), according to manufacturer's instructions. Total RNA was eluted directly from the RNeasy silica-gel membrane in 500 µl of DEPC-treated water and immediately precipitated by addition of 50 µl of 3 M sodium acetate and 400 µl of absolute isopropanol (4°C). Tubes were mixed by inversion and placed at −20°C for at least 2 h. The RNA was collected by centrifugation (30 min, 20,800×*g*, 4°C) and the pellets were washed twice with 250 µl of cold 70% ethanol, dried for 30 min at room temperature and resuspended in 50 µl of TE ×1. Samples were then hydrated overnight at 4°C after addition of 0.5 µl (20 U) of RNase Inhibitor (RNasin; Promega, Madison, WI, USA). The RNA integrity was visualized by an electrophoresis at 6 V cm^{-1} in a 1% agarose gel, which was stained by 0.3 µg ml^{-1} ethidium bromide (Sigma–Aldrich) and photographed under UV light. Quantity and purity were assessed by measurement of the A_{260}:A_{230} and A_{260}:A_{280} ratios using a spectrophotometer (Beckman DU640B; Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA).

Labeling of cDNA targets

For all analyses, total RNA was fluorescently labeled with the CyScribe™ First-Strand cDNA Labeling kit (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA), without any amplification, using both anchored oligo(dT) and random nonamers priming methods together. Reverse transcription labeling reactions were performed at 42°C for 1.5 h in a thermocycler (GeneAmp PCR System 9700; Perkin-Elmer Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), by direct incorporation of dCTP-Cy3 (Amersham Biosciences) according to the manufacturer's instructions. RNA template and unincorporated fluorescent nucleotides were then eliminated by a chemical treatment (15 min at 37°C with 2 M NaOH). After neutralization with 2 M HEPES (pH 6.8) (Sigma–Aldrich), labeled cDNA was purified on GFX columns (CyScribe GFX Purification kit; Amersham Biosciences) and then concentrated using a Microcon YM-30 filter (Millipore, Bedford, MA, USA).

Microarray hybridization, washing, and scanning

To reduce the nonspecific adsorption of fluorescent probes to the surface, microarray slides were prehybridized by injecting 5 µl of 10 mg ml^{-1} herring sperm DNA (Promega), previously heated at 95°C for 2 min, and 30 µl of DIGeasy hybridization buffer (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) to the slide covered with a 22×40 mm coverslip (premium printed cover glass Lifter-Slip; Erie Scientific Company, Portsmouth, NH, USA). The slide was then put in an individual hybridization chamber (Corning, Avon, France) and immersed in a water bath for 1 h at 60°C. It was then washed in 0.1× SSC and dried by centrifugation at 150×*g* for 3 min at room temperature before hybridization. Labeled targets and 5 µl of herring sperm DNA were heated at 95°C for 5 min for denaturation and then snap-cooled on ice. Twenty microliter of the hybridization buffer were added to the mixture, then injected under a new coverslip. The hybridization chamber was incubated in a 60°C water bath overnight. The slide was then immersed in 2× SSC, 0.1% SDS to remove the coverslip, then washed in 2× SSC, 0.1% SDS at 55°C for 5 min, in 1× SSC at room temperature, followed by a rinse in 0.2× SSC before drying by centrifugation. Subsequently, slides were scanned at 532 nm (wavelength for Cy3 fluorescence) using a robot ScanArray 4000 (Packard Biosciences, Boston, MA, USA) with 5 µm pixel resolution. Pictures were generated by using appropriate gains on the photomultiplier tube (PMT) to obtain the highest signal intensity without saturation.

Hybridization signals quantification and statistical analyses

Each gene was represented by duplicate spots on the arrays. The mean fluorescence intensity of each spot was quantified with QuantArray software (Packard BioChip Technologies, Billerica, MA, USA). Differentially expressed genes were identified by two methods: fold change (FC) and analysis of variance (ANOVA). For the FC method, the signal intensity for each spot of the treatment condition was normalized by the median (Quackenbush 2001). Ratios were calculated as the average of all individual hybridizations. ANOVA was performed using the software package GeneANOVA (Didier et al. 2002). For each gene, the equation used for ANOVA is the following:

$$\mathrm{Yikj} = \mu + \mathrm{Ci} + \mathrm{Bj} + \mathrm{Rk} + \varepsilon \mathrm{ijk}$$

where Yikj is the gene intensity; μ the mean of the intensities of expression measured for the gene; Ci, Bj, and Rk, are, respectively, the effects of analyzed "culture

Table 1 List of genes and corresponding oligonucleotide probes designed in this study

Genes[a]	Annotation[b]	*E* value[b]	EC number[c]	Oligonucleotides[d]
Aromatic or branched-chain amino acids metabolism				
84	gi|29606382|dbj|BAC70444.1| *Streptomyces avermitilis* MA-4680 putative acetolactate synthase subunit large	1E-145	2.2.1.6	GAAGCCGATATCGTGGGAATGACGATGCCGGTGACCAAGCACAGCTTCCTCGTCACCAAG
198	gi|11351227|pir||D83468 *Pseudomonas aeruginosa* PA01 probable decarboxylase	2E-76	2.2.1.6	CAGGCACAGAGTTCGCACGAGTCGACACAGAGTTCGCACGAGAAGAAGGACCTGACATGA
2145	gi|14026727|dbj|BAB53323.1| *Mesorhizobium loti* acetolactate synthase large subunit	0E+00	2.2.1.6	TCTTCGGCATCCCCGGTGAGGAGAACATCGATTTCATCGATTCTCTTCGCCAGTCCTCGATCGAATTCGT
4881	gi|17984505|gb|AAL53593.1| *Brucella melitensis* 16 M acetolactate synthase large subunit	1E-107	2.2.1.6	AAGATCATACGGCGTTGTGCGACCGAATGTTCAAGAGTCTGCCCACATGAGACAAAAGAATGATAAGCAT
5111	gi|24982858|gb|AAN67017.1| *Pseudomonas putida* KT2440 putative acetolactate synthase large subunit	2E-89	2.2.1.6	ACGATCTTCGGGATCCCCGGCACACACAATCTCGAGTTCTACCGCCACCTGAGCGAATTC
5113	gi|19886928|gb|AAM01746.1| *Methanopyrus kandleri* AV19 acetolactate synthase large subunit	4E-38	2.2.1.6	AACCTGTACGGTCTCAAAGGGCTGGATAAGTCGCCGATGCTCATCGACGAGATCGACTTC
5439	gi|25291304|pir||B97615 *Agrobacterium tumefaciens* probable decarboxylase	1E-106	2.2.1.6	AAGAATTCAGCCTGGCCGAATGGTTCTCCTCGACGGCGAAGAAGGTCATCATCGTCGATGATGAGGAT
1130	gi|23326526|gb|AAN25069.1| *Bifidobacterium longum* NCC2705 probable aminotransferase	3E-83	2.6.1.1	CGGAGACTGGCTTGATGAGATCACTGCCTATCTCAAAGGCAATCGCGAACTGCTGACC
2572	gi|6224986|sp|O67781| *Aquifex aeolicus* aspartate aminotransferase	3E-50	2.6.1.1	ATCATCAACTCAATCCCAGGCATGAGCGTGGCCGTTCCCGGCTCGACGTTCTATGTATTC
3991	gi|14285338|sp|Q9V0L2| *Pyrococcus abyssi* aspartate aminotransferase; probable aromatic-amino-acid transaminase	6E-72	2.6.1.1	ACGGGTTCACCATCATTTCCGACGAGGTCTATGACCAGATGGTCTTCGACGATGCCGTGTTCACATCCAT
5034	gi|15839723|ref|NP_334760.1| *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv aspartate aminotransferase	1E-146	2.6.1.1	AGACGTCGTAGGAAAGGTTCACATGTACAGGCAGTCGTCGAAATTGGCCAGCGTCCTCTATGACATTCGG
3786	gi|13880381|gb|AAK45075.1| *Mycobacterium tuberculosis* CDC1551 aminotransferase class IV	6E-45	2.6.1.21	AGCGCCTGATCTTCGACCATGCGGGAGAGCTCGGGCTCAATGCCGAATATGCGGACTT

93	gi|21111875|gb|AAM40165.1| *Xanthomonas campestris* ATCC33913 branched-chain amino acid aminotransferase	1E-119	2.6.1.42	ATGACTAAGTTTGCCGTTCTCAAAAACATCCAGCCGCAACCCGAGCTGGTGCGCGAGAACATCAAGAA
Methionine or cysteine metabolism				
4813	gi|7466785|pir||E64751 *Escherichia coli* K12 putative homocysteine *S*-methyltransferase	5E-69	2.1.1.10	ACAGCCTTCGTTGTCGGAGATCACAGTGCTCGCAGGCCTGGCCGATGAGTACGGGATT
607	gi|15842936|ref|NP_337973.1| *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv *O*-acetylhomoserine sulfhydrylase	1E-150	2.4.1.49	ATGACGAGATCGCATCGGGGAAGTCACAGAGTCGAAGACAGTAGTGACATCACCACAAACAATCGCGC
529	gi|22095913|sp|Q9L0Y3| *Streptomyces coelicolor* A3(2) *S*-adenosylmethionine synthetase (methionine adenosyltransferase)	1E-145	2.5.1.6	ATGCGTAGAATCGACGCCGTGAGTCAATCAAATCTGCGTTTCTTCTCGTCCGAATCCGTCACC
725	gi|14575551|emb|CAC42841.1| *Streptomyces coelicolor* A3(2) putative cystathionine γ-synthase	3E-97	2.5.1.48	CAGTTAATAGCAGGAATAGCTTGAATGCTGATATGACCTCACTGCACCCAGAAACGCTCATGGTCCACGG
2908	gi|23494186|dbj|BAC19153.1| *Corynebacterium efficiens* YS-314 *O*-succinylhomoserine (thiol)-lyase	1E-102	2.5.1.48	GAGGTTCCAATTGCGGACCCCTCACCGTCAACTCTTCAACACCCTGTAGCAACGGTATGA
3163	gi|21325558|dbj|BAC00180.1| *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 cystathionine β-lyase/cystathionine γ-synthase	6E-79	2.5.1.48	ACGACTGAGACATCGATGCACCGCCGTTTGCGCTCGGCATATATTGGGAAAATGACCACACGAGATTCCT
mgl	strain *Brevibacterium linens* ATCC9175 L-methionine γ-lyase		4.4.1.11	AATCGTATACCGGTTCGGTTGTTGTCCCTATCTTCCAGACCTCGACCTTCATGATCATCTGCCACGGGAT
Amino acids and carbohydrate metabolisms				
2675	gi|21323667|dbj|BAB98294.1| *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 FAD/FMN-containing dehydrogenase	0E+00	1.1.1.28	CAGGACTACGATCGTGAGATCGTCATCATCTCCACCCTGCGCATCAACCAGATCCATCTCATCAACGATG
1556	gi|15841341|ref|NP_336378.1| *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv L-lactate dehydrogenase	1E-118	1.1.2.3	ATATGGAACTCATCCTCGACTCCGGAATCATGTCCGGCACCGATGTCGTGACAGCTCTGT
2948	*Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 L-lactate dehydrogenase	0E+00	1.1.2.3	CAATTGCCCAATCCGTCCGAGATCTTCGAGCTGATGAAGTTCAAGAAGTTCGAGCTCGACTCCCGGAAAC
2504	gi|11228469|emb|CAC16452.1| *Streptomyces coelicolor* A3(2) putative oxidoreductase	0E+00	1.1.2.4	GTTCTCCAGCTGCACGAACACGATGTTCGGACCAGAAGACGGTGGAAGCGGAGATGGAGT

Table 1 (continued)

Genes[a]	Annotation[b]	*E* value[b]	EC number[c]	Oligonucleotides[d]
3932	gi|10129768|emb|CAC08323.1| *Streptomyces coelicolor* A3(2) putative oxidoreductase	0E+00	1.1.2.4	ACAATGCGAACATGACGACTTCGGTTCATAGCACTGGTGCACTTCGAACGTCTGCGGAGACAGAGATGTC
2924	gi|28852945|gb|AAO56017.1| *Pseudomonas syringae* DC3000 pyruvate dehydrogenase	0E+00	1.2.2.2	AACAAACTGCCGGTCAAGACCGTCGTCTACAACAACTCCTCGCTGAACTTCGTGGAGTTGGAGATGAAGG
731	gi|15841734|ref|NP_336771.1| *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv pyruvate dehydrogenase E1 component	0E+00	1.2.4.1	ACACACCAGATGAAGAAGCTGACGATCGACGATCTCAAGCTGGCCCGTGATCACTTCCAGATTCCGATCT
2777	gi|868152|gb|AAB03377.1| *Streptomyces avermitilis* MA-4680 putative branched-chain α-keto acid dehydrogenase E1 α-subunit	1E-127	1.2.4.1	ACAAAGGAGAACTGGAATGACCTCCAACATTTCAGTGGGAACCGGGACTGCCCACAGTCAGTCTTCGGAA
2778	gi|29608033|dbj|BAC72089.1| *Streptomyces avermitilis* MA-4680 branched-chain α-keto acid dehydrogenase E1 β-subunit	1E-132	1.2.4.1	ACTGGATGATGCAGGACGCGATCAAGAGCGACGACCCGGTGATGTTCTTCGAACCCAAGC
4415	gi|15841734|ref|NP_336771.1| *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv pyruvate dehydrogenase E1 component	0E+00	1.2.4.1	TCAACTCGATCTACCAGGCGCAGATGAACCGCTATCTGCACAATCGCGGCATCAAGGACA
5668	gi|24427172|emb|CAD55333.1| *Streptomyces coelicolor* A3(2) branched-chain α-keto acid dehydrogenase E1 α-subunit	7E-99	1.2.4.1	AAGAGGTCGAGCACTGGAAGCAGTTCGATCCCATCGACCGTCTCGAGAAGTATCTGCGAA
5669	gi|7480531|pir||T36511 *Streptomyces coelicolor* A3(2) putative branched-chain α-keto acid dehydrogenase E1 β-subunit	1E-117	1.2.4.1	ATTCGATGTGCCGTATCCGTCGCCGAAGCTTGAGGAGTTCTATTTGCCCACCGTCGAA
819	gi|29606622|dbj|BAC70683.1| *Streptomyces avermitilis* MA-4680 putative 2-oxoglutarate dehydrogenase	0E+00	1.2.4.2	GCAGTACAAGTCCGATAAGAACTCCGTCGACCAGTCATGGTGGCCGTTCTTCGACAAGTACGAAAAGAAC
2264	*Deinococcus radiodurans* fumarate reductase-related protein; Fe–S oxidoreductase	1E-63	1.3.99.1	ATGAAGATTGCACTGTTCGCCACGTGCATCGTCGATGCCATGTATCCGGAGGTCGCGCAG
1932	*Corynebacterium glutamicum* transketolase	0E+00	2.2.1.1	AACTGTCGAACCTGGTCGTCATCTGGGACGATAACCGGATCTCGATCGAAGATGACACCG
430	gi|30315915|sp|Q8CJP7| *Streptomyces coelicolor* A3(2) probable 1-deoxyxylulose-5-phosphate synthase	0E+00	2.2.1.7	ATGAGATCCTTGAATACGCGGGCCTCGATGTGGCCACCATCGTCTCCGAGATCGTTCATA

Unassigned function				
694	gi|29609593|dbj|BAC73643.1| *Streptomyces avermitilis* MA-4680 putative methionyl aminopeptidase	1E-112	3.4.11.18	AATGATCTTCACCATCGAACCGATGCTCAACCTCGGAACCGTCGATTGGGACGTCTGGGA
1274	gi|29608606|dbj|BAC72660.1| *Streptomyces avermitilis* MA-4680 putative methionine aminopeptidase	7E-77	3.4.11.18	AACTATCGTGCGAAGTCGAACGGACCGAAGATCAAATCCGGAATGTGTCTGGCAATCGAGCCGATGCTCA
4701	gi|23327027|gb|AAN25516.1| *Bifidobacterium longum* NCC2705 methionine aminopeptidase	7E-78	3.4.11.18	TCGTCGCGAAGACATTGGCTGAACTGTCTGAGCTCGCAGAACCGGGCATGAACATCATGCAATTGGAGAA

The functional classification of genes was done according to the KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) biochemical pathways.
[a] *B. linens* BL2 gene number (http://www.genome.ornl.gov/microbial/blin/), except *mgl* gene cloned from the type strain *Brevibacterium linens* ATCC9175 (Amárita et al. 2004). *mgl* nucleotide sequence appears in the DDBJ, EMBL, and GenBank nucleotide sequence databases under accession number AY622198.
[b] Best blast vs NR hit (http://www.genome.ornl.gov/microbial/blin/).
[c] EC (Enzyme Commission) number obtained from the best KEGG hit (http://www.genome.ornl.gov/microbial/blin/).
[d] Oligonucleotides designed in this study (see text).

condition" i (with or without added L-methionine); the biological repetition j; the spot replicate on microarray k; and εijk is the residual error. The residual error εijk includes all the interactions. The threshold of 10% for the False Discovery Rate (FDR) was chosen to select genes whose expression changes in presence of L-methionine are significant (The FDR is the expected proportion of erroneously rejected null hypotheses among the rejected ones) (Benjamini and Hochberg 1995; Reiner et al. 2003).

Measurement of volatile sulfur compounds produced by *B. linens* cultures

The production of VSC was analyzed by dynamic headspace GC-MS. Five milliliter of each sample (possibly diluted) were analyzed using a headspace analyzer (HP 7695A purge and trap concentrator; Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA) coupled to a gas chromatograph (HP 6890, Hewlett Packard) and a mass spectrophotometer detector (HP 6890A quadrupole mass spectrometer, Hewlett Packard), as previously described (Martin et al. 2001). The amount of VSCs eventually present in the samples taken initially (0 h) was subtracted from the total amount of VSC determined in the samples after a 72-h incubation period corresponding to the optimum for VSC production.

High-performance liquid chromatography (HPLC) analyses of the cultures

Culture samples stored at −20°C were thawed at 4°C, centrifuged (2,060×*g*, 15 min) and filtered using a polyethersulfone membrane filter (pore size, 0.22 μm; diameter, 33 mm; Dutscher, Brumath, France) before analysis. α-Keto-γ-methylthiobutyric acid (KMTBA) and α-hydroxy-γ-methylthiobutyric acid (HMTBA) contents of the filtrates were determined by HPLC (HPLC Waters TCM; Waters, Saint Quentin en Yvelines, France) with a cation exchange column (Aminex HPX-87H; diameter, 7.8 mm; length, 300 mm; Bio-Rad, Ivry-Sur-Seine, France) thermostated at 65°C. The mobile phase was sulfuric acid (0.01 N) dispensed at 0.6 ml min^{-1} flow rate. Detection of compounds of interest was performed with a Waters 486 tunable ultraviolet/visible detector regulated at 210 nm. Methionine was analyzed with a reversed-phase column (Symmetry C18; pore size, 100 Å; diameter, 4.6 mm; length, 100 mm; Waters). A gradient of H_2O plus acetonitrile at a flow rate of 0.6 ml min^{-1} was applied as follows: 100% H_2O for 2.5 min, 100–90% for 0.5 min, 90–60% for 7 min, 60–100% for 4 min. UV detection at 210 nm was used. All compounds were quantified from calibration curves established with pure chemicals.

Preparation of cell-free extracts and determination of lactate dehydrogenase (LDH) activity

B. linens cells supplemented or not with L-methionine, were harvested by centrifugation (13,000×*g*, 20 min, 4°C), washed twice with 1 ml of 100 mM Tris–HCl buffer (pH 8.0). For preparation of cell extracts, 500 mg of *B. linens* cells were suspended in 1 ml of 50 mM Tris–HCl buffer (pH 8.0). Cells were subsequently disrupted with 0.6 g of glass beads (diameter 0.1 mm; PolyLabo) using a FP120 FastPrep™ cell disruptor. Three mixing sequences of 30 s (speed 6.5 m s^{-1}) were successively applied, each separated by a 5-min cooling period in ice. After centrifugation (20,000×*g*, 5 min, 4°C), the supernatant [called cell-free extract (CFE)] was collected and enzymatic activities were determined. Protein content in CFEs was determined according to Bradford (Bradford 1976) using bovine serum albumin as a standard. The LDH activity present in CFE was determined as previously described (Labeyrie et al. 1978) using L-lactate as substrate and potassium ferricyanide as cofactor.

Results

Choice of candidate genes for DNA microarrays construction

The choice of the candidate genes was performed on the basis KEGG pathways data (http://www.genome.jp/kegg/pathway.html). All genes possibly involved in lactate or methionine catabolisms were searched for in *B. linens* genome. In this way, we found 39 candidate genes. To perform the first transcriptional analysis of the strain *B.*

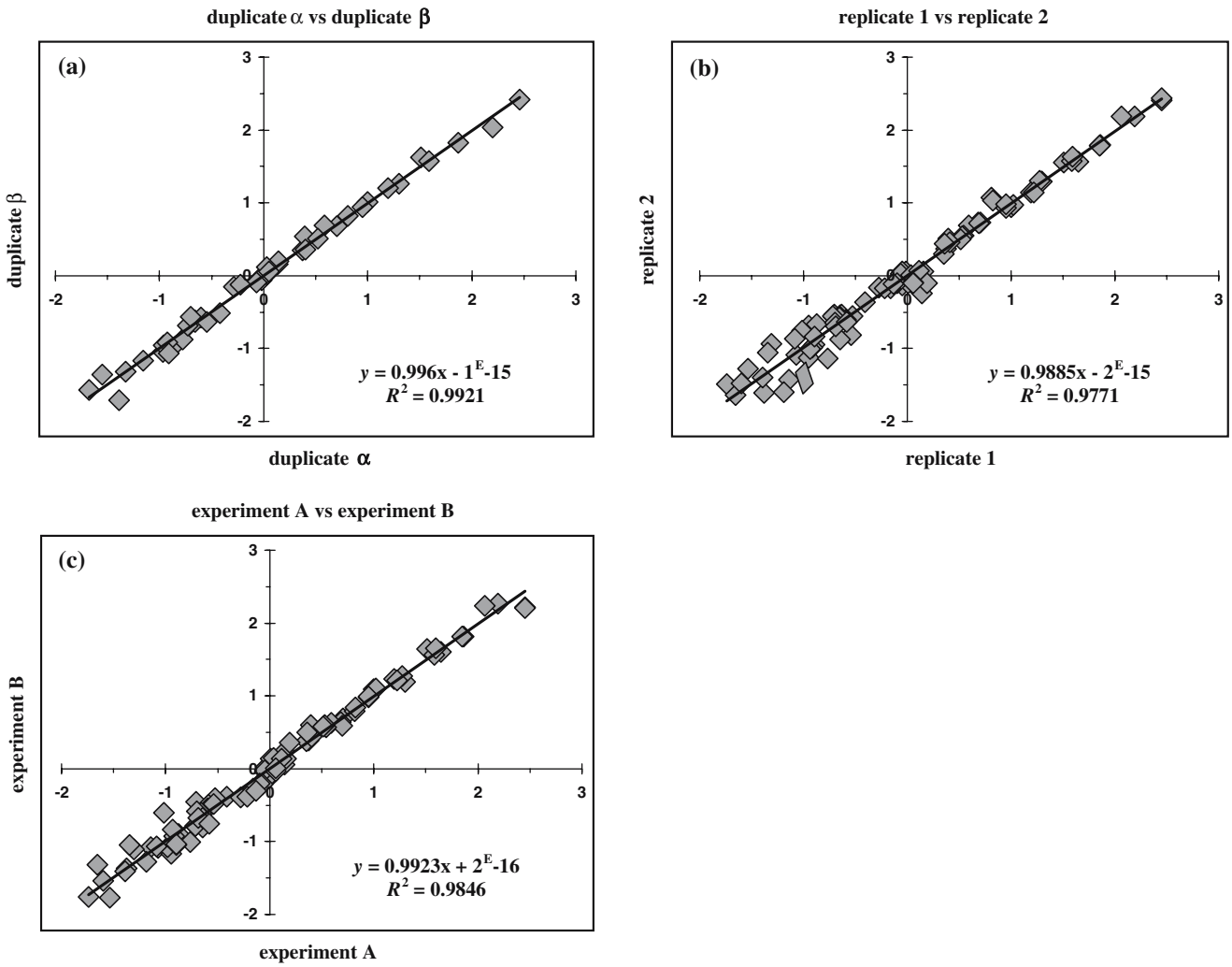


Fig. 1 Array quality and variation within and between experiments. The data are log center-reduced. **a** Comparison of the signal intensity of duplicate spots on the same array. **b** Comparison of the signal intensity of pairs of arrays hybridized with two sets of Cy3-cDNA probes prepared from the same RNA extract. **c** Comparison of the signal intensity of pairs of arrays hybridized with two sets of Cy3-cDNA probes prepared from two different RNA extracts from *B. linens* grown in the same conditions

linens ATCC9175, the 39 *Brevibacterium* gene sequences were selected from the *B. linens* BL2 genome database (US Department of Energy Joint Genome Institute; http://www.jgi.doe.gov/). These genes encode enzymes involved in lactate catabolism and/or L-methionine metabolism.

The appropriate design of oligonucleotide probes is crucial to ensure the success of transcriptional analyses. Therefore, one long oligonucleotidic probe was designed for each gene of interest using the ROSO software (Reymond et al. 2004), optimized to select the most specific sequence of each gene. Oligonucleotidic sequences were searched in the last 300 bases of each gene, with no stable secondary structure and several optimal thermodynamic properties as defined by ROSO (http://www.pbil.univ-lyon1.fr/roso/Home.php). A genome-wide search for homologs was conducted for each oligonucleotide probe to ensure maximum specificity for the targeted gene and avoid nonspecific hybridization with other genes. The list of the selected genes and the corresponding oligonucleotides are given in Table 1.

Validation and reproducibility of DNA microarray data

The reproducibility of the duplicate spots on the arrays and the variation observed between replicate experiments were assessed. The data obtained from duplicate spots on the same array were highly reproductible (R^2=0.99) (Fig. 1a). As an indication of the reproducibility, spot intensities were also compared between pairs of arrays hybridized with two sets of Cy3-cDNA prepared from the same RNA extract (i.e., technical repeats). The results showed a good reproductibility between arrays (Fig. 1b); in all cases, a correlation coefficient >0.96 was generated. Spot intensities were also compared between pairs of cDNA arrays hybridized with two sets of Cy3-cDNAs prepared from two different RNA extracts from *B. linens* cells grown in identical conditions (i.e., biological repeats). As a representative example (Fig. 1c), the results also showed a good reproductibility between arrays (R^2>0.95). High stringency criterion for probe design together with the low variability that we have shown above (from spot-to-spot, slide-to-slide, and cDNA synthesis-to-cDNA synthesis) serve as validation tests for the use of our microarray.

Growth and biochemical analyses

To examine which genes were differentially expressed in response to L-methionine supplementation, a single cell culture of *B. linens* ATCC9175 was grown in a culture medium enriched or not with L-methionine. Unless stated otherwise, samples were obtained from triplicate cultures. For both culture conditions, maximum growth is reached at 60–72 h (Fig. 2). Our data show that L-methionine supplementation significantly enhanced growth of *B. linens*. L-methionine is therefore efficiently used as a growth substrate because the consumption of lactate, the major carbon source for growth present in the culture medium, remained unchanged when L-methionine was provided (data not shown). This is in agreement with the fact that lactate dehydrogenase activity (LDH) was not influenced by L-methionine supplementation (Table 2), and that an increase in pH (+0.9 pH)—attributable to lactate consumption—was observed in the presence or absence of L-methionine. In cultures supplemented with L-methionine, a

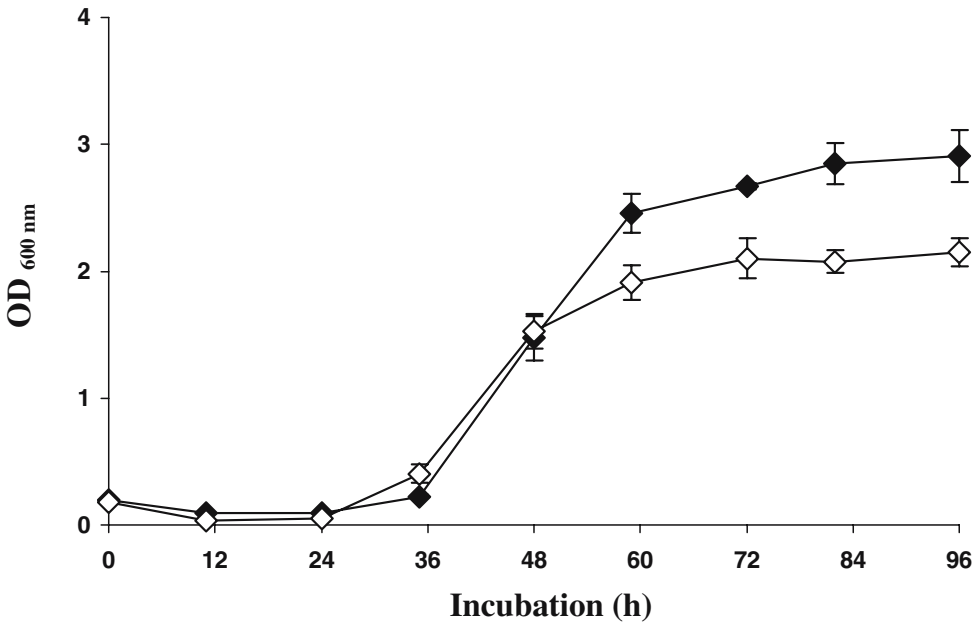


Fig. 2 Growth of *B. linens* in a medium with (*closed symbols*) or without (*open symbols*) L-methionine supplementation. *Error bars* represent standard deviations calculated on the average value of six determinations

Table 2 Biochemical data of *B. linens* after 72 h of growth in cultures supplemented or not with L-methionine

		Growth ($OD_{600\ nm}$)	pH	LDH activity (U mg^{-1})	Met (mM)	VSC specific production (peak area × 10^4 × CFU^{-1})					
						MTL	DMDS	DMTS	DTP	TTH	Total VSC
+Met	Control	nd	7.00±0.00	nd	6.71±0.06	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	B. linens	2.67±0.02	7.96±0.01	25.54±0.30	4.52±0.08	3.0±0.4	1144±91	10.3±0.5	4.9±0.7	0.6±0.1	1162.8
–met	Control	nd	7.00±0.00	nd	0.07±0.01	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	B. linens	2.10±0.15	7.81±0.03	28.38±0.38	nd	nd	24±3	nd	nd	nd	nd

LDH Lactate dehydrogenase, *MTL* methanethiol, *DMDS* dimethyldisulfide, *DMTS* dimethyltrisulfide, *DTP* 2,4-dithiapentane, *TTH* 2,3,5-trithiahexane, *nd* not detected

third of this sulfur amino acid is consumed after 72 h of cultivation, which is accompanied by a dramatic increase in volatile sulfur compounds biosynthesis (Table 2).

Identification of differentially expressed genes

Out of the 39 candidate genes, 25% were up-regulated by L-methionine supplementation, among others three genes related to sulfur amino acids metabolism and six genes involved in carbohydrate metabolism (Table 3). The levels of gene induction varied from 1.3- to 5.2-fold. This falls well in the range of expression levels reached in other studies in which the expression profile was studied in the presence of sulfur sources such as L-methionine and sulfate (Auger et al. 2002).

For genes involved in sulfur metabolism, expression levels were increased 1.3-, 1.7-, and 2-fold, respectively, for aminotransferase IV, homocysteine *S*-methyltransferase, and L-methionine γ-lyase (MGL), this latter being involved in the one-step conversion of L-methionine to MTL (Amarita et al. 2004). Expression level of an aminotransferase was increased 1.3-fold, but is probably not involved in L-methionine transamination because no KMTBA was detected in the culture supernatant of *B. linens* ATCC9175

Table 3 Up- and down-regulated genes from *B. linens* in response to L-methionine supplementation

Genes	Function/similarity[a]	Fold changes[b]
Up-regulated genes		
198	Acetolactate synthase/probable decarboxylase	5.2
731	Pyruvate dehydrogenase E1 component	1.7
2504	Putative oxidoreductase	1.8
2778	Branched-chain α-keto acid dehydrogenase E1 β-subunit	1.4
3786	Aminotransferase class IV	1.3
4813	Putative homocysteine *S*-methyltransferase	1.7
5668	Branched-chain α-keto acid dehydrogenase E1 α-subunit	2.0
5669	Putative branched-chain α-keto acid dehydrogenase E1 β-subunit	2.8
mgl	L-Methionine γ-lyase	2.0
Down-regulated genes		
84	Acetolactate synthase subunit large	2.2
529	*S*-adenosylmethionine synthetase	1.5
607	*O*-acetylhomoserine sulfhydrylase	2.5
1274	Putative methionine aminopeptidase	2.1
1556	L-Lactate dehydrogenase	1.9
1932	Transketolase	1.6
2264	Fe–S oxidoreductase	1.9
2675	FAD/FMN-containing dehydrogenase	2.1
2777	Putative branched-chain α-keto acid dehydrogenase E1 α-subunit	1.5
2948	L-Lactate dehydrogenase	2.1
3163	Cystathionine β-lyase/cystathionine γ-synthase	3.5
3932	Putative oxidoreductase	2.1
4415	Pyruvate dehydrogenase E1 component	1.6
4701	Methionine aminopeptidase	1.9
4881	Acetolactate synthase large subunit	1.4
5034	Aspartate aminotransferase	1.6
5111	Putative acetolactate synthase large subunit	2.4

[a] For detailed annotation, see Table 1.
[b] Only genes whose transcript levels were significantly induced or repressed with FDR ≤5% are indicated in the table (FDR: False Discovery Rate using the software package GeneANOVA).

(data not shown), as already shown in the *B. linens* CNRZ918 strain (Arfi et al. 2006). Among up-regulated genes from carbohydrate metabolism, there were four genes related to α-keto acid dehydrogenase, one gene encoding a probable decarboxylase, one gene encoding an oxydase.

Down-regulated genes represent 42% of the candidate genes, out of which six genes were related to sulfur metabolism and 11 genes were involved in carbohydrate metabolism. Two putative genes for methionine aminopeptidase, one putative gene encoding for cystathionine β-lyase/cystathionine γ-synthase, one gene encoding a *S*-adenosylmethionine synthetase, aspartate aminotransferase and one gene encoding a *O*-acetylhomoserine sulfhydrylase were down-regulated in L-methionine-enriched medium. Among genes involved in carbohydrate metabolism, three genes were related to acetolactate synthase and five genes encoding for dehydrogenases. One gene encoding a transketolase family was also down regulated.

Among all the genes studied, the expression levels of 31% of them were not modified by L-methionine supplementation. A third of these genes encode for aminotransferases which suggest that such enzymes are not involved in L-methionine catabolism in *B. linens*.

Discussion

Methionine plays a central role in the metabolism of a range of bacteria and eukaryotes but its metabolism remains relatively poorly explored. Catabolism of L-methionine in Brevibacteria has been the subject of several studies because this amino acid is the precursor of methanethiol which is required for the production of a range of VSC. However, although it has been shown that lactate could favorably influence methanethiol production (Ferchichi 1984), no studies were done until now at the level of gene expression related to L-methionine or lactate catabolism in *B. linens*, or on possible interrelationships between those catabolisms.

Primarily, our *in silico* analysis of genes possibly involved in sulfur amino acids metabolism revealed that genes encoding for cystathionine γ-lyase (CGL) or cystathionine β-synthase (CBS) were not found in *B. linens* genome (Fig. 3). It is therefore probable that the reverse transulfuration pathway (e.g., CBS, CGL) is not active in *B. linens*, as well as the thiolation pathway because no gene encoding for a *O*-acetylhomoserine (thio)-lyase was identified in *B. linens* sequenced genome (US Department of Energy Joint Genome Institute). However, such a hypothesis should be investigated through tracing experiments which were not performed in the present study.

Our data also show that, contrary to lactate catabolism which seems hardly influenced by L-methionine supplementation, expression levels of several major genes involved in sulfur metabolism were found to be influenced by L-methionine levels. For instance, gene expression studies revealed that the transsulfurylation pathway was poorly active in L-methionine-enriched cultures because a putative cystathionine β-lyase/cystathionine γ-synthase encoding gene (45% identity with *Corynebacterium glutamicum*, 37% identity with *Escherichia coli*)—the two enzymes catalyzing the transsulfurylation of cysteine—was 3.5-fold less strongly expressed with L-methionine (Table 3). In accordance with this, it has been shown in *C. glutamicum* that methionine repressed cystathionine γ-synthase and cystathionine β-lyase, encoded by *metB* and *metC*, respectively (Lee and Hwang 2003). Also, previous studies have shown that the overal structures of cystathionine γ-synthase (CGS) and cystathionine β-lyase (CBL) proteins were quite similar (Clausen et al. 1998). Owing to high identities between enzymes involved in the transsulfurylation or reverse transsulfurylation pathways, several enzymes have been reported to possess dual activities. For example, cloning of the *CYS3* gene of *Saccharomyces*

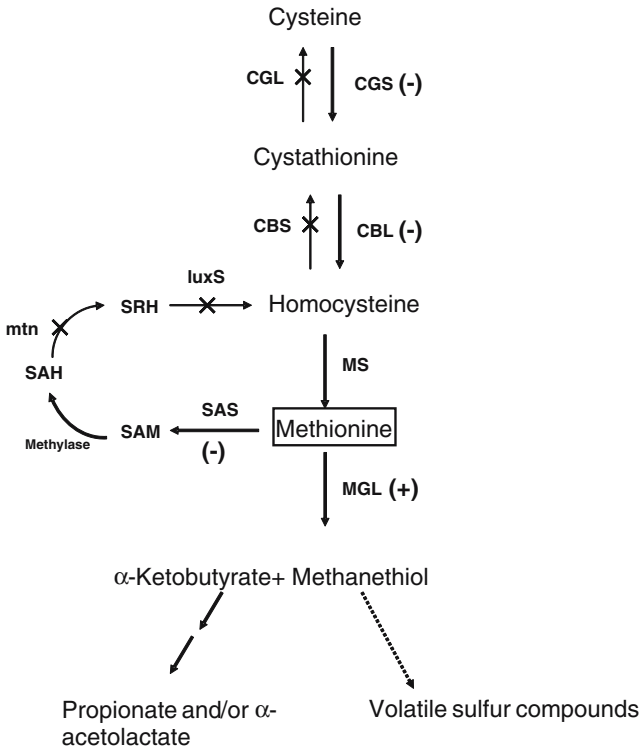


Fig. 3 Proposed biosynthetic/catabolic pathways of sulfur-containing amino acids in *B.linens* ATCC9175. A *cross* indicates that a pathway is not active. A *dashed line* indicates a chemical reaction. *Positive sign* up-regulated by L-methionine; *negative sign* down-regulated by L-methionine. *CGS* Cystathionine γ-synthase; *CBL* cystathionine β-lyase; *MS* methionine synthase; *MGL* L-methionine γ-lyase; *SAS* *S*-adenosylmethionine synthetase; *SAM* *S*-adenosylmethionine; *SAH* *S*-adenosyl-homocysteine; *SRH* *S*-ribosylhomocysteine; *mtn* SAH/MTA nucleosidase; *luxS* SRH hydrolase

cerevisiae in *E. coli*, conferred both CGS and CGL activities to *E. coli* (Ono et al. 1992). In *Bacillus subtilis*, it has been reported that the PatB protein had both CBL and cysteine desulhydrase in vitro (Auger et al. 2005). Furthermore, the gene encoding MGL is expressed more strongly in the presence of L-methionine (Fig. 3), which is accompanied by a dramatic increase in the production of VSC which are direct degradation products of MTL. This clearly indicates an inducing effect of a substrate, L-methionine, on its catabolic enzyme, MGL. Our results show that L-methionine metabolism is rather catabolic in *B. linens* (Fig. 3) and that L-methionine recycling to L-cysteine through a reserve transsulfurylation probably do not operate in this microorganism, as already shown in the model systems *E. coli* or *Salmonella enterica* (Seiflein and Lawrence 2001).

It must be pointed out that the supply of L-methionine also enhanced expression of several genes encoding components of α-keto acid dehydrogenase complex including pyruvate dehydrogenase. Alpha-ketobutyrate is a main product of L-methionine catabolism because it is generated together with MTL and ammonia through demethiolation of L-methionine by MGL (Fig. 4). It can be subsequently converted to (1) propionyl-coenzyme A by an α-keto acid dehydrogenase complex (Bisswanger 1981) and (2) α-aceto-α-hydroxybutyrate with pyruvate by an acetolactate synthase. The expression of several genes encoding for α-keto acid dehydrogenase or acetolactate synthase were found to be modulated by L-methionine in *B. linens*. In *Pseudomonas putida*, *mdeA* (which encodes MGL) is part of the *mde* operon that also contains *mdeB*, that encodes an α-ketobutyrate dehydrogenase E1 component (Inoue et al. 1997) responsible for the conversion of α-ketobutyrate to propionyl–CoA. Our results shows that, in *B. linens*, four genes related to α-keto acid dehydrogenase—encoding for E1 components of α-ketoacid dehydrogenase or pyruvate dehydrogenase—were up-regulated in the presence of L-methionine. Although differing in relative activity towards α-ketobutyrate, it is generally accepted that pyruvate dehydrogenase complex can use α-ketobutyrate instead of pyruvate as a substrate (Bisswanger 1981). Two genes encoding for an acetolactate synthase were down-regulated by L-methionine, α-aceto-α-hydroxybutyrate being subsequently converted to pentanedione as the final product (Arfi et al. 2006). Our data therefore suggest that propionyl-coenzyme A pathway could be activated in the presence of L-methionine together with MGL pathway (Fig. 4).

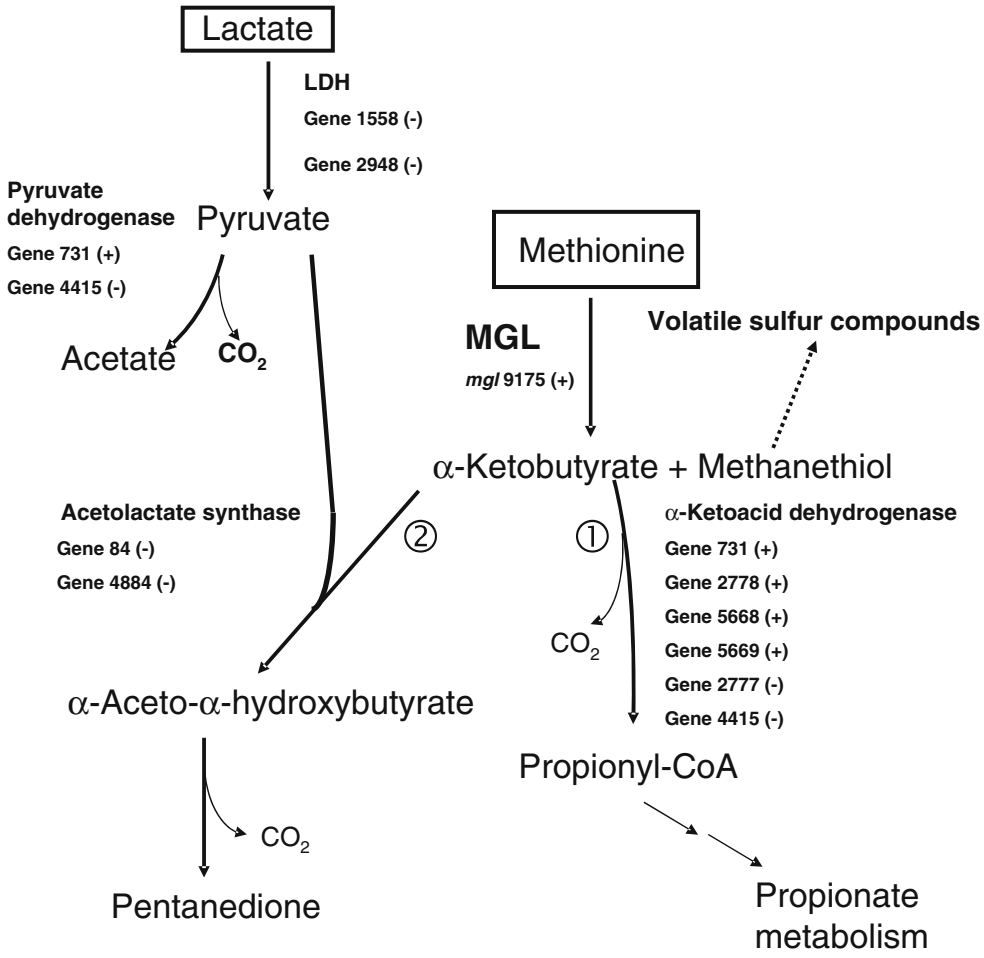


Fig. 4 Possible interrelationship between L-methionine and lactate catabolism in *B. linens* ATCC9175. *MGL* L-methionine γ-lyase; *LDH* lactate dehydrogenase. *Encircled number one* Propionyl-coenzyme A pathway; *Encircled number two* acetolactate pathway. *Positive sign* Up-regulated by L-methionine; *negative sign* down-regulated by L-methionine

This work represents the first transcriptomic data of *B. linens*. It offers a first insight into the expression of some major genes involved in L-methionine and lactate catabolisms which are of major importance in the ripening process. Future studies could extend to a more global transcriptomic approach to better understand the behavior of *B. linens* within the cheese ecosystem in interaction with other microorganisms.

Acknowledgements The sequence data of *B. linens* BL2 were produced by the US department of Energy Joint Genome Institute. Orianne Cholet is grateful to Ecole Doctorale ABIES for a Ph.D. scholarship. Jérôme Delettre is acknowledged for LDH activity measurements.

References

Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res 25:3389–3402

Amarita F, Yvon M, Nardi M, Chambellon E, Delettre J, Bonnarme P (2004) Identification and functional analysis of the gene encoding methionine-γ-lyase in *Brevibacterium linens*. Appl Environ Microbiol 70:7348–7354

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

Auger S, Danchin A, Martin-Verstraete I (2002) Global expression profile of *Bacillus subtilis* grown in the presence of sulfate or methionine. J Bacteriol 184:5179–5186

Auger S, Gomez MP, Danchin A, Martin-Verstraete I (2005) The PatB protein of *Bacillus subtilis* is a C-S-lyase. Biochimie 87:231–238

Benjamini Y, Hochberg Y (1995) Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. J R Stat Soc B 57: 289–300

Bisswanger H (1981) Substrate specificity of the pyruvate dehydrogenase complex from *Escherichia coli*. J Biol Chem 256:815–822

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

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilising the principle of protein–dye binding. Anal Biochem 72: 54–63

Clausen T, Huber R, Prade L, Wahl MC, Meserschmidt A (1998) Crystal structure of *Escherichia coli* cystathionine gamma-synthase at 1.5A resolution. EMBO J 17:6827–6838

Dias B, Weimer B (1998) Purification and characterization of L-methionine-γ-lyase from *Brevibacterium linens* BL2. Appl Environ Microbiol 64:3327–3331

Didier G, Brezellec P, Rémy E, Hénaut A (2002) GeneANOVA—gene expression analysis of variance. Bioinformatics 18: 490–491

Ferchichi M (1984) Production de méthanethiol à partir de L-méthionine par *Brevibacterium linens* CNRZ 918: induction, caractérisation, nature des systèmes enzymatiques. Ph.D. Dissertation, Universities of Paris VII, Paris XI and ENSIA, Paris, France

Ferchichi M, Hemme D, Nardi M (1986) Induction of methanethiol production by *Brevibacterium linens* CNRZ 918. J Gen Microbiol 132: 3075–3082

Inoue H, Inagaki K, Eriguchi S, Tamura T, Esaki N, Soda K, Tanaka H (1997) Molecular characterization of the *mde* operon involved in L-methionine catabolism of *Pseudomonas putida*. J Bacteriol 179:3956–3962

Labeyrie F, Baudras A, Lederer F (1978) Flavocytochrome b_2 or L-lactate cytochrome c reductase from yeast. Methods Enzymol 5:238–256

Leclercq-Perlat MN, Oumer A, Bergère JL, Spinnler HE, Corrieu G (2000) Behavior of *Brevibacterium linens* and *Debaryomyces hansenii* as ripening flora in controlled production of smear soft cheese from reconstituted milk: growth and substrate consumption. J Dairy Sci 83: 1665–1673

Lee HS, Hwang BJ (2003) Methionine biosynthesis and its regulation in *Corynebacterium glutamicum*: parallel pathways of transulfuration and direct sulfhydrylation. Appl Microbiol Biotechnol 62: 459–467

Maoz A, Mayr R, Sherer S (2003) Temporal stability and biodervisity of two complex antilisterial cheese-ripening microbial consortia. Appl Environ Microbiol 69: 4012–4018

Martin N, Berger C, LeDu C, Spinnler HE (2001) Aroma compound production in cheese curd by coculturing with selected yeast and bacteria. J Dairy Sci 84:2125–2135

McSweeney PLH (2004) Biochemistry of cheese ripening. Int J Dairy Technol 57:127–144

Mounier J, Gelsomino R, Goerges S, Vancanneyt M, Vandemeulebroeke K, Hoste B, Sherer S, Swings J, Fitzgerald GF, Cogan TM (2006) Surface microflora of four smear-ripened cheeses. Appl Environ Microbiol 71: 6489–6500

Ono B, Tanaka K, Naito K, Heike C, Shinoda S, Yamamoto S, Ohmori S, Oshima T, Toh-e A (1992) Cloning and characterization of the CYS3 (CYI1) gene of *Saccharomyces cerevisiae*. J Bacteriol 174:3339–3347

Quackenbush J (2001) Computational analysis of microarray data. Nat Rev Genet 2:418–427

Rattray FP, Fox A (1999) Aspects of enzymology and biochemical properties of *Brevibacterium linens* relevant to cheese ripening: a review. Int Dairy J 82:891–909

Reiner A, Yekutieli D, Benjamini Y (2003) Identifying differentially expressed genes using false discovery rate controlling procedures. Bioinformatics 19:368–375

Reymond N, Charles H, Duret L, Calevro F, Beslon G, Fayard JM (2004) ROSO: optimizing oligonucleotide probes for microarrays. Bioinformatics 20:271–273

Rijnen L, Yvon M, van Kranenburg R, Courtin P, Verheul A, Chambellon E, Smit G (2003) AraT and BcaT are key enzymes for the formation of aroma compounds from amino acids in cheese. Int Dairy J 13:805–812

Seiflein TA, Lawrence JG (2001) Methionine-to-cysteine recycling in *Klebsiella aerogenes*. J Bacteriol 183:336–346

Weimer B, Seefeldt K, Dias B (1999) Sulfur metabolism in bacteria associated with cheese. Antonie van Leeuwenhock 76:247–261

Résumé

L'un des gènes les plus fortement induits lors de la croissance de *B. linens* dans un milieu liquide enrichi en L-méthionine est le gène *mgl*. L'augmentation de la concentration en L-méthionine dans le milieu de culture engendre également une accumulation accrue de composés soufrés volatils. Ces nouvelles données montrent que l'enzyme clef du catabolisme de la L-méthionine en méthanethiol chez cette bactérie est incontestablement la L-méthionine γ-lyase. De plus, l'absence du produit de transamination de la L-méthionine, l'acide α-céto-γ-méthylthiobutyrique (KMTBA), et de sa forme réduite, l'acide α-hydroxy-γ-méthylthiobutyrique (HMTBA), indique que l'étape de transamination de la L-méthionine est inactive chez *B. linens* ATCC9175. Par ailleurs, nous avons observé que quatre gènes codant pour des α-cétoacide déshydrogénases (gènes *5669*, *5668*, *731* et *2778*) et un gène codant pour une acétolactate synthase (gène *198*) étaient plus fortement exprimés en présence de L-méthionine. Il semblerait donc que les voies métaboliques conduisant à la production de composés aromatiques autres que les composés soufrés volatils, par exemple la 2,3-pentanedione, puissent également être plus fortement induites en présence de L-méthionine. *A contrario*, l'apport de L-méthionine dans le milieu n'a qu'un effet limité sur le catabolisme du lactate.

Enfin, d'un point de vue méthodologique, cette étude préliminaire nous a permis de valider, en partie, le bon fonctionnement de notre puce multi-espèces. En effet, l'absence de cross-hybridation entre les ADNc-Cy3 de *B. linens* et les sondes oligonucléotidiques dessinées spécifiquement pour l'étude de *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces marxianus* et *Yarrowia lipolytica* a pu être vérifiée. Il convient toutefois de noter qu'un soin particulier doit être apporté à la « définition » des gènes candidats sélectionnés et spottés sur la puce. Les banques de données de séquences sont, en effet, criblées d'erreurs d'annotation qui peuvent mener à la sélection de gènes peu pertinents. Depuis la publication initiale de la séquence du génome de *B. linens* BL2 sur le site de l'US Department of Energy Joint Genome Institute (JGI : http://www.jgi.doe.gov/), diverses corrections y ont été apportées et, en particulier, au niveau de l'annotation des ORFs. Ainsi, un des gènes candidats retenu lors de cette étude (gène *725*), annoté comme codant pour une « putative methionine γ-lyase » lors de la conception de notre puce, a récemment été ré-annoté comme « putative cystathionine γ-synthase » par homologies de séquence avec *Streptomyces coelicolor* A3(2) (Blastp : *E-value* = 3^{E}-97). La mise à jour progressive des données de séquences et des annotations dans les bases de données en ligne peut donc induire des confusions si les données des puces à ADN ne sont pas conjointement mises à jour. Par conséquent, nous nous sommes efforcés d'actualiser régulièrement nos annotations afin de respecter la concordance avec la base JGI (**Table 1** [**Article 1**], dernière mise à jour le 2 septembre 2006).

3.

Analyse transcriptomique du catabolisme de la L-méthionine chez la levure d'affinage *Yarrowia lipolytica*.

Les levures utilisent différentes voies enzymatiques pour convertir la L-méthionine en composés soufrés. Les deux principales voies suspectées chez les levures sont la voie « aminotransférase » et la voie « lyase ». Très peu de gènes codant les protéines nécessaires au fonctionnement de ces voies métaboliques ont été identifiés jusqu'à présent chez les levures d'affinage. L'acide α-céto-γ-méthylthiobutyrique (KMTBA), produit de transamination de la L-méthionine, a toutefois été détecté dans des cultures réalisées au laboratoire avec l'espèce *Yarrowia lipolytica* (Arfi *et al*., 2002). Une aminotransférase active sur la L-méthionine, codée par le gène Yl*BAC1*, a également été identifiée (Cernat Bondar *et al*., 2005). Afin de compléter ces informations préliminaires, une approche transcriptomique a donc été entreprise chez *Y. lipolytica* à l'aide de notre puce multi-espèces. La souche *Y. lipolytica* 370 qui a fait l'objet de cette étude a originellement été isolée du fromage et fait actuellement partie de la collection de l'UMR Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires (UMR-GMPA, INRA, Thiverval-Grignon). Elle a été cultivée dans un milieu synthétique dont la composition se rapproche de celle d'un caillé en début d'affinage (milieu synthétique fromager J1 ; **Fiche technique 03**). Pour les besoins de l'étude, ce milieu a été enrichi ou non en L-méthionine. Le but de ce travail était également de mettre en évidence une corrélation entre les données d'expression des gènes et les mesures biochimiques, et de voir dans quelles mesures les deux approches sont complémentaires.

