



**HAL**  
open science

# Étude de *Brevibacterium aurantiacum*, une bactérie d'affinage de fromage : de son métabolisme du soufre à son interaction avec *Kluyveromyces lactis*

Marie-Pierre Forquin

► **To cite this version:**

Marie-Pierre Forquin. Étude de *Brevibacterium aurantiacum*, une bactérie d'affinage de fromage : de son métabolisme du soufre à son interaction avec *Kluyveromyces lactis*. Microbiologie et Parasitologie. AgroParisTech, 2010. Français. NNT : 2010AGPT0047 . pastel-00594332

**HAL Id: pastel-00594332**

**<https://pastel.hal.science/pastel-00594332>**

Submitted on 19 May 2011

**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.



## Doctorat ParisTech

# THÈSE

pour obtenir le grade de docteur délivré par

## L'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (AgroParisTech)

**Spécialité : MICROBIOLOGIE**

*présentée et soutenue publiquement par*

**Marie-Pierre FORQUIN**

Le 06 juillet 2010

### **Étude de *Brevibacterium aurantiacum*, une bactérie d'affinage de fromage : de son métabolisme du soufre à son interaction avec *Kluyveromyces lactis***

Directeur de thèse : **Pascal BONNARME**

Co-encadrement de la thèse : **Isabelle MARTIN-VERSTRAETE**

#### **Jury**

**Mme Marie-Joëlle VIROLLE**, DR, Institut de Génétique et Microbiologie, CNRS/Paris 11, Orsay  
**M. Pascal LOUBIÈRE**, DR, Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés, INRA, Toulouse  
**M. Eric GUEDON**, CR, Institut MICALIS, INRA, Jouy en Josas  
**Mme Isabelle MARTIN-VERSTRAETE**, Pr, Bactéries Anaérobies et Toxines, Institut Pasteur, Paris 7  
**M. Pascal BONNARME**, DR, GMPA, INRA, Thiverval-Grignon  
**M. Colin Tinsley**, Pr, Micalis, AgroParisTech, Thiverval-Grignon

Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Directeur de thèse  
Directeur de thèse  
Président

## *Remerciements*

Je souhaite tout d'abord remercier mes nombreux directeurs d'unité, Antoine Danchin pour m'avoir accueillie lors de ma première année de thèse au sein de l'unité GGB à l'Institut Pasteur, Georges Corrieu, Michèle Marin, et Isabelle Souchon directeurs successifs de l'unité GMPA à l'INRA de Versailles-Grignon.

Je voudrais remercier Marie-Joëlle Virolle et Pascal Loubière d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail de thèse, Colin Tinsley d'avoir accepté d'être le président de Jury et également à Eric Guedon pour son implication en tant qu'examineur dans ce Jury.

Un grand MERCI à Isabelle Martin-Verstraete et Pascal Bonnarne, « mes parents scientifiques ». J'ai eu la chance d'avoir une directrice **et** un directeur de thèse. Isabelle, Merci pour ta disponibilité sans faille, ta rigueur, et tes encouragements. Pascal, Merci pour ton enthousiasme, ta disponibilité et ta confiance tout au long de cette thèse. Vous m'avez tous les deux apporté un très bon équilibre qui m'a permis de passer ses trois années très sereinement.

Merci à Andrea Pimenta, pour m'avoir fait découvrir le monde merveilleux de la microbiologie. Un jour de juin 2004, tu as accepté une stagiaire de Licence qui cherchait désespérément une expérience dans le monde de la recherche, juste pour voir ce que c'était !! Et Merci de m'avoir reprise l'année suivante pour un stage de maîtrise. C'est sûrement grâce à toi que j'ai réussi à rentrer dans le master Microbio de P7. A travers toi, je remercie aussi l'université de Cergy-Pontoise et l'équipe ERMECe pour toute ma formation.

Merci à Françoise Rul et Eric Guedon (encore) d'avoir participé à mon comité de thèse. Merci pour nos discussions constructives lors de ces réunions qui m'ont vraiment permis d'avancer.

Mes remerciements vont également à toutes les filles de « feu » GGB, Evelyne, Anne-Marie, Evelyne, Emma, Olga, Marie-Françoise, Anne-Sophie, Undine, Agnieszka, Catherine et Sandra. Avec une pensée très particulière pour Gaëlle et Emmanuelle pour tous ces excellents moments passés ensemble (un petit café les filles ???). Quel dommage d'avoir dû vous quitter si rapidement.

Merci à la promo Pasteur microbiologie 2005, c'était une année terrible !!!

Merci à « mon » équipe puce, Caroline Proux de PF2 pour mon « instruction puce », à Valentin Loux, Mr Design des oligos, Julie Aubert, Mme Stat, merci pour votre disponibilité et votre patience.

Merci à l'ensemble de l'équipe métabolome : Christophe Junot, Jean-François, Geoffrey, Ying, Ludo, Jérôme, et bien sur Aurélie. Merci pour ces journées

mémorables où l'Orbitrap fonctionnait très bien dans l'après midi et qu'il décidait de s'arrêter vers 22h quand tout le monde était parti ou encore lors qu'il y a eu une coupure d'électricité générale à Jussieu alors que Bob fonctionnait très bien. Ca a été un véritable plaisir de travailler avec vous.

Merci également à tous ceux que j'ai croisés au cours de cette thèse au GMPA, les nombreux stagiaires : Stéphanie, Tiphaine, Karine, Raquel, Anne-Laure, Rachel, Monseratte, Angélique, Romain, Jean-Jacques, Audrey, Stéphane et Romain, et à ceux que j'ai oubliés bien sûr. Merci à toute l'équipe 1 : Françoise (merci pour tes précieux conseils), Christophe, Tatiana (pour ton aide dans la 1ere partie de cette thèse) Sophie, Sandra, Alain, Pawinee et Soulaf (les trois thésards partis) Chrise, Jessie et Julie (les petites nouvelles). Merci aux autres : Les Isabelles, Fernanda, Stéphanie, Violaine, Catherine, Armelle, la baronne, Thibaut, Asma, Anne, Maud, Marie-Noëlle, David, Fred, Jérôme, David, Stéphanie, Marion, Jean-Marie, Sébastien, Steven, Cédric, Michel, Mariette, Bruno, Hervé, David, Inès, Clément, Aurélie, Florence et Valérie (nos secrétaires de choc). Vous avez fait la richesse de ces 2 années.

Un mot particulier pour Anne-So' (alors comment va ta toute petite fille ?) et à ma tata Roselyne. Merci pour votre accueil, votre bonne humeur, votre disponibilité et votre soutien tout au long de ces 2 dernières années de thèse.

Merci aux voisins de la génétique. Merci pour le prêt de la machine à café quand la nôtre est en panne, et de toutes ses petites choses qui nous manquent du côté GMPA.

Un grand Merci à l'équipe des bon moments du GMPA : Yohan (qui est parti vers d'autres aventures) ; ma petite Reinette; Perrine, Séverine, Yoann alias Koala (les thésards de Catherine); le quatuor inséparable : Aline, Julie (ma colocataire de bureau), Jérôme et Thomas. Merci pour votre soutien, vos conseils et votre bonne humeur pendant cette thèse et plus particulièrement pendant cette fin de rédaction, vous avez été toujours mon écoute, n'est-ce pas Jérôme ? Merci pour les petites discussions.

Je ne peux pas faire des remerciements sans parler d'Agnès mon « Alter-Ego levurien ». J'ai commencé par te martyriser dès le M2 lorsque tu t'es retrouvée dans le binôme voisin, 7 semaines de TP de folie !!! Merci pour tout, Cocotte, pour ta patience (je me souviendrai toujours de ton regard noir quand je dis une bêtise), pour ton écoute (c'est que je parle beaucoup moi), pour nos discussions pendant nos semaines « manip co-cultures » ou pendant nos virées en voiture lorsque l'on s'est baladé dans l'Île de France pour les manip. Que puis-je dire d'autre à part : Merci pour ton amitié et tu vas me manquer Cocotte.

Un petit mot aux non-scientifiques ou les hors-labo qui ont su me soutenir pendant toute cette thèse. Hélène, Maimou, Johanna, Auré, Anthony, Caro, Fro, Yannick, Lord, Antoine, Marion, Nico, Sarah, Julien, Claire, Sophie, Bubu, Julien, Erwan, Sandra, Zoé, Gauthier (oh un scientifique). Merci pour votre amitié qui me fait beaucoup de bien dans ces moments stressants.

Je vais terminer par ceux qui me soutiennent depuis des années et particulièrement pendant ces 3 années : Ma famille. Mes parents qui m'ont soutenue pendant toutes mes études, Ben, Elo, Lolo (ma correctrice d'orthographe, bien plus performante que le correcteur word), Benoît, et mes neveux et nièces préférés : Cléo, Solène et Arthur (dans l'ordre d'arrivée) ; Pépé et tous les autres. Merci.

Juste un mot très particulier pour mon Christophe, merci pour ces trois dernières années de vie commune. En thèse tous les deux, et on ne c'est même pas pouillé, bon d'accord, heureusement que l'on a pas écrit notre thèse en même temps. Ne t'inquiètes pas, on n'est pas obligé de se marier si je trouve un poste !!! Mille fois Merci.

MERCI à vous tous...



## *Liste des Publications*

### Publication dans des revues à comité de lecture

Forquin, M.P., A. Hebert, C. Proux, J. Aubert, S. Landaud, J. F, Heilier, C. Junot, P. Bonnarme, and I. Martin-Verstraete, **Global regulation in response to sulfur availability in the cheese-related bacterium, *Brevibacterium aurantiacum***, Submitted in BMC Genomics.

Forquin, M.P., H. Duvergey, C. Proux, V. Loux, J. Mounier, S. Landaud, J.Y. Coppee, J.F. Gibrat, P. Bonnarme, I. Martin-Verstraete, and T. Vallaey. 2009. **Identification of Brevibacteriaceae by Multilocus Sequence Typing and Comparative Genomic Hybridization Analyses**. Appl. Environ. Microbiol. 75 :6406-6409.

Hebert A., M.P. Forquin, A Roux, J. Aubert, J. F, Heilier, C. Junot, V. Loux, P. Bonnarme, J.M. Beckerich and S. Landaud. **Exploration of sulfur metabolism in the yeast *Kluyveromyces lactis***. To be Submitted.

### Communications orales

Forquin, M.P., A. Hebert, J. Aubert, S. Landaud, I. Martin-Verstraete, J.M. Beckerich and P. Bonnarme. **Interactions between *Brevibacterium aurantiacum* and *Kluyveromyces lactis* : study of two indispensable bacterium and yeast of cheese ripening ecosystem by biochemical and transcriptomic approaches**. In JMI 2010, May 5-7, Poitiers, France.

Hebert A., M.P. Forquin, A Roux, J. Aubert, C. Junot, S. Casaregola, S. Landaud, P. Bonnarme et J.M. Beckerich. ***Kluyveromyces Lactis* : une levure de l'écosystème fromage**. In JMI 2010, May 5-7, Poitiers, France

Forquin, M.P. and T. Vallaey. **Genomic island localisation of sulphur metabolism related genes in *Brevibacterium aurantiacum* ATCC 9174 could be responsible for strains specific aromatic potentialities**. In Workshop Arthrobacter 2008, INRA, Jouy-en-Josas, 24-27 June 2008. (Oral communication)

Forquin, M.P., H. Duvergey, C. Proux, V. Loux, J. Mounier, S. Landaud, J.Y. Coppee, J.F. Gibrat, P. Bonnarme, I. Martin-Verstraete, and T. Vallaey. **Genomic island localisation of sulphur metabolism related genes in *Brevibacterium aurantiacum* ATCC 9174 could be responsible for strains specific aromatic potentialities**. In Genomes 2008, Functional genomics of microorganisms, Institut Pasteur, Paris 8-11 April 2008. (Poster)

## *Liste des abréviations*

ABC : ATP Binding Cassette  
ADN : Acide DésoxyriboNuclétique  
ADNc : Acide DésoxyriboNuclétique complémentaire  
AHL : AcylHomoserine Lactone  
AI : AutoInducteur  
AI-2 : AutoInducteur 2  
APS : Adénosine 5' PhosphoSulfate  
ARN : Acide RiboNucléique  
ATP : Acide Tri Phosphate  
CBL : Cystathioninie  $\beta$ -Lyase  
CGL : Cystathioninie  $\gamma$ -Lyase  
CoA : Co-enzymeA  
CSVs : Composés Soufrés Volatils  
DMAPP : DiMéthylAllyl diPhosphate  
DMDS : DiSulfure de DiMéthyl  
DMS : Sulfure de Méthyl  
DMTS : TriSulfure de DiMéthyl  
GGPP : GéranylGéranyl PyroPhosphate  
IPP : Isoententenyl PyroPhosphate  
KMBA :  $\alpha$ -cétio- $\gamma$ -Méthylthiobutyrate  
MGL : Méthioninie  $\gamma$ -Lyase  
MTA : MéthylThioAdénosine  
MTAc : MéthylThioAcétate  
MTB : S-MéthylThioButyrate  
MTiB : S-MéthylThioisoButyrate  
MTiV : S-MéthylThioisoValérate  
MTL : MéthaneThiol  
MTP : S-MéthylThioPropionate  
MTR : MéthylThioRibose  
MTR-P : MéthylThioRibose Phosphate  
OAH : O-AcétylHomoserine  
OAS : O-AcétylSerine  
PLP : Pyridoxal Phosphate  
SAH : S-AdénosylHomocystéine  
SAM : S-AdénosylMéthionine  
SRH : S-RibosylHomoserine

## *Liste des figures et des tableaux*

### **Figures**

- Figure 1.** Les différentes étapes de fabrication d'un fromage à pâte molle.
- Figure 2.** Evolution de la forme de *Brevibacterium linens* au cours de la croissance.
- Figure 3.** Les pigments de type caroténoïde de *Brevibacterium aurantiacum* ATCC 9175.
- Figure 4.** Les différentes voies de biosynthèse des composés soufrés volatils produits par les *Brevibacteriaceae*.
- Figure 5.** Assimilation et réduction du sulfate chez *E. coli*, *B. subtilis* et *C. glutamicum*.
- Figure 6.** Voies de biosynthèse de la cystéine.
- Figure 7.** Biosynthèse de la méthionine.
- Figure 8.** Recyclage de la méthionine.
- Figure 9.** Dégradation de la méthionine en méthanethiol.
- Figure 10.** Alignement des méthionine  $\gamma$ -lyases de *Citrobacter freundii* (CF), *Pseudomonas putida* (PP), *Trichomonas vaginalis* (TV), *Arabidopsis thaliana* (AT).
- Figure 11.** Régulation de la synthèse de la cystéine par CymR chez *B. subtilis*.
- Figure 12.** Le régulon McbR chez *C. glutamicum*.
- Figure 13.** Régulation du métabolisme du soufre chez *C. glutamicum*.
- Figure 14.** Mécanisme du « Quorum sensing ».
- Figure 15.** Production, régulation, et mécanisme de résistance de la nisine.
- Figure 16.** Croissance de *B. aurantiacum* ATCC 9175 et de *K. lactis* 3550 dans le milieu MCD.
- Figure 18.** Concentration des acides aminés en MCD.
- Figure 19.** Activation du cycle de krebs de *B. aurantiacum* en présence de *K. lactis*.
- Figure 20.** Activation de la voie de biosynthèse de l'arginine de *B. aurantiacum* en présence de *K. lactis*.
- Figure 21.** Activation de la voie de biosynthèse des pigments de *B. aurantiacum* en présence de *K. lactis*.
- Figure 22.** Relations phylogénétiques en différentes souches du genre *Brevibacterium*.
- Figure 23.** Productions spécifiques de composés soufrés volatils par 5 souches appartenants au genre *Brevibacterium*.
- Figure 24.** Alignement des méthionine  $\gamma$ -lyases de *Citrobacter freundii* (CF), *Pseudomonas putida* (PP), *Trichomonas vaginalis* (TV), *Arabidopsis thaliana* (AT) incluant les protéines BL613, BL541 et BL929 de la souche de *B. aurantiacum* ATCC 9174.
- Figure 25.** Métabolisme du soufre chez *B. aurantiacum*.
- Figure 26.** Interaction entre *B. aurantiacum* et *K. lactis*.

## Tableaux

**Tableau 1.** Propriétés biochimiques des protéinases extracellulaires des *Brevibacteriaceae*

**Tableau 2.** Les différents agents antimicrobiens des *Brevibacteriaceae*.

**Tableau 3.** Les différents composés soufrés volatils produits par les *Brevibacteriaceae*.

**Tableau 4.** Interactions microbiennes inter-espèces observées dans différents produits laitiers.

**Tableau 5.** Molécule du « quorum sensing » chez les bactéries à Gram-négatives.

**Tableau 6** Molécule du « quorum sensing » chez les bactéries à Gram-positives.

**Tableau 7.** Groupes métaboliques des gènes différentiellement exprimés chez *B.aurantiacum* à 30 h et 58 h en co-culture avec *K. lactis* par rapport à la mono-culture.

**Tableau 8.** Gènes discutés dans le ce travail et différentiellement exprimés en co-culture et mono-culture à 58 h.

# **Sommaire**



<b>Introduction générale</b> .....	<b>15</b>
<b>Chapitre I- Revue bibliographique</b> .....	<b>19</b>
<b>I- Brevibacterium : Une bactérie d'affinage de fromage</b> .....	<b>19</b>
<b>A- Le Fromage : un écosystème complexe</b> .....	<b>19</b>
A-1- La Fabrication des fromages.....	19
A-2- Les microorganismes du fromage.....	20
<i>Les bactéries lactiques</i> .....	20
<i>Les levures d'affinage</i> .....	21
<i>Les bactéries d'affinage</i> .....	23
<b>B- Brevibacterium : Une bactérie du fromage</b> .....	<b>24</b>
B-1- Taxonomie et généralité.....	25
B-2- <i>Brevibacterium</i> et le fromage.....	26
<i>Activité protéolytique, lipolytique et estérasique</i> .....	26
<i>Production de substance antimicrobienne</i> .....	28
<i>Pigmentation</i> .....	29
<i>Production de composés volatils</i> .....	31
<b>II- Métabolisme du soufre</b> .....	<b>35</b>
<b>A- Assimilation du sulfate et des sulfonates</b> .....	<b>35</b>
A-1- Transport du sulfate et du thiosulfate .....	35
A-2- Réduction du sulfate .....	36
A-3- Entrée et assimilation des sulfonates .....	37
<b>B- Métabolisme de la cystéine</b> .....	<b>40</b>
B-1- La voie de thiolation .....	40
B-2- La voie de transsulfuration inverse .....	42
<i>La cystathionine <math>\beta</math>-synthase (CBS)</i> .....	43
<i>La cystathionine <math>\gamma</math>-lyase (CGL)</i> .....	43
B-3- Transport de la cystine et de la cystéine .....	44
B-4- Le mycothiol .....	46
<b>C- Métabolisme de la méthionine</b> .....	<b>46</b>
C-1- Biosynthèse de la méthionine .....	47
<i>Synthèse de l'acyl-homosérine</i> .....	47
<i>La voie de transsulfuration</i> .....	48
<i>La voie de thiolation</i> .....	49
<i>Méthylation de l'homocystéine</i> .....	49
C-2- Biosynthèse, recyclage et dégradation de la S- adénylméthionine .....	50
<i>Recyclage de la S- adénylméthionine via la S- adénylhomocystéine</i> .....	50
<i>Recyclage de la SAM via la méthylthioadénosine</i> .....	52
C-3- Dégradation de la méthionine .....	53
<i>La voie de la méthionine <math>\gamma</math>-lyase</i> .....	53
<i>La voie de production du méthane thiol en deux étapes</i> .....	56
C-4- Transport de la méthionine .....	56
<b>D- Régulation du métabolisme du soufre par des régulateurs transcriptionnels</b> .....	<b>58</b>
D-1 Les régulateurs de la famille LysR .....	58
<i>Le régulateur CysL de B. subtilis</i> .....	58
<i>Le régulateur YtlI de B. subtilis</i> .....	59
<i>Le régulateur CmbR/FhuR de L. lactis</i> .....	59
<i>Les régulateurs MtaR/MetR et CysR des Streptocoques</i> .....	60

D-2- Le régulateur CymR de <i>B. subtilis</i> et <i>S. aureus</i> .....	61
D-3- Le réseau de régulation contrôlé par McbR chez <i>Corynebacterium glutamicum</i> ....	64
<b>III- La communication des micro-organismes .....</b>	<b>69</b>
<b>A- Les différents types d'interaction : exemples des produits laitiers.....</b>	<b>69</b>
A-1- Amensalisme.....	69
<i>Les acides carboxyliques</i> .....	70
<i>Le peroxyde d'hydrogène</i> .....	71
A-2- Compétition .....	71
B-3-Parasitisme .....	72
A-4- Commensalisme.....	73
A-5-Mutualisme .....	73
<b>B- Communication entre les micro-organismes via une signalétique moléculaire : le « quorum sensing » .....</b>	<b>74</b>
B-1- Le « Quorum Sensing » chez les bactéries .....	74
B-2- Le « Quorum Sensing » chez les levures .....	78
B-3- Les communications bactéries-levures.....	79
<b>Chapitre II-Résultats et discussions .....</b>	<b>82</b>
<b>A- Identification des souches de <i>Brevibacteriaceae</i> par « MultiLocus Sequence Typing » et Comparative genomic Hybridization » .....</b>	<b>82</b>
A-1 -Contextes et objectifs de l'étude.....	82
A-2 Résumé.....	83
A-3 Conclusions.....	92
<b>B- Etude de la régulation du métabolisme du soufre à une réponse une disponibilité en soufre chez <i>B.aurantiacum</i>.....</b>	<b>94</b>
B-1-Contexte et objectifs de l'étude.....	94
B-2-Résumé.....	95
B-3-Conclusions.....	132
<b>C- Etude de l'interaction entre deux micro-organismes du fromage, <i>B.aurantiacum</i> et <i>K. lactis</i>, par des approches biochimiques et transcriptomiques. ....</b>	<b>133</b>
C-1-Objectif de l'étude.....	133
C-2-Résumé.....	134
C-3-Introduction.....	135
C-5-Résultats et Discussion .....	136
<i>Croissances de B. aurantiacum et K. lactis.</i> ....	136
<i>Les évolutions des substrats dans les différentes cultures.</i> .....	138
<i>Limiter au maximum les cross-hybridations inter-espèces.</i> .....	139
<i>Analyse du transcriptome.</i> .....	140
C-3-Conclusion .....	149
<b>Chapitre III- Discussion générale et perspectives .....</b>	<b>153</b>
<b>Références.....</b>	<b>183</b>

# **Introduction générale**



## *Introduction générale*

La France est un pays de terroir dont les différents produits font sa fierté. Parmi ces produits on trouve les produits fermentés comme la charcuterie ou le vin mais aussi le fromage. Chaque région possède sa spécialité fromagère, le Calinzanincu en Corse, le Beaufort en Savoie, le Cantal comme son nom l'indique dans le Cantal, le Camembert en Normandie et le Munster Ermitage à Bulgnéville (près de Vittel). On pourrait en citer plus de 1000 car c'est le nombre des différentes spécialités fromagères françaises. Le fromage est une spécialité dont la fabrication requiert un savoir-faire indispensable puisque c'est un écosystème complexe où différents paramètres physico-chimiques mais aussi microscopiques évoluent. De plus, les micro-organismes présents au cours du processus d'affinage modifient constamment ces paramètres et participent ainsi à la flaveur des fromages. La dégradation des acides aminés et plus particulièrement des acides aminés soufrés (la cystéine et la méthionine) contribue à la production des arômes des fromages par la formation de composés soufrés volatils (CSVs).

Le soufre est un élément structural essentiel à tous les organismes. Il représente entre 0,5 et 1% du poids sec cellulaire chez les bactéries. On trouve des atomes de soufre dans les acides aminés soufrés mais aussi dans des vitamines telles que la thiamine et la biotine. Les acides aminés soufrés jouent un rôle central dans la cellule. La cystéine participe à la biogenèse des centres Fer-Soufre, mais aussi au maintien de la structure des protéines, par la formation de ponts disulfures. La méthionine est quand à elle impliquée dans des processus cellulaires comme le démarrage de la traduction des ARNm, la méthylation via la *S*-adenosylméthionine, la synthèse des polyamines ou encore la production d'une molécule de « quorum sensing », l'AI-2. Des thiols contenant une molécule de cystéine tels que le glutathion, le mycothiol ou le bacillithiol sont aussi impliqués dans le maintien de l'homéostasie du redox intracellulaire.

Depuis 15 ans, de nombreux micro-organismes ont été séquencés dans le cadre de projets souvent réservés aux bactéries modèles et/ou pathogènes, ce qui permet d'avoir de nouvelles formes d'approches telles que la génomique ou la transcriptomique. Cependant, en 1999, un projet de séquençage sur une bactérie d'intérêt technologique issue de l'écosystème fromager, *Brevibacterium aurantiacum* (anciennement appelée *Brevibacterium linens*) a été entrepris.

Malgré cette volonté prometteuse, le séquençage du génome de cette bactérie n'a toujours pas été terminé et son génome assemblé. Toutefois, ce séquençage a permis d'initier ce travail en mettant à disposition de la communauté scientifique le génome d'une souche technologique et fromagère, *B. aurantiacum* ATCC 9174.

C'est dans ce contexte que le projet ANR ECOMET (ECOystème fromager : étude fonctionnelle du METabolisme du soufre) a démarré. Trois grands axes ont été étudiés dans ce projet : i) une étude de la production de composés soufrés volatils par voie biotechnologique (Thèse d'Alain Sourabié) ; ii) une étude du métabolisme du soufre chez *Yarrowia lipolytica* et *Kluyveromyces lactis*, deux levures d'affinage (Thèse d'Agnès Hebert) ; iii) une étude sur bactérie d'affinage *B. aurantiacum*, son métabolisme du soufre et son interaction avec la levure *K. lactis*. Le troisième axe de ce projet est l'objet de ce travail de thèse.

Ce manuscrit est constitué d'une revue bibliographique, d'une partie présentant les résultats obtenus lors de ce travail et d'une discussion générale et de perspectives. La revue bibliographique est composée de trois parties. La première présente un état des connaissances sur l'impact du genre *Brevibacterium* dans les fromages, puis la deuxième partie porte sur les connaissances sur le métabolisme du soufre principalement chez les bactéries. Et enfin, dans le dernier paragraphe, nous décrivons les différentes interactions qui existent dans le monde microbien.

Les résultats sont présentés sous forme de trois chapitres. Le premier chapitre s'intéresse à la mise au point de technique pour identifier et typer les *Brevibacteriaceae*. Dans le deuxième chapitre, nous avons réalisé une étude globale sur la régulation en réponse à la disponibilité en soufre chez *B. aurantiacum* ATCC 9175. Enfin dans le troisième chapitre, nous avons étudié porte sur l'interaction entre la bactérie d'affinage *B. aurantiacum* et la levure d'affinage *K. lactis* par une approche transcriptomique.

Finalement, une conclusion générale permet de récapituler les principaux résultats de ce travail et de les analyser de façon plus globale. Le manuscrit se conclut en présentant les principales perspectives envisagées pour la poursuite de cette thématique de recherche.

# **Chapitre I- Revue Bibliographique**



## *Chapitre I- Revue bibliographique*

### **I- *Brevibacterium* : Une bactérie d'affinage de fromage**

#### **A- Le Fromage : un écosystème complexe**

Les fromages peuvent être classés en fonction des types de pâtes : pâtes fraîches (Petit Suisse, Demi-Sel), pâtes pressées (Tomme de Savoie, St-Paulin, Reblochon), pâtes fermes non cuites (Cantal), pâtes fermes cuites (Comté, Emmental) et enfin pâtes molles. Ces derniers peuvent se diviser en deux sous-familles : les pâtes molles à croûte fleurie telles que Brie, Camembert, Coulommiers et les pâtes molles à croûte lavée ou croûte morgée comme l'Époisse, le Livarot et le Munster. Dans la suite du manuscrit, nous avons choisi de nous intéresser uniquement au cas des fromages à pâtes molles.

#### **A-1- La Fabrication des fromages**

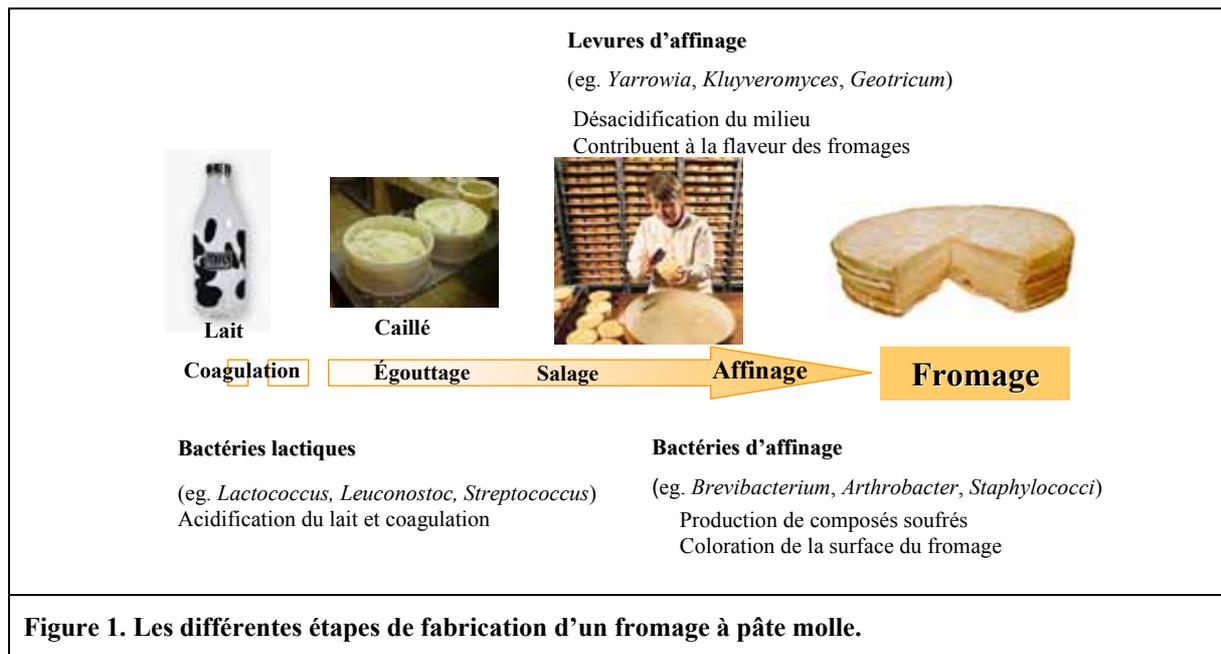
La transformation du lait en fromage comporte quatre étapes principales (Figure 1).

La coagulation du lait qui correspond à des modifications physico-chimiques des micelles de caséines sous l'action d'enzymes protéolytiques et (ou) de l'acide lactique qui entraînent la formation du gel ou caillé.

L'égouttage du caillé qui assure une déshydratation partielle du gel, obtenue par séparation d'une partie du lactosérum.

Le salage qui est réalisé par l'incorporation de sel par dépôt en surface ou dans la masse ou par immersion dans la saumure. Cette étape complète la phase précédente et agit directement sur le processus d'affinage.

L'affinage qui se caractérise par des transformations biochimiques des constituants du caillé, essentiellement sous l'action d'enzymes microbiennes. Cette étape participe au développement des caractéristiques d'un fromage telles que la couleur ou ses propriétés organoleptiques.



## A-2- Les microorganismes du fromage

### Les bactéries lactiques

La première flore à intervenir dans la fabrication du fromage est la flore lactique. Les bactéries lactiques sont initialement présentes dans le lait ou sont inoculées volontairement à partir de ferments. Elles appartiennent au genre *Lactococcus*, *Leuconostoc* ou *Streptococcus*. Cette flore contribue activement à la fabrication des fromages en participant à l'acidification du lait et à la dégradation des protéines grâce à son potentiel protéolytique. Pour les fromages à pâte molle, des études ont été principalement menées sur les fromages à croûte fleurie de type Camembert (Richard et Gratadoux, 1984) mais aussi dans des fromages à croûte lavée de type Livarot (Mounier *et al.*, 2009). L'espèce majoritairement présente dans ces fromages est *L. lactis*. Cependant, il existe différents biovars qui ne se distinguent pas d'un point de vue phénotypique : *L. lactis ssp lactis*, *L. lactis ssp cremoris* et enfin *L. lactis ssp diacetylactis*. (Lange *et al.*, 1994 ; Corroler *et al.*, 1998). Ici, nous nous intéresserons uniquement à l'espèce *L. lactis*. Cette bactérie est une bactérie à Gram positive, anaérobie-aérobie-facultative, mésophile, non-mobile, non sporulante, ne produisant pas de catalase, et de métabolisme homofermentaire. Le rôle majeur de ces bactéries dans la fabrication du fromage est l'acidification conduisant à la coagulation du lait. *L. lactis* consomme le lactose présent dans le lait, et le convertit en galactose et glucose. Le glucose produit du pyruvate via la glycolyse puis du lactate grâce à la lactate déshydrogénase. Cette voie est appelée la voie homofermentaire. La conversion du lactose en lactate entraîne une baisse du pH d'environ 2

unités. Cette acidification constitue aussi une barrière pour le développement des flores acido-sensibles dont certaines espèces comme *Listeria monocytogenes* ou *E. coli* sont potentiellement pathogènes. Le deuxième intérêt fonctionnel des bactéries lactiques concerne la protéolyse des protéines du lait. Elles correspondent majoritairement à des caséines. En effet, *L. lactis* possède un système protéolytique complexe qui lui assure ses besoins en acides aminés libres. La cascade de réactions protéolytiques est initiée par la présence d'une protéase de paroi (PrtP) dont le gène est porté par un plasmide. Cette protéase hydrolyse la caséine du lait en oligopeptides qui sont ensuite pris en charge par différents transporteurs de peptides dont le principal est le système Opp. Les peptides sont alors dégradés en acides aminés libres par des peptidases intracellulaires (oligopeptidases, endopeptidases ou exopeptidases) (Corrieu et Luquet, 2008). Chez *L. lactis*, il existe un dernier phénomène qui joue très probablement un rôle dans l'affinage : la lyse cellulaire. En effet, cette lyse entraîne une libération du contenu enzymatique provoquant une accélération de la protéolyse ce qui aurait pour conséquence d'accélérer l'affinage. De plus, la libération d'acides aminés libres, précurseurs d'arômes, contribuerait à la saveur des fromages (Bourdat-Deschamps *et al.*, 2004).

### Les levures d'affinage

Les levures sont naturellement présentes dans le lait mais peuvent aussi êtreensemencées à partir de ferments. Leur croissance dépend de l'acidité, de la température, du taux de sel, mais aussi de la teneur en oxygène. On trouve différentes espèces dans les fromages à pâte molle. *Debaryomyces hansenii* est la plus abondante mais on retrouve aussi *Candida catenulata*, *C. kefyr*, *C. intermedia*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Cryptococcus albidus*, *Kluyveromyces lactis*, *K. marxianus*, des *Geotrichum* spp. et *Yarrowia lipolytica*. Des études portant sur la diversité des levures dans le Livarot, ont mis en évidence par exemple la dominance de *C. catenulata*, *C. intermedia*, *Geotrichum* spp. et *Y. lipolytica* (Mounier *et al.*, 2009). Les levures participent activement à l'ensemble des processus de maturation du fromage. En effet, l'un des rôles principaux des levures est la désacidification du caillé par la consommation du lactate et/ou la production d'ammoniac. Cette désacidification permettra ensuite le développement des bactéries d'affinage acido-sensibles. Les levures participent aussi à la protéolyse des protéines du lait (Suzzi *et al.*, 2001 ; Boutrou et Guéguen, 2005). Enfin, différentes études montrent aussi leur implication dans la lipolyse (Guerzoni *et al.*, 2001 ; Suzzi *et al.*, 2001). Une autre contribution des levures dans l'affinage des fromages est

leur capacité à produire des composés soufrés volatils (CSVs). *G. candidum* a été l'une des premières levures d'affinage testée pour la production de ce type de molécules mais des études plus récentes montrent que d'autres levures telles que *Y. lipolytica* ou *K. lactis* produisent des CSVs tels que le sulfure de méthyl (DMS), le disulfure de diméthyl (DMDS), le trisulfure de diméthyl (DMTS) et des *S*-méthyl thioesters (Demarigny *et al.*, 2000 ; Bonnarme *et al.*, 2001 ; Spinnler *et al.*, 2001) (Berger *et al.*, 1999 ; Arfi *et al.*, 2002) (Cernat-Bondar *et al.*, 2005). Les co-cultures de *G. candidum* avec d'autres levures (*K. lactis*, *Y. lipolytica*, *D. hansenii*) et des bactéries d'affinage (*B. linens*, *Corynebacterium glutamicum*) ont conduit à la synthèse de CSVs aux notes fromagères marquées (Martin *et al.*, 1999 ; Martin *et al.*, 2001). Les associations incluant *G. candidum* et *Y. lipolytica* se distinguent particulièrement par leur forte intensité aromatique et leurs notes de Munster et d'ammoniac (Martin *et al.*, 2001).

Dans le prochain paragraphe, nous décrirons ce genre plus en détail car la levure *Kluyveromyces lactis* est utilisée en co-culture avec *B. aurantiacum* au cours de mon travail de thèse.

Le genre *Kluyveromyces* appartient à la classe des *Ascomycetes*, sous-classe des *Hemiascomycetes* et à l'ordre des *Endomycetales*. La majorité des espèces appartenant au genre *Kluyveromyces* peut être classée parmi les levures de type respiratoire, à l'exception de *K. marxianus* qui appartient aux levures de type fermentaire c'est-à-dire dégradant majoritairement le glucose par voie fermentaire en condition d'aérobiose (le cas typique étant celui de *S. cerevisiae*). En se basant sur ses capacités à consommer le lactose, *K. lactis* a longtemps fait partie du genre *Saccharomyces* avant d'être classée dans le genre *Kluyveromyces*. Cette levure, principalement isolée des produits laitiers, est capable d'assimiler diverses sources de carbone mais consomme préférentiellement le lactose (Schaffrath et Breunig, 2000). *K. lactis* est une levure aérobie facultative et peut fermenter le lactose en éthanol. Les bases génétiques de la régulation du métabolisme respiro-fermentaire chez *K. lactis* ont fait l'objet de nombreuses revues bibliographiques très complètes (González-Siso *et al.*, 2000) (Breunig *et al.*, 2000 ; Schaffrath et Breunig, 2000). Enfin, les levures du genre *Kluyveromyces* sont capables de produire des composés d'arôme variés, principalement des esters aux notes fruitées et des alcools. *K. lactis* peut produire des CSVs comme le méthane-thiol (MTL), le DMS, le DMDS, le DMTS ou encore le 2-méthylthioacetate (MTAc) (Arfi *et al.*, 2002).

### Les bactéries d'affinage

Les bactéries d'affinage appartiennent principalement à trois groupes : les bactéries à Gram-négatif, les staphylocoques, et les bactéries corynéformes (Dahl *et al.*, 2000 ; Mounier *et al.*, 2005 ; Goerges *et al.*, 2008 ; Mounier *et al.*, 2009).

Les bactéries à Gram-négatif isolées du fromage à pâte molle font parties de 3 familles : les *Enterobacteriaceae*, les *Moraxellaceae* et les *Pseudomonadaceae*. La famille des *Enterobacteriaceae* est la plus fréquemment trouvée. La présence de bactéries à Gram-négatif est le plus souvent associée comme le résultat d'un manque d'hygiène. Malgré tout, des études récentes sur *Hafnia alvei*, *Psychrobacter* sp ou encore *Proteus vulgaris* montrent un impact positif sur la production de composés d'arôme (Dahl *et al.*, 2000 ; Deetae *et al.*, 2007 ; Deetae *et al.*, 2009). En effet, ces espèces produisent des CSVs (MTL, DMDS, DMTS) mais aussi des esters, des aldéhydes et des alcools. Elles possèdent des propriétés protéolytiques (Morales *et al.*, 2003 ; Chaves-López *et al.*, 2006) et lipolytiques (Chaves-López *et al.*, 2006) (Sable *et al.*, 1997) impliquées dans le processus d'affinage de fromage.

La deuxième grande famille est le genre *Staphylococcus*. Le nom de « *Staphylococcus* » vient du mot *staphyle* qui signifie grappe de raisin et du mot latin *coccus* qui signifie grain. Ce genre fait partie de la sous-branche *Clostridium-Bacillus* au sein des *firmicutes* qui correspondent aux Gram-positif à bas contenu en G+C %. En général, on associe les staphylocoques à des pathogènes opportunistes, comme *Staphylococcus aureus* ou *Staphylococcus epidermidis*, qui sont des producteurs de coagulase et/ou d'entérotoxines. Mais, il existe des espèces non-pathogènes à coagulase négative qui sont présentes dans les écosystèmes fromagers (Irlinger, 2008). *Staphylococcus equorum*, *Staphylococcus vitulinus* et *Staphylococcus xylosus* sont les espèces les plus fréquemment retrouvées dans les fromages à croûte lavée (Hoppe-Seyler *et al.*, 2004) (Irlinger *et al.*, 1997). Ces bactéries se développent de manière limitée en début d'affinage (Brennan *et al.*, 2002). Dans certains fromages, les souches de staphylocoques isolées représentent entre 2,5 à 15 % de la microflore (Bockelmann et Hoppe-Seyler, 2001) (Brennan *et al.*, 2002). Les travaux menés par Mounier et coll (Mounier *et al.*, 2005) dans 4 fromages à pâte molle, ont permis d'isoler différentes espèces de staphylocoques dont certaines sont spécifiques d'un fromage comme *S. equorum* retrouvée exclusivement dans le fromage Irlandais l'Ardrhan. Les souches de staphylocoques isolées du fromage sont halo-tolérantes (Mounier *et al.*, 2007) et possèdent aussi des propriétés lipolytiques et protéolytiques qui participent au processus d'affinage (Curtin *et al.*, 2002a) (Bockelmann et Hoppe-Seyler, 2001).

Les bactéries corynéformes constituent le troisième type de bactéries trouvées à la surface des fromages. Le terme de bactérie corynéforme a regroupé pendant longtemps les bactéries dont la morphologie était décrite « en forme de massue ». Ces bactéries sont capables d'effectuer un cycle de transformation de la forme bacille à coque en fonction de leur stade de croissance. Les bactéries corynéformes sont des bactéries à Gram-positif, catalase positive, non mobiles, acido-sensible, le plus souvent aérobies. La teneur en GC de leur génome est élevée. Cependant, on observe une grande hétérogénéité au niveau de leur taxonomie. Les bactéries corynéformes sont reliées à l'ordre des *Actinobacteria*, et divisées en deux sous-ordres les *Micrococcineae* et les *Corynebacterineae* (Stackebrandt *et al.*, 1997). Plusieurs études ont montré que les bactéries corynéformes de surface présentent une diversité de genre et constituent une part importante, voire dominante, de la flore microbienne de divers types de fromages (Brennan *et al.*, 2002 ; Mounier *et al.*, 2007). Ces bactéries se trouvent en association avec des levures car ces dernières désacidifient le milieu par la consommation du lactate et la production d'ammoniac. Les levures favorisent donc l'implantation des bactéries corynéformes. Ces bactéries ont une implication active dans l'affinage des fromages. En effet, elles participent à la pigmentation des fromages mais elles sont surtout capables de produire des composés soufrés qui renforcent les caractères "fromager" et "affiné" d'un fromage (Ratray et Fox, 1999 ; Arfi *et al.*, 2003 ; Arfi *et al.*, 2005). Elles possèdent des activités estérolytiques, peptidolytiques conduisant ainsi à la synthèse de composés d'arômes qui participent à la flaveur du des fromages (Curtin *et al.*, 2002b). Cette flore appartiendrait aux genres *Brevibacterium*, *Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Brachybacterium*, *Microbacterium*, ou encore *Corynebacterium*. Récemment, de nouvelles souches de bactéries corynéformes ont été identifiées à la surface du fromage telles qu'*Arthrobacter arilaitensis*, *Arthrobacter bergerei*, *Corynebacterium casei*, *Corynebacterium mooreparkense*, *Microbacterium gubbeenense* et *Brevibacterium aurantiacum* (Mounier *et al.*, 2007) (Brennan *et al.*, 2001 ; Gavrish *et al.*, 2004 ; Irlinger *et al.*, 2005). Nous reviendrons plus en détail sur le genre *Brevibacterium* dans le prochain paragraphe.

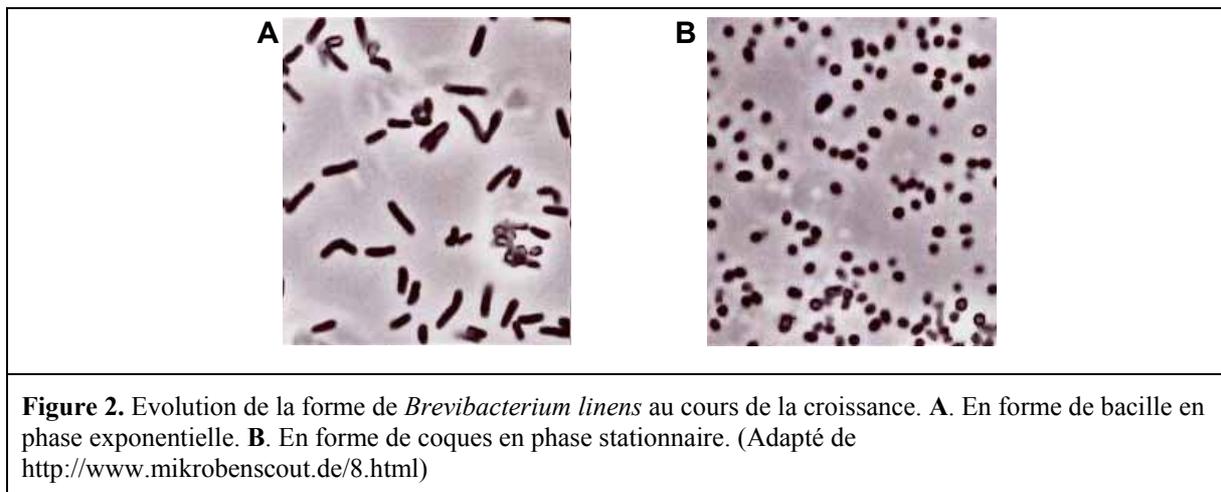
### **B- *Brevibacterium* : Une bactérie du fromage**

Parmi les bactéries corynéformes du fromage, le genre le plus étudié est *Brevibacterium*. En effet, c'est une bactérie majeure des flores de surface qui participe activement à la flaveur des fromages à pâte molle et donne l'odeur typique d'un fromage affiné. Ce genre est aussi

responsable de la pigmentation en donnant la couleur spécifique orangé du Munster, du Livarot ou encore la couleur rouille en croûte d'un Camembert bien affiné.

### B-1- Taxonomie et généralité

Le genre *Brevibacterium* est l'unique genre de la famille des *Brevibacteriaceae*. Il appartient au sous-ordre des *Micrococcineae*, ordre des *Actinomycetales*, sous-classe des *Actinobacteridae*, classe des *Actinobacteria*. Les *Brevibacteriaceae* sont des bactéries à Gram-positif dont la contenance en GC dans leurs génomes est de 62,3% (souche séquencée ATCC 9174) Elles sont non mobiles, aérobies strictes, catalase positive. Leurs températures de croissance sont comprises entre 20°C et 37°C et elles possèdent un pH de croissance optimum allant de 6,5 à 8,5. Ces espèces sont halotolérantes (15-25% de NaCl). Elles sont donc capables de supporter les conditions de pression propres à la surface des fromages à croûte lavée. Les *Brevibacteriaceae* appartiennent aussi aux bactéries corynéformes, c'est-à-dire qu'elles changent de forme au cours de sa croissance. En phase exponentielle, elles sont en forme de bâtonnet mais à l'entrée de la phase stationnaire, elles se transforment en coque (Figure 2).



Le genre *Brevibacterium* est capable d'utiliser différentes sources de carbone et d'azote. L'acétate et le lactate sont les substrats les mieux utilisés par les *Brevibacteriaceae*. Ces espèces utilisent également le glucose et le galactose comme source de carbone alors que le saccharose et le lactose sont peu utilisés et l'amidon n'est pas dégradé (Moreau *et al.*, 1998). En présence d'acide lactique comme unique source de carbone, les *Brevibacteriaceae* sont capables d'utiliser le sulfate d'ammonium comme source d'azote inorganique (Moreau *et al.*, 1998) Elles sont aussi capables d'utiliser les acides aminés comme source d'azote et de carbone en l'absence d'une autre source de carbone. Cependant, en présence d'acide lactique,

les acides aminés ne sont métabolisés qu'après épuisement de celui-ci. L'ammoniac est une source d'azote consommée préférentiellement par rapport aux acides aminés et c'est sa disparition qui accélère la consommation de ces derniers. Les acides aminés phénylalanine, tyrosine, arginine, proline, acide glutamique, histidine constituent des facteurs limitant pour la croissance des *Brevibacteriaceae* (Famelart *et al.*, 1987) (Moreau *et al.*, 1998).

Différentes études révèlent la présence d'une hétérogénéité au sein de ce genre (Stackebrandt *et al.*, 1999 ; Gavrish *et al.*, 2004). Il existe 43 espèces différentes décrites comme appartenant au genre *Brevibacterium* mais seules 23 espèces dont *B. linens*, *B. antiquum*, *B. aurantiacum*, *B. avium*, *B. casei*, et *B. iodinum* semblent effectivement appartenir à ce genre<sup>1</sup>. Ces différentes espèces ont été isolées du lait, de différents fromages, du sol ou chez l'Homme. En 2003, une étude se basant sur l'hybridation ADN/ADN divise l'espèce *B. linens* en deux espèces distinctes *B. linens*, dont la souche type est ATCC 9172, et *B. aurantiacum*, représentée par la souche ATCC 9175 (Gavrish *et al.*, 2004). Bien que *B. linens* est l'espèce type du genre *Brevibacterium*, c'est *B. aurantiacum* qui est la plus représentée en surface des fromages (Gavrish *et al.*, 2004 ; Rea *et al.*, 2007).