Cette étude a fait l'objet d'un article :

Cholet, O., Hénaut, A. & Bonnarme, P. (soumis). Transcriptional analysis of L-methionine catabolism in the cheese-ripening yeast *Yarrowia lipolytica* in relation with volatile sulfur compounds biosynthesis. *Applied and Environmental Microbiology*. [**Article 2**]

1 **Transcriptional analysis of L-methionine catabolism in the cheese-ripening yeast**
2 ***Yarrowia lipolytica* in relation with volatile sulfur compounds biosynthesis.**
3

4 Orianne Cholet[1], Alain Hénaut[2] and Pascal Bonnarme[1*]
5
6 [1] UMR782 Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires, AgroParisTech, INRA, F-
7 78850 Thiverval Grignon, France.
8 [2] Laboratoire Génome et Informatique, UMR 8116, Tour Evry2, F-91034 Evry, France.
9 * Corresponding author. Phone : 33 1 30 81 53 88. Fax : 33 1 30 81 55 97. Email :
10 bonnarme@grignon.inra.fr
11

12 **KEY WORDS:** Gene expression; *Yarrowia lipolytica*; L-methionine catabolism;
13 Aminotransferase; Volatile sulfur compounds.
14
15 **Short title:** L-methionine catabolism in *Yarrowia lipolytica*
16
17

ABSTRACT

Yarrowia lipolytica is one of the yeasts most frequently isolated from the surface of ripened cheeses. In previous work, it has been shown that this yeast is able to convert L-methionine into various volatile sulfur compounds (VSCs) that may contribute to the typical flavors of several cheeses. In the present study, we show that *Y. lipolytica* does not assimilate lactate in the presence of L-methionine in a cheese-like medium. Nineteen presumptive genes associated with L-methionine catabolism or pyruvate metabolism in *Y. lipolytica* were thus transcriptionally studied in relation to the L-methionine degradation. The expression levels of Yl*ARO8* (*YALI0E20977g*) and YL*BAT2* (*YALI0F19910g*) genes were found to be strongly up-regulated by L-methionine, and a greater variety and higher amounts of VSCs – such as methanethiol and its auto-oxidation products (DMDS and DMTS) – were released in the medium when *Y. lipolytica* was grown in the presence of a high concentration of L-methionine. In contrast, other genes related to pyruvate metabolism were found to be down-regulated in the presence of L-methionine, except Yl*PDB1* (*YALI0E27005g*) and Yl*PDC6* (*YALI0D06930g*) genes which encode a pyruvate dehydrogenase and a pyruvate decarboxylase, respectively. Both transcriptional and biochemical results demonstrated that transamination is the first step of the enzymatic conversion of L-methionine to VSCs in *Y. lipolytica* and that the Yl*ARO8* and Yl*BAT2* genes could play a key role in this process.

INTRODUCTION

The enzymatic degradation of L-methionine and the subsequent formation of volatile sulfur compounds (VSCs) are essential for the development of the characteristic aromatic notes of several cheeses (12, 14, 17). Methanethiol (MTL) is the most frequently detected VSC in the ripened cheeses. It is also the direct precursor of other sulfur aroma compounds such as dimethyl sulfide (DMS), dimethyl disulfide (DMDS), dimethyl trisulfide (DMTS) and *S*-methylthioesters (4, 7, 18).

Although chemical degradation (Strecker degradation) can occur during the ripening process, the amino acids catabolism in cheese is due mainly to the action of microbial enzymes. In lactic acid bacteria, such as *Lactococcus lactis*, the first step of amino acid degradation is initiated by an aromatic or a branched-chain aminotransferase (AraT or BcaT) (15, 16), which requires the presence of an α-ketoacid as aminogroup acceptor (27). Cheese-ripening yeasts, such as *Geotrichum candidum*, *Kluyveromyces lactis* and *Yarrowia lipolytica*, are also known to contribute to the formation of various VSCs through the degradation of L-methionine (4, 25). Until recently, the involvement of an aminotransferase in L-methionine conversion to MTL was still speculative in the yeasts, since a functional analysis of any gene encoding such enzymes was not possible. Due to the recent availability of *K. lactis* and *Y. lipolytica* genomes (http://cbi.labri.fr/Genolevures/), several strategies using genome sequence can be now considered. For instance, all the putative aminotransferase-encoding genes from *Kluyveromyces lactis* were cloned in an overproducing vector, and their effects on the production of VSCs were analyzed (19). Two aromatic aminotransferase genes, Kl*ARO8.1* and Kl*ARO8.2*, were found to be responsible for L-methionine aminotransferase activity in *K. lactis*. In *Y. lipolytica*, the functional analysis of a branched-chain aminotransferase gene (Yl*BCA1*) has recently shown that the corresponding enzyme is able to convert L-methionine to α-keto γ-methylthiobutyric acid (KMTBA) (9). KMTBA could be subsequently converted

to MTL (4), a highly reactive sulfur compounds that quickly reacts with itself, forming the oxidized and more stable compounds DMDS and DMTS (10).

Aminotransferases are widely distributed among microorganisms. Furthermore, two or more aminotransferases with overlapping specificities were generally found in the same microorganism (21, 26, 28). In the yeast *Y. lipolytica*, not all the putative genes encoding an aminotransferase have been studied, and their involvement in the L-methionine catabolism remains incomplete. In the present study, all genes predicted to be involved in L-methionine catabolic pathways were searched in the full genome of *Y. lipolytica*. A set of nineteen oligonucleotides were then designed and employed to perform transcriptional analysis of *Y. lipolytica* in the presence of L-methionine. Subsequently, in relation to the biochemical data (lactate and L-methionine consumption; KMTBA and VSCs production), the transcriptional patterns of these genes were compared when *Y. lipolytica* cells were grown in a cheese-like medium under low- or high-L-methionine conditions.

MATERIALS AND METHODS

Media, growth conditions, and microbial analysis. *Yarrowia lipolytica* 370 was originally isolated from French cheeses. This strain belongs to our laboratory's own collection (LGMPA, UMR INRA-INAPG, Thiverval-Grignon, France) and was stored in 5% glycerol/non-fat dried milk at –80°C. *Y. lipolytica* was precultured by inoculating a single colony in 20 ml of synthetic cheese medium in 100-ml Erlenmeyer flasks for 48 h at 25°C under agitation (150 rpm). The synthetic cheese medium was composed (per liter of distilled water) of 1 g yeast extract (Gibco, Heidelberg, Germany), 15 g Bacto™ casamino acids (Difco Laboratories), 38 ml of a 60% sodium lactate stock solution (Prolabo, Fontenay-sous-Bois, France), 0.1 g $CaCl_2$ (Prolabo), 0.5 g $MgSO_4$ $7H_2O$ (Prolabo), 6.8 g KH_2PO_4 (Sigma-Aldrich, St-Quentin Fallavier, France), 10 g NaCl (Prolabo). After adjusting the pH to 5.5 ± 0.1, the medium was autoclaved

1 (120°C, 20 min) and then supplemented with 20 g lactose (Prolabo). One ml of this preculture
2 was then used to inoculate (1% v/v) 100 ml of synthetic cheese medium in 500-ml
3 Erlenmeyer flasks. Prior to inoculation, the L-methionine concentration was adjusted to 1 $g.l^{-1}$
4 (LM) or 6 $g.l^{-1}$ (HM) in the culture medium (Sigma-Aldrich). Cultures were incubated for at
5 least 96 h using the same conditions as described above. Viable cell counts, expressed as
6 colony-forming units ($CFU.ml^{-1}$), were determined following a standard aerobic plate count
7 procedure on Yeast Extract Glucose Chloramphenicol Agar (YEGC) (Biokar Diagnostics,
8 Paris, France). Surface inoculation was carried out by a spiral plater (Interscience, F-78860,
9 Saint-Nom-La-Bretèche, France) on Petri dishes to detect any microbial contamination. Plates
10 were incubated at 25°C for at least 2 days before the numbers of CFU were determined.
11 ***In silico* analysis.** Our first objective was to select *Y. lipolytica* genes encoding enzymes
12 possibly involved in L-methionine catabolism by this cheese-ripening yeast. Possible related
13 metabolic pathways were examined using the online service KEGG
14 (http://www.genome.ad.jp/kegg/pathway.html). We used *Saccharomyces cerevisiae*
15 sequences on the *Saccharomyces* Genome Database (SGD: http://www.yeastgenome.org/) as
16 queries and employed BLAST (2) to screen sequence databases for homology. The *Y.*
17 *lipolytica* sequence data were obtained from *Génolevures* public database
18 (http://cbi.labri.fr/Genolevures/). Even distantly related homologs to *S. cerevisiae* genes were
19 identified in order to ensure that potential genes of interest were collected in *Y. lipolytica*. The
20 results of our *in silico* analysis is presented in Table 1.
21 **Oligonucleotide probes design and microarrays construction.** DNA microarrays that
22 included nineteen annotated protein-encoding sequences of *Y. lipolytica* were developed. One
23 long oligonucleotide probe (70-mers) was designed for each gene of interest (Table 2) using
24 the ROSO software (23), optimized to select the most specific sequence of each gene.
25 Oligonucleotidic sequences were searched in the last 300 bases of each gene, with no stable

1 secondary structure and several optimal thermodynamic properties as defined by ROSO
2 (http://pbil.univ-lyon1.fr/roso/Home.php). As a final check, a low homology search using
3 BLASTN was performed against all *Y. lipolytica* genes to ensure that each probe was specific
4 of one single gene and would not display any cross-hybridization with any other gene. All of
5 the oligonucleotides that were designed were commercially synthesized without modification
6 by Qiagen Operon (Qiagen Operon, Alemeda, USA). In addition, six *Arabidopsis thaliana*
7 probes were used as external positive (with mRNA spiked) or negative (without mRNA
8 spiked) controls and provided by Stratagene (SpotReport Oligo Array Validation System;
9 Stratagene, La Jolla, CA, USA). Spotting onto Corning UltraGAPS Coated Slides (Gamma
10 Amino Propyl Silane surface; Corning Life Sciences, NY, USA) was performed at the
11 Transcriptome-Biochips Platform in Toulouse (http://genopole.toulouse.inra.fr) using a
12 VersArray ChipWriter Pro microarray (Bio-Rad). Probes were spotted in duplicate. After
13 printing, DNA elements were cross-linked to the slides by UV irradiation (Stratalinker UV
14 Crosslinker; Stratagene) and stored in a vacuum chamber until use.
15 **Cell lysis, total RNA extraction and labelling.** All solutions were prepared with 0.1%
16 diethylpyrocarbonate (DEPC; Sigma-Aldrich)-treated water and autoclaved at 121°C for 20
17 min. Plastic ware, surface and pipettors were decontaminated by using RNase AWAY®
18 (Molecular BioProducts, San Diego, California USA).
19 *Sample preparation.* Cells were centrifuged for 5 min at 8,200 *g* and 4°C. The pellets were
20 washed with Tris-EDTA buffer (TE 1X; 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0; Sigma-
21 Aldrich) and then resuspended in 150 µL of 10% *N*-lauroylsarcosine (Sigma-Aldrich) and 1
22 ml of RNeasy Lysis Buffer (RLT buffer; Qiagen, Hilden, Germany)-β-mercaptoethanol
23 (Sigma-Aldrich) (1:0.01). The suspension was vortex-mixed for approximately 3 min, poured
24 in sterile 2 ml Eppendorf tubes (each aliquot containing 800 µL of suspension) and then
25 stored at -80°C or used for the extraction.

1 *Total RNA isolation.* For the RNA extraction, 200 mg of zirconium beads (diameter, 0.1 mm;
2 BioSpec Products, Bartlesville, OK, USA) and 800 μL of RLT-β-mercaptoethanol were
3 added into an aliquot containing 800 μL of suspension (see above section). The mixture was
4 shaken in a FastPrep FP120 bead beating system (Bio101, Vista, CA, USA) for 30 s at a
5 machine speed setting of 6.0 $m.s^{-1}$. Samples were cooled down on ice for 1 min and the
6 shaking procedure was repeated a second time. Phase separation was carried out after a
7 centrifugation for 5 min at 1,700 *g* and 4°C. The aqueous phase was transferred to a fresh tube
8 and an equal volume of 70% ethanol was added after which the extraction was performed
9 with the RNeasy® Midi kit (Qiagen), according to manufacturer's instructions. Total RNA
10 was eluted directly from the RNeasy silica-gel membrane in 500 μL of DEPC-treated water
11 and immediately precipited by addition of 50 μL of 3M sodium acetate and 400 μL of
12 absolute isopropanol (4°C). Tubes were mixed by inversion and placed at -20°C for at least 2
13 hours. The RNA was collected by centrifugation (30 min, 20,800 *g*, 4°C) and the pellets were
14 washed twice with 250 μL of cold 70% ethanol, dried for 30 min at room temperature and
15 resuspended in 50 μL of TE 1X. Samples were then hydrated overnight at 4°C after addition
16 of 0.5 μL (20U) of RNase Inhibitor (RNasin; Promega, Madison, WI, USA). The RNA
17 integrity was visualized by an electrophoresis at 6 $V.cm^{-1}$ in a 1% agarose gel, which was
18 stained by 0.3 $\mu g.ml^{-1}$ ethidium bromide (Sigma-Aldrich) and photographed under UV light.
19 Quantity and purity were assessed by measurement of the A_{260}:A_{230} and A_{260}:A_{280} ratios using
20 a spectrophotometer (Beckman DU640B; Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA).
21 *Labelling of cDNA targets.* Total RNA was fluorescently labelled with the CyScribe™ First-
22 Strand cDNA Labelling kit (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA), without any
23 amplification, using both anchored oligo(dT) and random nonamers priming methods
24 together. Reverse transcription labelling reactions were performed at 42°C for 1.5 in a
25 thermocycler (GeneAmp PCR System 9700; Perkin-Elmer Applied Biosystems, Foster City,

CA, USA), by direct incorporation of dCTP-Cy3 (Amersham Biosciences) according to the manufacturer's instructions. RNA template and unincorporated fluorescent nucleotides were then eliminated by a chemical treatment (15 min at 37°C with 2M NaOH). After neutralization with 2M HEPES (pH 6.8) (Sigma-Aldrich), labelled cDNA was purified on GFX columns (CyScribe GFX Purification kit; Amersham Biosciences) and then concentrated using a Microcon YM-30 filter (Millipore, Bedford, MA, USA).

Microarray hybridization, washing, and scanning. Hybridization was performed using a slide for each biological replicate. To reduce the non-specific adsorption of fluorescent probes to the surface, microarray slides were prehybridized by injecting 5 µL of 10 $mg.ml^{-1}$ herring sperm DNA (Promega), previously heated at 95°C for 2 min, and 30 µL of DIGeasy hybridization buffer (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) to the slide covered with a 22 x 40 mm coverslip (premium printed cover glass LifterSlip; Erie Scientific Company, Portsmouth, NH, USA). The slide was then put in an individual hybridization chamber (Corning, Avon, France) and immersed in a water bath for 1 h at 60°C. It was then washed in 0.1X SSC and dried by centrifugation at 150 *g* for 3 min at room temperature before hybridization. Labelled targets and 5 µL of herring sperm DNA were heated at 95°C for 5 min for denaturation and then snap-cooled on ice. Twenty µL of the hybridization buffer were added to the mixture, then injected under a new coverslip. The hybridization chamber was incubated in a 60°C water bath for 18 h. Slides were then immersed in 2X SSC/0.1% SDS to remove the coverslip, and washed for 5 min in 2X SSC/0.1% SDS, 1X SSC and 0.2X SSC, successively, before drying by centrifugation. Slides were scanned at 532 nm (wavelength for Cy3 fluorescence) using a robot ScanArray 4000 (Packard Biosciences, Boston, MA, USA) with 5 µm pixel resolution. Pictures were generated by using appropriate gains on the photomultiplier tube (PMT) to obtain the highest signal intensity without saturation.

Image quantification and microarray data analysis. Hybridization signals were analysed using the software QuantArray (Packard BioChip Technologies**,** Billerica, MA, USA), and the mean fluorescence intensity of each spot quantified. Prior to data analysis, we did not subtract background values or use ratio measurements (24). In order not to introduce normalization conditions based on underlying biological hypotheses (for example, using the average of some house-keeping genes with the assumption that the expression level of such genes would not vary), the signal intensity for each spot of one given condition was normalized by the median (22). The expression level of each gene was then calculated as the average of all individual hybridizations.

High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) analyses. Culture samples stored at -20°C were thawed at 4°C, centrifuged (2,060 *g*, 15 min) and filtered using a polyethersulfone membrane filter (pore size, 0.22 µm; diameter, 33 mm; Dutscher, Brumath, France) before analysis. Lactose, glucose, galactose, lactate, α-keto-γ-methylthiobutyric acid (KMTBA) and α-hydroxy-γ-methylthiobutyric acid (HMTBA) contents of the filtrates were determined by HPLC (HPLC Waters TCM; Waters, Saint Quentin en Yvelines, France) with a cation exchange column (Aminex HPX-87H; diameter, 7.8 mm; length, 300 mm; Bio-Rad, Ivry-Sur-Seine, France) thermostated at 65°C. The mobile phase was sulfuric acid (0.01N) dispensed at 0.6 $ml.min^{-1}$ flow rate. Detection of compounds of interest were performed with a Waters 486 tunable ultraviolet/visible detector regulated at 210 nm, except lactose for which a Waters 410 differential refractometer were used. Methionine was analysed with a reversed-phase column (Symmetry C18; pore size, 100Å; diameter, 4.6 mm; length, 100 mm; Waters). A gradient of H_2O plus acetonitrile at a flow rate of 0.6 $ml.min^{-1}$ was applied as follows: 100% H_2O for 2.5 min, 100–90% for 0.5 min, 90–60% for 7 min, 60–100% for 4 min. UV detection at 210 nm was used. All compounds were quantified from calibration curves established with pure chemicals.

Solid-Phase Microextraction GC-MS analyses. The VSCs production was analyzed by an automatic solid-phase microextraction (SPME) method coupled to a gas chromatograph (Varian CP-3800; Varian Inc., Walnut Creek, CA, USA) and a single quadrupole mass spectrophotometer equipped with an impact electronic source (model 1200, Varian Inc.). Automation of the extraction and injection was achieved with a CombiPAL autosampler (CTC Analytics, Zwingen, Switzerland). Defrosted samples (5 ml) kept at 4°C were pre-incubated for 2 min at 40°C with agitation at 250 rpm. The extraction was carried out with a 100 µm PDMS fiber (Supelco, Bellefonte, USA) for 40 min at 40°C and equivalent agitation conditions. The sample was injected by desorption at 250°C for 60 s in splitless mode using the standard Varian split/splitless injector (model 1177, Varian Inc.). The volatiles were carried onto a non-polar capillary column (HP-5 MS, 30 m x 0.25 mm, 0.25 µm film thickness) swept by helium at a constant flow rate (1.2 ml/min). The compounds were then separated using the following temperature program. First, the temperature was maintained at 15°C for 8 min. Subsequently, the temperature reached 220°C with an increment of 5°C/min. Separated compounds were detected with an MS detector. Data were collected in the range of 30-400 atomic mass units at a rate of 2 scans/s. Volatile compounds were identified by comparison of their ion chromatograms with NIST/02 Mass Spectral Library (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, USA). Data were analyzed using Statgraphics Plus software (Statistical Graphics Corp., Englewood Cliffs XY 07632-0124 USA). Values are presented as means of three replicates ± standard deviations.

RESULTS

Substrates assimilated by *Y. lipolytica* for its growth under conditions that mimic cheese-ripening environment. The abilities of *Y. lipolytica* to degrade lactose, lactate and L-methionine were evaluated in a cheese-like medium. Effects of a low or a high concentration

of L-methionine – 1 $g.l^{-1}$ (LM medium) or 6 $g.l^{-1}$ (HM medium), respectively – in the culture medium were also compared. Data of *Y. lipolytica* growth and pH evolution are presented in both culture conditions (Fig. 1). Regardless of L-methionine initial concentration, *Y. lipolytica* (inoculated to 8.10^3 $CFU.ml^{-1}$) grew exponentially during the first 36 h of cultivation, to reach a population of about 10^8 $CFU.ml^{-1}$ at 48 h. Although L-methionine was depleted after 48h in the LM medium (Fig. 2), final cell yield was even higher than in HM medium (Fig. 1). This result is consistent with the greater utilization of lactate in LM medium at 72 h and 96 h. This suggests a shift from L-methionine to lactate catabolism after 48 h in the LM medium. A rise in pH (initially adjusted to 5.5 ± 0.1) was observed after 24 h of cultivation in both culture media, but was slightly lower in HM medium (- 0.3 pH unit at the end of the experiment (96 h)). The kinetics of lactose, lactate and L-methionine consumption were also followed during exponential and stationary phases for both culture conditions (Fig. 2). *Y. lipolytica* did not consume lactose in both culture media. Since no other sugar (glucose, galactose) was initially provided in the culture medium, the major carbon sources available for *Y. lipolytica* growth were lactate and amino acids. From HPLC analyses of culture supernatants, L-methionine was the most efficiently degraded carbon substrate in both culture conditions, independently of its initial concentration. Indeed, during growth in HM medium, almost 88% of the amino acid was consumed by *Y. lipolytica*, while the lactate initial amount (≈ 23 $g.l^{-1}$) remained unchanged until the end of the experiment (96 h). When *Y. lipolytica* cells were grown in LM medium, the lactate concentration started to decrease significantly at the end of the exponential phase, once L-methionine had been completely depleted. Consequently, *Y. lipolytica* did not assimilate lactate in the presence of L-methionine, this amino acid being efficiently used by *Y. lipolytica* as a substrate for its growth.

***In silico* prediction of the *Y. lipolytica* genes that could participate in L-methionine catabolism.** From the above results, our main objective was to identify the genes involved in

the L-methionine catabolic pathway in *Y. lipolytica*. Since L-methionine transamination pathway was found to be active in cheese-ripening yeasts, such as *Geotrichum candidum* (8), *Kluyveromyces lactis* (19) and *Y. lipolytica* (9), all genes that putatively encode aromatic or branched-chain aminotransferases were searched against the *Y. lipolytica* genome using the *Génolevures* public database. Two open reading frames (ORFs) encoding aromatic aminotransferases were identified on the basis of sequence homology with the known Sc*ARO8* and Sc*ARO9* genes of *Saccharomyces cerevisiae*. The Yl*ARO8* (*YALI0E20977g*) and Yl*ARO9* (*YALI0C05258g*) genes are located on the E and C chromosomes of *Y. lipolytica*, and exhibit 50% and 28% identity at the protein sequence level with Sc*ARO8* and Sc*ARO*9, respectively. *Y. lipolytica* has also two branched-chain aminotransferase genes, one with a mitochondrial targeting signal (Yl*BAT1*) and one which is cytosolic (Yl*BAT*2) (9). Lactic acid bacteria, mainly *Lactococcus lactis*, possess two enzymes, cystathionine β-lyase and cystathionine γ-lyase, which are able to convert L-methionine to methanethiol in a single-step (1, 13). In the cheese-ripening yeasts, the ability of these cystathionine lyases to carry out both the α,β-elimination and α,γ-elimination reactions on the L-methionine substrate has never been studied. A demethiolating activity is also suspected in certain yeasts, including *Y. lipolytica* under conditions simulating cheese ripening (4), but the genes involved have never been studied. By using BLASTP and *S. cerevisiae* cystathionine β/γ-lyase genes as queries, two homologs of Sc*STR3* and Sc*CYS3* were found in *Y. lipolytica*. One gene (*YALI0D00605g**) exhibits 48% identity at the protein sequence level with the cystathionine β-lyase Sc*STR3*, and another gene (*YALI0F05874g*) exhibits 66% identity with the cystathionine γ-lyase Sc*CYS3*. Nevertheless, the *Y. lipolytica* DNA sequences had no significant homology with the L-methionine γ-lyase gene (*mgl*), which catalyzes the one-step degradation of L-methionine to methanethiol in *Brevibacterium linens* (3). Since *Y. lipolytica* has a strictly oxidative metabolism, catabolism of all carbon sources transits through the

tricarboxylic acid cycle (TCA). Consequently, pyruvate metabolism is an important branch point in carbohydrate utilization. It probably controls different pathways crucial to determine the fate of the imported carbohydrates. For a more detailed analysis of L-methionine catabolism, a second group of genes involved in pyruvate metabolism was searched in *Y. lipolytica* genome. Table 1 shows results of our *in silico* comparative analysis between the target genes of *S. cerevisiae* and *Y. lipolytica*.

Gene expression profiles in the presence of L-methionine. We have carried out a microarray analysis of some *Y. lipolytica* genes that could participate to L-methionine catabolism under conditions simulating cheese ripening. The list of the selected genes and the corresponding designed oligonucleotide probes are given in Table 2. For gene expression measurements, samples were taken at three different times: at early (48 h), mid- (72 h) and late (96 h) stationary phase, when *Y. lipolytica* cells were grown in medium initially adjusted to 6 $g.l^{-1}$ of L-methionine (HM medium). Hybridization signals were quantified using the software QuantArray (Packard BioChip Technologies) and normalized by the median (for a statistical detailed analysis, see Materials and Methods). To evaluate the quality of the DNA-array data, the reproducibility of the duplicate spots on the arrays and the variations observed between replicate experiments were assessed. The data obtained from duplicate spots on the same array were highly reproducible (R^2>0.97) (Fig. 3a). As an indication of the reproducibility, spot intensities were also compared between pairs of arrays hybridized with two sets of Cy3-cDNA prepared from the same RNA extract (i.e., technical repeats). The results showed a good reproducibility between arrays (Fig. 3b); in all cases, a correlation coefficient >0.96 was generated. Spot intensities were also compared between pairs of cDNA arrays hybridized with two sets of Cy3-cDNAs prepared from two different RNA extracts from *Y. lipolytica* cells grown in identical conditions (i.e., biological repeats). As a representative example (Fig. 3c), the results also showed a good reproducibility between

arrays (R^2>0.94). A low variability was obtained (from spot-to-spot, slide-to-slide, and cDNA synthesis-to-cDNA synthesis) and served as a validation test for the use of our microarray. Table 3 shows the changes in gene expression during the stationary phase when the transcript level for each gene at 72 h and 96 h was compared to that at 48 h. For the samples from cultures in the mid-stationary phase (72 h), the expression of less genes was altered compared to the expression at 48 h. In contrast, the expression levels appeared to rebound at the late exponential phase since 32% of candidate genes were up-expressed more than twofold at 96 h. Among them, there were two genes predicted to be involved in amino acid transamination pathway in *Y. lipolytica*, Yl*BAT2* and Yl*ARO8*, and four genes related to pyruvate metabolism, Yl*ILV2*, Yl*PDB1*, *YALI0F05038g** and Yl*PDC6*. Other presumptive genes associated with L-methionine catabolic pathways (Yl*CYS3*, Yl*CYS4*, *YALI0D17402g**, Yl*STR3*) were down-expressed. These first results indicate that transcript levels in *Y. lipolytica* cells varied during the stationary phase, and quantitative differences were apparent. Concomitant with L-methionine catabolism, the identification of Yl*ARO8* gene strongly up-expressed (2.1 to 4.3-fold) – with a possible underestimation of the calculated expression ratios due to highly saturating signals at 96 h – indicates that the L-methionine transamination pathway is highly induced in *Y. lipolytica*.

Effects of L-methionine on gene expression and volatile sulfur compounds (VSCs) production. For a more detailed analysis of L-methionine catabolic pathway in *Y. lipolytica*, we have decided to identify genes which are transcriptionally up-regulated in the presence of L-methionine, and which may affect L-methionine conversion to VSCs. Gene expression profiles of the nineteen genes were analysed and compared at three different times during the stationary phase (48, 72 and 96 h), when *Y. lipolytica* was grown in HM or LM media. It must be pointed out that a complete depletion of L-methionine was observed in LM medium at 48 h (Fig. 2), whereas 3.7 $g.l^{-1}$ (61%) of L-methionine were still detected in HM medium at 48 h,

1.9 $g.l^{-1}$ (31%) at 72 h and 0.7 $g.l^{-1}$ (12%) at 96 h. Table 4 shows the results of the comparative analysis of gene expression in *Y. lipolytica* cells at different times for the two culture media (high- *versus* low-L-methionine conditions). It seems clear that, for the majority of the genes, there is a higher expression in presence of L-methionine (74 to 84% of genes). For instance, the aromatic aminotransferase Yl*ARO8* gene was found to be strongly up-regulated (11.0- to 15.1-fold) in HM compared to LM. (Fig. 2). The Yl*BAT2* gene, which encodes a branched-chain aminotransferase, was also positively regulated in presence of L-methionine (5.6- to 15.0-fold), whereas the expression levels of its homolog Yl*BAT1* appear to be hardly influenced by L-methionine (1.5- to 1.6-fold). In the same way, Yl*ARO9* transcript levels – although superior in HM than in LM – remained fairly stable over time (Table 4). No quantitative increase (expression ratios HM/LM < 2) was noticed for Yl*CYS3*, Yl*CYS4*, *YALI0D17402g**, Yl*STR3* transcripts in the presence of L-methionine. The above results show that the transamination pathway is of major importance in the breakdown of L-methionine in *Y. lipolytica* and that its induction is modulated by L-methionine concentration. Concomitant with these transcriptional analyses, biochemical measurements were performed throughout the cultures (Table 5). In HM medium, L-methionine degradation was accompanied by an important α-keto γ-methylthiobutyric acid (KMTBA) accumulation after 24 h. This latter was maximally detected (3.07 ± 0.07 $mmol.l^{-1}$) at 60 h and then gradually degraded. Since the enzymatic reduction of KMTBA to α-hydroxy γ-methylthiobutyric acid (HMTBA), previously observed in S. *cerevisiae* and *Kluyveromyces* sp. (20), was not detected in *Y. lipolytica* cultures, the production of VSCs was measured and compared at 72 h and 96 h in both culture conditions (Table 5). Methanethiol, dimethyl disulfide (DMDS) and dimethyl trisulfide (DMTS) were only detected in HM medium at 72 h and 96 h, which indicates a strong relationship between the VSCs production and the KMTBA disappearance. Low traces of methylthiopropanal (methional) were also detected in HM medium at 72 h.

1

2 **DISCUSSION**

3 Cheese-ripening yeasts develop during the early stage of ripening, and it is generally admited
4 that they neutralize the curd by consuming lactate (11) and may also contribute to the
5 formation of VSCs from L-methionine (4, 9, 19, 20). In the present study, we have assessed
6 the ability of *Yarrowia lipolytica* to grow, deacidify and generate VSCs under culture
7 conditions that mimic cheese-ripening environment.

8 As expected (6), *Y. lipolytica* is unable to assimilate lactose as carbohydrate substrate. Genes
9 that encode β-galactosidase (*LAC4*) and lactose permease (*LAC12*) in *Kluyveromyces* sp. were
10 not detected in the *Y. lipolytica* genome. Consequently, lactate and L-methionine were
11 evaluated as readily available carbon sources for *Y. lipolytica* growth in a cheese-like
12 medium. The effect of a low or a high concentration of L-methionine in the culture medium
13 was evaluated. In both culture media, HPLC analyses revealed that *Y. lipolytica* prefers L-
14 methionine to lactic acid as carbon source. Interestingly, *in silico* analysis revealed a striking
15 redundance of putative high-affinity L-methionine permease *MUP1* genes in *Y. lipolytica*
16 genome (*YALI0D16137g*, *YALI0F03498g*, *YALI0F25795g*, *YALI0D19646g* and
17 *YALI0F07018g*), higher than in other cheese-ripening yeasts genomes, like *Saccharomyces*
18 *cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis* and *Debaryomyces hansenii*. This suggests that such
19 methionine transporters may give a competitive advantage to *Y. lipolytica*, allowing it to
20 rapidly grow on L-methionine. Once L-methionine has been completely depleted in the
21 medium, *Y. lipolytica* assimilates lactate as a carbon source. Consequently, two independent
22 phenomena could explain the high pH increase in both culture conditions: (i) an increase in
23 the ammonia release concomitant with the L-methionine degradation; (ii) a deacidification of
24 the medium due to lactic acid consumption. The observation that *Y. lipolytica* could rapidly
25 grow and neutralise the two culture media, regardless of the carbon source used for its

growth, is also interesting. It suggests a positive effect of *Y. lipolytica* on the development of acid-sensitive microorganisms such as the coryneform bacteria – e.g. *Brevibacterium linens* – during ripening.

Furthermore, several genes 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 HM or LM media. A rearrangement in the expression of some genes were also observed when the L-methionine concentration of the growth medium was changed. Among them, the Yl*ARO8* and Yl*BAT2* genes (both predicted to be involved in amino acid transamination pathway) were found to be strongly modulated by L-methionine, clearly indicating their involvement in the L-methionine transamination step in *Y. lipolytica*. In contrast, the expression levels of Yl*ARO9* and Yl*BAT1* genes were hardly modulated by L-methionine concentration. Since it has been recently shown that the overexpression of the Yl*BAT1* gene significantly increased L-methionine transamination (9), we can speculate that the induction of the Yl*BAT1* gene depends on one or more host-specific conditions that may not be provided by our cheese-like medium. Nevertheless, the fact that the L-methionine transamination step is highly active in *Y. lipolytica* was confirmed: a transient accumulation of the transamination product – KMTBA – was observed in HM medium after 48 h of cultivation, which coincides with the maximum rate of L-methionine consumption. Furthermore, Yl*ARO8* gene product has been overproduced in *Escherichia coli* and purified. We found that YlAro8p had transaminase activity and was highly active on L-methionine (data not shown). Other studies will be done in order to evaluate the specificity of other *Y. lipolytica* transaminases towards amino acids, including L-methionine. In *K. lactis*, Kl*ARO8.1* and Kl*ARO8.2*, two homolog genes of Yl*ARO8* were found to be responsible for L-methionine aminotransferase activity (19). We

can therefore suspect that YlAro8p is involved in L-methionine transamination in *Y. lipolytica*.

Alpha-ketoglutarate (α-KG) is generally the preferred amino group acceptor for transamination reactions, and is usually generated through sugar catabolism. Since *Y. lipolytica* has a strictly oxidative metabolism, α-KG is most probably provided through the tricarboxylic acid cycle (TCA). The transcriptional analysis of genes related to the pyruvate metabolism showed that Yl*ILV6*, Yl*PDB1* and Yl*PDC6* were strongly up-regulated in the presence of L-methionine. The fact that Yl*PDB1* and Yl*PDC6* genes were also highly expressed at late stationary phase in HM medium may reflect the continued need for TCA cycle intermediates as precursors required for L-methionine catabolism. It might also be attributable to the utilization of the pyruvate as amino group acceptor for YlAro8p and YlBat2p, as previously described for ScAro9p (21). We show here that the transamination step is of crucial importance in the L-methionine conversion to MTL, and other subsequent VSCs, and that the regulation of their synthesis is at the crossroads between amino acids catabolism and central carbon metabolism in *Y. lipolytica*.

This is the first study in which genes associated with L-methionine catabolism or pyruvate metabolism in *Y. lipolytica* were identified, and then transcriptionally studied in relation to the L-methionine catabolism. Our results suggest that the conversion of L-methionine to MTL is initiated by a transamination step. This is supported by biochemical data which show that, in HM medium, the transamination product KMTBA yields were significantly increased together with VSCs production. In yeast *G. candidum*, KMTBA was found to transiently accumulate, and that its degradation corresponded to an overall increase in the production of VSCs (5, 8). Also, in the yeast *K. lactis* the genes, Kl*ARO8.1* and Kl*ARO8.2*, two homologs of Yl*ARO8*, were found to be responsible for L-methionine aminotransferase activity (19). Our data suggest that, in *Y. lipolytica*, L-methionine transamination involves two major

genes, Yl*ARO8* (*YALI0E20977g*) and Yl*BAT2* (*YALI0F19910g*) whose expression levels were increased in HM medium. Although a KMTBA-demethiolating activity has already been measured in *Y. lipolytica* (4), the mechanism which leads to the demethiolation of KMTBA to MTL could be studied at the transcriptional level in *Y. lipolytica*.

ACKNOWLEDGEMENTS

Orianne Cholet is grateful to Ecole Doctorale ABIES for a PhD scholarship. Nicolas Bonnaire is acknowledged for SPME-GC-MS measurements.

REFERENCES

1. Alting, A. C., W. Engels, S. van Schalkwijk, and F. A. Exterkate. 1995. Purification and characterization of cystathionine (beta)-lyase from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* B78 and its possible role in flavor development in cheese. Appl. Environ. Microbiol. **61:**4037-4042.

2. Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D. J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. **25:**3389-3402.

3. Amárita, F., M. Yvon, M. Nardi, E. Chambellon, J. Delettre, and P. Bonnarme. 2004. Identification and functional analysis of the gene encoding methionine-gamma-lyase in *Brevibacterium linens*. Appl. Environ. Microbiol. **70:**7348-7354.

4. Arfi, K., H. E. Spinnler, R. Tâche, and P. Bonnarme. 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.

1 **5. Arfi, K., F. Amárita, H. E. Spinnler, and P. Bonnarme.** 2003. Catabolism of volatile
2 sulphur compounds precursors by *Brevibacterium linens* and *Geotrichum candidum*, two
3 microorganisms of the cheese ecosystem. J. Biotechnol. **105:**245-253.
4 **6. Barnett, J. A., R. W. Payne, and D. Yarrow.** 2000. Yeasts: Characteristics and
5 Identification, 3rd ed. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.
6 **7. Berger, C., J. A. Khan, P. Molimard, N. Martin, and H. E. Spinnler.** 1999. The
7 production of sulfur flavors by 10 strains of *Geotrichum candidum*. Appl. Environ. Microbiol.
8 **65:**5510-5514.
9 **8. Bonnarme, P., K. Arfi, C. Dury, S. Helinck, M. Yvon, and H. E. Spinnler.** 2001. Sulfur
10 compound production by *Geotrichum candidum* from L-methionine: importance of the
11 transmination step. FEMS Microbiol. Lett. **205:**247-252.
12 **9. Cernat Bondar, D., J. M. Beckerich, and P. Bonnarme.** 2005. Involvement of a
13 branched-chain aminotransferase in production of volatile sulfur compounds in *Yarrowia*
14 *lipolytica*. Appl. Environ. Microbiol. **71:**4585-4591.
15 **10. Chin, H. W., and R. C. Lindsay.** 1994. Ascorbate and transition-metal mediation of
16 methanethiol oxidation to dimethyl disulfide and dimethyl trisulfide. Food Chem. **49:**387-
17 392.
18 **11. Corsetti, A., J. Rossi, and M. Gobbetti.** 2001. Interactions between yeasts and bacteria
19 in the smear surface ripened cheeses. Int. J. Food Microbiol. **69:**1-10.
20 **12. Cuer, A., G. Dauphin, A. Kergomard, J. P. Dumont, and J. Adda.** 1979. Flavour
21 properties of some sulfur compounds isolated from cheeses. Lebensm. Wiss. Technol.
22 **12:**258-261.
23 **13. Dobric, N., G. K. Y. Limsowtin, A. J. Hillier, N. P. B. Dudman, and B. E. Davidson.**
24 2000. Identification and characterization of a cystathionine beta/gamma-lyase from
25 *Lactococcus lactis* ssp *cremoris* MG1363. FEMS Microbiol. Lett. **182:**249-254.

1 **14. Engels, W. J. M..** 1997. Volatile and non-volatile compounds in ripened cheese: their
2 formation and their contribution to flavour. PhD Thesis. Wageningen Agricultural University,
3 Wageningen, the Netherlands.
4 **15. Gao, S., D. H. Oh, J. R. Broadbent, M. E. Johnson, B. C. Weimer, and J. L. Steele.**
5 1997. Aromatic amino acid catabolism by lactococci. Lait **77:**371-381.
6 **16. Gao, S., and J. L. Steele.** 1998. Purification and characterization of oligomeric species of
7 an aromatic amino acid aminotransferase from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* S3. J. Food
8 Biochem. **22:**197-211.
9 **17. Grill, H., S. Patton, and J. F. Cone.** 1966. Aroma significance of sulfur compounds in
10 surface-ripening cheese. J. Dairy Sci. **49:**409-412.
11 **18. Helinck, S., H. E. Spinnler, S. Parayre, M. Dame-Cahagne, and P. Bonnarme.** 2000.
12 Enzymatic *versus* spontaneous *S*-methyl thioester synthesis in *Geotrichum candidum*. FEMS
13 Microbiol. Lett. **193:**237-241.
14 **19. Kagkli, D. M., P. Bonnarme, C. Neuvéglise, T. M. Cogan, and S. Casaregola.** 2006. L-
15 methionine degradation pathway in *Kluyveromyces lactis*: identification and functional
16 analysis of the genes encoding L-methionine aminotransferase. Appl. Environ. Microbiol.
17 **72:**3330-3335.
18 **20. Kagkli, D. M., R. Tâche, T. M. Cogan, C. Hill, S. Casaregola, and P. Bonnarme.**
19 2006. *Kluyveromyces lactis* and *Saccharomyces cerevisiae*, two potent deacidifying and
20 volatile-sulphur-aroma-producing microorganisms of the cheese ecosystem. Appl. Microbiol.
21 Biotechnol. **73:**434-442.
22 **21. Kradolfer, P., P. Niederberger, and R. Hütter.** 1982. Tryptophan degradation in
23 *Saccharomyces cerevisiae*: characterization of two aromatic aminotransferases. Arch.
24 Microbiol. **133:**242-248.

1 **22. Quackenbush, J..** 2001. Computational analysis of microarray data. Nat. Rev. Genet.
2 **2:**418-427.
3 **23. Reymond, N., H. Charles, L. Duret, F. Calevro, G. Beslon, and J. M. Fayard.** 2004.
4 ROSO: optimizing oligonucleotide probes for microarrays. Bioinformatics **20:**271-273.
5 **24. Sekowska, A., S. Robin, J. J. Daudin, A. Hénaut, and A. Danchin.** 2001. Extracting
6 biological information from DNA arrays: an unexpected link between arginine and
7 methionine metabolism in *Bacillus subtilis*. Genome Biol. **2:**research0019.
8 **25. Spinnler, H. E., C. Berger, C. Lapadatescu, and P. Bonnarme.** 2001. Production of
9 sulfur compounds by several yeasts of technological interest for cheese ripening. Int. Dairy J.
10 **11:**245-252.
11 **26. Urrestarazu, A., S. Vissers, I. Iraqui, and M. Grenson.** 1998. Phenylalanine- and
12 tyrosine-auxotrophic mutants of *Saccharomyces cerevisiae* impaired in transamination. Mol.
13 Gen. Genet. **257:**230-237.
14 **27. Yvon, M., S. Thirouin, L. Rijnen, D. Fromentier, and J. C. Gripon.** 1997. An
15 aminotransferase from *Lactococcus lactis* initiates conversion of amino acids to cheese flavor
16 compounds. Appl. Environ. Microbiol. **63:**414-419.
17 **28. Yvon, M., and L. Rijnen.** 2001. Cheese flavour formation by amino acid catabolism. Int.
18 Dairy J. **11:**185-201.

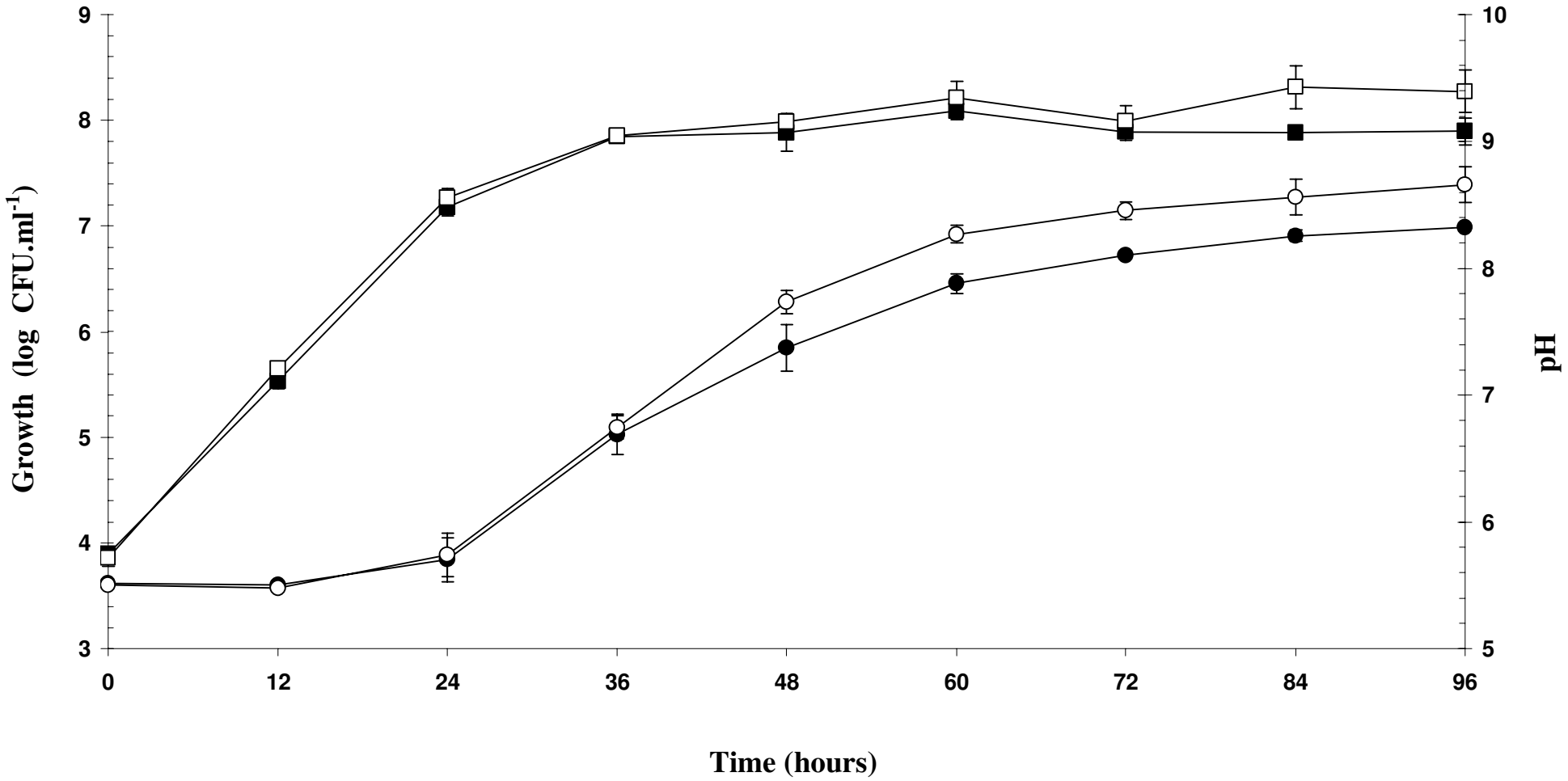
1

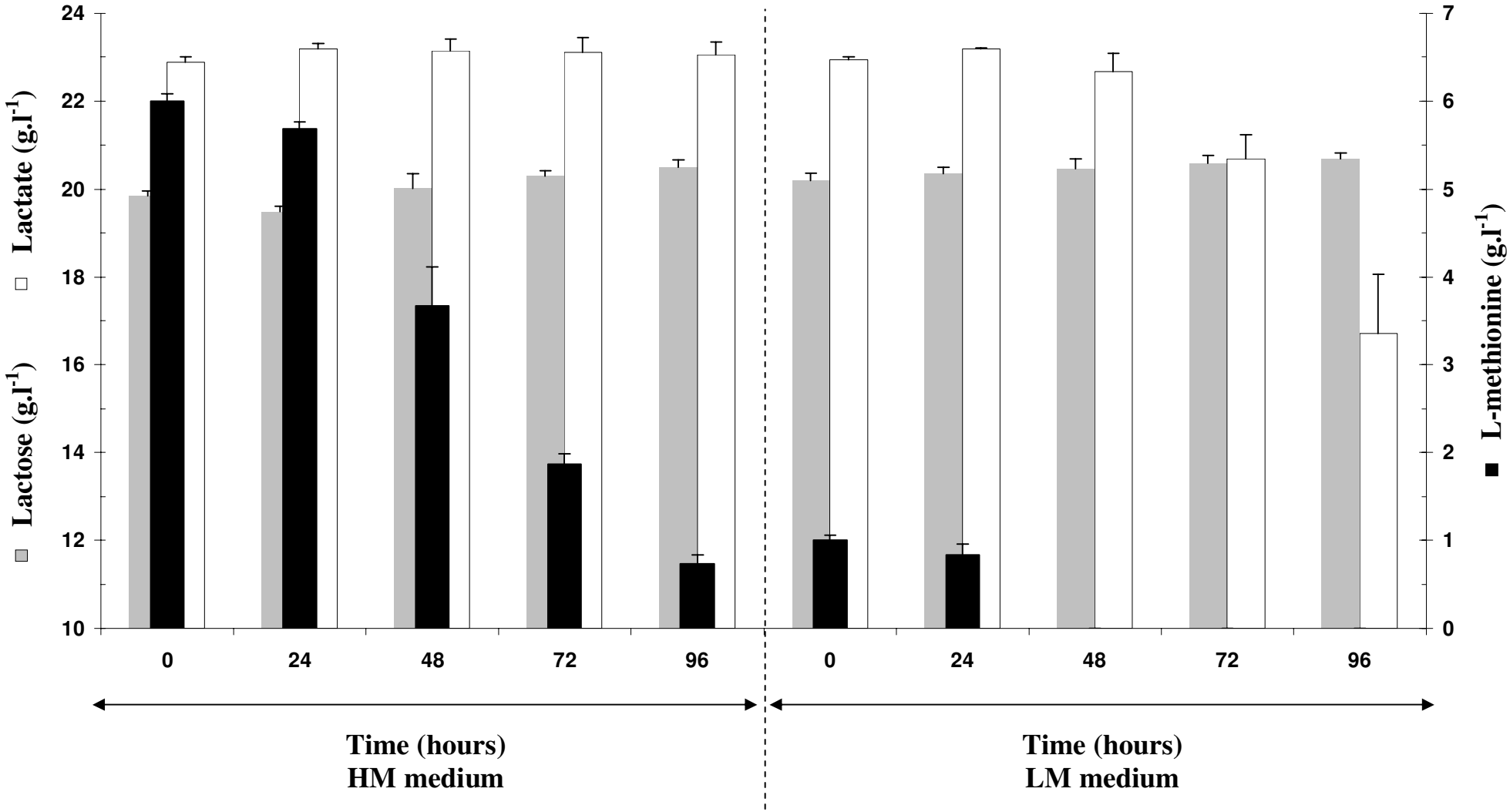
2 **FIGURE CAPTIONS**

3 **Figure 1.** *Yarrowia lipolytica* growth and pH evolution in a cheese-like medium initially
4 containing 6 $g.l^{-1}$ (closed symbols) or 1 $g.l^{-1}$ (open symbols) of L-methionine. Error bars
5 represent standard deviations calculated on the average value of three independent
6 determinations. ■ Growth; • pH.

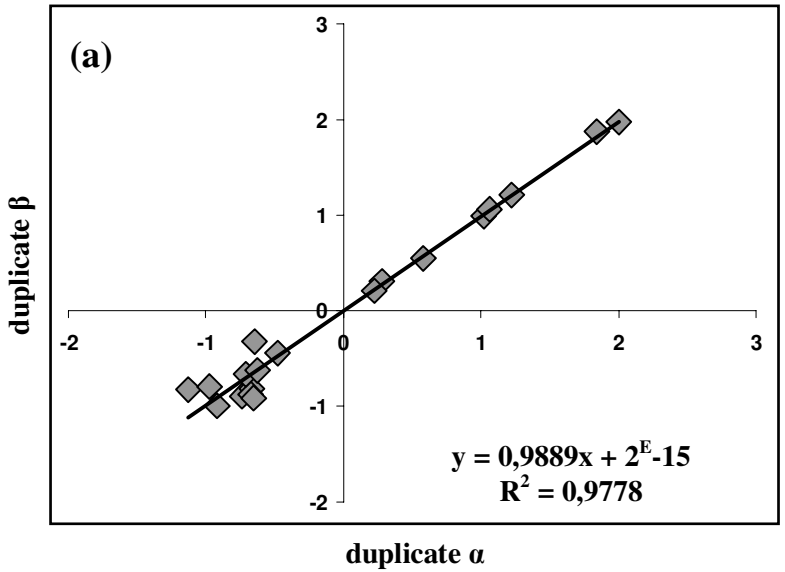
7 **Figure 2.** Effect of L-methionine concentration on the degradation of lactose, lactate and L-
8 methionine. The error bars indicate standard deviations.

9 **Figure 3.** Array quality and variation within and between experiments. The data are log
10 centre-reduced. **(a)** Comparison of the signal intensity of duplicate spots on the same array.
11 **(b)** Comparison of the signal intensity of pairs of arrays hybridized with two sets of Cy3-
12 cDNA probes prepared from the same RNA extract. **(c)** Comparison of the signal intensity of
13 pairs of arrays hybridized with two sets of Cy3-cDNA probes prepared from two different
14 RNA extracts from *Y. lipolytica* grown in the same conditions.