<sup>1</sup> [http://www.dsmz.de/microorganisms/bacterial\\_nomenclature\\_info.php?genus=Brevibacterium&show\\_all\\_details=1](http://www.dsmz.de/microorganisms/bacterial_nomenclature_info.php?genus=Brevibacterium&show_all_details=1) (date 25/03/10)

## **B-2- *Brevibacterium* et le fromage**

La souche type des *Brevibacteriaceae* est la souche *B. linens* ATCC9172, une souche issue d'un fromage allemand à pâte molle et à croûte lavée, le Harzerkase. Dans ce paragraphe, nous verrons en quoi les espèces appartenant au genre *Brevibacterium* participent activement à l'affinage des fromages à pâte molle et sont particulièrement intéressantes pour l'industrie fromagère.

### *Activité protéolytique, lipolytique et estérasique*

Les *Brevibacteriaceae* peuvent produire différents types de protéinases ou peptidases qui sont extracellulaires, intracellulaires et membranaires. Ces différentes activités participent au développement des propriétés organoleptiques des fromages.

Différentes études ont montré la capacité des protéinases des *Brevibacteriaceae* à hydrolyser certaines caséines du lait. Les propriétés biochimiques des protéinases extracellulaires de différentes souches du genre *Brevibacterium* sont résumées dans le tableau 1. Les *Brevibacteriaceae* produisent, en outre, plusieurs protéinases intracellulaires et membranaires dont les activités sont relativement faibles, comparées à celles des protéinases extracellulaires (Ratray et Fox, 1999). Ces protéinases sont fortement actives sur les

dipeptides ayant l'alanine en position N-terminale et sont inhibées en présence de l'ion  $Hg^{2+}$  et d'acide *p*-hydroxymercuribenzoïque (pHMB). Une aminopeptidase intracellulaire a été purifiée et caractérisée chez *B. aurantiacum* ATCC 9174 (Ratray et Fox, 1997a). Ses optima de pH et de température sont respectivement de 8,5 et 35°C. Cette aminopeptidase hydrolyse les dipeptides ayant l'alanine en position N-terminale mais pas ceux ayant la valine, la phénylalanine, la proline, le glutamate, la leucine, la lysine ou encore l'arginine dans cette position. Fortement inhibée par le pHMB, cette enzyme est inactive sur les tripeptides.

Differentes aminopeptidases extracellulaires ont également été mises en évidence chez les *Brevibacteriaceae* avec une grande variation au niveau de leurs optima de température, de pH mais aussi leurs masses moléculaires. On peut cependant estimer que les aminopeptidases extracellulaires de *B. linens* ont un optimum de température situé entre 28 et 40°C et de pH entre 7 et 9,6 tandis que leurs masses moléculaires varient entre 26 et 48 kDa pour le monomère (Ratray *et al.*, 1995). Les études d'inhibition, notamment à l'EDTA, ont montré que ces aminopeptidases sont des métalloenzymes ayant une forte préférence pour les dipeptides ayant la leucine en position N-terminale (Ratray et Fox, 1999).

**Tableau 1. Propriétés biochimiques des protéinases extracellulaires des *Brevibacteriaceae* (Adapté Ratray, et al 1999)**

Souches	Nbr	Opt. T°	Opt. pH	Masse mol.	Références <sup>1</sup>
<i>B. linens</i> 450	2	38°C	7,2	ND <sup>2</sup>	Friedman <i>et al.</i> , 1953
<i>B. linens</i> (non spécifié)	1	25°C	7	ND	Tokita <i>et al.</i> , 1972
<i>B. linens</i> Lactoflora 200	1	45°C	7-8,5	52-55 kDa	Juhász <i>et al.</i> , 1990
<i>B. linens</i> Lactoflora 200	4	50°C	5-8	ND	Brezina <i>et al.</i> , 1987
<i>B. linens</i> F	5	40-55°C	11	37-325 kDa	Hayashi <i>et al.</i> , 1990
<i>B. aurantiacum</i> ATCC 9174	1	50°C	8.5	56-126 kDa	Ratray <i>et al.</i> , 1997

<sup>1</sup> Citées par Ratray et Fox, 1999.

<sup>2</sup> Non déterminé

Enfin, la présence d'activités lipolytiques et estérasiques a aussi été démontrée chez *B. linens* (Adamitsch *et al.*, 2003) (Adamitsch et Hampel, 2000) (Lambrechts *et al.*, 1995) (Lambrechts et Galzy, 1995). Le nombre d'estérases, leurs optima de température et de pH ainsi que leur spécificité en terme de substrats dépendent fortement de la souche. Par exemple, une estérase intracellulaire a été purifiée chez *B. aurantiacum* ATCC 9174. Cette étude a mis en évidence que cette enzyme, dont les optima de pH et de température sont

respectivement de 7,5 et 35°C, hydrolyse les esters des acides acétiques, butyriques, caproïques, capryliques et capriques (Ratray et Fox, 1997b).

### Production de substance antimicrobienne

*Brevibacterium* est capable de produire des substances antimicrobiennes qui inhibent la croissance de nombreuses bactéries potentiellement pathogènes ainsi que certaines levures. Plusieurs bactériocines comme la linecine A, la linocine M18 et la linenscine OC2 sont isolées des *Brevibacteriaceae* ainsi que 3 composés antimicrobiens et inhibiteurs. Le premier agent inhibiteur a été découvert par Grecz et al (1959) dans le surnageant de culture de deux souches de *B. aurantiacum* (ATCC 9174 et 9175). Il inhibe la germination des spores de *Clostridium botulinum* mais n'a jamais été purifié. Il est toujours actif après un traitement de 15 min à 120°C. Le deuxième agent microbien non identifié possède une activité anti-listeria. Il reste actif après différents traitements tels qu'un chauffage à 80°C pendant 30 min en pH acide, mais aussi après un traitement par une protéase, une lipase ou encore une catalase. Enfin la dernière substance identifiée est produite par *B. aurantiacum* ATCC 9175. Cette substance est sensible à la température et aux traitements à la trypsine suggérant que cela serait un peptide (Motta et Brandelli, 2002) d'où son nom de bactériocine peptidique. Sa production et son activité sont simulées en présence de 0,4 à 0,8% de sel dans le milieu de croissance et par une température de croissance de 25°C. Elle est capable d'inhiber le développement de *L. monocytogenes* ATCC 7644 et de *Corynebacterium fimi* NCTC7547.

Trois bactériocines différentes ont été purifiées et caractérisées chez les *Brevibacteriaceae*. La première est la linecine A. Cette bactériocine est produite par *B. aurantiacum* ATCC 9175 et elle est capable d'inhiber la croissance d'autres souches de *Brevibacterium* comme *B. linens* ATCC9172, 9174 ou 8377. En revanche, elle ne semble pas être active sur des espèces du genre *Corynebacterium* ou *Micrococcus* (Kato et al., 1991). Cette bactériocine est thermolabile, elle est sensible à l'action d'une protéase et possède une masse moléculaire de 95 kDa. La deuxième bactériocine est la linocine M18 isolée à partir du surnageant d'une culture de *B. linens* M18. Elle est codée par le gène *lin* présent sur son chromosome. Elle est composée de sous-unité de 28,5 kDa mais la protéine native aurait une masse extrêmement élevée (> 2000 kDa). Elle est totalement inactivée par un traitement à la chaleur (5 min à 80°C) (Valdes-Stauber et Scherer, 1994 ; Valdes-Stauber et Scherer, 1996). Elle présente un large spectre d'activité contre des espèces des genres *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Micrococcus* mais son activité anti-Listeria est particulièrement

intéressante pour l'industrie fromagère. En effet, l'activité antimicrobienne de *B. linens* M18 sur les souches de *Listeria* a été démontrée dans un fromage modèle avec la réduction de 1 à 2 unités log des populations de *Listeria ivanovii* et *Listeria monocytogenes* (Eppert *et al.*, 1997). Enfin, la dernière substance antibactérienne nommée la linenscine OC2 a été isolée chez *B. linens* OC2. Cette molécule est active sur les pathogènes alimentaires comme *S. aureus* et *L. monocytogenes* (Maisnier-Patin et Richard, 1995). Elle possède une activité hémolytique sur les érythrocytes de moutons (Boucabeille *et al.*, 1997). Son action combinerait une lyse de la membrane cytoplasmique et une induction de l'autolyse.

**Tableau 2. Les différents agents antimicrobiens des *Brevibacteriaceae*. Adapté de Motta, 2008**

Agent antimicrobien	Souche productrice	Mode d'action	Spectre antimicrobien	Poids moléculaire	Référence
Agent antimicrobien 1	<i>B. linens</i>	id	<i>Listeria spp.</i>	id	Fox <i>et al.</i> , 1999
Agent antimicrobien 2	<i>B. linens</i>	id	<i>Clostridium botulinum</i>	id	Grecz <i>et al.</i>
Bactériocine peptidique	<i>B. aurantiacum</i> ATCC 9175	id	<i>L. monocytogenes</i> et <i>Corynebacterium fimi</i>	id	Motta <i>et al.</i> , 2002
Linecine A	<i>B. aurantiacum</i> ATCC 9175	id	<i>Brevibacteriaceae</i>	95 kDa	Kato <i>et al.</i> , 1991
Linocine M18	<i>B. linens</i> M18	id	<i>Bacillus</i> , <i>Arthrobacter</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>micrococcus</i> et <i>Listeria</i>	2000 kda	Valdes-Stauber, <i>et al.</i> 1994, Valdes-Stauber, <i>et al.</i> 1996
Linenscine OC2	<i>B. linens</i> OC2	lyse de la membrane cytoplasmique et une induction de l'autolyse	<i>S. aureus</i> et <i>L. monocytogenes</i>	285 kDa	Maisnier-Patin, <i>et al.</i> 1995 Boucabeille <i>et al.</i> , 1997

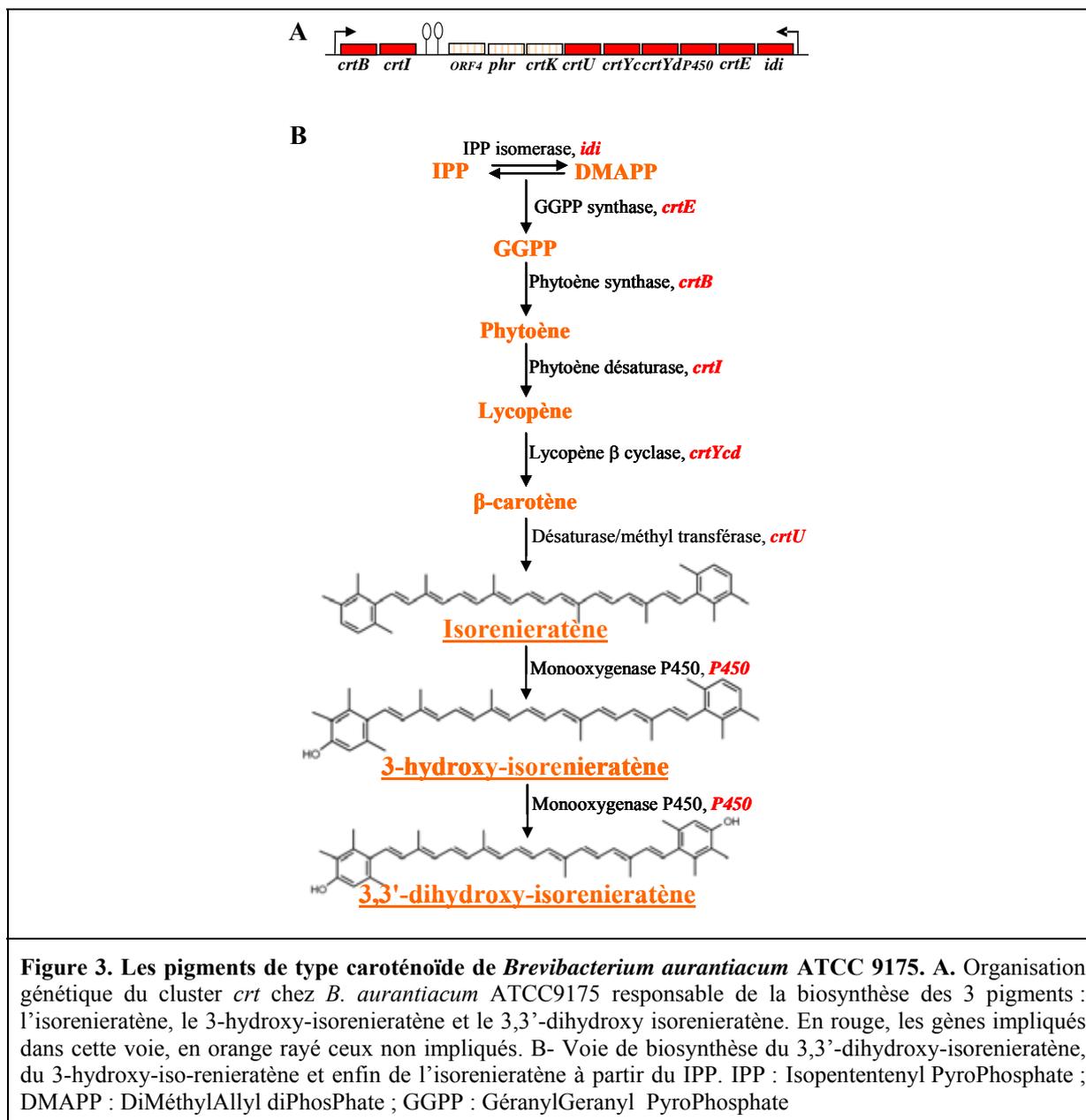
id= indéterminé

### Pigmentation

La coloration rouge orangée de la croûte de fromage comme le Munster ou le Livarot est traditionnellement due aux pigments produits par les bactéries de surface et plus particulièrement par les différentes espèces de *Brevibacterium*. Chez les *Brevibacteriaceae*, les pigments à l'origine de la couleur ont été identifiés comme étant des caroténoïdes aromatiques : l'isorenieratène, le 3-hydroxy-isorenieratène et enfin le 3,3'-dihydroxyisorenieratène (Jones *et al.*, 1973 ; Dufosse *et al.*, 2001). Les gènes codant pour la voie de synthèse du 3,3'-dihydroxy-isorenieratène ont été identifiés chez *B. aurantiacum* ATCC 9175 ; ils font parti du cluster *crt* (Figure 3A). La formation de ces composés à partir de l'isopententenyl pyrophosphate (IPP) se produit par l'action successive d'une IPP isomérase, Idi, d'une géranylgeranyl pyrophosphate (GGPP) synthase, CrtE, d'une phytoène

synthase, CrtB, d'une phytoène désaturase, CrtI, d'une lycopène cyclase, CrtYcd, d'une  $\beta$ -carotène désaturase, CrtU, et enfin d'une cytochrome P450 (Figure 3B) (Krubasik et Sandmann, 2000 ; Dufossé et de Echanove, 2005).

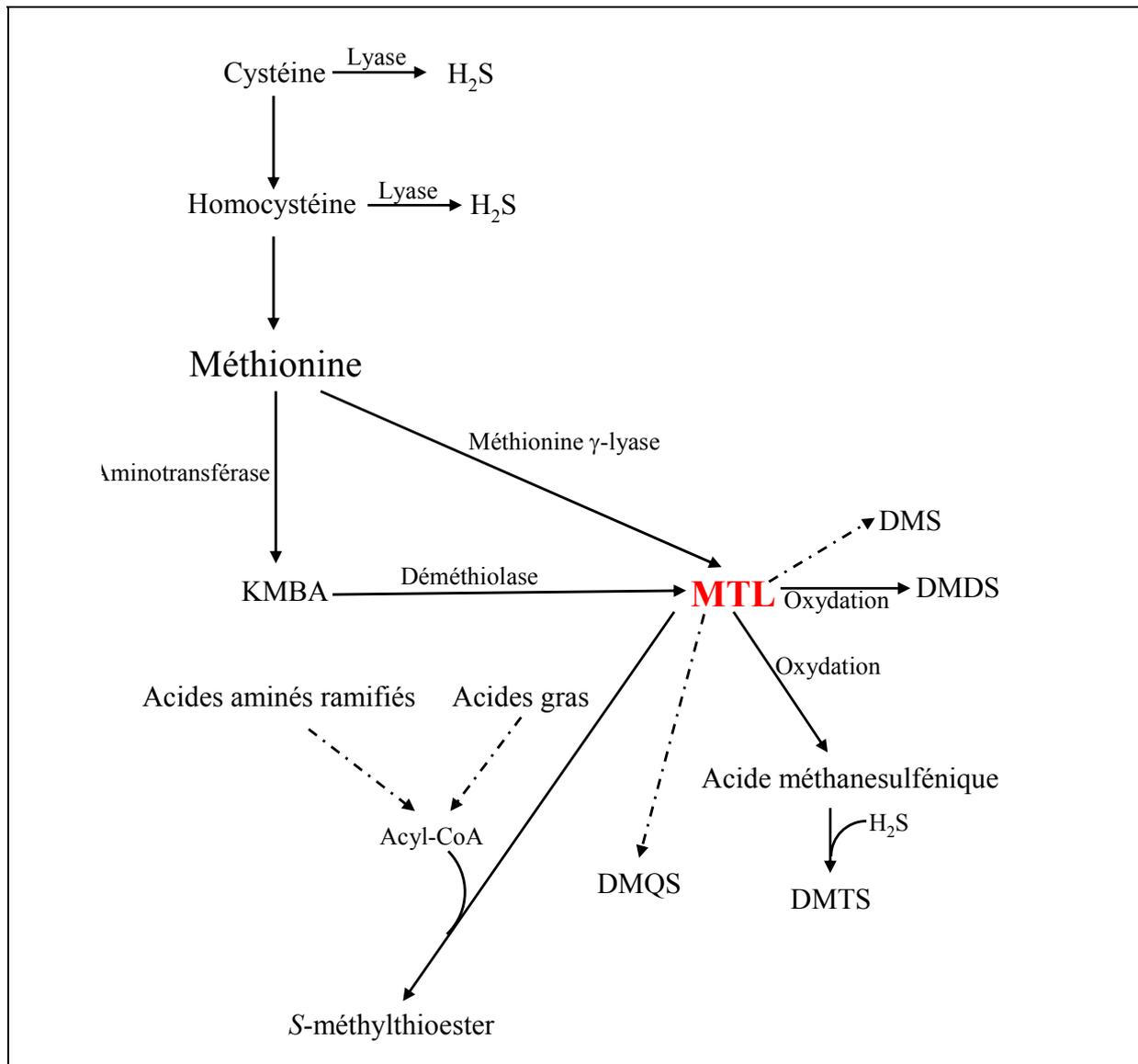
Des études ont montré par des analyses de spectrocalorimétrie et d'HPLC, une hétérogénéité de la production des pigments au sein des espèces mais aussi le rôle de la lumière dans la pigmentation (Guyomarc'h *et al.*, 2000 ; Guyomarc'h *et al.*, 2000). La première étude montre l'importance de la lumière sur la pigmentation des colonies et distingue trois groupes. Dans le premier groupe qui inclut *B. linens* ATCC 9172, les souches sont de couleurs crème lorsqu'elles croissent à l'obscurité mais se colorent en orange à la lumière alors que d'autres souches comme *B. linens* ATCC 19391 développent la couleur orange dans les deux cas. Cette étude montre aussi l'existence d'un dernier groupe, comprenant la souche *B. aurantiacum* ATCC 9175, dont la coloration est plus importante lorsqu'elles croissent à l'obscurité (Guyomarc'h *et al.*, 2000). La deuxième étude montre que la production des pigments est liée à la croissance, avec un maximum de production en phase exponentielle (Guyomarc'h *et al.*, 2000). D'autres études ont montré que la pigmentation orange est plus intense lorsque le pH, la concentration en NaCl et l'oxygénation du milieu sont favorables à la croissance des *Brevibacteriaceae* (Ferchichi *et al.*, 1986a) (Famelart *et al.*, 1987 ; Masoud et Jakobsen, 2003). Enfin, certaines études montrent que la présence d'autres micro-organismes et en particulier de *D. hansenii*, joue un rôle dans la production de pigments par les *Brevibacteriaceae* (Masoud et Jakobsen, 2003) (Bockelmann *et al.*, 2002) (Leclercq-Perlat *et al.*, 2004).



### Production de composés volatils

Dans les fromages, l'ensemble des bactéries du genre *Brevibacterium* contribue activement à la production de composés volatils et plus particulièrement des CSVs. Ces CSVs sont principalement le méthanthiol (MTL) mais aussi le sulfure d'hydrogène (H<sub>2</sub>S) et des polysulfures comme le DMDS et le DMTS, les thioethers dont le principal est le DMS ou encore les *S*-méthylthioesters comme le *S*-méthylthioacétate (MTAc) (Tableau 3). Ils ont pour précurseurs principaux les acides aminés soufrés, en particulier la méthionine. Parmi ces composés, le MTL est considéré comme un constituant majeur de l'arôme caractéristique du Camembert, du Cheddar, et il est souvent associé aux odeurs « chou bouilli » et « chou

fermenté » mais aussi à l'odeur « des fromages ». Chez les *Brevibacteriaceae*, le MTL est issu de la dégradation de la méthionine par deux voies distinctes : une première voie qui implique la méthionine  $\gamma$ -lyase, et une voie impliquant successivement une aminotransférase et une déméthiolase et qui a pour intermédiaire métabolique le KMBA (paragraphe II-D-4) (Figure 4). La deuxième voie semble très minoritaire chez les *Brevibacteriaceae* (Deetae *et al.*, 2007) (Dias et Weimer, 1998b)



**Figure 4** Les différentes voies de biosynthèse des composés soufrés volatils produits par les *Brevibacteriaceae*. H<sub>2</sub>S : sulfure d'hydrogène ; MTL ; méthane-thiol ; DMS : disulfure de méthyle ; DMDS : disulfure de diméthyle ; DMTS : trisulfure de diméthyle ; KMBA :  $\alpha$ -cétio  $\gamma$ -méthylthiobutyrate

Une étude a montré par un traçage au carbone 13 que le MTL est le précurseur d'autres CSVs tels que le sulfure de diméthyle (DMS), le DMDS, le DMTS ou le diméthyle de tétrasulfure (DMQS) mais aussi des S-méthylthioesters (Arfi *et al.*, 2006). Les polysulfures

sont issus d'une oxydation du MTL. Ils possèdent des notes aromatiques de type « chou », « ail » ou encore « fromage » alors que le DMS possède des descriptifs allant plutôt vers des notes de type « chou cuit », « oignon » ou « soufré ». (Bonnarme *et al.*, 2000). Enfin, certaines souches de *Brevibacteriaceae* sont capables de produire des *S*-méthyl thioesters (Dias et Weimer, 1998b ; Bonnarme *et al.*, 2000 ; Arfi *et al.*, 2006). Ces composés sont principalement le *S*-méthylthioacétate (MTAc), le *S*-méthylthiopropionate (MTP), le *S*-méthylthiobutyrate (MTB), le *S*-méthylthioisobutyrate (MTiB) et le *S*-méthylthioisovalérate (MTiV) (Bonnarme *et al.*, 2000) (Arfi *et al.*, 2006). Les *S*-méthylthioesters possèdent des notes descriptives évoquant « le chou », « l'ail », « le fromage » « le crabe » mais aussi des notes « fruités ». Les voies de formation de ces composés ont fait l'objet de plusieurs études chez différents micro-organismes de la flore d'affinage du fromage. Une étude récente a clairement établi les voies de biosynthèse de ces composés chez deux *Brevibacteriaceae* : *B. linens* CNRZ918 et *B. aurantiacum* BL171 (Sourabié *et al.*, 2010). Celle-ci montre que les acides gras et, pour la première fois, les acides aminés ramifiés comme la leucine et la valine, mais ainsi les  $\alpha$ -céto-acides sont des précurseurs pour la synthèse des *S*-méthyl thioesters chez ces deux *Brevibacteriaceae*. Les résultats de l'analyse LC/MS-MS réalisée (chromatographie liquide associée à une détection par spectrométrie de masse en tandem) montrent, sans équivoque, que les acyl-CoAs sont les intermédiaires centraux de la biosynthèse des *S*-méthylthioesters. De fait, la première étape de la synthèse de ces composés est la formation des acyl-CoAs par un ensemble de réactions catalysées soit par une acyl-CoA synthase (en présence d'acides gras), soit par des aminotransférases et des  $\alpha$ -céto-acides déshydrogénases (en présence d'acides aminés). La deuxième étape est une réaction chimique spontanée entre l'acyl-CoA néoformée et le MTL (Figure 4) (Sourabié *et al.*, 2010).

*Les Brevibacteriaceae* sont aussi capables de produire d'autres types de composés volatils en dehors des CSVs. En effet, ils produisent des acides gras volatils comme l'acide butyrique mais aussi des amines volatiles incluant l'histamine, la tyramine, la diéthylamine et la cadavérine ont également été détectées (Ratray et Fox, 1999).

**Tableau 3. Les différents composés soufrés volatils produits par les *Brevibacteriaceae*.**

Composés	Espèces	Notes aromatiques	Références
<i>Thiols</i>			
Sulfure d'hydrogène	} <i>B. aurantiacum</i> , <i>B. linens</i> , <i>B. antiqum</i>	(Euf pourri	Lopez del Castillo <i>et al</i> , 2007
Méthanethiol		Chou cuit ou fermenté	Bonnarme <i>et al</i> , 2000 Arfi <i>et al</i> , 2006 Dias <i>et al</i> , 1998
<i>Sulfures</i>			
Sulfure de diméthyle	} <i>B. aurantiacum</i> , <i>B. linens</i> , <i>B. antiqum</i>	Chou bouilli, soufré	Bonnarme <i>et al</i> , 2000 Arfi <i>et al</i> , 2006
Disulfure de diméthyle		Chou, ail, fromage	
Trisulfure de diméthyle		Ail, gaz	
Tetrasulfure de diméthyle		Chou, fromage, ail	
<i>Thioéthers</i>			
2,4-dithiapentane	} <i>B. aurantiacum</i> , <i>B. linens</i>	Chou, ail, rance, gaz	Cholet <i>et al</i> , 2007
2,4,5-trithiahexane		} <i>B. aurantiacum</i>	
<i>Thioesters</i>			
S-méthylthioacétate	} <i>B. aurantiacum</i> , <i>B. linens</i> , <i>B. antiqum</i>	Chou, fromage, crabe	Bonnarme <i>et al</i> , 2000 Arfi <i>et al</i> , 2006 Sourabié <i>et al</i> , 2010
S_méthylthiopropionate		Chou, fromage, rance, ail	
S_méthylthioisovalérate		Fromage, ail, chou	
S_méthylthioisobutyrate		Ail, fromage, chou	

Comme nous venons de le voir, les *Brevibacteriaceae* participent au développement des caractères organoleptiques des fromages à pâte molle principalement via la production de CSVs. De nombreux travaux ont été menés sur la formation et la diversité des CSVs produits par les *Brevibacteriaceae* mais chez cette bactérie aucun travail n'a été effectué sur les précurseurs de ses CSVs : les acides aminés soufrés. De plus, des travaux récents ont montré le manque de compétitivité des *Brevibacteriaceae* dans de nombreux fromages (Goerges *et al.*, 2008) (Rea *et al.*, 2007). En effet, les études montrent que la croissance de *B. linens* serait ralentie voir arrêtée en présence de la microflore indigène (Mounier *et al.*, 2006). Cette observation montre l'importance des interactions et de la communication entre les différents micro-organismes présents dans l'écosystème fromager. Dans les deux prochains paragraphes, nous ferons un état des lieux des connaissances sur les différentes voies du métabolisme du soufre mais aussi sur les différents types d'interaction et les moyens de communication qui existent chez les micro-organismes.

## II- Métabolisme du soufre

### A- Assimilation du sulfate et des sulfonates

Le sulfate, présent abondamment dans l'environnement, constitue une source de soufre facilement accessible pour différentes bactéries, les champignons et les plantes. Cependant, cette source de soufre n'est pas utilisée par les mammifères. Le sulfate est converti en sulfure et en cystéine qui sont les précurseurs directs de la méthionine.

#### A-1- Transport du sulfate et du thiosulfate

Trois types de transporteurs permettent l'entrée du sulfate dans la cellule. Le premier appartient à la famille des ABC transporteurs de type SulT (**S**ulfate uptake **T**ransporter), les deux autres correspondent à des systèmes de transport actif secondaire appartenant aux familles de perméases SulP (**S**ulfate **P**ermease) et Pit (**I**norganic **P**hosphate **T**ransporter) (Saier, 2000).

Chez *Escherichia coli*, le transport du sulfate et du thiosulfate se fait via un unique ABC transporteur appartenant à la famille SulT. Il est codé par l'opéron *cysPTWAM* et le gène *sbp*. Ce transporteur est composé de deux unités transmembranaires CysT et CysW et d'une protéine cytoplasmique qui hydrolyse l'ATP, CysA. Enfin, les protéines périplasmiques SBP (**S**ulfate **B**inding **P**rotein) et CysP sont impliquées, respectivement, dans la liaison du sulfate et du thiosulfate (Pardee, 1966) (Hryniewicz *et al.*, 1990). Cependant, seul le double mutant *sbp cysP* est incapable d'utiliser le sulfate et le thiosulfate pour la croissance. Les activités des protéines de liaison du substrat, Sbp et CysP, peuvent donc se substituer partiellement. Le sulfite, le sélénite, le sélénate, le chromate ou encore le molybdate inhibent l'entrée du sulfate par ce système et utilisent donc aussi ce transporteur pour pénétrer dans la cellule (Lindblow-Kull *et al.*, 1985 ; Kredich, 1996). Chez *Mycobacterium tuberculosis*, les gènes *cysTWA* et *subI* codent pour les différentes sous-unités de ce transporteur (Wooff *et al.*, 2002). Cet ABC transporteur a aussi été caractérisé chez *Synechococcus* (Laudenbach et Grossman, 1991). On retrouve des gènes codant pour des protéines similaires à celles du système d'*E. coli* chez de nombreux organismes dont les génomes sont connus comme *Bordetella pertussis*, *Vibrio cholerae* *Pseudomonas aeruginosa*. (Kertesz, 2001).

Un second type de transporteur du sulfate correspondant aux perméases de la famille SulP (Saier, 2000) a été mis en évidence chez certains eucaryotes. De nombreuses bactéries possèdent des protéines homologues aux perméases SulP : YchM chez *E. coli* ainsi qu'YbaR

et YvdB chez *B. subtilis*. Leur implication possible dans le transport du sulfate ou du thiosulfate reste à démontrer. Cependant, un gène codant pour une protéine similaire à YbaR de *B. subtilis*, SA1850, voit son expression réprimée en présence de cystéine et fait partie du régulon CymR chez *Staphylococcus aureus* (Soutourina *et al.*, 2009a). Cette bactérie qui ne possède pas la voie de conversion du sulfate en sulfite n'utilise pas le sulfate comme source de soufre mais peut pousser en présence de thiosulfate. SA1850 pourrait donc être un transporteur du thiosulfate.

Finalement, un dernier type de transporteur du sulfate a été mis en évidence chez *B. subtilis*, qui utilise le transporteur CysP (Mansilla et De Mendoza, 2000). Ce symporteur appartient à la famille des transporteurs Pit habituellement impliqués dans l'entrée du phosphate inorganique (Saier, 2000). Le gène *cysP* fait partie de l'opéron *cysH* codant pour des protéines impliquées dans l'assimilation du sulfate (Figure 5) (Mansilla *et al.*, 2000). La fonction de ce symporteur a été mise en évidence par une complémentation d'un double mutant *sbpcysP* d'*E. coli*. L'introduction du gène *cysP* de *B. subtilis* restaure la croissance de ce mutant en présence de sulfate comme seule source de soufre (Mansilla et De Mendoza, 2000).

## A-2- Réduction du sulfate

Une fois entré dans la cellule, le sulfate est réduit en sulfure qui pourra être utilisé comme précurseur des acides aminés soufrés, la cystéine et la méthionine (via l'homocystéine) par des voies de thiolation. La voie d'assimilation du sulfate a été très bien étudiée chez différents microorganismes (Figure 5). Le sulfate est d'abord activé en phosphosulfate. Cette première étape nécessite l'ATP sulfurylase codée par les gènes *cysDN* chez *E. coli* et *C. glutamicum*. Cette enzyme forme de l'Adénosine-5'-PhosphoSulfate (APS) et du pyrophosphate à partir de sulfate et d'ATP (Figure 5). Chez *B. subtilis*, l'ATP sulfurylase est codée par un seul gène *sat*. Dans cette enzyme, on observe une fusion des deux sous unités de l'ATP-sulfurylase : la sous unité catalytique CysD et la sous unité régulatrice CysN. La deuxième étape de cette voie chez *E. coli* est la phosphorylation de l'APS en 3' PhosphoAdénosine 5'-PhosphoSulfate (PAPS) par une APS kinase, CysC. Cette enzyme est présente chez *E. coli* et *B. subtilis*. Le PAPS est ensuite réduit en sulfite ( $\text{SO}_3^{2-}$ ) par CysH, une PAPS sulfotransférase qui utilise la thiorédoxine comme donneur d'électrons. Chez *B. subtilis*, des études *in vitro* montrent que CysH a une double activité d'APS et de PAPS réductase (Berndt *et al.*, 2004). *B. subtilis* serait donc capable de réduire directement l'APS en sulfite. Cependant, des données récentes montrent que des mutants *cysH*, *sat* et *cysC* de *B. subtilis* sont auxotrophes pour la cystéine

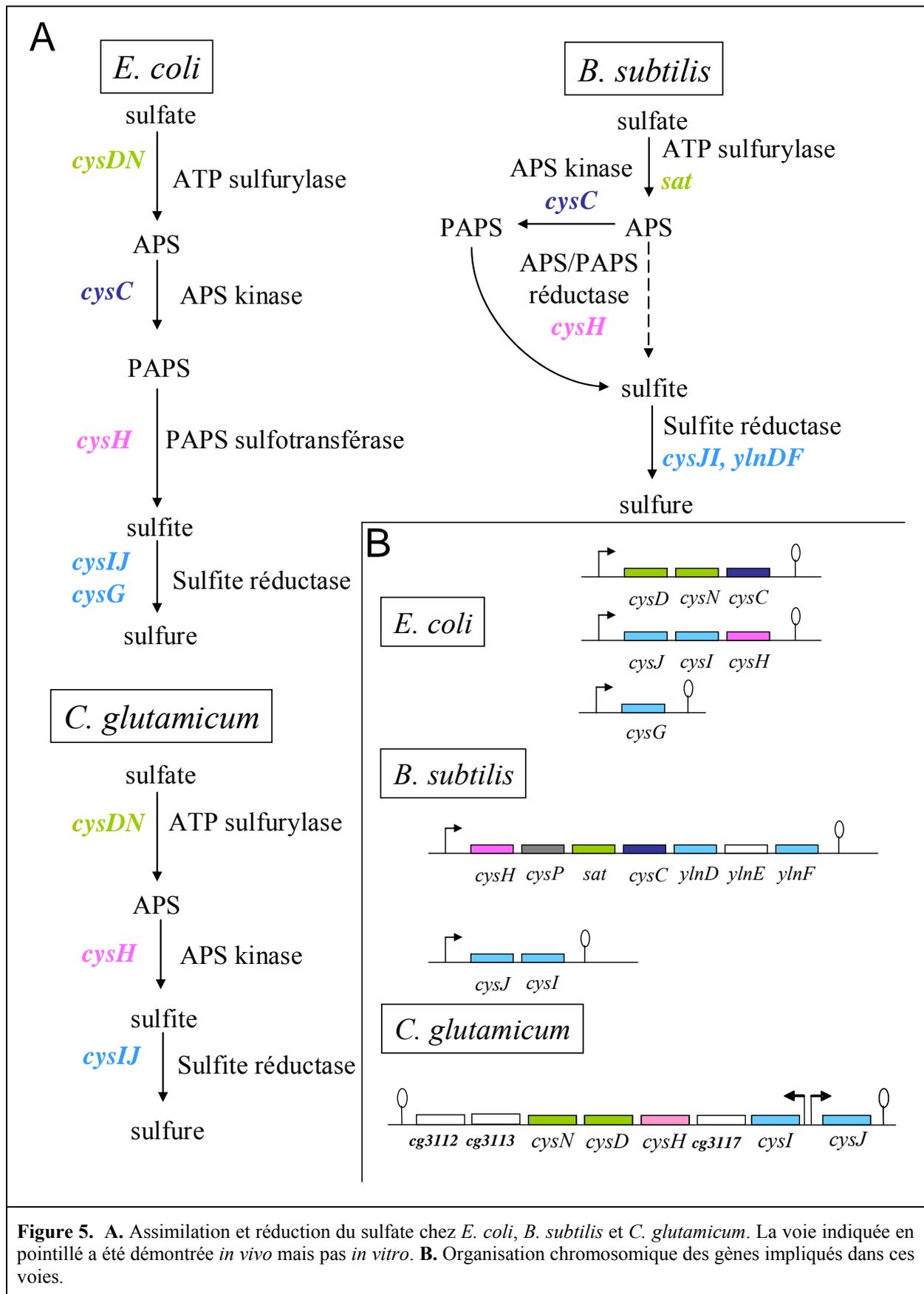
comme ceux d'*E. coli*. Ceci suggère une voie de réduction du sulfate en sulfite en 3 étapes chez *B. subtilis* comme chez *E. coli* (E. Courtois et I. Martin-Verstraete, résultats non publiés). Par contre, chez *C. glutamicum* et *M. tuberculosis*, la réduction du sulfate en sulfite s'effectue en 2 étapes au lieu de 3 avec l'implication d'une APS réductase, CysH (Figure 5). L'introduction de *cysH* de *C. glutamicum* et *M. tuberculosis* dans des mutants  $\Delta cysH$  et  $\Delta cysC$  d'*E. coli* restaure la croissance en présence de sulfate confirmant la conversion directe de l'APS en sulfite par CysH (Ruckert *et al.*, 2005) (Williams *et al.*, 2002). Le sulfite est ensuite réduit en sulfure ( $S_2^-$ ) par la sulfite réductase codée par les gènes *cysJI* (Kredich, 1996 ; Van der Ploeg *et al.*, 2001). CysJ est une flavoprotéine contenant un groupement FAD (flavine dinucléotide) et un groupement FMN (flavine mononucléotide). CysI est une hémoprotéine qui contient un centre [Fe-S] et un sirohème dont la synthèse, chez *E. coli*, est assurée par une uroporphyrinogène méthyltransférase codée par le gène *cysG*. Chez *B. subtilis* et *C. glutamicum*, la synthèse du sirohème associé à CysI serait respectivement effectuée par les produits des gènes *ylnD* et *ylnF* et *fpr2* (Ruckert *et al.*, 2005). Enfin, de nombreuses firmicutes, incluant les staphylocoques, les streptocoques, et les listeria ne possèdent pas de voie d'assimilation du sulfate.

### A-3- Entrée et assimilation des sulfonates

En absence de sulfate inorganique, les microorganismes peuvent aussi utiliser du soufre organique tel que les sulfonates ( $R-C-SO_3H$ ), qui représentent environ 40% du soufre total dans le sol (Autry et Fitzgerald, 1990). De nombreuses bactéries peuvent assimiler les sulfonates ou les esters de sulfonates. Le catabolisme de ces molécules nécessite l'entrée des sulfonates puis une étape d'oxydation.

Chez *E. coli*, il existe deux transporteurs de ces molécules, un spécifique de la taurine (TauABC) et un autre des alcanesulfonates (SsuABC) (Eichhorn *et al.*, 1999 ; Eichhorn *et al.*, 2000). Ces ABC transporteurs sont codés par les opérons *tauABCD* et *ssuEADCB*. Ces systèmes sont constitués des trois entités classiques des ABC transporteurs avec une protéine de liaison du substrat (TauA ou SsuA), une protéine membranaire (TauC ou SsuC) et une ATPase (TauB ou SsuB). Chez *B. subtilis*, un unique transporteur similaire au système TauABC d'*E. coli* est codé par l'opéron *ssuBACDygaN*. Il est impliqué dans l'entrée des sulfonates et de la taurine (Eichhorn *et al.*, 1999). Chez *C. glutamicum*, un ABC transporteur des sulfonates SsuABC est présent (Ruckert *et al.*, 2005). Son inactivation empêche la croissance en présence de sulfonates aliphatiques, de taurine, de propane sultone alors que la

croissance sur d'autres esters de sulfonates comme le busulfane, le butanesulfone, l'éthyl-méthane sulfonate est maintenue dans ce mutant. Ceci suggère la présence d'au moins un autre transporteur pour ces esters de sulfonates qui reste à caractériser (Ruckert *et al.*, 2005). Une fois entrés dans la cellule, les sulfonates aliphatiques sont transformés en sulfite par désulfonation, puis en sulfure par l'action de la sulfite réductase. Chez *E. coli*, TauD catalyse la désulfonation de la taurine tandis que SsuD assure la désulfonation des sulfonates aliphatiques (Eichhorn *et al.*, 1997 ; Eichhorn *et al.*, 1999). TauD est une dioxygénase dépendante de l' $\alpha$ -cétoglutarate alors que SsuD est une monooxygénase dépendante du FMNH<sub>2</sub>. Le FMNH<sub>2</sub> est fourni par la protéine SsuE qui est une FMN réductase dépendante du NAD(P)H. Chez *B. subtilis*, la protéine SsuD présente 64% d'identité avec SsuD d'*E. coli*. Cependant, l'opéron *ssu* de *B. subtilis* ne contient pas de gène *ssuE* et aucun équivalent de la protéine TauD d'*E. coli* n'est aussi présent. Ceci suggère un système unique de transport et d'assimilation des sulfonates chez cette bactérie. *C. glutamicum* possède plusieurs monooxygénases dépendantes du FMNH<sub>2</sub> (Koch *et al.*, 2005b) qui dégradent différents types de sulfonates. Les protéines SsuD1 et SsuD2 codées par l'opéron *ssuDICBA* et le gène *ssuD2*, respectivement (Ruckert *et al.*, 2005) sont impliquées dans le catabolisme des sulfonates aliphatiques. Leur spécificité de substrat est chevauchante et seul un double mutant *ssuD1 ssuD2* est incapable de croître en présence de sulfonates aliphatiques comme le méthanesulfonate et de taurine comme seule source de soufre. Le gène *ssuD2* se situe sur le chromosome juste après les gènes *seuABC*. Ces gènes codent pour des monooxygénases dépendantes du FMNH<sub>2</sub> qui semblent permettre la désulfonation d'esters de sulfonates comme le butanesulfone ou l'éthyl-méthane sulfonate. Cependant, seul un mutant *ssuD1 ssuD2 seuABC* est incapable de pousser sur ces composés. Le FMNH<sub>2</sub> est fourni dans tous les cas par la protéine SsuI qui est une FMN réductase. Cette protéine qui ne présente pas de similitudes avec SsuE d'*E. coli* est essentielle à l'utilisation des sulfonates et des esters de sulfonates chez *C. glutamicum* (Ruckert *et al.*, 2005).



## **B- Métabolisme de la cystéine**

Chez les êtres vivants, la synthèse de novo de la cystéine peut se faire i) à partir du sulfure présent dans l'environnement ou provenant de la réduction du sulfate, par la voie de thiolation (Kredich, 1996), ii) à partir d'homocystéine par la voie de transsulfuration inverse (Figure 6). La thiolation est la voie la plus utilisée chez les bactéries, les champignons et les plantes, alors que la voie de transsulfuration inverse est plus communément utilisée chez les mammifères et les levures bien qu'elle soit également retrouvée chez certaines bactéries.

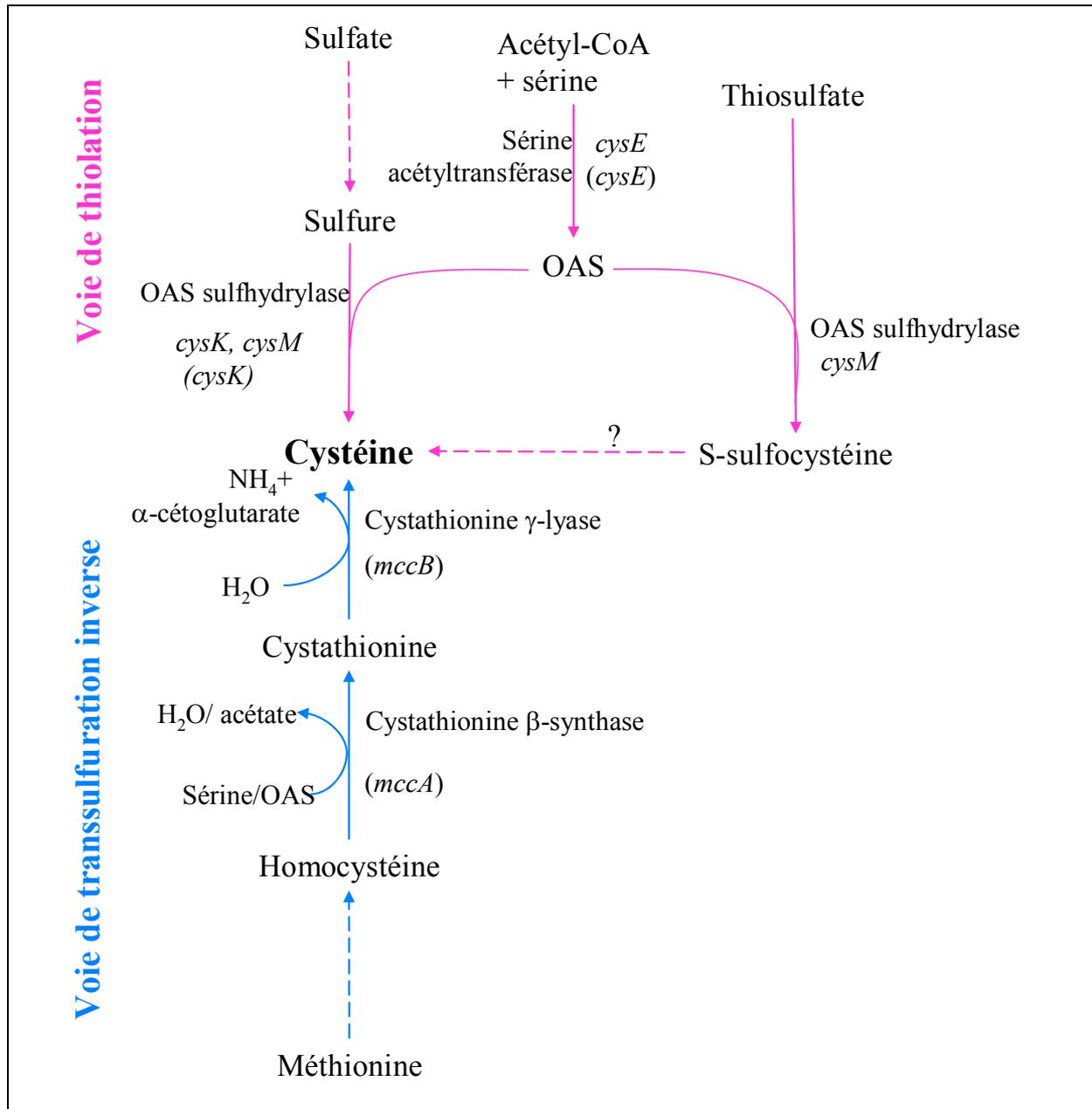
### **B-1-La voie de thiolation**

Cette voie permet la synthèse de la cystéine à partir de la sérine en deux étapes successives. La première étape consiste à former de *O*-acétyl-sérine (OAS) grâce l'*O*-acétyltransférase ou sérine acétyltransférase, CysE ; la seconde étape consiste à condenser l'OAS et le sulfure pour synthétiser de la cystéine par l'OAS-sulfhydrase ou OAS thiol-lyase, CysK (Figure 6).

Chez *E. coli* et *S. typhimurium*, c'est la seule voie de biosynthèse de la cystéine. En effet, ces bactéries sont incapables de croître en présence de méthionine comme seule source de soufre. L'OAS est synthétisé par l'acétylation de la sérine en utilisant de l'acétyl-CoA. Cette réaction est catalysée par la sérine acétyltransférase, CysE. Chez *E. coli*, l'expression du gène *cysE* est constitutive. La régulation de la synthèse d'OAS a lieu au niveau enzymatique avec une répression de l'activité de CysE en présence de cystéine (Kredich, 1996). Chez *E. coli* et *S. typhimurium*, la cystéine est ensuite synthétisée par 2 OAS thiol-lyases utilisant le pyridoxal-phosphate (PLP) comme cofacteur. Les gènes *cysK* et *cysM* codent pour les OAS thiol-lyases, A et B, qui présentent 43 % d'identité entre elles (Kredich, 1996). CysM diffère de CysK par sa capacité à utiliser le thiosulfate à la place du sulfure pour former de la S-sulfocystéine qui sera ensuite dégradée en cystéine par une enzyme qui n'est pas encore identifiée (Nakamura *et al.*, 1984). Un mutant *cysM* n'est plus capable de croître en présence de thiosulfate. En revanche, l'inactivation de *cysK* ou de *cysM* n'affecte pas la croissance de la bactérie en présence de sulfate alors qu'un double mutant  $\Delta cysK \Delta cysM$  est incapable de se développer dans ces conditions (Hulanicka *et al.*, 1979) (Sirko *et al.*, 1987).

Chez *E. coli*, l'OAS-thiol-lyase CysK mais pas CysM est complexée à la sérine acétyltransférase, CysE pour former un complexe bi-enzymatique nommé cystéine synthase (Zhao *et al.*, 2006), (Mino *et al.*, 1999). Ce complexe est également observé chez les plantes

(Bogdanova et Hell, 1997), (Bonner *et al.*, 2005). Cependant, son rôle exact n'est pas encore bien défini.



**Figure 6. Voies de biosynthèse de la cystéine.** Les gènes impliqués dans les différentes voies sont indiqués chez *E. coli* et chez *B. subtilis* (entre parenthèses). Les flèches roses indiquent les étapes de la voie thiolation. Cette voie est l'unique voie de biosynthèse de la cystéine chez *E. coli* qui ne possède pas la voie de transsulfuration. Les flèches bleues indiquent les étapes de la voie de transsulfuration inverse. Cette voie est présente chez les mammifères les levures et quelques bactéries. Les flèches en pointillé représentent plusieurs étapes enzymatiques. OAS : O-acétylsérine ; ? : enzyme(s) non identifiée(s).

La voie de thiolation est aussi présente chez *B. subtilis* et *C. glutamicum*. Chez *B. subtilis*, le gène *cysE* codant pour la sérine acétyltransférase fait partie d'un opéron contenant également les gènes *gltX* et *cysS* qui codent respectivement pour la glutamyl-ARNt synthétase et la cystéinyl-ARNt synthétase. L'expression du gène *cysE* est régulée par un mécanisme de

terminaison précoce de la transcription via un motif de type boîte T spécifique de la cystéine (Gagnon *et al.*, 1994). Comme ce qui est observé chez *E. coli*, l'activité de l'enzyme CysE est inhibée en présence de cystéine et nous verrons que ce contrôle allostérique joue un rôle important dans la régulation du métabolisme de la cystéine par le régulateur CymR via la modulation de la synthèse de l'OAS (Tanous *et al.*, 2008). Trois protéines de la famille des OAS thiol-lyases (CysK, MccA et YtkP) sont présentes chez *B. subtilis* (Hullo *et al.*, 2007). CysK est l'OAS thiol-lyase majeure. En effet, CysK et MccA possèdent cette activité *in vitro*, cependant MccA reste beaucoup moins active que CysK. De plus, la croissance d'un mutant  $\Delta cysK$  est très affectée en présence de sulfate alors que le mutant  $\Delta mccA$  croît normalement dans les mêmes conditions. Nous verrons dans le chapitre suivant que MccA est une cystathionine  $\beta$ -synthase. La fonction exacte de YtkP n'a pas encore été caractérisée.

Chez *C. glutamicum*, les gènes *cysE* et *cysK* sont adjacents sur le chromosome mais ne forment pas un opéron (Rey *et al.*, 2005). De plus, ces gènes ne semblent pas être régulés de la même façon. En effet, *cysK* fait parti du régulon McbR mais pas *cysE*. Le gène *cysE* semble être régulé par la présence de méthionine (Haitani *et al.*, 2006).

## **B-2-La voie de transsulfuration inverse**

La voie de transsulfuration inverse permet la formation de cystéine à partir d'homocystéine via la cystathionine. Elle n'est pas présente chez *E. coli*, *S. typhimurium* ou encore chez les plantes (Giovanelli, 1987). Par contre, on la retrouve chez les mammifères comme le rat ou l'homme (Finn *et al.*, 2006), les levures (Thomas et Surdin-Kerjan, 1997), les champignons comme *Neurospora crassa* ou *Aspergillus nidulans* (Jacobson et Metzberg, 1977) ou encore certaines bactéries comme *B. subtilis*, *M. tuberculosis*, *Klebsiella pneumoniae* ou *Lactobacillus casei* (Zhou et White, 1991 ; Hullo *et al.*, 2007) (Seiflein et Lawrence, 2001) (Irmeler *et al.*, 2009). Cette voie confère à la plupart des organismes la capacité de se développer en utilisant la méthionine comme seule source de soufre. La méthionine est d'abord convertie en homocystéine. La méthionine donne d'abord de la S-adénosyl-méthionine (SAM). La voie de recyclage de la SAM via la S-adénosyl-homocystéine (SAH) permet de produire ensuite de l'homocystéine (Fig. 4). Cette voie sera décrite en détail au chapitre I.C2. L'homocystéine permet ensuite la formation de cystéine via la voie de transsulfuration inverse (Figure 6).

La synthèse de cystéine à partir d'homocystéine se fait en 2 étapes par l'action successive de 2 enzymes, une cystathionine  $\beta$ -synthase (CBS) et une cystathionine  $\gamma$ -lyase (CGL). Ces enzymes utilisent le PLP comme cofacteur. La CBS est une enzyme qui présente des

similitudes avec les OAS thiol-lyases alors que la CGL appartient à la même famille que les cystathionine  $\beta$  ou  $\gamma$ -lyases, les méthionines  $\gamma$ -lyases, les cystathionine  $\gamma$ -synthases et les O-acétylhomosérine sulfhydrylases (Mehta et Christen, 2000).

#### La cystathionine $\beta$ -synthase (CBS)

Cette enzyme est impliquée dans la première étape de cette voie et utilise le PLP comme cofacteur. La cystathionine est formée par réaction entre l'homocystéine et la sérine (Figure 6). Cette enzyme a principalement été étudiée chez les eucaryotes. Elle a été purifiée chez la levure (Ono *et al.*, 1994) et l'homme (Meier *et al.*, 2001) et sa structure a été déterminée. Chez *S. cerevisiae*, la CBS est codée par le gène *cys4* (Cherest et Surdin-Kerjan, 1992 ; Ono *et al.*, 1994) Un mutant  $\Delta cys4$  nécessite la présence de cystéine pour se développer (Cherest et Surdin-Kerjan, 1992 ; Cherest *et al.*, 1993). Le gène codant la CBS humaine est capable de compléter le mutant  $\Delta cys4$  de la levure (Kruger et Cox, 1994).

Quelques études ont été menées sur les CBS bactériennes. Chez *K. pneumoniae*, les enzymes de la voie de transsulfuration inverse sont codées par l'opéron *mtcBC* (Seiflein et Lawrence, 2006). L'expression de cet opéron est induite par la carence en cystéine. Un mutant  $\Delta mtcBC$  est toujours capable de croître en milieu liquide en présence de méthionine comme seule source de soufre, suggérant l'existence d'une autre voie de conversion de la méthionine en cystéine chez cet organisme (Seiflein et Lawrence, 2006).

Chez *B. subtilis*, le gène *mccA* code la CBS. Ce gène forme un opéron avec les gènes *yrrTmtnNmccAmccByrhC* (Hullo *et al.*, 2007) dont l'expression est régulée par le répresseur pleiotrope du métabolisme de la cystéine, CymR (Chapitre II D-2). L'enzyme MccA présente une particularité puisqu'elle utilise l'homocystéine et l'OAS comme substrats, contrairement aux autres CBS caractérisées biochimiquement qui utilisent l'homocystéine et la sérine (Hullo *et al.*, 2007) (Figure 6). Chez *B. subtilis*, un mutant *mccA* est auxotrophe pour la méthionine.

#### La cystathionine $\gamma$ -lyase (CGL)

La cystathionine  $\gamma$ -lyase (CGL) catalyse le clivage de la cystathionine, seconde étape de la biosynthèse de la cystéine à partir d'homocystéine. Chez la levure, la CGL est codée par le gène *cys3* (Yamagata *et al.*, 1993). Un mutant  $\Delta cys3$  ne peut pas se développer sans cystéine (Cherest et Surdin-Kerjan, 1992) (Cherest *et al.*, 1993). Contrairement aux CBS, les CGL ont été plus largement étudiées chez les procaryotes. Chez *B. subtilis*, le gène *mccB* code pour une CGL. L'activité cystathionine  $\gamma$ -lyase de MccB a été mise en évidence *in vitro*. MccB possède également une activité homocystéine  $\gamma$ -lyase permettant la formation directe de sulfure à

partir d'homocystéine (Hullo *et al.*, 2007). Cette réaction est accompagnée de la formation de pyruvate et des ions ammoniums. Le sulfure ainsi formé peut par la suite être transformé en cystéine par l'action de CysK. Étonnamment, les mutants *luxS* et *mccA* sont incapables de croître en présence de méthionine comme seule source de soufre alors qu'un mutant  $\Delta mcbB$  pousse normalement dans les mêmes conditions. Ceci suggère l'existence d'une deuxième cystathionine  $\gamma$ -lyase chez *B. subtilis*.

Malgré la présence des gènes impliqués dans le recyclage de la SAM (Figure 8) et des gènes *mccA* et *mccB* (Figure 6), *S. aureus* ne peut pas se développer en présence de méthionine comme seule source de soufre. Cependant, elle est capable d'utiliser l'homocystéine. Ces résultats suggèrent que la voie de transsulfuration inverse, codée par les gènes *mccA* et *mccB* est fonctionnelle (Soutourina *et al.*, 2009a). L'expression de cet opéron est également régulée par le régulateur CymR de *S. aureus*. Les analyses *in silico* ont montré la présence de cette voie chez d'autres bactéries à Gram positif. On retrouve ainsi des gènes homologues à *mccA* et *mccB* de *B. subtilis* chez d'autres bacillales et certaines clostridies (Rodionov *et al.*, 2004).

Chez *Streptomyces phaeochromogenes*, *L. lactis* et *Lactobacillus fermentum*, la protéine a été purifiée et caractérisée (Nagasawa *et al.*, 1984) (Bruinenberg *et al.*, 1997) (Dobric *et al.*, 2000) (Smacchi et Gobbetti, 1998). Chez *M. tuberculosis*, le gène *metB* code une enzyme possédant à la fois une activité cystathionine  $\gamma$ -lyase et cystathionine  $\gamma$ -synthase. Un mutant  $\Delta metB$  de *M. tuberculosis* ne peut plus convertir la cystéine en homocystéine et inversement (Wheeler *et al.*, 2005).

### **B-3- Transport de la cystine et de la cystéine**

Dans un environnement oxydant, un pont disulfure se forme entre les groupements thiols libres de deux cystéines pour former la cystine. Ainsi, dans la nature, la cystéine doit majoritairement être sous cette forme dimérisée. Dans un milieu réducteur, la réaction inverse s'effectue. Les micro-organismes possèdent des systèmes permettant l'entrée de la cystine ou de la cystéine pour répondre à leurs besoins métaboliques.

Chez *E. coli*, deux transporteurs de cystine ont été identifiés. Le premier système semble être un transporteur spécifique à la cystine mais dont les gènes n'ont toujours pas été identifiés (Kredich, 1996). Le second, un ABC transporteur, dont la protéine FliY fixe la cystine (Butler *et al.*, 1993) est induit dans des conditions de carence en soufre (Quadroni *et al.*, 1996). Cet ABC transporteur de la cystine est formé par FliY, YecC et YecS (Kertesz,

2001). Les gènes codant ces trois protéines sont situés à proximité sur le chromosome. Le gène *fliY* est en opéron avec les gènes *fliA* et *fliZ* qui codent respectivement pour un facteur sigma alternatif  $\sigma^E$  impliqué dans l'expression des gènes de synthèse des flagelles et une protéine de fonction inconnue. Ce système d'entrée de la cystine d'*E. coli* présente une forte affinité pour ce composé ( $K_M = 0,3 \mu\text{M}$ ) et permet également l'entrée de nombreux analogues de la cystine. Chez *S. typhimurium*, le transport de la cystine est assuré par trois systèmes de transport CTS-1, CTS-2 et CTS-3 (Baptist et Kredich, 1977) mais les gènes correspondants n'ont pas été identifiés.

Chez *B. subtilis*, la cystine est transportée par trois systèmes distincts : deux ABC transporteurs, TcyABC et TcyJKLMN, et un symporteur cystine/cation, TcyP (Burguiere *et al.*, 2004). Le transporteur TcyABC possède une faible affinité pour la cystine, et son expression est constitutive. En revanche, les transporteurs TcyP ( $K_M=0,6 \mu\text{M}$ ) et TcyJKLMN ( $K_M=2,5 \mu\text{M}$ ) constituent des transporteurs à haute affinité. Un triple mutant  $\Delta\text{tcyP}$ ,  $\Delta\text{tcyJKLMN}$ ,  $\Delta\text{tcyA}$  est incapable de croître en présence de L-cystine comme seule source de soufre et donc de transporter la L-cystine. Le symporteur TcyP est capable de transporter la cystéine en plus de la cystine mais moins efficacement. L'expression de *tcyP* et *tcyJKLMN* est réprimée en présence de cystéine. Un ABC transporteur de la cystine a également été caractérisé chez la bactérie lactique *L. fermentum*. Un lien étroit entre ce transporteur de la cystine et le stress oxydatif a été mis en évidence (Turner *et al.*, 1999) (Hung *et al.*, 2003). En effet, un défaut d'entrée de la cystine dû à une interruption de ce transporteur entraîne une surproduction de peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) et en conséquence une sensibilité accrue de *L. fermentum* à l'oxygène (Hung *et al.*, 2003). Chez *C. glutamicum*, une étude sur un régulateur du métabolisme de la cystéine, CysR (Chapitre II D-3), a montré une répression du gène *cg2810* par ce régulateur. Les auteurs proposent que ce gène code un transporteur à faible affinité de la cystine qui appartient à la famille des symporteurs  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -dicarboxylate (Ruckert et Kalinowski, 2008).

En raison du fort potentiel réducteur de son groupement thiol, la cystéine est un composé très réactif. A forte concentration, elle a des effets toxiques sur les organismes vivants (inhibition d'activités enzymatiques et de la croissance). Les microorganismes ont développé des systèmes d'efflux de cet acide aminé. Les systèmes d'excrétion de la cystéine ont été étudiés principalement chez *E. coli*. Trois systèmes codés par les gènes *cydDC*, *ydeD* et *yfiK* ont été identifiés (Pittman *et al.*, 2002) (Dassler *et al.*, 2000 ; Franke *et al.*, 2003). L'inactivation de *ydeD* ne provoque aucun phénotype apparent, mais sa surexpression entraîne une forte excrétion de cystéine dans le milieu (Dassler *et al.*, 2000). Cependant, la

forme sous laquelle la cystéine est transportée n'a pas encore été clairement déterminée. Il pourrait s'agir de cystéine, de cystine ou d'acide 2-méthyl-2,4-thiazolidinedicarboxylique qui résulte de la condensation spontanée de la cystéine et du pyruvate. Les protéines YvbV et YoaV de *B. subtilis*, homologues de YdeD d'*E. coli*, pourraient avoir la même fonction. CydDC est un ABC transporteur nécessaire à la formation et l'assemblage du cytochrome *bd* qui a aussi une activité d'excrétion de la cystéine.

#### **B-4- Le mycothiol**

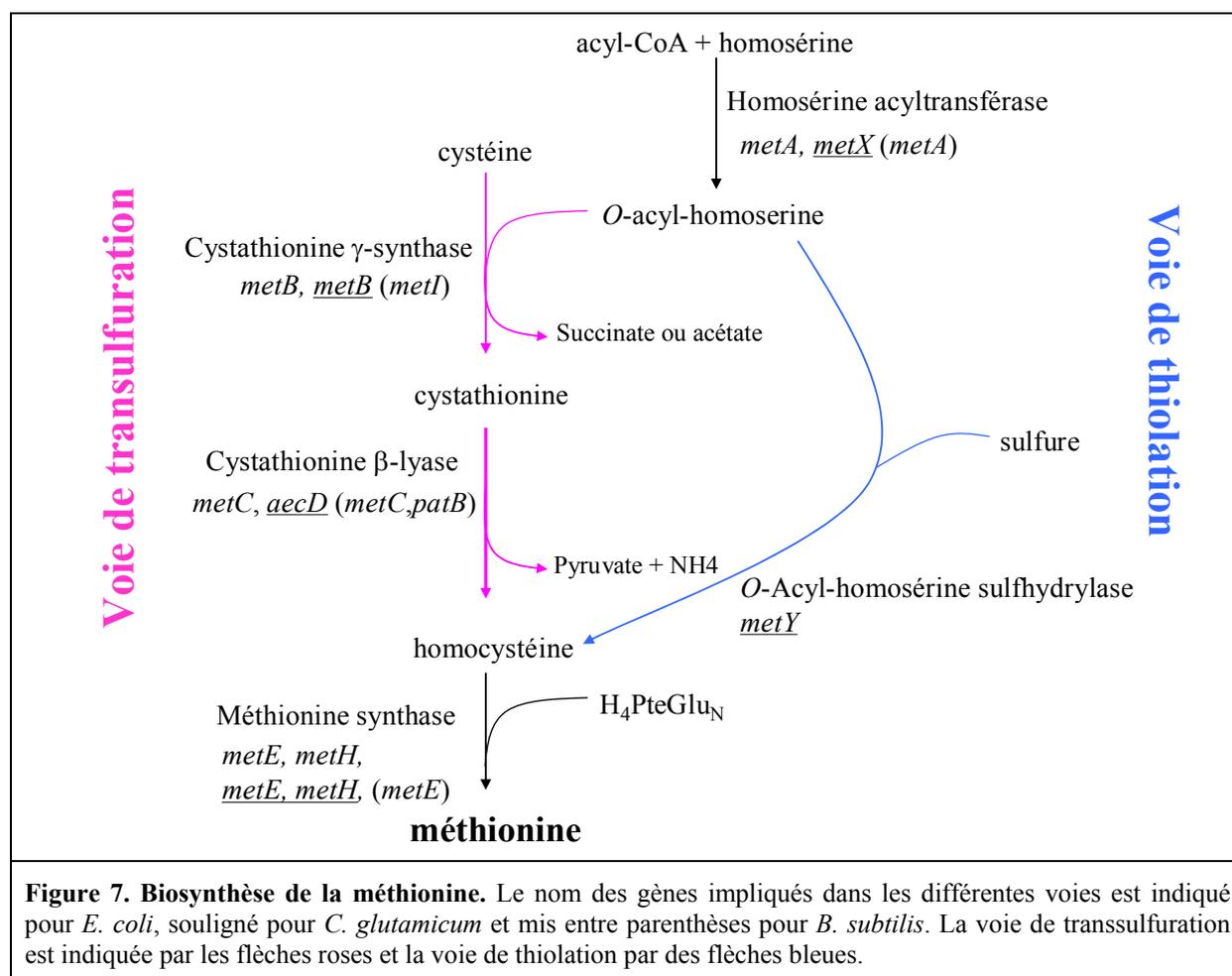
Il existe chez les microorganismes des composés dérivés de la cystéine qui possèdent un groupement thiol et sont impliqués dans le maintien de l'homéostasie redox intracellulaire. Ces composés sont le glutathion chez les bactéries à Gram-négative, les eucaryotes et les cyanobactéries, le bacillithiol chez les Bacillacées et le mycothiol (MSH) chez certaines *Actinomycetales* comme les *Streptomyces*, les *Nordioforms* ou les *Corynebacteriaceae* (Newton *et al.*, 1996). Le MSH est un pseudodisaccharide qui possède un groupement thiol donné par la cystéine. La voie de biosynthèse a été identifiée chez *Mycobacterium smegmatis* (Newton *et al.*, 1999) (Newton *et al.*, 2003). La première étape de la biosynthèse est la formation du N-acetylglucosaminyl-inositol par une glycosyltransférase qui est le produit du gène *mshA*. Ce composé est ensuite déacétylé en glucosaminyl-inositol par MshB, une MSH déacétylase (Newton *et al.*, 2000 ; Buchmeier *et al.*, 2003). La troisième étape consiste en la fixation de la cystéine sur le glucosaminyl-inositol par une MSH ligase codée par le gène *mshC* (Bornemann *et al.*, 1997), (Anderberg *et al.*, 1998 ; Rawat *et al.*, 2002 ; Sareen *et al.*, 2003). Enfin, la dernière étape de la biosynthèse du MSH est la N-acétylation du composé cystéine-glucosaminyl-inositol par le MSH synthase, le produit du gène *mshD*.

#### **C- Métabolisme de la méthionine**

La méthionine est un métabolite clé pour différents processus cellulaires. Cette molécule participe au démarrage de la traduction des ARN messagers sous forme de *N*-formylméthionine. Il est le précurseur de la *S*-adénylméthionine (SAM) impliquée dans de nombreuses réactions de méthylation. Il joue aussi un rôle très important chez certains microorganismes d'intérêt technologique. En effet, il est impliqué dans la formation de composés soufrés volatils, participant ainsi à la flaveur des fromages (Paragraphe I B-2).

## C-1- Biosynthèse de la méthionine

La biosynthèse de la méthionine s'effectue en trois étapes successives à partir d'homosérine d'une part et de cystéine ou de sulfure, d'autre part : i) une réaction d'acylation de l'homosérine ; ii) la synthèse d'homocystéine par la voie de transsulfuration utilisant la cystéine comme précurseur ou la voie de thiolation qui incorpore directement le sulfure ; iii) la méthylation de l'homocystéine pour donner de la méthionine (Figure 7).



### Synthèse de l'acyl-homosérine

L'homosérine est un dérivé de l'aspartate. Chez *C. glutamicum*, *B. subtilis* et *E. coli*, l'aspartate est convertie successivement en aspartate 4-phosphate puis en aspartate semi-aldehyde et enfin en homosérine. L'homosérine subit une réaction d'acylation catalysée par une acyl-transférase. Il s'agit d'une homosérine phosphoryl-, succinyl- ou acétyl-transférase selon les organismes. En effet, les bactéries à Gram négatif utilisent pour la plupart le succinyl-CoA comme substrat alors que les bactéries à Gram positif, les levures et les

champignons utilisent l'acétyl-CoA (Thomas et Surdin-Kerjan, 1997). Ces réactions donnent lieu à la formation d'*O*-succinylhomosérine ou d'*O*-acétylhomosérine. La succinyl-transférase est codée par le gène *metA* chez *E. coli* (Figure 7). L'activité de MetA est réprimée en présence de méthionine et de SAM chez ce microorganisme. Chez *B. subtilis*, l'homosérine acétyltransférase est codée par le gène *metA* et catalyse la synthèse de l'*O*-acétylhomosérine à partir d'homosérine et d'acétyl-CoA (Brush et Paulus, 1971). Comme chez *E. coli*, son activité est réprimée en présence de méthionine ou de SAM. Il existe deux types d'homosérine acétyl-transférases, MetA et MetX qui ne sont pas homologues. Il n'y a pas d'inhibition de MetX par la SAM contrairement à ce qui est observé pour MetA. Des protéines de type MetX sont présentes chez *C. glutamicum*, *S. aureus* et les *Listeria* (Rey *et al.*, 2005) (Rodionov *et al.*, 2004) (Hwang *et al.*, 2002). L'acyl-homosérine peut ensuite être transformée en homocystéine par deux voies différentes, la voie de transsulfuration ou la voie de thiolation.

#### La voie de transsulfuration

Cette voie se fait en deux étapes par l'action successive de deux enzymes : la cystathionine  $\gamma$ -synthase et la cystathionine  $\beta$ -lyase. Dans un premier temps, l'acyl-homosérine réagit avec la cystéine pour donner de la cystathionine via l'action d'une cystathionine  $\gamma$ -synthase codée par le gène *metB* chez *E. coli* et le gène *metI* chez *B. subtilis*, avec la production de succinate ou d'acétate, respectivement (Duchange *et al.*, 1983) (Auger *et al.*, 2002a) (Figure 7). Chez les bactéries à Gram-positif à haut contenu en GC, comme *C. glutamicum* ou *M. tuberculosis*, cette enzyme est codée par le gène *metB*, et utilise l'acétyl-homosérine comme substrat. Chez *M. tuberculosis*, ce gène semble posséder une double activité cystathionine  $\gamma$ -synthase et cystathionine  $\gamma$ -lyase (Wheeler *et al.*, 2005).

La cystathionine est ensuite clivée en homocystéine, pyruvate et ammoniacque par une cystathionine  $\beta$ -lyase. Deux types de cystathionine  $\beta$ -lyase qui ne présentent aucune similitude entre elles existent chez les bactéries : la famille MetC qui est présente chez *E. coli* (Belfaiza *et al.*, 1986), *B. subtilis* et de nombreuses bactéries et la famille PatC/PatB. Chez *C. glutamicum*, une enzyme de la famille PatB/PatC qui est codée par le gène *aecD* est présente (Rossol et Puhler, 1992) (Kim *et al.*, 2001). Chez *B. subtilis*, les deux types de cystathionine  $\beta$ -lyases, MetC et PatB sont trouvés. Des mutants  $\Delta metB$  et  $\Delta metC$  d'*E. coli* et un mutant *metI* de *B. subtilis* sont auxotrophes pour la méthionine alors que des mutants  $\Delta metC$  ou  $\Delta patB$  de *B. subtilis* poussent sur sulfate comme seule source de soufre. Seul un double mutant  $\Delta metC$

*ΔpatB* est incapable de croître en présence de sulfate ou de cystéine et nécessite de la méthionine pour sa croissance. Chez *E. coli* et *B. subtilis*, cette voie semble être l'unique voie de formation de l'homocystéine.

#### La voie de thiolation

Cette voie permet la condensation du sulfure sur l'acyl-homosérine pour former directement de l'homocystéine, permettant ainsi de court-circuiter la formation de cystathionine (Figure 7) (Yamagata *et al.*, 1993). Cette réaction est catalysée par une *O*-acyl-homosérine thiol-lyase codée par un gène nommé *metY* ou *metZ* suivant les microorganismes. Cette enzyme présente des similitudes avec les cystathionine  $\gamma$ -synthases et les cystathionine  $\beta$ -lyases impliquées dans la voie de transsulfuration, mais présente une insertion de 30 acides aminés supplémentaires. La voie de thiolation est présente chez *C. glutamicum* (Hwang *et al.*, 2002), *P. aeruginosa* (Fogolino *et al.*, 1995) ou *S. cerevisiae* (Thomas et Surdin-Kerjan, 1997). Chez *C. glutamicum*, les gènes *metX* et *metY* sont en opéron. Ces organismes possèdent les deux voies de biosynthèse de l'homocystéine, transsulfuration et thiolation. La voie de thiolation est utilisée préférentiellement par *S. cerevisiae* et *P. aeruginosa* (Fogolino *et al.*, 1995) (Thomas et Surdin-Kerjan, 1997). Chez *C. glutamicum*, les deux voies semblent utilisées de manière équivalente. Seul un double mutant  $\Delta metB \Delta metY$  est auxotrophe pour la méthionine (Hwang *et al.*, 2002 ; Hwang *et al.*, 2007). Par contre, *Leptospira meyeri* ne possède que la voie de thiolation (Belfaiza *et al.*, 1998).

#### Méthylation de l'homocystéine

La dernière étape cette voie de biosynthèse est la production de la méthionine via une méthylation de l'homocystéine. Cette réaction est catalysée par des méthionine-synthases de la famille MetH ou MetE. Le groupement méthyle utilisé lors de cette réaction provient du tétrahydroptérol mono ou tri-glutamate ( $H_4PteGlu_{1/3}$ ) qui sont des dérivés de l'acide folique. Les deux étapes nécessaires à la synthèse de ces composés sont catalysées par une sérine hydroxyméthyltransférase, GlyA, puis une méthylène tétrahydro-folate réductase, MetF (Greene, 1996). Chez *E. coli* et *C. glutamicum*, deux types de méthionine-synthase sont présentes. MetH utilise la vitamine B12 comme cofacteur et la forme tri-glutamate comme substrat. MetE ne nécessite pas de vitamine B12 et peut quant à elle utiliser les formes mono ou tri-glutamate comme substrat de méthylation (Greene, 1996). Chez *B. subtilis*, une seule méthionine synthase, MetE qui fonctionne indépendamment de la vitamine B<sub>12</sub> est présente (Auger *et al.*, 2002b). La protéine YitJ est la méthylène tétrahydrofolate réductase. Des

mutants *metE* et *yitJ* sont auxotrophes pour la méthionine et l'expression de *metE* et *yitJ* est régulée par terminaison précoce de la transcription via un motif boîte S (Grundy et Henkin, 1998).

## C-2- Biosynthèse, recyclage et dégradation de la S-adenosylméthionine

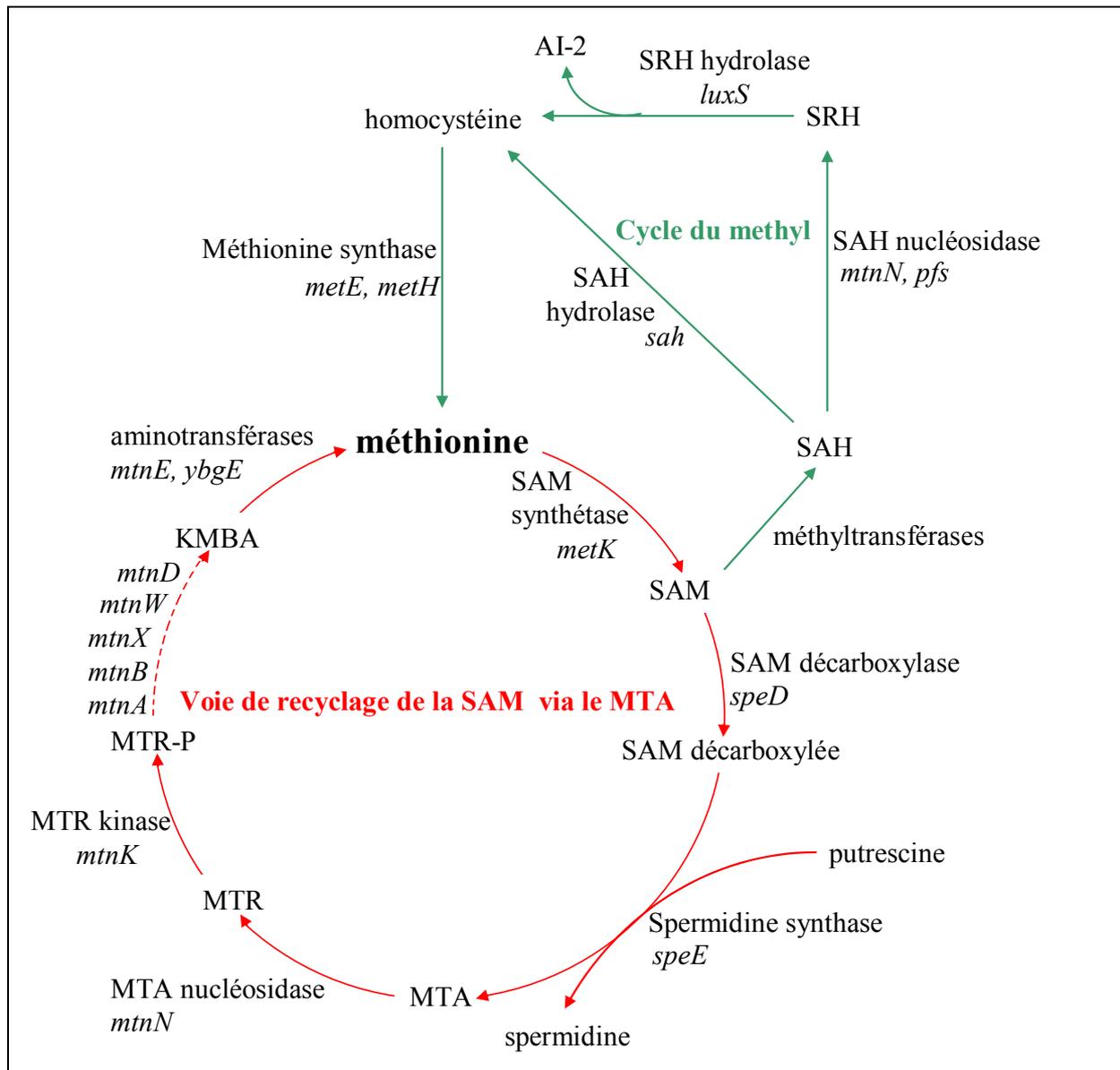
La méthionine est le précurseur de la SAM qui est un élément essentiel du métabolisme cellulaire. Ce composé est un donneur universel de méthyle pour un grand nombre de réactions de méthylation qui permettent par exemple la protection de l'ADN contre les enzymes de restriction ou participent aux nombreuses étapes du métabolisme cellulaire qui nécessitent la méthylation d'un substrat. La SAM est aussi importante pour la synthèse des polyamines en fournissant après décarboxylation le groupement aminopropyle nécessaire à la synthèse de la spermidine. La SAM est obtenue par condensation de la méthionine et de l'ATP par la méthionine adénosyltransferase synthétase, MetK. Cette réaction s'accompagne de l'hydrolyse de l'ATP en phosphate et pyrophosphate. L'enzyme MetK est une enzyme essentielle chez de nombreux microorganismes. La synthèse de méthionine à partir de sulfate étant très coûteuse en énergie, la cellule est capable de recycler les produits issus du catabolisme de la SAM, et plusieurs voies de recyclage de la SAM ont été identifiées.

### Recyclage de la S-adenosylméthionine via la S-adenosylhomocystéine

Le produit des réactions de méthylation ayant la SAM pour donneur de méthyle est la SAH. Dans cette voie de recyclage, la SAH va former de l'homocystéine en une ou deux étapes (Figure 8). Dans le premier cas, une SAH hydrolase produit directement de l'adénosine et de l'homocystéine à partir du SAH. Cette voie est principalement trouvée chez les eucaryotes ainsi que chez certaines bactéries (Winzer *et al.*, 2002), (Stepkowski *et al.*, 2005), (Takata *et al.*, 2002) (Figure 8). Lorsque ce recyclage se fait en deux étapes, la première réaction implique une SAH nucléosidase qui clive le SAH et forme de l'adénine et de la S-ribosyl-homocystéine (SRH). Cette nucléosidase est codée par le gène *pfs* chez *E. coli* et *mtnN* chez *B. subtilis* (Figure 8). La SRH est ensuite dégradée en homocystéine par une SRH hydrolase codée par le gène *luxS*. Cette réaction entraîne également la formation de 4,5-dihydroxy 2,3-pentanedione (DPD) qui après une cyclisation spontanée se lie au borate pour donner l'autoinducteur 2 (AI-2). Cette molécule est un médiateur du « quorum sensing » (Xavier et Bassler, 2003) (Pei et Zhu, 2004).

Les eucaryotes et les archaebactéries possèdent uniquement la voie de dégradation de la SAH en une seule étape alors que les bactéries peuvent posséder les deux voies alternatives

(Sun *et al.*, 2004). Enfin chez *S. cerevisiae*, il existe une dernière alternative qui fait intervenir une SAM-homocystéine méthyltransférase et permet la formation directe de méthionine et de SAH à partir de SAM et d'homocystéine (Thomas et Surdin-Kerjan, 1997). Suivant les besoins cellulaires, l'homocystéine formée peut ensuite servir à la synthèse de méthionine grâce à la méthionine synthase, ou de cystéine par la voie de transsulfuration inverse.



**Figure 8. Recyclage de la méthionine.** AI-2 : autoinducteur 2, SAM : S-adenosylméthionine, SAH : S-adenosylhomocystéine, SRH : S-ribosylhomocystéine, MTA : méthylthioadénosine, MTR : méthylthioribose, MTR-P : méthylthioribose phosphorylé, KMBA :  $\alpha$ -céto- $\gamma$ -méthylthiobutyrate. La voie de recyclage de la SAM via le MTA est indiquée par des flèches rouges et le cycle du méthyle est indiqué par les flèches vertes.

### Recyclage de la SAM via la méthylthioadénosine

La première étape de cette voie consiste à former de la SAM décarboxylée. Cette réaction est catalysée par la SAM décarboxylase codée par le gène *speD* (Figure 8). La SAM décarboxylée réagit ensuite avec la putrescine et entraîne la formation de spermidine et la méthyl-thio-adénosine (MTA) (Sekowska *et al.*, 2004). La spermidine synthase, codée par le gène *speE*, catalyse cette réaction. La MTA est clivée par une MTA nucléosidase pour donner de l'adénine et du méthyl-thio-ribose (MTR). Chez la plupart des organismes, c'est la même enzyme qui clive la SAH et le MTA (Cornell et Riscoe, 1998). Chez *K. pneumoniae* et *B. subtilis*, le MTR est ensuite recyclé en méthionine. En revanche, *E. coli* qui ne possède pas cette voie de recyclage, excrète du MTR à l'extérieur de la cellule (Furfine et Abeles, 1988) (Schroeder *et al.*, 1973 ; Sekowska et Danchin, 1999).

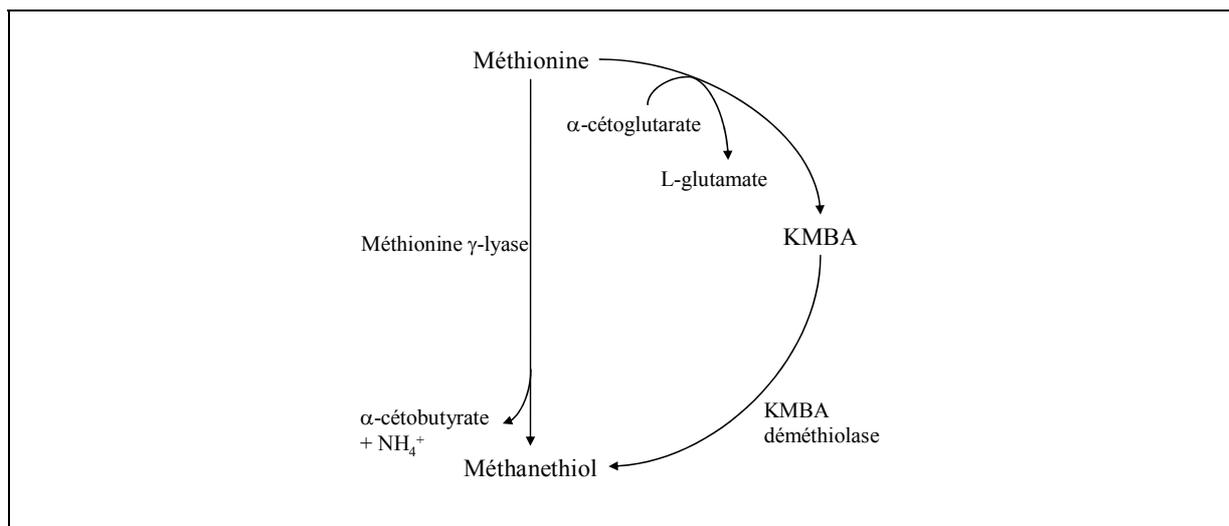
La voie de recyclage du MTA en méthionine a été caractérisée chez *K. pneumoniae* (Furfine et Abeles, 1988) puis plus récemment chez *B. subtilis*. Cette voie fait intervenir différentes enzymes aboutissant à la formation d' $\alpha$ -cétio  $\gamma$ -méthylthiobutyrate (KMBA) qui sera lui-même converti en méthionine. Chez *K. pneumoniae*, les activités enzymatiques des protéines impliquées dans cette voie ont été caractérisées mais les gènes impliqués dans ce recyclage ne sont pas encore clairement identifiés (Furfine et Abeles, 1988). Chez *B. subtilis*, les gènes impliqués dans le recyclage du MTA ont été caractérisés, et huit étapes sont nécessaires pour obtenir la méthionine (Figure 8). Le gène *mtnN* code une MTA nucléosidase responsable du clivage de la MTA en MTR, puis une MTR kinase codé par le gène *mtnK*, catalyse la formation du MTR-1-phosphate (MTR-1P) à partir du MTR. Un mutant *mtnN* ne peut pas croître en présence de MTA et un mutant *mtnK* est incapable de se développer en présence de MTR (Sekowska *et al.*, 2001 ; Murphy *et al.*, 2002). Le MTR-1P est ensuite converti en méthylthioribulose-1P par une isomérase, MtnA. Le méthylthioribulose-1P va donner du 1,2-dihydroxy-3-keto-5-méthylthiopentène par l'action successive d'une méthylthioribulose-1P déshydratase (MtnB), une 2,3-diketo-5-méthylthiophentyl-1P-énolase (MtnW) et une 2-hydroxy-3-keto-5-méthylthiophentyl-1P phosphatase (MtnX) (Sekowska et Danchin, 2002), (Ashida *et al.*, 2008). Puis, une aci-reductone dioxygénase (MtnD) oxyde le 1,2-dihydroxy-3-keto-5-méthylthiopentène pour former du 2-keto-4-méthylthiobutyrate (KMBA) et du formate, en présence d'oxygène. Enfin, la méthionine est obtenue par la transamination du KMBA, cette réaction est réalisée par les aminotransférases, MtnE et YbgE qui utilisent la glutamine, les acides aminés branchés, la phénylalanine ou la tyrosine comme donneurs (Berger *et al.*, 2003 ; Sekowska *et al.*, 2004).

### C-3- Dégradation de la méthionine

La méthionine peut subir des modifications sous l'action d'une méthionine  $\gamma$ -lyase, d'aminotransférases, de décarboxylases ou de désaminases. Différents produits soufrés issus du catabolisme de la méthionine peuvent être obtenus en particulier, le méthanethiol (MTL). Ce composé soufré volatil joue un rôle important dans la formation des arômes dans différents produits du terroir dont le fromage (Voir Chapitre I).

#### La voie de la méthionine $\gamma$ -lyase

La méthionine peut être dégradée en MTL par deux voies distinctes. Tout d'abord, la méthionine  $\gamma$ -lyase permet la synthèse du MTL directement par la déméthiolation de la méthionine. Cette réaction forme aussi de l' $\alpha$ -cétobutyrate et des ions ammoniums (Figure 9). Cette enzyme est dépendante du PLP et présente des similitudes avec les cystathionine  $\beta$  ou  $\gamma$ -lyases, les cystathionine  $\gamma$ -synthases et les *O*-acétylhomosérine sulfhydrylases. Elle a été purifiée et caractérisée chez différentes bactéries : *B. linens* (Dias et Weimer, 1998a), (Amarita *et al.*, 2004), *Pseudomonas putida* (Tanaka *et al.*, 1977), *Clostridium sporogenes* (Kreis et Hession, 1973), *Citrobacter freundii* (Manukhov *et al.*, 2005) et *Trichomonas vaginalis* (Lockwood et Coombs, 1991). Cette activité enzymatique est détectée dans des extraits bruts de plusieurs autres microorganismes comme *C. glutamicum* et *Geotrichum candidum* (Demarigny *et al.*, 2000 ; Bonnarme *et al.*, 2001). En plus de la méthionine, cette enzyme peut aussi utiliser la cystéine et l'homocystéine comme substrat pour former du H<sub>2</sub>S, des ions ammoniums, du pyruvate ou de l' $\alpha$ -cétobutyrate (Tanaka *et al.*, 1985).

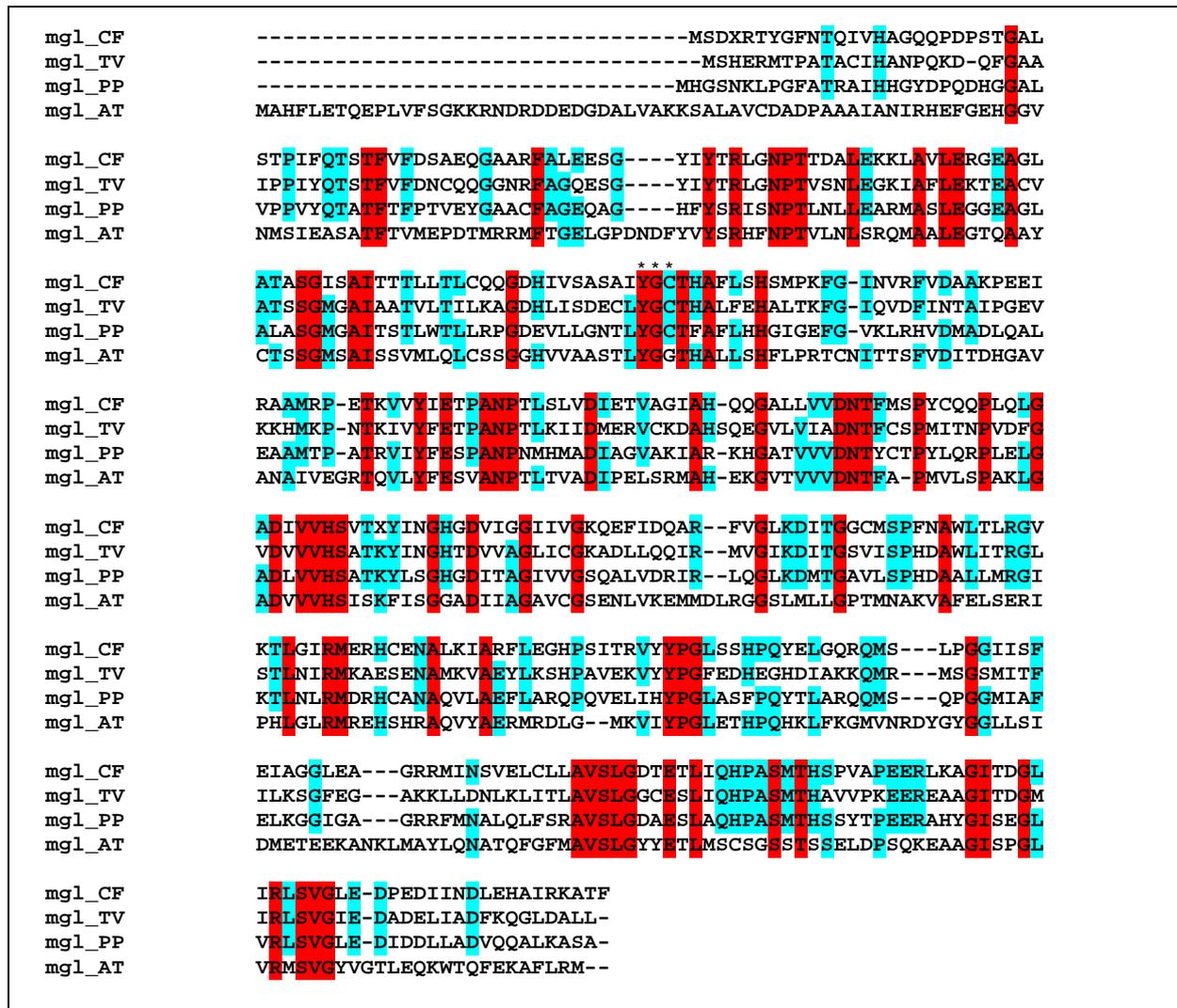


**Figure 9. Dégradation de la méthionine en méthanethiol.** Les enzymes impliquées dans les différentes voies sont indiquées. KMBA : α-céto γ-méthylthiobutyrate

Chez *P. putida* et *C. freundii*, l'expression du gène codant la méthionine  $\gamma$ -lyase est induite en présence de méthionine. De plus, l'activité méthionine  $\gamma$ -lyase dosée dans des extraits bruts de *B. linens* augmente en présence de méthionine ce qui suggère que la synthèse de cette enzyme est induite par cet acide aminé. Chez *P. putida*, le gène *mdeA* codant la méthionine  $\gamma$ -lyase est organisé en opéron avec le gène *mdeB* qui code une protéine homologue à la sous unité E1 du complexe pyruvate déshydrogénase. MdeB possède une activité déshydrogénase spécifique de l' $\alpha$ -cétobutyrate dont l'accumulation dans la cellule peut être toxique. Cette enzyme est impliquée dans la biosynthèse du propionate, un précurseur de l'isoleucine (Inoue *et al.*, 2003). Localisé en amont et transcrit de manière divergente, se trouve le régulateur MdeR. Cette protéine est un activateur transcriptionnel appartenant à la famille Lrp « Leucine Responsive regulator Protein » essentiel à l'expression de l'opéron *mdeAB* (Inoue *et al.*, 1997).

La structure tridimensionnelle des méthionine  $\gamma$ -lyases de *P. putida* et *C. freundii* a été déterminée. Ces études montrent que les sites actifs de ces 2 méthionine  $\gamma$ -lyases sont proches de ceux des cystathionine  $\gamma$ -lyases ou des cystathionine  $\beta$ -lyases d'*E. coli* (Motoshima *et al.*, 2000 ; Mamaeva *et al.*, 2005). De plus, une étude montre l'importance de la tyrosine 114 chez *P. putida* dans la réaction de  $\gamma$ -élimination (Inoue *et al.*, 2000) (Figure 10). Il semble aussi que les résidus glycine et cystéine présents en position 115 et 116 chez *P. putida* sont fortement conservés dans les méthionine  $\gamma$ -lyases bactériennes et pourraient participer au site de liaison avec le substrat (Figure 10).

Cette voie de dégradation de la méthionine impliquant une méthionine- $\gamma$ -lyase a aussi été décrite pour la première fois chez une plante, *Arabidopsis thaliana* (Rébeillé *et al.*, 2006). Cette enzyme semble pourtant être absente chez les mammifères.



**Figure 10. Alignement des méthionine  $\gamma$ -lyases de *Citrobacter freundii* (CF), *Pseudomonas putida* (PP), *Trichomonas vaginalis* (TV), *Arabidopsis thaliana* (AT).** En rouge, on observe les acides aminés conservés dans les 4 méthionine  $\gamma$ -lyases, en bleu, les acides aminés conservés dans 3 séquences. Les étoiles (\*\*\*)montrent le site fortement conservé chez les méthionine  $\gamma$ -lyases des bactéries « Y » participe à la  $\gamma$ -élimination et « GC » fixation de la méthionine.

Chez les bactéries lactiques, il a été montré que des enzymes impliquées dans la voie de biosynthèse de la méthionine et de cystéine peuvent participer dans la production de méthane-thiol. En effet, la cystathionine  $\beta$ -lyase de *L. lactis* ou la cystathionine  $\gamma$ -lyase de *Lactobacillus fermentum* peuvent catalyser *in vitro* la conversion de la méthionine en MTL mais avec une efficacité moins importante que celle des méthionine  $\gamma$ -lyases (Alting *et al.*, 1995) (Smacchi et Gobbetti, 1998).

### La voie de production du méthaneéthiol en deux étapes

La formation du méthaneéthiol à partir de la méthionine peut également s'effectuer en deux étapes via le  $\alpha$ -céto  $\gamma$ -méthylthiobutyrate (KMBA) (Figure 9). Une aminotransférase dégrade la méthionine en KMBA et glutamate. Cette activité est détectée chez différents micro-organismes tels que *B. aurantiacum*, *C. glutamicum*, *Y. lipolytica* et *G. candidum* (Bonnarme *et al.*, 2000) (Bonnarme *et al.*, 2001) (Arfi *et al.*, 2006) (Cernat-Bondar *et al.*, 2005). Chez *L. lactis*, les aminotransférases AraT et BcaT catalysent cette réaction (Yvon *et al.*, 1997 ; Yvon *et al.*, 2000). Le KMBA est ensuite décarboxylé en MTL (Figure 9). Cette réaction s'effectue par l'intervention d'une déméthiolase, mais pourrait également se réaliser spontanément (<10%). L'activité KMBA déméthiolase est présente chez des bactéries comme *B. aurantiacum*, *C. glutamicum* et chez des levures telles que *G. candidum* (Bonnarme *et al.*, 2000) (Bonnarme *et al.*, 2001). Chez *L. lactis*, la formation de MTL à partir de KMBA passerait par la formation transitoire de méthylthioéthanal dont la dégradation conduirait à une accumulation de MTL (Bonnarme *et al.*, 2004). De même, chez *S. cerevisiae*, le KMBA serait transformé en méthional puis ce composé serait à son tour dégradé en méthionol qui pourrait être impliqué dans la formation des arômes de la bière (Perpète *et al.*, 2006).