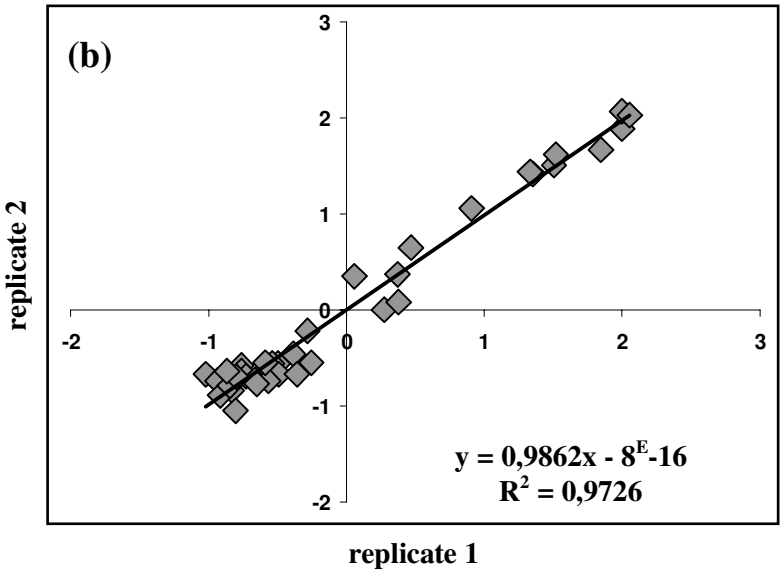

Growth (log CFU.ml-1)
pH
Time (hours)
9
8
7
6
5
4
3
10
9
8
7
6
5
0
12
24
36
48
60
72
84
96


Lactose (g.l-1)
Lactate (g.l-1)
L-methionine (g.l-1)
24
22
20
18
16
14
12
10
7
6
5
4
3
2
1
0
0
24
48
72
96
0
24
48
72
96
Time (hours)
HM medium
Time (hours)
LM medium

duplicate α *versus* duplicate β



replicate 1 *versus* replicate 2



experiment A *versus* experiment B

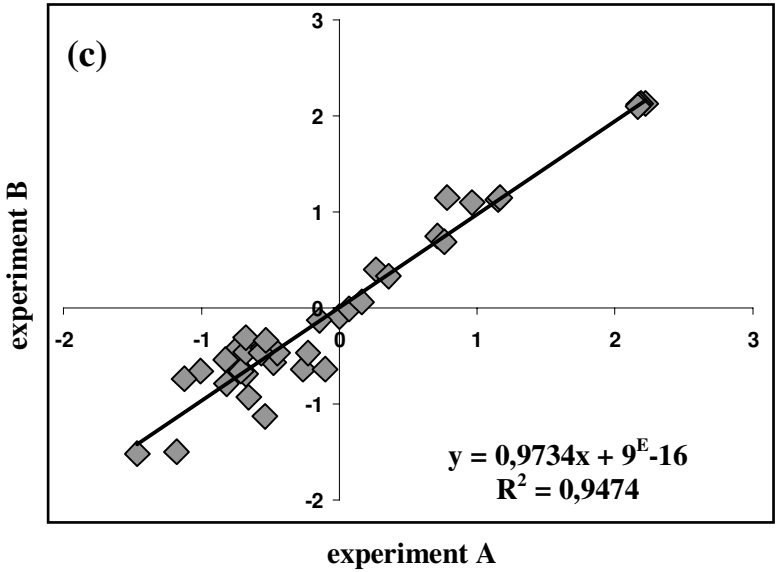


***Table 1: In silico* analysis of target genes from the *S. cerevisiae* and *Y. lipolytica* genomes.**

S. cerevisiae ORFs	SGD annotation[a]	Predicted translation product	*Y. lipolytica* orthologs[b]	Putative designation and functional comment	Predicted translation product	Blast result (similarity)	Expected value
Methionine, aromatic or branched-chain amino acids metabolisms							
YHR208w/BAT1	Mitochondrial branched-chain amino acid aminotransferase	**393**	***YALI0D01265g***	similar to sp|P38891 *S. cerevisiae* YHR208w BAT1 branched chain amino acid aminotransferase (mitochondrial)	**388**	**300/390 (76%)**	**E-146**
YJR148w/BAT2	Cytosolic branched-chain amino acid aminotransferase	**376**	***YALI0F19910g***	similar to sp|P47176 *S. cerevisiae* YJR148w BAT2 branched chain amino acid aminotransferase (cytosolic)	**373**	**209/374 (55%)**	**1E-62**
YGL202w/ARO8	Aromatic aminotransferase	**500**	***YALI0E20977g***	similar to sp|P53090 *S. cerevisiae* YGL202w ARO8 aromatic amino acid aminotransferase I	**495**	**332/496 (66%)**	**E-141**
YHR137w/ARO9	Aromatic aminotransferase	**513**	***YALI0C05258g***	weakly similar to sp|P38840 *S. cerevisiae* YHR137w ARO9 aromatic amino acid aminotransferase II	**532**	**259/521 (49%)**	**6E-59**
YLR244c/MAP1	Methionine aminopeptidase	**387**	***YALI0D17138g***	similar to sp|Q01662 *S. cerevisiae* YLR244c MAP1 methionine aminopeptidase (isoform 1)	**371**	**267/363 (73%)**	**E-127**
YBL091c/MAP2	Methionine aminopeptidase	**421**	***YALI0D05159g***	similar to sp|P38174 *S. cerevisiae* YBL091c MAP2 methionine aminopeptidase (isoform 2)	**471**	**295/468 (63%)**	**E-122**
YLR180w/SAM1	*S*-adenosylmethionine synthase	**382**	*no*				
YDR502c/SAM2	*S*-adenosylmethionine synthase	**384**	***YALI0B14509g****	highly similar to tr|Q9P842 *Candida albicans S*-adenosylmethionine synthase 2 (CaSAM2)	**386**	**340/380 (89%)**	**E-177**
YPL273w/SAM4	*S*-adenosylmethionine-homocysteine methyltransferase	**325**	***YALI0F25641g****	weakly similar to tr|Q8DZ17 *Streptococcus agalactiae* putative homocysteine *S*-methyltransferase MmuM	**348**	**161/353 (45%)**	**3E-29**
YAL012w/CYS3	Cystathionine γ-lyase	**394**	***YALI0F05874g***	similar to sp|P31373 *S. cerevisiae* YAL012w CYS3 cystathionine γ-lyase	**394**	**321/392 (81%)**	**E-147**
YGR155w/CYS4	Cystathionine β-synthase	**507**	***YALI0E09108g***	similar to sp|P32582 *S. cerevisiae* YGR155w CYS4 cystathionine β-synthase	**538**	**362/514 (70%)**	**E-146**
YJR130c/STR2	Cystathionine γ-synthase	**639**	*no*				
YLL058w	Molecular function unknown	**575**	***YALI0D17402g****	similar to tr|Q86ZL4 *Podospora anserina* putative cystathionine γ-synthase	**549**	**315/582 (54%)**	**1E-94**
YGL184c/STR3	Cystathionine β-lyase	**465**	***YALI0D00605g****	similar to tr|Q96VU8 *Neurospora crassa* cystathionine β-lyase	**434**	**269/419 (64%)**	**6E-99**
Amino acids and carbohydrate metabolisms							
YMR108w/ILV2	Acetolactate synthase (catalytic subunit)	**687**	***YALI0C00253g***	highly similar to sp|P07342 *S. cerevisiae* acetolactate synthase (mitochondrial precursor) (catalytic subunit)	**681**	**514/658 (78%)**	**0.0**
YCL009c/ILV6	Acetolactate synthase (regulatory subunit)	**309**	***YALI0C09636g***	similar to sp|P25605 *S. cerevisiae* acetolactate synthase (mitochondrial precursor) (regulatory subunit)	**288**	**226/283 (79%)**	**E-102**
YER178w/PDA1	E1α subunit of the pyruvate dehydrogenase (PDH) complex	**443**	***YALI0F20702g***	highly similar to sp|P16387 *S. cerevisiae* YER178w PDA1 pyruvate dehydrogenase (lipoamide) (subunit	**394**	**318/394 (80%)**	**E-155**

				E1α)			
YBR221c/PDB1	E1β subunit of the pyruvate dehydrogenase (PDH) complex	**366**	***YALI0E27005g***	highly similar to sp|P32473 *S. cerevisiae* YBR221c PDB1 pyruvate dehydrogenase (lipoamide) (subunit E1β)	**330**	**282/329 (85%)**	**E-132**
			YALI0F05038g*	similar to tr|Q9P5K8 *Neurospora crassa* probable 3-methyl-2-oxobutanoate dehydrogenase (lipoamide) (subunit E1β)	**398**	**195/355 (54%)**	**1E-49**
YLR044c/PDC1	Major of three pyruvate decarboxylase isozymes	**563**	***YALI0D10131g***	similar to sp|P06169 *S. cerevisiae* YLR044c PDC1 pyruvate decarboxylases (major isozyme)	**571**	**407/563 (72%)**	**0.0**
YLR134w/PDC5	Minor isoform of pyruvate decarboxylase	**563**	*no*				
YGR087c/PDC6	Minor isoform of pyruvate decarboxylase	**563**	***YALI0D06930g***	similar to sp|P26263 *S. cerevisiae* YGR087c PDC6 pyruvate decarboxylases (minor isozyme)	**600**	**338/577 (58%)**	**E-114**
YDR380w/ARO10	Phenylpyruvate decarboxylase	**635**	*no*				
YDL080c/THI3	Probable decarboxylase	**609**	*no*				

[a] annotation from *Saccharomyces* Genome Database (SGD) (http://www.yeastgenome.org/); [b] accession number of the *Y. lipolytica* sequences obtained from *Génolevures* (http://cbi.labri.fr/Genolevures/); ORFs: Open Reading Frames; *no*: no ortholog in *Y. lipolytica*;* distantly related homologs of *S. cerevisiae* (see putative designation).

Table 2: **List of ORFs selected and corresponding oligonucleotide probes for *Y. lipolytica* microarray construction.**

Y. lipolytica ORFs[ab]	Putative gene designation[b]	Corresponding oligonucleotide probes (70-mers)[c]
YALI0D01265g	***BAT1***	GAGACTGTTAATGAGTGGATTGGAGATATCCAGTACGGTAAGGATGAATACAAGGGATGGTCTAAGGTGG
YALI0F19910g	***BAT2***	TACAAGAACAAGGCTGGCAACAAGCTGATTCTGTTCCGACCCGAGCTCAACATGGCTCGTCTCAACGACT
YALI0E20977g	***ARO8***	ATCGACTTCATCAAGGAGCACACCACCATGATCCACAACATTCCTTACAAGAACTGGGACATTTGTGCCA
YALI0C05258g	***ARO9***	GCTGATATCGACCATTACACCTCCTTGATCGCTCCCTCTTACCTCACCATTGATGATGTAGGACTGGTTG
YALI0D17138g	***MAP1***	ACAGTTTGAGCACACTCTGTTAGTCACTGAGACTGGTGTGGAGATTCTCACCGCAAGATACAAGAACTCT
YALI0D05159g	***MAP2***	TGTTCCTATTGTCAAGTCTGCTGACATGACCAAGATGGAAGAGGGTGAGACCTTTGCCATCGAGACTTTT
YALI0B14509g*	***SAM2***	ACTCCGAGAAGGGTTTCGACTACAAGACCTGTAACGTGCTTGTTGCCATTGAGCAGCAGTCTCCCGATAT
YALI0F25641g*	***SAM4***	GGTCAGCCAAGTTCTTGCTTCCTATCAACTCCGATTTCCTCAAATGTATCGAAAGCGCCGATCCATGGAC
YALI0F05874g	***CYS3***	TCTCCTTCCGAATCAAGGGAGGAGCCGAGTCTGCCAACAAGTTCTGCCAGAACACCAAGATCTTCACTCT
YALI0E09108g	***CYS4***	CTTTCCATTGGCACTCCTTCTGGCGATAAGAAGGCCTCTAAGCAGCGACAGTTTGTGGAGGTTACTGTTG
YALI0D17402g*		CTCGTGTCGATTGTTTTGAACGACGAGGACTCAGCCAAGCGGTTTTTTGACACTCTTCAGACTGCCAAGG
YALI0D00605g*	***STR3***	AACGTGACTTCCCTGAGGATCTCATTCGATTGTGTGTTGGTATCGAAGACCCCGATGATCTGATTGATGA
YALI0C00253g	***ILV2***	CTATTGTCCTCAACAACGAGGAACAGGGTATGGTCACCCAGTGGCAGTCTCTCTTCTACGAGAACCGATA
YALI0C09636g	***ILV6***	GCTTCAACATTGATTCGCTGGTAGTGTGCAACACGGAGGTTGCCGATCTGTCGCGAATGACCATTGTTCT
YALI0F20702g	***PDA1***	CCAGTACATGCGATCCCACAACGATCCTATTTCTGGTCTCAAGGCCCACATCCTGGAGCTTAATTTCGCC
YALI0E27005g	***PDB1***	AACTGTCAAGCCTCTCGACACTGAGACCATTTTCAACTCCATCAAGAAGACTAACCGACTTGTCTCTGTC
YALI0F05038g*		ATTTGAAGATCTCCAGGTCCCCAACGTGACCCGAATCTTCCACTCCATCAAAAAGGCCATTGAGTATTAG
YALI0D10131g	***PDC1***	GGAATTGCATTCGGACCACGTCAAAATCAAGTCCGCCACCTACAACAACGTCGGCATGAAAATGCTGTTC
YALI0D06930g	***PDC6***	TGTTCGGATGTCAAGTTCAACACCAACAACTCACTTCTCACCCAGATCTTCTACTCGTGCATTGGTTTCA

[a] *Y. lipolytica* sequences obtained from *Génolevures* public database; [b] for functional comment, see Table 1; [c] oligonucleotide probes (70-mers) designed using the ROSO software (see Materials and methods); * distantly related homologs of *S. cerevisiae*.

Table 3: **List of ORFs predicted to be up-expressed or down-expressed during the stationary phase when *Y. lipolytica* was grown in a cheese-like medium initially containing 6 g.l^{-1} of L-methionine (HM).**
The transcript levels at 72 h and 96 h (mid- and late stationary phase) were compared to those at 48 h (early stationary phase).

Y. lipolytica ORFs	Putative designation and/or function[a]		Changes in gene expression during the stationary phase[bc] at:	
			72 h *(ratios 72/48)*	**96 h** *(ratios 96/48)*
Methionine, aromatic or branched-chain amino acids metabolisms				
YALI0D01265g	***BAT1***	branched-chain aminotransferase	-1.1	1.2
YALI0F19910g	***BAT2***	branched-chain aminotransferase	**-2.4**	**2.4**
YALI0E20977g	***ARO8***	aromatic aminotransferase	**2.1**	**4.3**[d]
YALI0C05258g	***ARO9***	aromatic aminotransferase	-1.2	1.8
YALI0D17138g	***MAP1***	methionine aminopeptidase	-1.7	**-3.0**
YALI0D05159g	***MAP2***	methionine aminopeptidase	-1.9	**-2.2**
YALI0B14509g*	***SAM2***	*S*-adenosylmethionine synthetase	-1.4	**-8.5**
YALI0F25641g*	***SAM4***	*S*-adenosylmethionine-homocysteine methyltransferase	-1.3	-1.0
YALI0F05874g	***CYS3***	cystathionine γ-lyase	-1.1	-1.5
YALI0E09108g	***CYS4***	cystathionine β-synthase	1.1	-1.1
YALI0D17402g*		putative cystathionine γ-synthase	**-2.2**	-1.9
YALI0D00605g*	***STR3***	cystathionine β-lyase	**-2.9**	**-3.2**
Amino acids and carbohydrate metabolisms				
YALI0C00253g	***ILV2***	acetolactate synthase (catalytic subunit)	-1.3	**2.7**
YALI0C09636g	***ILV6***	acetolactate synthase (regulatory subunit)	-1.6	1.9
YALI0F20702g	***PDA1***	pyruvate dehydrogenase (E1α subunit)	-1.4	1.8
YALI0E27005g	***PDB1***	pyruvate dehydrogenase (E1β subunit)	1.2	**5.7**[d]
YALI0F05038g*		probable 3-methyl-2-oxobutanoate dehydrogenase	1.1	**2.2**
YALI0D10131g	***PDC1***	pyruvate decarboxylase	-1.6	1.4
YALI0D06930g	***PDC6***	pyruvate decarboxylase	-1.4	**2.1**
	Number of genes induced more than twofold		**1**	**6**
	Number of genes repressed more than twofold		**3**	**4**

[a] for detailed annotation, see Table 1; [b] a negative or positive value indicates repressed or induced transcript levels respectively; [c] genes whose transcript levels varied more than twofold (|ratio| > 2.0) are indicated by boldface type; [d] spots with highly saturating signals at 96 h, leading to possible underestimation of the calculated expression ratios.

Table 4: **Up- and down-regulated genes by L-methionine.**
Samples were taken at early (48 h), mid- (72 h) and late (96 h) stationary phase when *Y. lipolytica* was grown in a cheese-like medium under high- or low-L-methionine conditions[a].

Y. lipolytica ORFs	Putative gene designation and/or function[b]		Fold changes[cd] at: (ratios HM/LM)		
			48 h	72 h	96 h
Methionine, aromatic or branched-chain amino acids metabolisms					
YALI0D01265g	***BAT1***	branched-chain aminotransferase	1.5	1.5	1.6
YALI0F19910g	***BAT2***	branched-chain aminotransferase	1.5	**5.6**	**15.0**
YALI0E20977g	***ARO8***	aromatic aminotransferase	1.1	**11.0**	**15.1**[e]
YALI0C05258g	***ARO9***	aromatic aminotransferase	1.7	1.7	**2.2**
YALI0D17138g	***MAP1***	methionine aminopeptidase	1.2	1.0	**-2.6**
YALI0D05159g	***MAP2***	methionine aminopeptidase	1.1	1.9	1.3
YALI0B14509g*	***SAM2***	*S*-adenosylmethionine synthase	-1.0	-1.6	**-6.7**
YALI0F25641g*	***SAM4***	*S*-adenosylmethionine-homocysteine methyltransferase	1.7	1.8	1.5
YALI0F05874g	***CYS3***	cystathionine γ-lyase	-1.3	-1.2	-1.5
YALI0E09108g	***CYS4***	cystathionine β-synthase	1.4	1.2	1.5
YALI0D17402g*		putative cystathionine γ-synthase	1.5	1.7	-1.0
YALI0D00605g*	***STR3***	cystathionine β-lyase	1.6	-1.5	**-2.1**
Amino acids and carbohydrate metabolisms					
YALI0C00253g	***ILV2***	acetolactate synthase (catalytic subunit)	**6.0**	1.1	1.7
YALI0C09636g	***ILV6***	acetolactate synthase (regulatory subunit)	**3.2**	1.1	**2.4**
YALI0F20702g	***PDA1***	pyruvate dehydrogenase (E1α subunit)	**2.0**	-1.0	1.3
YALI0E27005g	***PDB1***	pyruvate dehydrogenase (E1β subunit)	1.5	**4.6**	**11.9**[e]
YALI0F05038g*		probable 3-methyl-2-oxobutanoate dehydrogenase	**-3.2**	1.4	1.4
YALI0D10131g	***PDC1***	pyruvate decarboxylase	**2.4**	1.2	1.3
YALI0D06930g	***PDC6***	pyruvate decarboxylase	**2.1**	**2.7**	**2.9**
	Number of genes induced more than twofold		**5**	**4**	**6**
	Number of genes repressed more than twofold		**1**	**0**	**3**

[a] a complete depletion of L-methionine was observed in LM medium at 48 h, whereas 3.7 g.l-1 (61%) of L-methionine were still detected in HM medium at 48 h, 1.9 g.l-1 (31%) at 72 h and 0.7 g.l-1 (12%) at 96 h (Fig. 2); [b] for detailed annotation, see Table 1; [c] a negative or positive value indicates repressed or induced transcript levels respectively; [d] genes whose transcript levels varied more than twofold (|ratio| > 2.0) are indicated by boldface type; [e] spots with highly saturating signals at 96 h, leading to possible underestimation of the calculated expression ratios.

Table 5: **Production of KMTBA (mmol.l^{-1}) and VSCs (peak area x 10^{2}.CFU^{-1}) by *Y. lipolytica* cells growing in a cheese-like medium under high- or low-L-methionine conditions.**

	Time (h)	HM	LM
α-keto γ-methylthiobutyric acid (KMTBA)	0	*nd*	*nd*
	24	0.60 ± 0.03	*tr*
	48	2.90 ± 0.12	*tr*
	60	3.07 ± 0.07	*nd*
	72	2.86 ± 0.10	*nd*
	96	2.10 ± 0.11	*nd*
Methanethiol (MTL)	72	19.0 ± 1.4	*nd*
	96	22.9 ± 2.6	*nd*
Dimethyl disulfide (DMDS)	72	125.7 ± 47.2	0.2 ± 0.1
	96	52.8 ± 3.5	0.1 ± 0.0
Dimethyl trisulfide (DMTS)	72	0.1 ± 0.0	*tr*
	96	0.5 ± 0.1	*tr*
Dimethyl sulfide (DMS)	72	0.1 ± 0.0	*nd*
	96	0.3 ± 0.0	*nd*
Methylthiopropanal	72	*tr*	*nd*
	96	*nd*	*nd*

nd: not detected; *tr*: traces (< 0.1).

Résumé

Dans ce travail, nous avons montré que le catabolisme de la L-méthionine est initié par une transamination chez *Y. lipolytica*. Deux aminotransférases, codées par les gènes Yl*ARO8* et Yl*BAT2*, jouent un rôle prépondérant dans cette étape. En effet, les résultats de transcriptomique ont révélés que Yl*ARO8* et Yl*BAT2* sont fortement induits en présence de L-méthionine et, parallèlement, les données biochimiques ont montré qu'une augmentation de la concentration en L-méthionine dans le milieu de culture engendre une accumulation transitoire de KMTBA, puis la production de composés soufrés volatils (essentiellement méthanethiol et DMDS). Par contre, l'expression du gène Yl*BAC1* ne semble pas influencée par la concentration en L-méthionine dans notre milieu de culture. Lors de notre analyse *in silico* du génome de *Y. lipolytica* (comme préalable à la construction de notre puce), nous avons pu observer que les duplications de gènes sont fréquentes dans le génome de *Y. lipolytica*. En théorie, cela donne la possibilité à la cellule de produire des enzymes aux propriétés biochimiques différentes ou de contrôler leur expression en fonction de conditions particulières. Ceci pourrait, par conséquent, expliquer l'absence d'induction du gène Yl*BAC1*.

L'ensemble de ces résultats indique que l'analyse *in silico*, l'expression des gènes et les données biochimiques sont très bien corrélées et complémentaires. D'un point de vue méthodologique, cette étude nous a également permis de vérifier l'absence de cross-hybridation entre les ADNc-Cy3 de *Y. lipolytica* et les sondes oligonucléotidiques dessinées spécifiquement pour l'étude de *D. hansenii*, *K. marxianus* et *B. linens*. La prochaine étape de ce travail pourrait être la recherche d'enzymes pouvant dégrader le KMTBA. Il pourrait par exemple s'agir de décarboxylases ou de déméthiolases. Pour *S. cerevisiae*, ce travail a récemment commencé. Une analyse transcriptomique a révélé que, parmi les cinq gènes codant pour des décarboxylases thiamine-pyrophosphate-dépendantes chez *S. cerevisiae* (Sc*PDC1*, Sc*PDC5*, Sc*PDC6*, Sc*ARO10* et Sc*THI3*), seul le gène Sc*ARO10* était induit en présence de L-méthionine (Vuralhan *et al.*, 2005). Il convient toutefois de rappeler que, chez *Y. lipolytica* (souche CLIB122), le gène *ARO10* est absent (**Table 1** [**Article 2**]).

4.

Suivi de l'expression des gènes chez trois levures d'affinage, cultivées séparément puis en association.

La spécificité des sondes spottées sur la puce et la reproductibilité des protocoles de lyse cellulaire, d'extraction de l'ARN, de marquage et d'hybridation (**Fiches techniques 06** / **08** / **09**) ont été estimées à partir de cultures pures de *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces marxianus* et *Yarrowia lipolytica*. Afin d'évaluer si l'extraction préférentielle d'une espèce ou si une extraction partielle pouvait avoir lieu au sein d'un mélange complexe de cellules microbiennes, une extraction a également été réalisée à partir d'un mélange de cultures pures.

Pour identifier le rôle et la contribution exacts de la flore levure dans le catabolisme du lactose, du lactate et de la L-méthionine au cours de l'affinage, notre puce multi-espèces a ensuite été hybridée avec un mélange d'acides nucléiques obtenu à partir d'une culture mixte de *D. hansenii*, *K. marxianus* et *Y. lipolytica*. Des prélèvements ont été réalisés après 36, 72 et 120 h de culture, dans milieu synthétique mimant la composition d'un caillé fromager en début d'affinage (J1) (**Fiche technique 03**). Les cinétiques de croissance, l'évolution du pH, la consommation des substrats (lactose, lactate, L-méthionine) et la production de composés soufrés volatils ont été suivies au cours du temps.

Cette étude a fait l'objet d'un article :

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.* [**Article 3**]

Applied and Environmental Microbiology, Apr. 2007, p. 2561–2570 Vol. 73, No. 8
0099-2240/07/$08.00+0 doi:10.1128/AEM.02720-06
Copyright © 2007, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Gene Expression and Biochemical Analysis of Cheese-Ripening Yeasts: Focus on Catabolism of L-Methionine, Lactate, and Lactose▽†

Orianne Cholet,[1] Alain Hénaut,[3] Serge Casaregola,[2] and Pascal Bonnarme[1]*

UMR 782 Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires[1] and UMR1238 Microbiologie et Génétique Moléculaire,[2] INRA, F-78850 Thiverval-Grignon, France, and Laboratoire Génome et Informatique, UMR 8116, Tour Evry 2, F-91034 Evry, France[3]

Received 21 November 2006/Accepted 8 February 2007

DNA microarrays of 86 genes from the yeasts *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces marxianus*, and *Yarrowia lipolytica* were developed to determine which genes were expressed in a medium mimicking a cheese-ripening environment. These genes were selected for potential involvement in lactose/lactate catabolism and the biosynthesis of sulfur-flavored compounds. Hybridization conditions to follow specifically the expression of homologous genes belonging to different species were set up. The microarray was first validated on pure cultures of each yeast; no interspecies cross-hybridization was observed. Expression patterns of targeted genes were studied in pure cultures of each yeast, as well as in coculture, and compared to biochemical data. As expected, a high expression of the *LAC* genes of *K. marxianus* was observed. This is a yeast that efficiently 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. A set of genes possibly involved in L-methionine catabolism was also used on the array. *Y. lipolytica*, which efficiently assimilates L-methionine, also exhibited a high expression of the *Saccharomyces cerevisiae* orthologs *BAT2* and *ARO8*, which are involved in the L-methionine degradation pathway. Our data provide the first evidence that the use of a multispecies microarray could be a powerful tool to investigate targeted metabolism and possible metabolic interactions between species within microbial cocultures.

Cheese ripening is a complex phenomenon in which the curd undergoes a set of biochemical reactions during the ripening process. Such reactions are catalyzed by the microbial ecosystem living within the cheese matrix—among others, yeasts such as *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, and *Yarrowia lipolytica*, which play key roles in deacidification and the development of flavor compounds (3, 11).

The mechanisms by which yeast growth influences the maturation process are fermentation of lactose, utilization of lactic acid (with consequent pH increase), proteolytic and lipolytic activities, and release of autolysis products (13, 17). However, the contributions of yeasts to cheese flavor development during ripening are generally underestimated, and their roles are generally not well established. They develop at the early stages of ripening (16, 21, 22), when they participate in the deacidification of the curd through lactate/lactose consumption (11), and they could also be involved in flavor compound biosynthesis. Yeasts like *K. lactis*, *K. marxianus*, *Y. lipolytica*, and *D. hansenii* are found in a wide range of cheeses (11, 12, 16, 21, 31) and are expected to play an important role in the ripening. For instance, *K. lactis*, *K. marxianus*, and *D. hansenii* assimilate lactose, whereas a majority of yeast species isolated from cheese efficiently degrade lactate (11, 12). In smear soft cheese, the rise in pH at the cheese surface was found to be related to lactate degradation by *D. hansenii* (4, 21). The same situation prevails with *K. lactis* or *K. marxianus*, for which lactate degradation coincides with a dramatic increase in pH (4). The presence of yeasts during ripening is essential, since this rise in pH enables the acid-sensitive bacteria that are necessary for the cheese typicity to develop at the cheese surface. Due to the wide catabolic spectrum of *Y. lipolytica*, this yeast could be of interest in cheese making. A comparison of the technological characteristics of *D. hansenii* and *Y. lipolytica* has shown that *Y. lipolytica* was much more proteolytic and lipolytic than *D. hansenii* (30).

It has also been shown that cheese-ripening yeasts such as *Y. lipolytica*, *D. hansenii*, and *K. lactis* could produce volatile sulfur compounds (VSC) through L-methionine catabolism (3, 8, 19). The importance of such compounds in ripened cheese derives mainly from their reactivity and their high volatility at very low concentrations. Also, the involvement of a transamination step in L-methionine catabolism, as well as VSC production, has been demonstrated in *Y. lipolytica* (8) and *K. lactis* (19).

The recent publications of the genomes of some yeasts involved in cheese ripening (15, 28) opened new opportunities to investigate the metabolic capacities of such microorganisms during the making of dairy or other fermented food products. With the availability of whole-genome sequences, DNA microarray analysis offers the potential to monitor and compare the expression patterns of a wide range of mRNA species simultaneously (27). However, whole-genome DNA microarray analysis is generally used to examine differential expression patterns of genes of a single microorganism resulting, for example, from changes in the microbial environment, e.g., a stress effect, or in the microbial phenotype, e.g., biofilm formation (1, 23, 32). Analysis of gene expression is important, since changes in the physiology and metabolism of an organism

* Corresponding author. Mailing address: UMR 782 Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires, INRA, F-78850 Thiverval-Grignon, France. Phone: 33 1 30 81 53 88. Fax: 33 1 30 81 55 97. E-mail: bonnarme@grignon.inra.fr.

† Supplemental material for this article may be found at http://aem.asm.org/.

▽ Published ahead of print on 16 February 2007.

are the consequences of changes in the pattern of gene expression. With the availability of an increasing number of genome sequences from microorganisms of food ecosystems (e.g., dairy products, fermented beverages, and meat), strategies using mixed genome microarrays can be now considered.

Until now, changes occurring during ripening were based essentially on global biochemical data, such as enzymatic activities, consumption of substrates, and biosynthesis of products, but could not fully describe the specific involvement of a given microorganism in the whole process. More precisely, we were not able to know which gene products, related to one protein and/or one function, were expressed in a given microorganism of the cheese ecosystem. The cheese-ripening yeasts *D. hansenii*, *K. marxianus*, and *Y. lipolytica* were used as model organisms of a cheese ecosystem.

The first part of this work was devoted to the design of species-specific oligonucleotide probes and to the validation of microarray data. In the second part, we identified which genes related to L-methionine and lactose/lactate catabolism were expressed in yeast pure cultures and which were expressed in yeast cocultures. The expression profiles of candidate genes were simultaneously followed for the three yeasts cultivated in coculture at three culturing times.

MATERIALS AND METHODS

Yeast strains and storage conditions. Yeast strains used in this work were *Debaryomyces hansenii* 304, *Kluyveromyces marxianus* $44_{(8)}$ (initially named *K. lactis* $44_{(8)}$) and *Yarrowia lipolytica* 370. These microorganisms were from our laboratory collection, having originally been isolated from French cheeses. They were selected on the basis of their efficiency in producing volatile sulfur compounds that contribute to the quality of cheeses (3). The microorganisms were stored in 5% glycerol/nonfat dried milk at −80°C.

Culture conditions and media. The yeasts were cultivated in pure cultures or in coculture in 500-ml flasks containing 100 ml of medium. Precultures were cultivated for 2 days in potato dextrose broth (PDB) (Difco Laboratories, Detroit, MI) at 25°C with agitation (150 rpm). The PDB medium was inoculated with 1 ml of thawed stock suspension. These precultures served as inocula (1% vol/vol) for the subsequent cultures. The synthetic cheese medium (SCM) used for all strains was composed (per liter of distilled water) of 1 g yeast extract (Gibco, Heidelberg, Germany), 15 g Bacto Casamino Acids (Difco Laboratories), 38 ml of a 60% sodium lactate stock solution (Prolabo, Fontenay-sous-Bois, France), 0.1 g $CaCl_2$ (Prolabo), 0.5 g $MgSO_4$ $7H_2O$ (Prolabo), 6.8 g KH_2PO_4 (Sigma-Aldrich, St-Quentin Fallavier, France), 10 g NaCl (Prolabo). After adjusting the pH to 5.5 ± 0.1, the medium was autoclaved (120°C, 20 min) and then supplemented with 20 g · liter^{-1} lactose (Prolabo) and 6 g · liter^{-1} L-methionine (Sigma-Aldrich) prior to inoculation. Cultures were incubated at 25°C (150 rpm) for either 84 h or 120 h. The composition of the SCM was chosen since it corresponds to the amount of substrates (e.g., lactate and lactose) present in the curd of a soft cheese, like Camembert. The L-methionine concentration was chosen since it corresponds to the maximum amount of free L-methionine present in the curd of a soft cheese, like Camembert. This medium was shown to reproduce growth conditions found during ripening (21, 10).

Microbial analyses. Viable cell counts were determined as CFU ml^{-1} following a standard aerobic plate count procedure with yeast extract glucose chloramphenicol agar (Biokar Diagnostics, Paris, France). Surface inoculation was carried out by using a spiral plater (Intersciences, St-Nom La Bretèche, France) on 120-mm-diameter petri dishes to ensure immediate differentiation of the colonies based on their size, appearance, and pigmentation and to detect any microbial contamination. The dishes were incubated at 25°C, and colonies were counted after 48 to 72 h.

Oligonucleotide probes design. The appropriate design of oligonucleotide probes is crucial to ensure the success of transcriptional analyses. Therefore, one To-mer oligonucleotide probe was designed for each gene of interest, using ROSO software (26). *D. hansenii*, *K. lactis*, and *Y. lipolytica* sequence data were obtained from the Génolevures public database (http://cbi.labri.fr/Genolevures/). Oligonucleotide sequences were searched in the last 300 bases of each gene, with no stable secondary structure and several optimal thermodynamic properties as defined by ROSO (http://pbil.univ-lyon1.fr/roso/Home.php). As a final check, a low-homology search using BLASTN was performed against all genomes to ensure that each probe would not display any cross-hybridization. It should be noted that the *K. lactis* genome sequence was used to design the *K. marxianus* probes, because the two yeasts are closely related. The oligonucleotides used are listed in the supplemental material. They were synthesized by QIAGEN Operon (QIAGEN, Alameda, CA). In addition, six *Arabidopsis thaliana* probes were used as external positive controls and were provided by Stratagene (SpotReport Oligo array validation system; Stratagene, La Jolla, CA).

Oligonucleotide printing. Printing onto Corning UltraGAPS coated slides (gamma amino propyl silane surface; Corning Life Sciences, Corning, NY) was performed at the Transcriptome Biochips Platform in Toulouse using a spotter (VersArray ChipWriter Pro; Bio-Rad) with 12 pins (SMP3; Telechem International, Sunnyvale, CA) in a 3-by-4 format. Each microarray comprises 86 oligonucleotides (30 for *D. hansenii*, 29 for *K. lactis* [*K. marxianus*], and 27 for *Y. lipolytica*) deposited in duplicate and 6 *A. thaliana* species-positive controls replicated four times to generate sufficient data points, giving a total of 196 elements per microarray. The diameter of each spot was approximately 100 μm. After printing, DNA elements were cross-linked to the slides by UV irradiation (Stratalinker UV cross-linker; Stratagene) and stored in a vacuum chamber until use.

Extraction and purification of total RNA. (i) Sample preparation. Cells were centrifuged for 5 min at 8,200 × *g* and 4°C. The pellets were washed with Tris-EDTA (TE) buffer (1× TE; 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA [pH 8.0]; Sigma-Aldrich) and then resuspended in 150 μl of 10% *N*-lauroylsarcosine (Sigma-Aldrich) and 1 ml of RNeasy lysis buffer (RLT; QIAGEN, Hilden, Germany)–β-mercaptoethanol (Sigma-Aldrich) (1:0.01). The suspension was mixed by vortex for approximately 3 min, poured into sterile 2-ml Eppendorf tubes (each aliquot containing 800 μl of suspension), and then stored at −80°C or used for the extraction.

(ii) Total RNA isolation. For the RNA extraction, 200 mg of zirconium beads (diameter, 0.1 mm; BioSpec Products, Bartlesville, OK) and 800 μl of RLT-β-mercaptoethanol were added to an aliquot. The mixture was shaken in a FastPrep FP120 bead beating system (Bio101, Vista, CA) for 30 s at a machine speed setting of 6.0 m · s^{-1}. Samples were cooled down on ice for 1 min, and the shaking procedure was repeated a second time. Phase separation was carried out after a centrifugation for 5 min at 1,700 × *g* and 4°C. The aqueous phase was transferred to a fresh tube, and an equal volume of 70% ethanol was added, after which the extraction was performed with an RNeasy Midi kit (QIAGEN), according to the manufacturer's instructions. Total RNA was eluted directly from the RNeasy silica-gel membrane into 500 μl of diethylpyrocarbonate-treated water and immediately precipitated by the addition of 50 μl of 3 M sodium acetate and 400 μl of absolute isopropanol (at 4°C). Tubes were mixed by inversion and placed at −20°C for at least 2 h. The RNA was collected by centrifugation (30 min, 20,800 × *g*, 4°C), and the pellets were washed twice with 250 μl of cold 70% ethanol, dried for 30 min at room temperature, and resuspended in 50 μl of 1× TE. Samples were then hydrated overnight at 4°C after the addition of 0.5 μl (20 U) of RNase inhibitor (RNasin; Promega, Madison, WI). The RNA integrity was visualized by electrophoresis at 6 V · cm^{-1} with a 1% agarose gel, which was stained with 0.3 μg · ml^{-1} ethidium bromide (Sigma-Aldrich) and photographed under UV light. Quantity and purity were assessed by measurement of the ratios A_{260}:A_{230} and A_{260}:A_{280} by using a spectrophotometer (Beckman DU640B; Beckman Instruments, Fullerton, CA).

Labeling of cDNA targets. External RNA controls (*A. thaliana* mRNA spikes; SpotReport oligo array validation system, Stratagen) were added into total RNA samples (i) prior to cDNA synthesis, to control all of the downstream steps, and (ii) at different concentrations, to cover the entire range of expression levels of mRNAs of interest. mRNA of *A. thaliana* and mRNA of biological samples were then reverse transcribed and simultaneously cyanine 3 labeled with a CyScribe first-strand cDNA labeling kit (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ), without any amplification. Reverse transcription-labeling reactions were performed at 42°C for 90 min in a thermocycler (GeneAmp PCR system 9700; Perkin-Elmer Applied Biosystems, Foster City, CA) by direct incorporation of dCTP-Cy3 (Amersham Biosciences) according to the manufacturer's instructions. RNA template and unincorporated fluorescent nucleotides were then eliminated by a chemical treatment (15 min at 37°C with 2 M NaOH). After neutralization with 2 M HEPES (pH 6.8) (Sigma-Aldrich), labeled cDNA was purified on GFX columns (CyScribe GFX purification kit; Amersham Biosciences) and then concentrated using a Microcon YM-30 filter (Millipore, Bedford, MA).

Microarray hybridization and washing. To reduce the nonspecific adsorption of fluorescent probes to the surface, microarray slides were prehybridized by injecting 5 μl of 10 mg · ml^{-1} herring sperm DNA (Promega), previously heated at 95°C for 2 min, and 30 μl of DIGeasy hybridization buffer (Roche Diagnostics

GmbH, Mannheim, Germany) to the slide covered with a 22-by-40-mm coverslip (LifterSlip premium printed cover glass; Erie Scientific Company, Portsmouth, NH). The slide was then put into an individual hybridization chamber (Corning, Avon, France) and immersed in a water bath for 1 h at 60°C. It was then washed in 0.1× SSC (0.15 M NaCl plus 0.015 M sodium citrate) and dried by centrifugation at 150 × *g* for 3 min at room temperature before hybridization. Labeled targets and 5 μl of herring sperm DNA were heated at 95°C for 5 min for denaturation and then snap-cooled on ice. Twenty microliters of the hybridization buffer was added to the mixture and then injected under a new coverslip. The hybridization chamber was incubated in a 60°C water bath overnight. The slide was then immersed in a solution of 2× SSC, 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS) to remove the coverslip and washed in 2× SSC, 0.1% SDS at 55°C for 5 min and then in 1× SSC at room temperature, followed by a rinse in 0.2× SSC before being dried by centrifugation.

Scanning, and quantification of microarray data. Subsequently, slides were scanned at 532 nm (the wavelength for Cy3 fluorescence) using a robot ScanArray 4000 (Packard Biosciences, Boston, MA) with 5-μm-pixel resolution. Pictures were generated by using appropriate gains on the photomultiplier tube to obtain the highest signal intensity without saturation. Hybridization signals were analyzed with QuantArray software (Packard BioChip Technologies, Billerica, MA). The mean fluorescence intensity for each spot was quantified, and the expression level of each gene was calculated as the average of two individual hybridizations (duplicate probes for each gene of interest).

Statistical analysis of cDNA microarray experiments. The glass plates contained few genes. The mean fluorescence intensity is, thus, biased by those genes that were most highly expressed and is therefore not a reliable value for the normalization of data. It should be noted that as a consequence, the variance cannot be relied upon either, as it is calculated with the mean value. We decided therefore to work with the median and minimum values under each experimental condition (24). The minimum value was taken as the zero (value). For normalization, the median was used instead of the mean value, and the standard deviation was calculated using the difference between the median and the minimum values. The new (normalized) value of a given gene, *j*, under a given experimental condition, *c*, was as follows: $x'_{jc} = (x_{jc} - \min_c)/(\mathrm{med}_c - \min_c)$.

For statistical analyses, we applied the above procedure to the logged values. An analysis of variance (ANOVA) was performed using the GeneANOVA software (14). For each gene, the equation used was as follows: $Yikj = \mu + Ci + Bj + Rk + \varepsilon ijk$, where *Yikj* is the gene intensity; μ is the mean of the intensities of expression measured for the gene; *Ci*, *Bj*, and *Rk* are, respectively, the effects of analyzed "culture time," *i* (at early [36-h], mid- [72-h], or late [120-h] stationary phase); the biological repetition, *j*; and the spot replicate on microarray, *k*; and εijk is the residual error. The residual error, εijk, includes all the interactions. The threshold of 10% for the *f*alse *d*iscovery *r*ate (FDR) was chosen to select genes whose expression changes in the "time course" are significant (the FDR is the expected proportion of erroneously rejected null hypotheses among the rejected ones) (6, 25).

High-performance liquid chromatography analyses. Culture samples stored at −20°C were thawed at 4°C, centrifuged (2,060 × *g*; 15 min), and filtered using a polyethersulfone membrane filter (pore size, 0.22 μm; diameter, 33 mm; Dutscher, Brumath, France) before analysis. α-Keto-γ-methylthiobutyric acid (KMTBA) and α-hydroxy-γ-methylthiobutyric acid (HMTBA) contents of the filtrates were determined by high-performance liquid chromatography (HPLC Waters TCM; Waters, Saint Quentin en Yvelines, France) with a cation exchange column (diameter, 7.8 mm; length, 300 mm; Aminex HPX-87H; Bio-Rad, Ivry-Sur-Seine, France) thermostatted at 65°C. The mobile phase was sulfuric acid (0.01 N) dispensed at a 0.6-ml · min^{-1} flow rate. Detection of compounds of interest was performed with a Waters 486 tunable UV/visible detector regulated at 210 nm. Methionine was analyzed with a reversed-phase column (Symmetry C_{18}; pore size, 100 Å; diameter, 4.6 mm; length, 100 mm; Waters). A gradient of H_2O plus acetonitrile at a flow rate of 0.6 ml · min^{-1} was applied as follows: 100% H_2O for 2.5 min, 100 to 90% for 0.5 min, 90 to 60% for 7 min, and 60 to 100% for 4 min. UV detection at 210 nm was used. All compounds were quantified from calibration curves established with pure chemicals.

Solid-phase microextraction gas chromatography-mass spectrometry analyses. The VSC production was analyzed by an automatic solid-phase microextraction (SPME) method coupled to a gas chromatograph (Varian CP-3800; Varian, Inc., Walnut Creek, CA) and a single-quadrupole mass spectrophotometer equipped with an impact electronic source (model 1200, Varian, Inc.). Automation of the extraction and injection was achieved with a CombiPAL autosampler (CTC Analytics, Zwingen, Switzerland). Defrosted samples (5 ml) kept at 4°C were preincubated for 2 min at 40°C with agitation at 250 rpm. The extraction was carried out with 100-μm polydimethylsiloxane fiber (Supelco, Bellefonte, PA) for 40 min at 40°C and equal agitation conditions. The sample was injected by desorption at 250°C for 60 s in splitless mode using the standard Varian split/splitless injector (model 1177, Varian, Inc.). The volatiles were carried onto a nonpolar capillary column (HP-5 mass spectrometry; 30 m by 0.25 mm; 0.25-μm film thickness) swept by helium at a constant flow rate (1.2 ml/min). The compounds were then separated using the following temperature program. First, the temperature was maintained at 15°C for 8 min. Subsequently, the temperature reached 220°C with an increment of 5°C/min. Separated compounds were detected with a mass spectrometry detector. Data were collected in the range of 30 to 400 atomic mass units at a rate of 2 scans/s. Volatile compounds were identified by comparison of their ion chromatograms with those in the NIST/02 Mass Spectral Library (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD). Data were analyzed using Statgraphics Plus software (Statistical Graphics Corp., Englewood Cliffs, NJ). Values are presented as the means ± standard deviations of three replicates.

RESULTS

Choice of candidate genes for the multispecies microarray construction. Our first objective was to select genes possibly involved in the catabolism of lactose, lactate, and L-methionine. Taking *Saccharomyces cerevisiae* as the yeast reference, we therefore collected all the potential genes encoding such specific enzymes from the *Saccharomyces* Genome Database (http://www.yeastgenome.org/). Such genes were then searched for in the full genome of *D. hansenii* CBS767, *K. lactis* CLIB210, and *Y. lipolytica* CLIB122, using the Génolevures public database (http://cbi.labri.fr/Genolevures/). BLAST (2) was used to screen sequence databases for homology. Even distantly related homologs to *S. cerevisiae* genes were selected in order to ensure that potential genes of interest in *D. hansenii*, *K. lactis*, and *Y. lipolytica* were present on the microarray (Table 1). Possible related metabolic pathways were examined using the online service KEGG Pathway database (http://www.genome.ad.jp/kegg/pathway.html).

Growth, substrate assimilation, and metabolite production by yeasts *K. marxianus*, *D. hansenii*, and *Y. lipolytica* cultivated as pure cultures or in cocultures. (i) Growth of microorganisms and pH over time. Growth of the three yeasts cultivated separately or in coculture are shown in Fig. 1. The development of *K. marxianus* started (Fig. 1a) after a 24-h lag phase during which the initial population remained unchanged (approximately 2.10^4 CFU ml^{-1}). The *K. marxianus* population steadily increased between 30 h and 62 h of culture, reaching around 3.10^8 CFU ml^{-1} until the end of the experiment. In contrast, *D. hansenii* and *Y. lipolytica* displayed a continuous and rapid development in the first hours of the cultivation (Fig. 1b and c), increasing from an initial population of almost 2.10^4 CFU ml^{-1} to between 4.10^8 CFU ml^{-1} and 8.10^7 CFU ml^{-1} at 38 h, respectively. Thereafter, *D. hansenii* showed a stationary phase until 80 h, whereas the *Y. lipolytica* population stabilized at 10^8 CFU ml^{-1} after 58 h of cultivation. When the strains were cultivated in coculture (Fig. 1d), whereas the development of *Y. lipolytica* did not differ significantly, the maximal populations were significantly decreased (<1 to 1.5 log units) for *D. hansenii* and *K. marxianus* compared to those of pure cultures. However, the initial growth of all yeasts was accelerated when cultivated in coculture. This was particularly clear with *K. marxianus*, for which no lag phase was observed when it was cultivated in coculture with *D. hansenii* and *Y. lipolytica* (Fig. 1d). The initial growth acceleration observed in coculture, compared to that in pure cultures, suggests that there is a competition for growth among the yeasts.

TABLE 1. List of selected genes from *S. cerevisiae* and their respective homologues in *D. hansenii*, *K. lactis*, and *Y. lipolytica*

Gene name	*S. cerevisiae* ORFs	SGD annotation[a]	Yeast type strain and accession no.[b]		
			D. hansenii CBS767	*K. lactis* CLIB210	*Y. lipolytica* CLIB122
LAC4	No orthologue	β-Galactosidase	*DEHA0G26345g*	*KLLA0B14883g*	NMF
LAC12	No orthologue	Lactose permease	*DEHA0G26367g*	*KLLA0B14861g*	NMF
JEN1	*YKL217w*	Lactate transporter	*DEHA0F18843g* *DEHA0D20427g** *DEHA0F28809g**	*KLLA0E16313g* *KLLA0F10043g*	*YALI0D24607g* *YALI0D20108g* *YALI0C15488g* *YALI0E32901g* *YALI0C21406g* *YALI0B19470g*
CYB2	*YML054c*	Lactate dehydrogenase cytochrome b_2	*DEHA0E01166g*	*KLLA0D02640g* *KLLA0B14795g*	*YALI0E21307g*
DLD1	*YDL174c*	Lactate ferrocytochrome *c* oxidoreductase	*DEHA0D09658g**	*KLLA0E19789g* *KLLA0D03344g*	*YALI0E03212g*
DLD2	*YDL178w*	Lactate ferrocytochrome *c* oxidoreductase	*DEHA0F07612g**	*KLLA0B01397g**	NMF
ILV2	*YMR108w*	Acetolactate synthase (catalytic subunit)	*DEHA0G02574g**	*KLLA0B12584g*	*YALI0C00253g*
ILV6	*YCL009c*	Acetolactate synthase (regulatory subunit)	*DEHA0E22869g**	*KLLA0F12364g*	*YALI0C09636g*
PDA1	*YER178w*	E1α subunit of the PDH complex	*DEHA0G13728g**	*KLLA0F12001g*	*YALI0F20702g*
PDB1	*YBR221c*	E1β subunit of the pyruvate dehydrogenase (PDH) complex	*DEHA0C10065g*	*KLLA0F09603g*	*YALI0E27005g* *YALI0F05038g**
PDC1	*YLR044c*	Major of three pyruvate decarboxylase isozymes	*DEHA0G19525g** *DEHA0B03784g* *DEHA0D18381g**	*KLLA0E16357g*	*YALI0D10131g*
PDC6	*YGR087c*	Minor isoform of pyruvate decarboxylase	NMF	NMF	*YALI0D06930g*
THI3	*YDL080c*	Probable decarboxylase	NMF	*KLLA0F16962g*	NMF
ARO10	*YDR380w*	Phenylpyruvate decarboxylase	*DEHA0D11066g**	*KLLA0E02662g*	NMF
BAT1	*YHR208w*	Mitochondrial branched-chain amino acid aminotransferase	NMF	*KLLA0A10307g*	*YALI0D01265g*
BAT2	*YJR148w*	Cytosolic branched-chain amino acid aminotransferase	*DEHA0D07689g**	NMF	*YALI0F19910g*
ARO8	*YGL202w*	Aromatic aminotransferase	*DEHA0A06974g* *DEHA0A00253g** *DEHA0A00231g**	*KLLA0F10021g* *KLLA0A04906g*	*YALI0E20977g*
ARO9	*YHR137w*	Aromatic aminotransferase	NMF	*KLLA0D11110g*	*YALI0C05258g*
MAP1	*YLR244c*	Methionine aminopeptidase	*DEHA0G13937g**	*KLLA0D18436g*	*YALI0D17138g*
MAP2	*YBL091c*	Methionine aminopeptidase	*DEHA0C04444g*	*KLLA0E06875g*	*YALI0D05159g*
SAM2	*YDR502c*	*S*-Adenosylmethionine synthase	*DEHA0E14751g*	*KLLA0C01782g*	*YALI0B14509g**
SAM4	*YPL273w*	*S*-Adenosylmethionine-homocysteine methyltransferase	*DEHA0A00869g**	*KLLA0D01551g*	*YALI0F25641g**
CYS3	*YAL012w*	Cystathionine γ-lyase	*DEHA0C16863g**	*KLLA0F07909g*	*YALI0F05874g*
CYS4	*YGR155w*	Cystathionine β-synthase	*DEHA0C15708g*	*KLLA0F09317g*	*YALI0E09108g*
STR3	*YGL184c*	Cystathionine β-lyase	*DEHA0A06897g**	*KLLA0C17028g*	*YALI0D00605g**
STR2	*YJR130c*	Cystathionine γ-synthase	*DEHA0D10285g**	*KLLA0B04378g*	NMF
	YLL058w	Hypothetical cystathionine γ-synthase	NMF	NMF	*YALI0D17402g**
	YHR112c	Cystathionine γ-synthase activity	*DEHA0A01144g* *DEHA0A01529g*	*KLLA0E21406g*	NMF

[a] Annotations from the *Saccharomyces* Genome Database (SGD) (http://www.yeastgenome.org/).
[b] Accession numbers of sequences were obtained from Génolevures (http://cbi.labri.fr/Genolevures/). NMF, no matches found; *, distantly related homolog of *S. cerevisiae* (see putative designations in the supplemental material).

The pH measurements showed that the three yeasts were able to neutralize the medium when cultivated as pure cultures but not when cultivated in coculture. We can reasonably suspect that most metabolites responsible for the neutralization of the medium in yeast pure cultures are catabolized by the yeast coculture. The nature of such metabolites remains to be identified. For *K. marxianus* cultures (Fig. 1a), a rise in pH was observed after 38 h of incubation and reached a plateau (pH 7.0 ± 0.2) after 72 h. *D. hansenii* and *Y. lipolytica* cultures followed similar variation patterns (Fig. 1b and c), although *Y. lipolytica* was the most efficient at increasing the pH (Fig. 1c). For both yeasts, the pH started to increase after 16 h and kept increasing thereafter until the end of the experiment. The rise in pH by *D. hansenii* cultures (Fig. 1b) was slightly slower and the final pH was lower than in *Y. lipolytica* cultures. In yeast cocultures, the pH started to increase after 16 h and reached a maximum (pH 6.3 ± 0.2) after 50 h (Fig. 1d), then steadily decreased thereafter, to increase again after 95 h of cultivation.

(ii) Lactose and lactate consumption. The initial concentration of lactate was 22.9 ± 0.1 g · liter^{-1} and that of lactose was 18.3 ± 0.3 g · liter^{-1} (Table 2). Most lactose (over 92%) was consumed between 30 h and 62 h in *K. marxianus* cultures, while lactate was hardly consumed during the remaining time. During the stationary phase, 16% of the lactate was consumed, and lactose was completely exhausted at 72 h. In *D. hansenii* cultures, lactose consumption was progressive and continuous: 10% of the lactose was catabolized at 30 h, 34% at 55 h, and over 67% at 72 h. The degradation of the lactate paralleled

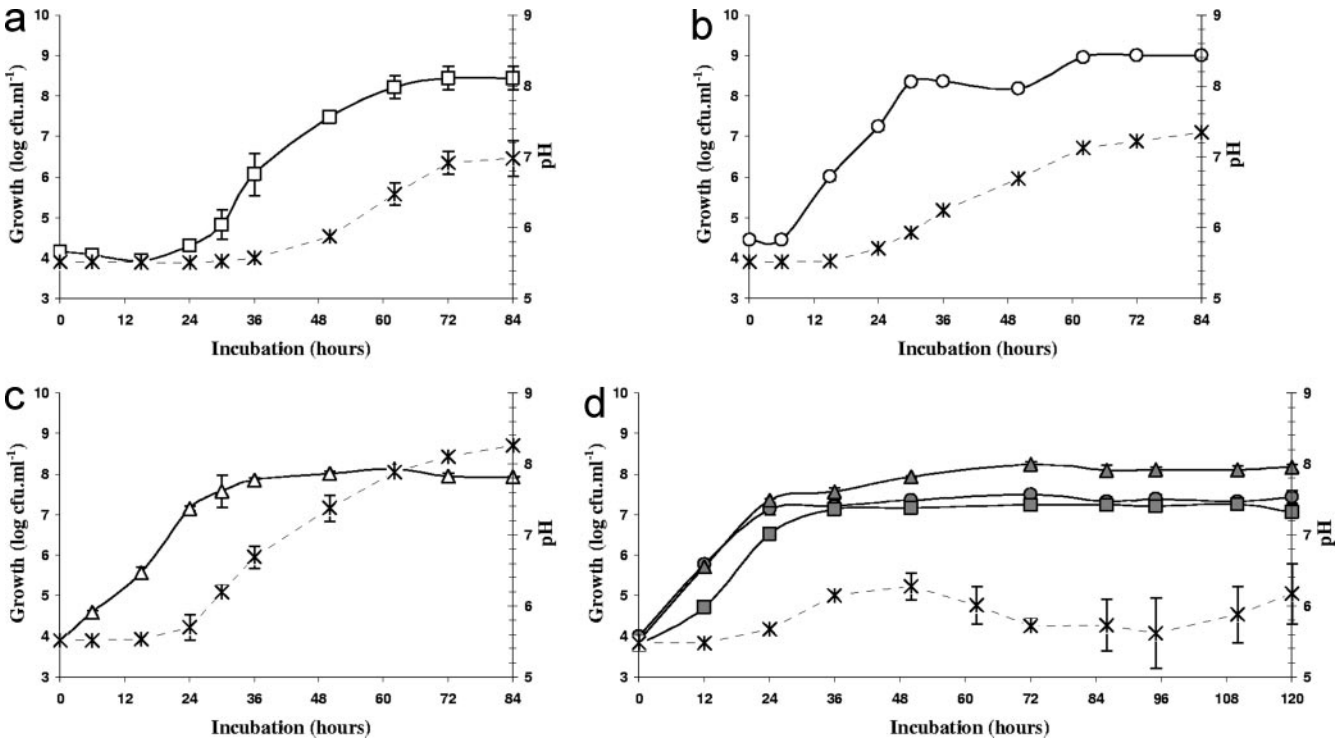


FIG. 1. pH and growth of three yeasts cultivated separately (open symbols) and in coculture (closed symbols) over time. (a) □, *K. marxianus* alone; (b) ○, *D. hansenii* alone; (c) △, *Y. lipolytica* alone; (d) ■, *K. marxianus*; ●, *D. hansenii*; and ▲, *Y. lipolytica* in coculture. ✳, pH levels. Error bars represent standard deviations calculated on the average values of six determinations.

lactose consumption after 30 h. In contrast to the other yeasts, *Y. lipolytica* consumed neither lactose nor lactate in the SCM, and initial concentrations remained unchanged during the 84 h of culture. In cocultures, lactose consumption was progressive, whereas lactate was hardly consumed. Also, the pH did not rise significantly in cocultures (Fig. 1d) compared to that of pure cultures (Fig. 1a, b, and c). Since all yeast species could develop in cocultures (Fig. 1d), this suggests a coculture effect among yeasts. It is possible that metabolites possibly involved in the neutralization process observed in yeast pure cultures are catabolized by the yeast coculture, resulting in no significant change in pH (Fig. 1d).

(iii) L-Methionine consumption and KMTBA and HMTBA biosynthesis. The results obtained showed that the consumption of L-methionine was much more important in *Y. lipolytica* cultures than in others (Table 2). Indeed, while *Y. lipolytica* consumed over 77% of L-methionine within 72 h, only 16% and almost 4% of the initial amount of this amino acid was utilized at this time by *K. marxianus* and *D. hansenii*, respectively (Table 2). In yeast cocultures, 22% of the L-methionine was consumed after 72 h and 32% after 120 h. In parallel to L-methionine degradation, a transient accumulation of the transamination product KMTBA was observed in the yeast coculture and in *Y. lipolytica* culture, although it was much more important in *Y. lipolytica* culture (Table 2). Moreover, HMTBA, which is the reduction product of KMTBA, was detected in *K. marxianus* and *D. hansenii* cultures, as well as in the yeast cocultures. The absence of HMTBA from *Y. lipolytica* cultures indicated that this strain is strongly oxidative.

(iv) Volatile sulfur compound biosynthesis. The production of VSC was measured in the pure cultures of the three yeasts, as well as in yeast cocultures (Table 3). *Y. lipolytica* was by far the most efficient of the yeasts at producing VSC, with dimethyl disulfide being the major sulfur compound produced. This is in agreement with the fact that *Y. lipolytica* can degrade L-methionine most efficiently among the three yeasts (Table 2). The thioester methylthioacetate was produced only by *D. hansenii* and *K. marxianus*. In yeast cocultures, VSC production was lower than in *Y. lipolytica* cultures and surpassed the VSC biosynthesis of the two other yeasts, *D. hansenii* and *K. marxianus*. This suggests that the presence of *Y. lipolytica* promotes VSC production within the yeast coculture.

Gene expression analyses. (i) Multispecies microarray validation with pure cultures. *D. hansenii*, *K. marxianus*, and *Y. lipolytica* were first cultivated separately in the SCM containing lactose, lactate, and L-methionine. Cells were grown to late exponential phase on the basis of kinetic studies performed as described above (Fig. 1), 36 h for *D. hansenii* and *Y. lipolytica* and 55 h for *K. marxianus*, and total RNA isolation was performed.

The presence of homologs on the same microarray increases the risk of cross-hybridizations. Effects of hybridization temperature on the hybridization efficiency and stringency were thus determined. First, assays were made at 42 and 52°C, and cross-hybridizations were observed between sequences of the three yeasts (data not shown). By increasing the hybridization temperature to 60°C, cross-hybridizations were avoided while keeping a high fluorescence signal (Fig. 2). For example, very

TABLE 2. Lactose, lactate, and L-methionine consumption and KMTBA and HMTBA production by *K. marxianus*, *D. hansenii*, and *Y. lipolytica* cultivated in pure cultures and in cocultures[a]

Yeast	Time (h)	% of consumption (g · liter^{-1}) of:			% of production (g · liter^{-1}) of:	
		Lactose	Lactate	L-Methionine	KMTBA	HMTBA
K. marxianus	0	18.4 ± 0.1	22.9 ± 0.1	5.73 ± 0.05	ND	ND
	30	18.3 ± 0.1	22.9 ± 0.1	5.77 ± 0.19	ND	ND
	36	18.2 ± 0.1	22.8 ± 0.2	5.82 ± 0.04	0.01 ± 0.00	0.03 ± 0.00
	55	8.9 ± 0.8	22.6 ± 0.7	5.39 ± 0.15	0.03 ± 0.00	0.09 ± 0.00
	62	1.4 ± 0.1	22.2 ± 0.3	5.05 ± 0.10	0.01 ± 0.00	0.12 ± 0.01
	72	ND	19.6 ± 0.6	4.79 ± 0.11	0.02 ± 0.00	0.16 ± 0.01
	84	ND	18.6 ± 0.7	4.69 ± 0.06	0.02 ± 0.00	0.22 ± 0.02
D. hansenii	0	18.3 ± 0.1	22.9 ± 0.1	5.81 ± 0.02	ND	ND
	30	16.5 ± 0.7	22.7 ± 0.1	5.93 ± 0.38	ND	ND
	36	14.1 ± 0.2	22.4 ± 0.2	5.95 ± 0.60	0.02 ± 0.00	0.04 ± 0.01
	55	12.0 ± 0.0	20.1 ± 0.7	5.86 ± 0.29	0.01 ± 0.00	0.05 ± 0.01
	62	9.6 ± 0.9	19.4 ± 0.4	5.75 ± 0.02	0.02 ± 0.00	0.14 ± 0.06
	72	6.1 ± 0.6	19.4 ± 0.9	5.59 ± 0.12	0.03 ± 0.01	0.32 ± 0.06
	84	4.7 ± 0.5	19.9 ± 0.4	5.26 ± 0.10	0.03 ± 0.01	0.55 ± 0.10
Y. lipolytica	0	18.3 ± 0.1	22.9 ± 0.1	5.87 ± 0.03	ND	ND
	30	18.5 ± 0.1	23.0 ± 0.1	5.75 ± 0.10	0.16 ± 0.01	ND
	36	18.6 ± 0.1	23.1 ± 0.1	5.29 ± 0.07	0.32 ± 0.01	ND
	55	18.6 ± 0.0	23.0 ± 0.1	2.95 ± 0.05	0.51 ± 0.02	ND
	62	18.5 ± 0.1	22.9 ± 0.1	2.10 ± 0.04	0.55 ± 0.01	ND
	72	18.7 ± 0.2	22.9 ± 0.1	1.37 ± 0.07	0.52 ± 0.02	ND
	84	18.6 ± 0.0	22.8 ± 0.1	0.72 ± 0.05	0.46 ± 0.02	ND
K. marxianus, *D. hansenii*, and *Y. lipolytica* in coculture	0	18.3 ± 0.1	22.9 ± 0.1	5.72 ± 0.09	ND	ND
	36	13.8 ± 0.3	23.0 ± 0.3	5.16 ± 0.00	0.13 ± 0.00	ND
	55	10.5 ± 0.3	23.0 ± 0.3	4.86 ± 0.06	0.20 ± 0.01	0.04 ± 0.01
	62	7.2 ± 0.4	22.9 ± 0.2	4.58 ± 0.03	0.27 ± 0.01	0.05 ± 0.01
	72	5.4 ± 0.2	22.9 ± 0.2	4.44 ± 0.06	0.32 ± 0.01	0.08 ± 0.01
	84	2.6 ± 0.1	23.0 ± 0.1	4.34 ± 0.03	0.34 ± 0.02	0.10 ± 0.02
	110	0.3 ± 0.1	22.8 ± 0.2	3.98 ± 0.07	0.44 ± 0.02	0.18 ± 0.03
	120	0.1 ± 0.0	21.8 ± 0.6	3.88 ± 0.03	0.45 ± 0.03	0.20 ± 0.02

[a] Results are the means ± standard deviations of six different experiments. ND, not detected.

low signal intensities were detected with *K. marxianus* strain- and *Y. lipolytica* strain-specific oligonucleotide probes when Cy3-labeled cDNA was prepared from *D. hansenii* mRNA (Fig. 2a).

Parallel analyses were performed with the three pure cultures to test the reproducibility of the methodology (i.e., cDNA synthesis, purification, hybridization, and scanning parameters) when the transcripts of a given species were evaluated from a yeast coculture. As a representative example, signal intensities for *D. hansenii*-specific oligonucleotide probes were compared when Cy3-labeled cDNA was prepared from *D. hansenii* mRNA in pure culture versus signals from an artificial mixed culture with *K. marxianus* and *Y. lipolytica* mRNA. Prior to RNA extraction, the three pure cultures of *D. hansenii*, *K. marxianus*, and *Y. lipolytica* were pooled (1:1:1, vol/vol/vol). All RNAs were extracted, transcribed, and labeled by direct incorporation of dCTP-Cy3. The specific hybridization signals for each species were then compared to those obtained from pure cultures. For *D. hansenii* (Fig. 3), a good reproducibility between arrays was observed, with a correlation coefficient of 0.95. The same experiment was performed for *K. marxianus* and *Y. lipolytica*; in these two cases, a correlation coefficient of at least 0.96 was generated (data not shown).

TABLE 3. Production of VSC by *K. marxianus*, *D. hansenii*, and *Y. lipolytica* cultivated as pure cultures or cocultures[a]

Yeast(s)	Time (h)	VSC production (peak area × 10^4 · CFU^{-1})			
		MTL	DMDS	DMTS	MTA
Cultivated as pure cultures					
K. marxianus	72	ND	7 ± 2	2 ± 1	59 ± 8
D. hansenii	72	ND	37 ± 7	4 ± 0	11 ± 0
Y. lipolytica	72	1,905 ± 136	12,575 ± 726	11 ± 2	ND
K. marxianus, *D. hansenii*, and *Y. lipolytica* cultivated in coculture	72	ND	98 ± 17	8 ± 2	ND
	120	ND	523 ± 57	24 ± 9	ND

[a] Results are shown as means ± standard deviations. MTL, methanethiol; DMDS, dimethyl disulfide; DMTS, dimethyl trisulfide; MTA, methylthioacetate; ND, not detected.

(ii) Identification of expressed genes in yeast pure cultures. In order to identify genes expressed for each yeast, expression profiling of those genes possibly involved in lactose/lactate and L-methionine catabolism was carried out. The reproducibility of the measurements was confirmed by duplicate biological experiments. Hybridization signals were quantified using Quantarray (Packard BioChip Technologies) software and normalized by the median (see Materials and Methods) value.

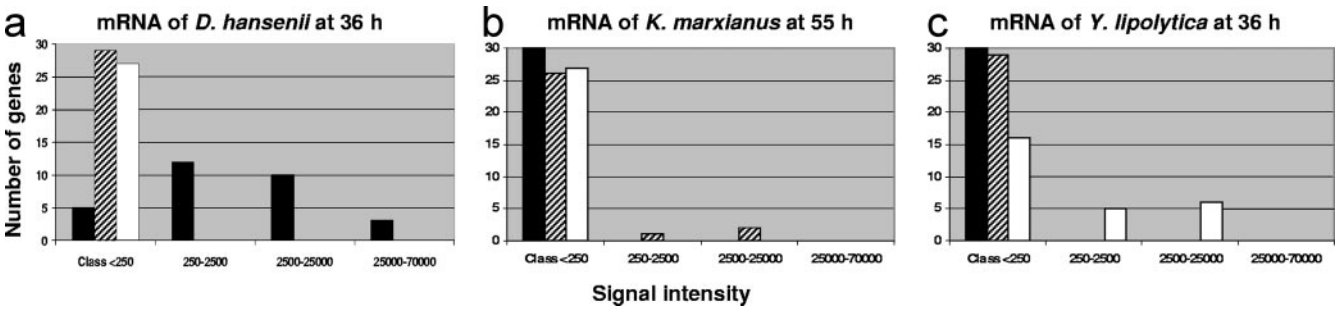


FIG. 2. Distribution of spot intensities (arbitrary units) under different experimental conditions: (a) Cy3-cDNA prepared from *D. hansenii* mRNA; (b) Cy3-cDNA prepared from *K. marxianus* mRNA; (c) Cy3-cDNA prepared from *Y. lipolytica* mRNA. The genes were ranked according to the intensities of the corresponding hybridization signals. The values were then arranged into four sets: Class <250; 250 to 2,500; 2,500 to 25,000; and 25,000 to 70,000, with increasing hybridization values. Black histograms, *D. hansenii* genes. Hatched histograms, *K. marxianus* genes. White histograms, *Y. lipolytica* genes.

Table 4 compares the expression level of each gene to the mean expression of all genes present on the array for a given species and, consequently, gives us biological information about the predominant biological processes in the yeast considered. Expression patterns varied considerably depending on the yeast, which suggests a complementary role for each given yeast during ripening. As expected, lactose catabolism was highly induced in *K. marxianus* as indicated by expression levels of both *LAC4* (β-galactosidase) and *LAC12* (lactose permease), while major genes involved in lactate and pyruvate catabolism were highly expressed in *D. hansenii*. In *Y. lipolytica*, the highest expression levels were reached by *BAT2* and *ARO8*, two genes involved in amino acid catabolism, and *PDC6*, which encodes a pyruvate decarboxylase.

(iii) Gene expression analysis of the yeast coculture. In order to give an insight into the relative importance of each yeast when cultivated in coculture, with respect to lactose/lactate and L-methionine catabolism, gene expression measurements were carried out at three different times, at early (36 h), mid- (72 h), and late (120 h) stationary phases of yeast coculture with the SCM (Table 5). The reproducibility of the measurements was confirmed by triplicate, independent experiments for each time point. Our experimental design included three experimental parameters ("culture time" analyzed, repetition of experiments, and replication of spots on microarray). Statistical analysis was performed with GeneANOVA software (see Materials and Methods). ANOVA showed that the biological factors "gene identity" and "culture time" were responsible for most of the variance. Only genes whose expression levels changed significantly (false discovery rate of <10%) over time are indicated in Table 5. Lactose metabolism was highly induced within 72 h as indicated by high expression levels of the *LAC4* (β-galactosidase) and *LAC12* (lactose permease) genes. This induction was followed by a dramatic decline thereafter (Table 5), which correlates with complete lactose consumption (Table 2). In *Y. lipolytica*, L-methionine catabolism was highly induced during the whole duration of the cultivation, as indicated by the expression levels of *BAT2* and *ARO8*; this corresponds to a gradual accumulation of KMTBA observed in the yeast coculture (Table 2). In cocultures, lactate is less efficiently degraded compared to that in *D. hansenii* pure cultures (Table 2), although major genes involved in lactate/pyruvate catabolism were highly expressed (Table 5). Low expression levels of a *D. hansenii* lactate transporter at 36 to 72 h might explain this phenomenon.

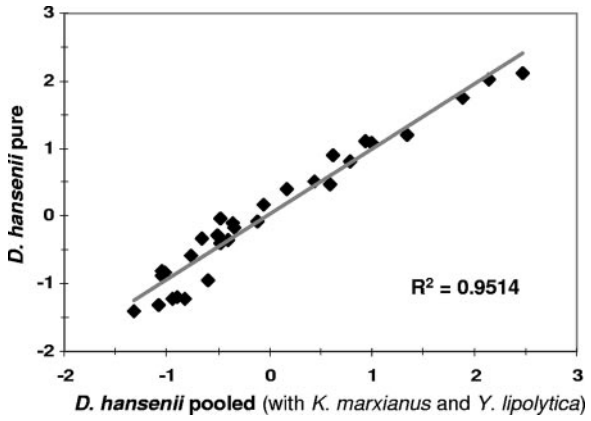


FIG. 3. Scatter plots of the signal intensities obtained from mRNA of *D. hansenii* in pure culture (pure) versus mRNA of *D. hansenii* in artificial mixed culture (pooled) with *K. marxianus* and *Y. lipolytica*.

DISCUSSION

In this work, we were able to identify distinct and/or complementary roles of three cheese-ripening yeasts cultivated in pure cultures or in cocultures, with respect to lactose/lactate and L-methionine catabolism.

We have shown that lactose and lactate consumption profiles varied depending on the yeast species considered. Both lactose and lactate were consumed in *K. marxianus* cultures, which is in agreement with the results obtained from analyses of ewe's cheeses (12). Indeed, high mRNA signals of genes encoding β-galactosidase and lactose permease corroborate the high lactose consumption in *K. marxianus* cultures. In yeast cocultures, our results show that both genes were most highly expressed between 36 h and 72 h, which corresponds to a continuous lactose consumption. This is well in agreement with results obtained with *K. lactis* in which *LAC4* and *LAC12* genes were up-regulated in response to lactose addition (29 and references therein). Our data also revealed that the lactate consumption began concomitantly with the pH rise in *K. marxianus* cultures. In *K. marxianus* culture, microarray results

TABLE 4. Transcript levels of *D. hansenii*, *K. marxianus*, or *Y. lipolytica* genes when yeasts were cultivated separately in SCM containing lactose, lactate, and L-methionine

Gene	Putative function[a]	Gene expression levels for yeast type strain[b]					
		D. hansenii 304		*K. marxianus* $44_{(8)}$		*Y. lipolytica* 370	
		Accession no.	Transcript level	Accession no.	Transcript level	Accession no.	Transcript level
LAC4	β-Galactosidase	*DEHA0G26345g*	−0.0	*KLLA0B14883g*	+10.7		
LAC12	Lactose permease	*DEHA0G26367g*	−1.1	*KLLA0B14861g*	+10.3		
JEN1	Lactate transporter	*DEHA0F18843g*	+0.5	*KLLA0E16313g*	−0.0	*YALI0D24607g*	−0.7
		*DEHA0D20427g**	−1.2	*KLLA0F10043g*	−0.2	*YALI0D20108g*	−0.7
		*DEHA0F28809g**	−1.3			*YALI0C15488g*	−0.2
						YALI0E32901g	−0.6
						YALI0C21406g	−0.5
						YALI0B19470g	−1.0
CYB2	Lactate dehydrogenase cytochrome b_2	*DEHA0E01166g*	+3.2	*KLLA0D02640g*	−1.0	*YALI0E21307g*	+1.1
				KLLA0B14795g	+0.5		
DLD1	Lactate ferricytochrome *c* oxidoreductase	*DEHA0D09658g**	+4.0	*KLLA0E19789g*	−0.2	*YALI0E03212g*	+5.0
				KLLA0D03344g	−0.4		
DLD2	Lactate ferricytochrome *c* oxidoreductase	*DEHA0F07612g**	+0.4	*KLLA0B01397g**	−0.2		
ILV2	Acetolactate synthase (catalytic subunit)	*DEHA0G02574g**	+1.0	*KLLA0B12584g*	−0.7	*YALI0C00253g*	+4.6
ILV6	Acetolactate synthase (regulatory subunit)	*DEHA0E22869g**	+4.0	*KLLA0F12364g*	−0.3	*YALI0C09636g*	+5.3
PDA1	E1α subunit of the PDH complex	*DEHA0G13728g**	+5.9	*KLLA0F12001g*	+0.3	*YALI0F20702g*	+4.9
PDB1	E1β subunit of the PDH complex	*DEHA0C10065g*	+6.1	*KLLA0F09603g*	−0.0	*YALI0E27005g*	+3.6
						*YALI0F05038g**	+5.4
PDC1	Major pyruvate decarboxylase isozyme	*DEHA0G19525g**	+7.3	*KLLA0E16357g*	+7.9	*YALI0D10131g*	+5.5
		DEHA0B03784g	+0.5				
		*DEHA0D18381g**	+4.3				
PDC6	Minor isoform of pyruvate decarboxylase					*YALI0D06930g*	+6.8
THI3	Probable decarboxylase			*KLLA0F16962g*	−0.4		
ARO10	Phenylpyruvate decarboxylase	*DEHA0D11066g**	+4.4	*KLLA0E02662g*	−0.1		
BAT1	Branched-chain amino acid aminotransferase			*KLLA0A10307g*	−0.6	*YALI0D01265g*	−0.9
BAT2	Branched-chain amino acid aminotransferase	*DEHA0D07689g**	+4.7			*YALI0F19910g*	+6.1
ARO8	Aromatic aminotransferase	*DEHA0A06974g*	+0.6	*KLLA0F10021g*	−0.3	*YALI0E20977g*	+7.3
		*DEHA0A00253g**	+1.5	*KLLA0A04906g*	−0.3		
		*DEHA0A00231g**	−0.9				
ARO9	Aromatic aminotransferase			*KLLA0D11110g*	−0.2	*YALI0C05258g*	−0.2
MAP1	Methionine aminopeptidase	*DEHA0G13937g**	+2.6	*KLLA0D18436g*	−0.6	*YALI0D17138g*	−0.5
MAP2	Methionine aminopeptidase	*DEHA0C04444g*	+2.9	*KLLA0E06875g*	−0.9	*YALI0D05159g*	−0.9
SAM2	*S*-Adenosylmethionine synthase	*DEHA0E14751g*	+4.4	*KLLA0C01782g*	−0.6	*YALI0B14509g**	+0.3
SAM4	*S*-Adenosylmethionine-homocysteine methyltransferase	*DEHA0A00869g**	−1.4	*KLLA0D01551g*	−0.7	*YALI0F25641g**	−0.2
CYS3	Cystathionine γ-lyase	*DEHA0C16863g**	+1.3	*KLLA0F07909g*	−0.6	*YALI0F05874g*	+0.3
CYS4	Cystathionine β-synthase	*DEHA0C15708g*	+1.8	*KLLA0F09317g*	−0.2	*YALI0E09108g*	+0.3
STR3	Cystathionine β-lyase	*DEHA0A06897g**	+0.7	*KLLA0C17028g*	−0.3	*YALI0D00605g**	−0.8
STR2	Cystathionine γ-synthase	*DEHA0D10285g**	+1.0	*KLLA0B04378g*	−0.3		
	Hypothetical cystathionine γ-synthase					*YALI0D17402g**	−0.4
	Cystathionine γ-synthase activity	*DEHA0A01144g*	+0.6	*KLLA0E21406g*	−0.2		
		DEHA0A01529g	−0.9				

[a] Annotations are from Génolevures (http://natchaug.labri.u-bordeaux.fr/Genolevures/index.php).
[b] Yeast cells were grown to late exponential phase (36 h for *D. hansenii* and *Y. lipolytica* and 55 h for *K. marxianus*). It should be noted that the transcript levels of two genes belonging to the same species can be compared but cannot be compared between homologous genes from two different species. *, distantly related homolog of *S. cerevisiae* (see putative designation in the supplemental material).

showed low transcript levels of the open reading frames (ORFs) corresponding to lactate dehydrogenases and lactate transporters; this is in accordance with limited lactate catabolism, since around 16% of lactate was consumed after 72 h. When cultivated in coculture, in which lactate is not extensively degraded, none of the genes involved in lactate catabolism was significantly expressed from *K. marxianus*. In *K. lactis*, only one gene was found to express a pyruvate decarboxylase (Pdc) activity (7). Our microarray results showed that the *K. marxianus PDC1* ortholog mRNA level was highly expressed when this strain was cultivated in pure culture. Also, the relative transcript levels of the *K. marxianus PDA1* and *PDB1* genes encoding pyruvate dehydrogenases (PDH) were very low.

In *D. hansenii*, although this yeast was able to grow efficiently on lactose (Table 2), the *LAC4* and *LAC12* genes were poorly expressed (Table 4). In contrast, lactate is poorly degraded by *D. hansenii*, but our results also showed that genes putatively involved in lactate and/or pyruvate (e.g., Ldh, Pdh, Pdc, and acetolactate synthase) catabolic pathways were up-regulated in *D. hansenii* under all culture conditions (pure culture or coculture). When yeasts were cultivated in coculture, in which lactate is poorly degraded, major genes involved in lactate

TABLE 5. Significant up- and down-regulated genes with an FDR of <10% over time[a]

Gene	Accession no.[b]	FDR rate at:			Putative function[c]
		36 h	72 h	120 h	
LAC4	*KLLA0B14883g*	+7.2	+7.1	+0.6	β-Galactosidase
LAC12	*KLLA0B14861g*	+3.6	+2.4	−1.6	Lactose permease
JEN1	*DEHA0F18843g*	+2.2	−0.7	+5.0	Lactate transporter
ILV6	*DEHA0E22869g**	+5.2	+4.7	+3.4	Acetolactate synthase (regulatory subunit)
PDA1	*DEHA0G13728g**	+8.2	+7.2	+5.8	E1α subunit of the PDH complex
PDB1	*DEHA0C10065g*	+10.1	+8.6	+7.9	E1β subunit of the PDH complex
	*YALI0F05038g**	+2.6	+1.9	+6.0	
PDC1	*DEHA0D18381g**	+5.9	+6.8	+5.2	Major of three pyruvate decarboxylase isozymes
	*DEHA0G19525g**	+8.8	+10.0	+7.0	
	YALI0D10131g	−0.4	+2.5	+1.0	
ARO10	*DEHA0D11066g**	+6.0	+5.8	+8.6	Phenylpyruvate decarboxylase
BAT2	*YALI0F19910g*	+3.8	+6.3	+4.4	Branched-chain amino acid aminotransferase
ARO8	*YALI0E20977g*	+5.2	+7.5	+6.6	Aromatic aminotransferase

[a] Samples were taken at early (36 h), mid- (72 h), and late (120 h) stationary phase of yeasts cocultured in synthetic cheese medium. The FDR was determined using GeneANOVA software.
[b] *, distantly related homolog of *S. cerevisiae* (see putative designations in the supplemental material).
[c] Annotations are from Génolevures (http://cbi.labri.fr/Genolevures/).

and/or pyruvate catabolism were highly expressed, with the exception of the lactate permease gene *JEN1*. Since *D. hansenii* grows properly in coculture where lactose is efficiently degraded, we can suspect this yeast to degrade lactose by an as-yet-unknown pathway. Alternatively, we can suspect the yeast coculture (i) to produce an intermediate that induces the lactose degradation pathway in *D. hansenii* or (ii) to degrade lactose to an intermediate used by *D. hansenii*. Further work is required to clarify how lactose is degraded by this yeast.

In *Y. lipolytica* pure cultures, lactose and lactate concentrations remained unchanged. Neither *LAC4* nor *LAC12* genes were identified in the *Y. lipolytica* genome. This is in accordance with the natural inability of *Y. lipolytica* to use lactose as a carbon source (5). Moreover, none of the six *JEN1* homolog genes was induced by lactate at the transcriptional level in *Y. lipolytica* cultures. However, the deacidification rate was highest with *Y. lipolytica* cultures. It is clear, therefore, that the pH increase does not depend on the assimilation of lactate in *Y. lipolytica*. From our study, we can propose that this pH increase is due to the release of ammonia during L-methionine catabolism, since this amino acid is efficiently degraded by this yeast. The involvement of aminotransferase(s) in L-methionine catabolism in the cheese-ripening yeasts *Geotrichum candidum*, *D. hansenii*, *K. lactis*, and *Y. lipolytica* has been suggested (3, 9). Two ORFs encoding aromatic aminotransferases were identified in the *Y. lipolytica* genome on the basis of sequence homology with *ARO8* and *ARO9* of *S. cerevisiae*. Moreover, *Y. lipolytica* has two branched-chain aminotransferase genes, one with a mitochondrial targeting signal and one which is cytoplasmic, like *S. cerevisiae* (8). The mitochondrial gene *BAT1* is highly expressed during logarithmic phase and is repressed during stationary phase in *S. cerevisiae*, whereas the cytosolic isoenzyme *BAT2* has the opposite pattern of expression (20). In other species, there is only one branched-chain aminotransferase (Bat), and it has either cytoplasmic features (as in *D. hansenii*) or mitochondrial features (as in *K. lactis*) (8). Our microarray experiments showed high transcriptional expressions of *Y. lipolytica ARO8* (Yl*ARO8*) and *BAT2* (Yl*BAT2*), in pure cultures or in coculture with other yeasts, which correlates with the rapid production of KMTBA in *Y. lipolytica* concomitant with the degradation of L-methionine. Interestingly, L-methionine is specifically transported by one high-affinity and two low-affinity permeases in *S. cerevisiae* (18). A homology search against the three genomes of *K. lactis*, *D. hansenii*, and *Y. lipolytica* revealed that they contain several ORFs whose products show extensive sequence similarities to these L-methionine permeases. These ORFs show similarities to the high-affinity L-methionine permeases encoded by *MUP1* (*YGR055w*). Two other genes carried by *K. lactis* and *D. hansenii* present high similarities with the low-affinity L-methionine permease gene *MUP3* (*YHL036w*). As a high redundancy of high-affinity L-methionine permeases is observed in the *Y. lipolytica* genome, we can suspect that such L-methionine transporters may give a competitive advantage to *Y. lipolytica*, allowing it to grow better on L-methionine.

In conclusion, multispecies microarrays were successfully employed to identify major genes involved in lactose/lactate and L-methionine catabolism by three cheese-ripening yeasts cultivated in cocultures. We observed good agreement between expressed genes in the array experiments and biochemical data. It provides evidence of the reliability of our metabolic array data. Furthermore, we also found no interspecies cross-hybridization. Our data open up new prospects in the use of tailor-made microarrays to study the simultaneous expression of targeted metabolism processes in several species within a microbial association (e.g., the cheese ecosystem). Such an approach could therefore be developed to investigate functional redundancy and possible interspecies metabolic interactions within complex microbial associations.

ACKNOWLEDGMENTS

Orianne Cholet is grateful to Ecole Doctorale ABIES for a Ph.D. scholarship.

We thank Nancie Reymond for helpful discussions and Audrey Suleau for providing excellent technical advice. We are grateful to Noémie Jacques for performing the strain identification.

REFERENCES

1. **Alexandre, H., V. Ansanay-Galeote, S. Dequin, and B. Blondin.** 2001. Global gene expression during short-term ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. FEBS Lett. **498:**98–103.
2. **Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D. J. Lipman.** 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. **25:**3389–3402.
3. **Arfi, K., H. E. Spinnler, R. Tâche, and P. Bonnarme.** 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.
4. **Arfi, K., M. N. Leclercq-Perlat, H. E. Spinnler, and P. Bonnarme.** 2005. Importance of curd-neutralising yeasts on the aromatic potential of *Brevibacterium linens* during cheese ripening. Int. Dairy J. **15:**883–891.
5. **Barnett, J. A., R. W. Payne, and D. Yarrow.** 2000. Yeasts: characteristics and identification, 3rd ed. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.
6. **Benjamini, Y., and Y. Hochberg.** 1995. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. J. R. Stat. Soc. B **57:**289–300.
7. **Bianchi, M. M., L. Tizzani, M. Destruelle, L. Frontali, and M. Wésolowski-Louvel.** 1996. The "petite negative" yeast *Kluyveromyces lactis* has a single gene expressing pyruvate decarboxylase activity. Mol. Microbiol. **19:**27–36.
8. **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:**4585–4591.
9. **Bonnarme, P., K. Arfi, C. Dury, S. Helinck, M. Yvon, and H. E. Spinnler.** 2001. Sulfur compound production by *Geotrichum candidum* from L-methionine: importance of the transamination step. FEMS Microbiol. Lett. **205:** 247–252.
10. **Cholet, O., A. Hénaut, and P. Bonnarme.** Transcriptional analysis of L-methionine catabolism in *Brevibacterium linens* ATCC9175. Appl. Microbiol. Biotechnol., in press.
11. **Corsetti, A., J. Rossi, and M. Gobbetti.** 2001. Interactions between yeasts and bacteria in the smear surface ripened cheeses. Int. J. Food Microbiol. **69:** 1–10.
12. **Cosentino, S., M. E. Fadda, M. Deplano, A. F. Mulargia, and F. Palmas.** 2001. Yeasts associated with Sardinian ewe's dairy products. Int. J. Food Microbiol. **69:**53–58.
13. **Devoyod, J. J.** 1990. Yeasts in cheese-making, p. 229–240. *In*: J. F. T. Spencer and D. M. Spencer (ed.), Yeast technology. Springer Verlag, Berlin, Germany.
14. **Didier, G., P. Brezellec, E. Rémy, and A. Hénaut.** 2002. GeneANOVA: gene expression analysis of variance. Bioinformatics **18:**490–491.
15. **Dujon, B., D. Sherman, G. Fischer, P. Durrens, S. Casaregola, I. Lafontaine, J. De Montigny, C. Marck, C. Neuveglise, E. Talla, N. Goffard, L. Frangeul, M. Aigle, V. Anthouard, A. Babour, V. Barbe, S. Barnay, S. Blanchin, J. M. Beckerich, E. Beyne, C. Bleykasten, A. Boisrame, J. Boyer, L. Cattolico, F. Confanioleri, A. De Daruvar, L. Despons, E. Fabre, C. Fairhead, H. Ferry-Dumazet, A. Groppi, F. Hantraye, C. Hennequin, N. Jauniaux, P. Joyet, R. Kachouri, A. Kerrest, R. Koszul, M. Lemaire, I. Lesur, L. Ma, H. Muller, J. M. Nicaud, M. Nikolski, S. Oztas, O. Ozier-Kalogeropoulos, S. Pellenz, S. Potier, G. F. Richard, M. L. Straub, A. Suleau, D. Swennen, F. Tekaia, M. Wesolowski-Louvel, E. Westhof, B. Wirth, M. Zeniou-Meyer, I. Zivanovic, M. Bolotin-Fukuhara, A. Thierry, C. Bouchier, B. Caudron, C. Scarpelli, C. Gaillardin, J. Weissenbach, P. Wincker, and J. L. Souciet.** 2004. Genome evolution in yeasts. Nature **430:**35–44.
16. **Fadda, M. E., V. Mossa, M. B. Pisano, M. Deplano, and S. Cosentino.** 2004. Occurrence and characterization of yeasts isolated from artisanal Fiore Sardo cheese. Int. J. Food Microbiol. **95:**51–59.
17. **Ferreira, A. D., and B. C. Viljoen.** 2003. Yeasts as adjunct starters in matured cheddar cheese. Int. J. Food Microbiol. **86:**131–140.
18. **Isnard, A. D., D. Thomas, and Y. Surdin-Kerjan.** 1996. The study of methionine uptake in *Saccharomyces cerevisiae* reveals a new family of amino acid permeases. J. Mol. Biol. **262:**473–484.
19. **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:**3330–3335.
20. **Kispal, G., H. Steiner, D. A. Court, B. Rolinski, and R. Lill.** 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.
21. **Leclercq-Perlat, M. N., A. Oumer, J. L. Bergere, H. E. Spinnler, and G. Corrieu.** 2000. Behavior of *Brevibacterium linens* and *Debaryomyces hansenii* as ripening flora in controlled production of smear soft cheese from reconstituted milk: growth and substrate consumption. J. Dairy Sci. **83:**1665–1673.
22. **Leclercq-Perlat, M. N., F. Buono, D. Lambert, E. Latrille, H. E. Spinnler, and G. Corrieu.** 2004. Controlled production of Camembert-type cheeses. I. Microbiological and physicochemical evolutions. J. Dairy Res. **71:**346–354.
23. **Pysz, M. A., S. B. Conners, C. I. Montero, K. R. Shockley, M. R. Johnson, D. E. Ward, and R. M. Kelly.** 2004. Transcriptional analysis of biofilm formation processes in the anaerobic, hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. Appl. Environ. Microbiol. **70:**6098–6112.
24. **Quackenbush, J.** 2001. Computational analysis of microarray data. Nat. Rev. Genet. **2:**418–427.
25. **Reiner, A., D. Yekutieli, and Y. Benjamini.** 2003. Identifying differentially expressed genes using false discovery rate controlling procedures. Bioinformatics **19:**368–375.
26. **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.
27. **Schena, M., D. Shalon, R. W. Davis, and P. O. Brown.** 1995. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. Science **270:**467–470.
28. **Souciet, J., M. Aigle, F. Artiguenave, G. Blandin, M. Bolotin-Fukuhara, E. Bon, P. Brottier, S. Casaregola, J. de Montigny, B. Dujon, P. Durrens, C. Gaillardin, A. Lepingle, B. Llorente, A. Malpertuy, C. Neuveglise, O. Ozier-Kalogeropoulos, S. Potier, W. Saurin, F. Tekaia, C. Toffano-Nioche, M. Wesolowski-Louvel, P. Wincker, and J. Weissenbach.** 2000. Genomic exploration of the hemiascomycetous yeasts: 1. A set of yeast species for molecular evolution studies. FEBS Lett. **487:**3–12.
29. **Suleau, A., P. Gourdon, J. Reitz-Ausseur, and S. Casaregola.** 2006. Transcriptomic analysis of extensive changes in metabolic regulation in *Kluyveromyces lactis* strains. Eukaryot. Cell **5:**1360–1370.
30. **van den Tempel, T., and M. Jakobsen.** 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.
31. **Welthagen, J. J., and B. C. Viljoen.** 1998. Yeast profile in gouda cheese during processing and ripening. Int. Dairy J. **41:**185–194.
32. **Xie, Y., L.-S. Chou, A. Cutler, and B. Weimer.** 2004. DNA macroarray profiling of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IL1403 gene expression during environmental stresses. Appl. Environ. Microbiol. **70:**6738–6747.

Résumé

Les résultats de transcriptomique obtenus à partir de cultures pures ont montré que l'ensemble des protocoles définis au cours de nos précédents travaux permet de réaliser des expérimentations de qualité avec la puce multi-espèces. La méthode est reproductible et aucun artéfact n'a été généré entre gènes orthologues. De plus, selon que les cellules de levure soient cultivées en culture pure ou en association, elles ne sont pas affectées différemment par la procédure de lyse, ni par l'étape d'extraction de l'ARN. L'utilisation de la puce permet donc de discriminer *D. hansenii*, *K. marxianus* et *Y. lipolytica* en culture mixte, d'identifier les gènes pertinents et, par conséquent, d'obtenir des informations sur la part fonctionnelle de chaque espèce au cours de l'affinage. Le suivi de l'expression des gènes chez *K. marxianus* indique que cette levure serait plus impliquée dans la consommation du lactose *via* l'induction des gènes *LAC12* et *LAC4* qu'à la dégradation du lactate. Ces résultats sont parfaitement corrélés avec les données microbiologiques et biochimiques qui montrent que la croissance de *K. marxianus* a lieu principalement en présence de lactose, en début de culture. En revanche, *D. hansenii* et *Y. lipolytica* jouent un rôle tout au long de l'affinage. *D. hansenii* intervient essentiellement dans le métabolisme du pyruvate durant les 3 à 4 premiers jours de culture, puis dans le catabolisme du lactate. *Y. lipolytica* contribue directement à la production de composés soufrés volatils, comme l'indiquent l'induction des gènes *ARO8* et *BAT2* et l'accumulation transitoire de KMTBA dans le milieu de culture.

Enfin, il convient de souligner qu'une levure qui semble potentiellement intéressante en terme d'activité « désacidifiante » en culture pure, peut se révéler totalement inefficace lorsqu'elle est cultivée en association. De nombreuses interrogations demeurent pour élucider les phénomènes d'interactions entre levures. En effet, si ces premiers résultats indiquent que les levures sont capables de complémentarité métabolique, il reste maintenant à comprendre comment. Pour compléter ces données, il serait intéressant de relier quantités d'ARN et de protéines par des études de protéomique.

5.

Essais préliminaires sur fromages modèles.

5.1. Objectifs et contexte méthodologique

Le premier volet de cette étude visait à déterminer *in situ* la dynamique et la contribution de chaque micro-organisme (*K. marxianus*, *D. hansenii*, *Y. lipolytica* et *B. linens*) dans la désacidification et/ou la production d'arômes soufrés au sein de l'écosystème fromager. Pour ce faire, il a d'abord été nécessaire de mettre au point un milieu fromager modèle, permettant une manipulation plus aisée qu'un fromage fabriqué en plate-forme expérimentale, ainsi qu'une extraction facilitée des ARN. Des fromages modèles ont donc été fabriqués à partir de caillés lactiques (type Livarot) (**Fiche technique 04**), dont l'épaisseur (15 à 16 mm) correspondait en moyenne à celle d'un demi-fromage industriel. Sachant que la surface de chaque fromage-agar était de 24,6 cm^2, les niveaux d'ensemencement ont été fixés à 10^4 UFC/cm^2 pour chaque levure et à 10^6 UFC/cm^2 pour la bactérie.

Notre deuxième approche a porté sur l'impact de ces quatre micro-organismes sur la coloration des fromages. L'apparence générale et la couleur de la surface des fromages sont des critères commerciaux essentiels et, malgré son intérêt pour produire des pigments et des arômes typiques des fromages, *B. linens* ne semble pas être le seul micro-organisme impliqué dans le développement de la couleur de la croûte. L'action d'autres micro-organismes est aujourd'hui largement acceptée et le rôle pigmentaire des levures a été montré (Carreira *et al*., 1998 ; Leclercq-Perlat *et al*., 2004a). Compte tenu de nos conditions de culture (ex. pH, milieu, température), proches des conditions réelles de croissance de cette flore d'affinage, nous avons choisi de suivre au cours d'une même fabrication le développement de la couleur à la surface de nos fromages modèles.

5.2. Prélèvements et analyses

Après 7, 21 ou 35 jours d'affinage à 12 °C, à l'obscurité et en présence d'un bac d'eau (taux d'humidité alors supérieur à 95%), les mesures de la concentration en cellules viables des quatre micro-organismes, du pH en surface, ainsi que des paramètres colorimétriques ont été réalisées sur trois cristallisoirs ensemencés et sur un cristallisoir servant à la fois de témoin de stérilité et de « blanc » pour l'étude colorimétrique. Pour l'approche transcriptomique, à chaque temps d'affinage, les surfaces de trois fromages modèles ont été raclées à l'aide d'un grattoir stérile, aliquotées puis congelées à –80 °C jusqu'à extraction des ARN (**Fiche technique 06**).

5.3. Résultats obtenus sur fromages expérimentaux

5.3.1. Suivi de la croissance microbienne de surface au cours de l'affinage (**Fiche technique 05**)

Ensemencées à environ 10^4 UFC/cm^2, les levures présentent des tapis microbiens denses et homogènes tout au long de l'affinage, excepté l'espèce *K. marxianus* pour laquelle le nombre de colonies est faible (< $5{,}0.10^4$ UFC/cm^2) après 35 jours d'incubation (**Figure 14**). Concernant *D. hansenii*, sa population atteint $8{,}5.10^7$ UFC/cm^2 par fromage à J7, puis diminue très lentement au cours de l'affinage. Les dénombrements suggèrent également une lyse de la population du *Kluyveromyces* en fin d'affinage, alors que la levure *Y. lipolytica* (présente à tous les stades de l'affinage) domine la microflore de surface.

La bactérie commence à s'implanter dès les 7 premiers jours d'affinage, lorsque le pH avoisine 6 unités. Cependant, après 35 jours d'incubation à 12 °C, la concentration en cellules viables demeure assez faible pour une bactérie de surface telle que *B. linens*, puisqu'elle est passée de $9{,}7.10^5$ à $5{,}1.10^7$ UFC/cm^2. On aurait pu s'attendre à ce que cette bactérie domine très nettement la microflore de surface en fin d'affinage, et atteigne une population de l'ordre de 10^9 UFC/cm^2. Ces données montrent, néanmoins, que la souche ATCC9175 est capable de se développer et de maintenir sa population lorsqu'elle est cultivée en association avec les trois levures sur un milieu fromager modèle, contrairement à ce que nous avions pu observer lorsqu'elle était cultivée en co-culture avec ces mêmes levures sur notre milieu synthétique fromager J1 (ces données ne figurent pas dans le manuscrit). Ce résultat confirme qu'il n'est pas toujours possible de transposer les résultats obtenus en milieu synthétique à la réalité fromagère.

5.3.2. Résultats préliminaires de l'analyse transcriptomique

5.3.2.1. D'un point de vue méthodologique ...

Concernant l'extraction des ARN, deux protocoles ont été testés pour cette étude sur matrice fromagère. En effet, après validation de la spécificité de notre *microarray* multi-espèces et de la reproductibilité technique des résultats obtenus en milieu liquide (cf. **Articles 1**, **2** et **3**), la principale difficulté de cette étude a résidé dans la mise au point d'un protocole unique permettant d'extraire des ARNm de bonne qualité et en concentration suffisante, à la fois chez la bactérie et chez les levures et, qui plus est, à partir d'une matrice fromagère au fort pouvoir tampon. Le premier protocole testé est celui décrit par Bonaïti *et al.* (2006), basé sur deux étapes d'extraction consécutives au phénol-chloroforme à chaud, en conditions acides. Le deuxième protocole testé est celui que nous avons précédemment mis au point (**Fiche technique 06**) pour extraire les ARNm chez *B. linens*, *Y. lipolytica*, *K. marxianus* et *D. hansenii* à partir de cultures en milieu synthétique (milieu A et milieu fromager J1). Pour chaque protocole utilisé, la pureté et la qualité des ARN extraits ont été contrôlées par mesures au spectrophotomètre à 260 nm et 280 nm, puis visualisées après électrophorèse sur un gel d'agarose en conditions dénaturantes (**Fiche technique 07**). Pour les fromages affinés durant 7 jours, le protocole d'extraction le mieux adapté s'est révélé être celui que nous avions au préalable mis au point pour les cultures en milieu synthétique. Pour les fromages à J21 et J35, quel que soit le protocole testé, aucun

ARN n'a pu être extrait (ou alors de très mauvaise qualité). Par conséquent, seuls les ARNm extraits des fromages à J7 ont pu être transcrits en ADNc marqués, puis hybridés sur la puce. La variabilité introduite par des facteurs non maîtrisés au cours des manipulations (ex. extraction de l'ARN, rendement du marquage, conditions d'hybridation, lavages des lames) a été estimée en répétant l'expérience à trois jours différents (A, B et C).

5.3.2.2. D'un point de vue biologique ...

Ayant des données de transcriptomique uniquement pour un temps donné (J7), il nous a été impossible d'identifier les gènes à expression différentielle au cours de l'affinage. Par conséquent, nous avons choisi de comparer les données de transcriptomique obtenues pour les trois levures sur milieu fromager (à 36, 72 et 120 h) et sur fromage modèle (à 7 jours d'affinage). Le tableau de données résumant cette analyse est une matrice dont les lignes correspondent aux *gènes* et les colonnes aux *conditions expérimentales*. Dans toutes les colonnes, la distribution des données brutes est fortement asymétrique et comporte un petit nombre de très grandes valeurs. Ces dernières influencent très fortement l'évaluation de la plupart des grandeurs statistiques. Pour remédier à ce biais, nous avons choisi de remplacer les données brutes par leur logarithme. Comme méthode exploratoire, une analyse en composantes principales (ACP) a été réalisée sur les 86 gènes sélectionnés sur la puce pour l'étude de *D. hansenii*, *K. marxianus* et *Y. lipolytica*. La matrice des vecteurs propres obtenus par l'ACP est présentée dans le **tableau 7** :

- le premier axe correspond au niveau moyen de l'expression des gènes dans l'ensemble des conditions expérimentales. Cette différence de niveau d'expression est toujours la principale source de variation dans les analyses de transcriptomique car elle revient à dire qu'il y a des gènes qui sont peu ou pas exprimés et d'autres qui le sont fortement (l'inertie le long du premier axe représente 85,6 % de l'inertie totale).
- le deuxième axe sépare les deux milieux de culture (milieu synthétique fromager ou fromage modèle). Ceci montre que, pour un bon nombre de gènes, les niveaux d'expression prédits sont notablement différents selon le milieu de culture utilisé. Ce résultat était attendu, toutefois on aurait pu s'attendre à ce que l'inertie de cet axe soit encore plus importante (6,1 % de l'inertie totale).
- le troisième axe associe des valeurs positives aux expériences réalisées aux temps 36 h, 72 h et 7 jours d'affinage, et des valeurs négatives à l'expérience réalisée à 120 h. Cet axe regroupe donc les expériences sur milieu synthétique fromager à 36 et 72 h et sur fromage modèle à 7 jours d'affinage.
- les neuf autres axes ne sont pas directement interprétables en terme de combinaison des facteurs *milieu*, *temps* et *répétition expérimentale*. Il n'existe donc pas d'interaction significative entre les facteurs *gène* et *répétition expérimentale*, ce qui montre que le protocole de préparation de l'ADNc est suffisamment maîtrisé à l'égard des autres sources d'erreur.

Une analyse de variance gène par gène (ou « ANOVA locale » dans le logiciel GeneANOVA ; Didier *et al*., 2002) nous a ensuite permis d'identifier les gènes dont l'expression varie de façon reproductible au cours du *temps* et/ou en fonction du facteur *milieu*. Les niveaux d'expression de tous les gènes ayant un FDR (*False Discovery Rate* ; Reiner *et al*., 2003) inférieur ou égal à 10 % sont indiqués dans le **tableau 8**. En comparant ces nouvelles données à celles obtenues au cours du temps sur milieu synthétique fromager (**Table 5** [**Article 3**]), on

identifie 10 gènes supplémentaires (5 pour *D. hansenii*, 4 pour *Y. lipolytica* et 1 pour *K. marxianus*). L'expression de ces gènes est donc plus influencée par le facteur *milieu* que par le facteur *temps* sur milieu synthétique fromager. Ils sont indiqués en gras dans le **tableau 8**.

5.3.3. Couleur de la surface des fromages

Outre l'appréciation visuelle des « fromages » aux trois temps d'affinage (photos présentées sur la **figure 14**), la pigmentation du tapis microbien a été suivie au cours de l'affinage par spectrocolorimétrie (**Fiche technique 12**). Une seule photo du témoin (T) est présentée sur la **figure 14** car un *test t de Student* bilatéral, appliqué aux paramètres colorimétriques mesurés sur les fromages non ensemencés à J7, J21 et J35, montre qu'il n'y a pas de différence significative de couleur entre les trois temps d'affinage pour les fromages « témoins ». Il convient de noter qu'au cours de l'affinage, la couleur des tapis microbiens varie du blanc-crème au jaune-orangé en passant par le beige. La luminance L* rend compte de l'aspect plus ou moins lumineux de la couleur, b* traduit la composante jaune de la couleur, a* évalue la composante rouge, C* donne l'intensité de la couleur et est toujours couplé à h°, l'angle de teinte. L'analyse de variance des facteurs « temps d'affinage » et « cristallisoir » effectuée sur l'ensemble des paramètres colorimétriques permet de conclure que le facteur « cristallisoir » n'a pas d'effet significatif. Les tapis microbiens sont donc de couleur homogène pour un même temps d'affinage, ce qui confirme bien la répétabilité de nos résultats.

5.3.3.1. La luminance (L*)

Les valeurs moyennes de la luminance L* obtenues pour les tapis microbiens après 7, 21 et 35 jours d'incubation à 12 °C et à l'obscurité (**Figure 15**) ne se distinguent pas nettement de celles obtenues pour les fromages « témoins ». A titre d'exemple, la luminance des tapis microbiens après 7 jours d'affinage (79,7 ± 0,2) se rapproche graphiquement de celle obtenue pour les fromages non ensemencés après 35 jours d'incubation (78,9 ± 0,5). Ce paramètre est donc très peu discriminant. Ceci s'explique, en partie, parce qu'une lamelle de microscopie est posée avant mesure sur le fromage-agar, pour ne pas salir la cellule de mesure du spectrocolorimètre. La mesure de la luminance est d'autant plus biaisée à J35 puisque l'aspect plissé de la surface empêche l'adhésion complète de la lamelle au tapis microbien.

5.3.3.2. Paramètres colorimétriques (a*b* ; C*h°)

Les représentations graphiques de la position des fromages dans les plans a*b* et C*h° sont données, respectivement, sur les **figures 16** et **17**. Il convient de noter que les témoins (T7, T21 et T35) ont, quel que soit le temps d'incubation, des composantes chromatiques faibles (a* ≈ 0,2 ; b* ≈ 14,3), une saturation métrique faible (C* ≈ 14,3) associée à un angle de teinte élevé (h° ≈ 89,3). En conséquence, les fromages non ensemencés apparaissent blanc-crème.

Aux trois temps d'affinage, les fromages ensemencés se distinguent très nettement du pool existant autour des témoins. Les paramètres colorimétriques a*, b* et C* sont globalement supérieurs à J7 (excepté la composante a*), J21 et J35, indiquant que la couleur est bien plus intense. Ces résultats sont en accord avec ceux de Dufossé (2001) qui considère qu'une

différence de couleur ne peut être perçue que si son intensité est suffisante, c'est-à-dire avec une saturation métrique C* supérieure à 15. Parallèlement, au cours de l'affinage, l'angle de teinte h° tend à être plus petit, ce qui correspond à des teintes plus orangées. En effet, si h° tend vers 90°, alors la teinte est plutôt jaune ; de la même manière, si h° est voisin de 80°, alors la teinte est plutôt orange.

5.4. Conclusion et perspectives

Les résultats de l'étude d'association en milieu synthétique étaient certes encourageants (cf. **Article 3**), mais les expériences *in situ* ne se sont pas révélées à la hauteur de ce que l'on espérait. En effet, les observations décrites dans ce chapitre ne représentent que le début d'un long travail d'analyse et d'interprétation à venir. D'un point de vue technique, l'extraction des acides nucléiques reste l'étape critique de cette étude. Il est en effet très difficile de réduire le pouvoir tampon du milieu fromager et, par conséquent, d'extraire les ARN sur milieu fromager en fin d'affinage. Pour poursuivre ce travail, une amélioration des protocoles testés pour extraire l'ARN doit donc être envisagée. A noter que cette empreinte génétique de l'écosystème fromager à un instant donné permettra alors de suivre la dynamique des populations en terme de présence et/ou en terme d'activité tout au long de l'affinage. Appréhender l'étude de l'écosystème fromager de façon complète nécessitera toutefois l'utilisation d'approches combinées, impliquant les niveaux génomique, protéomique et métabolique. A terme, l'optimisation des protocoles de préparation du matériel biologique, de lyse cellulaire et d'extraction des ARNm devrait alors permettre, au niveau transcriptionnel, l'étude des phénomènes d'interactions entre *D. hansenii*, *K. marxianus*, *Y. lipolytica* et *B. linens* au sein de l'écosystème fromager.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les diverses études sur les voies de production des composés d'arôme soufrés par la flore d'affinage ont permis de mettre l'accent sur certains aspects importants de l'élaboration de la flaveur du fromage, tels que les voies de dégradation de la L-méthionine, l'effet des interactions entre les micro-organismes sur la biogenèse de molécules volatiles, et les variations métaboliques qui existent au sein de la flore fromagère en terme de potentiel aromatisant et de voies métaboliques. Néanmoins, par manque d'outils moléculaires, de nombreux aspects concernant la physiologie propre à chaque micro-organisme restaient à élucider. L'objectif principal de cette thèse était de construire et de mettre au point une puce à ADN permettant d'avoir, pour la première fois, une vision globale de l'expression des gènes impliqués dans la désacidification et la production d'arômes soufrés simultanément chez plusieurs micro-organismes d'affinage, et en particulier au sein d'un écosystème fromager modèle. La principale limite de cette technique a résidé dans le fait que le dessin des sondes ne peut être réalisé qu'à partir de séquences disponibles dans les bases de données et exclut, par conséquent, les micro-organismes dont les séquences ne sont pas répertoriées.