Chez certains micro-organismes comme *P. putida*, le MTL formé par la dégradation de la méthionine pourrait être recyclé vers la voie de biosynthèse des acides aminés soufrés. En effet, le MTL produit par la méthionine  $\gamma$ -lyase pourrait être oxydé en méthanesulfonate ( $\text{CH}_3\text{-SO}_3$ ). Le méthanesulfonate serait à son tour dégradé en sulfite ( $\text{SO}_3^{2-}$ ) par une monooxygénase, SsuD, dégradant le méthanesulfonate (Vermeij et Kertesz, 1999) (Paragraphe II A-3).

### **C-4- Transport de la méthionine**

Les premiers transporteurs de la méthionine ont été mis en évidence chez *E. coli* où 2 types de transporteurs de la méthionine sont présents. Le système MetD correspond au transporteur à haute affinité de la L-méthionine ( $K_m=75$  nM) mais il est aussi capable de transporter la D-méthionine ( $K_m= 1,2$   $\mu\text{M}$ ), la N-acétylméthionine, et la N-formylméthionine (Kadner et Watson, 1974 ; Kadner, 1975 ; Zhang *et al.*, 2003). Ce transporteur est codé par les gènes *metNIQ* et appartient à la famille de « Methionine Uptake Transporter » (Gal *et al.*, 2002) (Merlin *et al.*, 2002) (Zhang *et al.*, 2003). Les mutants pour ce système sont incapables

de transporter la D-méthionine, mais conservent une capacité à transporter la L-méthionine, grâce à la présence d'un second transporteur à faible affinité, MetP ( $K_m = 40 \mu\text{M}$ ) dont les gènes ne sont toujours pas caractérisés (Zhang *et al.*, 2003) (Greene, 1996). *S. typhimurium* possède plusieurs transporteurs de la méthionine dont un est à haute affinité, correspondant au système MetNIP présent chez *E. coli* (Ayling, 1981) (Betteridge et Ayling, 1975 ; Poland et Ayling, 1984), et deux à faible affinité (Ayling *et al.*, 1979).

*B. subtilis* possède un système de transport de la D/L-méthionine et de la méthionine sulfoxyde appartenant à la famille des transporteurs MUT. Ce système est codé par l'opéron *metNPQ* (Hullo *et al.*, 2004). Un mutant  $\Delta\text{metNP}$  de *B. subtilis* n'est plus capable de croître en présence de D-méthionine ou de  $5 \mu\text{M}$  de L-méthionine, mais sa croissance est restaurée en présence de  $50 \mu\text{M}$  de L-méthionine. Ce résultat suggère la présence d'autres transporteurs de la L-méthionine qui restent à caractériser (Hullo *et al.*, 2004). La régulation des gènes codant pour ce transporteur en réponse à la disponibilité en L-méthionine s'effectue par un mécanisme de terminaison précoce de la transcription via le motif boîte S (Hullo *et al.*, 2004).

Chez *S. aureus*, 3 transporteurs potentiels de la méthionine sont présents (Soutourina *et al.*, 2009a) : i) 2 transporteurs de type MUT présentant des similarités avec les transporteurs de la méthionine de *B. subtilis* et *E. coli* ; ii) le troisième transporteur, MetT, présente des similarités avec les antiporteurs  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  NhaC de certaines bactéries à Gram positif (Rodionov *et al.*, 2004). De manière intéressante, la régulation de la synthèse de ces 3 transporteurs diffère. L'expression de *metNPQ2* est régulée par le régulateur du métabolisme de la cystéine, CymR, en réponse à la disponibilité dans cet acide aminé, alors que celle de *metNPQ1* et de *metT* semble réprimée en présence de méthionine via un système de régulation par une terminaison précoce de la transcription (boîte S).

Récemment, deux systèmes de transport de la méthionine ont été identifiés chez *C. glutamicum*. MetQNI est un ABC transporteur à haute affinité spécifique de la L-méthionine dont l'expression est contrôlée par le régulateur McbR (Trötschel *et al.*, 2008). Le deuxième transporteur, MetPS appartient à la famille NSS (Neurotransmitter Sodium Symporteur). C'est un symporteur méthionine/ $\text{Na}^+$  dont l'expression est constitutive (Trötschel *et al.*, 2008). Ce transporteur est aussi capable de faire rentrer de l'alanine dans la cellule. Un transporteur de type symporteur méthionine/ $\text{Na}^+$  a été décrit chez *B. linens* CNRZ918 (Ferchichi *et al.*, 1987). Ce transporteur est à faible affinité ( $K_m=55 \mu\text{M}$ ) et la présence de  $\text{Na}^+$  stimule l'entrée de la méthionine dans la cellule par ce système. Ce transporteur semble également être impliqué dans le transport d'autres composés soufrés tels que la cystéine, la

sélénométhionine, ou encore l'homocystéine. Le gène de *B. linens* correspondant à ce transporteur n'est pas identifié.

## **D- Régulation du métabolisme du soufre par des régulateurs transcriptionnels**

Afin de répondre efficacement aux besoins en soufre de la cellule, le métabolisme du soufre est finement régulé. Cette régulation s'effectue via deux mécanismes principaux : une régulation au niveau de l'initiation de la transcription par l'intervention de régulateurs transcriptionnels ou par des mécanismes de terminaison précoce de la transcription qui sont principalement retrouvés chez les bactéries à Gram positif. Nous avons choisi dans ce chapitre de présenter les différents mécanismes de régulation via des régulateurs transcriptionnels impliqués dans le contrôle du métabolisme du soufre chez les bactéries à Gram-positif.

### **D-1 Les régulateurs de la famille LysR**

Les régulateurs de type LysR ou LTTR (LysR Type Transcriptional Regulator) sont les régulateurs les plus répandus chez les procaryotes. Les LTTR sont des activateurs qui, en présence d'un co-inducteur, agissent sur un ou plusieurs gènes cibles pour en moduler l'expression. Chez les bactéries à Gram positif, de nombreux LTTR sont impliqués dans la régulation du métabolisme du soufre : biosynthèse de la méthionine et de la cystéine, assimilation des sulfonates : CysL et YtlI chez *B. subtilis*, les régulateurs MtaR/MetR chez les *streptocoques*, et FhuR/CmbR chez *L. lactis* (Guillouard *et al.*, 2002) (Sperandio *et al.*, 2005) (Van der Ploeg *et al.*, 2001 ; Sperandio *et al.*, 2007).

#### *Le régulateur CysL de B. subtilis*

Chez *B. subtilis*, le régulateur CysL active la transcription de l'opéron *cysJI* codant la sulfite réductase, une étape de la voie d'assimilation du sulfate (Guillouard *et al.*, 2002). Un mutant *cysL* tout comme un mutant  $\Delta cysJI$ , est incapable de croître en présence de sulfate ou de sulfite comme unique source de soufre. La région située entre les positions -76 à -70 par rapport au démarrage de transcription de *cysJI*, est nécessaire à la régulation de l'opéron par la source de soufre ainsi que par CysL. Enfin, des expériences d'empreinte à la DNaseI ont montré que CysL se fixait dans la région comprise entre les positions -75 à -50 du promoteur de *cysJI* et entre les positions +4 et +33 de son propre promoteur (Guillouard *et al.*, 2002). Il exerce donc un contrôle négatif sur sa propre transcription. Chez *Geobacillus*

*stearothermophilus*, *cysL* est adjacent à l'opéron *cysJI* et transcrit de manière divergente. Un motif ATTAN<sub>7</sub>TAAT qui correspond au motif conservé chez les régulateurs de type LysR est retrouvé en amont des gènes *cysL* et *cysJI* chez *B. subtilis* et *G. stearothermophilus*.

#### Le régulateur YtII de *B. subtilis*

Chez *B. subtilis*, un deuxième LTTR, YtII, est impliqué dans la régulation en réponse à la disponibilité en soufre. Ce régulateur active la transcription de l'opéron *ytmI* codant un ABC transporteur de la cystine (TcyJKLMN), une riboflavine kinase et plusieurs protéines de fonction inconnue. En présence de méthionine, le gène *ytmI* et l'opéron *ytmI* sont fortement exprimés alors que l'expression de ces gènes est réprimée en présence de sulfate et de cystéine (Burguiere *et al.*, 2005). Des expériences de mutagenèse et de retard sur gel ont permis d'identifier une séquence de fixation d'YtII en amont de la région -35 de l'opéron *ytmI*. Un régulateur similaire à YtII et un opéron de type *ytmI* sont retrouvés chez *L. monocytogenes* et *L. innocua* mais pas chez d'autres bactéries à Gram-positif. La comparaison des séquences en amont de l'opéron *ytmI* chez les *Listeria* et *B. subtilis* a permis de proposer le motif conservé ATTAN<sub>2</sub>ATTACTGN<sub>2</sub>GTNAN<sub>4</sub>TTANTTTTTTTTGATTAG comme site de liaison d'YtII à l'ADN (Burguiere *et al.*, 2005). Enfin, contrairement à de nombreux régulateurs de la famille LysR, YtII n'intervient pas dans sa propre régulation mais son expression est sous le contrôle de CymR, le répresseur pléiotrope du métabolisme de la cystéine (Chapitre II D-2).

#### Le régulateur CmbR/FhuR de *L. lactis*

Chez *L. lactis*, CmbR/FhuR active l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme de la méthionine et de la cystéine dans des conditions de carence en cystéine (Fernandez *et al.*, 2002) (Sperandio *et al.*, 2005) (Kovaleva et Gelfand, 2007). CmbR régule l'expression de 18 gènes dont les fonctions sont impliquées dans l'entrée de la cystéine/cystine et de la méthionine ainsi que dans leurs biosynthèses. Seuls les gènes *cysE* et de *metEF* ne semblent pas régulés par CmbR. Des expériences de retard de migration sur gel montrent que CmbR se fixe sur les régions promotrices des gènes régulés via un motif TAAAWWTTTA (Sperandio *et al.*, 2005) (Golic *et al.*, 2005). Le gène *cmbR* est exprimé de manière constitutive. L'OAS modifie *in vitro* l'affinité de CmbR pour le promoteur de ses gènes cibles et active *in vivo* leur transcription. Cette molécule est l'effecteur de CmbR et l'activation de CmbR est reliée uniquement au taux d'OAS dans la cellule (Sperandio *et al.*, 2005). L'OAS

est synthétisée par CysE (Figure 5) dont l'activité enzymatique est réprimée par la cystéine chez diverses bactéries telles qu' *E. coli* et *B. subtilis* (Tanous *et al.*, 2008). Des acides aminés de CysE d'*E. coli* responsables du rétrocontrôle par la cystéine (Nakamori *et al.*, 1998) sont conservés dans CysE de *L. lactis* suggérant que son activité pourrait aussi être inhibée par la cystéine. CysE serait l'enzyme clé du métabolisme du soufre en contrôlant la transcription du régulon CmbR via la biosynthèse de son effecteur, l'OAS (Sperandio *et al.*, 2005).

### Les régulateurs MtaR/MetR et CysR des Streptocoques

Aucun site de fixation du régulateur CmbR n'a été retrouvé chez les autres streptocoques suggérant un contrôle du métabolisme du soufre un peu différent de celui de *L. lactis*. Il existe au moins deux LTTR impliqués dans la régulation du métabolisme du soufre chez les streptocoques (Kovaleva et Gelfand, 2007) : MtaR/MetR et CysR régulent respectivement le métabolisme de la méthionine et de la cystéine.

Chez *S. agalactiae*, MtaR régule l'expression d'un opéron codant un transporteur de la méthionine (Shelver *et al.*, 2003). Le mutant  $\Delta mtaR$  a une virulence atténuée dans un modèle de sepsis dans des rats nouveaux-nés et pousse faiblement dans du plasma humain en raison d'un déficit dans le transport de la méthionine. Une analyse transcriptomique a montré que 11 gènes étaient moins exprimés dans un mutant  $\Delta mtaR$  incluant ceux codant pour un transporteur de la méthionine, *metQ<sub>1</sub>NP* qui est en opéron avec *psdM*, des gènes de dégradation de l'arginine et des gènes impliqués dans la virulence de la bactérie (*cspA*, *fbxB* et *SAN1255*) (Bryan *et al.*, 2008). Un site conservé appelé boîte MET (TATGTTTNAACTATA) est retrouvé en amont de gènes impliqués dans le métabolisme de la méthionine chez de nombreux streptocoques (Kovaleva et Gelfand, 2007). Dans les conditions testées, MtaR ne régule pas certains gènes possédant une boîte MET dans leur région promotrice comme *metE* ou *metQ<sub>2</sub>*. De plus, tous les gènes régulés par MtaR ne possèdent pas de boîte MET en amont de leur promoteur (Bryan *et al.*, 2008).

Chez *S. mutans*, le régulateur MetR active l'expression des gènes impliqués dans le transport et la biosynthèse de la méthionine (Sperandio *et al.*, 2007). Un mutant  $\Delta metR$  est incapable de transporter la méthionine et de se développer en absence de méthionine. Le motif de fixation de MetR est identique au motif boîte MET (Rodionov *et al.*, 2004) et la modification de cette séquence abolit la fixation de MetR sur ses gènes cibles (Sperandio *et al.*, 2007). Ce motif est retrouvé en amont des gènes impliqués dans le métabolisme de la méthionine comme *atmB* (transporteur de la méthionine), *metE* (méthionine synthétase), *cysD* (*O*-acétyl-homosérine thiol-lyase), *metA* (homosérine *O*-acétyltransférase) et *smu1487*

(homocystéine S-méthyltransférase). L'expression des gènes régulés par MetR est fortement augmentée dans un mutant  $\Delta metE$  qui accumule l'homocystéine et l'addition d'homocystéine dans le milieu augmente l'expression des cibles de MetR. Enfin, des expériences de retard de migration sur gel ont montré que la présence d'homocystéine augmentait l'affinité de MetR pour ses cibles (Sperandio *et al.*, 2007). L'homocystéine est donc l'effecteur *in vitro* et *in vivo* de MetR.

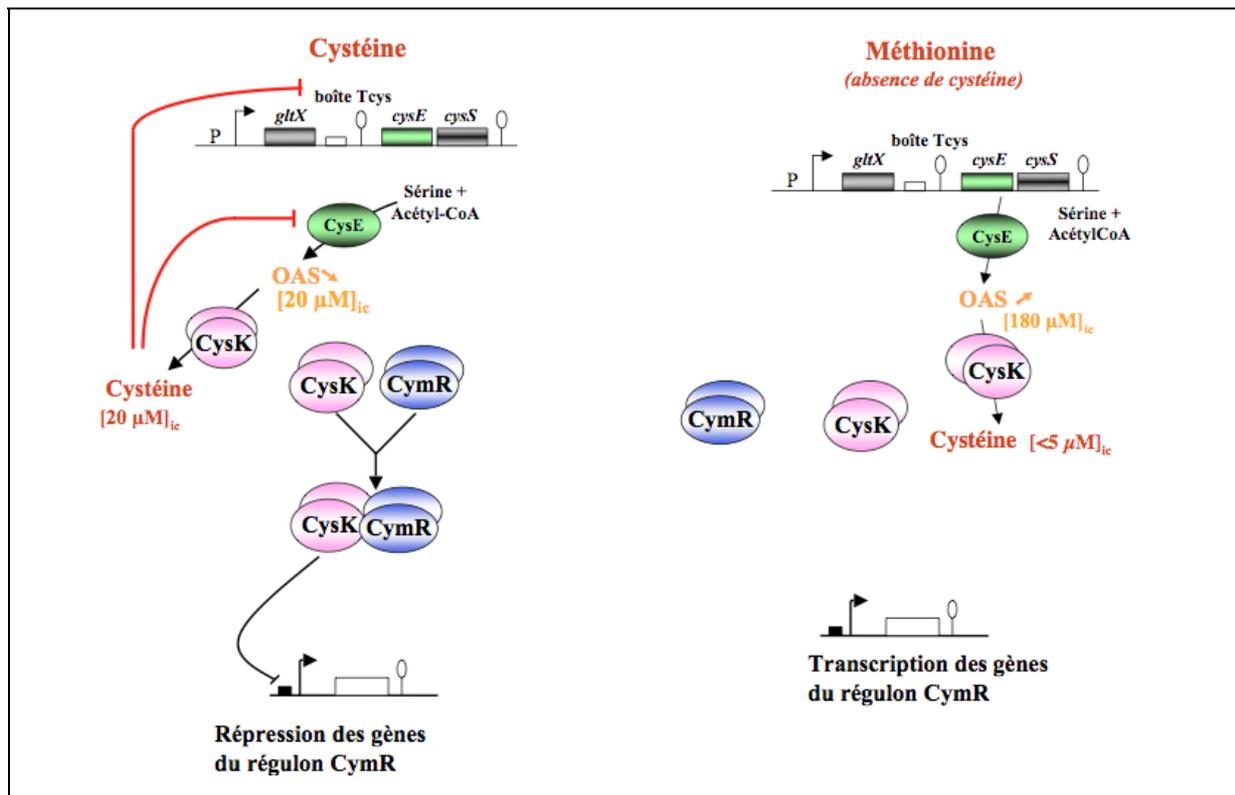
Il existe chez les streptocoques un deuxième LTTR, CysR qui contrôle l'expression des gènes d'assimilation et de biosynthèse de la cystéine mais aussi du thiosulfate et du glutathion (Kovaleva et Gelfand, 2007) (Sperandio *et al.*, 2005). Ce régulateur se fixe au niveau d'un motif (TGATAN<sub>9</sub>TATCAN<sub>2-4</sub>TGATA) présent en amont de la région -35 du promoteur du gène cible (Kovaleva et Gelfand, 2007). La présence de 3 parties dans la séquence de fixation de CysR est assez inhabituelle pour les LTTR qui n'en comportent généralement que 2. Cependant, la grande conservation de ce troisième motif parmi les streptocoques suggère un rôle important dans la régulation par CysR. La fixation d'un dimère de CysR sur les 2 premières boîtes pourrait entraîner une interaction coopérative d'un monomère sur la troisième.

#### **D-2- Le régulateur CymR de *B. subtilis* et *S. aureus***

Le régulateur CymR (Cysteine Metabolism Repressor) appartient à la famille des régulateurs de type Rrf2. Chez *B. subtilis*, CymR est le régulateur majeur du métabolisme de la cystéine (Even *et al.*, 2006). Ce répresseur contrôle l'expression de gènes codant pour des transporteurs de la cystéine, *tcyP* et *tcyJKLMN*, de biosynthèse de la cystéine comme *cysK* et *mccAB* (Figure 7), ou encore responsables de l'assimilation des sulfonates comme *ssuABCD* (Even *et al.*, 2006). CymR se fixe sur le promoteur des gènes *ytII*, *tcyP*, *ssuB*, *yrrT*, *yxeK*, *cysK* et *ydbM* via le motif de liaison à l'ADN TAAWNCN<sub>2</sub>ANTW-NAN<sub>3</sub>ATMGGGAATTW (Even *et al.*, 2006). Ce site est localisé en aval du promoteur de *cysK*, *yrrT* et *yxeK*, ou chevauchant la région -35 de *tcyP*, *ssuB* et *ytII*. CysK, l'OAS-thiol-lyase de *B. subtilis* est également un régulateur global de la synthèse de cystéine. La plupart des gènes régulés par CysK le sont par CymR (Albanesi *et al.*, 2005) suggérant la formation d'un complexe CymR-CysK qui viendrait se fixer sur l'ADN (Hullo *et al.*, 2007). La formation du complexe a été démontrée *in vitro* dans des expériences de résonance plasmonique de surface et *in vivo* dans des expériences de double hybride chez la levure. Des dimères de CymR et CysK s'associent pour former un complexe CymR<sub>2</sub>-CysK<sub>2</sub> avec un Kd de 0,1  $\mu$ M (Tanous *et al.*, 2008). Dans ce complexe, chaque partenaire possède un rôle bien défini. Tandis que CymR se fixe sur les

promoteurs de ces cibles grâce à son motif HTH, la protéine CysK stabilise l'interaction de CymR avec l'ADN (Figure 11). CysK possède aussi un rôle de transducteur du signal et indique à CymR la présence ou non de cystéine dans le milieu via son substrat, l'OAS (Figure 11). L'OAS est formée par CysE. L'expression du gène *cysE* est régulée par un système d'antitermination impliquant une boîte T spécifique à la cystéine dépendante de la concentration de cet acide aminé dans le milieu et l'activité de CysE est inhibée par la cystéine *in vitro* (Tanous *et al.*, 2008). La production d'OAS va donc dépendre de la quantité de cystéine dans le milieu. L'OAS joue un rôle de molécule effectrice contrôlant la régulation dépendante de CymR. En effet, l'ajout d'OAS dans le milieu augmente l'expression de plusieurs cibles de CymR et il provoque la dissociation du complexe CymR-CysK (Tanous *et al.*, 2008).

Un modèle de régulation du métabolisme de la cystéine par le régulateur CymR est indiqué dans la Figure 11. La variation de la quantité d'OAS dans la cellule module la formation du complexe CymR-CysK et donc sa capacité à réprimer la transcription. En présence de cystéine, la synthèse et l'activité de CysE sont diminuées ce qui induit une diminution du pool d'OAS jusqu'à 20  $\mu\text{M}$ . Dans ces conditions, le complexe CymR-CysK se forme et réprime le régulon CymR. En absence de cystéine, le pool d'OAS augmente pour atteindre une concentration de l'ordre de 180  $\mu\text{M}$ , CysK ne se complexe plus avec CymR, ce qui a pour conséquence d'induire l'expression des gènes du régulon CymR.



**Figure 11. Régulation de la synthèse de la cystéine par CymR chez *B. subtilis*.** *cysE*, *cysS* et *gltX* codent pour la sérine acétyltransférase et la cystéinyl et glutamyl ARNt synthétase. OAS : *O*-acétylsérine. Les concentrations intracellulaires des métabolites sont indiquées entre crochets. Les promoteurs et les terminateurs sont indiqués.

Chez *S. aureus*, CymR est un régulateur pléiotrope du métabolisme de la cystéine (Soutourina *et al.*, 2009b). Il régule 8 opérons regroupant 18 gènes impliqués dans le transport de la cystéine, du thiosulfate, des sulfonates et de la méthionine via l'un de ses transporteurs (MetNPQ<sub>2</sub>) et les voies de biosynthèse de la cystéine à partir du sulfure (CysM) ou de l'homocystéine (MccAB). Un site de fixation de CymR sur ses cibles a été déterminé par analyse bioinformatique et par des expériences d'empreinte à la DnaseI sur le gène *mccA*. Le motif consensus (TAWWNYHKABYDDWHWWVTHDGVWWW) est retrouvé en amont des gènes *mccA*, *tcyP*, *ssuB*, *sa1850*, *tcyA*, *ydbM*, *metN2* et *cysM* (Soutourina *et al.*, 2009b). L'OAS-thiol-lyase, CysM, est indispensable à la régulation par CymR<sub>SA</sub> suggérant la formation d'un complexe CymR-CysM chez *S. aureus*. L'OAS est également capable d'inhiber la fixation dépendante de CymR<sub>SA</sub> sur l'ADN. Enfin, La formation des biofilms est affectée dans un mutant  $\Delta cymR$  de *S. aureus* impliquant un contrôle positif de ce régulateur sur la formation des biofilms. Des protéines similaires à CymR sont retrouvées chez les *Listeria*, les staphylocoques et les autres bacillacées.

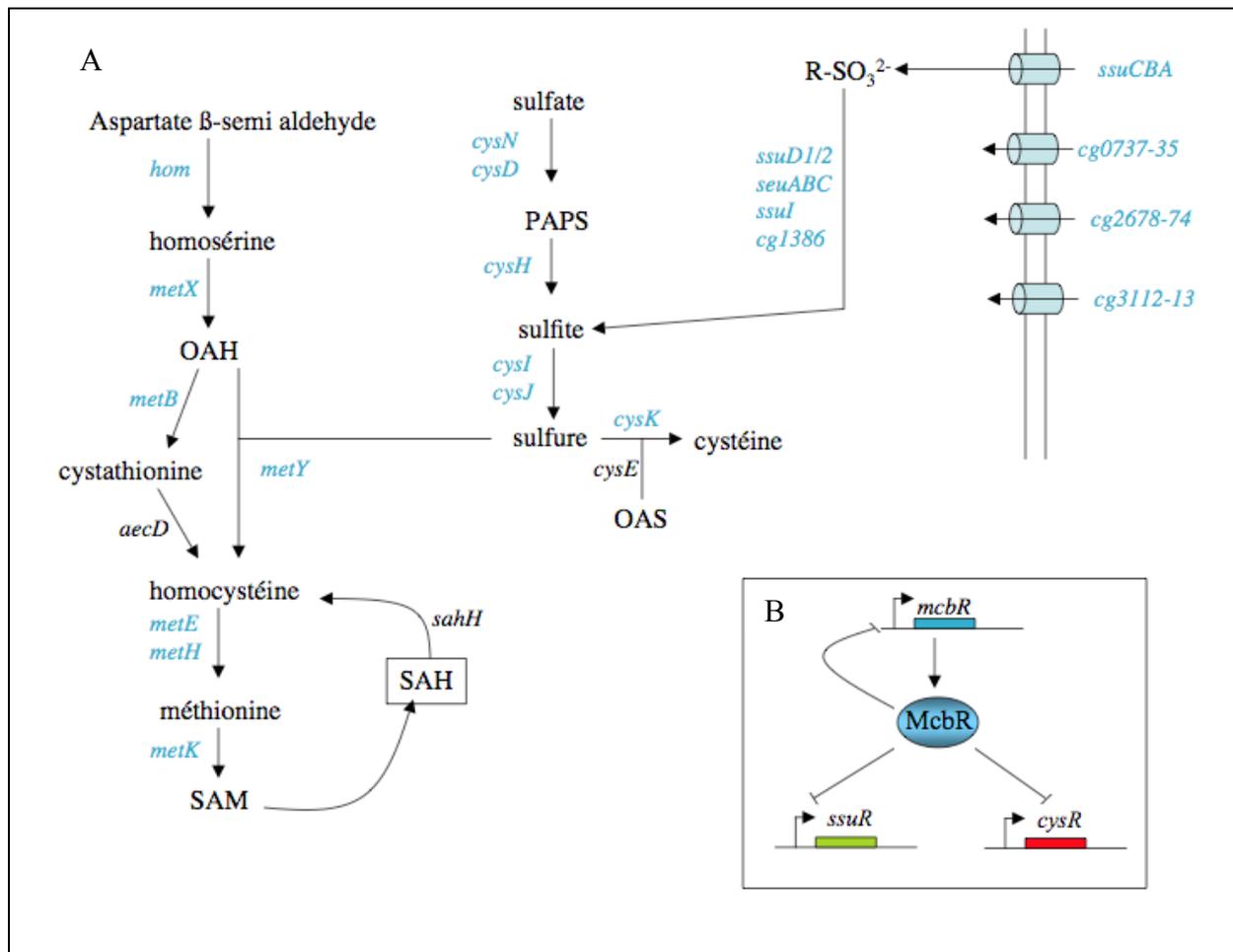
### D-3-Le réseau de régulation contrôlé par McbR chez *Corynebacterium glutamicum*

*C. glutamicum* possède un régulateur, McbR (Méthionine and Cysteine Biosynthesis Repressor), contrôlant un ensemble de gènes impliqués dans le métabolisme du soufre (Rey *et al.*, 2005) (Rey *et al.*, 2003). Ce répresseur appartient à la famille TetR. Ces régulateurs possèdent en N-terminal un motif HTH très conservé permettant une liaison à l'ADN, et une extrémité C-terminale peu conservée. La fixation des répresseurs de type TetR sur l'ADN se fait en absence d'effecteur dont le rôle est de dissocier le complexe répresseur/ADN.

Dans un mutant  $\Delta mcbR$ , 86 gènes sont plus fortement exprimés alors que 49 sont moins exprimés (Rey *et al.*, 2005). Parmi les gènes dérèprimés dans un mutant *mcbR*, 45 sont régulés directement par McbR. Ils sont impliqués dans l'assimilation du sulfate et des sulfonates, dans la biosynthèse de la méthionine et de la cystéine, dans le transport de métabolites soufrés ou codent des régulateurs transcriptionnels (Figure 12). Plusieurs gènes impliqués dans la biogenèse des centres fer-soufre (*nifSU* ou *sufCDB*) et le stress oxydant (*ahpD*, *kata*, *sod*, *trxA*, *trxB*, *trxC* ou *msrA*) sont également plus fortement exprimés dans ce mutant, mais ils semblent régulés indirectement par McbR (Rey *et al.*, 2005 ; Kromer *et al.*, 2008).

Le site de fixation de McbR est une séquence inversée répétée TAGAC-N<sub>6</sub>-GTCTA présente en amont de 22 gènes et opérons regroupant 45 gènes au total. Des expériences de retard de migration sur gel montrent la fixation de McbR dans la région promotrice de gènes impliqués dans le métabolisme du soufre (*mcbR*, *hom*, *cysI*, *cysK*, et *metK*). McbR réprime sa propre transcription (Figure 12B) (Rey *et al.*, 2005).

L'activité de McbR est modulée par un effecteur, la SAH. Cette molécule dissocie McbR de l'ADN ce qui induit l'expression des gènes du régulon McbR. La SAH est le produit des différentes réactions impliquant la SAM comme donneur de méthyle et reflète donc la consommation de SAM (Figure 8 et Figure 12) (Rey *et al.*, 2005).



**Figure 12. Le régulon McbR chez *C. glutamicum* (d'après Rey *et al* 2005).** A. Les transporteurs putatifs de composés sulfurés sont indiqués à droite. Les différentes voies de synthèse des acides aminés sulfurés sont indiquées. Les gènes colorés en bleu sont régulés directement par McbR. L'effecteur de McbR, la SAH (S-adénosylhomocystéine) est encadré. B. Régulateurs transcriptionnels régulés par McbR : McbR régule négativement la transcription des régulateurs SsuR et CysR. Le rétrocontrôle négatif de McbR est également présenté.

McbR régulerait, en réponse à la concentration intracellulaire de SAH, l'expression de gènes impliqués dans la formation de SAM à partir de différentes sources de soufre et permettrait d'adapter la disponibilité de SAM aux besoins en méthyle pour le fonctionnement cellulaire et la croissance. Cependant, d'autres mécanismes de régulation du métabolisme du soufre doivent exister afin d'adapter au mieux la réponse de la cellule aux signaux environnementaux comme par exemple la disponibilité en différentes sources de soufre.

Parmi les gènes régulés par McbR, se trouvent des gènes codant des régulateurs de la famille ROK comme CysR et CsuR (Figure 12B). La protéine SsuR (Sulfonate Sulfur Utilization Regulator) active l'expression de gènes de l'assimilation des sulfonates et des sulfonates esters chez *C. glutamicum* (Figure 12) (Koch *et al.*, 2005a). Un mutant *ssuR* est incapable de croître sur les sulfonates comme seule source de soufre contrairement à la

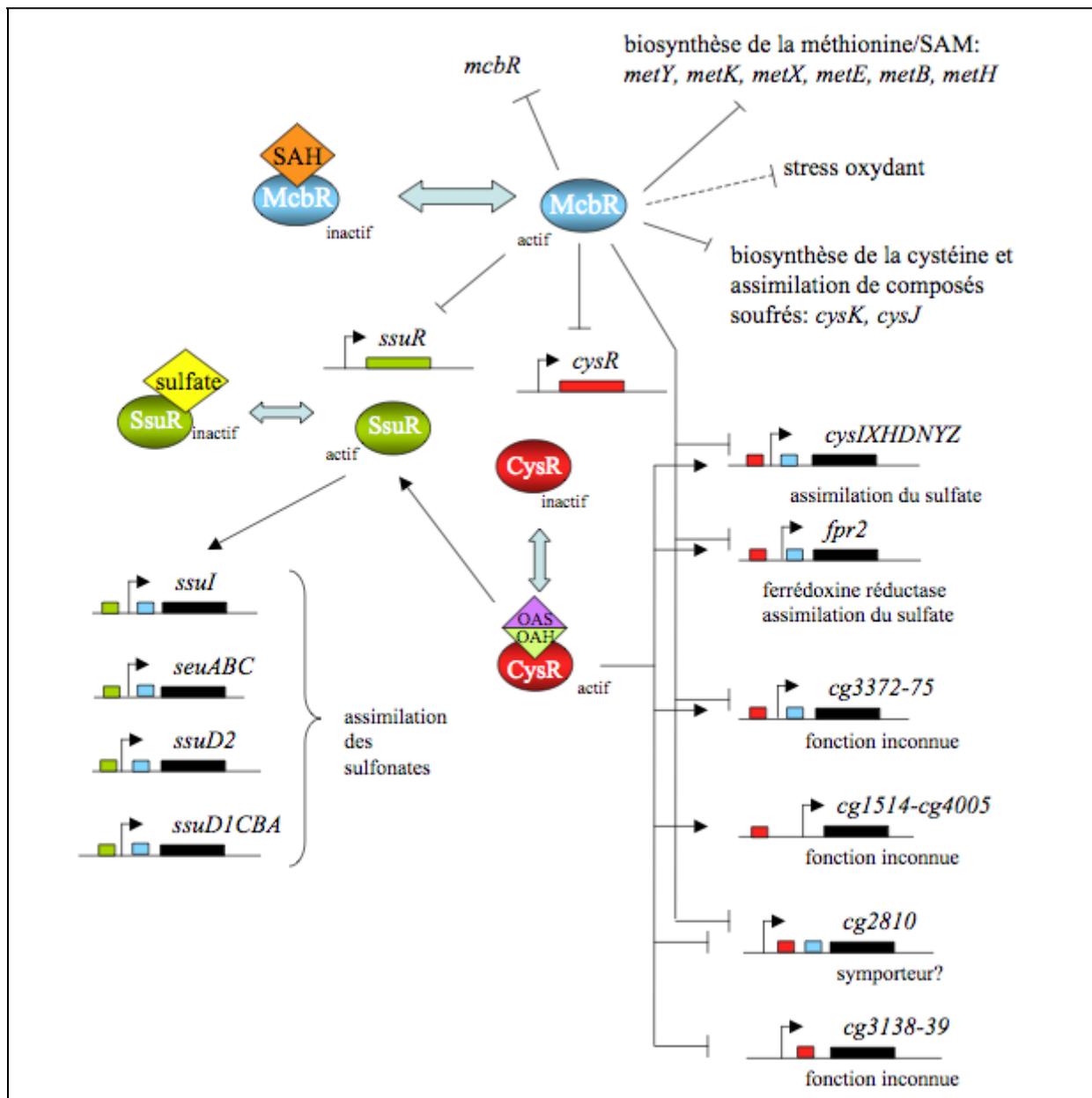
souche sauvage ce qui est en accord avec son rôle d'activateur. SsuR se fixe sur la région promoteur des gènes *ssuI*, *seuABC*, *ssuD2* et *ssuDICBA* impliqués dans l'assimilation des sulfonates. Un motif conservé de 21 nucléotides qui contient trois domaines : un domaine T, un domaine GC, et un domaine A riche est présent en amont de ces gènes. Ce site de fixation de SsuR est localisé en amont de la région -35 des gènes cibles, favorisant ainsi la reconnaissance de l'ADN par l'ARN polymérase comme trouvé classiquement chez les activateurs (Koch *et al.*, 2005a). La liaison de SsuR sur ses cibles est diminuée *in vitro* en présence de sulfate, d'APS, de sulfite et de sulfure des intermédiaires de la voie d'assimilation du sulfate. Tous ces composés peuvent être dégradés ou oxydés *in vitro* pour donner du sulfate. Des données *in vivo* suggèrent que le sulfate est crucial pour la régulation. Il semble probable que ce soit l'effecteur de SsuR.

Un autre régulateur contrôlé par McbR est CysR (Cystéine biosynthesis Regulator). Un mutant  $\Delta cysR$  est incapable d'utiliser le sulfate et les sulfonates comme seules sources de soufre suggérant que CysR contrôle positivement ces voies. Dans un mutant  $\Delta cysR$ , 97 gènes sont différentiellement exprimés en transcriptome. Parmi les 49 gènes activés par CysR, on trouve des gènes impliqués dans l'assimilation du sulfate (*fpr2*, *cysIKHDNYZ*) ainsi que le gène *ssuR*, des gènes de fonction inconnue, et un gène codant potentiellement pour un transporteur cystéine/cystine (Figure 13) (Ruckert et Kalinowski, 2008). CysR se fixe sur la région promotrice de l'opéron *cysI* au niveau d'une séquence inversée répétée d'environ 10 nucléotides riches en A/T. Cette séquence est également présente dans la région -35 des gènes *fpr2*, *ssuR*, *cg3372*, *cg2810*, activés par CysR, et au niveau du site de démarrage de la transcription des gènes *cg1514* et *cg3138* dont l'expression est réprimée par CysR. Ce régulateur aurait donc un rôle de répresseur ou d'activateur en fonction de la localisation de son site de liaison. CysR nécessite la présence d'OAS ou d'OAH pour se fixer sur l'ADN. Le rôle de CysR serait de contrôler la production de sulfure, composé potentiellement toxique, à partir de sulfate et des sulfonates en fonction de la disponibilité de ses accepteurs l'OAS et l'OAH. (Ruckert et Kalinowski, 2008).

Un modèle de régulation du métabolisme du soufre chez *C. glutamicum* a été proposé par l'équipe de Kalinowski impliquant les régulateurs McbR, CysR et SsuR (Figure 13). McbR agit comme régulateur global, contrôlant la transcription des gènes en réponse à la disponibilité en SAH. L'absence de SAH active McbR qui réprime la transcription des gènes de son régulon alors que l'augmentation du pool de SAH inactive McbR et induit leur expression. Parmi ces gènes se trouvent ceux codant pour CysR et SsuR indiquant une cascade de régulation. En réponse à la disponibilité en OAS ou OAH, CysR active la

transcription de 5 opérons et en réprime 2. Le gène *ssuR* codant pour le régulateur des voies d'assimilation des sulfonates est lui-même contrôlé par CysR. On observe donc des boucles de régulation dans ce réseau complexe qui adapte l'expression des différentes voies du métabolisme du soufre aux besoins cellulaires en fonction des conditions environnementales.

Chez *Corynebacterium ammoniagenes*, le régulateur CmaR (cysteine and methionine regulator in *C. ammoniagenes*) a été identifié récemment (Lee *et al.*, 2009). Ce régulateur active l'expression des gènes de biosynthèse de la méthionine et d'assimilation du sulfate. L'expression de ce gène est induite dans un mutant  $\Delta mcbR$  suggérant un contrôle négatif de McbR sur l'expression de *cmaR*. Ce régulateur semble donc exercer un rôle similaire à CysR de *C. glutamicum*.



**Figure 13. Régulation du métabolisme du soufre chez *C. glutamicum*.** Les régulateurs transcriptionnels sont indiqués par des cercles et les effecteurs sont représentés par des losanges. Les gènes régulés directement par les régulateurs sont représentés par des flèches pleines, ceux régulés indirectement sont indiqués par des flèches en pointillés. Les rectangles indiquent les différents sites de fixation des régulateurs : McbR (en bleu), CysR (en rouge), SsuR (en vert)

### **III- La communication des micro-organismes**

Le fromage est un écosystème complexe dans lequel cohabitent différents micro-organismes. Depuis quelques années, on dénombre de plus en plus d'études sur les dynamiques des populations au sein de l'écosystème fromager, mais peu d'études s'attachent à identifier les modes de communication dans cet écosystème. Dans ce chapitre, nous verrons les différents types d'interactions qui existent dans le monde microbien en prenant plusieurs exemples dans les produits laitiers. Les moyens de communication entre micro-organismes via des signaux chimiques seront également illustrés par quelques exemples chez les bactéries et les levures.

#### **A- Les différents types d'interaction : exemples des produits laitiers**

Dans les produits laitiers, l'évolution des conditions physico-chimiques et la disponibilité en nutriments sont des éléments importants pour le développement des micro-organismes. Ils peuvent ainsi générer des phénomènes d'interaction de différente nature. Tout au long du processus de fabrication, on observe une dynamique au sein des populations. Certains micro-organismes se multiplient activement, alors que d'autres tendent à disparaître. Les interactions observées dans des cultures mixtes peuvent être bénéfiques, néfastes ou encore neutres. Cinq catégories existent : l'amensalisme, la compétition, le parasitisme, le commensalisme et le mutualisme. Elles sont reprises dans le tableau ci-dessous et sont développées dans les paragraphes suivant en les illustrant de quelques exemples.

##### **A-1- Amensalisme**

L'amensalisme est une interaction inter-espèces où la présence d'un ou de plusieurs micro-organismes a un effet inhibiteur sur le développement d'autres micro-organismes présents dans le même environnement, sans que le micro-organisme inhibiteur en tire le moindre profit. Certains métabolites tel que les acides carboxyliques, le lactate, le peroxyde d'hydrogène ou encore les bactériocines (Paragraphe I-B-2 et III-B-1) participent à ce phénomène (Caplice et Fitzgerald, 1999) (van de Guchte *et al.*, 2001 ; Sieuwerts *et al.*, 2008). Les effets inhibiteurs agissent sur la croissance des micro-organismes pathogènes, indigènes ou inoculés (Sieuwerts *et al.*, 2008).

**Tableau 4. Interactions microbiennes inter-espèces observées dans différents produits laitiers (d'après Sieuwerts, 2008)**

Types d'interaction et produits	Micro-organismes impliquées	Références
<b>Amensalisme</b>		
Produits laitiers	Bactéries lactiques, <i>Listeria monocytogenes</i>	(Balasubramanyam, 1998)
Yaourt	<i>S. thermophilus</i> , <i>L. delbrueckii</i> subsp, <i>bulgaricus</i>	(Balasubramanyam, 1998) (Benkerroum, 2002) (Herve-Jimenez, 2009)
Surface de fromage affiné	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Listeria monocytogenes</i>	(Loessner, 2003)
<b>Compétition</b>		
Yaourt	<i>S. thermophilus</i> , <i>L. delbrueckii</i> subsp, <i>bulgaricus</i>	(Zouraria, 1991)
Produits laitiers	<i>Y. lipolytica</i> et <i>S. xylosus</i> , <i>L. lactis</i> et <i>S. aureus</i> ,	(Narvhus, 2003) (Nouaille, 2009)
<b>Parasitisme</b>		
Lait	Bactéries, phages	(Brassow, 2001) (Sturino, 2004)
<b>Commensalisme</b>		
Produits laitiers	Bactéries lactiques	(Viljoen, 2001) (Narvhus, 2003) (Xu, 2005)
Yaourt	<i>S. thermophilus</i> , <i>L. delbrueckii</i> subsp, <i>bulgaricus</i> , <i>bactérie propionique</i>	(Xu, 2005)
Yaourt et Produits laitiers	Bactéries lactiques, bactéries propioniques	(Xu, 2005)
Lait	Levures, bactéries	(Narvhus, 2003) (Gadaga, 2001)
Surface de fromage affiné	Bactéries lactiques, <i>Debaryomyces hansenii</i> , <i>Geotrichum candidum</i> , <i>Arthrobacter</i> sp. <i>Brevibacterium linens</i> , <i>Corynebacterium</i> <i>ammoniaenes</i> , staphylococci	(Mounier, 2005)
Lait fermenté, yaourt, fromage	Levures, bactéries	(Viljoen, 2001)
<b>Mutualisme</b>		
Yaourt	<i>S. thermophilus</i> , <i>L. delbrueckii</i> subsp, <i>bulgaricus</i>	(Courtin, 2004) (Herve-Jimenez, 2009)
Produits laitiers	Bactéries lactiques	(Narvhus, 2003)
Lait	Bactéries lactiques + Levures	(Narvhus, 2003)
Surface de fromage affiné	Différents types de moisissures, levures et bactéries	(Corsetti ; 2001)

### Les acides carboxyliques

Dans les produits laitiers, les bactéries lactiques sont généralement bien armées pour assurer leur croissance. En effet, elles sont capables de produire la majorité des métabolites cités précédemment. L'acide lactique est le métabolite majeur issu du métabolisme homofermentaire utilisé par certaines bactéries lactiques. Cet acide organique baisse le pH à un niveau conduisant à l'inhibition de la croissance des bactéries appartenant au genre *Listeria*, *Staphylococcus* ou *Clostridium* et des bactéries des flores de surface acido-sensibles (Oh et Marshall, 1993 ; Holzapfel *et al.*, 1995). Cet effet est cependant dépendant des stéréoisomères d'acide lactique produits. Une étude montre que l'acide L-lactique est plus inhibiteur que la forme D (Benthin et Villadsen, 1995). L'acide acétique est un métabolite qui peut être produit par voie hétérofermentaire chez certaines bactéries lactiques. Il est à

l'origine d'une inhibition plus importante que l'acide lactique du fait d'une constante de dissociation plus élevée (pKa de 4,75 pour l'acide acétique contre 3,1 pour l'acide lactique) pour une concentration et un pH donnés (Dahl *et al.*, 2000). L'acide acétique a un effet inhibiteur plus important sur *L. monocytogenes* (Ahamad et Marth, 1989) mais les deux acides organiques peuvent agir de manière synergique. En effet, l'acide lactique abaisse le pH du milieu, ce qui augmente la toxicité de l'acide acétique (Adams et Hall, 1988). La plupart du temps, les acides organiques faibles ne diminuent pas la viabilité des micro-organismes mais retardent leur croissance en allongeant par exemple la phase de latence.

### Le peroxyde d'hydrogène

Les bactéries lactiques sont capables de produire du peroxyde d'hydrogène (van de Guchte *et al.*, 2001) (Herve-Jimenez *et al.*, 2009). Cette molécule neutre diffuse librement à travers la membrane cellulaire; elle est peu réactive vis-à-vis des composants cellulaires. Cependant, en présence de métaux tels que le fer, l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est réduit en anion superoxyde et en radical hydroxyle via la réaction de Fenton :  $(\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{HO}^\circ + \text{HO}^-)$ . Ces deux produits sont des molécules très délétères pour la cellule réagissant sur de nombreux composants cellulaires essentiels tels que l'ADN, les protéines et les lipides (Touati, 2000 ; Imlay, 2003) ce qui entraîne la mort de la cellule. Le peroxyde d'hydrogène possède donc un effet inhibiteur sur la croissance de micro-organismes ne possédant aucun système de défense adéquat comme les catalases.

### A-2- Compétition

Le deuxième type d'interaction possible lorsque plusieurs micro-organismes sont présents dans un même milieu est la compétition pour les nutriments. Les sources de carbone sont souvent présentes à de fortes concentrations qui sont consommées rapidement pour former de la biomasse. Une étude récente portant sur une culture mixte entre *L. lactis* et *S. aureus* montre le ralentissement de la croissance de *S. aureus* après épuisement total du glucose présent initialement dans le milieu. Cependant, la production de lactate par *L. lactis* permet à *S. aureus* de changer de source de carbone et de reprendre sa croissance. Le ralentissement observé serait dû au changement de métabolisme (Nouaille *et al.*, 2009). Dans les produits laitiers, la source d'azote est souvent limitante, et les micro-organismes sont en compétition pour les acides aminés libres et les peptides présents dans la matrice. Le taux de croissance et la dynamique des populations dans un produit laitier dépendent essentiellement de leur

capacité à consommer les acides aminés (Juillard *et al.*, 1995 ; Juillard *et al.*, 1996) (Sieuwerts *et al.*, 2008). Les micro-organismes dominants dans les produits laitiers sont généralement capables de produire des protéases, des peptidases et d'induire la synthèse de systèmes de transport des produits issus de la protéolyse. Des études récentes sur des micro-organismes fromagers montrent que la levure, *Y. lipolytica*, utilise préférentiellement les acides aminés libres comme source de carbone puis le lactate lorsque les acides aminés sont épuisés (Mansour *et al.*, 2008). En présence de *Staphylococcus xylosus*, la croissance de cette levure est fortement inhibée. Une hypothèse émise est la compétition entre la levure et la bactérie pour certains acides aminés tels que le glutamate, la proline, l'histidine, l'aspartate, l'alanine, la thréonine, la serine, ou encore la glycine (Mansour *et al.*, 2009). Il existe d'autres formes de compétition comme celle pour les micro-nutriments tels que le fer. Si différentes études ont porté sur l'impact de la disponibilité en fer en lien avec la croissance des pathogènes et leur virulence (Brown et Holden, 2002), peu d'études portent le fer dans les écosystèmes laitiers. Certaines suggèrent l'existence d'une compétition pour le fer dans les produits laitiers car les concentrations en fer du lait et du fromage sont faibles. En effet, on estime qu'elles sont comprises entre 0,2 et 10 mg/kg (Gaucheron, 2000). De plus, certaines études ainsi que l'analyse des génomes de certaines espèces de l'écosystème fromager appartenant au genre *Brevibacterium*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium ssp* montrent la présence de systèmes moléculaires spécifiques comme les sidérophores et donc une adaptation à un milieu à faible concentration en fer (Noordman *et al.*, 2006 ; Mounier *et al.*, 2009). Les sidérophores ont une forte affinité pour le fer libre. Ils sont excrétés de la cellule puis captent le fer en formant des complexes et vont ensuite permettre à la bactérie de l'utiliser grâce à des mécanismes de transport actifs (Noordman *et al.*, 2006 ; Mounier *et al.*, 2009 ; Monnet *et al.*, 2010).

### **B-3-Parasitisme**

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

communautés bactériennes. Ils contribuent à la diversité des cultures fermentaires mixtes (Weinbauer, 2004 ; Weinbauer et Rassoulzadegan, 2004).