Mon travail, tirant profit des données du séquençage des génomes de *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces lactis*, *Yarrowia lipolytica* et *Brevibacterium linens*, a d'abord consisté à dessiner des sondes nucléiques de 58 à 70 mers suffisamment spécifiques pour détecter et identifier les gènes impliqués dans le catabolisme du lactose, du lactate et/ou de la L-méthionine parmi les milliers de séquences codantes d'un génome et, qui plus est, dans un mélange de séquences de différents organismes. Dans ce contexte, la deuxième difficulté a résidé dans la mise au point d'un protocole unique permettant d'extraire des ARNm de bonne qualité et en concentration suffisante, à la fois chez des procaryotes et chez des eucaryotes. En effet, d'un point de vue technique, l'extraction des acides nucléiques est l'étape clef de la technologie des puces à ADN. L'efficacité de la lyse, variable selon les espèces microbiennes, l'efficacité de l'extraction, le degré de pureté de l'ARNm extrait et le rendement sont des points majeurs. De plus, pour la recherche de spécificité qui nous intéresse, diverses températures d'hybridation ont été testées de manière à limiter les risques de cross-hybridation entre espèces phylogénétiquement proches, et d'augmenter l'efficacité de l'hybridation. Les résultats obtenus à partir de cultures pures ont montré que l'ensemble des protocoles définis au cours de ce travail permet de réaliser des expérimentations de qualité avec notre puce multi-espèces. La méthode est « statistiquement » reproductible et, concernant la sensibilité des sondes dessinées, aucun artéfact n'a été généré lors de l'hybridation avec des cultures pures, indiquant l'absence d'hybridations croisées entre des orthologues par exemple. La dynamique des profils d'expression des gènes et les données biochimiques sont également très bien corrélées.

L'étude de l'expression des gènes chez *B. linens*, en réponse à une modification de la concentration en L-méthionine dans le milieu de culture, nous a permis de conclure que chez cette bactérie, l'enzyme clef du catabolisme de la L-méthionine en méthanethiol est la L-méthionine γ-lyase. L'apport de L-méthionine induit fortement l'expression du gène *mgl* et génère une large gamme de composés soufrés volatils. L'étape de transamination est en revanche inactive, comme en témoignent les données biochimiques et de transcriptomique. Inversement, chez la levure *Y. lipolytica*, nous avons montré que le catabolisme de la L-méthionine est initié par une transamination, aucune autre voie de dégradation de la L-méthionine n'ayant été détectée. L'expression de deux aminotransférases majeures a été mise en évidence. Ces deux aminotransférases sont codées par les gènes Yl*ARO8* et Yl*BAT2*, et catalysent la transamination de la L-méthionine en KMTBA. Dans le cadre de travaux préliminaires, nous avons produit

YlAro8p de manière hétérologue (dans *Escherichia coli*) et avons observé que cette aminotransférase avait une très forte affinité pour la L-méthionine. A partir du KMTBA, *Y. lipolytica* est ensuite capable de produire des composés soufrés volatils, essentiellement du méthanethiol, du DMDS et du DMTS. L'étude en culture mixte a confirmé ces résultats chez *Y. lipolytica*, mais a également permis de mettre en évidence des phénomènes d'interaction entre micro-organismes en termes de croissance, voire de complémentarité métabolique entre les trois levures. Ainsi, il semblerait qu'en culture mixte, la levure *K. marxianus* soit plus impliquée dans la consommation du lactose *via* l'induction des gènes *LAC12* et *LAC4*, *D. hansenii* dans le métabolisme du pyruvate puis le catabolisme du lactate en fin de culture, et *Y. lipolytica* dans la dégradation de la L-méthionine *via* l'induction des gènes *ARO8* et *BAT2*. Aussi, les cultures en association sur milieu synthétique fromager ont permis d'obtenir des résultats proches de ce qui se déroule dans le fromage comme le suggère la comparaison des résultats obtenus sur milieu fromager synthétique J1 ou sur fromage modèle. Toutefois, il est difficile de tirer des conclusions définitives en raison des phénomènes d'interaction qui peuvent perturber le métabolisme d'un micro-organisme. A cela s'ajoute le fait qu'un gène peut être exprimé de façon totalement identique, mais présenter des variations qui vont induire des modifications de la structure de la protéine, et donc de son activité.

L'annotation complète des génomes de *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces lactis* et *Yarrowia lipolytica* est achevée depuis 2006. Il est désormais tout à fait envisageable d'ajouter d'autres gènes sur la puce multi-espèces, sans forcément que l'ensemble des trois génomes y soit représenté (et ce pour des raisons économiques !). Par ailleurs, avec notre puce multi-espèces, telle qu'elle est conçue, le risque d'hybridations croisées avec des séquences issues d'autres levures ou d'autres bactéries phylogénétiquement proches est limité, mais toutefois réel compte tenu de la variété microbienne sur et dans les fromages. Une nouvelle vérification *in silico* devra par conséquent être réalisée, lorsque les génomes d'autres micro-organismes d'affinage seront disponibles. Sous réserve que le génome de *Geotrichum candidum* soit un jour séquencé, il serait également intéressant d'envisager ce type d'approche « puce à ADN » chez ce micro-organisme qui semble dominer la flore levure à la surface du Livarot (Gente *et al.*, 2006 ; Larpin *et al.*, 2006). Par ailleurs, les analyses préliminaires qui ont été réalisées sur fromage modèle ont permis de montrer certaines corrélations entre expression des gènes et conditions biologiques. Cependant, l'utilisation des seuls résultats de puce à ADN n'offre pas la possibilité d'aborder complètement les éléments de régulation du catabolisme du lactose, du lactate ou de la L-méthionine chez ces quatre micro-organismes au cours de l'affinage des fromages. Cette information sur les profils d'expression est nécessaire pour attribuer à chaque activité clef le ou les gènes responsables et spécifiques à chaque micro-organisme, mais elle n'est pas suffisante pour modéliser de façon complète l'écosystème fromager en terme de dynamique des populations et/ou en terme d'activités fonctionnelles. De plus, il est désormais admis que les variations de concentration d'ARNm ne se répercutent pas toujours de façon identique au niveau des enzymes en raison de variations d'efficacité de traduction. Pour poursuivre ce travail, il sera donc nécessaire d'intégrer d'avantages de données. Pour cela, des études devront également être initiées au niveau protéomique afin d'associer à l'étude de l'expression des gènes l'analyse de la quantité de protéines obtenues et de leurs modifications. A l'échelle de l'individu, les études de protéomique s'avèrent très intéressantes en écologie microbienne. Au delà des connaissances fondamentales, c'est l'amélioration des micro-organismes et la conservation des ressources génétiques qui devraient à terme profiter de ces avancées scientifiques.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abu-Tarboush, H. M. (1996). Comparison of associative growth and proteolytic activity of yogurt starters in whole milk from camels and cows. *Journal of Dairy Science* **79**, 366-371.

Adams, M. R. & Hall, C. J. (1988). Growth inhibition of food-borne pathogens by lactic and acetic acids and their mixtures. *International Journal of Food Science and Technology* **23**, 287-292.

Addis, E., Fleet, G. H., Cox, J. M., Kolak, D. & Leung, T. (2001). The growth, properties and interactions of yeasts and bacteria associated with the maturation of Camembert and blue-veined cheeses. *International Journal of Food Microbiology* **69**, 25-36.

Ahamad, N. & Marth, E. H. (1989). Behaviour of *Listeria monocytogenes* at 7, 13, 21 and 35°C in tryptose broth acidified with acetic, citric or lactic acid. *Journal of Food Protection* **52**, 688-695.

Alting, A. C., Engels, W., van Schalkwijk, S. & Exterkate, F. A. (1995). Purification and characterization of cystathionine (beta)-lyase from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* B78 and its possible role in flavor development in cheese. *Applied and Environmental Microbiology* **61**, 4037-4042.

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215, 403-410.

Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* **25**, 3389-3402.

Alves, A., Santos, O., Henriques, I. & Correia, A. (2002). Evaluation of methods for molecular typing and identification of members of the genus *Brevibacterium* and other related species. *FEMS Microbiology Letters* **213**, 205-211.

Amann, R. & Ludwig, W. (2000). Ribosomal RNA-targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology. *FEMS Microbiology Reviews* **24**, 555-565.

Amann, R. I., Ludwig, W. & Schleifer, K. H. (1995). Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews* **59**, 143-169.

Amann, R., Krumholz, L. & Stahl, D. (1990). Fluorescent oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *Journal of Bacteriology* **172**, 762-770.

Amann, R., Springer, N., Ludwig, W., Görtz, H. D. & Schleifer, K. H. (1991). Identification *in situ* and phylogeny of uncultured bacterial endosymbionts. *Nature* **351**, 161-164.

Amárita, F., Requena, T., Taborda, G., Amigo, L. & Pelaez, C. (2001). *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum* initiate catabolism of methionine by transamination. *Journal of Applied Microbiology* **90**, 971-978.

Amárita, F., Yvon, M. Nardi, M., Chambellon, E., Delettre, J. & Bonnarme, P. (2004). Identification and functional analysis of the gene encoding methionine-gamma-lyase in *Brevibacterium linens*. *Applied and Environmental Microbiology* **70**, 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 yoghurt. *Lait* **69**, 519-528.

Ampe, F., ben Omar, N. & Guyot, J. P. (1999). Culture-independent quantification of physiologically-active microbial groups in fermented foods using rRNA-targeted oligonucleotide probes: application to pozol, a Mexican lactic acid fermented maize dough. *Journal of Applied Microbiology* **87**, 131-140.

Anazawa, H., Katsumata, R. & Araki, K. (1997). Cloning of a transaminase gene of *Citrobacter freundii* and the gene dosage effect on L-phenylalanine production through transaminase reaction. *Journal of General and Applied Microbiology* **43**, 125-128.

Arfi, K., Amárita, F., Spinnler, H. E. & Bonnarme, P. (2003). Catabolism of volatile sulphur compounds precursors by *Brevibacterium linens* and *Geotrichum candidum*, two microorganisms of the cheese ecosystem. *Journal of Biotechnology* **105**, 245-253.

Arfi, K., Spinnler, H. E., 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*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **58**, 503-510.

Arnau, J., Jorgensen, F., Madsen, S. M., Vrang, A. & Israelsen, H. (1997). Cloning, expression, and characterization of the *Lactococcus lactis pfl* gene, encoding pyruvate formate-lyase. *Journal of Bacteriology* **179**, 5884-5891.

Ascon-Reyes, D. B., Ascon-Cabrera, M. A., Cochet, N. & Lebeault, J. M. (1995). Indirect conductance for measurements of carbon dioxide produced by *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* TJ 160 in pure and mixed cultures. *Journal of Dairy Science* **78**, 8-16.

Atlan, D. (1996). Les connaissances acquises chez les lactocoques sont-elles transposables aux autres bactéries lactiques? *Lait* **76**, 129-137.

Aubel, D., Germond, J. E., Gilbert, C. & Atlan, D. (2002). L'activité β-cystathionase au sein de l'espèce *Lactobacillus delbrueckii*. *Sciences des Aliments* **22**, 161-166.

Auberger, B., Lenoir, J. & Bergère, J. L. (1997). Caractérisation partielle des exopeptidases d'une souche de *Geotrichum candidum*. *Science des Aliments* **17**, 655-670.

Baroiller, C. & Schmidt, J. L. (1990). Contribution à l'étude de l'origine des levures du fromage de Camembert. *Lait* **70**, 67-84.

Bastard, J. P., Chambert, S., Ceppa, F., Coude, M., Grapez, E., Loric, S., Muzeau, F., Spyratos, K., Poirier, K., Copois, V., Tse, C. & Bienvenu, T. (2002). Les méthodes d'extraction et de purification des ARN. *Annales de Biologie Clinique* **60**, 513-523.

Bauquis, A. C., Raynaud, V., Le Tual, A. G., Eppert, I., Bercetche, J. C. & Roustan, G. (2002). Effect de combinaisons sélectionnées de cultures lactiques et de cultures d'affinage sur l'aspect et l'arôme de pâtes molles fleuries traditionnelles. *Sciences Des Aliments* **22**, 169-175.

Béal, C. & Sodini, I. (2003). Fabrication des yaourts et des laits fermentés. *Les Techniques de l'Ingénieur*, pp. 1-16. Editions TI Sciences et Techniques.

Becerra, M. & González Siso, M. I. (1996). Yeast β-galactosidase in solid-state fermentations. *Enzyme and Microbial Technology* **19**, 39-44.

Béjà, O., Koonin, E. V., Aravind, L., Taylor, L. T., Seitz, H., Stein, J. L., Bensen, D. C., Feldman, R. A., Swanson, R. V. & DeLong, E. F. (2002). Comparative genomic analysis of archaeal genotypic variants in a single population and in two different oceanic provinces. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 335-345.

Béjà, O., Suzuki, M. T., Koonin, E. V., Aravind, L., Hadd, A., Nguyen, L. P., Villacorta, R., Amjadi, M., Garrigues, C., Jovanovich, S. B., Feldman, R. A. & DeLong, E.F. (2000). Construction and analysis of bacterial artificial chromosome libraries from a marine microbial assemblage. *Environmental Microbiology* **2**, 516-529.

Benthin, S. & Villadsen, J. (1995). Different inhibition of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* by D- and L-lactic acid: effects on lag phase, growth rate and cell yield. *Journal of Applied Bacteriology* **78**, 647-654.

Beresford, T. P., Fitzsimons, N. A., Brennan, N. L. & Cogan, T. M. (2001). Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal* **11**, 259-274.

Bergère, J. L. & Tourneur, J. (1992). Les bactéries de surface des fromages. In *Les groupes microbiens d'intérêt laitier*, pp. 127-163. Edited by J. Hermier, J. Lenoir & F. Weber. Paris: CEPIL.

Besançon, X., Smet, C., Chabalier, C., Rivemale, M., Reverbel, J. P., Ratomahenina, R. & Galzy, P. (1992). Study of yeast flora of Roquefort cheese. *International Journal of Food Microbiology* **17**, 9-18.

Beuvier, E., Berthaud, K., Cegarra, S., Dasen, A., Pochet, S., Buchin, S. & Duboz, G. (1997). Ripening and quality of Swiss-type cheese made from raw, pasteurized or microfiltered milk. *International Dairy Journal* **7**, 311-323.

Blechschmidt, D., Gohr, C. & Tröger, R. (1982). Arthrobacter globiformis – ein neues hefelytisches bakterium. *Zeitschrift für Allgemeine Mikrobiologie* **22**, 443-451.

Bockelmann, W. & Hoppe-Seyler, T. (2001). The surface flora of bacterial smear-ripened cheeses from cow's and goat's milk. *International Dairy Journal* **11**, 307-314.

Bockelmann, W. (1995). The proteolytic system of starter and non-starter bacteria: components and their importance for cheese ripening. *International Dairy Journal* **5**, 997-994.

Bockelmann, W. (2002a). Development of defined surface starter cultures for the ripening of smear cheeses. *International Dairy Journal* **12**, 123-131.

Bockelmann, W. (2002b). Development of smear cultures for semi-hard, soft and acid curd cheese. *DMZ-Lebensmittelindustrie und Milchwirtschaft* **123**, 93-99.

Bockelmann, W., Fuehr, C., Martin, D. & Heller, K. J. (1997a). Color development by red-smear surface bacteria. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte* **49**, 285-292.

Bockelmann, W., Hoppe-Seyler, T., Krusch, U., Hoffmann, W. & Heller, K. J. (1997c). The microflora of Tilsit cheese. Part 2: Development of a surface smear starter culture. *Nahrung* **41**, 213-218.

Bockelmann, W., Krusch, U., Engel, G., Klijn, N., Smit, G. & Heller, K. J. (1997b). The microflora of Tilsit cheese. Part 1: Variability of the smear flora. *Nahrung* **41**, 208-212.

Bockelmann, W., Portius, S., Lick, S. & Heller, K. J. (1999). Sporulation of *Penicillium camemberti* in submerged batch culture. *Systematic and Applied Microbiology* **22**, 479-485.

Bockelmann, W., Willems, K. P., Neve, H. & Heller, K. H. (2005). Cultures for the ripening of smear cheeses. *International Dairy Journal* **15**, 719-732.

Bockelmann, W., Willems, P., Rademaker, J., Noordmann, W. & Heller, K. J. (2003). Cultures for surface ripening of smeared soft cheese. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte* **55**, 277-299.

Bolotin-Fukuhara, M., Casaregola, S. & Aigle, M. (2005). Genome evolution: lessons from Genolevures. *Topics in Current Genetics* **15**, 165-196.

Bolotin-Fukuhara, M., Toffano-Nioche, C., Artiguenave, F., Duchateau-Nguyen, G., Lemaire, M., Marmeisse, R., Montrocher, R., Robert, C., Termier, M., Wincker, P. & Wesolowski-Louvel, M. (2000). Genomic Exploration of the Hemiascomycetous Yeasts: 11. *Kluyveromyces lactis*. *FEBS Letters* **487**, 66-70.

Bolumar, T., Sanz, Y., Aristoy, M. C. & Toldra, F. (2003). Purification and properties of an arginyl aminopeptidase from *Debaryomyces hansenii*. *International Journal of Food Microbiology* **86**, 141-151.

Bonaïti, C. (2004). Approche dynamique des fonctions et des interactions microbiennes dans un écosystème reconstitué par une méthode d'omission : exemple de l'affinage du fromage de Livarot. Thèse à l'*Institut National de la Recherche Agronomique*. Institut National Agronomique Paris-Grignon, France.

Bonaïti, C., Leclercq-Perlat, M. N., Latrille, E. & Corrieu, G. (2004). Deacidification by *Debaryomyces hansenii* of smear soft cheeses ripened under controlled conditions: relative humidity and temperature influences. *Journal of Dairy Science* **87**, 3976-3988.

Bonaïti, C., Parayre, S. & Irlinger, F. (2006). Novel extraction strategy of ribosomal RNA and genomic DNA from cheese for PCR-based investigations. *International Journal of Food Microbiology* **107**, 171-179.

Bonnarme, P., Arfi, K., Dury, C., Helinck, S., Yvon, M. & Spinnler, H. E. (2001). Sulfur compound production by *Geotrichum candidum* from L-methionine: importance of transamination step. *FEMS Microbiology Letters* **205**, 247-252.

Bonnarme, P., Psoni, L. & Spinnler, H. E. (2000). Diversity of L-methionine catabolism pathways in cheese-ripening bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 5514-5517.

Boucabeille C, Letellier L, Simonet JM, Henckes G. (1998). Mode of action of Linenscin OC2 against *Listeria innocua*. *Applied and Environmental Microbiology* **64**, 3416-3421.

Boucabeille, C., Mengin-Lecreulx, D., Henckes, G., Simonet, J. M. & Heijenoort, J. V. (1997). Antibacterial and hemolytic activities of linenscin OC2, a hydrophobic substance produced by *Brevibacterium linens* OC2. *FEMS Microbiology Lettters* **153**, 295-301.

Bouton, Y. & Grappin, R. (1995). Comparaison de la qualité de fromages à pâte pressée cuite fabriqués à partir de lait cru ou microfiltré. *Lait* **75**, 31-44.

Boutrou, R., Kerriou, L. & Gassi, J. Y. (sous presse). Contribution of *Geotrichum candidum* to the proteolysis of soft cheese. *International Dairy Journal*.

Bouvier, T. & del Giorgio, P. A. (2003). Factors influencing the detection of bacterial cells using fluorescence *in situ* hybridization (FISH): a quantitative review of published reports. *FEMS Microbiology Ecology* **44**, 3-15.

Boyaval, P. & Desmazeaud, M. J. (1983). Le point des connaissances sur *Brevibacterium linens*. *Lait* **63**, 187-216.

Bozzi, A., Saliola, M., Falcone, C., Bossa, F. & Martini, F. (1997). Structural and biochemical studies of alcohol dehydrogenase isozymes from *Kluyveromyces lactis*. *Biochimica et Biophysica Acta* **1339**, 133-142.

Brennan, N. M., Brown, R., Goodfellow, M., Ward, A. C., Beresford, T. P., Vancanneyt, M., Cogan, T. M. & Fox, P. F. (2001b). *Microbacterium gubbeenense* sp. nov., from the surface of a smear-ripened cheese. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **51**, 1969-1976.

Brennan, N. M., Brown, R., Goodfellow, M., Ward, A. C., Beresford, T. P., Simpson, P. J., Fox, P. F. & Cogan, T. M. (2001a). *Corynebacterium mooreparkense* sp. nov. and *Corynebacterium casei* sp. nov., isolated from the surface of a smear-ripened cheese. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **51**, 843-852.

Brennan, N. M., Ward, A. C., Beresford, T. P., Fox, P. F., Goodfellow, M. & Cogan, T. M. (2002). Biodiversity of the bacterial flora on the surface of a smear cheese. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 820-830.

Brinkman, N. E., Haugland, R. A., Wymer, L. J., Byappanahalli, M., Whitman, R. L. & Vesper, S. J. (2003). Evaluation of a rapid, quantitative real-time PCR method for enumeration of pathogenic *Candida* cells in water. *Applied and Environmental Microbiology* **69**, 1775-1782.

Brinkmeyer, R., Knittel, K., Jürgens, J., Weyland, H., Amann, R. & Helmke, E. (2003). Diversity and structure of bacterial communities in Arctic *versus* Antarctic Pack Ice. *Applied and Environmental Microbiology* **69**, 6610-6619.

Bruinenberg, P. G., De Roo, G. & Limsowtin, G. (1997). Purification and characterization of cystathionine (gamma)-lyase from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK11: Possible role in flavor compound formation during cheese maturation. *Applied and Environmental Microbiology* **63**, 561-566.

Buchan, A., Newell, S. Y., Butler, M., Biers, E. J., Hollibaugh, J. T. & Moran, M. A. (2003). Dynamics of bacterial and fungal communities on decaying salt marsh grass. *Applied and Environmental Microbiology* **69**, 6676-6687.

Butte, A. J., Tamayo, P., Slonim, D., Golub, T. R. & Kohane, I. S. (2000). Discovering functional relationships between RNA expression and chemotherapeutic susceptibility using relevance networks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 12182-12186.

Callon, C., Delbès, C., Duthoit, F. & Montel, M. C. (2006). Application of SSCP-PCR fingerprinting to profile the yeast community in raw milk Salers cheeses. *Systematic and Applied Microbiology* **29**, 172-180.

Cao, Z., Wu, H. K., Bruce, A., Wollenberg, K. & Panjwani, N. (2002). Detection of differentially expressed genes in healing mouse corneas, using cDNA microarrays. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **43**, 2897-2904.

Caplice, E. & Fitzgerald, G. F. (1999). Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology* **50**, 131-149.

Cappa, F. & Cocconcelli, P. S. (2001). Identification of fungi from dairy products by means of 18S rRNA analysis. *International Journal of Food Microbiology* **69**, 157-160.

Carnio, M. C., Eppert, I. & Scherer, S. (1999). Analysis of the bacterial surface ripening flora of german and french smeared cheeses with respect to their anti-listerial potential. *International Journal of Food Microbiology* **47**, 89-97.

Carnio, M. C., Höltzel, A., Rudolf, M., Henle, T., Jung, G. & Scherer, S. (2000). The macrocyclic peptide antibiotic Micrococcin P1 is secreted by the food-borne bacterium *Staphylococcus equorum* WS 2733 and inhibits *Listeria monocytogenes* on Soft Cheese. *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 2378-2384.

Carpentier, A. S., Riva, A., Tisseur, P., Didier, G. & Hénaut, A. (2004). The operons, a criterion to compare the reliability of transcriptome analysis tools: ICA is more reliable than ANOVA, PLS and PCA. *Computational Biology and Chemistry* **28**, 3-10.

Carreira, A., Dillinger, K., Eliskases-Lechner, F., Loureiro, V., Ginzinger, W. & Rohm, H. (2002). Influence of selected factors on browning of Camembert cheese. *The Journal of Dairy Research* **69**, 281-292.

Carreira, A., Ferreira, L. M. & Loureiro, V. (2001). Brown pigments produced by *Yarrowia lipolytica* result from extracellular accumulation of homogentisic acid. *Applied and Environmental Microbiology* **67**, 3463-3468.

Carreira, A., Paloma, A. & Loureiro, V. (1998). Pigment producing yeasts involved in a brown surface discoloration of ewe's cheese. *International Journal of Food Microbiology* **41**, 223-230.

Casalta, E. (2003). Bases scientifiques de la qualité du Venaco, fromage traditionnel au lait cru. Mise au point de ferments sélectionnés spécifiques. Thèse à l'*Institut National de la Recherche Agronomique*. Laboratoire de Recherches sur le Développement de l'Elevage, Corté, France.

Cernat Bondar, D., Beckerich, J. M. & Bonnarme, P. (2005). Involvement of a branched-chain aminotransferase in production of volatile sulfur compounds in *Yarrowia lipolytica*. *Applied and Environmental Microbiology* **71**, 4585-4591.

Chazaud, M. T. & Larpent, J. P. (1980). Stimulation de l'activité des ferments lactique par l'extrait de levure. *Revue Laitière Française* **383**, 19-24.

Chen, I. P., Haehnel, U., Altschmied, L., Schubert, I. & Puchta, H. (2003). The transcriptional response of *Arabidopsis* to genotoxic stress: a high-density colony array study (HDCA). *The Plant Journal: for cell and molecular biology* **35**, 771-786.

Cho, J. & Tiedje, J. M. (2002). Quantitative detection of microbial genes by using DNA microarrays. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 1425-1430.

Choisy, C., Desmazeaud, M., Grippon, J. C., Lamberet, G. & Lenoir, J. (1997a). La biochimie de l'affinage. In *Le fromage*, pp. 86-153. Edited by A. Eck & J. C. Gillis. Paris: Technique & Documentation, Lavoisier.

Choisy, C., Desmazeaud, M., Guéguen, M., Lenoir, J., Schmidt, J. L. & Tourneur, C. (1997b). Les phénomènes microbiens. In *Le fromage*, pp. 377-446. Edited by A. Eck & J. C. Gillis. Paris: Technique & Documentation, Lavoisier.

Chudin, E., Walker, R., Kosaka, A., Wu, S. X., Rabert, D., Chang, T. K. & Kreder, D. E. (2002). Assessment of the relationship between signal intensities and transcript concentration for Affymetrix GeneChip arrays. *Genome biology* **3**, research0005.

CNIEL. « L'économie laitière en chiffres ». Centre National Interprofessionnel de l'Economie Laitière, www.cniel.com.

Cocaign-Bousquet, M., Garrigues, C., Loubière, P. & Lindley, N. D. (1996). Physiology of pyruvate metabolism in *Lactococcus lactis*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **70**, 253-267.

Coiffier, O. (1992). Les bactéries coliformes. In *Les groupes microbiens d'intérêt laitier*, pp. 303-322. Edited by J. Hermier, J. Lenoir & F. Weber. Paris: CEPIL.

Collins, Y. F., McSweeney, P. L. & Wilkinson, M. G. (2003). Evidence of a relationship between autolysis of starter bacteria and lipolysis in cheddar cheese during ripening. *Journal of Dairy Research* **70**, 105-113.

Corbo, M. R., Lanciotti, R., Albenzio, M. & Sinigaglia, M. (2001). Occurrence and characterization of yeasts isolated from milks and dairy products of Apulia region. *International Journal of Food Microbiology* **69**, 147-152.

Corroler, D. (1999). Biodiversité des lactocoques sauvages au sein de la zone d'appellation d'origine « Camembert de Normandie » : implication au cours de la transformation fromagère. Thèse à l'*Institut de Biologie Fondamentale et Appliquée*. Université de Caen Basse-Normandie, France.

Corsetti, A., Rossi, J. & Gobbetti, M. (2001). Interactions between yeasts and bacteria in the smear surface-ripened cheeses. *International Journal of Food Microbiology* **69**, 1-10.

Cosentino, S., Fadda, M. E., Deplano, M., Mulargia, A. F. & Palmas, F. (2001). Yeasts associated with Sardinian ewe's dairy products. *International Journal of Food Microbiology* **69**, 53-58.

Crow, V. & Curry, B (2003). *Lactobacillus* spp.: *Lactobacillus delbrueckii* group. In *Encyclopedia of Dairy Sciences*, pp. 1494-1497. Edited by H. Roginski, J. W. Fuquay & P. F. Fox. London: Academic Press.

Curry, B & Crow, V. (2003). *Lactobacillus* spp.: general characteristics. In *Encyclopedia of Dairy Sciences*, pp. 1479-1484. Edited by H. Roginski, J. W. Fuquay & P. F. Fox. London: Academic Press.

Curtin, A.C., Gobbetti, M. & McSweeney, P. L. (2002). Peptidolytic, esterolytic and amino acid catabolic activities of selected bacterial strains from the surface of smear cheese. *International Journal of Food Microbiology* **76**, 231-240.

Dacosta, Y. (2000). In *La bio-protection des aliments*, 224 p. Edited by Y. Dacosta. Paris: Technique & Documentation, Lavoisier.

Dahllöf, I. (2002). Molecular community analysis of microbial diversity. *Current Opinion in Biotechnology* **13**, 213-217.

de Vos, W. M. & Vaughan, E. E. (1994). Genetics of lactose utilization in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* **15**, 217-237.

del Carmen Plata, M., Mauricio, J. C., Millan, C. & Ortega, J. M. (1998). *In vitro* specific activity of alcohol acetyltransferase and esterase in two flor yeast strains during biological aging of sherry wines. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **85**, 369-374.

Delves-Broughton, J. (1990). Nisin and its uses as a food preservative. *Food Technology* **44**, 100-117.

Demarigny, Y., Berger, C., Desmasures, N., Guéguen, M. & Spinnler, H. E. (2000). Flavour sulphides are produced from methionine by two different pathways by *Geotrichum candidum*. *Journal of Dairy Research* **67**, 371-380.

Denef, V. J., Park, J., Rodrigues, J. L. M., Tsoi, T. V., Hashsham, S. A. & Tiedje, J. M. (2003). Validation of a more sensitive method for using spotted oligonucleotide DNA microarrays for functional genomics studies on bacterial communities. *Environmental Microbiology* **5**, 933-943.

Denis, P., Edwards, E. A., Liss, S. N. & Fulthorpe, R. (2003). Monitoring gene expression in mixed microbial communities by using DNA microarrays. *Applied and Environmental Microbiology* **69**, 769-778.

Derrick, S. & Large, P. J. (1993). Activities of enzymes of the Ehrlich pathway and formation of branched-chain alcohols in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida utilis* grown in continuous culture on valine or ammonium as sole nitrogen source. *Journal of General Microbiology* **139**, 2783-2792.

Desmasures, N. (1995). Etude des laits de haute qualité : caractéristiques et aptitudes microbiologiques à la transformation en Camembert au lait cru. Thèse à l'*Institut de Biologie Appliquée*. Université de Caen Basse-Normandie, France.

Desmazeaud, M. (1992). Les bactéries lactiques. In *Les groupes microbiens d'intérêt laitier*, pp. 9-60. Edited by J. Hermier, J. Lenoir & F. Weber. Paris: Technique & Documentation, Lavoisier.

Dias, B. & Weimer, B. (1998a). Conversion of methionine to thiols by Lactococci, Lactobacilli, and Brevibacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **64**, 3320-3326.

Dias, B. & Weimer, B. (1998b). Purification and characterization of L-methionine □-lyase from *Brevibacterium linens* BL2. *Applied and Environmental Microbiology* **64**, 3327-3331.

Dickinson, J. R., Harrison, S. J. & Hewlins, M. J. E. (1998). An investigation of the metabolism of valine to isobutyl alcohol in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry* 273, 25751-25756.

Didier, G., Brezellec, P., Rémy, E. & Hénaut, A. (2002). GeneANOVA - gene expression analysis of variance. *Bioinformatics* **18**, 490-491.

Dieuleveux, V. & Guéguen, M. (1998). Antimicrobial effects of D-3-phenyllactic acid on *Listeria monocytogenes* in TSB-YE medium, milk, and cheese. *Journal of Food Protection* **61**, 1281-1285.

Dieuleveux, V., Lemarinier, S. & Guéguen, M. (1998a). Antimicrobial spectrum and target site of D-3-phenyllactic acid. *International Journal of Food Microbiology* **40**, 177-183.

Dieuleveux, V., van Der Pyl, D., Chataud, J. & Guéguen, M. (1998b). Purification and characterization of anti-*Listeria* compounds produced by *Geotrichum candidum*. *Applied and Environmental Microbiology* **64**, 800-803.

Dillon, J. C. & Berthier, A. M. (1997). Le fromage dans l'alimentation. In *Le fromage*, pp. 713-724. Edited by A. Eck & J. C. Gillis. Paris: Technique & Documentation, Lavoisier.

Dobric, N., Bruinenberg, P. G., Limsowtin, G., Hillier, A. J. & Davidson, B. E. (1998). Cystathionine g-lyase from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK11. *The Australian Journal of Dairy Technology* **53**, 131.

Dobric, N., Limsowtin, G. K. Y., Hillier, A. J., Dudman, N. P. B. & Davidson, B. E. (2000). Identification and characterization of a cystathionine beta/gamma-lyase from *Lactococcus lactis* ssp *cremoris* MG1363. *FEMS Microbiology Letters* **182**, 249-254.

Dojka, M. A., Harris, J. K. & Pace, N. R. (2000). Expanding the known diversity and environmental distribution of an uncultured phylogenetic division of bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 1617-1621.

Dorigo, U., Volatier, L. & Humbert, J. F. (2005). Molecular approaches to the assessment of biodiversity in aquatic microbial communities. *Water Research* **39**, 2207-2218.

Draghici, S. (2002). Statistical intelligence: effective analysis of high-density microarray data. *Drug Discovery Today* **7**, 55-63.

Dufossé, L. (2001). La biogénèse de la couleur par les bactéries d'affinage. In *Biogénèse des propriétés organoleptiques des produits laitiers.* Edited by Adeprina. Paris: CEPIL.

Dufossé, L., Galaup, P., Yaron, A., Arad, S. M., Blanc, P., Murthy, N. C., Ravishankar, G. A. (2005). Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality? *Trends in Food Science & Technology* **16**, 389-406.

Dufossé, L., Mabon, P. & Binet, A. (2001). Assessment of the coloring strength of brevibacterium linens strains: spectrocolorimetry versus total carotenoid extraction/quantification. *Journal of Dairy Science* **84**, 354-360.

Dujon, B., Sherman, D., Fischer, G., Durrens, P., Casaregola, S., Lafontaine, I., De Montigny, J., Marck, C., Neuveglise, C., Talla, E., Goffard, N., Frangeul, L., Aigle, M., Anthouard, V., Babour, A., Barbe, V., Barnay, S., Blanchin, S., Beckerich, J. M., Beyne, E., Bleykasten, C., Boisrame, A., Boyer, J., Cattolico, L., 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, J. M., Nikolski, M., Oztas, S., Ozier-Kalogeropoulos, O., Pellenz, S., Potier, S., Richard, G. F., Straub, M. L., Suleau, A., Swennen, D., Tekaia, F., Wesolowski-Louvel, M., Westhof, E., Wirth, B., Zeniou-Meyer, M., Zivanovic, I., Bolotin-Fukuhara, M., Thierry, A., Bouchier, C., Caudron, B., Scarpelli, C., Gaillardin, C., Weissenbach, J., Wincker, P. & Souciet, J. L. (2004). Genome evolution in yeasts. *Nature* **430**, 35-44.

Duthoit, F., Godon, J. J. & Montel, M. C. (2003). Bacterial community dynamics during production of registered designation of origin Salers cheese as evaluated by 16S rRNA gene single-strand conformation polymorphism analysis. *Applied and Environmental Microbiology* **69**, 3840-3848.

Duthoit, F., Tessier, L. & Montel, M. C. (2005). Diversity, dynamics and activity of bacterial populations in "Registered Designation of Origin" Salers cheese by single-strand conformation polymorphism analysis of 16S rRNA genes. *Journal of Applied Microbiology* **98**, 1198-1208.

Eden, A., Simchen, G. & Benvenisty, N. (1996). Two yeast homologs of ECA39, a target for c-Myc regulation, code for cytosolic and mitochondrial branched-chain amino acid aminotransferases. *The Journal of Biological Chemistry* **271**, 20242-20245.

Ehrmann, M., Ludwig, W. & Schleifer, K. H. (1994). Reverse dot blot hybridization: a useful method for the direct identification of lactic acid bacteria in fermented food. *FEMS Microbiology Letters* **117**, 143-149.

Eisen, M. B., Spellman, P. T., Brown, P. O. & Botstein, D. (1998). Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **95**, 14863-14868.

Eklund, T. (1984). The effect of carbon dioxide on bacterial growth and on uptake processes in bacterial membrane vesicles. *International Journal of Food Microbiology* **1**, 179-185.

El-Gazzar, F. E. & Marth, E. H. (1992). *Salmonellae,* salmonellosis and dairy foods: a review. *Journal of Dairy Science* **75**, 2327-2343.

Eliskases-Lechner, F. & Ginzinger, W. (1995a). The bacterial flora of surface-ripened cheeses with special regard to coryneform. *Lait* **75**, 571-584.

Eliskases-Lechner, F. & Ginzinger, W. (1995b). The yeast flora of surface-ripened cheeses. *Milchwissenschaft* **50**, 458-462.

Engels, W. J. M. (1997). Volatile and non-volatile compounds in ripened cheese: their formation and their contribution to flavour. PhD Thesis. Wageningen Agricultural University, Wageningen, the Netherlands.

Engels, W. J. M., Alting, A. C., Arntz, M. M. T. G., Gruppen, H., Voragen, A. G. J., Smit, G. & Visser, S. (2000). Partial purification and characterization of two aminotransferases from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* B78 involved in the catabolism of methionine and branched-chain amino acids. *International Dairy Journal* **10**, 443-452.

Ennahar, S. & Deschamps, N. (2000). Anti-*Listeria* effect of enterocin A, produced by cheese-isolated *Enterococcus faecium* EFM01, relative to other bacteriocins from lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology* **88**, 449-457.

Ennahar, S., Aoude-Werner, D., Sorokine, O., van Dorsselaer, A., Bringel, F., Hubert, J. C. & Hasselmann, C. (1996). Production of pediocin AcH by *Lactobacillus plantarum* WHE 92 isolated from cheese. *Applied and Environmental Microbiology* **62**, 4381-4387.

Entcheva, P., Liebl, W., Johann, A., Hartsch, T. & Streit, W. R. (2001). Direct cloning from enrichment cultures, a reliable strategy for isolation of complete operons and genes from microbial consortia. *Applied and Environmental Microbiology* **67**, 89-99.

Ercolini, D. (2004). PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *Journal of Microbiological Methods* **56**, 297-314.

Ercolini, D., Hill, P. J. & Dodd, C. E. (2003a). Development of a fluorescence *in situ* hybridization method for cheese using a 16S rRNA probe. *Journal of Microbiological Methods* **52**, 267-271.

Ercolini, D., Hill, P. J. & Dodd, C. E. (2003b). Bacterial community structure and location in Stilton cheese. *Applied and Environmental Microbiology* **69**, 3540-3548.

Ercolini, D., Moschetti, G., Blaiotta, G. & Coppola, S. (2001). The potential of a polyphasic PCR-DGGE approach in evaluating microbial diversity of natural whey cultures for water-buffalo Mozzarella cheese production: bias of "culture-dependent" and "culture-independent" analyses. *Systematic and Applied Microbiology* **24**, 610-617.

Eschbach, M., Mobitz, H., Rompf, A. & Jahn, D. (2003). Members of the genus *Arthrobacter* grow anaerobically using nitrate ammonification and fermentative processes: anaerobic adaptation of aerobic bacteria abundant in soil. *FEMS Microbiology Letters* **223**, 227-230.

Fatichenti, F., Bergère, J. L., Deiana, P. & Farris, G. A. (1983). Antagonistic activity of *Debaryomyces hansenii* towards *Clostridium tyrobutyricum* and *Cl. butyricum*. *Journal of Dairy Research* **50**, 449-457.

Felske, A., Wolterink, A., van Lis, R., de Vos, W. M. & Akkermans, A. D. (1999). Searching for predominant soil bacteria: 16S rDNA cloning *versus* strain cultivation. *FEMS Microbiology Ecology* **30**, 137-145.

Ferchichi, M., Hemme, D. & Nardi, M. (1987). Na^+-stimulated transport of L-methionine in *Brevibacterium linens* CNRZ 918. *Applied and Environmental Microbiology* **53**, 2159-2164.

Ferchichi, M., Hemme, D., Nardi, M. & Pamboukdjian, N. (1985). Production of methanethiol from methionine by *Brevibacterium linens* CNRZ 918. *Journal of General Microbiology* **131**, 715-723.

Fernandez, M., van Doesburg, W., Rutten, G. A., Marugg, J. D., Alting, A. C., van Kranenburg, R. & Kuipers, O. P. (2000). Molecular and functional analyses of the metC gene of *Lactococcus lactis*, encoding cystathionine beta-lyase. *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 42-48.

Feurer, C., Irlinger, F., Spinnler, H. E., Glaser, P. & Vallaeys, T. (2004a). Assessment of the rind microbial diversity in a farmhouse-produced *vs* a pasteurized industrially produced soft red-smear cheese using both cultivation and rDNA-based methods. *Journal of Applied Microbiology* **97**, 546-556.

Feurer, C., Vallaeys, T., Corrieu, G & Irlinger, F. (2004b). Does smearing inoculum reflect the bacterial composition of the smear at the end of the ripening of a French soft red-smear cheese? *Journal of Dairy Science* **87**, 3189-3197.

Fickers, P., Fudalej, F., Le Dall, M. T., Casaregola, S., Gaillardin, C., Thonart, P. & Nicaud, J. M. (2005). Identification and characterisation of *LIP7* and *LIP8* genes encoding two extracellular triacylglycerol lipases in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Fungal Genetics and Biology* **42**, 264-274.

Fitzsimons, N. A., Cogan, T. M., Condon, S. & Beresford, T. (2001). Spatial and temporal distribution of non-starter lactic acid bacteria in Cheddar cheese. *Journal of Applied Microbiology* **90**, 600-608.

Fleet, G. H. & Mian, M. A. (1987). The occurrence and growth of yeasts in dairy products. *International Journal of Food Microbiology* **4**, 145-155.

Fleet, G. H. (1990). Yeasts in dairy products. *Journal of Applied Bacteriology* **68**, 199-211.

Fleet, G. H. (1999). Microorganisms in food ecosystems. *International Journal of Food Microbiology* **50**, 101-117.

Fleischmann, R. D., Adams, M. D., White, O., Clayton, R. A., Kirkness, E. F., Kerlavage, A. R., Bult, C. J., Tomb, J. F., Dougherty, B. A., Merrick, J. M., McKenney, K., Sutton, G., FitzHugh, W., Fields, C., Gocayne, J. D., Scott, J., Shirley, R., Liu, L., Glodek, A., Kelley, J. M., Weidman, J. F., Phillips, C. A., Spriggs, T., Hedblom, E., Cotton, M. D., Utterback, T. R., Hanna, M. C., Nguyen, D. T., Saudek, D. M., Brandon, R. C., Fine, L. D., Fritchman, J. L., Fuhrmann, J. L., Geoghagen, N. S. M., Gnehm, C. L., McDonald, L. A., Small, K. V., Fraser, C. M., Smith, H. Q. & Venter, J. C. (1995). Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* **269**, 496-512.

Fleming, H. P., McFeeters, R. F. & Daeschel, M. A. (1985). The lactobacilli, pediococci and leuconostocs: vegetable products. In *Bacterial. Starters Cultures for Foods*, pp. 97-118. Edited by S. E. Gilliland. Boca Raton: CRS Press.

Flores, M. V., Cuellas, A. & Voget, C. E. (1999). The proteolytic system of the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Yeast* **15**, 1437-1448.

Fodor, S. P., Read, J. L., Pirrung, M. C., Stryer, L., Lu, A. T. & Solas, D. (1991). Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. *Science* **251**, 767-773.

Fox, G. E., Pechman, K. & Woese, C. R. (1977). Comparative cataloging of 16S ribosomal ribonucleic acid: molecular approach to prokaryotic systematics. *International Journal of Systematic Bacteriology* **27**, 44-57.

Fox, P. F. & McSweeney, P. L. H. (2004). Cheese: An Overview. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, pp. 1-18. Edited by P. F. Fox, P. L. H. McSweeney, T. M. Cogan & T. P. Guinee. London: Elsevier.

Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M. & McSweeney, P. L. H. (2000). Microbiology of cheese ripening. In *Fundamentals of cheese science*, pp. 206-232. Aspen Publisher, Inc., Gaithersburg, Maryland.

Fox, P. F., Lucey, J. A. & Cogan, T. M. (1990). Glycolysis and related reactions during cheese manufacture and ripening. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **29**, 237-253.

Fox, P. F., McSweeney, P. L. H. & Lynch, C. M. (1998). Significance of non-starter lactic acid bacteria in cheddar cheese. *The Australian Journal of Dairy Technology* **53**, 83-89.

Frank, J. F. & Hassan, A. N. (1998). Starter cultures and their use. In *Applied Dairy Microbiology*, pp. 131-172. Edited by E. H. Marth & J. L. Steele. New York: Marcel Dekker.

Franz, C. M. A. P., Holzapfel, W. H. & Stiles, M. E. (1999). Enterococci at the crossroads of food safety? *International Journal of Food Microbiology* **47**, 1-24.

Freitas, A. C., Pintado, A. E., Pintado, M. E. & Malcata, F. X. (1999). Role of dominant microflora of Picante cheese on proteolysis and lipolysis. *International Dairy Journal* **9**, 593-603.

Frings, E., Holtz, C. & Kunz, B. (1993). Studies about casein degradation by *Brevibacterium linens*. *Milchwissenschaft* **48**, 130-133.

Fröhlich-Wyder, M. T. (2003). Yeast in dairy products. In *Yeasts in Food*, pp. 209-237. Edited by T. Boekhout & V. Robert. Hamburg: Behrs Verlag, Germany.

Frouin, V. & Gidrol, X. (2005). Analyse des données d'expression issues des puces à ADN. *Biofutur* **252**, 22-26.

Fuchs, B. M., Glockner, F. O., Wulf, J. & Amann, R. (2000). Unlabeled helper oligonucleotides increase the *in situ* accessibility to 16S rRNA of fluorescently labeled oligonucleotide probes. *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 3603-3607.

Furet, J. P., Quénée, P. & Tailliez, P. (2004). Molecular quantification of lactic acid bacteria in fermented milk products using real-time quantitative PCR. *International Journal of Food Microbiology* **97**, 197-207.

Galaup, P., Flamin, C., Carlet, E. & Dufossé, L. (2005). HPLC analysis of the pigments produced by the microflora isolated from the 'Protected Designation of Origin' French red-smear soft cheeses Munster, Epoisses, Reblochon and Livarot. *Food Research International* **38**, 855-860.

Gao, S. & Steele, J. L. (1998). Purification and characterization of oligomeric species of an aromatic amino acid aminotransferase from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* S3. *Journal of Food Biochemistry* **22**, 197-211.

Gao, S., Mooberry, E. S. & Steele, J. L. (1998). Use of ^{13}C nuclear magnetic resonance and gas chromatography to examine methionine catabolism by lactococci. *Applied and Environmental Microbiology* **64**, 4670-4675.

Gao, S., Oh, D. H., Broadbent, J. R., Johnson, M. E., Weimer, B. C. & Steele, J. L. (1997). Aromatic amino acid catabolism by lactococci. *Lait* **77**, 371-381.

Gardiner, G. E., Ross, R. P., Wallace, J. M., Scanlan, F. P., Jagers, P. J. M., Fitzgerald, G. F., Collins, J. K. & Stanton, C. (1999). Influence of a probiotic adjunct culture of *Enterococcus faecium* on the quality of Cheddar cheese. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**, 4907-4916.

Gavrish, E. Y., Krauzova, V. I., Potekhina, N. V., Karasev, S. G., Plotnikova, E. G., Altyntseva, O. V., Korosteleva, L. A. & Evtushenko, L. I. (2004). Three new species of Brevibacteria, *Brevibacterium antiquum* sp. nov., *Brevibacterium aurantiacum* sp. nov. and *Brevibacterium permense* sp. nov. *Microbiology* **73**, 176-183.

Geertsma, E. R., Duurkens, R. H. & Poolman, B. (2003). Identification of the dimer interface of the lactose transport protein from *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Molecular Biology* **332**, 1165-1174.

Gelsomino, R., Vancanneyt, M., Snauwaert, C., Vandemeulebroecke, K., Hoste, B., Cogan, T. M. & Swings, J. (2005). *Corynebacterium mooreparkense*, a later heterotypic synonym of *Corynebacterium variabile*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **55**, 1129-1131.

Gente, S., Larpin, S., Cholet, O., Guéguen, M., Vernoux J. P. & Desmasures N. (2007). Development of species-specific primers for identification of dominant yeasts from smear cheeses. *Journal of Dairy Research* **74**, 1-9.

Gerrior, S. & Bente, L. (1997). Nutrient content of the U.S. food supply, 1909-1994. In *Home Economics Research*, report 53. Washington, D.C.: U.S. Department of Agriculture, Center for Nutrition Policy and Promotion.

Ginolhac, A., Jarrin, C., Gillet, B., Robe, P., Pujic, P., Tuphile, K., Bertrand, H., Vogel, T. M., Perriere, G., Simonet, P. & Nalin, R. (2004). Phylogenetic analysis of polyketide synthase I domains

from soil metagenomic libraries allows selection of promising clones. *Applied and Environmental Microbiology* **70**, 5522-5527.

Giovannoni, S. J., Britschgi, T. B., Moyer, C. L. & Field, K. G. (1990). Genetic diversity in Sargasso sea bacterioplankton. *Nature* **345**, 60-62.

Giraffa, G. & Neviani, E. (2001). DNA-based, culture-independent strategies for evaluating microbial communities in food-associated ecosystems. *International Journal of Food Microbiology* **67**, 19-34.

Gobbetti, M., Folkertsma, B., Fox, P. F., Corsetti, A., Smacchi, E., De Angelis, M., Rossi, J., Kilcawley, K. & Cortini, M. (1999). Microbiology and biochemistry of Fossa (pit) cheese. *International Dairy Journal* **9**, 763-773.

Gobbetti, M., Smacchi, E., Semeraro, M., Fox, P. F., Lanciotti, R. & Cogan, T. (2001). Purification and characterization of an extracellular proline iminopeptidase from *Corynebacterium variabilis* NCDO 2101. *Journal of Applied Microbiology* **90**, 449-456.

Godon, J. J., Duthoit, F., Delbès, C., Millet, L. & Montel, M. C. (2001). Use of molecular fringerprint for the study of complex microbial ecosystem. Application to AOC Salers cheese. *Lait* **81**, 257-262.

Godon, J. J., Zumstein, E., Dabert, P., Habouzit, F. & Moletta, R. (1997). Molecular microbial diversity of an anaerobic digestor as determined by small-subunit rDNA sequence analysis. *Applied and Environmental Microbiology* **63**, 2802-2813.

Goffeau, A., Barrell, B. G., Bussey, H., Davis, R. W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J. D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E. J., Mewes, H. W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H. & Oliver, S. G. (1996). Life with 6000 genes. *Science* **274**, 546, 563-567.

Gonzalez, B., Arca, P., Mayo, B. & Suarez, J. E. (1994). Detection, purification, and partial characterization of plantaricin C, a bacteriocin produced by a *Lactobacillus plantarum* strain of dairy origin. *Applied and Environmental Microbiology* **60**, 2158-2163.

Gory, L., Millet, L., Godon, J. J. & Montel, M. C. (1999). Identification of *Staphylococcus carnosus* and *Staphylococcus warneri* isolated from meat by fluorescent *in situ* hybridization with 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Systematic and Applied Microbiology* **22**, 225-228.

Grecz, N., Dack, G. M. & Hedrick, L. R. (1961). Antimicrobial agent of aged surface ripened cheese. I- Isolation and assay. *Journal of Food Science* **26**, 72-78.

Grecz, N., Dack, G. M. & Hedrick, L. R. (1962). Antimicrobial agent of aged surface ripened cheese. II- Sources and properties of the active principle(s). *Journal of Food Science* **27**, 335-342.

Green, C. D., Simons, J. F., Taillon, B. E. & Lewin, D. A. (2001). Open systems: panoramic views of gene expression. *Journal of Immunological Methods* **250**, 67-79.

Gressens, P., Langston, C. & Martin, J. R. (1994). *In situ* PCR localization of herpes simplex virus DNA sequences in disseminated neonatal herpes encephalitis. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* **53**, 469-482.

Gripon, J. C. (1993). Mould-ripened cheeses. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, pp. 111-131. Edited by P. F. Fox. London: Chapman & Hall.

Guéguen, M. & Lenoir, J. (1975). Aptitude de l'espèce *Geotrichum candidum* à la production d'enzymes protéolytiques. *Lait* **55**, 145-162.

Guéguen, M. & Schmidt, J. L. (1992). Les levures et *Geotrichum candidum*. In *Les groupes microbiens d'intérêt laitier*, pp. 165-219. Edited by J. Hermier, J. Lenoir & F. Weber. Paris: CEPIL.

Guéguen, M. (1984). Contribution à la connaissance de *Geotrichum candidum* et notamment de sa variabilité. Conséquences pour l'industrie fromagère. Thèse. Université de Caen Basse-Normandie, France.

Gummalla, S. & Broadbent, J. R. (2001). Tyrosine and phenylalanine catabolism by *Lactobacillus* cheese flavor adjuncts. *Journal of Dairy Science* **84**, 1011-1019.

Guschin, D. Y., Mobarry, B. K., Proudnikov, D., Stahl, D. A., Rittmann, B. E. & Mirzabekov, A. D. (1997). Oligonucleotide microchips as genosensors for determinative and environmental studies in microbiology. *Applied and Environmental Microbiology* **63**, 2397-2402.

Guyomarc'h, F., Binet, A. & Dufossé, L. (2000). Characterization of *Brevibacterium linens* pigmentation using spectrocolorimetry. *International Journal of Food Microbiology* **57**,201-210.

Hahn, D., Amann, R. I., Ludwig, W., Akkermans, A. D. L. & Schleifer, K. H. (1992). Detection of microorganisms in soil after *in situ* hybridization with rRNA-targeted, fluorescently labeled oligonucleotides. *The Journal of General Microbiology* **138**, 879-887.

Handelsman, J. (2004). Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **68**, 669-685.

Hang, Y. D. & Woodman, E. E. (1992). Purification and characterization of lactate dehydrogenase from *Geotrichum candidum*. *Food Chemistry* **45**, 15-17.

Hannan, Y. &. Guéguen, M. (1985). Activités endopeptidasiques du levain fongique *Geotrichum candidum* en fonction de sa croissance. *Sciences des Aliments* **5**, 147-152.

Hansen, B. V., Houlberg, U. & Ardo, Y. (2001). Transamination of branched-chain amino acids by a cheese related *Lactobacillus paracasei* strain. *International Dairy Journal* **11**, 225-233.

Harmsen, H., Prieur, D. & Jeanthon, C. (1997). Group-specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes to identify thermophilic bacteria in marine hydrothermal vents. *Applied and Environmental Microbiology* **63**, 4061-4068.

Heid, C., Stevens, J., Livak, K. & Williams, P. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Research* **6**, 986-994.

Hein, I., Lehner, A., Rieck, P., Klein, K., Brandl, E. & Wagner M. (2001). Comparison of different approaches to quantify *Staphylococcus aureus* cells by real-time quantitative PCR and application of this technique for examination of cheese. *Applied and Environmental Microbiology* **67**, 3122-3126.

Helinck, S., Le Bars, D., Moreau, D. & Yvon, M. (2004). Ability of thermophilic lactic acid bacteria to produce aroma compounds from amino acids. *Applied and Environmental Microbiology* **70**, 3855-3861.

Hemme, D., Bouillane, C., Metro, F. & Desmazeaud, M. J. (1982). Microbial catabolism of amino acids during cheese ripening. *Sciences des Aliments* **2**, 113-123.

Henne, A., Schmitz, R. A., Bomeke, M., Gottschalk, G. & Daniel, R. (2000). Screening of environmental DNA libraries for the presence of genes conferring lipolytic activity on *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 3113-3116.

Henri-Dubernet, S., Desmasures, N. & Guéguen, M. (2004). Culture-dependent and culture-independent methods for molecular analysis of the diversity of *lactobacilli* in "Camembert de Normandie" cheese. *Lait* **84**, 179-189.

Herbin, S., Mathieu, F., Brulé, F., Branlant, C., Lefebvre, G. & Lebrihi, A. (1997). Characteristics and genetic determinants of bacteriocin activities produced by *Carnobacterium piscicola* CP5 isolated from cheese. *Current Microbiology* **35**, 319-326.

Heuer, H. & Smalla, K. (1997). Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) for studying soil microbial communities. In *Modern Soil Microbiology*, pp. 353-373. Edited by J. D. van Elsas, E. M. H. Wellington & J. T. Trevors. New York: Marcel Dekker.

Hodson, R. E., Dustman, W. A., Garg, R. P. & Moran, M. A. (1995). *In situ* PCR for visualization of microscale distribution of specific genes and gene products in prokaryotic communities. *Applied and Environmental Microbiology* **61**, 4074-4082.

Holland, R. & Coolbear, T. (1996). Purification of tributyrin esterase from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* E8. *Journal of Dairy Research* **63**, 131-140.

Holmquist, M., Tessier, D. C. & Cygler, M. (1997). Identification of residues essential for differential fatty acyl specificity of *Geotrichum candidum* lipases I and II. *Biochemistry* **36**, 15019-15025.

Holtz, C. & Kunz, B. (1994). Studies on degradation of whey proteins by *Brevibacterium linens*. *Milchwissenschaft* **49**, 130-131.

Holzapfel, W. H., **Geisen, R**. & **Schillinger, U**. (1995). Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *International Journal of Food Microbiology* 24, 343-362.

Hoppe-Seyler, T., 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**, 211-218.

Hunt, J., Boddy, L., Randerson, P. F. & Rogers, H. J. (2004). An evaluation of 18S rDNA approaches for the study of fungal diversity in grassland soils. *Microbial Ecology* **47**, 385-395.

Husson-Kao, C., Mengaud, J., Gripon, J. C., Benbadis, L. & Chapot-Chartier, M. P. (2000). Characterization of *Streptococcus thermophilus* strains that undergo lysis under unfavourable environmental conditions. *International Journal of Food Microbiology* **55**, 209-213.

Irlinger, F., Bimet, F., Delettre, J., Lefèvre, M. & Grimont, P. A. (2004). *Arthrobacter bergerei* sp. nov. and *Arthrobacter arilaitensis* sp. nov., novel coryneform species isolated from the surfaces of cheeses. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **55**, 457-462.

Irlinger, F., Morvan, A., El Sohl, N. & Bergère, J. L. (1997). Taxonomic characterization of coagulase-negative staphylococci in ripening flora traditional French cheeses. *Systematic and Applied Microbiology* **20**, 319-328.

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**, 473-484.

Jack, R. W., Tagg, J. R. & Ray, B. (1995). Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiological Reviews* **59**, 171-200.

Jakobsen, M. & Narvhus, J. (1996). Yeasts and their possible beneficial and negative effects on the quality of dairy products. *International Dairy Journal* **6**, 755-768.

Jay, J. M. (1997). Taxonomy, role, and significance of microorganisms in foods. In *Modern Food Microbiology*, pp. 13-37. Edited by D. R. Heldman. Missouri: Chapman & Hall.

Johnson, M. R., Montero, C. I., Conners, S. B., Shockley, K. R., Pysz, M. A. & Kelly, R. M. (2004). Functional genomics-based studies of the microbial ecology of hyperthermophilic micro-organisms. *Biochemical Society Transactions* **32**, 188-192.

Jollivet, N. (1991). Etude des potentialités aromatiques de ferments de fromagerie. Thèse à l'Université de Bourgogne, Dijon, France.

Jones, E. W. (1991). Three proteolytic systems in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* **266**, 7963-7966.

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**, 3330-3335.

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**, 434-442.

Kamra, D. N. (2005). Rumen microbial ecosystem. *Current Science* **89**, 124-135.

Kato, F., Egichi, Y., Nakano, M., Oshima, T. & Murata, A. (1991). Purification and characterization of linencin A, a bacteriocin of *Brevibacterium linens*. *Agricultural and Biological Chemistry* **55**, 161-166.

Khalid, N. M. & Marth, E. H. (1990). Lactobacilli - Their enzymes and role in ripening and spoilage of cheese: a review. *Journal of Dairy Science* **73**, 2669-2684.

Kieronczyk, A., Skeie, S., Langsrud, T., Le Bars, D. & Yvon, M. (2004). The nature of aroma compounds produced in a cheese model by glutamate dehydrogenase positive *Lactobacillus* INF15D depends on its relative aminotransferase activities towards the different amino acids. *International Dairy Journal* **14**, 227-235.

Kispal, G., Steiner, H., Courts, D. A., Rolinski, B. & Lill, R. (1996). Mitochondrial and cytosolic branched-chain amino acid transaminases from yeast, homologs of the *myc* oncogene-regulated Eca39 protein. *The Journal of Biological Chemistry* **271**, 24458-24464.

Kitamura, K., Kaneko, T. & Yamamoto, Y. (1974). Lysis of viable yeasts cells by enzyms of *Arthrobacter luteus*. II- Purification and properties of an enzyme zymolase, which lyses viable yeasts cells. *Journal of General and Applied Microbiology* **20**, 323-344.

Klein, N., Zourani, A. & Lortal, S. (2002). Peptidase activity of four yeast species frequently encountered in dairy products – comparison with several dairy bacteria. *International Dairy Journal* **12**, 853-861.

Kohl, W., Achenbach, H. & Reichenbach, H. (1983). The pigment of *Brevibacterium linens*: aromatic carotenoids. *Phytochemistry* **22**, 207-210.

Kollöffel, B., Meile, L. & Teuber, M. (1999). Analysis of brevibacteria on the surface of Gruyere cheese detected by *in situ* hybridization and by colony hybridization. *Letters in Applied Microbiology* **29**, 317-322.

Kronick, M. N. (2004). Creation of the whole human genome microarray. *Expert Review of Proteomics* **1**, 19-28.

Krubasik, P. & Sandmann, G. (2000). A carotenogenic gene cluster from *Brevibacterium linens* with novel lycogene cyclase genes involved in the synthesis of aromatic carotenoids. *Molecular and General Genetics* **263**, 423-432.

Kubickova, J. & Grosch, W. (1997). Evaluation of potent odorants of Camembert cheese by dilution and concentration techniques. *International Dairy Journal* **7**, 65-70.

Kubickova, J. & Grosch, W. (1998). Evaluation of flavour compounds of Camembert cheese. *International Dairy Journal* **8**, 11-16.

Kumura, H., Takagaki, K., Sone, T., Tsukahara, M., Tanaka, T. & Shimazaki, K. (2002). Casein digestion by *Debaryomyces hansenii* isolated from cheese. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **66**, 1370-1373.

Lange, M., Champagne, C. P. & Goulet, J. (1994). Contribution de *Lactococcus lactis* ssp *lactis* biovar *diacetylis* au brunissement de fromages de types brie et camembert. *Lait* **74**, 187-195.

Larpin, S., Mondoloni, C., Goerges, S., Vernoux, J. P., Guéguen, M. & Desmasures N. (2006). *Geotrichum candidum* dominates in yeast population dynamics in Livarot, a French red-smear cheese. *FEMS Yeast Research* **6**, 1243-1253.

Lavermicocca, P., Valerio, F. & Visconti, A. (2003). Antifungal activity of phenyllactic acid against molds isolated from bakery products. *Applied and Environmental Microbiology* **69**, 634-640.

Lavermicocca, P., Valerio, F., Evidente, A., Lazzaroni, S., Corsetti, A. & Gobbetti, M. (2000). Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough *Lactobacillus plantarum* strain 21B. *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 4084-4090.

Lavery, D. J., Lopez-Molina, L., Fleury-Olela, F. & Schibler, U. (1997). Selective amplification *via* biotin- and restriction-mediated enrichment (SABRE), a novel selective amplification procedure for detection of differentially expressed mRNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **94**, 6831-6836.

Leclercq-Perlat, M. N., Corrieu, G. & Spinnler, H. E. (2004a). The color of *Brevibacterium linens* depends on the yeast used for cheese deacidification. *Journal of Dairy Science* **87**, 1536-1544.

Leclercq-Perlat, M. N., Corrieu, G. & Spinnler, H. E. (2004b). Comparison of volatile compounds produced in model cheese medium deacidified by *Debaryomyces hansenii* or *Kluyveromyces marxianus*. *Journal of Dairy Science* **87**, 1545-1550.

Leclercq-Perlat, M. N., Oumer, A., Bergère, J. L., Spinnler, H. E. & Corrieu, G. (1999). Growth of *Debaryomyces hansenii* on a bacterial surface-ripened soft cheese. *Journal of Dairy Research* **66**, 271-281.

Leclercq-Perlat, M. N., Oumer, A., Bergère, J. L., Spinnler, H. E. & Corrieu, G. (2000). Behavior of *Brevibacterium linens* and *Debaryomyces hansenii* as ripening flora in controlled production of smear soft cheese from reconstituted milk: growth and substrate consumption. *Journal of Dairy Science* **83**, 1665-1673.

Lecocq, J. & Guéguen, M. (1994). Effects of pH and sodium chloride on the interactions between *Geotrichum candidum* and *Brevibacterium linens*. *Journal of Dairy Science* **77**, 2890-2899.

Lecocq, J., Guéguen, M. & Coiffier, O. (1996). Importance de l'association *Geotrichum candidum-Brevibacterium linens* pour l'affinage de fromages à croûte lavée. *Science des Aliments* **16**, 317-327.

Lee, C. W. & Desmazeaud, M. J. (1985). Partial purification and some properties of an aromatic-amino-acid and and an aspartate aminotransferase in *Brevibacterium linens* 47. *Journal of General Microbiology* **131**, 459-467.

Lee, N., Nielsen, P. H., Andreasen, K. H., Juretschko, S., Nielsen, J. L., Schleifer, K. H. & Wagner, M. (1999). Combination of fluorescent *in situ* hybridization and microautoradiography: a new tool for structure-function analyses in microbial ecology. *Applied and Environmental Microbiology* **65**, 1289-1297.

Lee, T. I., Rinaldi, N. J., Roberts, F., Odom, D., Bar-Joseph, Z. & Gerber, G. K. (2002). Transcriptional regulatory networks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* **298**, 799-804.

Lenoir, J. (1984). The surface flora and its role in the ripening of cheese. *Bulletin of the International Dairy Federation* **171**, 3-20.

Lenoir, J., Lamberet, G. & Schmidt, J. L. (1983). L'élaboration d'un fromage: l'exemple du Camembert. *Pour la science*, 30-42.

Lenoir, J., Lamberet, G., Schmidt, J. L. & Tourneur, C. (1985). La main d'oeuvre microbienne domine l'affinage des fromages. *Revue Laitière Française* **444**, 50-64.

Lewis, B. (1982a). Correlation between thiol production and antifungal activity by *Brevibacterium linens*. *Microbios Letters* **21**, 75-78.

Lewis, B. (1982b). Inhibition of several food spoilage fungi by an antifungal agent(s) produced by *Brevibacterium linens*. *Phyton* **42**, 45-48.

Liang, P. & Pardee, A. B. (1992). Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* **257**, 967-971.

Liang, P. (1998). Factors ensuring successful use of differential display. *Methods* **16**, 361-364.

Liang, P. (2002). A decade of differential display. *Biotechniques* **33**, 338-344, 346.

Litthauer, D., Louw, C. H. & du Toit, P. J. (1996). *Geotrichum candidum* P-5 produces an intracellular serine protease resembling chymotrypsin. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **28**, 1123-1130.

Liu, W., Marsh, T., Cheng, H. & Forney, L. (1997). Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* **63**, 4516-4522.

Loy, A., Lehner, A., Lee, N., Adamczyk, J., Meier, H., Ernst, J., Schleifer, K. H. & Wagner, M. (2002). Oligonucleotide microarray for 16S rRNA gene-based detection of all recognized lineages of sulfate-reducing prokaryotes in the environment. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 5064-5081.

Lucia, V., Daniela, B. & Rosalba, L. (2001). Use of Fourier transform infrared spectroscopy to evaluate the proteolytic activity of *Yarrowia lipolytica* and its contribution to cheese ripening. *International Journal of Food Microbiology* **69**, 113-123.

Lueders, T. & Friedrich, M. W. (2003). Evaluation of PCR amplification bias by terminal restriction fragment length polymorphism analysis of small-subunit rRNA and *mcrA* genes by using defined template mixtures of methanogenic pure cultures and soil DNA extracts. *Applied and Environmental Microbiology* **69**, 320-326.

Lyne, R., Burns, G., Mata, J., Penkett, C. J., Rustici, G., Chen, D., Langford, C., Vetrie, D. & Bähler, J. (2003). Whole-genome microarrays of fission yeast: characteristics, accuracy, reproducibility, and processing of array data. *BMC Genomics* **4**, 27.

Macedo, A. C., Tavares, T. G. & Malcata, F. X. (2003). Esterase activities of intracellular extracts of wild strains of lactic acid bacteria isolated from Serra da Estrela cheese. *Food Chemistry* **81**, 379-381.

Macedo, A. C., Vieira, M., Pocas, R. & Malcata, F. X. (2000). Peptide hydrolase system of lactic acid bacteria isolated from Serra da Estrela cheese. *International Dairy Journal* **10**, 769-774.

Mahaut, M., Jeantet, R. & Brulé, G. (2000). Initiation à la technologie fromagère. Paris: Technique & Documentation, Lavoisier.

Maheswari, R. R. A. (1993). Effets antagonistes de *Geotrichum candidum* vis-à-vis de *Listeria monocytogenes* : étude des conditions d'action et de caractérisation initiale d'un principe inhibiteur extracellulaire. Thèse à l'*Institut de Biochimie et de Biologie Appliquée*. Université de Caen Basse-Normandie, France.

Maisnier-Patin, S., Deschamps, N., Tatini, S. R. & Richard, J. (1992). Inhibition of *Listeria monocytogenes* in Camembert cheese made with a nisin-producing starter. *Lait* **7**, 249-263.

Maisnier-Patin, S., Forni, E. & Richard, J. (1996). Purification, partial characterisation and mode of action of enterococcin EFS2, an antilisterial bacteriocin produced by a strain of *Enterococcus faecalis* isolated from a cheese. *International Journal of Food Microbiology* **30**, 255-270.

Maoz, A., Mayr, R. & Scherer, S. (2003). Temporal stability and biodiversity of two complex antilisterial cheese-ripening microbial consortia. *Applied and Environmental Microbiology* **69**, 4012-4018.

Marcellino, N. & Benson, D. R. (1992). Scanning electron and light microscopic study of microbial succession on Bethlehem St. Nectaire cheese. *Applied and Environmental Microbiology* **58**, 3448-3454.

Marsh, T. L. (1999). Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP): an emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplification products. *Current Opinion in Microbiology* **2**, 323-327.

Marshall, V. M. E. & Tamine, A. Y. (1997). Physiology and biochemistry of fermented milks. In *Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk*, pp. 153-192. Edited by B. A. Law. London: Blackie Academic and Professional.

Martin, K. J., Kwan, C. P., O'Hare, M. J., Pardee, A. B. & Sager, R. (1998). Identification and verification of differential display cDNAs using gene-specific primers and hybridization arrays. *Biotechniques* **24**, 1018-1026.

Martley, F. G. & Crow, V. L. (1993). Interaction between Non-Starter microorganisms during cheese manufacture and ripening. *International Dairy Journal* **3**, 461-483.

Massa, S. & Turtura, G. C. (1989). Identification of staphylococci and micrococci isolated from hard cheese made from raw cow and sheep milk. *Milchwissenschaft* **44**, 219-221.

Matsuki, T., Watanabe, K., Fujimoto, J., Kado, Y., Takada, T., Matsumoto, K. & Tanaka, R. (2004). Quantitative PCR with 16S rRNA-gene-targeted species-specific primers for analysis of human intestinal bifidobacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **70**, 167-173.

Matte-Tailliez, O., Quénée, P., Çibik, R., van Opstal, J., Dessevre, F., Firmesse, O. & Tailliez, P. (2001). Detection and identification of lactic acid bacteria in milk and industrial starter culture with fluorescently labeled rRNAtargeted peptide nucleic acid probes. *Lait* **81**, 237-248.

McSweeney, P. L. H. & Sousa, M. J. (2000). Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: a review. *Lait* **80**, 293-324.

Medina de Figueroa, R., Ceretti de Guglielmone, G., Benito de Cardenas, I. & Oliver, G. (1998). Flavour compound production and citrate metabolism in *Lactobacillus rhamnosus* ATCC7469. *Milchwissenschaft* **53**, 617-619.

Michaux, O. (1983). Identification des *Micrococcaceae* isolés des fromages à pâte molle. *Microbiologie Aliments Nutrition* **1**, 399-403.

Michel, V., Hauwuy, A. & Chamba, J. F. (2001). La flore microbienne de laits crus de vache : diversité et influence des conditions de production. *Lait* **81**, 575-592.

Milo, C. & Reineccius, G. A. (1997). Identification and quantification of potent odorants in regular-fat and low-fat mild Cheddar cheese. *Journal of agricultural and food chemistry* **45**, 3590-3594.

Moeseneder, M. M., Arrieta, J. M., Muyzer, G., Winter, C. & Herndl, G. J. (1999). Optimization of terminal-restriction fragment length polymorphism analysis for complex marine bacterioplankton communities and comparison with denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* **65**, 3518-3525.

Molimard, P. & Spinnler, H. E. (1996). Review: compounds involved in the flavor of surface mold-ripened cheeses: origins and properties. *Journal of Dairy Science* **79**, 169-184.

Molimard, P. (1994). Etude de la coopération entre *Geotrichum candidum* et *Penicillium camemberti* : impact sur le profil aromatique et sur les qualités organoleptiques d'un fromage de type camembert. Dijon: Université de Bourgogne.

Molimard, P., Bouvier, I., Issanchou, S., Lesschaeve, I., Vassal, L. & Spinnler, H. E. (1995). Cooperation between *Penicillium camemberti* and *Geotrichum candidum*: effect on taste and flavour qualities of Camembert type cheese. In *Bioflavour 95*, pp. 173-175. Edited by P. Etievant & P. Schreier. Dijon, France: INRA, Paris.

Molimard, P., Le Quéré, J. L. & Spinnler, H. E. (1997). Les lipides et la flaveur des produits laitiers. *Oleagineux, Corps Gras, Lipides* **4**, 301-311.

Morales, P., Feliu, I., Fernandez-Garcia, E. & Nunez, M. (2004). Volatile compounds produced in cheese by *Enterobacteriaceae* strains of dairy origin. *Journal of Food Protection* **67**, 567-573.

Mourgues, R., Bergère, J. L. & Vassal, L. (1983). Possibilités d'améliorer les qualités organoleptiques des fromages de Camembert grâce à l'utilisation de "*Geotrichum candidum*". *La Technique Laitière* **978**, 11-15.

Moyer, C., Dobbs, F. & Karl, D. (1994). Estimation of diversity and community structure through restriction fragment length polymorphism distribution analysis of bacterial 16S rRNA genes from a

microbial mat at an active, hydrothermal vent system, Loihi Seamount, Hawaii. *Applied and Environmental Microbiology* **60**, 871-879.

Muyzer, G. & Smalla, K. (1998). Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek* **73**, 127-141.

Muyzer, G., de Waal, E. C. & Uitterlinden, A. G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* **59**, 695-700.

Navarro, J. M. & Jorcano, J. L. (1999). The use of arbitrarily primed polymerase chain reaction in cancer research. *Electrophoresis* **20**, 283-290.

Nielsen, J. L., Juretschko, S., Wagner, M. & Nielsen, P. H. (2002). Abundance and phylogenetic affiliation of iron reducers in activated sludge as assessed by fluorescence *in situ* hybridization and microautoradiography. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 4629-4636.

Nielsen, M. S., Frisvad, J. C. & Nielsen, P. V. (1998). Protection by fungal starters against growth and secondary metabolite production of fungal spoilers of cheese. *International Journal of Food Microbiology* **42**, 91-99.

Nogales, B., Moore, E. R., Abraham, W. R. & Timmis, K. N. (1999). Identification of the metabolically active members of a bacterial community in a polychlorinated biphenyl-polluted moorland soil. *Environmental Microbiology* **1**, 199-212.

Nogales, B., Timmis, K. N., Nedwell, D. B. & Osborn, A. M. (2002). Detection and diversity of expressed denitrification genes in estuarine sediments after reverse transcription-PCR amplification from mRNA. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 5017-5025.

Nooitgedagt, A. J. & Hartog, B. J. (1988). A survey of the microbiological quality of Brie and Camembert cheese. *Netherlands Milk and Dairy Journal* **42**, 57-72.

Nuwaysir, E. F., Huang, W., Albert, T. J., Singh, J., Nuwaysir, K., Pitas, A., Richmond, T., Gorski, T., Berg, J. P., Ballin, J., McCormick, M., Norton, J., Pollock, T., Sumwalt, T., Butcher, L., Porter, D., Molla, M., Hall, C., Blattner, F., Sussman, M. R., Wallace, R. L., Cerrina, F., Green, R. D. (2002). Gene expression analysis using oligonucleotide arrays produced by maskless photolithography. *Genome Research* **12**, 1749-1755.

Ogier, J. C., Son, O., Gruss, A., Tailliez, P. & Delacroix-Buchet, A. (2002). Identification of the bacterial microflora in dairy products by temporal temperature gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* **68,** 3691-3701.

Oh, D.H. & Marshall, D. L. (1993). Antimicrobial activity of ethanol, glycerol monolaurate or lactic acid against *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* **20**, 239-246.

Ono, B. I., Ishii, N., Naito, K., Miyoshi, S., Shinoda, S., Yamamoto, S. & Ohmori, S. (1993). Cystathionine gamma-lyase of *Saccharomyces cerevisiae*: structural gene and cystathionine gamma-synthase activity. *Yeast* **9**, 389-397.

Ortiz de Apodaca, M. J., Selgas, M. D. & Orddfiez, J. A. (1993). Lipolytic and proteolytic activities of Micrococci isolated from cheese. *Food Research International* **26**, 319-325.

Osborn, A. M., Moore, E. R. & Timmis, K. N. (2000). An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. *Environmental Microbiology* **2**, 39-50.

Osman, M. (2004). Factors affecting the antifungal properties of *Brevibacterium linens*. *International Dairy Journal* **14**, 713-722.

Ott, A., Hugi, A., Baumgartner, M. & Chaintreau, A. (2000). Sensory investigation of yogurt flavor perception: mutual influence of volatiles and acidity. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **48**, 441-450.

Ouverney, C. C. & Fuhrman, J. A. (1999). Combined microautoradiography-16S rRNA probe technique for determination of radioisotope uptake by specific microbial cell types in *situ*. *Applied and Environmental Microbiology* **65**, 1746-1752.

Pan, W. (2002). A comparative review of statistical methods for discovering differentially expressed genes in replicated microarray experiments. *Bioinformatics* **18**, 546-554.

Parente, E. & Cogan, T. M. (2004). Starter cultures: general aspects. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, pp. 123-148. Edited by P. F. Fox, P. L. H. McSweeney, T. M. Cogan & T. P. Guinee. London: Elsevier.

Pearce, L. & Flint, S. (2003). *Streptococcus thermophilus*. In *Encyclopedia of Dairy Sciences*, pp. 2577-2582. Edited by H. Roginski, J. W. Fuquay & P. F. Fox. London: Academic Press.

Peplies, J., Glockner, F.O. & Amann, R. (2003). Optimization strategies for DNA microarray-based detection of bacteria with 16S rRNA-targeting oligonucleotide probes. *Applied and Environmental Microbiology* **69**, 1397-1407.

Pereira, C. I., Barreto Crespo, M. T. & San Romao, M. V. (2001). Evidence for proteolytic activity and biogenic amines production in *Lactobacillus curvatus* and *L. homohiochii*. *International Journal of Food Microbiology* **68**, 211-216.

Pereira-Dias, S., Potes, M. E., Marinho, A., Malfeito-Ferreira, M. & Loureiro, V. (2000). Characterisation of yeast flora isolated from an artisanal Portuguese ewes' cheese. *International Journal of Food Microbiology* **60**, 55-63.

Pereira-Meirelles, F. V., Rocha-Leão, M. H. M. & Sant'Anna, G. L. (2000). Lipase location in *Yarrowia lipolytica* cells. *Biotechnology Letters* **22**, 71-75.

Pernthaler, A., Pernthaler, J. & Amann, R. (2002). Fluorescence *in situ* hybridization and catalyzed reporter deposition for the identification of marine bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 3094-3101.

Pernthaler, J., Glockner, F. O., Schonhuber, W. & Amann, R. (2000). Fluorescence *in situ* hybridization with rRNAtargeted oligonucleotide probes. *FEMS Microbiology Ecology* **33**, 171-180.

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**, 48-56.

Phimister, B. (1999). Going global. *Nature Genetics* **21**, 1.

Piard, J. C., Muriana, P. M., Desmazeaud, M. J. & Klaenhammer, T. R. (1992). Purification and partial characterization of Lacticin 481, a lanthionine-containing bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CNRZ 481. *Applied and Environmental Microbiology* **58**, 279-284.

Pignède, G., Wang, H., Fudalej, F., Gaillardin, C., Seman, M. & Nicaud, J. M. (2000). Characterization of an extracellular lipase encoded by *LIP2* in *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Bacteriology* **182**, 2802-2810.

Piva, A. & Headon, D. R. (1994). Pediocin A, a bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* FBB61. *Microbiology* **140**, 697-702.

Poolman, B., Royer, T. J., Mainzer, S. E. & Schmidt, B. F. (1989). Lactose transport system of *Streptococcus thermophilus*: a hybrid protein with homology to the melibiose carrier and enzyme III of phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase systems. *Journal of Bacteriology* **171**, 244-253.

Prashar, Y. & Weissman, S. M. (1996). Analysis of differential gene expression by display of 3' end restriction fragments of cDNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **93**, 659-663.

Prescott, L. M., Harley, J. P. & Klein, D. A. (1999). Metabolism: The generation of energy. In *Microbiology*, pp. 164-189. Edited by K. T. Kane. New York: McGraw-Hill Higher Education.

Purko, M., Nelson, W. O. & Wood, W. A. (1951). The associative action between certain yeasts and *Bacterium linens. Journal of Dairy Science* **34**, 699-705.

Quackenbush, J. (2001). Computational analysis of microarray data. *Nature Reviews Genetics* **2**, 418-427.

Rademaker, J. L. W., Peinhopf, M., Rijnen, L., Bockelmann, W. & Noordman, W. H. (2005). The surface microflora dynamics of bacterial smear-ripened Tilsit cheese determined by T-RFLP DNA population fingerprint analysis. *International Dairy Journal* **15**, 785-794.

Ramet, J. P. (1997). Technologie comparée des différents types de caillés. In *Le fromage*, pp. 333-364. Edited by A. Eck & J. C. Gillis. Paris: Technique & Documentation, Lavoisier.

Ramsay, G. (1998). DNA chips: state-of-the art. *Nature Biotechnology* **16**, 40-44.

Randazzo, C. L., Torriani, S., Akkermans, A. D., de Vos, W. M. & Vaughan, E. E. (2002). Diversity, dynamics and activity of bacterial communities during production of an artisanal Sicilian cheese as evaluated by 16S rRNA analysis. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 1882-1892.

Rattray, F. P. & Fox, P. F. (1999). Aspects of enzymology and biochemical properties of *Brevibacterium linens* relevant to cheese ripening: a review. *Journal of Dairy Science* **82**, 891-909.

Reiner, A., Yekutieli, D. & Benjamini, Y. (2003). Identifying differentially expressed genes using false discovery rate controlling procedures. *Bioinformatics* **19**, 368-375.

Reymond, N., Charles, H., Duret, L., Calevro, F., Beslon, G. & Fayard, J. M. (2004). ROSO: optimizing oligonucleotide probes for microarrays. *Bioinformatics* **20**, 271-273.

Richard, J. & Zadi, H. (1983). Inventaire de la flore bactérienne dominante des Camemberts fabriqués au lait cru. *Lait* **63**, 25-42.

Richard, J. (1984). Evolution de la flore microbienne à la surface des Camemberts fabriqués avec du lait cru. *Lait* **64**, 496-520.

Riesenfeld, S. C., Schloss, P. D. & Handelsman, J. (2004). Metagenomics: genomic analysis of microbial communities. *Annual Review of Genetics* **38**, 525-552.

Rijnen, L., Bonneau, S. & Yvon, M. (1999a). Genetic characterization of the lactococcal aromatic aminotransferase and its involvement in conversion of amino acids to aroma compounds. *Applied and Environmental Microbiology* **65**, 4873-4880.

Rijnen, L., DelacroixBuchet, A., Demaizieres, D., LeQuere, J. L., Gripon, J. C. & Yvon, M. (1999b). Inactivation of lactococcal aromatic aminotransferase prevents the formation of floral aroma compounds from aromatic amino acids in semi-hard cheese. *International Dairy Journal* **9**, 877-885.

Rijnen, L., Yvon, M., van Kranenburg, R., Courtin, P., Verheul, A., Chambellon, E. & Smit, G. (2003). Lactococcal aminotransferases AraT and BcaT are key enzymes for the formation of aroma compounds from amino acids in cheese. *International Dairy Journal* **13**, 805-812.

Robinson, R. K. (2003). Fermented milks: yogurt, role of starter cultures. In *Encyclopedia of Dairy Sciences*, pp. 1059-1063. Edited by H. Roginski, J. W. Fuquay & P. F. Fox. London: Academic Press.

Robinson, R. K., Tamime, A. Y. & Wszolek, M. (2002). Microbiology of fermented milks. In *Dairy Microbiology Handbook: the microbiology of milk and milk products*, pp. 367-430. Edited by R. K. Robinson. New York: Wiley-Interscience.

Rockett, J. C. & Dix, D. J. (2000). DNA arrays: technology, options and toxicological applications. *Xenobiotica* **30**, 155-177.

Rohm, H., Eliskases-Lechner, F. & Brauer, M. (1992). Diversity of yeasts in selected dairy products. *Journal of Applied Bacteriology* **72**, 370-376.

Rondon, M. R., August, P. R., Bettermann, A. D., Brady, S. F., Grossman, T. H., Liles, M. R., Loiacono, K. A., Lynch, B. A., MacNeil, I. A., Minor, C., Tiong, C. L., Gilman, M., Osburne, M. S., Clardy, J., Handelsman, J. & Goodman, R. M. (2000). Cloning the soil metagenome: a strategy

for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 2541-2547.

Roostita, R. & Fleet, G. H. (1996a). Growth of yeasts in milk and associated changes to milk composition. *International Journal of Food Microbiology* **31**, 205-219.

Roostita, R. & Fleet, G. H. (1996b). The occurrence and growth of yeasts in Camembert and blue-veined cheeses. *International Journal of Food Microbiology* **28**, 393-404.

Ross, R. P., Morgan, S. & Hill, C. (2002). Preservation and fermentation: past, present and future. *International Journal of Food Microbiology* **79**, 3-16.

Roth, M. E., Feng, L., McConnell, K. J., Schaffer, P. J., Guerra, C. E., Affourtit, J. P., Piper, K. R., Guccione, L., Hariharan, J., Ford, M. J., Powell, S. W., Krishnaswamy, H., Lane, J., Guccione, L., Intrieri, G., Merkel, J. S., Perbost, C., Valerio, A., Zolla, B., Graham, C. D., Hnath, J., Michaelson, C., Wang, R., Ying, B., Halling, C., Parman, C. E., Raha, D., Orr, B., Jedrzkiewicz, B., Liao, J., Tevelev, A., Mattessich, M. J., Kranz, D. M., Lacey, M., Kaufman, J. C., Kim, J., Latimer, D. R., Lizardi, P. M. (2004). Expression profiling using a hexamer-based universal microarray. *NatureBiotechnology* **22**, 418-426.

Roudot-Algaron, F. & Yvon, M. (1998). Le catabolisme des acides aminés aromatiques et des acides aminés à chaîne ramifiée chez *Lactococcus lactis*. *Lait* **78**, 23-30.

Ryall, C., Holt, G. & Noble, W. C. (1981). Interactions between dermatophyte fungi and staphylococci or *Brevibacterium* in vitro. *Journal of Investigative Dermatology* **76**, 21-23.

Salama, N., Guillemin, K., McDaniel, T. K., Sherlock, G., Tompkins, L. & Falkow, S. (2000). A whole-genome microarray reveals genetic diversity among *Helicobacter pylori* strains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 14668-14673.

Sarantinopoulos, P., Andrighetto, C., Georgalaki, M. D., Rea, M. C., Lombardi, A., Cogan, T. M., Kalantzopoulos, G. & Tsakalidou, E. (2001a). Biochemical properties of enterococci relevant to their technological performance. *International Dairy Journal* **11**, 621-647.

Sarantinopoulos, P., Kalantzopoulos, G. & Tsakalidou, E. (2001b). Citrate metabolism by *Enterococcus faecalis* FAIR-E 229. *Applied and Environmental Microbiology* **67**, 5482-5487.

Schena, M., Shalon, D., Davis, R. W. & Brown, P. O. (1995). Identification and verification of differential display gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270, 467-470.

Schramm, A., Davidson, S. K., Dodsworth, J. A., Drake, H. L., Stahl, D. A. & Dublier, N. (2003). Acidovorax-like symbionts in the nephridia of earthworms. *Environmental Microbiology* **5**, 804-809.

Sinclair, D. A., Dawes, I. W. & Dickinson, J. R. (1993). Purification and characterization of the branched chain α-ketoacid dehydrogenase complex from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry and Molecular Biology International* **31**, 911-922.

Smacchi, E., Fox, P. F. & Gobbetti, M. (1999). Purification and characterisation of two extracellular proteinases from *Arthrobacter nicotinae* 9458. *FEMS Microbiology Letters* **170**, 327-333.

Sohier, D. & Lortal, S. (2004). Presented at the Symposium on cheese: Ripening, Characterization & Technology, Pragues.

Song, Y., Liu, C. & Finegold, S. M. (2004). Real-time PCR quantitation of clostridia in feces of autistic children. *Applied and Environmental Microbiology* **70**, 6459-6465.

Source F.A.O.-Eurostat, 2005

Source USDA, Département de l'Agriculture des USA, 2002

Spinnler, H. E. & Corrieu, G. (1989). Automatic method to quantify starter activity based on pH measurement. *Journal of Dairy Research* **56**, 755-764.

Spinnler, H. E., Berger, C., Lapadatescu, C. & Bonnarme, P. (2001). Production of sulfur compounds by several yeasts of technological interest for cheese ripening. *International Dairy Journal* **11**, 245-252.

Stackebrandt, E., Rainey, F. A. & Ward-Rainey, N. L. (1997). Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **47**, 479-491.

Stahl, D. A., Flesher, B., Mansfield, H. R. & Montgomery, L. (1988). Use of phylogenetically based hybridization probes for studies of ruminal microbial ecology. *Applied and Environmental Microbiology* **54**, 1079-1084.

Stathopoulos, A., van Drenth, M., Erives, A., Markstein, M. & Levine, M. (2002). Whole-genome analysis of dorsal-ventral patterning in the *Drosophila* embryo. *Cell* **111**,687-701.

Stiles, M. E. & Holzapfel, W. H. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology* **36**, 1-39.

Streit, W. R. & Schmitz, R. A. (2004). Metagenomics: the key to the uncultured microbes. *Current Opinion in Microbiology* **7**, 492-498.

Ström, K., Sjogren, J., Broberg, A. & Schnurer, J. (2002). *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 produces the antifungal cyclic dipeptides cyclo(L-Phe-L-Pro) and cyclo(L-Phe-trans-4-OH-L-Pro) and 3-phenyllactic acid. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 4322-4327.

Sugihara, A., Shimada, Y. & Tominaga, Y. (1991). A novel *Geotrichum candidum* lipase with some preference for the 2-position on a triglyceride molecule. *Applied Microbiology and Biotechnology* **35**, 738-740.

Sugihara, A., Shimada, Y., Nakamura, M., Nagao, T. & Tominaga, Y. (1994). Positional and fatty acid specificities of *Geotrichum candidum* lipases. *Protein Engineering* **7**, 585-588.

Sutcliffe, J. G., Foye, P. E., Erlander, M. G., Hilbush, B. S., Bodzin, L. J., Durham, J. T. & Hasel, K. W. (2000). TOGA: an automated parsing technology for analyzing expression of nearly all genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **97**, 1976-1981.

Suzzi, G., Lanorte, M. T., Galgano, F., Andrighetto, C., Lombardi, A., Lanciotti, R. & Guerzoni, M. E. (2001). Proteolytic, lipolytic and molecular characterisation of *Yarrowia lipolytica* isolated from cheese. *International Journal of Food Microbiology* **69**, 69-77.

Sztajer, H., Wang, W., Lunsdorf, H. & Stocker, A. (1996). Purification and some properties of a novel microbial lactate oxidase. *Applied Microbiology and Biotechnology* **45**, 600-606.

Takai, K., Oida, H., Suzuki, Y., Hirayama, H., Nakagawa, S., Nunoura, T., Inagaki, F., Nealson, K. H. & Horikoshi, K. (2004). Spatial distribution of marine Crenarchaeota group I in the vicinity of deep-sea hydrothermal systems. *Applied and Environmental Microbiology* **70**, 2404-2413.

Taroncher-Oldenburg, G., Griner, E. M., Francis, C. A. & Ward, B. B. (2003). Oligonucleotide microarray for the study of functional gene diversity in the nitrogen cycle in the environment. *Applied and Environmental Microbiology* **69**, 1159-1171.

Tavaria, F. K. & Malcata, F. X. (2003). Enzymatic activities of non-starter lactic acid bacteria isolated from a traditional Portuguese cheese. *Enzyme and Microbial Technology* **33**, 236-243.

Teixeira, P. C. M. (2000). *Lactobacillus*: *Lactobacillus bulgaricus*. In *Encyclopedia of Food Microbiology*, pp. 1136-1144. Edited by R. K. Robinson, C. A. Batt & P. D. Patel. London: Academic Press.

Thomas, D. & Surdin-Kerjan, Y. (1997). Metabolism of sulfur amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **61**, 503-532.

Tornadijo, M. E., Fresno, J. M., Sarmiento, R. M. & Carballo, J. (1998). Study of the yeasts during the ripening process of Armada cheeses from raw goat's milk. *Lait* **78**, 647-659.

Tornadijo, M. E., Garcia, M. C., Fresno, J. M. & Carballo, J. (2001). Study of *Enterobacteriaceae* during the manufacture and ripening of San Simón cheese. *Food Microbiology* **18**, 499-509.

Trovatelli, L. D. & Schiesser, A. (1987). Identification and significance of enterococci in hard cheese made from raw cow and sheep milk. *Milchwissenschaft* **42**, 717-719.

Troyanskaya, O. G., Garber, M. E., Brown, P. O., Botstein, D. & Altman, R. B. (2002). Nonparametric methods for identifying differentially expressed genes in microarray data. *Bioinformatics* **18**, 1454-1461.

Urrestarazu, A., Vissers, S., Iraqui, I. & Grenson, M. (1998). Phenylalanine- and tyrosine-auxotrophic mutants of *Saccharomyces cerevisiae* impaired in transamination. *Molecular and General Genetics* **257**, 230-237.

USDA (2002). National nutrient database for standard reference, release No. 15. United States Department of Agriculture.

Valdés-Stauber, N. & Scherer, S. (1994). Isolation and characterisation of Linocin M18, a bacteriocin produced by *Brevibacterium linens*. *Applied and Environmental Microbiology* **60**, 3809-3814.

Valdés-Stauber, N. & Scherer, S. (1996). Nucleotide sequence and taxonomical distribution of the bacteriocin gene *lin* cloned from *Brevibacterium linens* M18. *Applied and Environmental Microbiology* **62**, 1283-1286.

Valdés-Stauber, N., Gotz, H. & Busse, M. (1991). Antagonistic effect of coryneform bacteria from red smear cheese against *Listeria species*. *International Journal of Food Microbiology* **13**, 119-130.

Valdés-Stauber, N., Scherer, S. & Seiler, H. (1997). Identification of yeasts and coryneform bacteria from the surface microflora of brick cheeses. *International Journal of Food Microbiology* **34**, 115-129.

Valerio, F., Lavermicocca, P., Pascale, M. & Visconti, A. (2004). Production of phenyllactic acid by lactic acid bacteria: an approach to the selection of strains contributing to food quality and preservation. *FEMS Microbiology Letters* **233**, 289-295.

van Dam, R. M. & Quake, S. R (2002). Gene expression analysis with universal n-mer arrays. *Genome research* **12**, 145-152.

van De Peppel, J., Kemmeren, P., van Bakel, H., Radonjic, M., van Leenen, D. & Holstege, F. (2003). Monitoring global messenger RNA changes in externally controlled microarray experiments. *EMBO Reports* **4**, 387-393.

van den Tempel, T. & Jakobsen, M. (2000). The technological characteristics of *Debaryomyces hansenii* and *Yarrowia lipolytica* and their potential as starter cultures for production of Danablu. *International Dairy Journal* **10**, 263-270.

van Hal, N., Vorst, O., van Houwelingen, A., Kok, E., Peijnenburg, A., Aharoni, A., van Tunen, A. & Keijer, J. (2000). The application of DNA microarrays in gene expression analysis. *Journal of Biotechnology* **78**, 271-280.

Vaneechoutte, M. (1996). DNA fingerprinting techniques for microorganisms. A proposal for classification and nomenclature. *Molecular Biotechnology* **6**, 115-142.

Vassal, L. & Gripon, J. C. (1984). L'amertume des fromages à pâte molle de type Camembert: rôle de la présure et de P. caseicolum, moyens de contrôler. *Lait* **64**, 397-417.

Vassal, L., Monnet, V., Bars, D. L., Roux, C. & Grippon, J. C. (1986). Relation entre le pH, la composition chimique et la texture des fromages de type Camembert. *Lait* **66**, 341-351.

Velculescu, V. E., Zhang, L., Vogelstein, B. & Kinzler, K. W. (1995). Serial analysis of gene expression. *Science* **270**, 484-487.

Vicente-Soler, J. & Gacto, M. (1991). Characterization of a neutral proteinase from *Geotrichum lactis* cells. *Microbios* **66**, 157-161.

Viljoen, B. C., Khoury, A. R. & Hattingh, A. (2003). Seasonal diversity of yeasts associated with white-surface mould-ripened cheeses. *Food Research International* **36**, 275-283.

Vuralhan, Z., Luttik, M. A. H., Tai, S. L., Boer, V. M., Morais, M. A., Schipper, D., Almering, M. J. H., Kötter, P., Dickinson, J. R., Daran, J. M. & Pronk, J. T. (2005). Physiological characterization of the *ARO1*0-dependent, broad-substrate-specificity 2-oxo acid decarboxylase activity of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology* **71**, 3276-3284.

Wagner, M., Horn, M. & Daims, H. (2003). Fluorescence *in situ* hybridisation for the identification and characterisation of prokaryotes. *Current Opinion in Microbiology* **6**, 302-309.

Weimer, B., Dias, B., Ummadi, M., Broadbent, J., Brennand, C., Jaegi, J., Johnson, M., Milani, F., Steele, J. & Sisson, D. V. (1997). Influence of NaCl and pH on intracellular enzymes that influence Cheddar cheese ripening. *Lait* **77**, 383-398.

Wessels, D., Jooste, P. J. & Mostert, J. F. (1990). Technologically important characteristics of *Enterococcus* isolates from milk and dairy products. *International Journal of Food Microbiology* **10**, 349-352.

Weston, R. J., Mitchell, K. R. & Allen, K. L. (1999). Antibacterial phenolic components of. New Zealand honey. *Food Chemistry* **64**, 295-301.

Whitby, C. B., Saunders, J. R., Rodriguez, J., Pickup, R. W. & McCarthy, A. (1999). Phylogenetic differentiation of two closely related *Nitrosomonas* spp. that inhabit different sediment environments in an oligotrophic freshwater lake. *Applied and Environmental Microbiology* **65**, 4855-4862.

Wiedemuth, C. & Breunig, K. D. (2005). Role of Snf1p in regulation of intracellular sorting of the lactose and galactose transporter Lac12p in *Kluyveromyces lactis*. *Eukaryotic cell* **4**, 716-721.

Williams, A. G. & Banks, J. M. (1997). Proteolytic and other hydrolytic enzyme activities in non-stater lactic acid bacteria (NSLAB) isolated from Cheddar cheese manufactured in the United Kingdom. *International Dairy Journal* **7**, 763-774.

Williams, A. G., Noble, J. & Banks, J. M. (2001). Catabolism of amino acids by lactic acid bacteria isolated from Cheddar cheese. *International Dairy Journal* **11**, 203-215.

Williams, A. G., Noble, J., Tammam, J., Lloyd, D. & Banks, J. M. (2002). Factors affecting the activity of enzymes involved in peptide and amino cacid catabolism in non-starter lactic acid bacteria isolated from Cheddar cheese. *International Dairy Journal* **12**, 841-852.

Wilson, M. S., Bakermans, C. & Madsen, E. L. (1999). *In situ*, real-time catabolic gene expression: extraction and characterization of naphthalene dioxygenase mRNA transcripts from groundwater. *Applied and Environmental Microbiology* **65**, 80-87.

Woese, C. R. & Fox, G. E. (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **74**, 5088-5090.

Wu, L., Thompson, D. K., Li, G., Hurt, R. A., Tiedje, J. M. & Zhou, J. (2001). Development and evaluation of functional gene arrays for detection of selected genes in the environment. *Applied and Environmental Microbiology* **67**, 5780-5790.

Wyder, M. T. & Puhan, Z. (1999). Investigation of the yeast flora in smear ripened cheeses. *Milchwissenschaft* **54**, 330-333.

Yamagata, S., D'Andrea, R. J., Fujisaki, S., Isaji, M. & Nakamara, K. (1993). Cloning and bacterial expression of the CYS3 gene encoding cystathionine γ-lyase of *Saccharomyces cerevisiae* and the physicochemical and enzymatic properties of the protein. *Journal of Bacteriology* **175**, 4800-4808.

Yang, Y., Dudoit, S., Luu, P., Lin, D., Peng, V., Ngai, J. & Speed, T. (2002). Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. *Nucleic Acids Research* **30**, e15.

Yoshioka, K. & Hashimoto, H. (1981). Ester formation by alcohol. acetyltransferase from brewer's yeast. *Agricultural and Biological Chemistry* **45**, 2183-2190.

Yvon, M. & Rijnen, L. (2001). Cheese flavour formation by amino acid catabolism. *International Dairy Journal* **11**, 185-201.

Yvon, M., Berthelot, S. & Gripon, J. C. (1998). Adding α-ketoglutarate to semi-hard cheese curd highly enhances the conversion of amino acids to aroma compounds. *International Dairy Journal* **8**, 889-898.

Yvon, M., Berthelot, S. & Gripon, J. C. (1999). Adding of α-ketoglutarate to semi-hard cheese curd highly enhances the conversion of amino acids to aroma compounds. *International Dairy Journal* **8**, 889-898.

Yvon, M., Chambellon, E., Bolotin, A. & Roudot-Algaron, F. (2000). Characterization and role of the branched-chain aminotransferase (Bca T) isolated from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NCDO763. *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 571-577.

Yvon, M., Thirouin, S., Rijnen, L., Fromentier, D. & Gripon, J. C. (1997). An aminotransferase from *Lactococcus lactis* initiates conversion of amino acids to cheese flavor compounds. *Applied and Environmental Microbiology* **63**, 414-419.

Zhao, S., Ooi, S. L. & Pardee, A. B. (1995). New primer strategy improves precision of differential display. *Biotechniques* **18**, 842-846, 848, 850.

Zhou, Q. Z. K. & Chen, X. D. (2001). Effect of temperature and pH on the catalytic activity of the immobilized □-galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. *Biochemical Engineering Journal* **9**, 33-40.

Zhu, T. (2003). Global analysis of gene expression using GeneChip microarrays. *Current Opinion in Plant Biology* **6**, 418-425.

Zirnstein, G. & Hutkins, R. (2000). *Streptococcus*: *Streptococcus thermophilus*. In *Encyclopedia of Food Microbiology*, pp. 2127-2133. Edited by R. K. Robinson, C. A. Batt & P. D. Patel. London: Academic Press.

Zoetendal, E. G., Akkermans, A. D. L. & de Vos, W. M. (1998). Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Applied Environmental Microbiology* **64**, 3854-3859.

Zourari, A., Accolas, J. P. & Desmazeaud, M. J. (1992). Metabolism and biochemical characteristics of yogurt bacteria. *Lait* **72**, 1-34.