#### **A-4- Commensalisme**

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

#### **A-5-Mutualisme**

Enfin le dernier type d'interaction est le mutualisme. Cette dernière est une interaction entre une ou plusieurs espèces, dans laquelle toutes les parties tirent profit. L'exemple de mutualisme le mieux étudié est l'interaction observée entre *S. thermophilus*, et *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. L'interaction entre *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* et *S. thermophilus* semble cependant être extrêmement complexe avec l'existence de différents types d'interaction. Le résultat final est une croissance stimulée pour ces deux bactéries. En effet, la croissance simultanée de *S. thermophilus* et de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* dans le lait, s'accompagne d'un accroissement des concentrations bactériennes et d'une augmentation des vitesses d'acidification par rapport aux vitesses observées en culture pure (Amoroso *et al.*, 1989 ; Spinnler et Corrieu, 1989 ; Herve-Jimenez *et al.*, 2008). Différentes explications ont été avancées pour expliquer ce phénomène. *S. thermophilus* possède une protéase extracellulaire de type PrtP mais elle est faiblement active. Cependant, *L. delbrueckii*

subsp. *bulgaricus* présente une forte activité protéolytique via la protéase extracellulaire, PrtB appartenant à la famille des protéases PrpP (Paragraphe I-A-2). Cette protéase dégrade la caséine en oligopeptides et en acides aminés libres qui deviennent donc assimilables par *S. thermophilus* favorisant sa croissance (Abu-Tarboush, 1996). A son tour, *S. thermophilus* stimule la croissance de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Ascon-Reyes *et al.*, 1995) par la production de différents produits tels que le CO<sub>2</sub>, l'acide formique ou l'acide folique. *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* est incapable de produire ces acides qui sont impliqués dans la biosynthèse des purines nécessaires à son développement. Dans cette biosynthèse, l'acide formique est un précurseur et l'acide folique un co-facteur. Une étude récente semble étayer cette hypothèse. En effet, lorsque *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* est cultivée en présence de *S. thermophilus*, cette dernière réprime la voie de biosynthèse des purines et sur-exprime un gène codant pour une protéine potentiellement impliquée dans le transport de xantine et/ou d'uracile (Herve-Jimenez *et al.*, 2008). Les auteurs suggèrent que *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* produit les purines et les excrète dans le milieu où elles sont récupérées et assimilées par *S. thermophilus* (Herve-Jimenez *et al.*, 2008).

## **B- Communication entre les micro-organismes via une signalétique moléculaire : le « quorum sensing »**

La communication entre les micro-organismes via des signaux chimiques a été particulièrement bien étudiée chez les bactéries et quelques exemples sont connus chez les levures. En 2008, Monds et O'Toole ont proposé une méthodologie pour identifier ces interactions : i) le signal excrété doit être bien identifié ; ii) le signal est non toxique pour la cellule cible aux concentrations physiologiques ; iii) il doit exister un mécanisme qui capte le signal et entraîne une réponse spécifique iv) cette réponse est dissociable du signal excrété ; v) un signal purifié reproduit la même réponse dans les conditions physiologiques ; vi) le signal peut être capté par la communauté.

### **B-1- Le « Quorum Sensing » chez les bactéries**

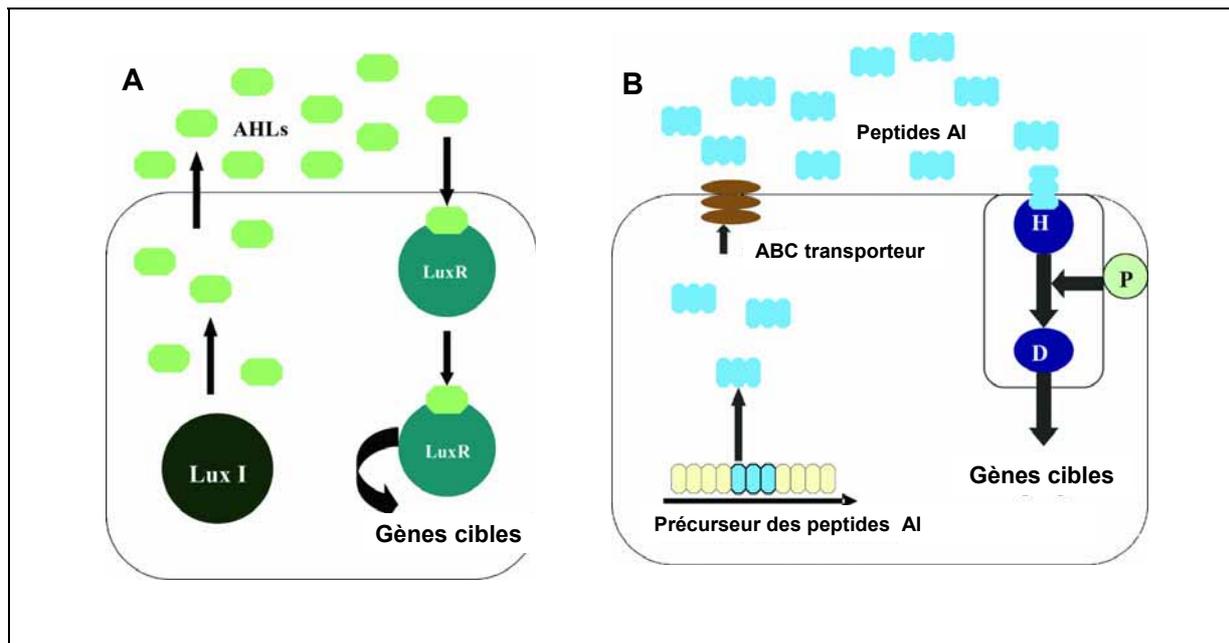
Les bactéries sont capables de communiquer entre elles avec des molécules chimiques appelées auto-inducteurs. Ce mécanisme est appelé « quorum sensing » car il répond en général à la densité cellulaire du micro-organisme. Ce système a été décrit pour la première

fois chez *Vibrio fischeri*, une bactérie marine à Gram-négatif qui a la capacité de devenir bioluminescente et le « quorum sensing » est impliqué dans ce phénomène (Nealson et Hasting, 1979). Chez les bactéries à Gram négatif, une enzyme synthétise une molécule de type acyl-homoserine lactone (AHL) qui se fixe sur un régulateur de type LuxR. Le complexe LuxR-AHL se lie à l'ADN et induit la transcription des gènes cibles (Waters et Bassler, 2005) (Figure 14. A). Les molécules AHL et le régulateur associé LuxR sont différents pour chaque espèce. Ce système, qui est très spécifique de chaque micro-organisme, permet donc une communication intra-espèce souvent associée à une détection de la densité cellulaire, et dans le cas de bactéries pathogènes à une induction de facteurs de virulence.

**Tableau 5. Molécule du « quorum sensing » chez les bactéries à Gram-négatives (Sheetal *et al.*, 2009)**

<b>Organisme</b>	<b>Molécule signal</b>	<b>Fonction</b>
<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>N</i> -Butanoyl-HSL	production de serine-protéase
<i>Aeromonas salmonicida</i>	<i>N</i> -Butanoyl-HSL	production de exoprotéase
<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>N</i> -C <sub>8</sub> -HSL	production de sidérophore and protease
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>N</i> -(3-Oxo-C <sub>12</sub> )-HSL	production d'élastase, d'hémolysine, l'exotoxine A,
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	<i>N</i> -C <sub>6</sub> -HSL	Biosynthèse de l'antibiotique phénazine
<i>Vibrio fischeri</i>	3-Oxo-C <sub>6</sub> -HSL	bioluminescence

Par exemple chez *Pseudomonas aeruginosa*, la molécule signal est le 3-oxo-C12-homoserine lactone, produit par le système LasIR. Elle induit la production de différents facteurs de virulence comme l'exotoxine A ou une hémolysine mais contrôle aussi un autre système de « quorum sensing » RhlIR qui synthétise l'autoinducteur *N*-butyryl-homoserine lactone (Sheetal *et al.*, 2009).



**Figure 14. Mécanisme du « Quorum sensing ».** A- Chez les bactéries à Gram négatives B- Chez les bactéries à gram positives. AHL : acyl-homoserine lactone, AI : Auto-Inducteurs. H ; Histidine D : Aspartate. P : phosphorylation

Chez les bactéries à Gram-positif à faible contenu en GC, la communication se fait via des peptides qui sont détectés le plus souvent par un système à deux composants (Figure 14B) (Waters et Bassler, 2005). Ce système est composé d'une protéine histidine kinase appelée senseur qui transmet le signal à un régulateur transcriptionnel. Suite à la fixation du peptide sur le domaine récepteur du signal du senseur, cette protéine se phosphoryle sur son domaine d'autophosphorylation puis transfère le groupement phosphate vers le domaine receveur du régulateur de réponse. La majorité des régulateurs de réponse ainsi activés vont se lier à des régions d'ADN pour contrôler l'expression des gènes cibles (Figure 14 B). Le « quorum sensing » a été largement étudié chez les bactéries pathogènes comme *S. aureus* pour son implication dans le contrôle de la virulence (Tableau 6). Chez *S. aureus*, un pathogène opportuniste de l'Homme, lorsque la densité cellulaire est faible, les bactéries expriment des facteurs d'adhérence et de colonisation mais à une concentration plus élevée, on observe l'induction des gènes de synthèse des toxines et de protéases impliquées dans sa dissémination dans l'hôte (Yarwood et Schlievert, 2003). Le « quorum sensing » est aussi étudié chez *B. subtilis* où il régule des fonctions impliquées dans le phénomène de compétence ou le développement de la sporulation.

Chez les *Streptomyces*, des molécules de type  $\gamma$ -butyrolactones, un homologue structural des AHL, contrôlent la production d'antibiotiques et la différenciation (Tableau 6)(Takano, 2006). Ces molécules sont synthétisées et perçues respectivement par une  $\gamma$ -butyrolactones

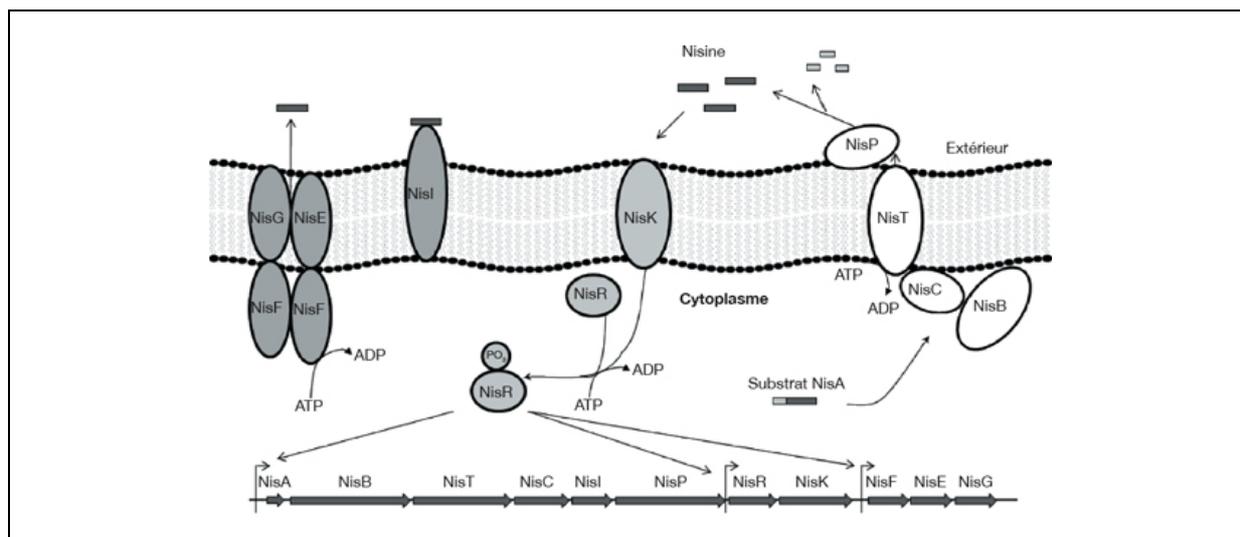
synthase, AfsA, et un récepteur, ArpA. Une étude phylogénique sur ces deux protéines a montré qu'il existait des homologues du récepteur AprA chez d'autres actinomycètes tels que *Mycobacterium*, *Rhodococcus* ou *Norcadia*. Contrairement à cette protéine, on ne retrouve pas d'homologue à la  $\gamma$ -butyrolactones synthase chez ces micro-organismes (Nishida *et al.*, 2007).

**Tableau 6 Molécule du « quorum sensing » chez les bactéries à Gram-positives (D'après Sheetal *et al.*, 2009)**

<b>Organisme</b>	<b>Molécule signal</b>	<b>Fonction</b>
<i>Bacillus subtilis</i>	ComX	sporulation
<i>Lactococcus lactis</i>	Nisine	autorégulation de Nisine
<i>Staphylococcus aureus</i>	AgrD	virulence
<i>Streptomyces coelicor</i>	SCB1	production de actinorhodine
<i>Streptomyces griseus</i>	A-Factor	production destreptomycine
<i>Streptomyces natalensis</i>	PI-factor	production de pimarcine
<i>Streptomyces virginiae</i>	virginiae butanolides	production de virginiamycin

Enfin, chez les bactéries alimentaires, le phénomène le plus étudié est le cas de la nisine, une bactériocine (Figure 15). Cette molécule est un lantibiotique qui est synthétisé par certaines souches de *L. lactis* ssp. *lactis* et certaines bactéries à Gram-positives. Les lantibiotiques sont des peptides qui contiennent des acides aminés inhabituels généralement soufrés modifiés post-traductionnellement comme la lanthionine et la  $\beta$ -méthyl lanthionine (McAuliffe *et al.*, 2001). Cette bactériocine se fixe à la membrane pour former des pores créant ainsi une fuite des petits composés cytoplasmiques comme les ions, l'ATP ou encore les acides aminés ce qui entraîne la mort cellulaire (Entian et de Vos, 1996) (Kleerebezem, 2004). De plus, étant une molécule du « quorum sensing », la nisine est aussi un autoinducteur (Figure 15). Sa fixation sur l'histidine kinase, NisK, entraîne la phosphorylation de la protéine régulatrice, NisR. Cela aboutit à la régulation de la synthèse de nisine, de son transport et de gènes impliqués dans l'immunité, NisI et NisFEG (Figure 15).

Enfin, un autre système de « quorum sensing » est médié par l'autoinducteur AI-2. Cette molécule est formée lors du recyclage de la SAM via la formation de la *S*-adénosylhomocystéine par l'action de la protéine LuxS (paragraphe II-C-2). Ce système a, tout d'abord, été décrit chez *Vibrio harveyi* mais une étude phylogénétique montre la présence de systèmes similaires chez des bactéries à Gram négatives mais aussi à Gram positives (Sun *et al.*, 2004). La production de cette molécule par différents micro-organismes fait penser à un système de communication universel pour les bactéries (Sun *et al.*, 2004 ; Sheetal *et al.*, 2009).



**Figure 15. Production, régulation, et mécanisme de résistance de la nisine.** Protéines de maturation de la nisine (en blanc) : Nis B/C et Nis P ; Système à deux composants (en gris clair) : NisK : protéine kinase ; NisR, protéine régulatrice, NisR ; Protéine de résistance à la nisine (en gris foncé) : Lipoprotéine de résistance, NisI ; ABC transporteur, NisFEG. (D'après McAuliffe *et al.*, 2001)

## B-2- Le « Quorum Sensing » chez les levures

La levure la plus étudiée pour les phénomènes de « quorum sensing » est *Candida albicans*. Cette levure est un champignon pathogène humain qui est dimorphique et forme soit un mycélium soit des spores. Deux molécules de « quorum sensing » contrôlent sa morphogénèse : i) Le farnesol inhibe la forme filamenteuse à haute densité cellulaire; ii) Le tyrosol active la croissance cellulaire et induit la formation du mycélium à faible densité cellulaire. Le farnesol est sécrété proportionnellement à la quantité de cellules dans le milieu, ce qui permet au micro-organisme d'évaluer sa concentration cellulaire (Hornby *et al.*, 2001 ; Nickerson *et al.*, 2006). Un ajout de tyrosol dans le milieu réduit la phase de latence et induit la forme filamenteuse (Chen *et al.*, 2004).

Un autre cas de « quorum sensing » a été étudié chez *S. cerevisiae* qui produit deux alcools aromatiques impliqués dans un phénomène de « quorum sensing ». Une carence en azote chez *S. cerevisiae* induit la production de phényléthanol et de tryptophol qui stimulent la morphogénèse par induction de l'expression du gène FLO11. Ce gène est impliqué dans la floculation de cette levure. De plus, la production de ces molécules semble être dépendante de la densité cellulaire et elles exercent un rétrocontrôle sur leur propre production (Chen et Fink, 2006).

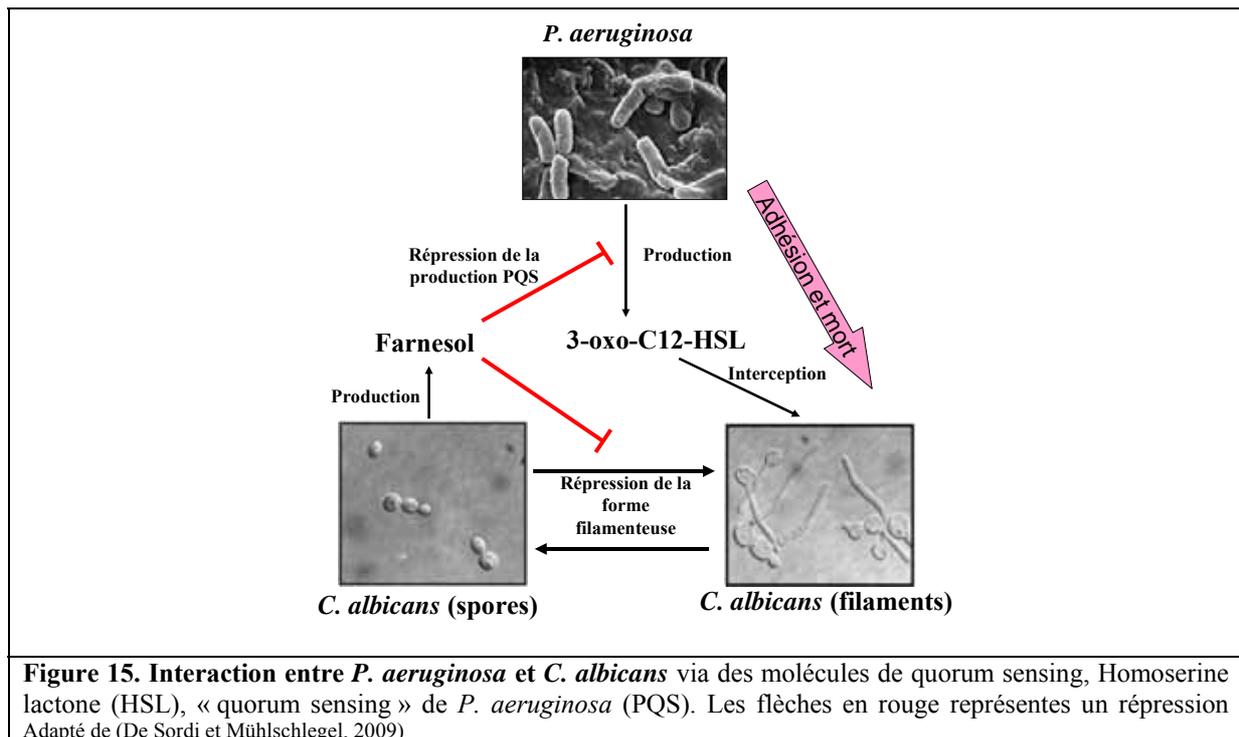
Enfin, une étude a montré que l'ammoniac pourrait aussi jouer le rôle d'une molécule de « quorum sensing » chez les levures (Palková *et al.*, 2003). Cette étude montre que la

production d'ammoniac dépend de la concentration en acides aminés extra-cellulaire. En effet, l'alcalinisation est observée en carence azotée, et corrèle avec la production d'ammoniac au sein même de la colonie ou des colonies voisines. En carence, on observe un changement périodique de pH des colonies de levures (*Saccharomyces*, *Candida*, *Kluyveromyces*, *Hansenula*), qui passent d'une phase acide à une phase alcaline (Palková et Váchová, 2006). L'ammoniac serait aussi à l'origine de changements de la morphogénèse de certaines levures. *Candida mogii* passerait d'une structure lisse, en phase acide, à une structure en forme de « spaghetti », en phase alcaline (Palková et Váchová, 2006). Cette alcalinisation induit une inhibition de la croissance des levures qui rentrent ainsi en phase de latence. Cette phase permettrait aux levures de minimiser leur consommation d'énergie, et d'être ainsi plus résistantes face au stress nutritionnel. Une fois que la carence nutritionnelle est levée, la production d'ammoniac est réduite, ce qui provoque une chute de pH et une induction de la croissance des levures (Palková *et al.*, 2003). De plus, des travaux (Gori *et al.*, 2007) ont mis en évidence le rôle de l'ammoniac comme médiateur chez une levure d'affinage, *D. hansenii*. Enfin, une dernière étude a mis en évidence une inhibition de l'expansion des mycéliums de *G. candidum* par *Y. lipolytica* dans un caillé. L'hypothèse émise par les auteurs est que l'ammoniac produit par *Y. lipolytica* pourrait être à l'origine de cette inhibition (Mounier *et al.*, 2008).

### **B-3- Les communications bactéries-levures.**

La communication inter-espèces impliquant des signaux chimiques entre les bactéries et les levures est très peu connue. Certaines molécules de « quorum sensing » comme des bactériocines jouent un rôle indirect sur cette interaction mais d'autres sont capables d'agir directement sur le « quorum sensing » d'une autre espèce. Le cas le mieux étudié est l'interaction entre *P. aeruginosa* et *C. albicans*. Ces micro-organismes sont des pathogènes opportunistes généralement présents dans les systèmes respiratoires de personnes immunodéprimées. *P. aeruginosa* produit la molécule 3-Oxo-C12-homoserine lactone (AHL) qui induit la production de ses facteurs de virulence dont des protéines responsables de son adhésion aux cellules (paragraphe III-B-1). Ces protéines confèrent à *P. aeruginosa* la capacité de se fixer uniquement sur la forme filamenteuse de *C. albicans* et cette bactérie peut tuer la levure grâce à ses facteurs de virulence. Mais la levure est capable d'intercepter l'AHL produite par *P. aeruginosa* et, pour se défendre, *C. albicans* va favoriser la formation de spores soit en inhibant la morphogénèse vers la forme de type mycélium soit en activant les

gènes impliqués dans la transition du filament vers la spore par la production de farnesol (Hogan *et al.*, 2004). De plus, la production de farnesol par la levure réprime les gènes impliqués dans le « quorum sensing » de *P. aeruginosa*. Ces deux micro-organismes ont donc mis en place un système complexe via une signalétique moléculaire qui leur assure une co-existence au sein d'un environnement donné. Cet exemple montre la complexité qui existe dans les phénomènes de communication inter-espèces via des molécules chimiques (De Sordi et Mühlischlegel, 2009) (Fig. 15).



# **Chapitre II- Résultats et discussions**

## *Chapitre II-Résultats et discussions*

### **A- Identification des souches de *Brevibacteriaceae* par « MultiLocus Sequence Typing » et Comparative genomic Hybridization »**

#### **A-1 -Contextes et objectifs de l'étude.**

Dans la partie bibliographique, nous avons vu que le genre *Brevibacterium* joue un rôle primordial dans l'étape d'affinage des fromages à pâte molle, mais aussi, que des évolutions récentes sur la taxonomie de ce genre bactérien relativement peu étudié ont été proposées. Les classifications sont basées sur des méthodes de biochimie et de physiologie mais aussi de biologie moléculaire comme l'analyse de la séquence de l'ARN 16S, l'hybridation ADN/ADN ou la PFGE « pulsed field gel electrophoresis ». De nouvelles espèces sont proposées au sein du genre alors que d'autres souches changent de genre (Stackebrandt *et al.*, 1997 ; Gavrish *et al.*, 2004). Un seul génome de bactéries du genre *Brevibacterium* est disponible sur le site du JGI ([http://genome.jgi-psf.org/draft\\_microbes/breli/breli.home.html](http://genome.jgi-psf.org/draft_microbes/breli/breli.home.html)).

Il est issue de la souche nommée *B. linens* BL2 alors que dans certains articles, la souche de *Brevibacterium* séquencée est nommée *B. linens* ATCC 9174. Nous avons souhaité éclaircir ce point et déterminer la souche qui a été séquencée.

Nous avons donc souhaité mettre au point de nouveaux outils moléculaires (« Multi-Locus-Sequence-Typing » ou MLST et hybridation sur puces à ADN) permettant de différencier les souches de *Brevibacteriaceae* au niveau inter-espèce mais aussi intra-espèce. Ces outils ont été utilisés pour définir la souche dont le génome était séquencé mais aussi pour choisir une souche du genre *Brevibacterium* pour la suite de l'étude.

Les résultats obtenus ont fait l'objet d'une première publication parue en 2009 dans la revue « Applied and Environmental Microbiology », et constituant le chapitre II-A-2.

## A-2 Résumé

Dans cette étude, deux approches ont été développées pour identifier les *Brevibacteriaceae*. L'approche par « Multilocus sequence typing » avec 9 gènes de ménage est un nouvel outil prometteur pour l'identification des *Brevibacteriaceae* à un niveau inter-espèce. De plus, le développement d'une puce à ADN a permis d'étudier la diversité intra-spécifique des souches de *Brevibacterium aurantiacum*. Les résultats montrent que 13% et 15% du génome de la souche séquencée ATCC 9174 sont absents ou divergents dans les souches B12 et ATCC 9175.

## Identification of *Brevibacteriaceae* by Multilocus Sequence Typing and Comparative Genomic Hybridization Analyses<sup>∇†</sup>

Marie-Pierre Forquin,<sup>1,2</sup> Hugo Duvergey,<sup>3</sup> Caroline Proux,<sup>4</sup> Valentin Loux,<sup>3</sup> Jerome Mounier,<sup>1,‡</sup>  
Sophie Landaud,<sup>1</sup> Jean-Yves Coppée,<sup>4</sup> Jean-François Gibrat,<sup>3</sup> Pascal Bonnarne,<sup>1</sup>  
Isabelle Martin-Verstraete,<sup>2</sup> and Tatiana Vallaëys<sup>1,5\*</sup>

INRA-AgroParisTech, UMR 782 Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires, Centre de Biotechnologies Agro-Industrielles, 78850 Thiverval-Grignon, France<sup>1</sup>; Institut Pasteur, Unité de Génétique des Génomes Bactériens, URA-CNRS2171, 28 Rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, France<sup>2</sup>; INRA, Unité Mathématique, Informatique et Génome UR1077, F-78352 Jouy-en-Josas, France<sup>3</sup>; Institut Pasteur, Plate-forme Puces à ADN, 28 Rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, France<sup>4</sup>; and ECOLAG, UMR 5119 CNRS, Université Montpellier II, Case 093, 34095 Montpellier Cedex 5, France<sup>5</sup>

Received 30 January 2009/Accepted 27 July 2009

**Multilocus sequence typing with nine selected genes is shown to be a promising new tool for accurate identifications of *Brevibacteriaceae* at the species level. A developed microarray also allows intraspecific diversity investigations of *Brevibacterium aurantiacum* showing that 13% to 15% of the genes of strain ATCC 9174 were absent or divergent in strain BL2 or ATCC 9175.**

*Brevibacteriaceae* play a major part in the cheese smear community (6, 11). The classification and typing of cheese-related *Brevibacteriaceae* have been based mainly on molecular methods such as amplified ribosomal DNA restriction enzyme analysis, pulsed-field gel electrophoresis, and ribotyping (8, 10, 12). Recently, the original *Brevibacterium linens* group was split into two species on the basis of their physiological and biochemical characteristics, the sugar and polyol composition of their teichoic acids, and their 16S rRNA sequence and DNA-DNA hybridization levels. One species remains *B. linens* and is represented by type strain ATCC 9172. The other, represented by type strain ATCC 9175, has been renamed *Brevibacterium aurantiacum*. Regarding this new classification, the taxonomic position of cheese-related isolates has to be revisited and potential relationships between phylogenetic affiliation and the potential occurrence of given metabolic characteristics redefined (7). The unfinished genome sequence of *B. aurantiacum* ATCC 9174 has recently been released by the Joint Genome Institute ([http://genome.jgi-psf.org/draft\\_microbes/breli/breli.home.html](http://genome.jgi-psf.org/draft_microbes/breli/breli.home.html)). The development of focused phylogenetic approaches using multiple markers in conjunction with whole-genome screening techniques such as comparative genomic hybridization (CGH) has proven to be useful for the detailed characterization of pathogenic species, including food pathogens (3, 5, 9). However, only a few technological species have been investigated at an intraspecies level (2). Our intention

was thus to develop modern tools to facilitate the typing of strains of technological interest, for which *Brevibacteriaceae* could be used as a case study.

**Phylogenetic analysis of cheese-related *Brevibacteriaceae* shows an organization in three main branches.** Three cheese *Brevibacterium* sp. strains, BL2, CNRZ918, and ATCC 9174, and *B. aurantiacum* and *B. linens* type strains ATCC 9175 and ATCC 9172, respectively, (7), were analyzed both by 16S rRNA sequencing with the universal primers and by multilocus sequence typing (MLST). The 16S rRNA analysis showed the phylogenetic relationship between these strains (Table 1). *B. linens* ATCC 9172 is an independent lineage. BL2 and ATCC 9174 were related to *B. aurantiacum* type strain ATCC 9175. Interestingly, strain CNRZ918 presents similarities to the *B. aurantiacum* lineage, but this strain appeared to be closely related to *Brevibacterium anticum*, with 99% identity between their 16S rRNA sequences.

To extend the 16S rRNA phylogenetic organization of technological *Brevibacteriaceae*, an MLST approach was used. Nine genes (*cysN*, *glnA*, *gyrA*, *metY*, *metX*, *mgl*, *pheS*, *sahH*, and *tkl*) were chosen from the conserved housekeeping genes involved in sulfur, carbon, or nitrogen metabolism or general cellular processes. For each gene, we designed primers (Table 1) within the conserved part surrounding a variable area after sequence alignment of these genes from *B. aurantiacum* ATCC 9174, *Arthrobacter aurescens* (TC1), and *Arthrobacter* sp. strain FB24. Among these genes, *sahH* was especially discriminating at both the interspecific and intraspecific levels, showing as much as 3% sequence divergence between *B. aurantiacum* ATCC 9174 and ATCC 9175 (Table 1). The discriminating ability of *glnA* and *cysN* was more questionable, while the *gyrA*, *metY*, *metX*, and *tkl* markers were discriminating only at an interspecific level (Table 1). After concatenation of the nine DNA sequences, the phylogenetic tree obtained shows three MLST clusters (Fig. 1). Cluster I contained *B. aurantiacum* ATCC 9175, ATCC 9174 and BL2. Cluster II corresponded to strain CNRZ918, and cluster III was composed of the *B. linens*

\* Corresponding author. Mailing address: Laboratoire ECOLAG, UMR CNRS-UMI 5119, Université Montpellier II, cc 093, Place E. Bataillon, 34095 Montpellier Cedex 5, France. Phone: 33 (0)4 67 14 40 11. Fax: 33 (0)4 67 14 46 74. E-mail: [tatiana.vallaëys@univ-montp2.fr](mailto:tatiana.vallaëys@univ-montp2.fr)

‡ Present address: Université Européenne de Bretagne, France, Université de Brest, EA3882 Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne, IFR148 ScInBioS, ESMISAB, Technopôle de Brest Iroise, 29280 Plouzané, France.

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

∇ Published ahead of print on 31 July 2009.

TABLE 1. 16S and MLST markers used in this study<sup>a</sup>

Locus	Putative gene product	Sequence <sup>b</sup> (5'-3')	Amplicon size (bp)	% Sequence difference from ATCC 9174			
				ATCC 9175	BL2	ATCC 9172	CNRZ918
<i>cysN</i> (BL2148)	Sulfate adenylyltransferase	F: GCTTCGCCACGGCCGGTTCCG R: GGCGACGGGTCTGCTCGGTCGCA	366	0	0	2.3	0
<i>glnA</i> (BL3684)	Glutamate synthase	F: ACCTTCTCGTGTGCTGCCTTG R: GAGTGAGACGTGTGTGTGCAT	483	0	0	18.4	0
<i>gyrA</i> (BL1402)	DNA gyrase, subunit A	F: GAGAACTTCTCCGCGAACATG R: CTCCGGAATGAGGTCCTCCAT	467	0	9.2	13.7	9.2
<i>metX</i> (BL36)	Homoserine O-acetyltransferase	F: ATGCCGTCATCGCGGATCGATGG R: GCCTCGGTTTCGGTGAGGAAGCCGTCATG	610	0	0	19.7	11.6
<i>metY</i> (BL56)	O-Acetylserine sulfhydrylase	F: AACATCGCCGAAGCCGGTGACCAC R: ACCGTGCACACGGGCCTTGAG	540	0	0	18.3	18.5
<i>mgl</i> (BL613)	Methionine $\gamma$ -lyase	F: AATGAATACGAGCGCTGG R: CTCGGGGCGGCTCTCCAACCA	507	3.1	1.3	0	12.4
<i>pheS</i> (BL2678)	Phenylalanyl tRNA synthase	F: CGCTGAACCTTCGATTCCCTCAAC R: CATGCCGAAGGCGAAGCCCTG	507	0	1.7	7.8	4.5
<i>sahH</i> (BL3170)	S-Adenosyl-L-homocysteine hydrolase	F: GTTGACGTTGATGCGCGGGAA R: TGCAACATCTTCTCCACCCAG	441	3	0	24.1	12.1
<i>tkl</i> (BL2672)	Transketolase	F: ACTCGCCCCACAGCGGCACCTTC R: GTCCGCGGGCTGCGCGTCGAACCA	660	0	0	14.5	9.5
16S rRNA gene	rRNA	F: AGAGTTTGATCCTGGCTCAG R: AAGGAGGTGATCCAGCCGCA	1,541	0.3	0.2	3.8	2.6

<sup>a</sup> For each gene, its putative function, the set of corresponding PCR primers, the amplicon size, and the percentage of sequence divergence are indicated. Gene prediction and functional annotation were performed with AGMIAL (<http://genome.jouy.inra.fr/~vloux/publications/forquin08/>).

<sup>b</sup> F, forward; R, reverse.

ATCC 9172 type strain. Similarities of 92.3% and 86.5% were observed between the MLST sequence of ATCC 9174 and those of CNRZ918 and ATCC 9172, respectively. We can propose *tkl* as a marker for interspecies discrimination. According to 16S rRNA and MLST data, the original classifica-

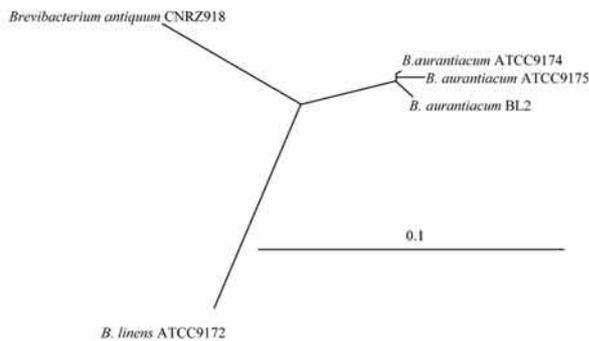


FIG. 1. Phylogenetic tree based on DNA sequences of concatenated MLST markers. The sequences of the nine genes were concatenated in length. The phylogenetic tree was constructed with concatenated nucleotide sequences of nine housekeeping genes (*cysN*, *glnA*, *gyrA*, *metY*, *metX*, *mgl*, *pheS*, *sahH*, and *tkl*) to obtain contigs of 4,581 bp and was displayed with the Treeview X software in an unrooted format.

tion of cheese-related *Brevibacteriaceae* into two different species was also confirmed and extended. Indeed, the occurrence of *B. antiquum* had previously been restricted to permafrost, while this study constitutes the first report of a *B. antiquum*-related cheese isolate (7). Interestingly, cheese-related *Brevibacteriaceae* bacteria were of a polyphyletic origin, suggesting that adaptation to the cheese habitat could have occurred several times independently in various lineages of *Brevibacteriaceae*.

**Assessing *B. aurantiacum* genome variability on the basis of CGH analysis.** In order to extend our analysis of cheese-related *Brevibacteriaceae*, we performed a genome comparison by hybridization analysis with the five strains studied by MLST. For this purpose, we used a microarray based on the unfinished genome sequence of *B. aurantiacum* ATCC 9174 (see the supplemental material). The array was further hybridized with the DNAs from the three cheese-related *Brevibacterium* groups as defined by MLST. The CGH analysis was performed by using the Franck Picard model (13). Although a signal was obtained with DNAs from ATCC 9172 and CNRZ918, the  $\log_2$  ratio was not significantly discriminating (see Fig. S1 in the supplemental material). The use of arrays should therefore be restricted to investigation of the genomic variability of *B. aurantiacum* species. Eighty-five percent and 87% of the probes gave a positive signal with *B. aurantiacum* ATCC 9175 and BL2, respectively.

TABLE 2. Distribution among major functional groups of the variable part of the *B. aurantiacum* ATCC 9174 genome

Function	No. of regions (no. of genes) deleted or divergent in:	
	ATCC 9175	BL2
Involvement in:		
Biosynthesis	1 (22)	1 (21)
Unknown function	7 (70)	17 (106)
Catabolic pathways	46 (427)	23 (304)
Heavy metal resistance	8 (117)	8 (94)
Antibiotic resistance	0 (0)	1 (10)
Oxidative stress response	1 (14)	2 (22)
Total	62 (650)	52 (557)
Mobile genetic elements		
Transposon related	29 (328)	19 (225)
Phage related	2 (41)	2 (33)
Total	31 (369)	21 (258)

Among the 4,211 genes of ATCC 9174 for which probes were present, 3,308 were conserved in both ATCC 9175 and BL2. Five hundred fifty-seven and 650 genes were probably absent or highly divergent in BL2 and ATCC 9175 compared to ATCC 9174, respectively. Table 2 summarizes the functional groups associated with the divergent parts of the *B. aurantiacum* genome and the mobile genetic element-related genes associated. We further focused our investigations on the vari-

able parts of the genome with potential links with the adaptation of *B. aurantiacum* to cheese characteristics such as salt resistance, peptide transport, and amino acid- or sulfur-related metabolism. The presence or absence of these regions (see Table S1 in the supplemental material) was further checked by PCR when possible. A first deleted region spanning the region from BL614 to BL621 in the genome of strain ATCC 9174 was confirmed by PCR amplification. By sequencing these PCR fragments, we determined that the ends of the fragments deleted in strains ATCC 9175 and BL2 were conserved (Fig. 2B). This observation suggests an insertion of a catabolic island in the genome of strain ATCC 9174. This chromosomal region encodes an oligopeptide-type ABC transporter (BL618 to BL621), two putative monooxygenases (BL615, BL617), and a reductase (BL616) that could be involved in sulfonate catabolism (Fig. 2A). The CGH results also showed that five peptide or amino acid transporters are deleted in both the ATCC 9175 and BL2 genomes while an additional peptide transporter (BL1002 to BL1006) seems to diverge between ATCC 9174 and BL2 (see Table S1 in the supplemental material). The diversity among the peptide uptake systems could be of potential interest for biotechnological applications. Indeed, yeast (*Geotrichum candidum*) and bacteria present during the cheese-ripening process degrade casein and produce peptides (1, 4). These peptides can be further used by other microorganisms for volatile sulfur compound production. The microarray developed in this study offers opportunities for further studies aiming at evaluating the biodiversity of a

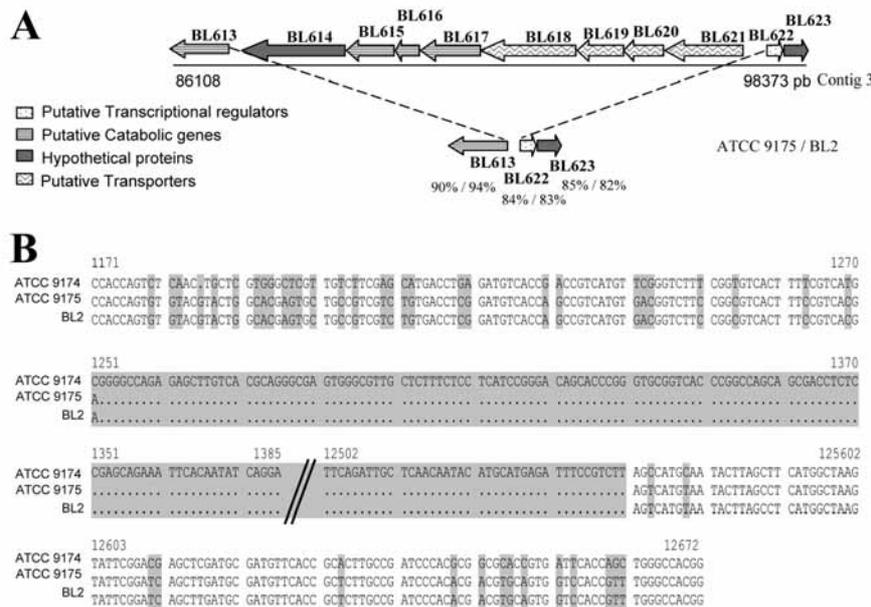


FIG. 2. Variable region spanning the region from BL614 to BL621 in the *B. aurantiacum* ATCC 9174 genome and lacking in the corresponding genomic regions of strains ATCC 9175 and BL2. (A) Schematic representation of the region from BL613 to BL623 in the genome of ATCC 9174 and of the same region of strains ATCC 9175 and BL2. The percent similarities of the BL613, BL622, and BL623 genes between strain ATCC 9174 and strains ATCC 9175 and BL2 are indicated. (B) Alignment of the DNA sequences adjacent to the variable chromosomal region between BL614 and BL621 in strains ATCC 9174, ATCC 9175, and BL2 and determination of the borders of the insertions or deletions. Variable nucleotides are shaded.

higher number of *B. aurantiacum* strains of technological interest, coming from various cheese habitats.

The *B. linens* BL2 sequence data were produced by the U.S. Department of Energy Joint Genome Institute ([http://genome.jgipf.org/draft\\_microbes/brel/brel.home.html](http://genome.jgipf.org/draft_microbes/brel/brel.home.html)). We are grateful to Antoine Danchin for support and stimulating discussions. We thank Donald White for correcting the English in this report.

This work was supported by the EcoMet program (ANR-06-PNRA-014) funded by ANR (Agence Nationale de la Recherche) and the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS URA 2171). Marie-Pierre Forquin is grateful to ANR for a Ph.D. scholarship, and I.M.-V. is a full professor at the Université Paris 7.

#### REFERENCES

1. **Boutrou, R., and M. Guéguen.** 2005. Interests in *Geotrichum candidum* for cheese technology. *Int. J. Food Microbiol.* **102**:1–20.
2. **Calmin, G., F. Lefort, and L. Belbahri.** 2008. Multi-loci sequence typing (MLST) for two lacto-acid bacteria (LAB) species: *Pediococcus parvulus* and *P. damnosus*. *Mol. Biotechnol.* **40**(2):170–179.
3. **Chan, K., S. Baker, C. C. Kim, C. S. Detweiler, G. Dougan, and S. Falkow.** 2003. Genomic comparison of *Salmonella enterica* serovars and *Salmonella bongori* by use of an *S. enterica* serovar Typhimurium DNA microarray. *J. Bacteriol.* **185**:553–563.
4. **Christensen, J., E. Dudley, J. Pederson, and J. Steele.** 1999. Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* **76**:217–246.
5. **Doumith, M., C. Cazalet, N. Simoes, L. Frangeul, C. Jacquet, F. Kunst, P. Martin, P. Cossart, P. Glaser, and C. Buchrieser.** 2004. New aspects regarding evolution and virulence of *Listeria monocytogenes* revealed by comparative genomics and DNA arrays. *Infect. Immun.* **72**:1072–1083.
6. **Feurer, C., T. Vallaeys, G. Corrieu, and F. Irlinger.** 2004. Does smearing inoculum reflect the bacterial composition of the smear at the end of the ripening of a French soft, red-smear cheese? *J. Dairy Sci.* **87**:3189–3197.
7. **Gavriš, E., V. I. Krauzova, N. V. Potekhina, S. G. Karasev, E. G. Plotnikova, O. V. Altyntseva, L. A. Korosteleva, and L. I. Evtushenko.** 2004. Three new species of brevibacteria: *Brevibacterium antiquum* sp. nov., *Brevibacterium aurantiacum* sp. nov. and *Brevibacterium permense* sp. nov. *Mikrobiologiya* **73**(2):218–225.
8. **Hoppe-Seyler, T. S., B. Jaeger, W. Bockelmann, A. Geis, and K. J. Heller.** 2007. Molecular identification and differentiation of *Brevibacterium* species and strains. *Syst. Appl. Microbiol.* **30**:50–57.
9. **Lepage, E., S. Brinster, C. Caron, C. Ducroix-Crepy, L. Rigottier-Gois, G. Dunny, C. Hennequet-Antier, and P. Serror.** 2006. Comparative genomic hybridization analysis of *Enterococcus faecalis*: identification of genes absent from food strains. *J. Bacteriol.* **188**:6858–6868.
10. **Lima, P. T., and A. M. Correia.** 2000. Genetic fingerprinting of *Brevibacterium linens* by pulsed-field gel electrophoresis and ribotyping. *Curr. Microbiol.* **41**(1):50–55.
11. **Mounier, J., R. Gelsonino, S. Goerges, M. Vancanneyt, K. Vandemeulebroecke, B. Hoste, S. Scherer, J. Swings, G. F. Fitzgerald, and T. M. Cogan.** 2005. Surface microflora of four smear-ripened cheeses. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:6489–6500.
12. **Oberreuter, H., J. Charzinski, and S. Scherer.** 2002. Intraspecific diversity of *Brevibacterium linens*, *Corynebacterium glutamicum* and *Rhodococcus erythropolis* based on partial 16S rDNA sequence analysis and Fourier-transform infrared (FT-IR) spectroscopy. *Microbiology* **148**:1523–1532.
13. **Picard, F., S. Robin, M. Lavielle, C. Vaisse, and J.-J. Daudin.** 2005. A statistical approach for array CGH data analysis. *BMC Bioinformatics* **6**:27.

### **Supplementary material : *B. aurantiacum* genome analysis and microarray design**

The *B. aurantiacum* ATCC9174 (formerly *B. linens*) draft genome was downloaded from JGI ([http://genome.jgi-psf.org/draft\\_microbes/breli/breli.home.html](http://genome.jgi-psf.org/draft_microbes/breli/breli.home.html)). Gene prediction and functional annotation were performed using AGMIAL. 4211 ORFs were predicted on the 76 major contigs (<http://genome.jouy.inra.fr/~vloux/publications/forquin08/>).

Probe design was performed using ROSO completed with in-house scripts. ROSO takes a number of parameters into account to design effective oligonucleotide probes : i) uniqueness among the genomes and lack of cross-hybridization against exclusion genomes, ii) melting temperature (T<sub>m</sub>), iii) lack of secondary structures, iv) distance from the 3' end of the gene. We ran ROSO on the 4211 candidate target genes. Our objective was to obtain two 40-mer probes per target gene with a T<sub>m</sub> around 80°C, preferably located at the 3' end of the gene. The genomes of *Arthrobacter aurescens* TC1, *Arthrobacter sp.* (strain FB24), *Corynebacterium glutamicum*, *Lactococcus lactis* IL1403, *Debaryomyces hansenii* CBS767, *Kluyveromyces lactis* NRRL Y-1140 and *Yarrowia lipolytica* CLIB99 were used as exclusion genomes. Three runs were made progressively lowering the criteria on secondary structure and probe localization to maximize the number of probes. 2995 targets (71.1%) have two probes, 1158 (27.5%) one while 1.4% of the genes (58) have no optimal probe, due to their length, repetitions in the genome or composition. The microarrays were produced by Agilent. Probes were replicated on the array to reach a final density of 15K probes per array. Seven positive controls (housekeeping genes from *B. aurantiacum*) and one negative control (40-mer oligo randomly generated with the same GC% as *B. aurantiacum* and no cross-hybridization) were also included in the array. A complete description of the microarray is available in the agmial site (<http://genome.jouy.inra.fr/~vloux/publications/forquin08/>).

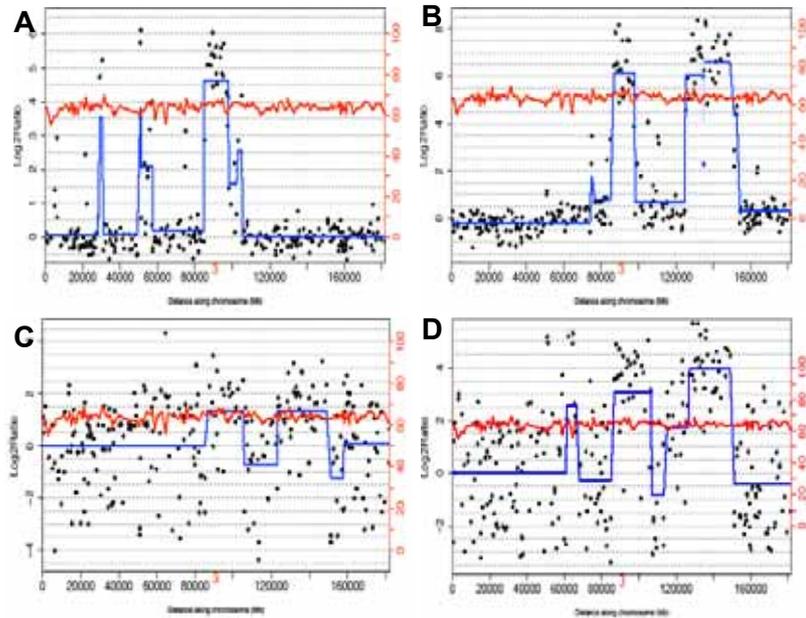
Chromosomal DNA was extracted from bacterial cultures of five strains and was labelled with either Cy3 or Cy5 fluorescent dye (GE healthcare, little Chalfond, UK) using the BioPrime DNA labelling system kit (Invitrogen, Carlsbad, USA) according to the manufacturer's recommendations. Hybridization and microarrays washing were performed in accordance with the manufacturer's instructions (Agilent, USA). The CGH analysis was performed with the Franck Picard model.