ANNEXES

- ***Figures***
- ***Tableaux***
- ***Fiches techniques***

CARACTERISTIQUES	
Organoleptiques	Pâte homogène, à onctuosité et à flaveur variable selon le degré d'affinage
Matière sèche	40-50% en général
Matière grasse/Matière sèche	25-60%

TECHNOLOGIE		
Préparation de la matière première	Ajustement de la matière grasse :	Utilisation de lait entier, standardisé ou écrémé
	Traitement thermique facultatif :	Utilisation de lait cru, thermisé (62-65°C ; 0,5-2 min) ou pasteurisé (72-76°C ; 0,5-2 min)
Coagulation	Type :	Caractère mixte ou avec une tendance lactique ou enzymatique selon la spécificité du fromage
	Auxiliaire de coagulation :	
	• *phosphate ou chlorure de calcium*	0,5 g/100 L
	• *levains lactiques mésophiles*	Ferments liquides : 2-3 L/100 L ; Ferments lyophilisés : 2-3 L/100 L
	• *levains lactiques thermophiles*	Facultatifs
	• *enzymes coagulantes (force 1/10000)*	18-30 mL/100 L
	Acidité à l'emprésurage :	15-25°C ; pH : 6,4-6,7
	Température :	28-35°C
	Temps de floculation :	8-30 min
	Temps total de coagulation	30-90 min
Egouttage	Type :	Spontané accentué par tranchage
	Chronologie des opérations :	
	• *tranchage*	Division du caillé en morceaux réguliers (1-10 cm)
	• *repos sous sérum*	30-60 min
	• *brassage*	Facultatif, discontinu et lent (1 min environ avec repos intermédiaire 10-20 min)
	• *moulage*	Après extraction du sérum, en moule ; à la louche ou par procédés mécanisés
	• *pressage*	Faible, par auto-pressage de la pâte (22-28°C ; 16-24h)
	• *salage*	A sec ou en saumure (NaCl final : 1,6-2%)
	• *séchage*	Facultatif selon le degré d'égouttage
Affinage	Ensemencement de microflores :	Dans le lait ou par pulvérisation ou frottage de la surface ; suspensions microbiennes à dominance de *Penicillium camemberti* et *Geotrichum candidum* pour les croûtes fleuries ou à dominance « ferment du rouge » pour les croûtes lavées
	Température :	12-14°C
	Humidité relative :	85-95%
	Durée :	12-45 jours

Figure 1 : Diagramme de fabrication des fromages à pâte molle (adapté d'après Ramet, 1997)**.**

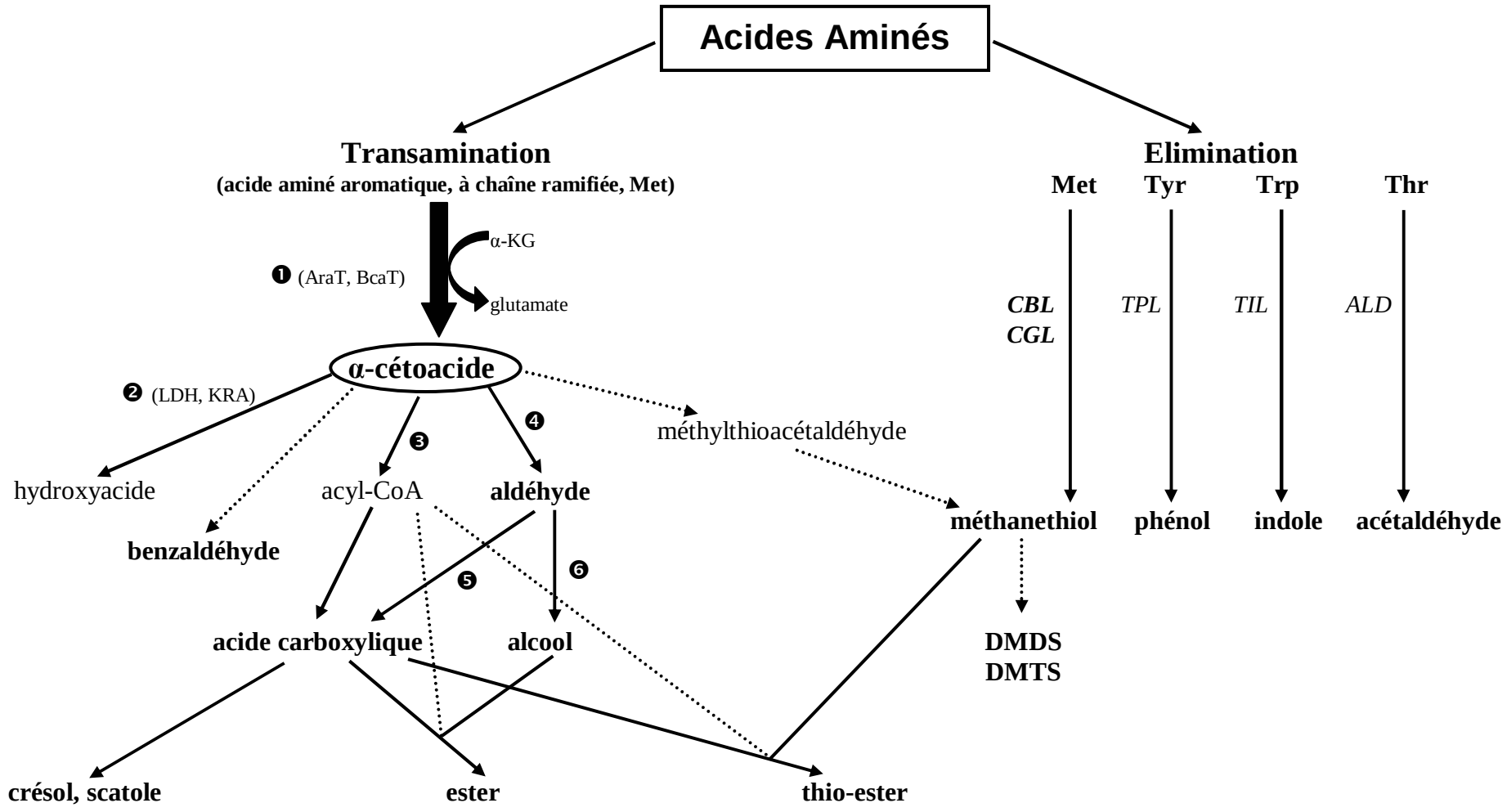


Figure 2 : Principales voies de dégradation des acides aminés (adapté d'après Yvon & Rijnen, 2001)**.**

Les réactions chimiques sont représentées par un trait pointillé noir. **α-KG** : *α-cétoglutarate* ; **AraT** : *aminotransférase spécifique des acides aminés aromatiques* ; **BcaT** : *aminotransférase spécifique des acides aminés à chaîne ramifiée* ; **LDH** : *lactate déshydrogénase* ; **KRA** : *cétopanthoate réductase* ; **CBL** : *cystathionine β-lyase* ; **CGL** : *cystathionine γ-lyase* ; **TPL** : *tyrosine-phénol lyase* ; **TIL** : *tryptophane-indole lyase* ; **ALD** : *thréonine aldolase* ; ❶ : *aminotransférase* ; ❷ : *hydroxyacide déshydrogénase* ; ❸ : *α-cétoacide déshydrogénase* ; ❹ : *α-cétoacide décarboxylase* ; ❺ : *aldéhyde déshydrogénase* ; ❻ : *alcool déshydrogénase.*

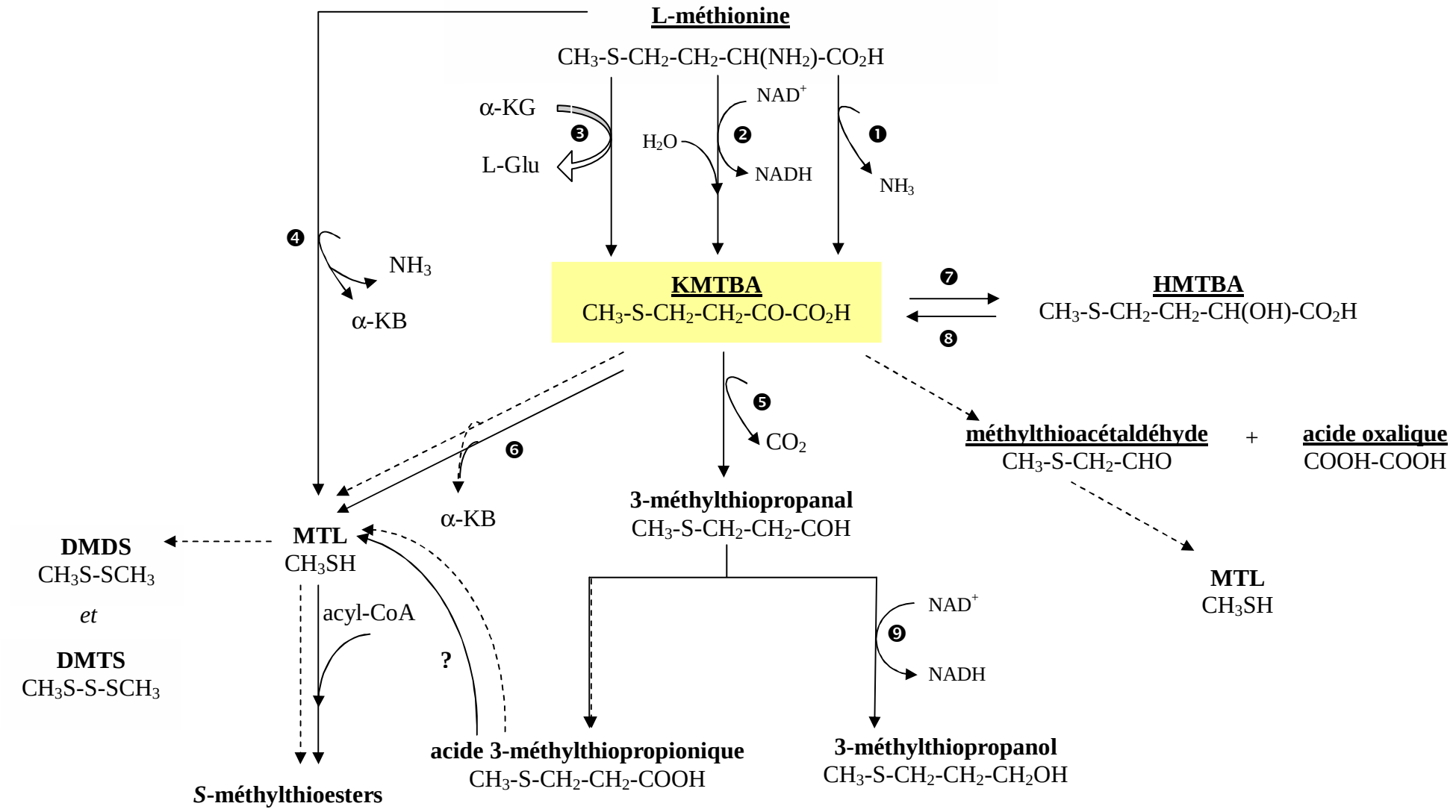


Figure 3 : Principales voies de dégradation de la L-méthionine chez les micro-organismes d'affinage (adapté d'après Bonnarme *et al.*, 2001 ; Arfi *et al.*, 2002 ; Arfi *et al.*, 2003 ; Kagkli *et al.*, 2006b)**.**

Les réactions spontanées sont représentées par un trait pointillé noir. **α-KG** : *α-cétoglutarate* ; **L-Glu** : *L-glutamate* ; **KMTBA** : *α-céto γ-méthylthiobutyrate* ; **HMTBA** : *α-hydroxy γ-méthylthiobutyrate* ; **MTL** : *méthanethiol* ; **DMDS** : *diméthyldisulfure* ; **DMTS** : *diméthyltrisulfure* ; **α-KB** : *α-cétobutyrate* ; ❶ *désaminase* ; ❷ *déshydrogénase* ; ❸ *aminotransférase* ; ❹ *L-méthionine déméthiolase* ; ❺ *cétoacide décarboxylase* ; ❻ *KMTBA déméthiolase* ; ❼ *KMTBA déshydrogénase* ; ❽ *HMTBA oxydase* ; ❾ *alcool déshydrogénase.*

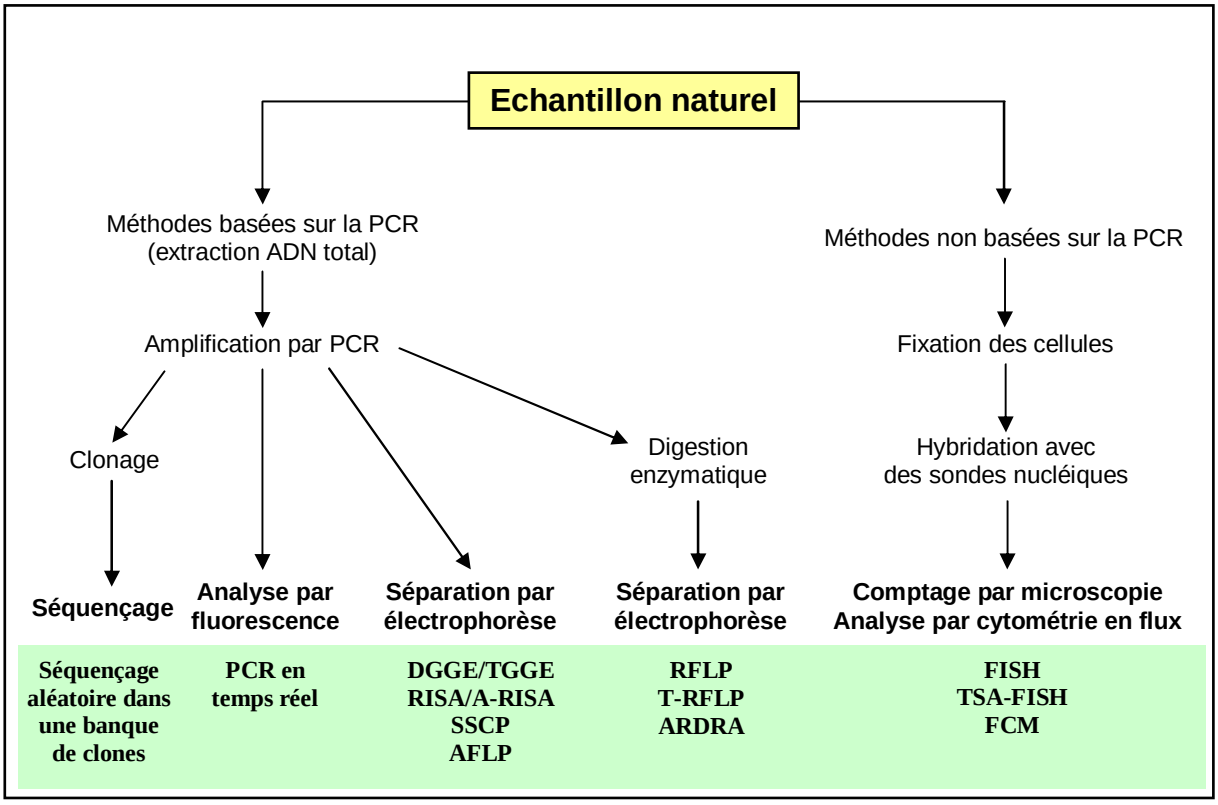


Figure 4 : Diagramme des différentes approches moléculaires permettant d'évaluer la diversité génétique des communautés microbiennes (d'après Dorigo *et al.*, 2005)**.**

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

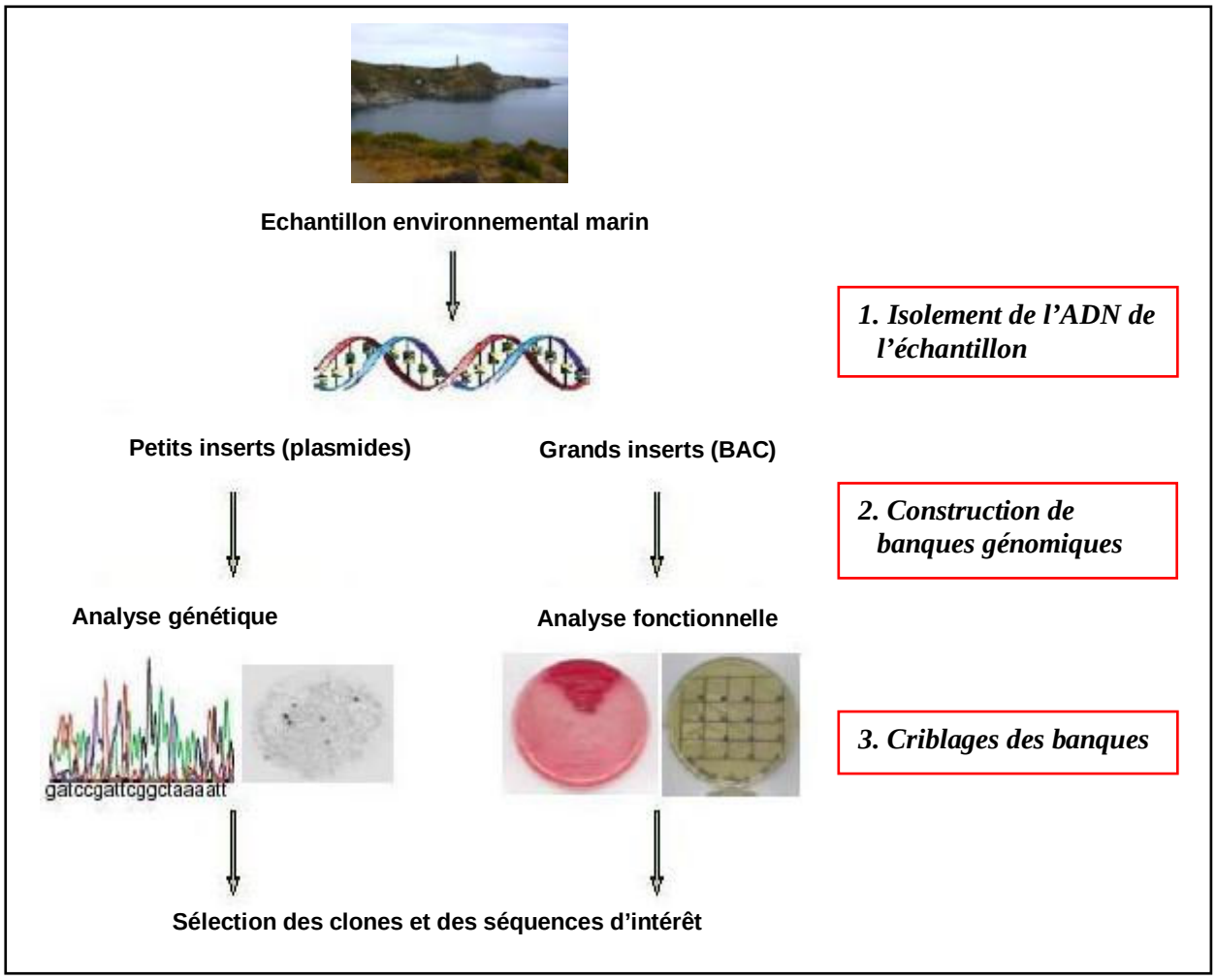


Figure 5 : Principe de l'exploitation de bactéries marines par la technique de métagénomique (d'après Streit & Schmitz, 2004)**.**

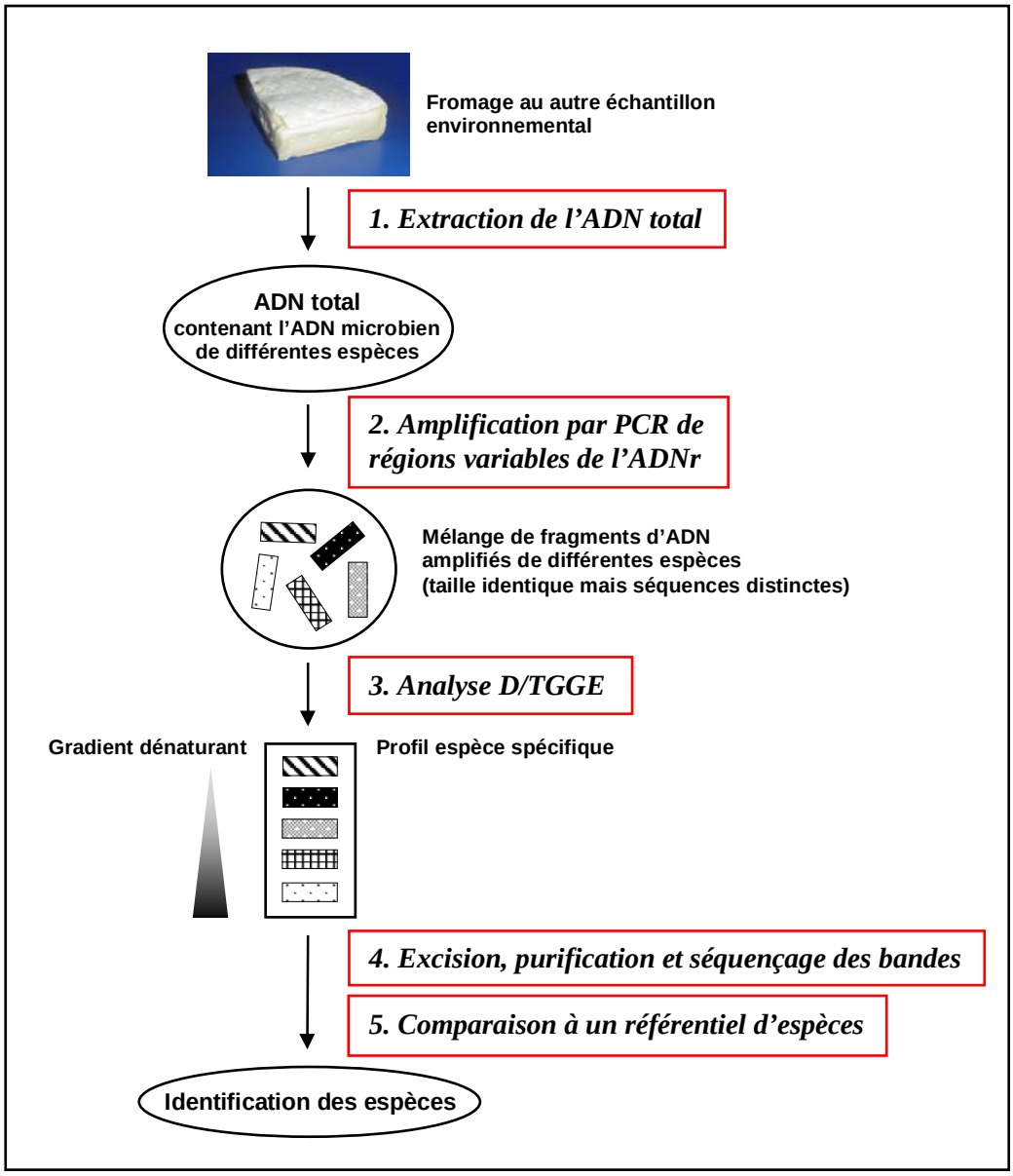


Figure 6 : Vision schématique des techniques D/TGGE (adapté d'après Ercolini, 2004)**.**

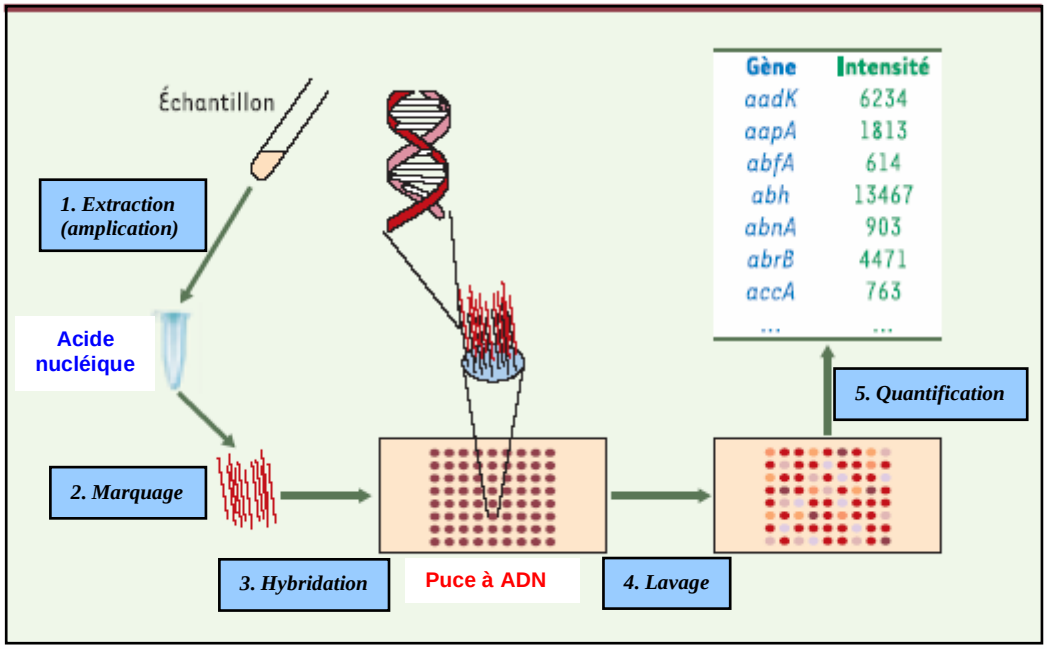


Figure 7 : Principe de la technique des puces à ADN.

L'ADN ou l'ARN est purifié et éventuellement amplifié à partir d'un échantillon biologique. Il est ensuite marqué de manière fluorescente et mis en contact avec les sondes portées par la puce. Lors de cette étape d'hybridation, les acides nucléiques marqués vont s'apparier avec les sondes ADN fixées de manière non spécifique. Finalement, la fluorescence au niveau de chaque dépôt de sonde sera quantifiée au moyen de tubes photomultiplicateurs ou d'une caméra CCD (*charge-coupled device*). Les valeurs obtenues pour chaque sonde sont ensuite traitées aux moyens d'outils informatiques pour obtenir la caractérisation de l'échantillon.

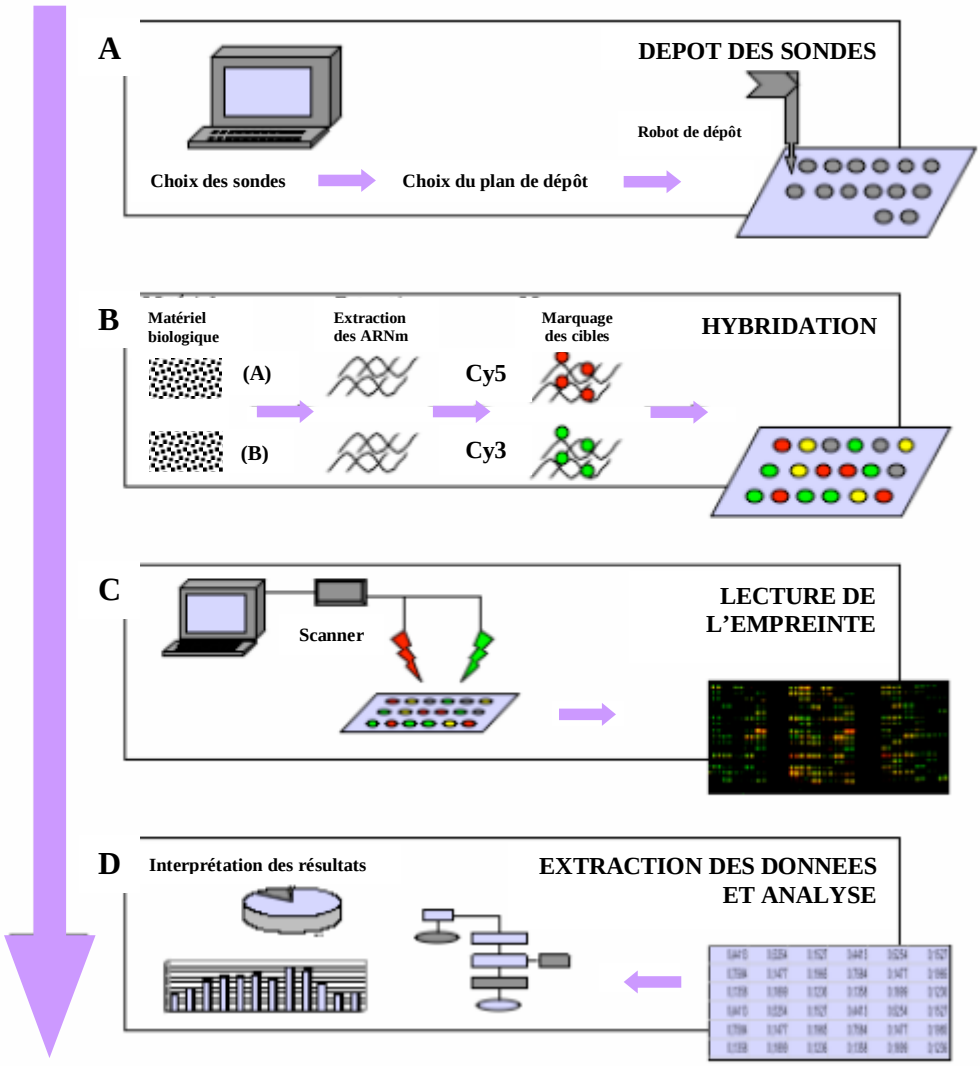


Figure 8 : Principe général de l'analyse de l'expression transcriptionnelle sur une microarray.

(A) *Les séquences des sondes sont déterminées de façon à optimiser leur spécificité et leur sensibilité. Les sondes synthétisées sont déposées par un robot sur la surface de la lame selon un plan défini.* **(B)** *Les ARNm sont extraits des deux échantillons biologiques à comparer, couplés à deux fluorochromes différents sous la forme d'ADNc puis mélangés avant hybridation. Ils entrent en compétition pour s'hybrider avec les différentes sondes.* **(C)** *La lecture des lames est réalisée avec un scanner (microscope à fluorescence) couplé à un photomultiplicateur (PMT).* **(D)** *L'image est alors analysée de façon à quantifier le signal. Les données sont ensuite normalisées, analysées et interprétées.*

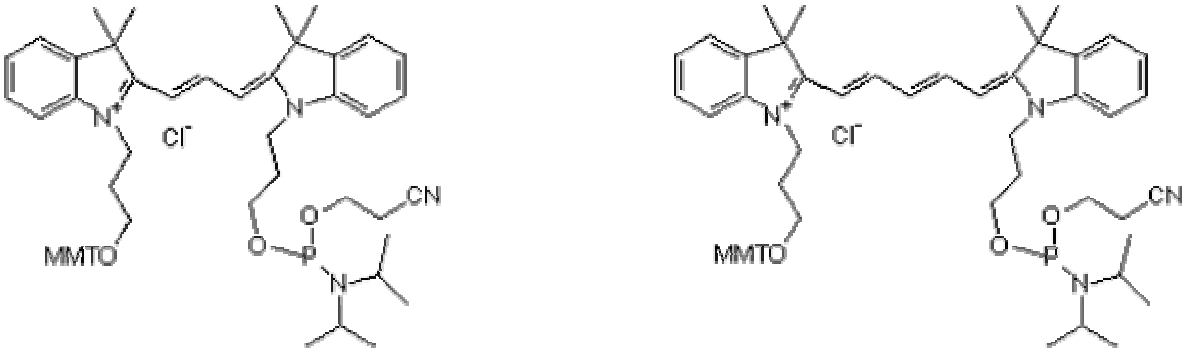


Figure 9 : Cy3^{TM}-phosphoramidite (à gauche) **et Cy5^{TM}-phosphoramidite** (à droite) (*Source* Amersham Biosciences Limited)**.**

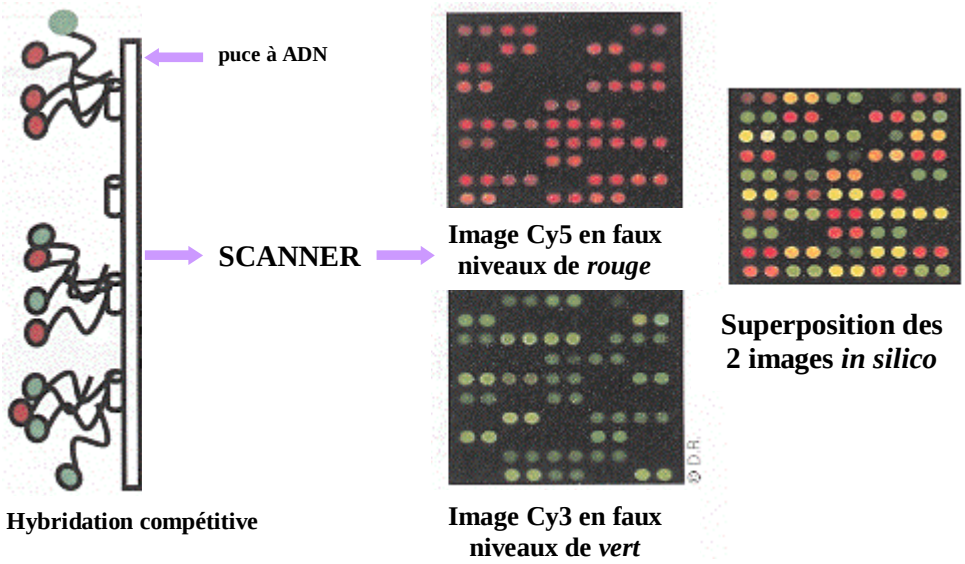


Figure 10 : Principe général de la détection du signal (adapté d'après Frouin & Gidrol, 2005)**.**

Lors de la lecture de l'empreinte, chaque *spot* est excité par un laser et l'émission de fluorescence est mesurée à l'aide d'un scanner couplé à un photomultiplicateur. On obtient 2 images en niveaux de *gris* qui correspondent au mélange des fluorescences respectives des 2 fluorochromes. En remplaçant les niveaux de *gris* par des niveaux de *vert* pour l'une des images et par des niveaux de *rouge* pour l'autre image, on obtient, après superposition, une image en fausses couleurs composée de *spots* :

- *rouges* : indiquant que seul l'ADNc cible de la condition A s'est hybridé aux sondes ;
- *verts* : indiquant que seul l'ADNc cible de la condition B s'est hybridé aux sondes ;
- *jaunes* : indiquant que les ADNc cibles des deux conditions A et B se sont hybridés aux sondes en quantité égales.

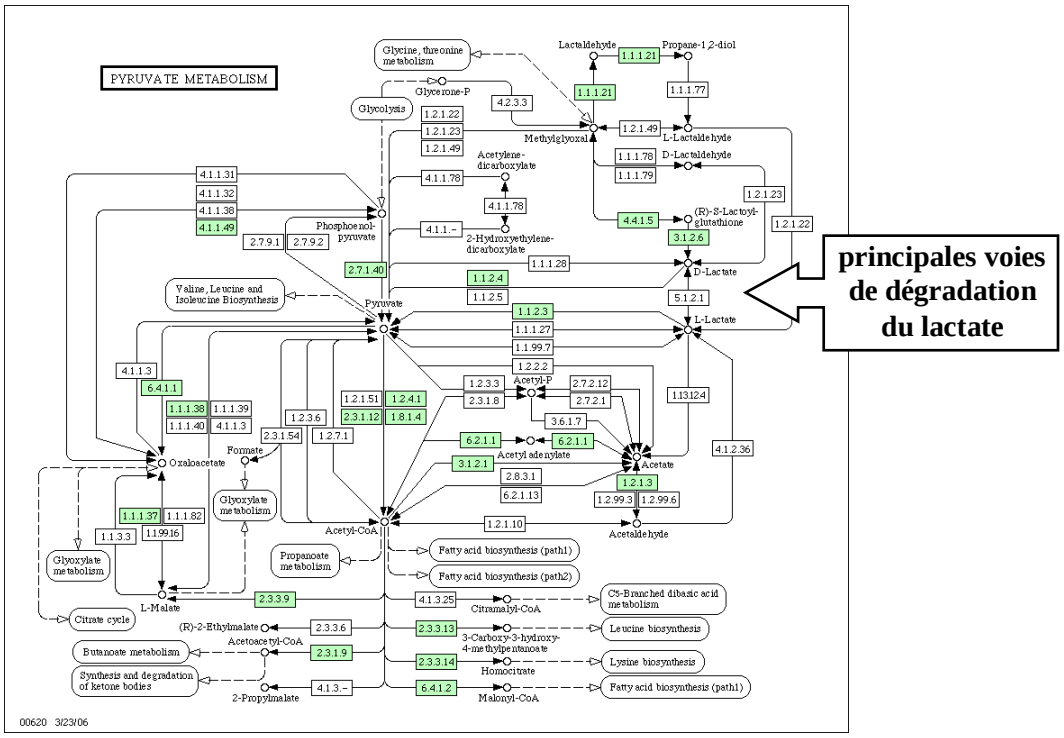


Figure 11 : Représentation théorique des voies de biosynthèse et de dégradation du pyruvate (carte métabolique disponible dans KEGG). Les enzymes en vert correspondent aux gènes présents chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

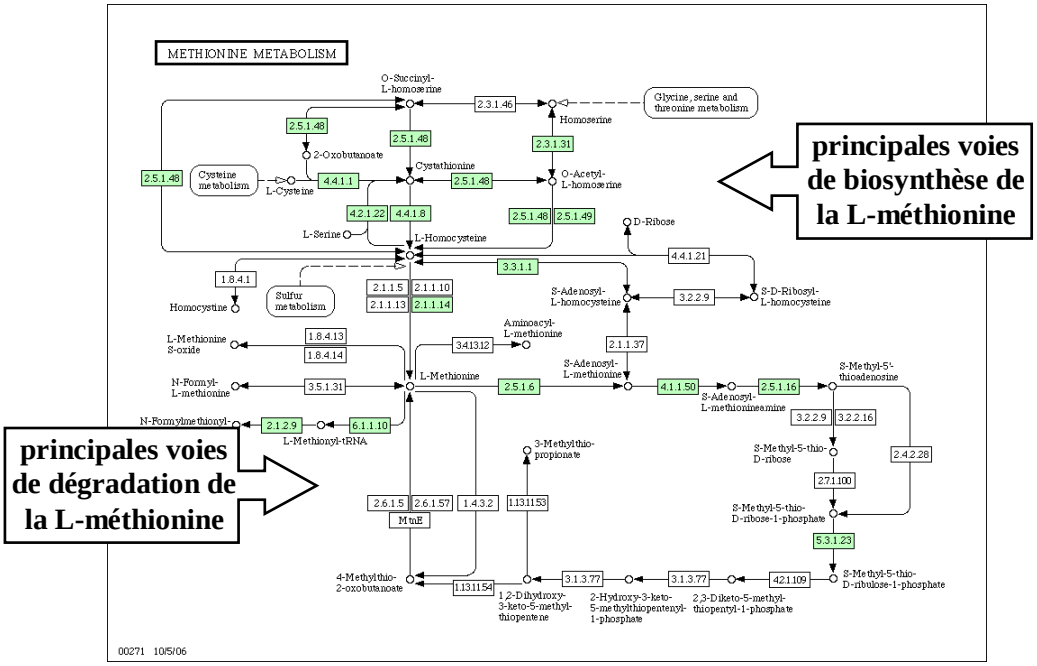


Figure 12 : Représentation théorique des voies de biosynthèse et de dégradation de la L-méthionine (carte métabolique disponible dans KEGG). Les enzymes en vert correspondent aux gènes présents chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

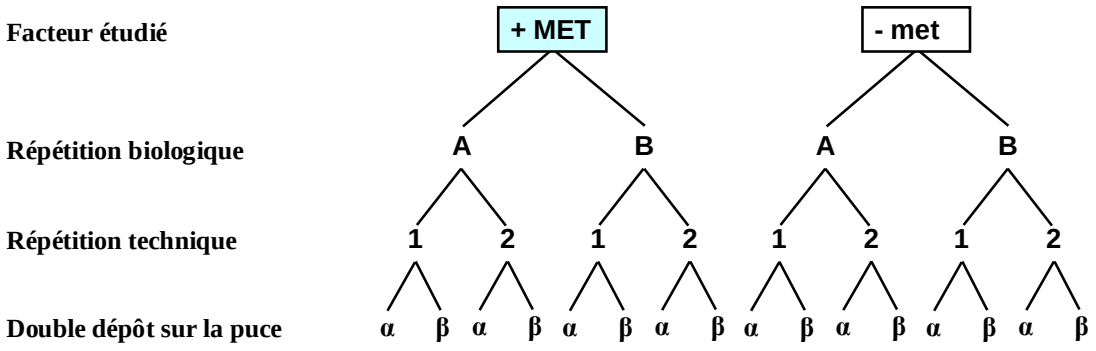


Figure 13 : Plan expérimental suivi pour l'analyse transcriptionnelle des gènes de *B. linens* ATCC9175.

TEMOIN (T) (fromage-agar non ensemencé)

pH = 4,9 ± 0,0

NIVEAUX D'ENSEMENCEMENT (F0)

Cv $_{D.\ hansenii}$ **≈ 9,8.10^3 UFC/cm^2**
Cv $_{K.\ marxianus}$ **≈ 9,6.10^3 UFC/cm^2**
Cv $_{Y.\ lipolytica}$ **≈ 1,1.10^4 UFC/cm^2**
Cv $_{B.\ linens}$ **≈ 9,7.10^5 UFC/cm^2**

7 JOURS D'AFFINAGE (F7)

pH = 5,9 ± 0,0

Cv $_{D.\ hansenii}$ **≈ 8,5.10^7 UFC/cm^2**
Cv $_{K.\ marxianus}$ **≈ 1,2.10^6 UFC/cm^2**
Cv $_{Y.\ lipolytica}$ **≈ 5,0.10^7 UFC/cm^2**
Cv $_{B.\ linens}$ **≈ 3,0.10^6 UFC/cm^2**

21 JOURS D'AFFINAGE (F21)

pH = 7,3 ± 0,1

Cv $_{D.\ hansenii}$ **≈ 4,1.10^7 UFC/cm^2**
Cv $_{K.\ marxianus}$ **≈ 2,8.10^6 UFC/cm^2**
Cv $_{Y.\ lipolytica}$ **≈ 1,0.10^8 UFC/cm^2**
Cv $_{B.\ linens}$ **≈ 1,2.10^7 UFC/cm^2**

35 JOURS D'AFFINAGE (F35)

pH = 8,0 ± 0,0

Cv $_{D.\ hansenii}$ **≈ 2,2.10^7 UFC/cm^2**
Cv $_{K.\ marxianus}$ **< 5,0.10^4 UFC/cm^2**
Cv $_{Y.\ lipolytica}$ **≈ 6,6.10^8 UFC/cm^2**
Cv $_{B.\ linens}$ **≈ 5,1.10^7 UFC/cm^2**

Figure 14 : pH et concentration en cellules viables cultivables (Cv) des tapis microbiens après 7, 21 et 35 jours d'affinage à 12 °C et à l'obscurité.

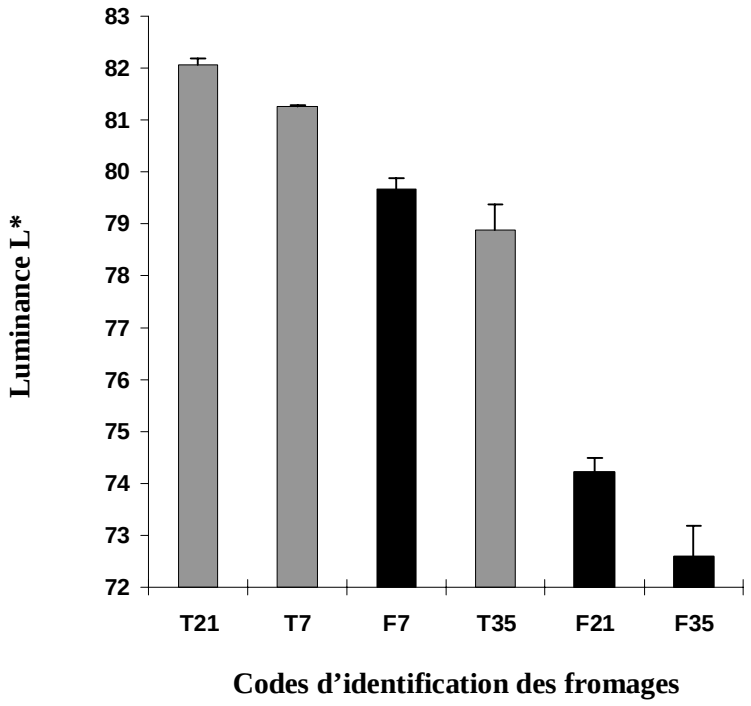


Figure 15 : Classement des fromages témoins (T) et des fromages ensemencés (F) en fonction de leur luminance L* après 7, 21 et 35 jours d'affinage à 12 °C et à l'obscurité.

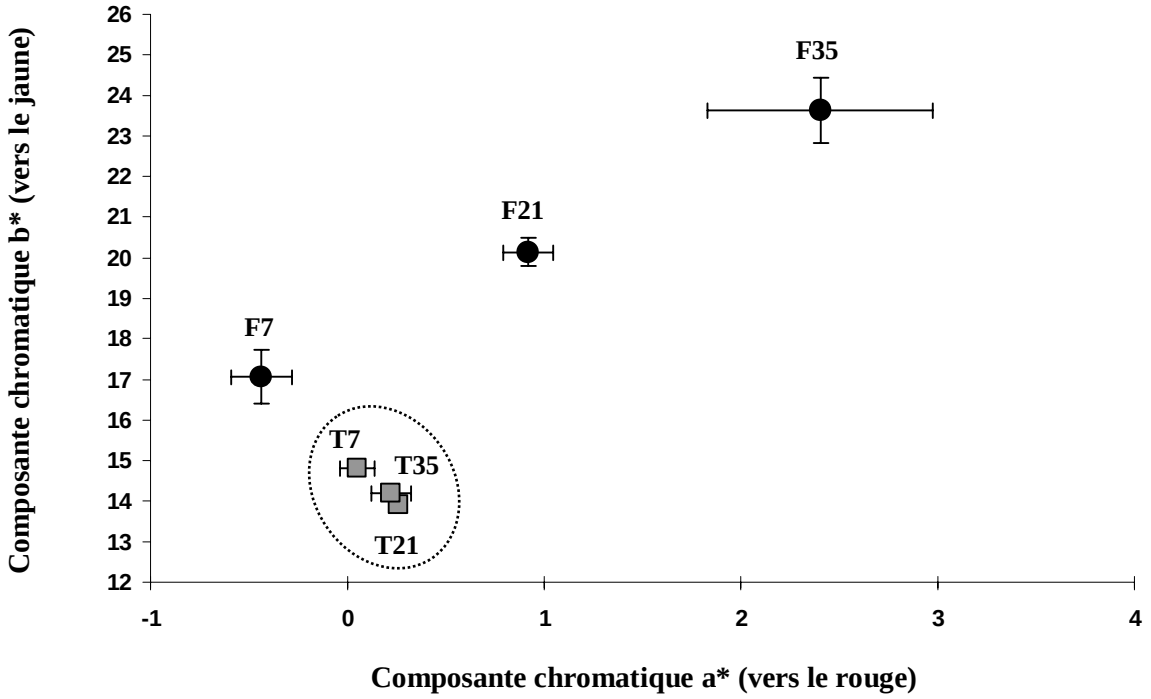


Figure 16 : **Représentation graphique du positionnement des fromages témoins (T) et des fromages ensemencés (F) dans le plan a*b* après 7, 21 et 35 jours d'affinage à 12 °C et à l'obscurité.**

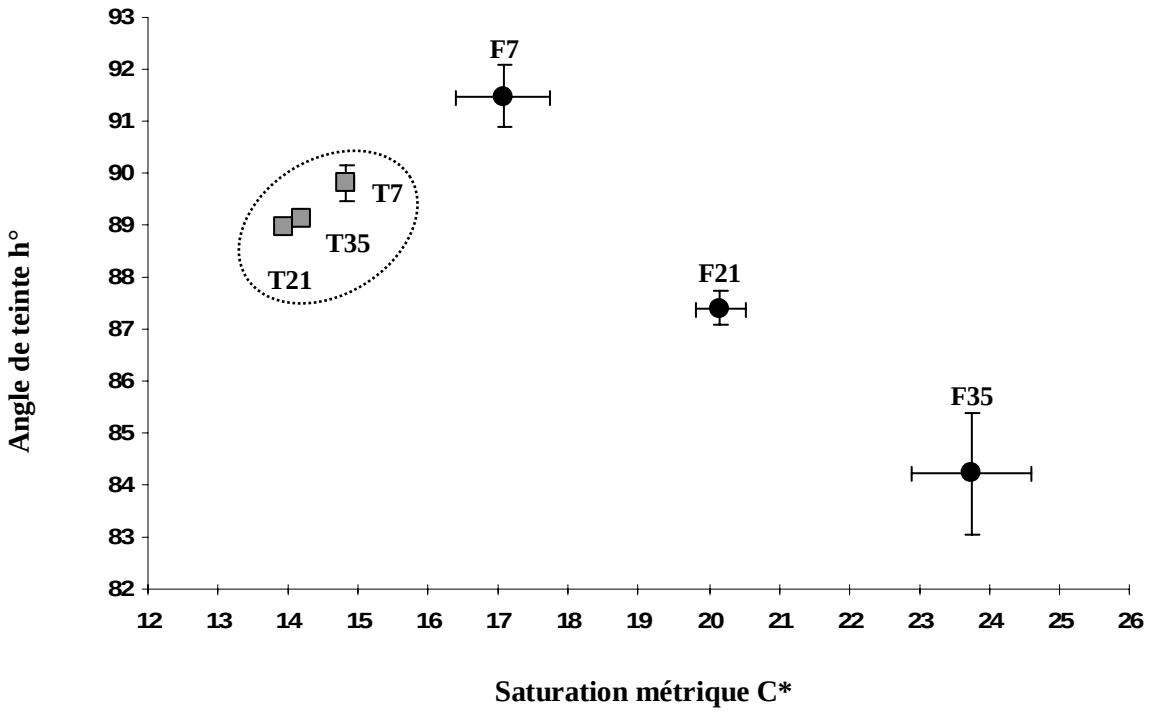


Figure 17 : **Représentation graphique du positionnement des fromages témoins (T) et des fromages ensemencés (F) dans le plan C*h° après 7, 21 et 35 jours d'affinage à 12 °C et à l'obscurité.**

Figure 18 : Représentation du système L*a*b*.
(a) plan chromatique a*b*
(b) sphère des couleurs

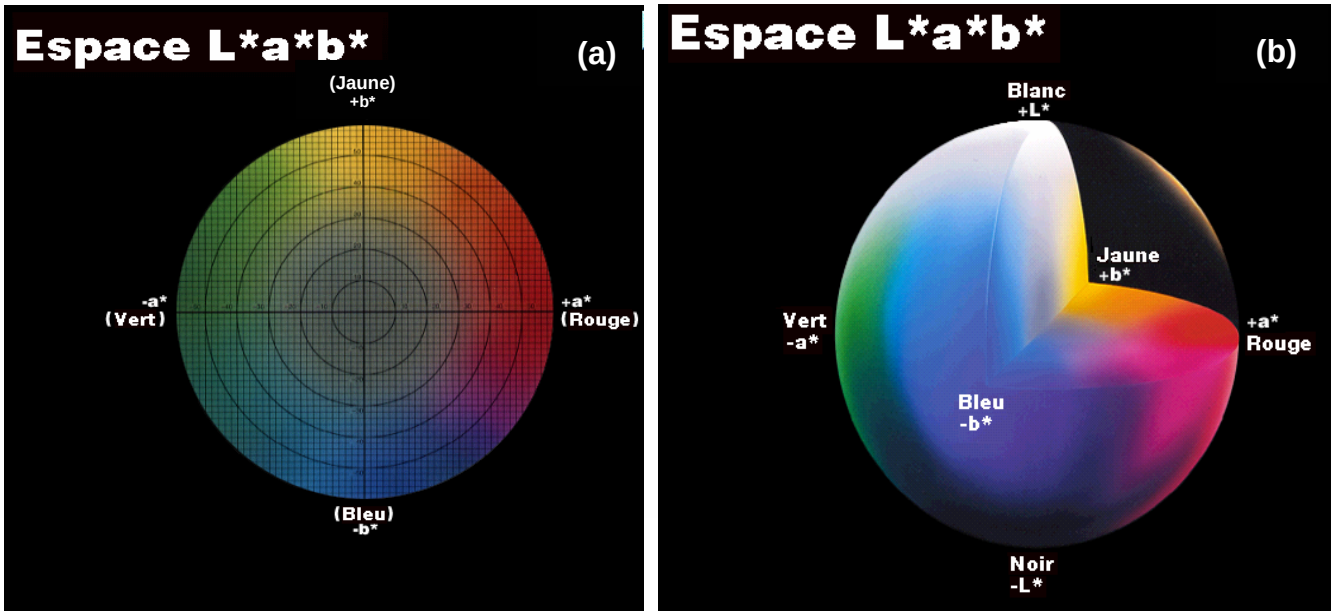


Figure 19 : Représentation du système C*h°.
(a) paramètre C*
(b) paramètre h°

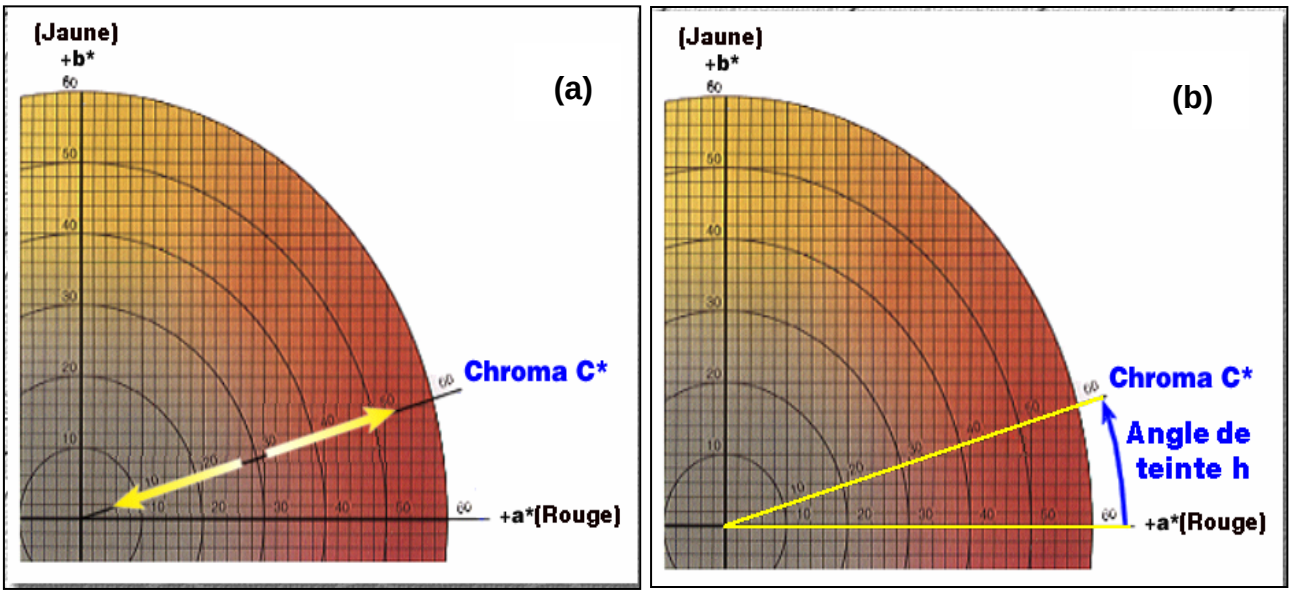


Tableau 1 : Composition moyenne (en g pour 100 g de fromage frais) en constituants majeurs de quelques familles de fromages (d'après Dillon & Berthier, 1997)**.**

Variété de fromage	Eau	Protéines	Lipides	Glucides
Fromages frais *ex. Petit suisse*	79	8,5	7,5	4
Fromages à pâte molle *ex. Camembert, Munster*	50	20	24	4
Fromages à pâte pressée non cuite *ex. Saint-Paulin*	40	28	24	3
Fromages à pâte pressée cuite *ex. Comté*	35	29	28	2,5
Fromages à pâte persillée *ex. Roquefort*	40	21	32	1,8

Tableau 2 : Composition moyenne (en g/100 g de poids frais) en acides aminés d'un Camembert et d'un Gruyère (*Source* USDA, 2002)**.**

	Camembert	Gruyère
Tryptophane	0,307	0,421
Thréonine	0,717	1,089
Isoleucine	0,968	1,612
Leucine	1,840	3,102
Lysine	1,766	2,710
Méthionine	0,565	0,822
Cystine	0,109	0,304
Phénylalanine	1,105	1,743
Tyrosine	1,145	1,776
Valine	1,279	2,243
Arginine	0,701	0,972
Histidine	0,683	1,117
Alanine	0,819	0,958
Acide aspartique	1,288	1,645
Acide glutamique	4,187	5,981
Glycine	0,379	0,533
Proline	2,346	3,869
Sérine	1,114	1,719

Tableau 3 : Exemple de caractéristiques biochimiques d'intérêt technologique de quelques espèces de bactéries lactiques.

Caractéristiques	Bactéries lactiques									
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**
Enzymes/activités protéolytiques		+	+	+	+	+	+	+	+	+
Enzymes/activités peptidasiques	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Enzymes/activités lipasiques				+			+			+
Enzymes/activités estérasiques	+	+	+	+	+		+	+		+
Aminotransférase	+	+	+	+	+			+	+	
Cystathionine γ-lyase								+		
Cystathionine β-lyase						+		+		
Utilisation du citrate	+								+	+
Métabolisme homofermentaire	+*	+	+	+		+	+	+	+	+
Métabolisme hétérofermentaire	+*	+	+	+	+					
Références	**[3] [17] [21] [24] [25]**	**[15] [21] [23] [24] [25]**	**[12] [18] [21] [23] [24]**	**[1] [8] [12] [16] [21] [24]**	**[23] [24] [25]**	**[2] [3] [12]**	**[12] [13] [22]**	**[4] [5] [6] [7] [9] [11] [12] [22] [27]**	**[9] [10] [12] [14] [26]**	**[19] [20] [21]**

1. *Lactobacillus rhamnosus* (sans distinction de souche ou de biovar.) ; **2**. *Lactobacillus paracasei* ; **3.** *Lactobacillus curvatus* ; **4.** *Lactobacillus plantarum* ; **5.** *Lactobacillus brevis* ; **6.** *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ; **7.** *Lactobacillus helveticus* ; **8.** *Lactococcus lactis* subsp *cremoris* ; **9.** *Lactococcus lactis* subsp *lactis* ; **10.** *Enterococcus faecalis.* Les cases vides indiquent l'absence d'information. ***** concerne les espèces hétérofermentaires facultatives.

[1] Amárita *et al.* (2001) ; **[2]** Aubel *et al.* (2002) ; **[3]** Bockelmann (1995) ; **[4]** Bruinenberg *et al.* (1997) ; **[5]** Dobric *et al.* (1998) ; **[6]** Dobric *et al.* (2000) ; **[7]** Engels *et al.* (2000) ; **[8]** Freitas *et al.* (1999) ; **[9]** Gao *et al.* (1997) ; **[10]** Gao & Steele (1998) **[11]** ; Holland & Coolbear (1996) ; **[12]** Jay (1997) ; **[13]** Khalid & Marth (1990) ; **[14]** Lange *et al.* (1994) ; **[15]** Macedo *et al.* (2000) ; **[16]** Macedo *et al.* (2003) ; **[17]** Medina de Figueroa *et al.* (1998) ; **[18]** Pereira *et al.* (2001) ; **[19]** Sarantinopoulos *et al.* (2001a) ; **[20]** Sarantinopoulos *et al.* (2001b) ; **[21]** Stiles & Holzapfel (1997) ; **[22]** Weimer *et al.* (1997) ; **[23]** Williams & Banks (1997) ; **[24]** Williams *et al.* (2001) ; **[25]** Williams *et al.* (2002) ; **[26]** Yvon *et al.* (1997) ; **[27]** Yvon *et al.* (2000).

Tableau 4 : Principales aptitudes biochimiques de quelques levures d'affinage des fromages.