**Table S1.** List of genes corresponding of describe region deleted or highly divergent in strain ATCC9175 and/or in strain BL2

	Gene Name	Putative Function	GC%	Contigs
Island A <sup>a*</sup>	BL 614	Hypothetical protein	65.8	3
	BL 615	Probable monooxygenase, component A	66.2	3
	BL 616	NADPH-dependent FMN reductase	64.0	3
	BL 617	Probable monooxygenase, component A	65.5	3
	BL 618	ABC peptide transporter, ATP-binding component	67.7	3
	BL 619	ABC peptide transporter, permease protein	65.3	3
	BL 620	ABC peptide transporter, Binding-protein membrane component	68.0	3
	BL 621	ABC transporter, periplasmic binding protein	61.9	3
Island B <sup>a</sup>	BL 2220	Hypothetical protein	57.0	22
	BL 2221	Hypothetical protein	55.3	22
	BL 2222	transcriptional regulator	61.2	22
	BL 2223	Hypothetical protein	61.5	22
	BL 2224	Peptide chain release factor RF3	59.8	22
	BL 2225	Beta-lactamase-like:RNA-metabolising metallo-bet a-lactamase	57.7	22
	BL 2227	Hypothetical protein	57.0	22
	BL 2228	Hypothetical protein	62.7	22
	BL 2229	Putative sulfate permease family protein	57.7	22
	BL 2230	Hypothetical protein	59.9	22
	BL 2231	Resolvase-like	59.7	22
	BL 2233	Putative sulfate permease family protein	58.9	22
	BL 2234	Regulatory protein, MerR	54.9	22
	BL 2235	Chromate transporter	60.7	22
	BL 2236	Probable transcriptional regulator	55.9	22
	Island C <sup>b*</sup>	BL 377	Putative proline racemase	67.7
BL 378		Hypothetical protein	63.4	2
BL 379		Putative transposase	60.5	2
BL 380		Amino acid ABC transporter	61.9	2
BL 381		Amino acid ABC transporter, permease protein	57.8	2
BL 382		Extracellular solute-binding protein, family 3 precursor	61.7	2
Island D <sup>c</sup>	BL 1304	Phage integrase precursor	64.6	9
	BL 1496	Hypothetical protein	57.0	9
	BL 1497	Excisionase/Xis, DNA-binding	64.5	9
	BL 1498	Hypothetical protein	67.1	9
	BL 1499	Hypothetical protein	56.8	9
	BL 1500	Hypothetical protein	59.3	9
	BL 1501	Hypothetical protein	60.7	9
	BL 1502	Hypothetical protein	62.1	9
	BL 1503	Hypothetical protein	64.4	9
	BL 1504	Hypothetical protein	63.2	9
	BL 1505	Hypothetical protein	60.1	9
	BL 1506	Hypothetical protein	62.9	9
	BL 1507	Hypothetical protein	65.4	9
	BL 1509	Hypothetical protein	63.1	9
	BL 1510	Hypothetical protein	61.5	9
	BL 1511	Hypothetical protein	68.3	9
	BL 1512	Hypothetical protein	64.9	9
BL 1513	Tail tape measure protein, TP901 family	60.6	9	

	Gene Name	Putative Function	GC%	Contigs
Island E <sup>a</sup>	BL 1102	Hypothetical protein	63.1	9
	BL 1103	Putative extracellular solute-binding dependent transport	57.1	9
	BL 1104	Oligopeptide/dipeptide ABC transporter ATP-binding	64.1	9
	BL 1105	Putative peptide ABC transporter permease protein	61.7	9
	BL 1106	Putative peptide ABC transporter permease protein	58.2	9

<sup>a</sup> region deleted in ATCC9175 and BL2 strains, <sup>b</sup> region deleted in ATCC9175 strain, <sup>c</sup> region deleted in BL2 strain, <sup>d</sup> region highly divergent in BL2 strain, \* PCRs were performed with the DNA of the ATCC9175 and BL2 strains.



**FIGURE S1** Schematic representation of deleted region in the contig 3 (A) ATCC9175, (B) BL2, (C) ATCC9172 and (D) CNRZ918. In red: %GC, in blue segmentation obtain by Franck Picard R package.

### A-3 Conclusions

Dans cette étude, deux approches ont été développées : i) une approche par « Multilocus Sequence Typing » (MLST) basée sur 9 gènes de ménages (*cysN*, *glnA*, *gyrA*, *metY*, *metX*, *mgl*, *pheS*, *sah* et *tkl*) ; ii) une approche par « Comparative Genomic Hybridization » (CGH). Nous avons aussi réalisé une approche plus classique de séquençage du gène de l'ARN 16S. Les résultats combinés des analyses de type MLST et de séquençage de l'ARNr 16S sur 5 souches ont confirmé la classification originale des souches fromagères de *Brevibacteriaceae* en deux espèces différentes (*B. linens* et *B. aurantiacum*). Cette analyse a surtout permis de étendre cette classification avec, pour la première fois, la mise en évidence de l'espèce *B. antiquum* parmi les souches d'intérêt technologique.

Cette approche nous a aussi permis de répondre à notre première question à savoir que la souche séquencée est la souche ATCC 9174 et non la souche BL2 comme indiqué sur la site du JGI. En effet, lors des analyses de nos résultats de séquençage, nous n'avons eu aucune différence au niveau des bases nucléotidiques entre la souche ATCC 9174 et le génome disponible. Ce résultat nous a donc permis de choisir la souche *B. aurantiacum* ATCC 9174 comme témoin pour l'analyse CGH.

Une puce à ADN a été utilisée pour étudier la diversité des 5 souches de Brevibactéries analysées en MLST. Les souches *B. linens* ATCC 9172 et *B. antiquum* CNRZ 918 sont trop éloignées de la souche de *B. aurantiacum* ATCC9174 et les résultats n'ont pas pu être exploités. Par contre, nous avons réalisé une étude de diversité intra-espèce de *B. aurantiacum*. Trois mille trois cents huit gènes sont conservés chez les trois souches de cette espèce alors que 13% et 15% des gènes du génome de la souche séquencée ATCC 9174 sont absents et/ou trop divergents dans les souches BL2 et ATCC 9175. Les analyses ont montré qu'il existait une variabilité au niveau des transporteurs de peptides et/ou oligopeptides montrant ainsi une forme d'adaptation au milieu fromager. Cette étude est une étude de cas montrant la possibilité d'une telle approche pour des souches d'intérêt technologique, une analyse portant sur un plus grand nombre de souches pourrait donc être envisagée.

Nous nous sommes particulièrement intéressés au métabolisme du soufre, puisque dans la suite de ce travail un des volets concerne ce métabolisme. Seuls trois gènes du métabolisme central du soufre sont absents du génome des souches BL2 et ATCC 9175 (deux

monooxygénases putatives et une réductase potentiellement impliquées dans la voie d'assimilation des sulfonates).

L'étude CGH nous a donc permis de choisir judicieusement notre souche pour la suite de ce travail. Les espèces *B. linens* et *B. antiquum* ne peuvent pas être utilisées sur la puce à ADN développée car elles sont trop distantes phylogénétiquement ; nous avons dû choisir entre les différentes souches de *B. aurantiacum*. Historiquement dans le laboratoire, nous utilisons la souche type de cette espèce, la souche ATCC 9175, isolée d'un camembert pour effectuer diverses fabrications de fromage. Notre choix s'est donc naturellement porté sur la souche de ***B. aurantiacum* ATCC 9175**.

## **B- Etude de la régulation du métabolisme du soufre à une réponse à une disponibilité en soufre chez *B.aurantiacum*.**

### **B-1-Contexte et objectifs de l'étude.**

Le choix de la souche *B. aurantiacum* ATCC9175 a été effectué suite à l'étude précédente. De plus, dans la partie bibliographique, nous avons vu que les différentes espèces de *Brevibacterium* participent activement à l'affinage des fromages à pâte molle par la production de composés soufrés volatils, développant ainsi la flaveur de ces fromages. Les études effectuées portent généralement sur le catabolisme des acides aminés soufrés (cystéine et méthionine) (del Castillo-Lozano *et al.*, 2008) (Cholet *et al.*, 2007) (Arfi *et al.*, 2003) (Dias et Weimer, 1998b) (Dias et Weimer, 1998a). Cependant, aucune étude n'a été effectuée sur les voies d'entrée et de biosynthèse des acides aminés soufrés chez cette bactérie.

Dans ce travail, nous avons souhaité étudier la régulation du métabolisme du soufre à la disponibilité en différentes sources de soufre (sulfate, cystine, méthionine et en carence en soufre). Pour cela, nous avons combiné des approches transcriptomiques et métabolomiques (fiche technique 10)

Les résultats obtenus ont fait l'objet d'une deuxième publication soumise dans la revue « BMC genomics », et constituant le chapitre II-B-2.

## B-2-Résumé

Les *Brevibacteriaceae* sont des acteurs majeurs de l'affinage de fromage, particulièrement par leurs capacités à produire des composés soufrés volatils (CSVs). La méthionine  $\gamma$ -lyase dégrade la méthionine en méthanethiol qui est le précurseur de plusieurs CSVs. Cependant, comparé aux autres bactéries, peu de données sont disponibles sur le métabolisme central du soufre chez *Brevibacteriaceae*.

Dans cette étude, nous avons combiné une reconstruction métabolique, des essais de croissance, des analyses métabolomiques et transcriptomiques pour obtenir une vue globale du métabolisme du soufre et de sa régulation chez *B. aurantiacum*. En accord avec les croissances en présence de sulfate et cystine, la reconstruction métabolique montre la présence de la voie d'assimilation du sulfate et de la voie thiolation produisant la cystéine (*cysE* et *cysK*) et l'homocystéine (*metX* et *metY*) à partir du sulfide, d'un gène codant pour une étape de la transsulfuration (*aecD*) et trois méthionine-synthases. Nous avons également comparé les profils d'expression de la souche ATCC 9175 de *B. aurantiacum* lors d'une carence en soufre mais aussi lors de croissances en présence de méthionine plus cystine, cystine et sulfate. Durant une limitation en soufre, 690 gènes sont différentiellement exprimés dont 21 codent pour des protéines impliquées dans le métabolisme du soufre et 29 gènes codent pour des protéines impliquées dans le transport d'acides animés ou de peptides.

Nous avons également observé des changements dans les pools de métabolites soufrés et dans les profils d'expression liés au métabolisme du soufre après une croissance en présence de méthionine plus cystine, cystine et sulfate. L'expression des gènes impliqués dans les voies d'assimilation du sulfate et de biosynthèse de la cystéine sont réprimés par la cystine alors que l'expression des gènes *metX*, *metY*, *metE1*, *metE2* et d'un gène codant pour la cystathionine  $\gamma$ -synthase, *BL613*, diminue en présence de méthionine. Nous avons également identifié trois ABC transporteurs dont deux ont leurs expressions augmentés pendant une limitation en cystine et un autre lors d'une carence en méthionine. Enfin, nous observons que les gènes, *BL929* codant pour la méthionine  $\gamma$ -lyase et *metPS* codant pour un transporteur de méthionine sont induits en présence de méthionine. Ces augmentations d'expression sont coordonnées avec une forte production de CSVs.

Ce travail représente la première vue globale du métabolisme du soufre et de sa régulation chez *B. aurantiacum*. Nous proposons également, des hypothèses sur des facteurs impliqués dans la régulation soufre-dépendante agissant en *cis* et en *trans*.

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

Marie-Pierre Forquin<sup>1,2</sup>, Agnès Hébert<sup>3</sup>, Aurélie Roux<sup>4</sup>, Julie Aubert<sup>5</sup>, Caroline Proux<sup>6</sup>, Jean-François Heilier<sup>4</sup>, Sophie Landaud<sup>1</sup>, Christophe Junot<sup>4</sup>, Pascal Bonnarne<sup>1\*</sup> and Isabelle Martin-Verstraete<sup>2</sup>

<sup>1</sup>INRA-AgroParisTech, UMR 782 Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires, Centre de Biotechnologies Agro-Industrielles, 78850, Thiverval-Grignon, France,

<sup>2</sup>Institut Pasteur, Unité des Bactéries Anaérobies et Toxines ; 25-28, rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, France.

<sup>3</sup>INRA-AgroParisTech, UMR 1319 Micalis Centre de Biotechnologies Agro-Industrielles, 78850, Thiverval-Grignon, France.

<sup>4</sup>CEA, Service de Pharmacologie et d'Immunoanalyse, DSV/iBiTec-S, CEA/Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette cedex, France.

<sup>5</sup>INRA-AgroParisTech, UMR 518 Mathématiques et Informatiques Appliquées; Paris

<sup>6</sup>Institut Pasteur, Plate-forme puces à ADN, 28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, France

\* corresponding author : Pascal Bonnarne , UMR 782 Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires, Centre de Biotechnologies Agro-Industrielles, 78850, Thiverval-Grignon, France

## Abstract

**Background :** *Brevibacteriaceae* are major actors in the cheese ripening, particularly via their ability to produce volatile sulfur compounds (VSCs). Methionine  $\gamma$ -lyase degrades methionine into methanethiol, which is a precursor for a wide variety of VSCs. However, few data are available regarding the central sulfur metabolism in *Brevibacteriaceae* as compared to other bacteria.

**Results:** In this study, we combined metabolic reconstruction, growth assays, metabolome and transcriptome analyses to obtain a global view of the sulfur metabolic network and of the response to sulfur availability in *Brevibacterium aurantiacum*. In agreement with the growth of *B. aurantiacum* in the presence of sulfate and cystine, the metabolic reconstruction showed the presence of a sulfate assimilation pathway of thiolation pathways producing cysteine (*cysE* and *cysK*) or homocysteine (*metX* and *metY*) from sulfide, of at least one gene of the transsulfuration pathway (*aecD*) and of genes encoding 3 MetE-type methionine synthases. We also compared the expression profiles of *B. aurantiacum* ATCC9175 during sulfur starvation and after growth in the presence of sulfate, cystine or methionine plus cystine. During sulfur depletion, 690 genes including 21 genes involved in sulfur metabolism and 29 genes encoding amino-acids and peptide transporters were differentially expressed. We also observed changes in pools of sulfur-metabolites and in expression profiles of sulfur-related genes after growth in the presence of sulfate, cystine or methionine plus cystine. The expression of genes involved in sulfate assimilation and cysteine synthesis was repressed by cysteine while the expression of *metX*, *metY*, *metE1*, *metE2* and BL613 encoding the probable cystathionine- $\gamma$ -synthase decreased in the presence of methionine. We also identified three ABC transporters: two were induced during cysteine limitation and one during methionine depletion. Finally, the expression of genes encoding the methionine  $\gamma$ -lyase, *BL929*, and a methionine transporter (*metPS*) was induced in the presence of methionine concomitantly with a significant increase of VSCs production.

**Conclusion :** This work represents a global view of sulfur metabolism and its regulation in *B. aurantiacum*, a bacterium of major importance in cheese-ripening. We also propose hypothesis for *cis*-acting and *trans*-acting factors involved in sulfur-dependent regulation.

## Background

*Brevibacteriaceae* plays a major part in the cheese microbial community [1, 2] and can constitute over 5% of the total bacterial counts of mature cheese surfaces [3]. *Brevibacterium linens* and *Brevibacterium aurantiacum* strains have been used for a long time in the composition of ripening starters by the cheese industry, particularly for red smear cheeses. These bacteria are used for their ability to produce orange pigmentation, to liberate a variety of volatile sulfur aroma during cheese ripening but also for their inhibitory potential against food pathogens such as *Listeria monocytogenes*. *B. linens* and *B. aurantiacum* produce important amount of volatile sulfur compounds (VSCs), which are key aroma in the development of typical cheese flavor. The metabolic pathways leading to VSCs production have been for long investigated [4-7]. During the ripening process, amino-acids like methionine are gradually released due to the hydrolysis of the casein matrix of the curd by lactic acid bacteria (LAB) and yeasts [8, 9]. In cheese related *Brevibacteriaceae*, VSCs arise from the degradation of methionine to methanethiol (MTL) by a methionine  $\gamma$ -lyase. MTL is then used as a common precursor for a wide variety of VSCs found in cheese like dimethyl disulfide (DMDS), dimethyl trisulfide (DMTS) and *S*-methylthioesters [10]. However, little is known on the central sulfur metabolism in *Brevibacteriaceae* [11].

Microorganisms can frequently use sulfate for the synthesis of organic sulfur metabolites, mostly cysteine, methionine and *S*-adenosyl-methionine (SAM). The sulfate assimilation pathway involves uptake and activation of inorganic sulfate followed by a stepwise reduction to sulfite. Sulfite could also be obtained from organic sulfonates via their oxidation by monooxygenases [12]. Sulfite is then converted into sulfide by the sulfite reductase, CysJI [12]. An *O*-acetylserine-thiol-lyase, CysK, further catalyzes the reaction of sulfide and *O*-acetylserine (OAS) to give cysteine [12]. Homocysteine could be obtained from *O*-acylhomoserine and cysteine by the transsulfuration pathway via the intermediary formation of cystathionine or directly from *O*-acylhomoserine and sulfide by the thiolation pathway [13]. Cystathionine  $\gamma$ -synthase and cystathionine  $\beta$ -lyase are required for transsulfuration whereas *O*-acylhomoserine thiol-lyase is involved in the thiolation pathway. Homocysteine is then methylated by methionine synthases to form methionine [14]. Methionine is also a sulfur source for several bacteria indicating an efficient conversion of methionine into cysteine usually through the SAM recycling pathway and then the reverse transsulfuration pathway (Fig. 1). This pathway, which is present in mammals, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus subtilis*, requires the sequential action of a cystathionine  $\beta$ -synthase

and a cystathionine  $\gamma$ -lyase [12, 15]. Various sulfur-containing compounds are also efficiently taken up by specific transporters. 3 main families of inorganic sulfate (sulfate and/or thiosulfate) transporters are described: the SulT family of ABC transporters (Sulfate Uptake Transporter), the SulP family (Sulfate Permease) and the Pit family (Phosphate Inorganic Transporter) [16-18]. Moreover, ABC transporters and a symporter have been shown to participate in the uptake of cystine (the cysteine dimer) in *B. subtilis* and *Escherichia coli* [19]. Methionine can be taken up by high affinity ABC transporters of the MUT family [12] or by a recently characterized MetPS symporter in *Corynebacterium glutamicum* [20]. Finally, 2 different types of ABC transporters, the TauABCD and the SsuABC systems are involved in various sulfonates uptake [12, 21, 22].

The unfinished genome sequence of the *B. aurantiacum* ATCC9174 strain [23] has been recently released by the Joint Genome Institute (JGI) ([http://genome.jgi-psf.org/draft\\_microbes/breli/breli.home.html](http://genome.jgi-psf.org/draft_microbes/breli/breli.home.html)). This should pave the way to the investigation of metabolic pathways at genomic scale in this genus and, further, to the selection of strains with appropriate organoleptic characteristics. In this study, we performed a reconstruction of sulfur metabolism in *B. aurantiacum*. We further analyzed the metabolic and expression profiles of a strain of *B. aurantiacum* after growth under conditions of sulfur starvation or in the presence of various sulfur sources.

## Results

### ***Reconstruction of sulfur metabolism in B. aurantiacum.***

Gene prediction was performed on the *B. aurantiacum* ATCC9174 (formerly *B. linens*) draft genome from JGI using AGMIAL [24]. To explore the sulfur metabolism, we performed a systematic search in the *B. aurantiacum* genome for genes of *E. coli*, *B. subtilis*, *C. glutamicum* and *Mycobacterium tuberculosis* known to be involved in the assimilation pathways of sulfur containing compounds (Fig. 1). Growth of *B. aurantiacum* ATCC9174 and ATCC9175 in the ESM medium with various sulfur sources supported the proposed metabolic reconstruction (Fig. 2). We have previously demonstrated using a CGH analysis that most of the genes of ATCC9174 involved in sulfur metabolism with two exceptions (see below) are also present in ATCC9175 [23]. We showed that both strains were able to grow on sulfate as sole sulfur source in agreement with the presence of a sulfate assimilation pathway (CysIHDN-BL2146-BL2147-CysJ) in the genome of ATCC9174 and its conservation in

ATCC9175. Interestingly, a gene encoding an APS kinase, CysC, is absent in the genome of *B. aurantiacum*, indicating that PAPS is probably not produced and that CysH is an APS reductase rather than a PAPS reductase. This three-step pathway for sulfide synthesis has already been proposed for the high GC content Gram-positive bacteria, *C. glutamicum* and *M. tuberculosis* [25, 26]. We showed that strain ATCC9174 grew in the presence of several organic sulfonates (taurine, methanesulfonate or ethanesulfonate) in agreement with the presence in its genome of several operons that could be involved in the uptake and degradation of sulfonates into sulfite (Fig. 2B). However, the growth rate and the growth yield of ATCC9174 in the presence of sulfonates remained low as compared to that observed with sulfate or cystine suggesting that sulfonates were poor sulfur sources. Interestingly, *B. aurantiacum* ATCC9175 cannot use taurine, methanesulfonate or ethanesulfonate as sole sulfur sources while this strain grew similarly to ATCC9174 in the presence of sulfate or cystine (Fig. 2B and data not shown). This result may be correlated with the deletion of the *BL615-621* region containing genes sharing similarities with SsuD and SsuE in the genome of ATCC9175 as previously observed by CGH analysis [23]. *B. aurantiacum* further utilized the sulfide produced from sulfate, thiosulfate or sulfonates for the synthesis of cysteine using the OAS thiol-lyase, CysK and the serine-acetyltransferase, CysE. Both *B. aurantiacum* strains grew in the presence of cysteine or cystine indicating the existence of efficient methionine biosynthetic pathways. Two main pathways for homocysteine production, the thiolation and the transsulfuration pathways could be involved. Both pathways first required the synthesis of *O*-acetylhomoserine (OAH) by a homoserine acetyl-transferase, encoded by *metX*, a gene present in the genome of ATCC9174 (Fig. 1). Cysteine is converted into homocysteine via a classical transsulfuration pathway involving a cystathionine  $\gamma$ -synthase and a cystathionine  $\beta$ -lyase (Fig. 1). Homocysteine can also be synthesized directly from sulfide by an OAH thiol-lyase. Cystathionine  $\beta$ -lyase, cystathionine  $\gamma$ -synthase, OAH thiol-lyase, methionine  $\gamma$ -lyase and cystathionine  $\gamma$ -lyase belong to the same family of pyridoxal-P (PLP)-dependent enzymes [27]. Transcriptomic analyses will be therefore helpful to assign functions to the 4 members of this family present in the *B. aurantiacum* genome (BL56, BL541, BL613, BL929). However, the protein BL56, MetY, has similarities with OAH thiol-lyase of *C. glutamicum* (54% identity) and *M. tuberculosis* (61% identity) and contains a 30 amino-acid insertion usually present in OAH thiol-lyases [28]. A gene (*aecD*) encoding a cystathionine  $\beta$ -lyase of the PatC/MalY family is also present in the genome. Homocysteine is further methylated by methionine synthases. Several MetE-type proteins (BL2266, BL2839, and BL1340) are

present in the genome of *B. aurantiacum*. In addition, BL2496 is a 348 amino-acid polypeptide that shares similarities with the N-terminal part of MetH protein from various microorganisms (about 27 % identity) and the N-terminal part of *yitJ* (*metF*) from *B. subtilis* (27 % identity). Methionine can be converted into homocysteine by the SAM recycling pathway that requires MetK, the SAM synthase, SAM-dependent methylases and SahH, the S-adenosyl-homocysteine (SAH) hydrolase (Fig. 1). The ATCC9174 and ATCC9175 strains poorly grew in the presence of methionine as sole sulfur source. The doubling time is 24 h in the presence of methionine compared to 3.5 h when grown in the presence of sulfate or cystine (Fig. 2). We further tested the ability of strain ATCC9175 to grow in the ESM medium containing 500  $\mu$ M homocysteine. The growth rate with homocysteine was similar to that observed in the presence of cystine or sulfate (data not shown). This result indicated that an efficient pathway for the conversion of homocysteine to cysteine is functional in *B. aurantiacum*.

#### ***Regulation of sulfur metabolism in strain ATCC9175 in response to sulfur availability.***

To confirm the involvement of these genes in sulfur metabolism and to analyze the global response of *B. aurantiacum* to sulfur starvation, we first compared the expression profiles of strain ATCC9175 after growth in the presence of sulfate or after resuspension of the cells two hours in the absence of any sulfur source (Table 1). For this purpose, we used the strain ATCC9175, a technological strain with a better cheese matrix colonization capability than the sequenced strain ATCC9174 (data not shown). The CGH analysis previously demonstrated that the genes of strain ATCC9174 involved in sulfur metabolism are also present in the genome of strain ATCC9175 [23]. A total of 690 genes were differentially expressed at least two-fold in the presence of sulfate compared to sulfur starvation. Among them, 304 genes were more expressed during sulfur starvation and 386 genes were repressed in the same conditions. Three hundred genes (43 %) encode proteins of unknown function. One hundred and thirteen genes differentially expressed in the presence of sulfate or during sulfur starvation participated in central cellular processes such as transcription, translation, replication, cell wall, macromolecules degradation or respiration. Fourteen genes related to stress response were differentially expressed. Among them, genes encoding the ClpP1 protease, a catalase, 3 UspA-like proteins and a cold shock protein were induced during sulfur starvation. Seventy-one genes encoding transporters or associated proteins were differentially expressed in these two conditions. We will discuss below all the systems related to the uptake of peptides or sulfur-containing amino-acids (Table 2). Thirty

six genes encoding transcriptional regulators were also identified: 9 of them were induced in the presence of sulfate and 27 during sulfur starvation. The high number of regulators, which responds to these variations of growth conditions, may help *B. aurantiacum* to adapt to environmental changes. Nineteen, 31, 1, 21, 56 and 28 genes involved in nucleotide, carbohydrate, secondary metabolites, lipid/energy, amino-acid and co-factor/vitamin metabolisms were also differentially expressed in these two conditions.

Finally, 21 genes involved in sulfur metabolism were identified in this analysis (Table 1). During sulfur starvation, we observed an increased expression of genes involved in sulfate assimilation (CysND, CysH, CysJI), in cysteine biosynthesis from sulfide (CysE, CysK), in methionine synthesis via transsulfuration or thiolation [MetX, BL613, AecD, MetY, 2 MetE-like enzymes (BL1340, BL2839)] and also in SAM synthesis (MetK) (Fig. 1). The expression of *BL2478* encoding a glutamate-cysteine ligase also increased during sulfur depletion. By contrast, only 3 genes involved in sulfur metabolism were up-expressed in the presence of sulfate: *BL3579* encoding a cysteine desulfurase that incorporates sulfur in iron-sulfur clusters using cysteine as a donor, as well as *BL2266* and *BL2267* encoding a MetE-type protein and a protein of unknown function, respectively.

### **Changes in the metabolome of strain ATCC9175 grown in the presence of various sulfur sources.**

To obtain new insights on the regulation in response to sulfur availability, we compared the metabolome of strain ATCC9175 after growth in the presence of 500  $\mu$ M sulfate, 500  $\mu$ M cystine or 10 mM methionine plus 500  $\mu$ M cystine. The metabolomic analyses were performed with a LC coupled to a LTQ-Orbitrap mass spectrometer fitted with an electrospray source. The LTQ-Orbitrap measures accurate mass and discriminates the isobaric ions, therefore improving the determination of elemental composition of ions and identification procedures. Automatic peak detection and integration were performed by using XCMs software. Two different strategies were developed: i) a targeted metabolic profiling approach to analyze specific metabolic pathway; ii) a global approach to highlight relevant signals by using multivariate statistical analyses. The metabolic profiling was performed in positive (ESI+) and negative (ESI-) ion detection mode to maximize the panel of metabolites. We detected 1859 and 729 signals in ESI+ and ESI-, respectively.

We first focused our analyses on the intermediary compounds of sulfur metabolism. The cysteine remained undetectable in the three growth conditions (Table 3). *O*-acetylhomoserine and cystathionine were only detectable during growth with cystine or sulfate (Table 3).

Methionine concentration increased 8- and 11-fold during growth in the presence of methionine plus cystine, as compared to cystine alone or sulfate, respectively. Homocysteine concentration similarly increased 5- and 1000-fold during growth in the presence of methionine plus cystine as compared to cystine or sulfate.

A global approach was further performed. The variables (i.e., combinations of retention time and m/z ratio) resulting from the XCMS process were first mean centered and then scaled to Pareto variance. The resulting score plot obtained by PCA exhibited a clear separation between our three conditions, and more particularly in the presence of methionine. Two hundred and twenty one and 172 signals were regrouped in 119 and 108 clusters in the positive and negative mode, respectively. This statistical analysis highlighted the presence of 23 putative dipeptides and tripeptides in *B. aurantiacum* cells (data not shown). Among them, a Glu-Met dipeptide and its oxidized form Glu-methionine sulfoxide were identified and a tripeptide (Glu-Glu-Met or Met-Glu-Glu) was detected. The global analysis also strongly suggested the presence of mycothiol and 5-methylthioadenosine (Table 3 and Fig. S1). These compounds were characterized on the basis of the elemental composition provided by accurate mass measurements and the presence of sulfur in the molecule assessed by the isotopic pattern observed in the mass spectra. In the *B. aurantiacum* genome, a pathway for the biosynthesis of mycothiol (*mshABCD*) and a gene encoding a mycothiol disulfide reductase (*mtr*) were found (Fig. 1B). The mycothiol that is present in *Actinomyces* protects cells against oxidative stress. The methionine salvage pathway via 5-methylthioadenosine is not present in the genomic data of *B. aurantiacum* ATCC9174. However, the identification of this compound was confirmed by MS/MS experiments. Two hypotheses could be proposed: i) the methionine salvage pathway is present in the unsequenced part of the genome ; ii) the biosynthesis of 5-methylthioadenosine is performed by a still uncharacterized pathway. Finally, 7 putative sulfur-containing compounds were detected with this analysis on the basis of isotopic pattern: presence of ion 34 sulfur at 1.9959 (m/z) from mono-isotopic compound. (Table 3). Using metabolomic public databases, we identified one of these compounds as N-acetyl-cystathionine. Its concentration increased 62- and 5-fold in the presence of cystine as compared to sulfate or methionine plus cystine. The 6 other sulfur-containing compounds remain to be identified.

### **Comparison of the expression profiles after growth of ATCC9175 in the presence of various sulfur sources**

After growth of *B. aurantiacum* ATCC9175 in the presence of 500  $\mu$ M sulfate, 500  $\mu$ M

cystine or 500  $\mu$ M cystine plus 10 mM methionine, we observed important changes in the pools of sulfur-containing compounds that may influence the transcription of genes involved in sulfur metabolism. We then decided to compare the expression profiles of strain ATCC9175 grown in the same conditions (Table 1 and data not shown). A total of 15 and 30 genes were differentially expressed after growth of strain ATCC9175 in the presence of sulfate compared to the growth in the presence of cystine or methionine plus cystine, respectively. The expression profiles of 15 genes also differed when we compared growth in the presence of cystine and cystine plus methionine. Most of the genes differentially expressed in these three conditions participate in sulfur metabolism. However, a few other genes were differentially expressed when we compared growth of strain ATCC9175 in the presence of sulfate compared to the growth in the presence of methionine plus cystine. They encode a peptidase (BL978), a putative carboxymuconolactone decarboxylase, (BL1185), a putative monooxygenase (LuxA, BL1738) or proteins of unknown function.

#### **Sulfate assimilation and cysteine biosynthesis from sulfide are coordinately regulated.**

A first set of genes was derepressed during sulfur starvation and was more expressed in strain ATCC9175 grown in the presence of sulfate than in the presence of cystine or methionine and cystine (Table 1). The regulation factors were usually higher when we compared sulfate to cystine plus methionine than to cystine. The *cysN*, *cysD*, *cysH*, *cysI*, *cysJ*, *cysE* and *cysK* genes were clearly down-expressed in the presence of cysteine in agreement with their respective role in sulfate assimilation and cysteine biosynthesis from sulfide, the product of sulfate assimilation. The *metY* gene (*BL56*) encoding the OAH thiol-lyase that also used sulfide as substrate was similarly regulated. However, the synthesis of MetY also responded to methionine availability indicating a pattern of expression different from that of the *cys* genes (see below). The genes involved in sulfate assimilation (*cysIHDN-BL2146-BL2147-cysJ*) and in cysteine biosynthesis (*cysKE*) are organized in two operons (Fig. 3A). We then determined the transcriptional start site of these operons by 5'RACE. The transcription of the sulfate assimilation operon is initiated 32 pb upstream of the *cysI* translational start codon whereas that of the *cysKE* operon is initiated 117 pb upstream of the *cysK* translational start codon (Fig. 3A). Upstream of these transcriptional start sites, we did not identify the TATAAT and TTGACA sequences characteristic of promoters in *E. coli* and *B. subtilis*. The vegetative promoters of *C. glutamicum* contain an extended -10 region (tgngnTA(c/t)aaTgg) while the -35 region is much less conserved [29]. Nothing is known about the promoters recognized by RNA polymerase in *Brevibacteriaceae*. However, a motif TAN<sub>3</sub>TG sharing

similarities with part of the consensus of -10 region of *C. glutamicum* is present upstream of the transcriptional start site of *cysK* and *cysJ* (Fig. 3A).

### **Regulation of methionine biosynthesis and catabolism in response to methionine availability.**

The comparison of the expression profiles of strain ATCC9175 in the presence of cystine or cystine plus methionine pointed out few genes that were specifically regulated in response to methionine availability (Table 1). These genes probably participated either in methionine biosynthesis or degradation. Only 2 genes, *BL929* encoding a putative methionine  $\gamma$ -lyase and *BL891* encoding a regulator, were up-regulated in the presence of methionine (Table 1). *BL929* and *BL891* are adjacent on the chromosome. Using a pair of convergent oligonucleotides (Table S1 and Fig. 4A) located at the end of *BL929* and at the beginning of *BL891*, we demonstrated the existence of a common transcript for the two genes (data not shown). Surprisingly, the transcription of the *BL929* operon is initiated at the ATG translational start codon of *BL929* as previously observed for several genes in other actinomycetes [29] (Fig. 4A). Accordingly, no RBS is present upstream of the translational start site of *BL929*. Methionine was usually regarded as the precursor of VSCs (Fig. 1). We thus measured the total production of VSCs after growth of strain ATCC9175 in the presence of various sulfur sources (Table 4). This strain did not produce VSCs during growth in the presence of cystine or sulfate as sole sulfur sources. Large amounts of VSCs were detected when methionine was added to the ESM containing cysteine. DMDS and DMTS were the major VSCs produced under these conditions with 643.5 ppb and 201.6 ppb, respectively.

The expression of *metY* encoding the OAH thiol-lyase and of *BL2266* (*metE1*) encoding one of the methionine synthases was 16- and 32-fold repressed when methionine was added to a medium containing cystine (Table 1). This was also the case of *BL2267* encoding a protein of unknown function that is adjacent to *metE1*. Using RT-PCR, we demonstrated that *BL2267* and *BL2266* as well as *metY* and *metX* form operons (Fig. 3B). The methionine dependent repression of these two operons suggested that the thiolation pathway involving MetY and MetX and the methionine synthase, BL2266, play an important role in methionine biosynthesis in *B. aurantiacum*. The function of BL613 and BL541 sharing similarities with MetY and BL929 remains unclear. The expression of *BL613* increased in the presence of sulfate as compared to methionine plus cystine as observed for *metX*, *metY* and *metE1*. A 6-fold repression was observed in qRT-PCR 2 h after the addition of methionine to a medium containing cystine (Table S3). We further tested by qRT-PCR the expression of this gene after

growth of strain ATCC9175 in the presence of homocysteine. The expression of *BL613* is 30-fold repressed in the presence of homocysteine as compared to sulfate or cystine suggesting that *BL613* could participate in methionine synthesis via transsulfuration. By contrast, the expression of *BL541* was not modulated in all conditions tested (sulfur-starvation, sulfate, cystine, methionine plus cystine, homocysteine).

### **Regulation of transporters synthesis in response to sulfur, methionine or cysteine starvation**

Among the genes differentially expressed in the presence of sulfate compared to sulfur limitation, we identified several transporters (Table 2). Peptides are a source for sulfur-containing amino-acids required for the growth of *B. aurantiacum*. Indeed, yeasts and LAB degrade casein and produce peptides during the cheese-ripening process [8, 9]. Eleven peptide transporters are present in the genome of *B. aurantiacum*. Among them, the expression of an operon encoding an oligopeptide ABC transporter (*BL1734-1737*) increased about 5-fold during sulfur depletion. By contrast, other genes encoding ABC transporters for oligopeptides (*BL250-253*, *BL634-637*, *BL2377* and *BL2733*) or a dipeptide/tripeptide transporter (*BL1264*), were more expressed during growth with sulfate. Interestingly, the expression of five genes encoding proteases (*AprE/BL4033*, *BL2348*, *BL494*) or peptidases (*BL1078*, *BL1007*) increased also 2 to 4-fold in the presence of sulfate. These enzymes may contribute to the production or degradation of peptides.

Genes encoding two amino-acid ABC transporters (*BL1657* and *BL1293-1295*) were also up-expressed during growth with sulfate in transcriptome (Table 2). *BL1655-1657* and *BL1293-1296* share similarities with *MetNPQ*, a high affinity ABC transporter of *B. subtilis* (53%, 35% and 36% of identity) [12] and a cystine ABC transporter of *E. coli* (48%, 31%, 33%, 26% identity), respectively. Other proteins sharing similarities to known cystine or methionine transporters are present in the *B. aurantiacum* genome. The *BL1249-1250-1251* proteins correspond to an ABC transporter sharing similarities with *BL1293-1296* and with the cystine ABC transporter of *E. coli*. *BL3001-3000* shared similarities with *MetPS* a lower affinity methionine transporter of *C. glutamicum* (48% and 30% of identity) [20]. To analyze more in details the expression profiles of genes encoding these transporters, we decided to test the specific effect of cysteine or methionine limitation on their expression. For this purpose, the strain ATCC9175 was first grown in the presence of methionine plus cystine and then resuspended either in the presence of cystine alone (methionine depletion) or in the presence of methionine alone (cysteine depletion). A qRT-PCR analysis was then

performed on the genes *BL1657*, *BL1250*, *BL1296* and *BL3001*. The expression of *BL1250* and *BL1296* increased 2.1- and 3.2-fold, respectively, during cysteine limitation (Table S2). The two ABC transporters BL1249-1251 and BL1293-1296 probably constitute uptake systems for cystine and/or cysteine in agreement with their similarities with cystine ABC transporters (Fig. 1A).

During methionine limitation, the expression of the *BL1657* gene increased 25-fold while the expression of *BL3001* did not change. The important induction of the synthesis of the ABC transporter BL1655-1657 during methionine limitation is in agreement with a key role of this transporter for methionine supply when the conditions are harsh. To determine whether *BL3001* is constitutively expressed or not, we further tested the expression of *BL3001* in the presence of cystine or cystine plus methionine by qRT-PCR. The expression of *BL3001* increased 3.2-fold when methionine is added. It is worth noting that the expression of *BL929*, encoding the probable methionine  $\gamma$ -lyase also increased in a medium containing 10 mM methionine. An additional qRT-PCR analysis was performed to analyze the induction of the *BL929-BL891* operon and of the methionine transporter gene. We observed that the expression of *BL891*, *BL929* and *BL3001* increased 21-, 47- and 3-fold 2 h after the addition of 10 mM methionine in ESM containing cystine (Fig. 4B). These results indicated a methionine specific induction for these three genes.

## Discussion

In this study, we combined metabolic reconstruction, growth assays with expression and metabolic profiling to obtain a global view of the sulfur metabolic network and of the response to sulfur availability in *B. aurantiacum*, a major VCSs producing bacterium of the cheese-ripening community. The 47 genes that participate to sulfur metabolism are presented in Fig. 1. The sulfate assimilation pathway encoded by the *cysI* operon is present in *B. aurantiacum* as observed in *C. glutamicum* [30]. The direct formation of cysteine or homocysteine from sulfide via thiolation pathways requires CysE/CysK and MetX/MetY, respectively. Both pathways are present in the *B. aurantiacum* genome and the corresponding genes form two operons: *cysKE* and *metYX*. The expression of the *cysI* and *cysK* operons is high in the presence of sulfate and reduced when cysteine is present in the medium as expected for genes involved in cysteine production from sulfate. Using the IMOMI software [31], we identified a conserved TTGTTGAGCAA motif upstream of the *cysK* and *cysI* genes (Fig. 3A) suggesting a cysteine-dependent repression by a common regulator. Proteins sharing

similarities with regulators controlling sulfate assimilation and/or cysteine biosynthesis in other Gram-positive bacteria like McbR and CysR of *C. glutamicum* [26, 32] or CymR of *B. subtilis* [33] are absent from the genome of *B. aurantiacum* suggesting the involvement of a still uncharacterized regulator. In addition, effectors of regulators of these pathways like cysteine, OAS or OAH are either undetectable or not differentially accumulated during growth with sulfate or cysteine (OAH) in our metabolomic experiments.

Two methionine biosynthesis pathways, the direct thiolation and the transsulfuration, are present in the genome of *B. aurantiacum*. *C. glutamicum* utilized both pathways with an equal efficiency [30]. While the OAH-thiol-lyase, MetY, is clearly identified, the annotation of the enzymes for the transsulfuration pathway, the cystathionine  $\gamma$ -synthase (MetB) and the cystathionine  $\beta$ -lyases (MetC-type or AecD-type) is less evident. BL613, which is more similar to the MetB proteins of *C. glutamicum* and *M. tuberculosis* than BL541, is the probable cystathionine  $\gamma$ -synthase. In agreement with this hypothesis, homocysteine and to a lesser extent methionine repressed the expression of *BL613*. The synthesis of AecD, which is the probable cystathionine  $\beta$ -lyase, is constitutively expressed as observed for AecD of *C. glutamicum* and PatB of *B. subtilis* [34]. BL541 that shares similarities with Cg3086 could be either a second cystathionine  $\beta$ -lyase or a cystathionine  $\gamma$ -lyase [35]. Three MetE-type cobalamin independent methionine synthases required for homocysteine methylation are found in the genome of *B. aurantiacum*. MetE2 and MetE3 share 56 % and 43 % identity with the methionine synthase of *C. glutamicum*. Interestingly, MetE1 (BL2266) is highly similar to MetE from *Arthrobacter aurencens* (83 % identity) and *Arthrobacter arilaitensis* (78 %) but also to MetE proteins from *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Psychrobacter* and *Acinetobacter* (80 to 82 % identity). This strongly suggests the existence of a horizontal-gene transfer between  $\gamma$ -proteobacteria and *Micrococcineae* in common biotopes like soils or foods. The expression of *metE2* and *metE3* was up-regulated during sulfur starvation. The expression of *metE1* and *metE2* is repressed in the presence of methionine as observed for *BL613*, *metX*, *metY* and *BL1657* (Table 1 and data not shown). A conserved motif CATGACG-N4-GTGACA is present about 50 bp upstream of the *metY* and *BL613* transcriptional start sites with a duplication of the motif in the *BL613* promoter region. This suggests the existence of a coordinated regulation of these genes by a still uncharacterized regulator. However, this motif is absent in the promoter region of the *BL2267-metE1* and *BL1655-1656-1657* operons and *metE2* suggesting the possible existence of several regulators for methionine biosynthesis as observed in *E. coli* with MetJ and MetR [36]. In the presence of methionine, the pools of

methionine and homocysteine increase whereas cystathionine and OAH are depleted. All these compounds might be effectors of these regulators.

Surprisingly, the doubling time of *B. aurantiacum* ATCC9175 on methionine (24 h) is very high as compared to that observed in the presence of cystine or homocysteine (3.5 h). The ability of *B. aurantiacum* to grow on homocysteine indicates an efficient conversion of this compound into cysteine. Several pathways could be involved: the reverse transsulfuration pathway involving a cystathionine  $\beta$ -synthase and a cystathionine  $\gamma$ -lyase [12], the presence of an efficient homocysteine  $\gamma$ -lyase or the degradation of methionine to MTL and its further conversion into methanesulfonate [15] (Fig. 1). This latter possibility seems unlikely since *B. aurantiacum* poorly grows in the presence of methionine. Proteins sharing only weak similarities with cystathionine  $\beta$ -synthases (BL781) or cystathionine  $\gamma$ -lyases (BL541) are present in the *B. aurantiacum* genome. Interestingly, the purified methionine  $\gamma$ -lyase of *B. linens* BL2 has also an homocysteine  $\gamma$ -lyase activity [4]. Using qRT-PCR, we also show that the expression of *BL929* was 3.7-fold induced in the presence of homocysteine as compared to cystine (Table S3). The BL929 enzyme could participate to cysteine production from homocysteine via the intermediary formation of sulfide (Fig. 1B). Two hypotheses for methionine being a poor sulfur source for *B. aurantiacum* could be proposed: i) methionine is inefficiently taken up; ii) the SAM recycling pathway is limiting. Two methionine transporters are present in the *B. aurantiacum* genome: one sharing similarities with the high affinity transporter MetNPQ of *B. subtilis* [12] is induced during methionine limitation and the second one sharing similarities with the low affinity transporter MetPS of *C. glutamicum* [20] is induced in the presence of methionine. In addition, the intracellular concentration of methionine strongly increased during growth in the presence of cystine and methionine as compared to cystine indicating an efficient uptake of this amino-acid (Table 3). This slow growth then suggests a limitation of SAM recycling.

The catabolism of methionine in *Brevibacteriaceae* has been the subject of several studies because this amino-acid is the precursor of MTL, which is required for the production of different VSCs [4, 5, 37]. The methionine  $\gamma$ -lyase is the key enzyme for methionine degradation in *Brevibacteriaceae* and other bacteria [38, 39]. The expression of genes encoding methionine  $\gamma$ -lyases is induced by methionine in *Pseudomonas putida* [39] and *Citrobacter freundii* [40]. In addition, the methionine  $\gamma$ -lyase activity in *B. antiquum* CNRZ918 (formerly *B. linens*) increases in the presence of methionine [41]. BL929 is the only enzyme sharing similarities with methionine  $\gamma$ -lyase of which synthesis is induced by

methionine. This indicated that BL929 is the major methionine  $\gamma$ -lyase of *B. aurantiacum* ATCC9175. Methionine degradation leads to the production of  $\alpha$ -ketobutyrate in addition to MTL. Interestingly,  $\alpha$ -ketobutyrate is a precursor of isoleucine [42] and we observe an increase of isoleucine concentration in the presence of methionine (Table 3 and Fig. S1). The BL3000-3001 transporter similar to the MetPS system of *C. glutamicum* probably corresponds to the Na<sup>+</sup>-stimulated L-methionine transporter identified in *B. antiquum* CNRZ918 [43]. The expression of the BL3000-3001 operon contrary to that of *metPS* in *C. glutamicum* [20] is induced in the presence of 10 mM methionine. BL929 forms an operon with BL891 encoding a MerR-type regulator. This regulator is a good candidate to participate in the coordinated control of methionine  $\gamma$ -lyase and MetPS synthesis. Interestingly, the analysis of the DNA sequences upstream of the *BL929* and *BL3001* operons showed a common motif GAGTRYWMMAMAKCWC located 51 bp upstream the transcriptional start site. The existence of a coordinated regulation of methionine transport and degradation could be an adaptation to the cheese matrix in which amino-acids constitute a major substrate for growth and/or aroma production. Interestingly, a dipeptide Glu-Met and a tripeptide (Glu-Glu-Met or Met-Glu-Glu) accumulate in the presence of methionine. These peptideds might correspond to a form of storage of methionine during conditions of excess. However, the existence of a pathway for their synthesis remains to be established.

## Conclusion

This work represents the first full picture of sulfur metabolism of *B. aurantiacum*, a bacterium of major importance in cheese-ripening. Methionine catabolism has been extensively studied in this bacterium with respect to VSCs, which are key compounds in numerous food including the fermented ones [11, 37]. This study also gives an overview of the global regulation of sulfur metabolism through transcriptomic and metabolomic approaches. This bacterium develops at the cheese surface, and is then exposed to oxygen. The production/accumulation of reducing thiol molecules either extracellularly (sulfide, MTL) or intracellularly (mycothiol, homocysteine) could be an interesting adaptative feature of this microorganism to its biotope. Future development of this work will be the studies related to oxidative stress.

## Methods

### Bacterial strains and culture conditions.

*B. aurantiacum* strains ATCC9174 and ATCC9175 were used in this study. These strains were grown in a defined synthetic medium (SM), adapted from the medium described by Mansour et al [44]. It contained 47 components, including lactate and lactose as carbon sources, 17 free amino-acids, 14 vitamins, five metallic ions, and four nucleic acids. The pH of the culture medium was adjusted to 7.0. In this defined synthetic medium, a residual growth in the absence of any added sulfur source was observed. To avoid this problem, an exhausted synthetic medium (ESM) was obtained by growing *B. aurantiacum* ATCC9175 in a sulfur-free SM followed by centrifugation and filtration of the supernatant. In this ESM, a complete absence of growth was observed for the *B. aurantiacum* ATCC9175 strain in the absence of any sulfur source. This ESM was supplemented with a sulfur source as stated: 500  $\mu\text{M}$  sulfate, 500  $\mu\text{M}$  homocysteine, 500  $\mu\text{M}$  sulfite, 500  $\mu\text{M}$  *S*-methyl-L-cysteine, 500  $\mu\text{M}$  thiosulfate, 500  $\mu\text{M}$  cystine or 10 mM methionine. In cow casein, methionine is about 10-fold more abundant as compared to cysteine [45]. We then used an ESM medium containing 500  $\mu\text{M}$  L-cystine and 10 mM methionine to mimic the ratio present in cow casein.

#### **Volatile sulfur compounds extraction and analysis**

The volatile compounds were analyzed with a system composed of a dynamic head space analyzer (Purge and Trap HP 3547A, Agilent Technologies) fitted with a sorbent trap (Tenax, 60 to 80 mesh, 0.25 g, 30 by 0.32 cm) and a cryofocusing module. The concentrator was coupled to a gas chromatograph (GC G1530A, Agilent Technologies) connected to a mass spectrometer detector (MSD 5973; Agilent Technologies). Five milliliters of the non-filtered culture was heated at 60°C and then purged for 15 min with high-purity helium at 15 ml.min<sup>-1</sup>. The volatile compounds were concentrated by adsorption to the Tenax trap maintained at 40°C. Water was then removed by flushing the trap with helium for 3 min (dry purge). The trap was heated at 225°C for 2 min to desorb the volatile compounds, which were directly transferred at 150°C to the head of a capillary column and condensed by cryofocusing at -150°C. The condensed volatile compounds were then injected by heating (180°C) on a nonpolar capillary column (HP-5MS, 30.0 m by 0.25 mm, 0.25 $\mu\text{m}$  film thickness) flushed with high-purity helium at a constant flow (1.2ml.min<sup>-1</sup>). The oven temperature was held at 5°C for 8 min. Then the metabolites were eluted with a first linear gradient of 3°C.min<sup>-1</sup> from 5 to 20°C, followed by a second linear gradient of 10°C.min<sup>-1</sup> from 20 to 150°C. The temperature was then held at 150°C for 10 min. The compounds were identified and quantified by mass spectrometry. The column was directly connected to the mass sensitive detector by an interface heated at 280°C. The electron impact energy was set at 70 eV, and data were collected in the range of 29 to 300 atomic mass units. Components were identified

by their retention times and by comparison of their mass spectra with those of the Wiley275 mass spectral database (Agilent Technologies). The concentrations of each volatile compound produced were quantified using a standard curve of pure DMDS (Sigma-Aldrich). Measurements were made in triplicate for each concentration in the non-inoculated media and the concentrations of volatile compounds were expressed as equivalent of DMDS in  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ .

### **RNA extraction, quantitative real-time PCR (qRT-PCR) and 5'RACE analysis**

Exponentially growing cells were collected and broken by shaking in a Fastprep apparatus (Bio 101). Total RNA was then extracted by Trizol treatment (Invitrogen, Carlsbad, USA) as previously described [46]. RNA quality was assessed with an Agilent 2100 Bioanalyser. After RNA extraction, the cDNAs were synthesized using the SuperScript III first-strand synthesis system (Invitrogen) according to the manufacturer's recommendations. The primers used are listed in Table S1. In each sample, the quantity of cDNA for each gene was normalized to the quantity of the *rpoB* cDNA, which is considered as a stably expressed gene. The relative change in gene expression was recorded as the ratio of normalized target concentrations ( $\Delta\Delta\text{ct}$ ). The transcriptional start sites of the *BL613* gene and the *metY*, *BL2267*, *BL929*, *BL3001*, *cysK*, and *cysI* operons were determined using the 5'/3' RACE Kit (Roche) according to the manufacturer's recommendations. RNA preparations extracted from strain ATCC9175 grown in the presence of various sulfur sources were used as template. The primers used for 5'RACE analysis are listed in Table S1.

### **Transcriptome analysis**

The expression profiles of *B. aurantiacum* ATCC 9175 grown in the presence of various sulfur sources were analyzed using DNA microarrays (Agilent, USA). The microarray was described in a previous study [23]. RNAs were labelled with either Cy3 or Cy5 fluorescent dye (GE healthcare, little Chalfond, UK) using the SuperScript Direct cDNA labelling system kit (Invitrogen, Carlsbad, USA) according to the manufacturer's recommendations. The levels of Cy3-dCTP and Cy5-dCTP incorporation were quantified by absorbance measurement. Hybridizations were then performed for 17 h at 65°C in dedicated micro-chambers with 150 pmol of the different samples. Dye swap was further performed. Arrays scanning was realized with a GenePix 4000A dual-channel (635 nm and 532 nm) laser scanner (GenePix) with a resolution of 10 nm per pixel. The laser power was set at 100, and the photomultiplier tension was adjusted between 680 and 800 V according to the average intensity of the hybridization of each slide in order to optimize the dynamic range of measurements. For further analysis, intensity-dependent normalization was performed with the LOESS [47] procedure followed

by subtraction of the log-ratio median calculated over the values for an entire block from each individual log-ratio using the *anapuce* package of R [48]. Differential analysis was performed with the *varmixt* package of R [48].

### **Extraction of intracellular metabolites and analysis by liquid chromatography coupled to mass spectrometry**

Intracellular metabolites of *B. aurantiacum* ATCC9175 cells were extracted as follows. Cells were grown in ESM with various sulfur sources. Exponentially growing cells ( $10^{10}$  bacteria) were centrifugated. The cells were washed with 20 mL of Milli-Q water to prevent contamination with ESM and centrifugated again. The pellets were then stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . After incubation of the frozen pellets for 15 min at  $4^{\circ}\text{C}$ , they were resuspended with 1 mL of formic acid 1%. The solution was then incubated for 10 min at  $95^{\circ}\text{C}$  and centrifuged 30 min at  $4^{\circ}\text{C}$ . The supernatant was lyophilized and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ .

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

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

### **Data processing and statistical analyses**

All data were processed using the Qualbrowser module of Xcalibur version 2.0.7 (Thermo Fisher Scientific, Les Ulis, France), and its chemical formula generator was used to provide elemental compositions. Automatic peak detection from LC/MS chromatograms was performed by using the XCMS software [49], version 1.14.1 running under R version 2.8.1. The R language was installed on a Dell Eight-core Intel Xeon 3.00GHz Processor with 16 Go RAM running Linux (Centos 5.2 x86\_64). The matchedFilter algorithm was used and default

values were set for all parameters except for fwhm, step, steps, mzdif, mzwid, bw and snthresh which were set respectively at 25, 0.01, 3, 0.1, 0.1, 5 and 3. A list of the areas of the peaks detected was generated for each sample, using a combination of the retention time (RT) and the  $m/z$  ratio as an identifier. An arbitrary number was assigned to each of these RT- $m/z$  pairs in order of elution. The data were then combined into a single matrix by aligning peaks with the same mass-retention time pair together from each data file in the data set. The XCMS data sets were annotated using in house developed tools: the spectral database of the laboratory, and an informatics tool for automatic query of metabolic and metabolomic public databases with the measured accurate masses.

The resulting data matrix were introduced into SIMCA P<sup>®</sup> (version 12.0; Umetrics, Sweden) for multivariate analyses (MVAs). Prior to MVAs by unsupervised and supervised methods, principal component analysis (PCA), partial least square or projection on latent structure – discriminant analysis (PLS-DA) and orthogonal partial least square or projection on latent structure (OPLS) in discriminant analysis mode, respectively, data exported from XCMS were first mean-centered and scaled either to unit variance or to Pareto variance. Models were validated by using the cross-validation function of SIMCA P<sup>®</sup>. PLS-DA models were tested with permutation tests ( $k=20$ ). Otherwise, the area and intensity of chromatographic peaks were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA). The mean values of each group were then compared with control group by Dunnett's test. Normality was checked before running the ANOVA. Values of  $p < 0.05$  were considered significant. Calculations were done using the GraphPad Prism version 5 software (GraphPad software Inc., La Jolla, CA).

### **Authors' contributions**

M.P.F. carried out the *in silico* analysis, the molecular genetic, transcriptomic and metabolomic studies, and drafted the manuscript. M.P.F., C.P. and J.A. participated in microarray experiments and statistical analysis. A.H. and A.R. contributed to the metabolomic study. J.F.H. and C.J. developed XCMS software. S.L. carried out the CG-MS assays. C. J., P.B. and I. M.V. conceived the study, and participated in its design and in data analysis and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

### **Acknowledgments**

The sequence data of “*B. linens* BL2” were produced by the U.S. Department of Energy Joint Genome Institute ([http://genome.jgipsf.org/draft\\_microbes/breli/breli.home.html](http://genome.jgipsf.org/draft_microbes/breli/breli.home.html)). We thank

E. Guedon and F. Rul for helpful discussions and XX for correcting the English language. We are also grateful to R. Tache for her technical support. This work was supported by the EcoMet program (ANR-06-PNRA-014) funded by ANR (Agence Nationale de la Recherche) and by grants from the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA-UMR 782 GMPA) and from the Institut Pasteur. MPF is grateful to ANR for a Ph.D. scholarship and IMV is full professor at the Université Paris 7.

## References

1. Mounier J, Gelsomino R, Goerges S, Vancanneyt M, Vandemeulebroecke K, Hoste B, Scherer S, Swings J, Fitzgerald GF, Cogan TM: **Surface microflora of four smear-ripened cheeses.** *Appl Environ Microbiol* 2005, **71**(11):6489-6500.
2. Rea MC, Gorges S, Gelsomino R, Brennan NM, Mounier J, Vancanneyt M, Scherer S, Swings J, Cogan TM: **Stability of the Biodiversity of the Surface Consortia of Gubbeen, a Red-Smear Cheese.** *J Dairy Sci* 2007, **90**(5):2200-2210.
3. Bockelmann W: **Smear ripened cheeses.** H. Roginski, J.W. Fuquay and P.F. Fox, **Editors.** *Encyclopedia of dairy sciences, Academic Press* 2003:391–401.
4. Dias B, Weimer B: **Purification and characterization of L-Methionine gamma - Lyase from *Brevibacterium linens* BL2.** *Appl Environ Microbiol* 1998, **64**(9):3327-3331.
5. Dias B, Weimer B: **Conversion of methionine to thiols by *Lactococci*, *Lactobacilli*, and *Brevibacteria*.** *Appl Environ Microbiol* 1998, **64**(9):3320-3326.
6. Arfi K, Amarita F, Spinnler HE, Bonnarme P: **Catabolism of volatile sulfur compounds precursors by *Brevibacterium linens* and *Geotrichum candidum*, two microorganisms of the cheese ecosystem.** *J Biotechnol* 2003, **105**(3):245-253.
7. Amarita F, Yvon M, Nardi M, Chambellon E, Delettre J, Bonnarme P: **Identification and functional analysis of the gene encoding Methionine-gamma-Lyase in *Brevibacterium linens*.** *Appl Environ Microbiol* 2004, **70**(12):7348-7354.
8. Boutrou R, Guéguen M: **Interests in *Geotrichum candidum* for cheese technology.** *Int J Food Microbiol* 2005, **102**(1):1-20.
9. Christensen J, Dudley E, Pederson J, Steele J: **Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria.** *Antonie van Leeuwenhoek* 1999, **76** 217-246.

10. Bonnarme P, Lapadatescu C, Yvon M, Spinnler HE: **L-methionine degradation potentialities of cheese-ripening microorganisms.** *J Dairy Res* 2001, **68**(4):663-674.
11. Landaud S, Helinck S, Bonnarme P: **Formation of volatile sulfur compounds and metabolism of methionine and other sulfur compounds in fermented food.** *Appl Microbiol Biotechnol* 2008, **77**( 6 ):1191-1205.
12. Soutourina O, Martin-Verstraete I: **Global regulatory network of sulfur metabolism in *Bacillus subtilis*.** In: *Global regulatory networks in Bacillus subtilis*. Edited by Fujita Y: Transworld research network; 2007: 111-141.
13. Hwang B-J, Yeom H-J, Kim Y, Lee H-S: ***Corynebacterium glutamicum* utilizes both transsulfuration and direct sulphydrylation pathways for methionine biosynthesis.** *J Bacteriol* 2002, **184**(5):1277-1286.
14. Ludwig ML, Matthews RG: **Structure-based perspectives on B12 dependent enzymes.** *Annu Rev Biochem* 1997, **66**(1):269-313.
15. Vermeij P, Kertesz MA: **Pathways of assimilative sulfur metabolism in *Pseudomonas putida*.** *J Bacteriol* 1999, **181**(18):5833-5837.
16. Mansilla MC, De Mendoza D: **The *Bacillus subtilis* *cysP* gene encodes a novel sulphate permease related to the inorganic phosphate transporter (Pit) family.** *Microbiology* 2000, **146**(4):815-821.
17. Hryniewicz M, Sirko A, Palucha A, Bock A, Hulanicka D: **Sulfate and thiosulfate transport in *Escherichia coli* K-12: identification of a gene encoding a novel protein involved in thiosulfate binding.** *J Bacteriol* 1990, **172**(6):3358-3366.
18. Wooff E, Michell SLI, Gordon SV, Chambers MA, Bardarov S, Jacobs WRJ, Hewinson RG, Wheeler PR: **Functional genomics reveals the sole sulphate transporter of the *Mycobacterium tuberculosis* complex and its relevance to the acquisition of sulphur *in vivo*.** *Mol Microbiol* 2002, **43**(3):653-663.
19. Burguiere P, Auger S, Hullo M-F, Danchin A, Martin-Verstraete I: **Three different systems participate in L-cystine uptake in *Bacillus subtilis*.** *J Bacteriol* 2004, **186**(15):4875-4884.
20. Trötschel C, Follmann M, Nettekoven JA, Mohrbach T, Forrest LR, Burkovski A, Marin K, Krämer R: **Methionine uptake in *Corynebacterium glutamicum* by MetQNI and by MetPS, a novel methionine and alanine importer of the NSS neurotransmitter transporter family.** *Biochemistry* 2008, **47**(48):12698-12709.
21. van der Ploeg JR, Weiss MA, Saller E, Nashimoto H, Saito N, Kertesz MA, Leisinger T: **Identification of sulfate starvation-regulated genes in *Escherichia coli*: a gene**

- cluster involved in the utilization of taurine as a sulfur source.** *J Bacteriol* 1996, **178**(18):5438-5446.
22. Koch DJ, Ruckert C, Rey DA, Mix A, Puhler A, Kalinowski J: **Role of the *ssu* and *seu* genes of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 in the utilization of sulfonates and sulfonate esters as sulfur sources.** *Appl Environ Microbiol* 2005, **71**(10):6104 - 6114.
  23. Forquin MP, Duvergey H, Proux C, Loux V, Mounier J, Landaud S, Coppee JY, Gibrat JF, Bonnarme P, Martin-Verstraete I *et al*: **Identification of *Brevibacteriaceae* by Multilocus Sequence Typing and Comparative Genomic Hybridization Analyses.** *Appl Environ Microbiol* 2009, **75**(19):6406-6409.
  24. Bryson K, Loux V, Bossy R, Nicolas P, Chaillou S, van de Guchte M, Penaud S, Maguin E, Hoebeke M, Bessieres P *et al*: **AGMIAL: implementing an annotation strategy for prokaryote genomes as a distributed system.** *Nucl Acids Res* 2006, **34**(12):3533-3545.
  25. Schelle MW, Bertozzi CR: **Sulfate Metabolism in *Mycobacteria*.** *ChemBioChem* 2006, **7**(10):1516-1524.
  26. Rey DA, Nentwich SS, Ruckert C, Koch DJ, Puhler A, Tauch A, Kalinowski J: **The *McbR* repressor modulated by the effector substance S-adenosylhomocysteine controls directly the transcription of a regulon involved in sulfur metabolism of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032.** *Mol Microbiol* 2005, **56**(4):871 - 887.
  27. Mehta PK, Christen P: **The molecular evolution of pyridoxal-5'-phosphate-dependent enzymes.** *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 2000, **74**:129-184.
  28. Cherest H, Thomas D, Surdin-Kerjan Y: **Cysteine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* occurs through the transsulfuration pathway which has been built up by enzyme recruitment.** *J Bacteriol* 1993, **175**(17):5366-5374.
  29. Patek M, Nesvera J, Guyonvarch A, Reyes O, Leblon G: **Promoters of *Corynebacterium glutamicum*.** *J Biotechnol* 2003, **104**(1-3):311 - 323.
  30. Ruckert C, Koch DJ, Rey DA, Albersmeier A, Mormann S, Puhler A, Kalinowski J: **Functional genomics and expression analysis of the *Corynebacterium glutamicum fpr2-cysIXHDNYZ* gene cluster involved in assimilatory sulphate reduction.** *BMC Genomics* 2005, **6**:121.
  31. Pons N, Batto JM, Ehrlich SD, Renault P: **Development of software facilities to characterize regulatory binding motifs and application to *streptococcaceae*.** *J Mol Microbiol Biotechnol* 2008, **14**(1-3):67-73.

32. Ruckert C, Milse J, Albersmeier A, Koch DJ, Puhler A, Kalinowski J: **The dual transcriptional regulator CysR in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 controls a subset of genes of the McbR regulon in response to the availability of sulphide acceptor molecules.** *BMC Genomics* 2008, **9**(1):483.
33. Even S, Burguiere P, Auger S, Soutourina O, Danchin A, Martin-Verstraete I: **Global control of cysteine metabolism by CymR in *Bacillus subtilis*.** *J Bacteriol* 2006, **188**(6):2184 - 2197.
34. Auger S, Gomez MP, Danchin A, Martin-Verstraete I: **The PatB protein of *Bacillus subtilis* is a C-S-lyase.** *Biochimie* 2005, **87**(2):231-238.
35. Ruckert C, Puhler A, Kalinowski J: **Genome-wide analysis of the L-methionine biosynthetic pathway in *Corynebacterium glutamicum* by targeted gene deletion and homologous complementation.** *J Biotechnol* 2003, **104**(1-3):213 - 228.
36. Weissbach H, Brotn N: **Regulation of methionine synthesis in *Escherichia coli*.** *Mol Microbiol* 1991, **5**(7):1593-1597.
37. Cholet O, Hénaut A, Bonnarme P: **Transcriptional analysis of L-methionine catabolism in *Brevibacterium linens* ATCC9175** *Appl Microbiol Biotechnol* 2007, **74** ( 6 ):1320-1332.
38. Manukhov IV, Mamaeva DV, Rastorguev SM, Faleev NG, Morozova EA, Demidkina TV, Zavilgelsky GB: **A Gene encoding L-Methionine {gamma}-Lyase is present in *Enterobacteriaceae* family genomes: identification and characterization of *Citrobacter freundii* L-Methionine {gamma}-Lyase.** *J Bacteriol* 2005, **187**(11):3889-3893.
39. Inoue H, Inagaki K, Eriguchi SI, Tamura T, Esaki N, Soda K, Tanaka H: **Molecular characterization of the *mde* operon involved in L-methionine catabolism of *Pseudomonas putida*.** *J Bacteriol* 1997, **179**(12):3956-3962.
40. Manukhov IV, Mamaeva DV, Morozova EA, Rastorguev SM, Faleev NG, Demidkina TV, B. ZG: **L-methionine gamma-lyase from *Citrobacter freundii*: cloning of the gene and kinetic parameters of the enzyme.** 2006, **71**(4):361-369.
41. Ferchichi M, Hemme D, Nardi M: **Induction of methanethiol production by *Brevibacterium linens* CNRZ 918.** *J Gen Microbiol* 1986, **132**(11):3075-3082.
42. Ramakrishnan T, Adelberg EA: **Regulatory Mechanisms in the Biosynthesis of Isoleucine and Valine II. Identification of Two Operator Genes.** *J Bacteriol* 1965, **89**(3):654-660.

43. Ferchichi M, Hemme D, Nardi M: **Na<sup>+</sup>-stimulated transport of L-methionine in *Brevibacterium linens* CNRZ 918.** *Appl Environ Microbiol* 1987, **53**(9):2159-2164.
44. Mansour S, Beckerich JM, Bonnarme P: **Lactate and amino acid catabolism in the cheese-ripening yeast *Yarrowia lipolytica*.** *Appl Environ Microbiol* 2008, **74**(21):6505-6512.
45. Fox PF, McSweeney PLH, Wallace J, Guinee TP: **Cheese : *Chemistry, Physics and microbiology* General Aspect**, vol. 1, 3 edn. Amsterdam: Elsevier Academic Press; 2004.
46. Guillouard I, Auger S, Hullo MF, Chetouani F, Danchin A, Martin-Verstraete I: **Identification of *Bacillus subtilis* CysL, a regulator of the *cysJI* operon, which encodes sulfite reductase.** *J Bacteriol* 2002, **184**(17):4681-4689.
47. Yang YH, Dudoit S, Luu P, Lin DM, Peng V, Ngai J, Speed TP: **Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation.** *Nucleic Acids Res* 2002, **30**(4).
48. Delmar P, Robin S, Daudin JJ: **VarMixt: efficient variance modelling for the differential analysis of replicated gene expression data.** *Bioinformatics* 2005, **21**(4):502-508.
49. Smith CA, Want EJ, O'Maille G, Abagyan R, Siuzdak G: **XCMS: processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification.** *Anal Chem* 2006, **78**(3):779-787.

### Figures

#### **Figure 1. Sulfur metabolism in *B. aurantiacum*.**

The *BL* numbers for *B. aurantiacum* genes correspond to those of Agmial (<http://genome.jouy.inra.fr/~vloux/publications/forquin08/>). The genes were renamed according to *B. subtilis* and *C. glutamicum* orthologues. “?” indicates a step or a pathway for which the gene proposed remains to be more clearly identified.

**A- Transport of sulfur compounds:** Methionine transporters, *metNIQ*, *metPS*; Cyst(e)ine transporters, Sulfate transporter, Sulfonates transporters. **B- Central sulfur metabolism.** ATP sulfurylase, *cysDN*; APS reductase, *cysH*; sulfite reductase, *cysJI*; Serine *O*-acetyltransferase, *cysE*; OAS thiol-lyase, *cysK*; homoserine dehydrogenase, *hom*; homoserine acetyl-transferase, *metX*; OAH thiol-lyase, *metY*; cystathionine  $\beta$ -lyase, *aecD*; cystathionine  $\gamma$ -synthase, *metB*, methionine synthase, *metE1-3*; methionine  $\gamma$ -lyase, *mgl*; SAM synthetase, *metK*; SAH hydrolase, *sahH*; alkanesulfonate monooxygenase, *ssuD1-2*; flavin mononucleotide (FMN) reductase, *ssuI*; FMNH<sub>2</sub>-dependent alkanesulfonate monooxygenase,

*seuA*; electron transfer flavoprotein, *fixA*; Glycosyltransferase, *mshA* ; MSH deacetylase, *mshB*; MSH ligase, *mshC*; MSH synthase, *mshD*; MSH disulfide reductase, *mtr*; NAD/mycothiol dependent formaldehyde dehydrogenase/nitrosothiol reductase; *mscR*; MSH-S-conjugate amidase, *mca*; Ac-CoA, acetyl-coenzyme A; APS, adenylyl sulfate; ATP, adenosine triphosphate; PPi, diphosphate; OAS, *O*-acetylserine; MSH, mycothiol, MSSM, mycothiol disulfide; GlcN-INS : Glucoaminonylinositol ; THF, tetrahydrofolate ; SAM, S-adenosyl-methionine, SAH, S-adenosyl-homocysteine;  $\alpha$ -KB,  $\alpha$ -ketobutyrate. In green : a coordinate repression in cystine. In blue: a coordinate repression in presence of methionine. In red : an induction of these genes in addition of methionine in ESM. In orange : induction of these genes in cystine limitation.

**Figure 2. Growth of *B. aurantiacum* strains in the presence of various sulfur sources:**

**A- Growth of strain ATCC 9175 in ESM in the presence of various sulfur sources:** 10 mM methionine and 500  $\mu$ M cystine (■), 10 mM methionine (▲), 500  $\mu$ M cystine (●). The growth of strain ATCC9175 in ESM in the presence of 500  $\mu$ M sulfite, 500  $\mu$ M homocysteine, 500  $\mu$ M cystathionine, 500  $\mu$ M thiosulfate was similar to the growth in the presence of 500  $\mu$ M cystine (data not shown).

**B- Growth of the strains ATCC 9175 (open symbols) and ATCC9174 (closed symbols) in ESM in the presence of sulfate or sulfonates:** 500  $\mu$ M sulfate (□,■) or 500  $\mu$ M taurine ( $\Delta$ ,▲). The growth of strains ATCC9175 and ATCC9174 in ESM in the presence of 500  $\mu$ M methanesulfonate or ethanesulfonate was similar to the growth in the presence of 500  $\mu$ M taurine (data not shown).

**Figure 3. Genetic organization of operons involved in sulfate assimilation or cysteine biosynthesis (A) and in methionine biosynthesis (B).** An arrow indicates the experimental transcriptional start site. The potential -10 boxes for promoter are underlined. The start codon is indicated in italic. The green and blue boxes correspond to conserved motifs. Terminator is represented by a loop. The position of primers used for the determination of operon by RT-PCR is symbolized by arrows.

**Figure 4. Operons induced in the presence of methionine. Genetic organization of the BL929-BL891 and BL3000-3001 operons (A).** An arrow indicates the transcriptional start sites. The potential -10 boxes of the promoter are underlined. The start codons of BL929 and BL3001 are indicated in italic. A red box corresponds to a conserved motif. Terminator is represented by a loop. **Q-RT-PCR analysis of BL929, BL891 and BL3001 expression after addition of methionine (B).** The  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method was applied to calculate the relative amount

of cDNAs of interest. Methionine (10 mM) was added to a culture of strain ATCC9175 in an ESM containing 500  $\mu$ M cystine and the cells were then harvested 0 and 2 h after methionine addition.

**Figure S1. Sulfur containing compounds and amino-acids detected with the targeted analysis (A) or global analysis (B).** Cultures were supplemented with 10 mM methionine and 500  $\mu$ M cystine (MC), 500  $\mu$ M cystine (C) or 500  $\mu$ M sulfate (S). Values are expressed as the mean of at least 3 determinations. *Error bars* correspond to extreme values from at least 3 independent determinations. \* correspond to a *pvalue* < 0.05.

# Figures

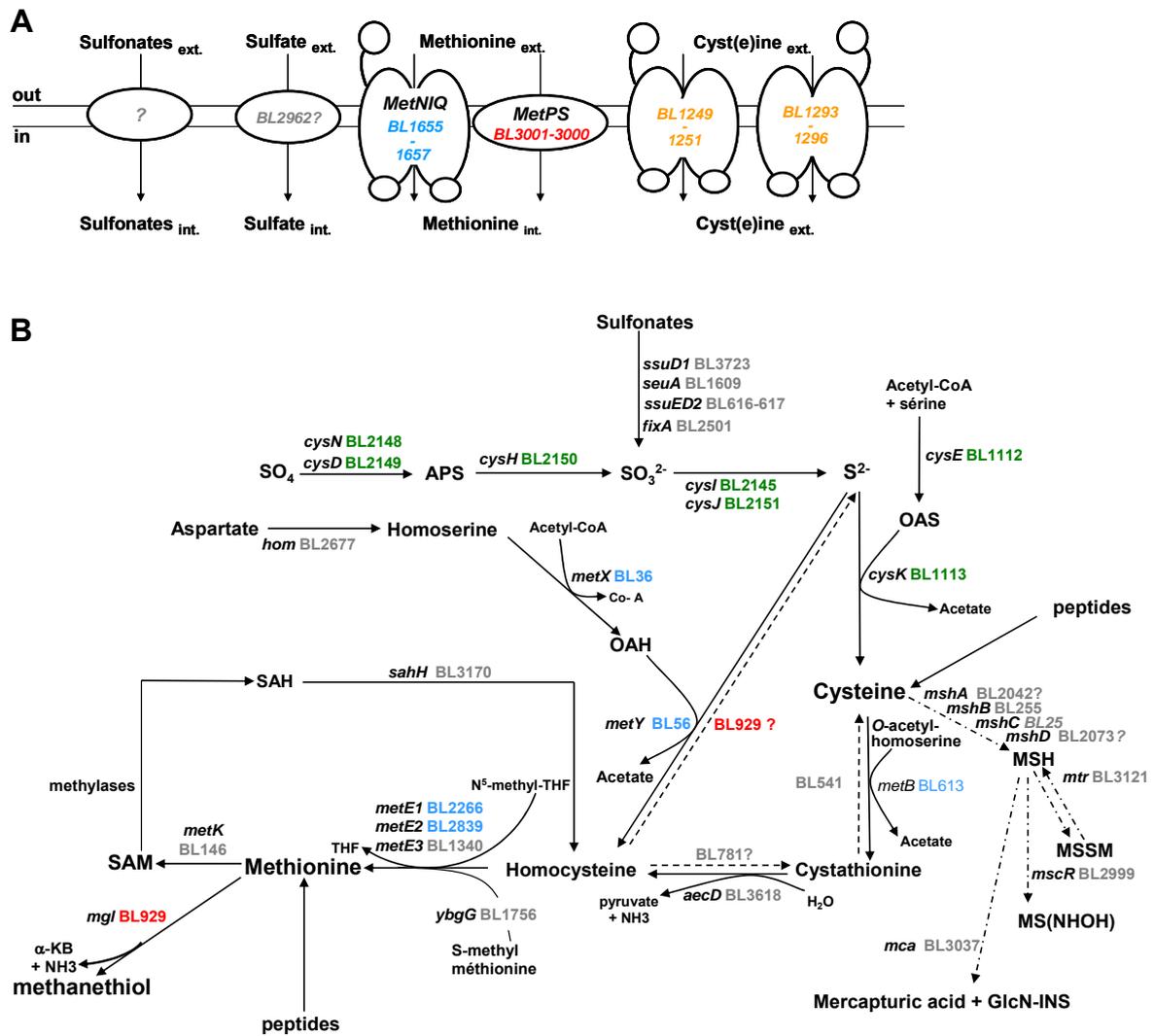


Figure 1

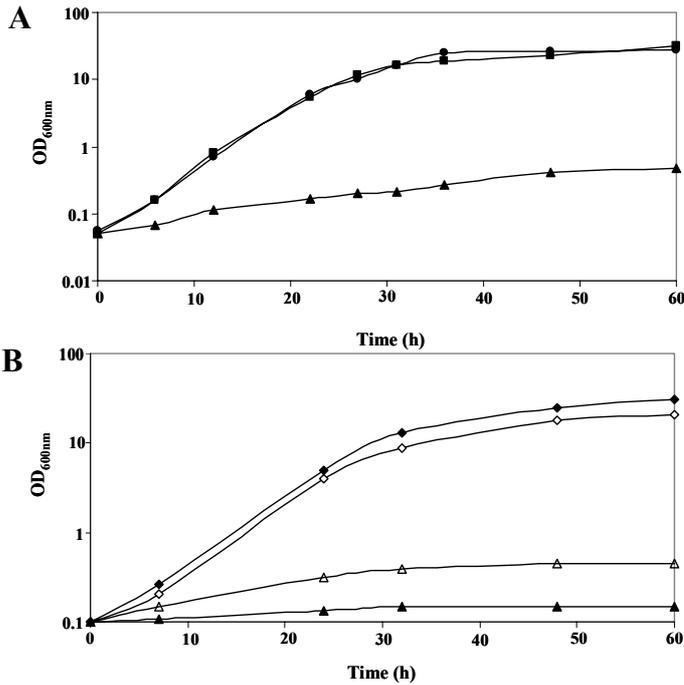


Figure 2.

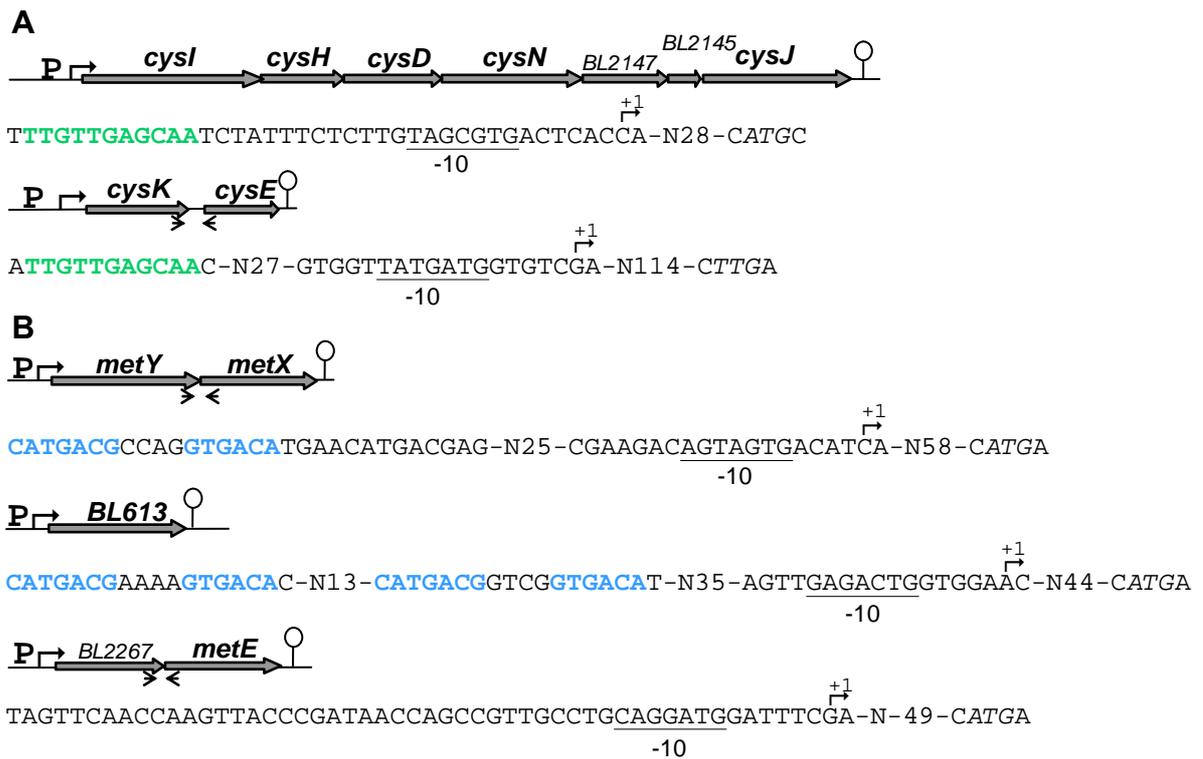


Figure 3.

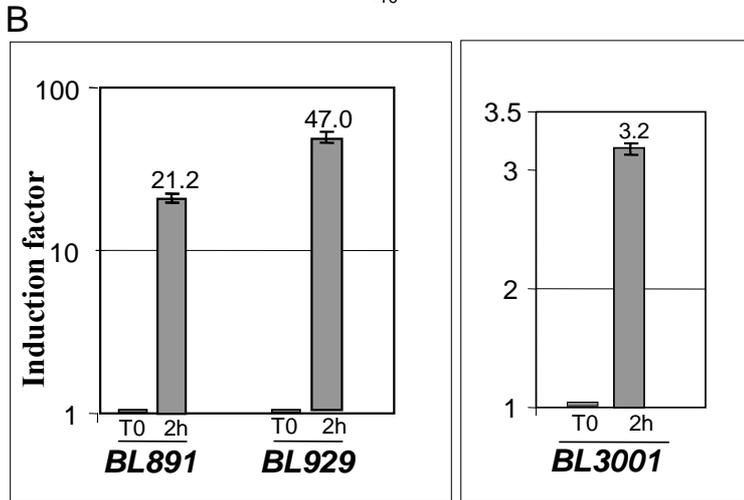
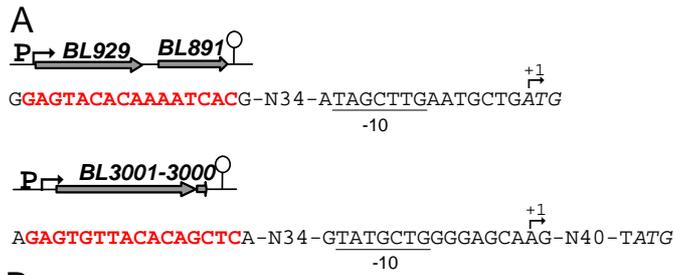


Figure 4.

\*

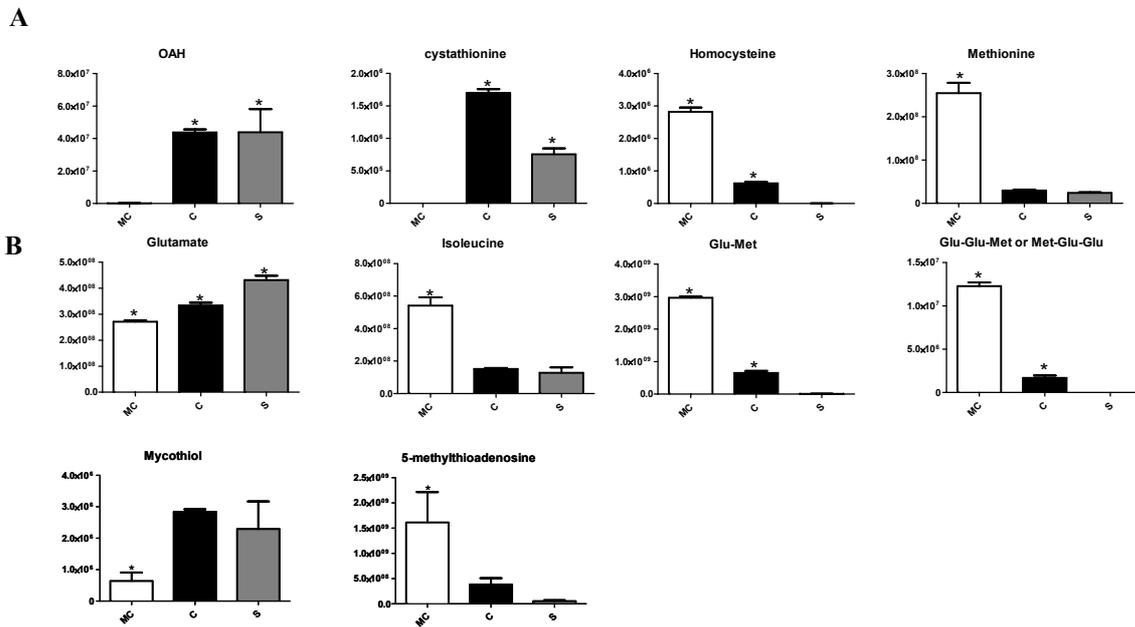


Figure S1.

**Table 1.** Genes related to sulfur metabolism differentially expressed in *B. aurantiacum* ATCC9175 grown in the presence of cystine, sulfate, methionine plus cystine or in the absence of any sulfur source.

Gene	Function/similarity	S/no sulfur ratio	<i>P</i> value	S/MC ratio	<i>P</i> value	C/MC ratio	<i>P</i> value	S/C ratio	<i>P</i> value
BL 146	MetK, SAM synthetase	0.34	4.5E-6	-*	2.8E-2	-	-	-	-
BL 613	MetC, putative cystathionine β-lyase	0.26	2.8E-7	7.55	1.8E-4	-	-	-	-
BL 1112	CysE, serine acetyltransferase	0.16	1.1E-12	2.82	2.1E-3	-	-	2.37	1.7E-2
BL 1113	CysK, OAS sulfhydrylase	0.32	2.5E-5	8.65	1.2E-6	-	-	3.39	1.8E-5
BL 2145	CysJ, sulfite reductase, flavoprotein	0.38	6.1E-6	3.50	4.5E-2	-	-	2.86	2.8E-2
BL 2147	Uroporphyrin-III C-methyltransferase, C-terminal	0.47	2.9E-3	4.51	1.7E-3	-	-	2.47	8.5E-5
BL 2148	CysN, sulfate adenylyltransferase	0.33	5.1E-6	14.21	4.3E-5	-	-	3.53	2.41E-5
BL 2149	CysD, sulfate adenylyltransferase	0.44	2.5E-3	16.95	1.4E-7	-	-	3.38	3.1E-3
BL 2150	CysH, phosphoadenosine 5'-phosphosulfate sulfotransferase	0.26	4.5E-7	7.04	1.5E-3	-	-	2.79	6.1E-3
BL 2151	CysI, sulfite reductase, hemoprotein	0.25	3.0E-6	10.39	3.1E-3	-	-	3.58	7.4E-6
BL 2839	MetE2, cobalamin-independent methionine synthase	0.30	4.9E-7	4.02	2.2E-2	-	-	-	-
BL2146	Unknown fonction	0.46	7.1E-4	4.51	1.7E-3	-	-	-	-
BL 1340	MetE3, cobalamin-independent methionine synthase	0.31	1.1E-6	-	-	-	-	-	-
BL 2496	Protein sharing similarity with part of MetH	0.27	9.0E-9	-	-	-	-	-	-
BL 1114	Formylmethionine deformylase	0.39	1.2E-5	-	-	-	-	-	-
BL 3618	AecD, cystathionine β-lyase	0.21	3.4E-10	-	-	-	-	-	-
BL 2478	Glutamate-cysteine ligase.	0.18	8.0E-8	-	-	-	-	-	-
BL 3579	IscS, cysteine desulfurase	3.85	1.1E-7	-	-	-	-	-	-
BL 36	MetX, Homoserine acetyltransferase	0.50	9.6E-3	5.26	7.4E-3	***	-	****	-
BL 56	MetY, O-acetylhomoserine sulfhydrylase	**	1.7E-3	18.77	1.9E-4	16.13	8.0E-2	2.2	5.1E-2
BL 2266	MetE1, cobalamin-independent methionine synthase	16.10	0 E 0	11.84	5.5E-10	32.40	5.5E-4	0.45	4.0E-2
BL 2267	Unknown fonction	19.3	0 E 0	13.8	1.9E-10	32.4	3.5E-2	-	-
BL 891	regulator MerR-like	-	-	0.10	5.9E-06	0.07	3.6E-2	-	-
BL 929	Mgl, methionine γ-lyase	-	-	0.06	5.5E-10	0.07	8.2E-2	-	-

**S : Sulfur, MC : methionine+cystine, C : cystine.** The *P*value ≤0.05 using a Benjamini and Hochberg (BH) test in S/no sulfur condition and *P*value ≤0.1 using the BH test in S/MC, S/C, and C/MC conditions and the difference higher 2 or lower 0.5. \* BL56 1.8 in this condition \*\* BL56 0.52 in this condition, \*\*\* in qRT-PCR the C/MC ratio is 7.0 (±1.3) \*\*\*\*in qRT-PCR the S/C ratio is 1.6 (± 0.4)

**Table 2.** Genes encoding oligopeptide or amino-acid transporters differentially expressed in *B. aurantiacum* ATCC9175 grown in the presence of sulfate, methionine plus cystine or during sulfur limitation.

Gene	Function/similarity	S/no sulfur ratio	<i>P</i> value	S/MC ratio	<i>P</i> value
BL 1734	Oligopeptide ABC transporter, solute-binding protein	0.14	5.4 E-12	-	-
BL 1736	Oligopeptide ABC transporter, permease	0.22	7.9 E-10	-	-
BL 1735	Oligopeptide ABC transporter, permease	0.46	6.3 E-10	-	-
BL 1737*	Oligopeptide ABC transporter, ATP-binding protein	0.19	5.3 E-10	-	-
BL 380	Probable glutamine ABC transporter, ATP-binding protein	0.47	6.6E-3	-	-
BL 250	Oligopeptide ABC transporter, solute binding component	2.15	2.7E-3	-	-
BL 251	Oligopeptide ABC transporter, permease	9.00	2.1E-14	-	-
BL 252	Oligopeptide ABC transporter solute-binding protein	14.23	2.1E-14	-	-
BL 253	Oligopeptide ABC transporter ATP-binding protein	12.30	2.1E-14	-	-
BL634	Oligopeptide ABC transporter ATP-binding protein	2.95	5.6E-6	-	-
BL635	Oligopeptide ABC transporter, permease	3.25	1.5E-6	-	-
BL636	Oligopeptide ABC transporter solute-binding protein	3.40	4.8E-7	-	-
BL637	Oligopeptide ABC transporter solute-binding protein	5.90	4.4E-5	-	-
BL 1103	Oligopeptide ABC transporter, solute-binding protein	9.95	0.0E+0	-	-
BL 1104	Oligopeptide ABC transporter, ATP-binding protein	2.25	8.1E-3	-	-
BL 2377	Oligopeptide ABC transporter, permease	2.96	5.2E-5	-	-
BL 2733	Oligopeptide ABC transporter, permease	2.50	6.7E-4	-	-
BL 1197	Amino acid transporter	2.05	2.0 E-4	-	-
BL1264	Dipeptide/tripeptide permease	5.16	2.7 E-11	-	-
BL 1657	Methionine ABC transporter, MetQ	6.90	5.1E-4	-	-
BL 2207	Lysine transporter	2.14	1.4E-3	-	-
BL 3604	livF leucine/isoleucine/valine transporter, ATP-binding protein	3.51	6.2E-7	-	-
BL3605	livJ leucine/isoleucine/valine transporter, solute-binding protein	2.93	4.2E-6	-	-
BL3607	livM leucine/isoleucine/valine transporter, permease	3.32	3.5E-7	-	-
BL3608	livH leucine/isoleucine/valine transporter, permease	2.24	7.3E-4	-	-
BL 1293	Probable cystine ABC transporter ATP-binding protein	8.27	0 E 0	1.82	7.9E-2
BL 1294	Probable cystine ABC transporter, permease	10.74	2.1E-14	2.01	3.9E-2
BL 1295	Probable cystine ABC transporter, permease	6.01	6.2 E-13	1.92	2.6E-2
BL 1296	Probable cystine ABC transporter, solute binding component	2.14	2.1E-3	-	-

\* The expression of this gene increased 2-fold in the presence of sulfate as compared to cystine.

**Table 3. Sulfur containing compounds and amino-acids detected with the metabolomic analysis**

Identification	m/z	RT (min)	Detection mode	MS/MS	MC/S	ratio C/S	MC/C
<b>Target analysis</b>							
Cysteine <sup>#</sup>	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Cystine <sup>#</sup>	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Cystathionine <sup>#</sup>	222.06797	3.6	+	n	n.d in MC*	2.2*	n.d in MC*
Homocysteine <sup>#</sup>	135.03556	5.1	+	n	1000*	230*	4.6*
Methionine <sup>#</sup>	149.05126	9.1	+/-	n	11*	1.4*	8.0*
OAS	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
OAH	161.06901	6.3	+/-	y	0.003*	1.0*	0.003*
<b>Global analysis</b>							
Glutamate <sup>#</sup>	147.05341	3.7	+/-	n	0.6*	0.8*	0.8*
Isoleucine <sup>#</sup>	131.09453	11.8	+/-	n	4.2*	1.2*	3.6*
Leucine <sup>#</sup>	131.09453	12.5	+/-	n	1.2*	1.5*	0.8*
Proline <sup>#</sup>	115.06344	4.8	+/-	n	1.7*	1.8*	0.9*
Aspartic acid <sup>#</sup>	133.03754	3.6	+/-	n	1.3*	1.8*	0.7*
Phenylalanine <sup>#</sup>	165.07909	13.6	+/-	n	1.0	1.2*	0.8*
Tryptophane <sup>#</sup>	204.08993	17.0	+/-	n	1.0	1.6*	0.6*
Valine <sup>#</sup>	117.07901	7.6	+/-	n	0.2	1.0*	0.2
Tyrosine <sup>#</sup>	181.07383	11.8	+/-	n	0.8*	1.9*	0.4*
Ophtalmic acid	289.12827	5.3	+/-	y	0.03*	0.2	0.2
Glu-met	278.09199	12.3	+/-	y	8.3*	2.2*	3.7*
Glu-met sulfoxide	294.08895	5.2	+/-	y	58*	4.7*	13.0*
5-methylthioadenosine	297.08831	14.7	+/-	y	2.8	1.2*	2.3
Putative mycothiol	486.15231	5.2	+/-	n	0.3*	1.2*	0.2*
Putative glu-glu-met or met-glu-glu	407.13559	14.6	+/-	n	n.d in S	n.d in S	7.3*
Putative N-acetyl-cystathionine	264.07855	11.8	+/-	n	12*	62*	0.2*
Putative sulfur compound 1	378.10787	12.0	+/-	n	n.d in S*	n.d in S*	3.0*
Putative sulfur compound 2	343.09281	15.3	-	n	5.7*	1.8*	3.3*
Putative sulfur compound 3	266.15407	19.8	-	n	1.0*	0.6*	1.5*
Putative sulfur compound 4	256.05309	7.0	-	n	0.4*	0.6*	0.7*
Putative sulfur compound 5	424.13834	10.9	+	n	83*	1.3*	63*
Putative sulfur compound 6	345.11127	14.0	+	n	0.1*	8.6*	0.01*

<sup>#</sup>Compound detected in this methode with a commercial compound (Sigma). n.d not detected. y : yes ; n : no ;+ : ESI+ ; - : ESI- ; m/z : mass/charge ; RT : Retention Time ; MS : mass spectrometry ; MC : methionine plus cystine, C : cystine ; S : sulfate. \*\* correspond to a *pvalue* < 0.05

**Table 4. Specific production of volatile sulfur compounds** by the *B. aurantiacum* ATCC9175 in exhausted defined synthetic medium (ESM) with different sulfur sources: 10 mM L-methionine and 500  $\mu$ M L-cystine, 10 mM L-methionine, 500  $\mu$ M L-cystine.

Volatile sulfur compounds ( $\mu\text{g.kg}^{-1}$ )	MC	C	S
Methanethiol	1.04 $\pm$ 0,40	n.d	n.d
DMDS	643.51 $\pm$ 136.35	0.70 $\pm$ 0.06	0.23 $\pm$ 0.05
2,4 dithiapentane	0.08 $\pm$ 0.05	n.d	n.d
DMTS	201.63 $\pm$ 50.45	0.05 $\pm$ 0.02	n.d
DMQS	0.59 $\pm$ 0.31	n.d	n.d

n.d Not detected

MC methionine plus cystine; C cystine; S sulphate ; DMDS Dimethyldisulfide; DMTS dimethyltrisulfide, DMQS dimethyltetrasulfide. All experiments were triplicated, and sulfur compound concentrations were reported as mean  $\pm$  standard deviation.