Levures	Caractéristiques	Références
Debaryomyces hansenii	Activité L-méthionine aminotransférase	Spinnler *et al.* (2001) ; Arfi *et al.* (2002)
	Activité KMTBA déméthiolase	Arfi *et al.* (2002)
	Enzymes/activités protéolytiques	Klein *et al.* (2002) ; Kumura *et al.* (2002) ; Bolumar *et al.* (2003)
	Enzymes/activités estérasiques	Pereira-Dias *et al.* (2000)
Kluyveromyces lactis	Activité L-méthionine aminotransférase	Arfi *et al.* (2002) ; Kagkli *et al.* (2006b)
	Activité KMTBA déméthiolase	Arfi *et al.* (2002)
	Activité HMTBA déméthiolase	Kagkli *et al.* (2006b)
	Activité HMTBA oxidase	Kagkli *et al.* (2006b)
	Activité KMTBA déshydrogénase	Sinclair *et al.* (1993) ; Kagkli *et al.* (2006b)
	Alcool déshydrogénase	Bozzi *et al.* (1997)
	Enzymes/activités protéolytiques	Flores *et al.* (1999) ; Klein *et al.* (2002)
	β-galactosidase	Becerra & Gonzales Siso (1996) ; Bolotin-Fukuhara *et al.* (2000); Zhou & Chen (2001)
Saccharomyces cerevisiae	Enzymes/Activité L-méthionine aminotransférase	Eden *et al.* (1996) ; Spinnler *et al.* (2001) ; Arfi *et al.* (2002) ; Kagkli *et al.* (2006b)
	Activité KMTBA déméthiolase	Arfi *et al.* (2002) ; Perpète *et al.* (2006) ; Kagkli *et al.* (2006b)
	Activité HMTBA déméthiolase	Kagkli *et al.* (2006b)
	Activité HMTBA oxidase	Kagkli *et al.* (2006b)
	Alcool acetyl transférase	Yoshioka & Hashimoto (1981)
	Cystathionine γ-lyase	Ono *et al.* (1993) ; Yamagata *et al.* (1993)
	Pyruvate décarboxylase	Derrick & Large (1993) ; Dickinson *et al.* (1998)
	Enzymes/activités protéolytiques	Jones (1991) ; Klein *et al.* (2002)
	Enzymes/activités estérasiques	Del Carmen Plata *et al.* (1998)
Yarrowia lipolytica	Activité L-méthionine aminotransférase	Bonnarme *et al.* (2001) ; Arfi *et al.* (2002) ; Cernat Bondar *et al.* (2005)
	Enzymes/activités lipolytiques	Pereira-Meirelles *et al.* (2000) ; Pignède *et al.* (2000) ; van den Tempel & Jacobsen (2000) ; Corbo *et al.* (2001) ; Suzzi *et al.* (2001) ; Fickers *et al.* (2005)
	Enzymes/activités protéolytiques	van den Tempel & Jacobsen (2000) ; Corbo *et al.* (2001) ; Suzzi *et al.* (2001)

Tableau 5 : Exemples de bactériocines produites par les bactéries lactiques, pouvant être utilisées comme conservateurs dans les produits laitiers et fromagers.

Bactériocines	Spectres d'inhibition	Références
Lactococcus sp. :		
Nisine	Spectre large	Delves-Broughton, 1990
Lactacine 481	Spectre moyen	Piard *et al*., 1992
Lactobacillus sp. :		
Plantaricine C	Spectre large	Gonzalez *et al*., 1994
Pediocine AcH	Spectre large	Ennahar *et al*., 1996
Pediococcus sp. :		
Pediocine A	Spectre large	Piva & Headon, 1994
Pediocine AcH (PA-1)	Spectre large	Bhunia *et al*., 1988
Enterococcus sp. :		
Entérocine EFS2	Spectre étroit	Maisnier-Patin *et al*., 1996
Entérocine A	Spectre étroit	Ennahar & Deschamps, 2000
Carnobacterium sp. :		
Carnocine CP5	Spectre large	Herbin *et al*., 1997

Tableau 6 : Principaux types de puces à ADN.

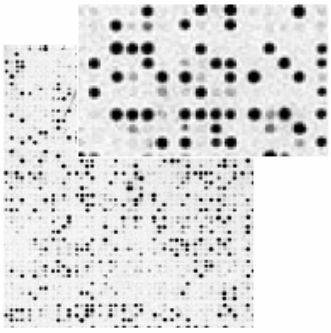
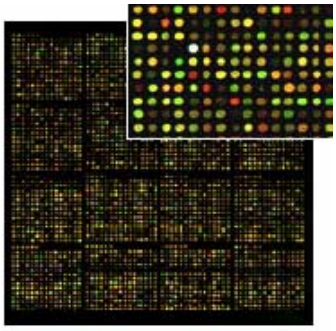
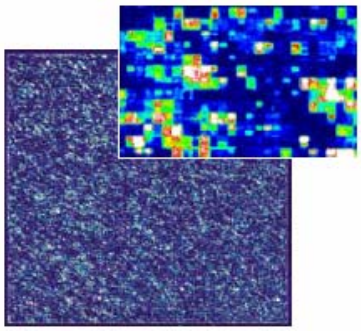
Filtres à haute densité « *macroarrays* »	Puces spottées « *microarrays* »	Puces à oligonucléotides « *oligochips* »
		
• **Support :** membrane de nylon • **Taille des spots :** 0,5-1 mm • **Densité :** quelques centaines de spots/cm^2 par membrane • **Sondes :** produits de PCR • **Cibles :** ADNc avec marquage radioactif au ^{33}P • 1 condition expérimentale par membrane	• **Support :** lame de verre à revêtement chimique • **Taille des spots :** ~ 100 µm • **Densité :** 1000 à 10000 spots/cm^2 par lame • **Sondes :** produits de PCR ou oligonucléotides longs (30-70 mers) • **Cibles :** ADNc ou produits de PCR avec marquage fluorescent au Cy3 et Cy5 • 2 conditions expérimentales possibles par lame	• **Support :** lame de verre à revêtement chimique • **Taille des spots :** ~ 20 µm • **Densité :** jusqu'à 300000 spots/cm^2 par lame • **Sondes :** oligonucléotides courts (20-25 mers) synthétisés *in situ* par photolithographie • **Cibles :** ADNc ou produits de PCR avec marquage fluores-cent à la biotine-streptavidine • 1 condition expérimentale par lame

Tableau 7 : Matrice des vecteurs propres (ACP) des données de transcriptomique obtenues pour les trois levures sur milieu synthétique fromager (à 36, 72 et 120 h) et sur fromage modèle (à 7 jours d'affinage).

Axes d'inertie	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
% d'inertie	**85,59**	**6,06**	**2,80**	**2,15**	**1,14**	**0,73**	**0,55**	**0,43**	**0,26**	**0,14**	**0,10**	**0,06**
Milieu fromager - 36 h – A	0,30	0,15	0,15	0,25	0,31	-0,04	0,19	-0,03	-0,51	0,60	0,21	-0,02
Milieu fromager - 36 h – B	0,30	0,18	0,04	0,20	0,23	0,24	0,20	-0,09	-0,09	-0,30	-0,72	-0,24
Milieu fromager - 36 h – C	0,30	0,20	0,08	0,23	0,43	0,14	-0,04	-0,20	0,34	-0,40	0,49	0,21
Milieu fromager - 72 h – A	0,30	0,18	0,09	0,14	-0,56	0,09	0,59	0,22	0,34	0,10	0,11	0,01
Milieu fromager - 72 h – B	0,30	0,24	0,20	0,03	-0,26	-0,19	-0,42	-0,09	0,01	0,11	-0,31	0,65
Milieu fromager - 72 h – C	0,30	0,27	0,24	-0,07	-0,29	-0,22	-0,41	0,03	-0,15	-0,20	0,20	-0,61
Milieu fromager - 120 h – A	0,29	0,03	-0,03	-0,75	0,02	0,21	0,21	0,09	-0,37	-0,24	0,11	0,22
Milieu fromager - 120 h – B	0,27	0,00	-0,87	0,22	-0,16	-0,19	-0,04	-0,04	-0,20	-0,12	0,07	0,04
Milieu fromager - 120 h – C	0,30	0,12	-0,27	-0,38	0,27	0,06	-0,20	0,09	0,53	0,47	-0,12	-0,20
Fromage modèle – J7 - A	0,27	-0,54	0,04	0,11	-0,26	0,62	-0,25	-0,29	-0,03	0,13	0,07	-0,06
Fromage modèle – J7 - B	0,28	-0,47	0,11	0,17	0,18	-0,14	-0,12	0,76	0,00	-0,13	-0,03	0,07
Fromage modèle – J7 - C	0,28	-0,47	0,14	-0,15	0,05	-0,58	0,27	-0,47	0,13	-0,03	-0,06	-0,06

Matrice des vecteurs propres obtenus par l'ACP. Ce tableau présente les coefficients des combinaisons linéaires qui permettent d'obtenir les coordonnées des axes d'inertie en fonction des coordonnées initiales. Les valeurs initiales ont été au préalable transformées en logarithmes centrés réduits sur les conditions expérimentales. Les coefficients des axes 2 et 3 sont grisés ou blancs afin de montrer la signification des axes par rapport aux facteurs expérimentaux. Chaque mesure a été répétée trois fois (A, B et C).

Tableau 8 : Gènes dont le niveau d'expression varie significativement (FDR ≤ 10 %) au cours du temps (36, 72 ou 120 h) sur milieu synthétique et/ou sur fromage modèle.

Nom des gènes	*S. cerevisiae* ORF	Numéro d'accession des gènes [a]	Milieu synthétique 36 h	Milieu synthétique 72 h	Milieu synthétique 120 h	Fromage modèle 7 jours d'affinage	Description [a]
LAC4	*no*	*KLLA0B14883g*	7,2	7,1	0,6	1,4	β-galactosidase
LAC12	*no*	***DEHA0G26367g***	-0,7	-0,1	0,7	**2,4**	Lactose permease
		KLLA0B14861g	3,6	2,4	-1,6	-0,7	
JEN1	*YKL217w*	*DEHA0F18843g*	2,2	-0,7	5,0	3,4	Lactate transporter
		YALI0D20108g	-2,2	-2,1	-1,0	**-2,5**	
CYB2	*YML054c*	***DEHA0E01166g***	2,6	0,6	0,9	**0,0**	Lactate dehydrogenase cytochrome b2
DLD1	*YDL174c*	***YALI0E03212g***	-1,0	-0,2	-0,2	**-0,9**	Lactate ferricytochrome c oxidoreductase
ILV2	*YMR108w*	***YALI0C00253g***	2,1	3,0	3,2	**0,1**	Acetolactate synthase (catalytic subunit)
ILV6	*YCL009c*	*DEHA0E22869g**	5,2	4,7	3,4	0,2	Acetolactate synthase (regulatory subunit)
PDA1	*YER178w*	*DEHA0G13728g**	8,2	7,2	5,8	7,4	E1α subunit of the pyruvate dehydrogenase (PDH) complex
		YALI0F20702g	0,3	1,9	0,9	**1,5**	
PDB1	*YBR221c*	*DEHA0C10065g*	10,1	8,6	7,9	11,5	E1β subunit of the pyruvate dehydrogenase (PDH) complex
		*YALI0F05038g**	2,6	1,9	6,0	2,2	
PDC1	*YLR044c*	*DEHA0G19525g**	8,8	10,0	7,0	9,7	Major of three pyruvate decarboxylase isozymes
		*DEHA0D18381g**	5,9	6,8	5,2	7,2	
		KLLA0E16357g	2,0	1,5	0,0	**-1,7**	
		YALI0D10131g	-0,4	2,5	1,0	-0,4	
ARO10	*YDR380w*	*DEHA0D11066g**	6,0	5,8	8,6	8,7	Phenylpyruvate decarboxylase
BAT2	*YJR148w*	***DEHA0D07689g****	-1,3	-2,1	-1,3	**4,5**	Cytosolic branched-chain amino acid aminotransferase
		YALI0F19910g	3,8	6,3	4,4	-0,6	
ARO8	*YGL202w*	*YALI0E20977g*	5,2	7,5	6,6	1,6	Aromatic aminotransferase
SAM2	*YDR502c*	***DEHA0E14751g***	3,4	1,6	0,3	**3,0**	*S*-adenosylmethionine synthase
STR2	*YJR130c*	***DEHA0D10285g****	0,8	-0,3	0,0	**-1,3**	Cystathionine γ-synthase

[a] *Génolevures* (Genomic Exploration of the Hemiascomycete Yeasts; http://cbi.labri.fr/Genolevures/).
FDR: False Discovery Rate.
no: absence d'homologue chez *S. cerevisiae*.
Les données ont été au préalable transformées en logarithme centré réduit selon les conditions expérimentales.

Bouillons utilisés

Toutes les quantités sont données pour la préparation de 1 l de milieu.

Composition du bouillon BHB *(Brain Heart Broth)* pour la bactérie

Composition (Biokar Diagnostics BK015)	**Quantité (g)**
Extrait de cœur-cervelle	17,5
Peptone pancréatique de gélatine	10,0
Chlorure de sodium	5,0
Glucose	2,0
Phosphate disodique (NaH_2PO_4)	2,5

Ce milieu, de pH final 7,4 ± 0,2, est autoclavé 15 min à 120 °C.

Composition du bouillon PDB *(Potato Dextrose Broth)* pour les levures

Composition (Difco™ 254920)	**Quantité (g)**
Fécule de pomme de terre	4,0
Dextrose	20,0

Ce milieu, de pH final 5,1 ± 0,2, est autoclavé 15 min à 120 °C.

Milieux gélosés utilisés

Toutes les quantités sont données pour la préparation de 1 l de milieu.

Composition du milieu gélosé BHA *(Brain Heart Agar)* pour la bactérie

Composition (Biokar Diagnostics BK029)	**Quantité (g)**
Extrait de cœur-cervelle	17,5
Peptone pancréatique de gélatine	10,0
Chlorure de sodium	5,0
Glucose	2,0
Phosphate disodique	2,5
Agar-agar bactériologique	15,0

Ce milieu, de pH final 7,4 ± 0,2, est autoclavé 15 min à 120 °C.
Pour l'étude de *Brevibacterium linens* en mélange avec des levures, 50 mg/l d'amphotéricine B (Sigma-Aldrich) sont ajoutés pour empêcher le développement des levures.

Composition du milieu gélosé YEGC *(Yeast Extract Glucose Chloramphenicol)* pour les levures

Composition (Biokar Diagnostics BK007)	**Quantité (g)**
Extrait autolytique de levure	5,0
Glucose	20,0
Chloramphénicol	0,1
Agar-agar bactériologique	15,0

Ce milieu, de pH final 6,6 ± 0,2, est autoclavé 15 min à 120 °C.
Le chloramphénicol inhibe la flore bactérienne.

Préparation des milieux de culture

Toutes les cultures sont réalisées dans des Erlenmeyers de 500 ml contenant 100 ml de milieu. Les milieux inoculés sont incubés à 25 °C, 150 rpm (incubateur rotatif, 5 cm de diamètre de rotation ; Unitron, Ht Infors), pour une durée allant de 96 à 120 h selon les études. Pour chaque facteur étudié, au moins trois réplicats sont réalisés.

Milieu synthétique A (cf. Article 1)

Composition	Quantité
Extrait de levure (Gibco 20047-056)	2,0 g
Lactate de sodium à 60% ($C_3H_5NaO_3$) (VWR Prolabo 27 925.292)	30 ml
Chlorure de calcium ($CaCl_2$) (VWR Prolabo 22 312.267)	0,1 g
Phosphate de potassium (KH_2PO_4) (Sigma-Aldrich P8281)	6,8 g
Chlorure de sodium (NaCl) (VWR Prolabo 27 788.366)	20,0 g
Eau MilliQ®	720 ou 970 ml *

*****_selon que le milieu soit enrichi ou non en L-méthionine après autoclavage_

Pour l'étude de *B. linens*, le pH de ce milieu est ajusté à 7,0 ± 0,1. Il est ensuite autoclavé 20 min à 120 °C.

* Quand nécessaire, 1 g de L-méthionine (Sigma-Aldrich M9625) est dissous dans 250 ml d'eau MilliQ®(système MilliQ, Millipore). Cette solution est filtrée à l'aide d'une membrane en acétate de cellulose 0,2 µm (Sartolab P20, Sartorius) et additionnée au milieu maintenu en surfusion à 50 °C.

Milieu synthétique fromager J1 (cf. Articles 2 et 3)

Composition	Quantité
Bacto™ casamino acids (Difco 223050)	15,0 g
Extrait de levure (Gibco 20047-056)	1,0 g
Lactate de sodium à 60% ($C_3H_5NaO_3$) (VWR Prolabo 27 925.292)	38 ml
Chlorure de calcium ($CaCl_2$) (VWR Prolabo 22 312.267)	0,1 g
Sulfate de magnésium ($MgSO_4$, $7H_2O$) (VWR Prolabo, 25 165.292)	0,5 g
Phosphate de potassium (KH_2PO_4) (Sigma-Aldrich P8281)	6,8 g
Chlorure de sodium (NaCl) (VWR Prolabo 27 788.366)	10,0 g
Eau MilliQ®	712 ml

Pour l'étude des levures seules ou en mélange, le pH de ce milieu est ajusté à 5,5. Il est ensuite autoclavé 20 min à 120 °C, puis maintenu en surfusion à 50 °C.

Lactose ($C_{12}H_{22}O_{11}$, H_2O) (VWR Prolabo 24 931.293)	20 g
L-méthionine (Sigma-Aldrich M9625)	1 *ou* 6 g
Eau MilliQ®	250 ml

Après dissolution du lactose et de la L-méthionine, cette solution est filtrée à l'aide d'une membrane en acétate de cellulose 0,2 µm (Sartolab P20) et additionnée au milieu en surfusion.

Fabrication d'un fromage modèle (fromage-agar)

Objectif

Mise au point d'un fromage modèle de type Livarot, permettant une manipulation plus aisée qu'un fromage fabriqué en plate-forme expérimentale.

Méthode

- ***Fabrication des caillés lactiques***

Des caillés de type Livarot sont fabriqués à l'échelle pilote dans une enceinte de fabrication stérile de 2 m^3 sous conditions aseptiques. Cent litres de lait standardisé à 270 g de matière grasse/l sont pasteurisés à 74 °C pendant 30 s, refroidis à 37 °C et inoculés avec 10 g de levains lactiques à ensemencement direct. Les levains lactiques sont un mélange de CHN12 et CHN15 (Chr. Hansen S.A.), cultures mésophiles acidifiantes (production de L- et D-lactate à partir du lactose) composées d'un nombre indéfini de souches appartenant à différentes espèces de *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* et *cremoris*, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* (biovar. *diacetylactis*) et *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris*. Lorsque le pH atteint 6,45, l'emprésurage est réalisé avec 30 ml d'une solution standardisée d'enzymes coagulantes contenant 520 mg/l de chymosine (extrait de présure 520 ; Chr. Hansen S.A.). Le temps de coagulation est de 16 min et le caillé est découpé après 30 min de raffermissement. Le coagulum est découpé en cubes de 1,5 x 1,5 x 2,0 cm et, après 5 min, est brassé une première fois à 8 rpm pendant 5 min. Un volume de 55 l de lactosérum est soutiré et, après 15 min, un second brassage à 5 rpm pendant 5 min est réalisé avant de soutirer la totalité du lactosérum (au total 70 l). Le caillé est déposé rapidement dans des moules de 10 cm de diamètre. Les moules sont retournés 2,5 h, 5,5 h, 6,5 h et 12 h après emprésurage et sont enlevés après 14 h. La température de la chambre est contrôlée et maintenue à 28 °C de la coagulation au moulage, puis descendue à 25 °C du 1er au 3ième retournement et à 20 °C du 4ième à l'enlèvement des caillés de la plate-forme. Les caillés sont ensuite emballés dans des sacs à congélation (préalablement placés sous UV) et sont ensuite rapidement congelés à –70 °C jusqu'à leur utilisation.

- ***Préparation des inocula***

Dans notre étude, nous avons considérer les levures (*Debaryomyces hansenii* 304, *Kluyveromyces marxianus* 44_8, *Yarrowia lipolytica* 370) et la bactérie (*Brevibacterium linens* ATCC9175). Avant chaque préparation, un aliquot de chaque souche est repiqué sur une boîte de gélose (YEGC pour les levures ; BHA pour la bactérie) et incubé à 25 °C, 3 à 7 jours selon le micro-organisme. Après croissance, une colonie est prélevée stérilement à l'aide d'une öse et mise en suspension dans un Erlenmeyer de 50 ml contenant 10 ml de bouillon stérile adapté à chaque micro-organisme, à savoir PDB pour les levures et BHB pour la bactérie. Cette première préculture est conduite à 25 °C, sous une agitation de 150 rpm, durant 55 h. Afin de s'assurer que toutes les cellules sont dans le même état physiologique, une deuxième préculture est réalisée. Des Erlenmeyers de 150 ml contenant 40 ml de bouillon (PDB pour les levures ; BHB pour la bactérie) sont alors inoculés avec 1% de suspension cellulaire issue de la précédente préculture, et incubés pendant 66 h à 25 °C et 150 rpm. La densité optique (DO) à 600 nm est alors mesurée (diluer dans le même milieu pour avoir une DO < 0,5) pour avoir la corrélation UFC/DO.

Cinq millilitres de chaque culture sont ensuite centrifugés à 2000 *g* pendant 10 min à température ambiante. Les culots sont homogénéisés dans un volume d'eau physiologique stérile (9 ‰ de NaCl) de manière à obtenir une concentration équivalente à 2.10^7 UFC/ml pour chaque levure et à 2.10^9 UFC/ml pour la bactérie. L'équivalent de $1,25.10^7$ UFC de chaque suspension de levure (0,64 ml) et $1,25.10^9$ UFC de suspension bactérienne (0,64 ml), sont mélangés et ajustés dans un volume final de 10 ml d'eau physiologique stérile (9 ‰ de NaCl). Cette solution saline de levures-bactéries constitue l'inoculum de surface d'un milieu fromager modèle.

- ***Préparation des caillés et du matériel***

Les caillés lactiques sont décongelés à 4 °C pendant 12 h. Toutes les manipulations sont réalisées en conditions stériles sous une hotte à flux laminaire, la verrerie est autoclavée à 120 °C pendant 20 min et l'eau utilisée est de l'eau MilliQ® (équivalente à de l'eau bidistillée).

- ***Fabrication des fromages modèles (fromage-agar)***

Une portion de 270 g de caillé est émiettée dans un Warring-Blender® (Laboratory Blender) et broyée à vitesse maximale pendant 3 x 30 s en présence de 180 ml d'eau salée stérile (42,5 g/l de NaCl) (entre les broyages la pâte est remuée avec une spatule stérile). A l'aide d'un entonnoir stérile, 400 g de pâte sont ensuite transvasés dans un flacon en verre Schott de 500 ml (préalablement stérilisé à 115 °C durant 15 min) contenant un barreau aimanté et 4 g d'agar bactériologique type E (Biokar Diagnostics). Après autoclavage (110 °C – 15 min), ce milieu est mélangé à l'aide du barreau magnétique pendant 10 min à température ambiante, puis refroidit 15 min dans un bain-marie à 65 °C. Environ 30 g de milieu sont ensuite coulés dans un cristallisoir en verre stérile (5,6 cm de diamètre intérieur et 3 cm de haut) avec couvercle. Les cristallisoirs ainsi préparés sont maintenus 45 min bien horizontalement à température ambiante (de manière à ce que la gélose solidifie) puis, après avoir enlevé le couvercle, séchés 20 min sous les UV de la hotte à flux laminaire (afin d'éliminer la condensation). La suspension microbienne est ensemencée à raison de 0,2 ml par cristallisoir. L'étalement se fait à l'aide d'un râteau stérile à la surface du fromage-agar pour obtenir un tapis homogène. Les fromages modèles sont affinés à 12 °C pendant 7, 21 ou 35 jours, à l'obscurité et en présence d'un bac d'eau (le taux d'humidité est alors supérieur à 95%). Pour chaque série de « fromages », deux cristallisoirs dont la surface n'est pas ensemencée constituent des références colorimétriques (blancs) à J7, J21 et J35 et des témoins de stérilité.

Remarque. Sachant qu'on ensemence 0,2 ml de la solution saline levures-bactéries à la surface de chaque fromage-agar, cela correspond à $2,5.10^5$ UFC pour chaque levure et à $2,5.10^7$ UFC de bactérie sur chaque fromage. La surface de chaque fromage-agar étant de 24,6 cm^2, les niveaux d'ensemencement sont donc de 10^4 UFC/cm^2 pour chaque levure et de 10^6 UFC/cm^2 pour la bactérie.

Suivi de la croissance microbienne

Principe

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

Méthode

- ***Traitement des échantillons***

Pour les cultures en milieu synthétique (milieu **A** et milieu fromager **J1**), un volume de 1 ml est prélevé stérilement dans l'Erlenmeyer et dilué au 1/10 dans de l'eau physiologique stérile (9 ‰ de NaCl) (dilution 0). Des dilutions décimales de cette suspension sont ensuite effectuées dans de l'eau physiologique.
Pour les cultures sur fromages modèles (**fromage-agar**), le tapis microbien de surface est prélevé par grattage à l'aide d'une spatule stérile et transféré dans 10 ml d'eau physiologique stérile (9 ‰ de NaCl) (dilution 0). Cette suspension cellulaire est homogénéisée à l'Ultra-Turrax (modèle T25 ; IMLAB) à 8000 rpm (1 min), puis des dilutions décimales de cette suspension sont effectuées dans de l'eau physiologique. La plage de dilution varie de 10^{-1} à 10^{-6} en fonction de l'avancement de l'affinage et des micro-organismes dénombrés.

- ***Dénombrement des cellules viables***

En culture pure, pour un Erlenmeyer et une dilution donnés, deux boîtes de Petri sont ensemencées en surface avec 0,049 ml de suspension. L'ensemencement se fait sur des boîtes de 90 mm de diamètre, au moyen d'un ensemenceur spiral (Spiral Plater, Interscience). En culture mixte, pour un échantillon et une dilution donnés, trois boîtes de Petri sont ensemencées en surface avec 0,100 ml de suspension. L'ensemencement se fait sur des boîtes de 140 mm de diamètre à l'aide de billes de verre stériles. Les milieux de culture utilisés sont : YEGC pour les levures et BHA pour la bactérie. L'incubation des boîtes se fait à 25 °C pendant 3-7 jours selon les micro-organismes. Cette méthode permet de dénombrer le nombre d'unités formant colonies (UFC) sur la totalité de la boîte (entre 30 et 300 UFC pour chaque micro-organisme). En outre, l'ensemencement en surface permet de distinguer les colonies en fonction de leur taille, de leur pigmentation, de leur aspect, et de constater immédiatement l'existence d'une éventuelle contamination. La concentration en cellules viables est donnée par la relation :

$$[CV] = \frac{\sum_{1}^{X} C_x \times 10^{-d} \times F}{V}$$

avec :

[CV] : concentration en cellules viables (UFC/ml),
d : dilution par rapport à la suspension de départ,
Cx : nombre de colonies compté pour la boîte x,
V : volume de solution ensemencée (ml).
F : facteur de dilution du prélèvement initial (=10).

Extraction des ARN totaux

Principe

Utilisation d'un chaotrope (guanidine), d'un agent chélateur (EDTA), de détergent (*N*-lauroylsarcosine), d'une méthode mécanique (système Bead-beatting) et de colonnes (*RNeasy® Midi kit* ; Qiagen) pour extraire de façon spécifique (sans contamination d'ADN) à la fois les ARN de levures et de bactéries à partir de cultures en milieu synthétique (milieu **A** et milieu fromager **J1**) ou sur fromages modèles (**fromage-agar**).

Méthode

- ***Préparation des réactifs et du matériel***

Tous les contenants en verre sont décontaminés au four Pasteur à 200 °C pendant une nuit. Tous les réactifs sont préparés avec de l'eau traitée au DEPC (Diéthyl Pyrocarbonate) (1:1000) et autoclavée à 120 °C pendant 20 min. Les surfaces et les pipettes, réservées à cet usage, sont décontaminées avec la solution RNaseAway® (Molecular Bio-Products). Contenants en plastique, Eppendorfs, tubes à vis et pointes à filtre sont garantis RNase-free et sont manipulés uniquement avec des gants en nitrile pour éviter toute contamination par des RNases.

- ***Préparation des échantillons***

Pour les cultures en milieu synthétique (milieu **A** et milieu fromager **J1**), 100 ml sont centrifugés à 8200 *g* durant 5 min à 4 °C. Le surnageant est éliminé et le culot cellulaire lavé avec un volume (v/v) de tampon Tris-EDTA (TE 1 X ; 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0 ; Sigma-Aldrich). Après centrifugation, les cellules sont re-suspendues dans une solution (v/v) de thiocyanate de guanidium 4M (Sigma-Aldrich) – Tris-HCl 0,1M (Sigma-Aldrich) (pH 7,5), un volume de tampon RNeasy Lysis (RLT buffer; RNeasy® Midi kit, Qiagen) – β-mercaptoéthanol (Sigma-Aldrich) (1:0,01) et 1/6e de volume d'une solution de *N*-lauroylsarcosine à 10 % (Sigma-Aldrich). La suspension est homogénéisée au vortex, répartie dans des tubes à vis de 2 ml (à raison de 800 µl par tube), puis stockée à –80 °C.
Pour les cultures sur fromages modèles, la surface d'un **fromage-agar** est raclée à l'aide d'un grattoir stérile (3 mm d'épaisseur) et homogénéisée au vortex dans un volume de tampon TE 1 X. Après 10 min de centrifugation à 8200 *g* et à 4 °C, le surnageant est éliminé et les cellules re-suspendues dans un volume (v/v) de thiocyanate de guanidium 4M – Tris-HCl 0,1M (pH 7,5), un volume de tampon RLT – β-mercaptoéthanol (1:0,01) et 1/6e de volume de *N*-lauroylsarcosine à 10 %. La suspension est homogénéisée au vortex durant 2 min, répartie dans des tubes à vis de 2 ml (à raison de 800 µl par tube), puis conservée à –80 °C jusqu'à extraction.

- ***Extraction des ARN totaux***

A chaque aliquot encore congelé sont ajoutés 800 µl de tampon RLT-β-mercaptoéthanol (1:0,01) et 200 mg de billes de zirconium (100 µm ; BioSpec Products). Chaque tube est ensuite vigoureusement agité au broyeur FastPrep® (FP120 bead beating system ; Bio101) pendant 30 s à 6 m/s, refroidi 1 min dans la glace, puis de nouveau agité dans les mêmes conditions. Après refroidissement 1 min dans la glace, les tubes sont centrifugés 5 min à 1700 *g* à 4 °C. Le surnageant est transféré par pipetage dans un tube Falcon de 15 ml et un

volume d'éthanol à 70 % (Merck) est ajouté. Les ARN sont ensuite extraits sur colonne avec le kit *RNeasy® Midi* (Qiagen). Cette étape permet également de purifier les échantillons en éliminant les RNases.

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

- Déposer l'échantillon (volume maximum 4 ml) sur une colonne *RNeasy Midi* placée sur un tube à centrifugation de 15 ml. Fermer le tube et centrifuger 5 min à 3000 *g* à 15 °C ;
- Eliminer l'éluat ;
- **Laver la colonne** en ajoutant 4 ml de tampon RW1. Fermer le tube et centrifuger 5 min à 3000 *g* à 15 °C ;
- Eliminer l'éluat ;
- Ajouter 2,5 ml de tampon RPE. Fermer le tube et centrifuger 5 min à 3000 *g* à 15 °C ;
- Eliminer l'éluat et faire un deuxième lavage avec 2,5 ml de tampon RPE ;
- Eliminer l'éluat et centrifuger à vide 30 s à 3000 *g* à 15 °C pour éliminer le reste de tampon ;
- Transférer la colonne sur un tube propre de 15 ml **pour l'élution de l'ARN** ;
- Ajouter 250 µl d'eau RNase-free (H_2O-DEPC) au centre de la colonne. Attendre 1 min. Centrifuger 3 min à 3000 *g* à 15 °C ;
- Recommencer une fois l'élution par 250 µl d'H_2O-DEPC de façon à récupérer un volume final de 500 µl.

Les ARN (re-suspendus dans 500 µl d'eau DEPC) sont précipités 2 h à –20 °C dans 50 µl d'acétate de sodium 3 M (pH 5,2) et 400 µl d'isopropanol absolu glacé (Merck), puis centrifugés à 20800 *g* 30 min à 4 °C. Le culot est lavé deux fois avec 250 µl d'éthanol à 70 %, puis séché au bain-marie à sec à 35 °C pendant 15 min (ou à température ambiante pendant 30 min). Le culot est finalement repris dans 50 µl de TE 1 X et 0,5 µl (20 U) d'inhibiteur de RNase (RNasin ; Promega). Les ARN sont réhydratés une nuit à 4 °C.

Remarque. La pureté et la qualité des ARN sont finalement contrôlées par mesures au spectrophotomètre à 260 nm et 280 nm (le ratio A_{260}/A_{280} doit être > 1,8 pour un échantillon de bonne qualité). La concentration des ARN totaux est estimée en mesurant la densité optique à 260 nm : **1 unité DO_{260} = 40 µg/ml d'ARN**. Le profil des ARN totaux est également visualisé après électrophorèse sur un gel d'agarose en conditions dénaturantes.

Electrophorèse sur gel d'agarose

Principe

L'intégrité des ARN extraits est visualisée sur un gel d'agarose contenant du Bromure d'éthidium (BET). Le BET s'intercale entre les bases azotées et fluoresce sous une lampe à UV.

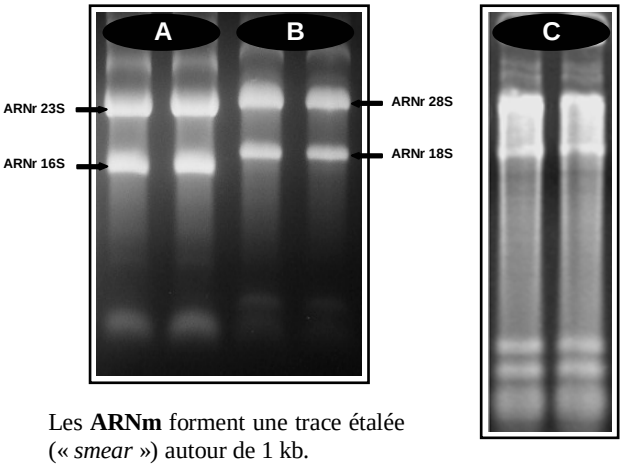
Méthode

- ***Préparation des réactifs et du matériel***

Préalablement à la réalisation du gel, plusieurs précautions sont nécessaires pour éviter la dégradation des ARN par des RNases :
– la cuve et le support à électrophorèse sont décontaminés avec de la soude (NaOH 1 M) durant 30 min, de même que les contenants en verre nécessaires à la préparation des solutions,
– le TBE 1 X est préparé avec de l'eau DEPC à partir d'une solution mère (TBE 10 X, Bio-Rad),
– le dépôt sur gel est effectué avec des pointes à filtre RNase-free et le tampon de charge est spécifiquement réservé à cet usage.

- ***Préparation et visualisation du gel***

Pour séparer les fragments d'ARN, un gel d'agarose à 1 % (QA-Agarose TM ; Qbiogene) est préparé avec du TBE 1 X. Lorsque la solution est transparisée (1 à 2 min au micro-ondes), 3 µl de BET à 10 mg/ml (Sigma-Aldrich) sont ajoutés pour un gel de 100 ml. Les peignes sont décontaminés avec la solution RNaseAway® (Molecular Bio-Products) et le gel coulé. Trois microlitres d'ARN et 2 µl de tampon de charge *blue/orange* (Promega) sont déposés par puits. Le marqueur de poids moléculaire *16S/23S E. coli* MRE600 (Roche Diagnostics) est également utilisé pour évaluer la taille des fragments. Après migration à 5-7 V/cm (80 V) pendant 90 min, le gel est visualisé sous une lampe à UV.



Les **ARNm** forment une trace étalée (« *smear* ») autour de 1 kb.

Vérification de la qualité des ARN totaux par électrophorèse sur gel d'agarose.

A Les ARN sont correctement extraits (ex. *B. linens*). Deux bandes de forte intensité sont observées. Elles correspondent aux ARNr de grande taille (23S et 16S) et sont en quantité à peu près équimolaire.

B Les ARN sont correctement extraits (ex. *Y. lipolytica*). Chez les levures, deux bandes d'intensité égale à 3,3 kb (ARNr 28S) et 1,6 kb (ARNr 18S), ainsi que plusieurs bandes de faible taille autour de 0,1 kb (ARNr 5S, ARNt…) sont observées.

C Exemple où les ARN sont partiellement dégradés. L'intensité des fragments de petite taille augmente et un *smear* apparaît en bas du gel. La dégradation n'est pas linéaire, les ARN de grande taille tendent à être plus rapidement dégradés.

Marquage par synthèse d'ADNc

Principe

Utilisation du kit *CyScribe*™ *First-Strand cDNA Labelling* (Amersham Biosciences) pour procéder au marquage direct de l'ARN. L'étape de marquage a lieu directement au cours de la synthèse d'ADNc par incorporation d'un nucléotide couplé à un fluorochrome. Le fluorochrome utilisé est la cyanine 3 (Cy3) car cette molécule fluorescente possède un haut niveau d'émission photonique sous forme d'un pic étroit à 532 nm, et assure une plus grande résistance à la décoloration que la cyanine 5 (van Hal *et al*., 2000).

Méthode

- ***RT et marquage des ADNc***

Les échantillons d'étude sont préparés en mélangeant 25 µg d'ARN total microbien avec les ARNm des cibles de contrôle *Arabidopsis thaliana* (SpotReport® Oligo Array Validation System, Stratagen) en quantité connue.

Quantités de cibles de contrôle ajoutées pour l'ensemble des échantillons

Cibles commerciales	Annotation (GenBank database accession)	Quantités
ARNm *Cab*	Photosystem I chlorophyll a/b-binding protein (X56062)	0,1 ng
ARNm *RCA*	RUBISCO activase (X14212)	0,2 ng
ARNm *rbcL*	Ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (U91966)	0,5 ng
ARNm *XCP2*	Papain-type cysteine endopeptidases (AF191028)	0,8 ng
ARNm *RCP1*	Root cap 1 (AF168390)	1,0 ng
ARNm *NAC1*	NAC1 (AF198054)	1,3 ng

La réaction de transcription inverse et le marquage des ADNc sont réalisés simultanément avec le kit *CyScribe First-Strand cDNA Labelling* (Amersham Biosciences). Les échantillons sont d'abord mélangés à 1 µl d'une solution d'amorces aléatoires de 9 mers et à 1 µl d'une solution d'oligo-dT, puis le volume final est ajusté à 11 µl avec de l'eau-DEPC. Les solutions d'amorces utilisées sont fournies avec le kit de marquage. Le mélange obtenu est ensuite incubé 5 min à 70 °C, puis laisser 10 min à température ambiante pour permettre l'hybridation des amorces sur les ARN. La réaction de transcription est ensuite réalisée en ajoutant à la solution précédente :

- ✓ 4 µl de tampon *CyScript*™ 5 X (pH 8,3)
- ✓ 2 µl de DTT à 0,1 M
- ✓ 1 µl de dCTP nucléotide mix
- ✓ 1 µl de Cy3-dCTP
- ✓ 1 µl d'enzyme *CyScript*™ *Reverse Transcriptase* (100 U/µl).

Le mélange est incubé 1 h 30 à 42 °C dans un thermocycler (GeneAmp PCR System 9700 ; Perkin-Elmer Applied Biosystems). Une fois l'ADNc synthétisé, l'ARN matrice est hydrolysé par traitement alcalin, en ajoutant 2,5 µl de NaOH 2 M puis en incubant le tout 15 min à 37 °C. Le pH est finalement rétabli à 7,4 par ajout de 10 µl de HEPES 2 M (pH 6,8) (Sigma-Aldrich).

- ***Purification et concentration des cibles marquées***

Les cyanines qui n'ont pas été incorporées sont éliminées par passage sur colonnes GFX (CyScribe GFX Purification kit ; Amersham Biosciences).

Protocole de purification des ADNc marqués sur colonnes GFX (Amersham Biosciences)

- Déposer 500 µl de *Capture buffer* (tampon de fixation) et la totalité de l'échantillon d'ADNc marqué sur une colonne GFX. Mélanger doucement par pipetage, puis microcentrifuger 30 s à 13800 *g* ;
- Eliminer l'éluat ;
- **Laver la colonne** en ajoutant 600 µl de *Wash buffer* (tampon de lavage). Microcentrifuger 30 s à 13800 *g*, puis éliminer l'éluat ;
- Procéder à deux autres lavages dans les mêmes conditions ;
- Microcentrifuger de nouveau 10 s à 13800 *g* pour éliminer le tampon résiduel, puis transférer la colonne sur un tube propre de 1,5 ml pour **éluer les ADNc purifiés** ;
- Ajouter 60 µl d'*Elution buffer* (tampon d'élution) préchauffé à 65 °C. Laisser 5 min à température ambiante, puis centrifuger 1 min à 13800 *g* ;
- Repasser les 60 µl élués sur la colonne, puis centrifuger de nouveau 1 min à 13800 *g*.

Une fois purifiées, les cibles sont concentrées dans une colonne Microcon YM-30 (Millipore) (3 min à 13800 *g*). La colonne est ensuite retournée et transférée sur un nouveau tube, puis centrifugée 1 min à 13800 *g* pour récupérer les ADNc marqués. Ceux-ci sont alors vivement colorés en rose-violet. Le volume final est ajusté à 10 µl avec le tampon d'élution.

Hybridation et lavages de la puce

Pré-hybridation

L'étape de pré-hybridation permet de réduire l'adsorption non spécifique des cibles fluorescentes sur les lames. Elle est réalisée juste avant l'hybridation.
Cinq microlitres d'une solution d'ADN de sperme de hareng à 10 mg/ml (Promega) sont d'abord dénaturés à 95 °C pendant 2 min, puis mélangés à 30 µL de tampon d'hybridation (DIGeasy hybridization buffer ; Roche Diagnostics). Entre-temps, une lame de *microarray* (UltraGAPS Coated Slides ; Corning) est placée dans une chambre d'hybridation (Corning), une lamelle (premium printed cover glass LifterSlip, 22 x 40 mm ; Erie Scientific Company) est déposée à l'emplacement des spots et 20 µl d'eau sont ajoutés dans les puits de chaque côté de la chambre. Le mélange d'ADN de sperme de hareng est ensuite déposé sur la zone d'hybridation par capillarité à l'aide d'une pipette. La chambre d'hybridation est fermée bien hermétiquement et déposée dans un bain-marie à 60 °C durant 1 h.
Une fois cette étape de pré-hybridation terminée, la lame est retirée de la chambre d'hybridation et agitée dans un tube de 50 ml contenant une solution de SSC à 0,1 X, jusqu'à ce que la lamelle se décolle et tombe au fond du tube. La lame est ensuite séchée par centrifugation 3 min à 150 *g*, puis replacée dans une chambre d'hybridation.

Hybridation

Les cibles marquées (préalablement re-suspendues dans un volume final de 10 µl) sont d'abord mélangées à 5 µl d'ADN de sperme de hareng, puis dénaturées 2 min à 95 °C pour éliminer les structures secondaires. Le mélange est rapidement refroidi sur de la glace, puis 20 µl de tampon d'hybridation y sont ajoutés. Une lamelle est déposée sur la zone d'hybridation et le mélange est déposé par capillarité à l'aide d'une pipette. La phase d'hybridation est réalisée dans une chambre d'hybridation, placée dans un bain-marie à 60 °C durant toute une nuit (≈ 18 h). L'hybridation des cibles sur les sondes se fait par complémentarité de séquences.

Lavages

Une fois l'hybridation terminée, la lame est plongée dans différentes solutions de lavage de stringence croissante. Cette étape permet d'éliminer les sondes non hybridées et diverses hybridations aspécifiques.
La lame est d'abord agitée dans le bain n°1 [SSC 2 X, SDS 0,1 %] jusqu'à décollement de la lamelle, puis lavée successivement dans le bain n°2 [SSC 2 X, SDS 0,1 %] 5 min à 55 °C, le bain n°3 [SSC 1 X] 4 min à température ambiante et le bain n°4 [SSC 0,2 X] 4 min à température ambiante. La lame est finalement séchée par centrifugation à 150 *g* durant 3 min. Elle est ensuite rangée dans une boîte en plastique à l'abri des poussières, de la lumière et de l'humidité, puis scannée dans la journée.

Dosage des métabolites par HPLC

Principe

Divers métabolites (sucres, acides organiques et L-méthionine) ont été dosés par chromatographie en phase liquide sous haute pression (HPLC). La technique est basée sur le partage des composés entre la phase mobile (solution dans laquelle ils sont élués) et la phase stationnaire (colonne dotée d'une capacité de rétention plus au moins importante). Les composés sont identifiés suivant leur temps de rétention.

Dispositif instrumental

Les sucres et acides organiques ont été analysés sur une colonne échangeuse de cations (Aminex HPX-87H ; Bio-Rad). La ligne est équipée d'une pompe (Waters 510) et d'un injecteur automatique réfrigéré (Waters 717). Les composés sont identifiés à l'aide d'un réfractomètre différentiel (Waters 410) et d'un détecteur UV (Waters 486).
L'acide aminé a été analysé sur une colonne en phase inverse (Symmetry C18 ; Waters). La ligne est équipée d'une pompe multi-solvants (Waters 600) associée à un contrôleur de gradient, et d'un injecteur automatique réfrigéré (Waters 717). La détection de la L-méthionine est réalisée à l'aide d'un détecteur UV (Waters 486).

Méthode

- ***Traitement des échantillons***

Les échantillons (conservés à –20 °C après prélèvement) sont décongelés à 4 °C, centrifugés 15 min à 2000 *g* (4 °C), puis filtrés à l'aide d'un filtre en polyethersulfone (PES) d'une porosité de 0,22 µm (PES ministart® ; Dutscher). Cette opération permet d'obtenir un échantillon exempt de toute particule insoluble susceptible de gêner l'analyse. Avant l'analyse, les filtrats sont, si nécessaire, dilués avec de l'eau MilliQ®.

- ***Dosage des sucres et des acides organiques***

Le volume d'échantillon injecté est de 20 µl et les analyses sont réalisées à 65 °C durant 28 min. La phase mobile est constituée d'acide sulfurique H_2SO_4 à 0,01 N et dispensée à un débit de 0,6 ml/min. Dans ces conditions, la colonne Aminex HPX-87H (300 mm de longueur, 7,8 mm de diamètre) permet de séparer différents sucres (lactose, glucose et galactose) et divers acides organiques (lactate, α-céto γ-méthylthiobutyrate (KMTBA) et α-hydroxy γ-méthylthiobutyrate (HMTBA)). La détection des sucres est réalisée grâce au réfractomètre différentiel Waters 410. L'identification des acides se fait à l'aide du détecteur UV Waters 486, dont la longueur d'onde est ajustée à 210 nm.

- ***Dosage de la L-méthionine***

Le volume d'échantillon injecté est de 5 µl et la colonne à phase inverse Symmetry C18 (taille des particules 3,5 µm, taille des pores 100 Å, longueur 100 mm, diamètre 4,6 mm) est thermostatée à 35 °C. La phase mobile est un mélange d'eau (solvant A) et d'acétonitrile (solvant B). La pompe multi-solvants Waters 600, réglées à un débit de 0,6 ml/min, délivre le gradient d'élution suivant :

Temps (min)	% A	% B
0,0	100	0
2,5	100	0
3,0	90	10
10,0	60	40
14,0	100	0
24,0	100	0

La L-méthionine est détectée à 210 nm (Waters 486).

Analyse des composés soufrés volatils par GC-MS

Principe

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

Dispositif instrumental

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

Méthode

- ***Traitement des échantillons***

Cette analyse a été conduite sur des échantillons issus de cultures en milieu synthétique (milieu fromager **J1**). Les échantillons (stockés à –80 °C après prélèvement) sont rapidement décongelés à 4 °C (≈ 45 min) puis, après agitation, un volume de 5 ml est prélevé et introduit dans un vial de 10 ml sans ajout de NaCl (milieu naturellement salé à 1 %). Les échantillons sont ensuite placés dans un bloc chauffant thermostaté dont la température est fixée à 4 °C (durant le temps nécessaire pour atteindre l'équilibre).

- ***Extraction des composés volatils***

La première étape de l'extraction consiste en un équilibre de partage entre la phase solide (la fibre) et la phase liquide (l'échantillon). On a estimé que le temps nécessaire pour atteindre cet équilibre était de 1 h à 4 °C pour les composés soufrés volatils. Les échantillons sont ensuite soumis à un préchauffage de 2 min à 40 °C, sous agitation magnétique (250 rpm), afin d'améliorer la répétabilité et l'efficacité de l'extraction. La fibre est ensuite déployée dans l'espace de tête ou « headspace » du vial. L'ensemble est maintenu à une température constante de 40 °C pendant les 40 min d'extraction, et sous agitation magnétique (250 rpm). Une fois les composés extraits, la fibre est directement introduite dans le dispositif d'injection split/splitless (Varian 1177) du chromatographe. La deuxième étape de l'extraction consiste alors à désorber thermiquement les composés de la fibre et à les entraîner vers la colonne. Le mode SPLITLESS est maintenu à 250 °C pendant 1 min, afin de permettre à la totalité des composés d'être entraînée dans la colonne.

- ***Séparation des composés***

Les composés injectés en tête de colonne sont séparés par chromatographie en phase gazeuse. Ils sont élués suivant un gradient de température en fonction de leur volatilité, et identifiés en sortie de colonne. La colonne capillaire non polaire HP-5MS, placée dans un four

thermostaté, constitue la phase stationnaire. Le gaz vecteur, l'hélium, circulant avec un débit fixé à 1,2 ml/min, constitue la phase mobile.

Programme du four

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

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

- ***Identification des composés***

Le principe de fonctionnement du spectromètre de masse (MS) est basé sur la séparation des ions en fonction du rapport de la masse à la charge de leurs ions (m/z). Le MS est constitué de plusieurs parties (sources, analyseurs et détecteur) permettant de réaliser les étapes suivantes :

L'ionisation. Les molécules séparées sont dirigées vers une chambre d'ionisation où un flux d'électrons de forte énergie les fragmente en ions. La molécule est ionisée suivant la réaction : $M + e^- \rightarrow 2\ e^- + M^+$. L'ion monochargé 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 sa 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 quadrupôle soumis à une tension qui affecte la trajectoire des ions qui circulent au centre. Les ions stables arrivent au détecteur. En faisant varier le potentiel, il est possible d'obtenir un spectre de masse.

La détection. L'ion sortant de l'analyseur pénètre dans un photomultiplicateur d'électron. C'est une plaque métallique qui émet des électrons secondaires lors d'un choc avec des ions. Ces électrons sont multipliés et permettent l'élaboration d'un signal électrique d'intensité proportionnelle à la quantité d'ions reçus. L'ensemble des signaux émis par les ions permet d'obtenir un spectre de masse caractéristique de la molécule. Lors de la caractérisation spectrale des composés, le spectromètre de masse fonctionne en mode SCAN (2 scans/s) ce qui permet d'analyser tous les ions de rapport masse/charge compris entre 30 et 400 uma.

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

Remarque. A l'issue de l'analyse, les résultats sont exprimés en aire de pics. Une valeur correspond à la moyenne arithmétique de trois répétitions indépendantes. Un « blanc » (eau MilliQ®) est analysé dans les mêmes conditions après chaque série d'échantillon.

Mesure physique de la couleur de surface des fromages

Principe

Utilisation d'une méthode physique pour déterminer la couleur de surface des fromages modèles, afin de s'affranchir des biais liés aux différences de perception et d'interprétation de la couleur de chaque individu.

Dispositif instrumental

Mesure de la couleur à l'aide d'un spectrocolorimètre (CM-2002 ; Minolta) qui imite le mécanisme psychosensoriel de la perception humaine.
Cinq paramètres sont déterminés (**Figures 18** et **19**) :

- ✓ la **luminance L*** qui code du **noir** vers le **blanc** et du **brillant** au **mât** ;
- ✓ la composante chromatique **a*** qui code du **vert** (-a*) vers le **rouge** (+a*) ;
- ✓ la composante chromatique **b*** qui code du **bleu** (-b*) vers le **jaune** (+b*) ;
- ✓ la **saturation métrique C*** ;
- ✓ l'**angle de teinte métrique h°**.

Méthode

- ***Préparation des échantillons***

Les fromages destinés à l'analyse colorimétrique sont « démoulés » à l'aide d'une spatule, puis déposés sur les couvercles des cristallisoirs (les bords étant suffisamment bas pour ne pas gêner le bon positionnement de l'appareil). Pour chaque fromage, afin de s'affranchir d'une éventuelle hétérogénéité de couleur de surface, cinq points distincts sont analysés. Avant chaque mesure, une lamelle en verre est apposée à la surface du fromage pour éviter le contact direct avec l'appareil et garantir la propreté de la cellule de mesure. L'étalonnage du spectrocolorimètre se fait à l'aide de deux capsules (une noire et une blanche) fournies avec l'appareil.

- ***Mesures et traitement des résultats***

Les mesures au spectrocolorimètre permettent d'intégrer, à la fois le spectre de la source de lumière, et celui de la couleur de surface des fromages. Ce dernier est filtré de sorte que les spectres du rouge, du jaune et du vert soient extraits en trois coordonnées, comme ils le sont par l'œil humain. Les paramètres **L***, **a*** et **b*** définissent alors un espace à trois dimensions, simple et uniforme de repérage (**Figure 18**). Le système **L*C*h°** découle directement du précédent (**Figure 19**). La saturation métrique **C*** (ou chroma) est calculée à partir des composantes a* et b* par la formule suivante :

$$C^* = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2}$$

→ plus C* est élevée, plus la couleur est intense (foncée).

L'angle de teinte **h°**, toujours associé à la saturation métrique, est également calculé à partir de la relation suivante :

$$h° = \tan^{-1}(b^*/a^*)$$

→ lorsque h° est proche de 90°, la couleur tend vers le jaune ; lorsque h° est proche de 0°, la couleur tend vers le rouge. Une teinte orangée répond à un angle h° compris entre 65 et 80°.

Cinq mesures sont effectuées par fromage, ce qui permet d'obtenir une valeur moyenne pour chacun des paramètres étudiés.

Identifier le rôle et la contribution de chaque flore au sein de l'écosystème fromager a déjà fait l'objet de nombreux travaux, mais les modes d'investigation sont restés trop souvent descriptifs par manque d'outils moléculaires. L'objectif principal de cette étude était d'élucider les voies métaboliques impliquées dans la désacidification et la production de composés soufrés chez trois levures (*Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces marxianus* et *Yarrowia lipolytica*) et une bactérie de surface (*Brevibacterium linens*) par une approche transcriptomique. La conception et l'utilisation d'une puce à ADN dédiée à ces quatre micro-organismes ont permis de mettre en évidence une divergence des voies cataboliques de la L-méthionine entre les levures et la bactérie d'affinage. L'ensemble des résultats obtenus a montré que la transamination est l'étape essentielle du catabolisme de la L-méthionine chez les levures. Elle s'accompagne d'une accumulation transitoire de l'acide α-céto-γ-méthylthiobutyrique chez *Y. lipolytica*, et essentiellement de sa forme réduite, l'acide α-hydroxy-γ-méthylthiobutyrique, chez *K. marxianus* et *D. hansenii*. La dégradation de ces composés se traduit par une augmentation de la production de méthanethiol et des composés soufrés volatils qui en résultent. Une étude plus approfondie réalisée sur *Y. lipolytica* a montré que les gènes *ARO8* et *BAT2* jouent un rôle prépondérant dans l'étape de transamination de la L-méthionine chez cette levure. En revanche, chez la bactérie *B. linens*, l'enzyme clef du catabolisme de la L-méthionine est la L-méthionine γ-lyase. L'apport de L-méthionine dans le milieu de culture induit fortement l'expression du gène *mgl* et génère une large gamme de composés soufrés volatils. L'étude des voies de dégradation du lactose et du lactate chez les levures a également permis d'obtenir des informations sur la part fonctionnelle de chaque espèce au cours de l'affinage. Ainsi, il semblerait qu'en culture mixte, *K. marxianus* soit plus impliqué dans la consommation du lactose *via* l'induction des gènes *LAC12* et *LAC4*, *D. hansenii* dans le métabolisme du pyruvate puis le catabolisme du lactate en fin de culture, et *Y. lipolytica* dans la dégradation de la L-méthionine *via* l'induction des gènes *ARO8* et *BAT2*. De façon plus globale, l'ensemble de nos résultats permet de mettre en évidence la possibilité de complémentarités métaboliques entre les levures d'affinage.