**Table S1.** Primers used in this Study.

<b>Name</b>	<b>Sequences (5'-3')</b>	<b>Description</b>
<b>qRT-PCR</b>		
MP21	CACCTCGGACCCGATTGC	5' BL891
MP22	CGAAACCGTCTGAACATTTTCCT	3' BL891
MP41	CTGCCGATGATGAGCTTGAGTT	5' BL2122 <i>rpoB</i>
MP31	ATGTCGATTCTTCCTGATCGCT	qRT BL1296
MP32	CCGAGGTCCTTGCGTAG	qRT BL1296
MP42	ACGTCCATGAAGTCAATCGTGTC	3' BL2122 <i>rpoB</i>
MP47	CAGTCACATGGGCAAAGGAA	5' BL929
MP48	TGTGTTGTCCACCAGCACAG	3' BL929
MP55	ATCGAAATCGCGAAGATGGT	5' BL1250
MP56	TTCTTGCGTTCGTCGTTGAT	3' BL1250
MP58	AAGACATCGCCGACATCCTC	5' BL 613
MP59	CCGTTGCTACAGGGTGTGTA	3' BL 613
MP89	GGTGACATCGACGCCAACTA	5' BL1657
MP90	GAAGGGTTCGAGGTTGATGG	3' BL1657
MP91	TGACAGATCCGGCAGTATGG	5' BL3001
MP92	AGGTTGCTCTTCCGCTTCAG	3' BL3001
<b>5'race</b>		
MP122	TTCTTTTGCCCATGTGACTG	BL929 (SP1)
MP123	GAAGGCGACTGCTTCCTCAG	BL929 (SP2 )
MP124	CGAATGCGCATCATGAAGTA	BL2151 (SP1)
MP125	GAAACCGCCCTTGGAGTACA	BL2151 (SP2)
MP126	TTCATACCCTGGGCCTTGTC	BL1113 (SP1)
MP127	CGGAGGTGGCTTCAACGAT	BL1113 (SP2)
MP136	TTTGGTGGAAAGCAGCTGCAG	BL56 (SP1)
MP137	ATGCGGTTCTCCACGACCT	BL56 (SP2)
MP138	TCGCGAACATAGGACGAGAA	BL2267 (SP1)
MP139	CTCGAGGTCGACAGCGTAGC	BL2267 (SP2)
MP152	CCTTCACTGATGACGCTTCG	BL613 (SP1)
MP153	TCATTCTTCAGCAGCCGGTA	BL613 (SP2)
<b>RT-PCR</b>		
MP43	TGACCTGGCAGACGATCTCA	BL929
MP44	ATCCGCGCTGTTTCCTGTAT	BL891
MP140	CGACCTCGACAAGGGCTTC	BL56
MP141	GTGCCGAAGGTCTCATAGGC	BL36
MP142	GGGAGATGCTCGATCAGTGG	BL2267
MP143	CAGGTTCCATGGTGACCAGA	BL2266

**Table S2. qRT-PCR analysis of expression of genes involved in sulfur metabolism after grown**

Gene	Function/similarity	Conditions	Ratio
<b>Effect of methionine addition</b>			
BL613	MetB putative cystathionine $\gamma$ -synthase	M+C/C	0.15 ( $\pm$ 0.008)
BL 1657	Methionine ABC transporter	M+C/C	0.12 ( $\pm$ 0.03)
<b>Methionine or cystine limitation</b>			
BL 1657	Met Q, Methionine ABC transporter	MC->C	25 ( $\pm$ 8.9)
BL3001	Met P, Methionine ABC transporter	MC->C	1.2 ( $\pm$ 0.2)
BL 1250	Probable cystine ABC transporter, solute binding component	MC->M	2.1 ( $\pm$ 0.4)
BL 1296	Probable cystine ABC transporter, solute binding component	MC->M	3.2 ( $\pm$ 0.3)
<b>Growth in the presence of homocysteine</b>			
BL 929	Mgl methionine $\gamma$ -lyase	HC/C	3.7 ( $\pm$ 1.4)
BL613	MetB putative cystathionine $\gamma$ -synthase	HC/S	0.03 ( $\pm$ 0.003)
		HC/C	0.03 ( $\pm$ 0.02)

MC : methionine plus cystine ; M : methionine ; C : cystine ; HC : homocysteine ; M+C : methionine addition ; MC->C : methionine limitation; MC->M cystine limitation.

### **B-3-Conclusions**

L'objectif de cette étude était, dans un premier temps, de reconstituer le métabolisme du soufre chez *B. aurantiacum* ATCC 9174, puis, dans un deuxième temps, d'étudier sa régulation en fonction des différentes sources de soufre présentes dans le milieu par des approches transcriptomiques et métabolomiques chez *B. aurantiacum* ATCC 9175.

Cette étude a montré la présence et la fonctionnalité de certaines voies telles que la voie d'assimilation du sulfate (opéron *cys*), les voies de thiolation (*metXY* et *cysKE*). De plus, pour la première fois, notre étude montre l'induction en présence de méthionine de la transcription du gène *BL929* codant pour la Mgl et des gènes codants pour le transporteur MetPS qui est concomittante avec la production de CSVs. L'approche métabolomique nous a permis d'émettre des hypothèses sur des signaux de régulation possibles mais surtout nous a montré la présence de certains métabolites soufrés intracellulaires comme le mycothiol ou des peptides contenant de la méthionine dont on ignorait l'existence chez *B. aurantiacum*.

Cette étude reste une première étape pour la compréhension du métabolisme soufré qui produit les précurseurs des CSVs, éléments indispensables au développement des qualités organoleptiques des fromages.

## **C- Etude de l'interaction entre deux micro-organismes du fromage, *B. aurantiacum* et *K. lactis*, par des approches biochimiques et transcriptomiques.**

### **C-1-Objectif de l'étude.**

L'écosystème fromager est un milieu complexe dont les différents composants sont en constante évolution. L'étude moléculaire des associations *in vivo* dans l'écosystème fromager est difficile en raison du nombre de micro-organismes présents et de la complexité de la matrice fromagère.

L'objectif de cette étude est d'apporter des éléments de compréhension à l'interaction entre deux micro-organismes de la flore d'affinage, une bactérie *B. aurantiacum* et une levure *K. lactis* dans un milieu chimiquement défini. Pour cela, nous avons suivi les modifications transcriptomiques, physiologiques et biochimiques de ces micro-organismes en culture pure ou en association avec l'autre. Dans cette partie, nous nous intéresserons plus particulièrement au transcriptome de *B. aurantiacum* tout en discutant des données obtenues par Agnès Hébert sur *K. lactis* concernant des éléments nécessaires à la compréhension de certaines modifications de profil d'expression de *B. aurantiacum*.

## C-2-Résumé

*B. aurantiacum* et *K. lactis* sont deux micro-organismes participant activement à l'affinage des fromages à pâte molle mais présentant une faible compétitivité dans cet écosystème. Nous avons voulu étudier les modifications biochimiques, physiologiques et transcriptomiques observés chez ces deux micro-organismes lorsqu'ils sont cultivés en co-culture dans un milieu chimiquement défini. Les résultats ne montrent aucun changement de croissance de *K. lactis* en mono-culture ou en co-culture. Par contre, on observe une augmentation du taux de croissance de *B. aurantiacum* lors d'une culture avec *K. lactis* suivie d'une décroissance plus forte (environ 1 log) en fin de culture. La comparaison des profils d'expression de *B. aurantiacum* en mono-culture ou en co-culture avec *K. lactis* a montré que 509 gènes sont différentiellement exprimés dans ces deux conditions. On observe une modification du métabolisme carboné (cycle de Krebs, assimilation de l'éthanol, ou du lactate), du métabolisme de l'azote (arginine, glutamate et glutamine), du métabolisme des vitamines (biotine), et des voies de biosynthèse des métabolites secondaires (pigments). Nous émettons l'hypothèse que la présence d'éthanol produit par *K. lactis* dans le milieu oblige *B. aurantiacum* à se défendre en mettant en place différentes stratégies telles que la consommation de l'éthanol ou la production de pigments caroténoïdes.

### C-3-Introduction

L'écosystème fromager est un milieu complexe où les bactéries, levures et moisissures sont en interaction. L'activité métabolique de chaque micro-organisme dépend à la fois de la composition en micro-organismes de l'écosystème, des interactions générées et des paramètres physico-chimiques. En conséquence, les études des micro-organismes en monoculture ne reflètent donc que rarement leur faculté à s'adapter dans l'écosystème fromager. La majorité des études réalisées sur cet écosystème demeure très descriptive et aborde la question de la diversité des micro-organismes dans l'écosystème et non leur fonctionnalité (Mounier *et al.*, 2008 ; Mounier *et al.*, 2009). Le séquençage des génomes de micro-organismes issus de l'écosystème fromager a permis d'envisager l'étude des interactions sous un nouvel angle, c'est-à-dire d'un point de vue transcriptomique. Dans cette étude, nous avons choisi d'étudier *B. aurantiacum* ATCC 9175 et *K. lactis* en co-culture. *B. aurantiacum* est une bactérie essentielle pour l'affinage des fromages à pâte molle. En plus de ses capacités à produire des agents antimicrobiens, elle synthétise des peptidases, des lipases et des estérases et produit également des pigments qui donnent sa coloration au fromage. Mais, son rôle clé dans l'affinage des fromages est lié à sa capacité à former des composés soufrés volatils (CSVs) qui donnent la saveur caractéristique de ces fromages. Ces CSVs sont principalement le méthane-thiol (MTL), le sulfure d'hydrogène (H<sub>2</sub>S) et des polysulfures (DMDS, DMTS). Certaines études ont montré le manque de compétitivité de ce micro-organisme (Goerges *et al.*, 2008) (Rea *et al.*, 2007) qui se traduit par un faible pouvoir colonisateur dans les fromages. *K. lactis* est une levure dont le rôle principal est la désacidification du caillé permettant ainsi la croissance des bactéries acido-sensibles telles que *B. aurantiacum*. De plus, cette levure a la capacité de produire, dans une moindre mesure, des CSVs comme le MTL, le DMDS, le DMTS ou encore des *S*-méthylthioesters.

Depuis quelques années, on dénombre de plus en plus d'études transcriptomiques et/ou protéomiques sur les interactions entre micro-organismes. Certaines sont réalisées dans des milieux maîtrisés (Maligoy *et al.*, 2008 ; Even *et al.*, 2009 ; Mansour *et al.*, 2009 ; Nouaille *et al.*, 2009) alors que d'autres sont effectuées dans des milieux complexes comme le lait (Herve-Jimenez *et al.*, 2008 ; Herve-Jimenez *et al.*, 2009). La première étude sur des micro-organismes d'intérêt technologique porte sur l'interaction en *L. lactis* et *S. cerevisiae* (Maligoy *et al.*, 2008). Cette étude montre que cette interaction entraîne une accumulation d'éthanol dans le milieu qui a pour conséquence une répression des gènes impliqués dans la biosynthèse des pyrimidines chez *L. lactis*. D'autres études portant sur l'interaction entre

*Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus* ont montré l'impact du lactobacille sur les métabolismes du soufre, des purines, de l'azote et du fer chez le streptocoque (Herve-Jimenez *et al.*, 2008 ; Herve-Jimenez *et al.*, 2009).

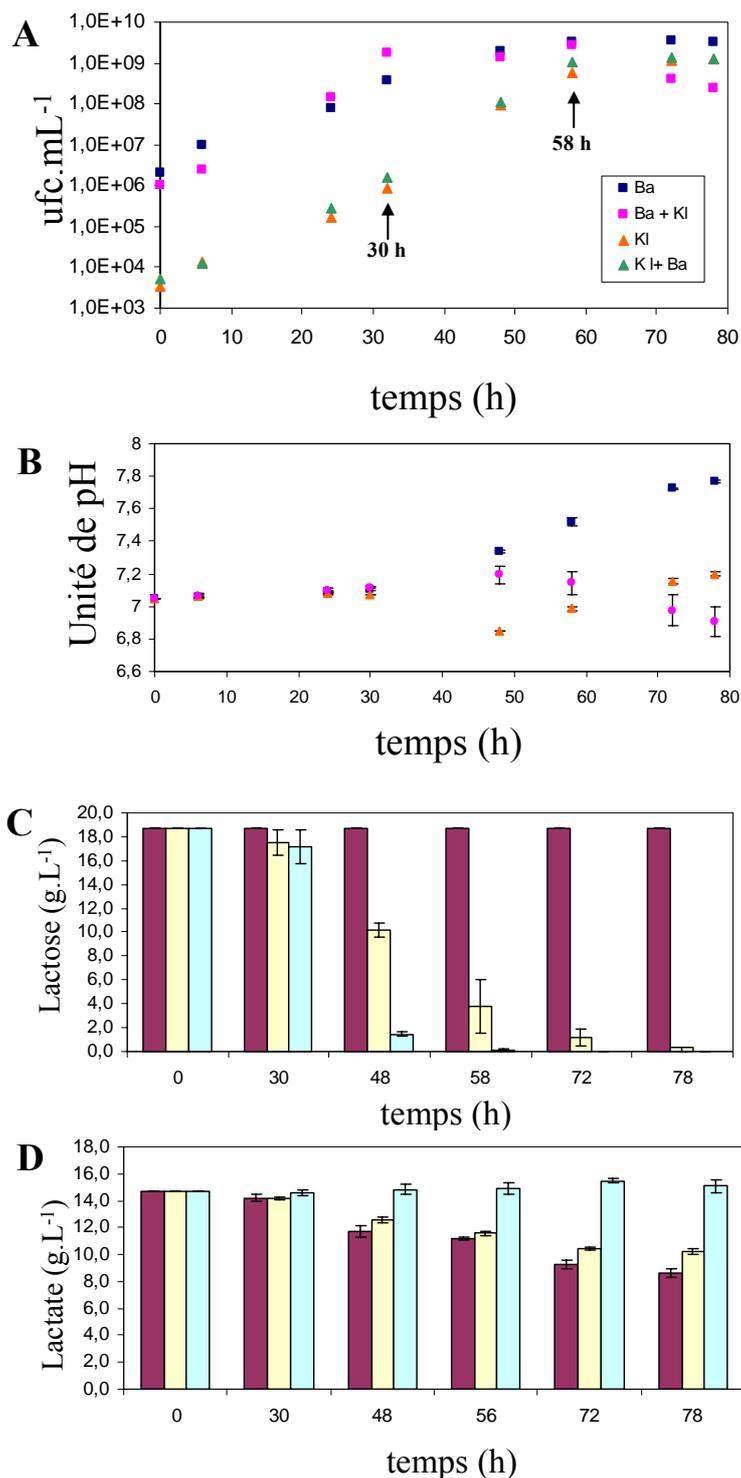
Dans cette étude, nous explorons l'association entre *B. aurantiacum* et *K. lactis* dans un milieu chimiquement défini par des approches biochimiques et transcriptomiques. Les transcriptomes des deux micro-organismes ont été réalisés. Néanmoins, dans cette partie, nous n'aborderons que brièvement les résultats pour *K. lactis*. Nous nous intéresserons plus spécifiquement à la réponse de *B. aurantiacum* à la présence de *K. lactis*.

## C-5-Résultats et Discussion

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

Nous avons suivi la croissance en milieu chimiquement défini (MCD) des deux micro-organismes *B. aurantiacum* et *K. lactis* en mono-culture et en co-culture par dénombrement sur milieux sélectifs gélosés. Nous utilisons du milieu « Brain Heart infusion » contenant de l'amphotéricine pour la bactérie et du milieu YEGC contenant du chloramphénicol pour la levure. Les résultats sont présentés dans la figure 16A. Nous observons que la croissance de *B. aurantiacum* est stimulée en présence de *K. lactis* pendant les 30 premières heures. En effet, le temps de doublement est de 3 h 30 en co-culture et seulement de 5 h 50 en mono-culture. A 58 h de culture, *B. aurantiacum* atteint une biomasse maximale de  $10^9$  ufc.ml<sup>-1</sup> dans les deux cultures. Après 58 h, la biomasse de *B. aurantiacum* décroît en co-culture approximativement d'un facteur 10 alors qu'elle reste stable jusqu'à 78 h en mono-culture.

La croissance de *K. lactis* n'est pas affectée par la présence de *B. aurantiacum*. La levure atteint une biomasse maximale de  $10^8$  ufc.ml<sup>-1</sup> à 58 h qui reste stable jusqu'à 78 h. Le temps de doublement de la levure est de 1 h 10 dans la mono-culture et la co-culture. Ces résultats suggèrent une formidable adaptation de la levure dans un environnement changeant.

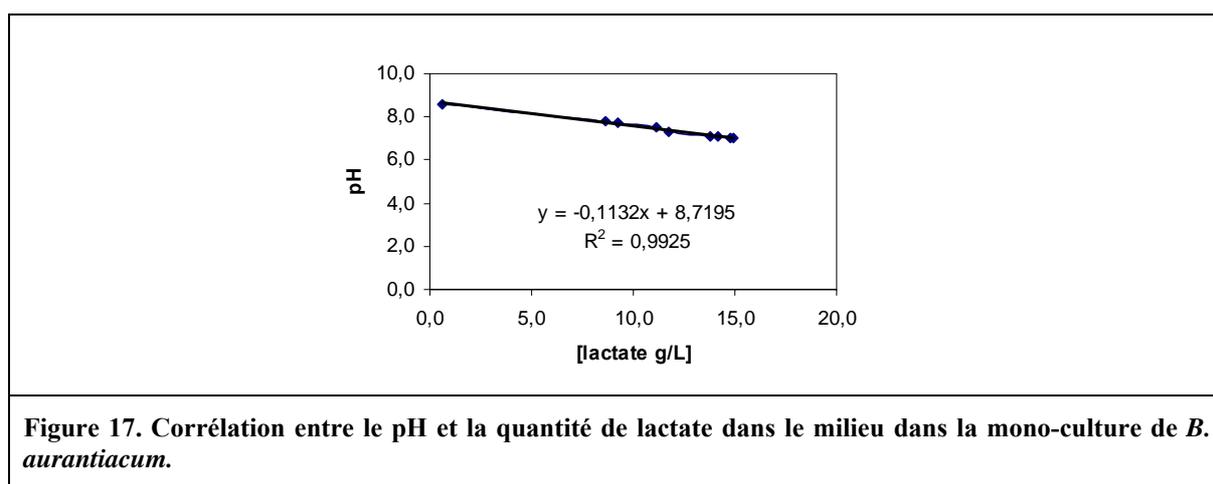


**Figure 16. Croissance de *B. aurantiacum* ATCC 9175 et de *K. lactis* 3550 dans le milieu MCD en monoculture et en co-culture, et analyse du lactate et du lactose résiduel. A.** croissance de *B. aurantiacum* en monoculture (carré bleu) et co-culture (carré rose), et *K. lactis* en mono-culture (triangle orange) et en co-culture (triangle vert). **B.** Evolution du pH au cours du temps en mono-culture de *B. aurantiacum* (carré bleu) ou de *K. lactis* (triangle orange), en co-culture (en rond rose). **C.** Lactose résiduel présent dans le milieu de culture. Mono-culture *B. aurantiacum* (en bordeaux) et *K. lactis* (en vert) co-culture (en jaune). **D.** Lactate résiduel présent dans le milieu de culture. mono-culture de *B. aurantiacum* (en bordeaux) et mono-culture de *K. lactis* (en vert) co-culture (en jaune). Les flèches indiquent les temps de prélèvement pour les analyses transcriptomiques.

### Les évolutions des substrats dans les différentes cultures.

L'évolution du pH est présentée dans la figure 16B. Le pH initial est de 6.95. On observe 3 profils différents. Tout d'abord, dans la culture de *B. aurantiacum* seule, le pH augmente de 6,95 à 7,8 à partir de 30 h. Ces résultats sont corrélés de manière significative avec la consommation par *B. aurantiacum* du lactate présent dans le milieu (Figure 17). Dans la culture de *K. lactis*, on observe une baisse du pH de 6,95 à 6,85 à 48 h avant une remontée de 0,2 unité du pH. Enfin, en co-culture, le pH est stable pendant 48 h avant de diminuer jusqu'à 6,85 à 78 h.

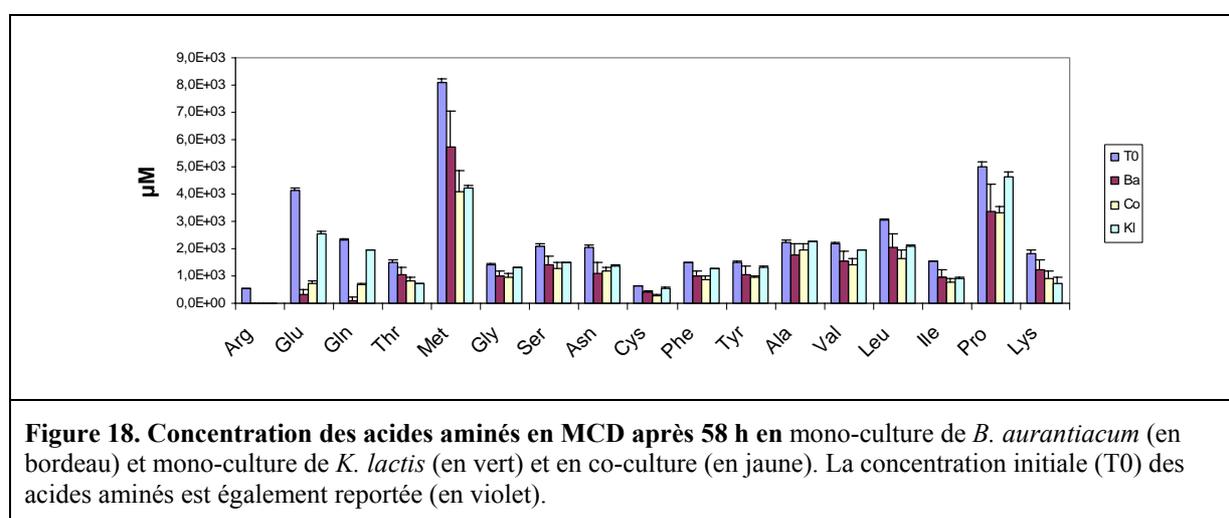
Nous avons réalisé des analyses biochimiques avec le dosage du lactate et des acides aminés libres par HPLC et du lactose par le kit BioSentec lactose/galactose. Les quantités résiduelles de lactose et de lactate ont été dosées dans le surnageant de culture. Les résultats sont présentés dans les figures 16C et 16D, respectivement. *B. aurantiacum* ne consomme pas le lactose et *K. lactis* ne consomme pas le lactate. *B. aurantiacum* n'a pas complètement consommé le lactate dans la mono-culture et la co-culture. Cependant, la consommation de lactate est plus rapide en mono-culture (6,1 g.L<sup>-1</sup>) qu'en co-culture (4,5 g. L<sup>-1</sup>) suggérant la production d'une source de carbone par *K. lactis* qui pourrait être utilisée par *B. aurantiacum*. A 58 h, en mono-culture, *K. lactis* a entièrement épuisé le lactose mais en co-culture 14,9 g. L<sup>-1</sup> ont été consommés. Cette différence suggère l'utilisation d'une autre source de carbone par la levure qui pourrait être produite par la bactérie.



Parallèlement, nous avons dosé la quantité d'acides aminés consommés après 30 h et 58 h en mono-culture ou en co-culture. Dans le milieu MCD, 19 acides aminés sont présents mais seulement 17 ont pu être dosés par notre méthode (Arg, Glu, Gln, Thr, Met, Gly, Ser, Asn, Cys, Phe, Tyr, Ala, Val, Leu, Ile, Pro et Lys) (Figure 18). Les résultats montrent, qu'à

l'exception de la lysine, les acides aminés dosés ne sont pas consommés au cours des 30 premières heures (résultats non présentés). Chez *B. aurantiacum*, les acides aminés peuvent être utilisés comme source de carbone après l'épuisement total du lactate ou comme source d'azote après la consommation du  $\text{NH}_4$ . Dans notre milieu, la concentration initiale de  $\text{NH}_4$  est de 2,65 mM. Ces résultats suggèrent que *B. aurantiacum* aurait consommé totalement le  $\text{NH}_4$  au bout de 30 h de culture.

A 58 h de culture, seule l'arginine a été totalement consommée dans les 3 conditions. Le glutamate et la glutamine sont, respectivement, 2 et 6 fois plus consommés en mono-culture de *B. aurantiacum* que dans la co-culture. *K. lactis* consomme préférentiellement la thréonine, la lysine et la méthionine (Figure 18).



#### Limiter au maximum les cross-hybridations inter-espèces.

Afin d'étudier les interactions entre *B. aurantiacum* et *K. lactis*, une puce à ADN a été développée pour minimiser les cross hybridations avec un cahier des charges précis. Les oligonucléotides présents sur la puce devaient être de 60-mers et avoir une température d'hybridation homogène et élevée (65°C). Ils ne devaient pas non plus s'hybrider avec des génomes d'autres micro-organismes de l'écosystème fromager (Forquin *et al.*, 2009) (Hebert, communication personnelle). Dans un premier temps, nous avons voulu évaluer les cross-hybridations entre les puces à ADN de *B. aurantiacum* et l'ADN génomique de *K. lactis*. Le pourcentage de cross-hybridation est calculé grâce à un « package de R ». La fréquence du signal est calculée et elle est relative à log2. Le signal d'un oligonucléotide doit être supérieur à 8 pour qu'on le considère comme hybridé. Nous avons hybridé la puce de *B. aurantiacum* avec de l'ADN génomique de *K. lactis* marqué par Cy3 puis Cy5. Les résultats montrent que

seulement 0,87% (Cy3) et 7,6% (Cy5) des gènes de *K. lactis* hybrident sur la puce de *B. aurantiacum*. Nous pouvons donc utiliser cette puce pour notre étude.

### Analyse du transcriptome.

En utilisant des lames Agilent, nous avons effectué une étude transcriptomique à 30 h et 58 h de culture, ce qui correspond respectivement à la phase exponentielle et au début de la phase stationnaire et comparé les résultats obtenus en mono-culture ou en co-culture. Un total de 145 gènes (30 h) et 509 gènes (58 h) de *B. aurantiacum* sont différentiellement exprimés en co-culture par rapport à la mono-culture (Tableau 7). Chez *K. lactis*, 144 gènes (30 h) et 323 gènes (58 h) sont différentiellement exprimés dans nos expériences.

**Tableau 7. Groupes métaboliques des gènes différentiellement exprimés chez *B.aurantiacum* à 30 h et 58 h en co-culture avec *K. lactis* par rapport à la mono-culture.**

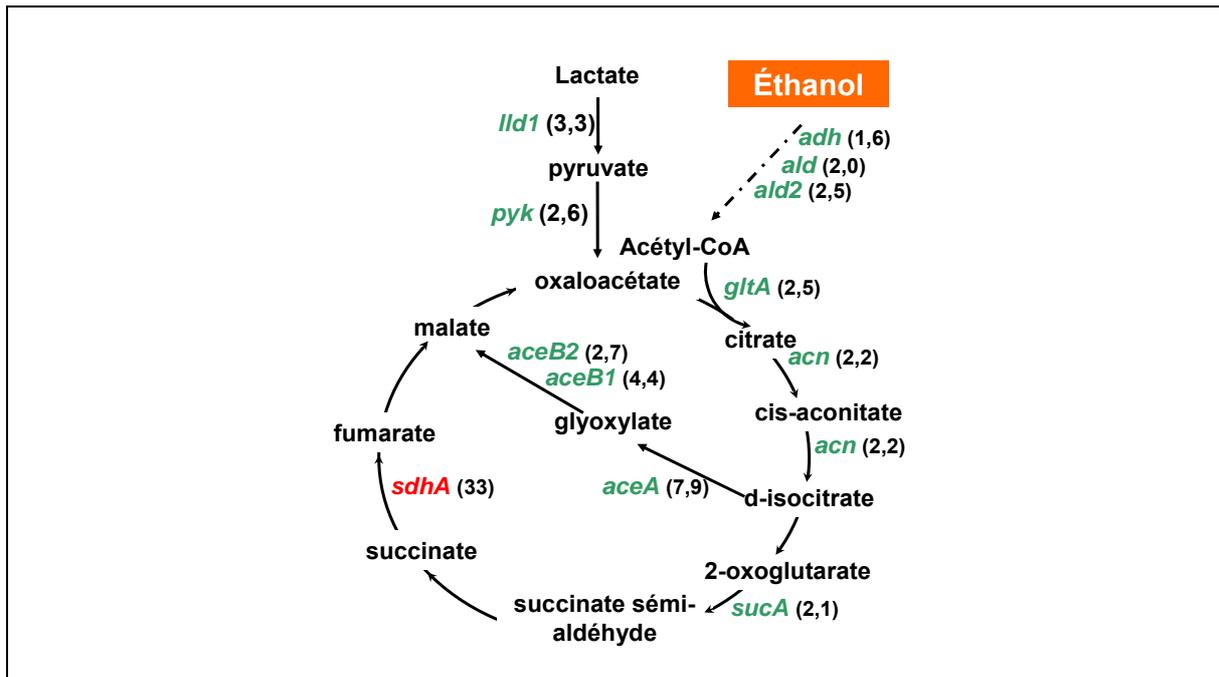
Groupes métaboliques	30 h	58 h
Processus cellulaire (réplication, transcription, traduction, respiration, ...)	25	111
Métabolisme carboné	10	36
Biosynthèse et métabolisme des acides aminés	9	20
Biosynthèse et métabolisme des vitamines	2	12
Biosynthèse et métabolisme des nucléotides	1	7
Biosynthèse et métabolisme Lipides	4	15
Régulateur	8	21
Stress	7	12
Transporteurs	23	54
Métabolisme secondaire (antibiotiques, pigments,...)	2	3
Fonction inconnue	54	218
<b>Total</b>	<b>145</b>	<b>509</b>

Dans la suite des résultats, nous présenterons essentiellement les résultats obtenus à 58 h de culture.

### Métabolisme du carbone

Le catabolisme des métabolites carbonés fournit de l'énergie sous forme d'ATP et génère des coenzymes réduits essentiellement sous forme de NADH. Lorsque *B. aurantiacum* est en co-culture avec *K. lactis*, on observe une induction de la néoglucogenèse. En effet, les gènes codant pour la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, *gap*, la phosphoglycérate kinase, *pgk*, mais aussi pour la fructose-2,6-bisphosphatase, *gmp*, sont induits respectivement d'un facteur 14,6 et 2,1 et 2,5 (Tableau 8). Cependant, le gène *pckA* codant pour la phosphoénolpyruvate carboxykinase est réprimé en co-culture (facteur 10). Cette étape est

soit la première étape de la néoglucogenèse soit permet la synthèse de pyruvate. Le pyruvate peut également être obtenu par la dégradation du lactate via la L-lactate déshydrogénase. Cette réaction peut être réversible, mais aussi être réalisée par une L-lactate déshydrogénase quinone-dépendante qui permet uniquement la production du pyruvate à partir du lactate (Stansen *et al.*, 2005). Chez *B. aurantiacum*, 2 gènes codant pour des L-lactate déshydrogénases quinone-dépendantes, BL2308 (50% identité avec la LLD de *C. glutamicum*) et BL1247 (75% d'identité avec LLD de *C. glutamicum*) sont présents. Le gène *BL1247* est également induit d'un facteur 3,3 en co-culture. Le pyruvate est lui-même dégradé en oxaloacétate, intermédiaire du cycle de Krebs, par la pyruvate carboxylase codée par le gène *pyc*. Ce gène est induit en co-culture d'un facteur 2,6. De plus, on remarque que les gènes codant pour la voie de dégradation de l'éthanol sont activés. En effet, une alcool déshydrogénase, *adh* (BL2715), et le gène codant pour l'aldéhyde déshydrogénase, *ald*, sont surexprimés en co-culture (respectivement 1,6 et 2,0 fois). Nous pensons que ces résultats peuvent être expliqués par le fait que *K. lactis* produit de l'éthanol après 58 h (4,5 g.l<sup>-1</sup> en co-culture et 7,8 g.l<sup>-1</sup> en mono-culture) contrairement à *B. aurantiacum* qui ne produit pas cet alcool. De plus, une étude sur Biotype 100 (Irlinger, communication personnelle) a montré que *B. aurantiacum* ATCC 9175 était capable d'utiliser l'éthanol comme source de carbone. La dégradation de l'éthanol conduit à la production d'acétyl-CoA qui peut entrer directement dans le cycle de Krebs. Enfin, on observe une induction de l'ensemble des gènes codant pour le cycle de Krebs en co-culture (tableau 8, figure 19). Seul le gène *sdhA* codant pour la succinate déshydrogénase est réprimé d'un facteur 36 dans cette condition. La production d'éthanol par *K. lactis* est un phénomène connu (González-Siso *et al.*, 2000) (Schaffrath et Breunig, 2000). Elle intervient en cas de manque d'oxygène dans le milieu (Kiers *et al.*, 1998 ; Breunig *et al.*, 2000). Dans nos expériences, on remarque que les gènes de production d'éthanol de *K. lactis* (*pdh* et *adh6*) sont induits respectivement d'un facteur 10,2 et 6,9 en co-culture. Ces résultats peuvent être reliés au fait que le lactose n'a pas été totalement consommé en co-culture à 58 h (figure 16).



**Figure 19.** Activation du cycle de krebs de *B. aurantiacum* en présence de *K. lactis*. En vert induction des voies. En rouge répression des voies.

Définir plus précisément lld1=BL1247 ?

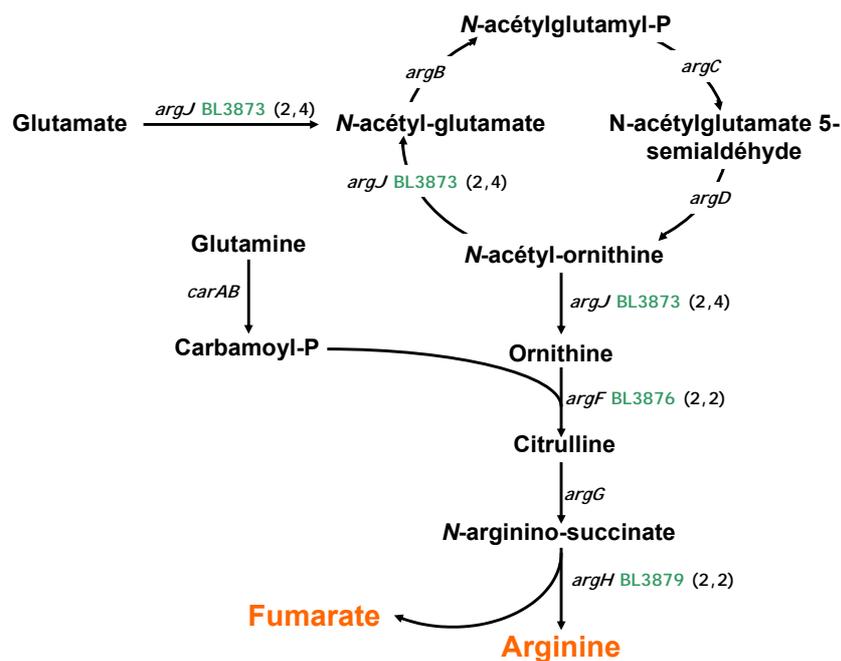
### Métabolisme de l'azote

L'azote est un constituant majeur des protéines, des acides nucléiques des coenzymes. Il est donc essentiel pour la cellule de pouvoir l'assimiler. On le trouve sous différentes formes telles que les acides aminés ou l'ammoniac. Le transport des acides aminés est donc important pour l'assimilation de l'azote. En présence de *K. lactis*, *B. aurantiacum* induit l'expression de gènes codant pour des transporteurs de la méthionine (*metQ*) ou du glutamate (*gltT*) (Tableau 8) mais réprime celle de gènes codant pour des transporteurs de proline et/ou de glycine ou d'oligopeptides, Opp et Dpp (Tableau 8). Les acides aminés peuvent aussi être obtenus par la dégradation de peptides ou de protéines par l'action de protéases ou de peptidases. En présence de *K. lactis*, *B. aurantiacum* induit l'expression des gènes *BL1007*, *BL2055* et *BL494* codant pour une dipeptidyl aminopeptidase, une dipeptidase et une protéase, respectivement.

En présence de *K. lactis*, on observe une induction d'un facteur 2 de l'expression du gène *gdh*, codant pour une glutamate déshydrogénase chez *B. aurantiacum*. Cette enzyme est utilisée en présence d'une forte concentration d'ammoniac dans le milieu (Prescott *et al.*, 2003); Ces résultats suggèrent donc une production d'ammoniac par la levure *K. lactis*.

La biosynthèse des acides aminés, lorsque ces derniers sont épuisés dans le milieu, est essentielle pour une bonne croissance des micro-organismes. Dans les trois cultures (mono-

culture de *B. aurantiacum* ou de *K. lactis* et co-culture), on observe une consommation totale de l'arginine. Chez *B. aurantiacum*, le glutamate est transformé en ornithine par l'action successive de quatre enzymes ArgJ, ArgB, ArgC, et ArgD. Puis, à partir de la molécule d'ornithine, trois enzymes ArgF, ArgG et ArgH sont impliquées dans la biosynthèse d'arginine et de fumarate. Les gènes codant pour ces protéines appartiennent à deux opérons *argCJBD* et *argFRH*. Le répresseur ArgR contrôle la dégradation de l'arginine chez *P. aeruginosa* PAO1 (Park *et al.*, 1997). En présence de *K. lactis*, le gène *argJ* appartenant à l'opéron *argCJBD* et les gènes *argFRH* sont surexprimés d'un facteur 2 sont induits chez *B. aurantiacum*. De plus, la biosynthèse d'arginine entraîne la formation de fumarate et de manière intéressante on observe une forte répression (facteur 36) du gène codant pour la succinate déshydrogenase SdhA, qui transforme le succinate en fumarate (Figure 19 et 20). Ces résultats sont comparables à ceux obtenus lors d'une étude sur l'association entre *S. thermophilus* et *L. delbrueckii subsp bulgaricus* dans le lait. Les auteurs avaient observé une induction des gènes de la biosynthèse de l'arginine chez *S. thermophilus* et ils émettent l'hypothèse que cette bactérie synthétise de l'arginine pour elle-même mais aussi pour le lactobacille (Herve-Jimenez *et al.*, 2009). Dans notre cas, on observe un épuisement de l'arginine dans l'ensemble des trois conditions. Chez *K. lactis*, on observe l'induction d'un facteur 3 du gène *argI* codant pour une arginino-succinate synthase suggérant une induction de la voie de synthèse de l'arginine chez la levure en présence de *B. aurantiacum*. On ne peut donc pas exclure que dans la co-culture il y ait un épuisement total de l'arginine, alors que dans les cultures pures, il reste de l'arginine mais que cette dernière est en dessous du seuil de détection par HPLC.



**Figure 20.** Activation de la voie de biosynthèse de l'arginine de *B. aurantiacum* en présence de *K. lactis*. En vert induction des voies.

### Métabolisme des acides nucléiques

Chez tous les micro-organismes, les acides nucléiques sont essentiels pour la cellule. En effet, ils sont les précurseurs de l'ADN et des ARNs mais aussi de certaines vitamines et de certains cofacteurs. Nos résultats montrent que 8 gènes impliqués dans le métabolisme des purines et des pyrimidines sont différenciellement exprimés entre la mono-culture et la co-culture. Parmi ces gènes, la majorité code pour des protéines impliquées dans le métabolisme des purines, PurM, PurD, DeoD, Gmk. Les trois premières sont respectivement sur-exprimés d'un facteur 6,6 , 2,1 et 3,2 en co-culture. A l'inverse, deux gènes codant pour un transporteur putatif de la xanthine et de l'uracil et une guanylate kinase sont sous-exprimés d'un facteur 2 dans ces mêmes conditions. En ce qui concerne les gènes impliqués dans le métabolisme des pyrimidines, 2 gènes, *pyrE* et *cdd*, sont sous-exprimés d'un facteur 2 en co-culture tandis que les gènes *pyrG* codant pour une CTP kinase et *pyrR* codant pour le répresseur de la voie de biosynthèse des pyrimidines sont surexprimés. Dans une étude sur l'association entre la bactérie *L. lactis* et la levure, *S. cerevisiae*, les auteurs ont montré que certains gènes de la voie de biosynthèse des pyrimidines comme *pyrG* et *deoD* sont surexprimés (Maligoy *et al.*,

2008) et d'autres gènes comme *pyrR* et *pyrE* sont sous-exprimés en présence d'éthanol (Maligoy *et al.*, 2008). Chez *B. aurantiacum*, *pyrR* appartient à l'opéron *pyrRBC-BL191-carAB*. Les protéines CarA et CarB synthétisent la molécule de carbanoyl-phosphate précurseur de la voie de biosynthèse des pyrimidines et de l'arginine. L'induction du gène *pyrR* est probablement due à une carence en arginine ; cette hypothèse a déjà été émise chez *E. coli* (Weerasinghe *et al.*, 2006).

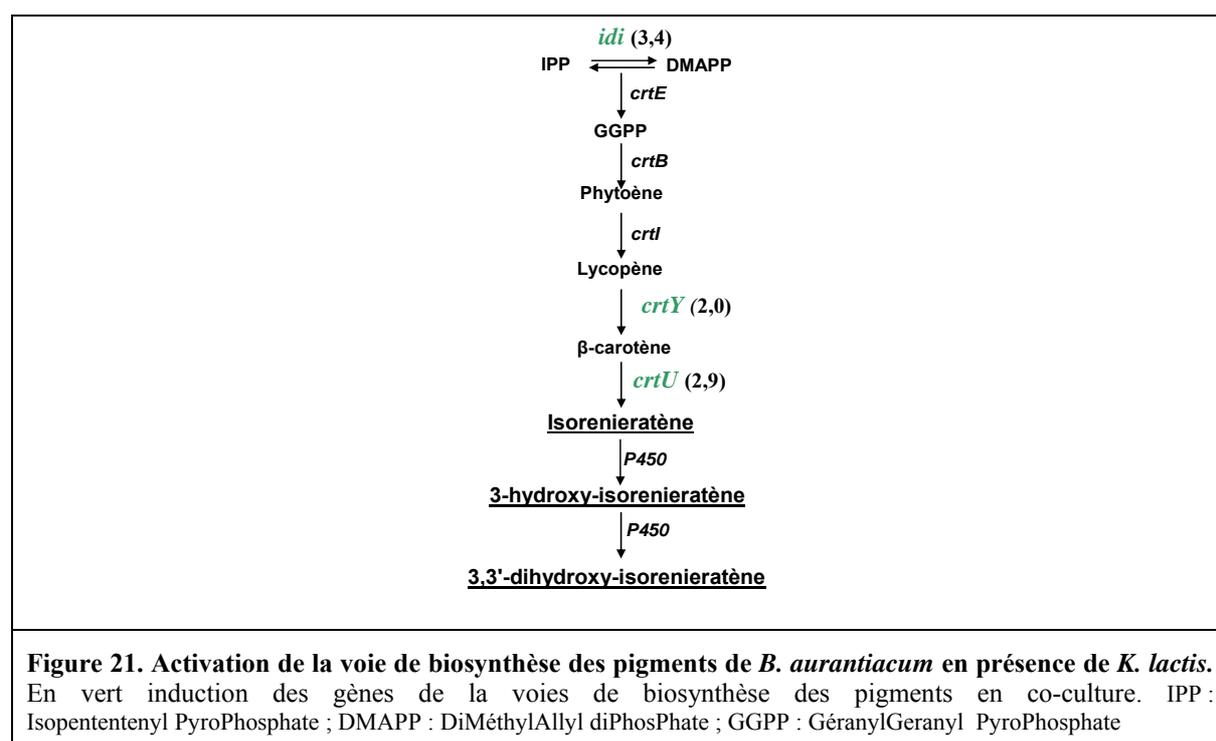
### Métabolisme des vitamines

Les vitamines sont nécessaires en très faibles quantités pour la croissance des bactéries. Cinq gènes impliqués dans le métabolisme des vitamines sont différentiellement exprimés dans nos conditions. Deux gènes, *BL3524-3525*, participant à la synthèse de la pyridoxine sont surexprimés d'un facteur 5,3 et 5,2 en co-culture (tableau 8). Cette vitamine intervient comme cofacteur de réactions de transamination ou de décarboxylation dans le métabolisme des acides aminés. Le rôle de la thiamine est par exemple un transfert du groupement aldéhyde lors de la décarboxylation du pyruvate. Aussi, un gène codant pour une cystéine désulfurase impliqué dans la biosynthèse de la thiamine est surexprimé d'un facteur 2,4 en co-culture (Tableau 8). Enfin, le gène, *ribC*, codant pour la riboflavine synthase est surexprimé d'un facteur 7,8. Le seul gène impliqué dans un métabolisme d'une vitamine qui soit sous-exprimé (facteur 2) en co-culture est le gène *bioF*. La protéine BioF est une 8-amino-7-oxononoate synthase participant à la biosynthèse de la biotine. Enfin, un gène codant pour un transporteur putatif de biotine, BioY est sur-exprimé d'un facteur 2 en co-culture. Une étude a montré que la croissance de *B. aurantiacum* nécessite la présence de biotine (Mounier *et al.*, 2007). Cependant, l'analyse du génome de la souche séquencée de cette espèce (ATCC 9174) montre la présence de l'ensemble de la voie de biosynthèse de cette vitamine. L'analyse du transcriptome en co-culture de *K. lactis* a montré l'induction du gène, *bio5*, codant pour un transporteur probable d'8-amino-7-oxononoate (facteur 2,8) et du gène *bio4* codant pour la biotine synthase (facteur 2,3). L'analyse du génome de *K. lactis* a montré l'absence du début de la voie de biosynthèse de la biotine, jusqu'à la dégradation de la molécule de 8-amino-7-oxononoate. Notre hypothèse est que *B. aurantiacum* excrète le 8-amino-7-oxononoate dans le milieu extérieur. La levure internalise ce composé via le transporteur puis active la voie de biosynthèse de biotine à partir de 8-amino-7-oxononoate. *K. lactis* pourrait ensuite excréter la biotine dans le milieu extracellulaire. La biotine serait à son tour captée par *B. aurantiacum* via le transporteur BioY qui réprimerait sa voie de biosynthèse.

### Métabolisme des métabolites secondaires

Chez *B. aurantiacum* ATCC 9175, les pigments à l'origine de la couleur sont des caroténoïdes aromatiques : l'isorenieratène, le 3-hydroxy-isorenieratène mais le principal est le 3,3'-dihydroxyisorenieratène. Ces composés sont synthétisés à partir de l'isopententenyl pyrophosphate (IPP) en 6 étapes.

L'IPP est transformé en isorenieratène par l'action successive d'une IPP isomérase, Idi, d'une géranylgeranyl pyrophosphate (GGPP) synthase, CrtE, d'une phytoène synthase, CrtB, d'une phytoène désaturase, CrtI, d'une lycopène cyclase, CrtYcd, d'une  $\beta$ -carotène désaturase, CrtU. Enfin une cytochrome P450 convertit l'isorenieratène en 3-hydroxy-isorenieratène puis en 3,3'-dihydroxyisorenieratène. Trois gènes codant pour des protéines de cette voie sont surexprimés en co-culture (Tableau 8). Les pigments sont généralement induits lors d'un stress comme un stress oxydatif ou osmotique. Notre hypothèse est que la production d'éthanol par *K. lactis* provoquerait un stress qui induit l'expression des gènes de la voie de biosynthèse de ces pigments. *B. aurantiacum* chercherait donc à se protéger de la présence d'éthanol dans le milieu. De plus, en présence de *K. lactis*, 12 gènes codant pour des protéines impliquées dans la résistance à différents stress sont induits (Tableau 8). Deux gènes codant pour des protéines de résistance à un stress générale, CspB, UspA, et une protéine chaperonne sont respectivement induits d'un facteur 2,3 ; 2,7 et 2,8 (Tableau 8). De plus, cinq gènes codant pour des protéines impliquées dans la résistance au stress oxydant sont également induits (Tableau 8).



**Tableau 8. Gènes discutés dans le ce travail et différentiellement exprimés en co-culture et mono-culture à 58 h.**

Gènes	Fonctions/similarités	58h	
		Co/Ba	P value
<b>Métabolisme du Carbone</b>			
BL 1183	Gap glycéraldehyde-3-phosphate déshydrogénase	14,6	1,58E-09
BL 2253	GlpX fructose 1,6-bisphosphatase II	2,5	3,85E-03
BL 139	Pgk phosphoglycérate kinase glycolyse	2,1	1,67E-02
BL 1202	PckA Phosphoénolpyruvate carboxykinase	0,1	4,01E-06
BL 1394	GltA Citrate synthase	2,5	3,27E-03
BL 2786	Acn aconitate hydratase	2,2	1,42E-02
BL 1315	AceB2 Malate synthase 2	2,7	7,95E-04
BL 1906	AceB1 Malate synthase 1	4,4	1,11E-04
BL 1907	AceA Isocitrate lyase	7,9	8,18E-04
BL 3807	SucA alpha-ketoglutarate décarboxylase	2,1	1,07E-02
BL 3154	SdhA succinate déshydrogenase	0,03	3,62E-13
BL 847	Fum B fumarate hydratase	3,3	2,08E-03
BL 1247	Ldh L-lactate déshydrogenase	3,3	1,74E-03
BL 1744	AldB aldehyde déshydrogenase B	2,0	4,48E-03
BL 479	AldB2 aldehyde dehydrogenase B	2,5	2,03E-03
BL 2715	Adh alcool déshydrogénase	1,6	2,02 E-02
BL 3088	Pyk pyruvate carboxylase	2,6	2,18E-03
BL 2602	BglA 6-phospho-beta-glucosidase	2,3	2,03E-03
BL 1300	transporteur de C4-dicarboxylate	3,0	1,18E-02
BL 121	Symporteur Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> dicarboxylate	3,6	6,10E-04
BL 3376	Symporteur Na <sup>+</sup> dicarboxylate	2,0	2,31E-02
<b>Métabolisme des Acides Aminés et peptides</b>			
BL 3877	ArgR Arginine répresseur	2,1	5,92E-03
BL 3879	ArgH Argininosuccinate lyase	2,2	2,03E-03
BL 3876	ArgF Ornithine carbamoyltransferase	2,2	2,66E-03
BL 3873	ArgJ Glutamate n-acetyltransferase	2,4	7,75E-03
BL 3120	GlnA glutamine synthase	2,1	2,77E-03
BL1553	Gdh Glutamate déshydrogénase	2,0	1,87E-02
BL 1103	OppA protéine de liaison au substrat	0,2	2,67E-03
BL 1104	OppD protéine ATPasique	0,4	3,75E-03
BL 1105	OppC protéine transmembranaire	0,4	3,73E-03
BL 1106	OppB protéine transmembranaire	0,4	1,26E-02
BL 250	OppA protéine de liaison au substrat	0,3	1,32E-02
BL 2734	DppA protéine de liaison au substrat	0,4	8,36E-03
BL 1860	proline/glycine bétaine transporteur	0,5	9,96E-03
BL 1293	transporteur Cystine	0,4	7,14E-03
BL 1657	MetQ protéine de liaison à la méthionine	2,2	2,79E-03
BL 1685	AppA protéine de liaison au substrat	3,2	1,55E-03
BL 2546	GltT Symporteur H <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup> glutamate	2,0	1,67E-02
BL 1007	dipeptidyl aminopeptidase	2,3	3,19E-02
BL2055	dipeptidase	3,1	3,51E-03
BL 494	protéase	2,3	5,29E-03
<b>Métabolisme des Vitamines</b>			
BL 3850	BioF 8-amino-7-oxononoate synthase	0,5	2,32E-03
BL2448	BioY, transporteur putatif de biotine	2,0	1,50E-02
BL 1124	cystéine désulfurase (thiamine)	2,4	5,18E-03
BL 590	RibC Riboflavine synthase	7,8	7,45E-05
BL 3524	Enzyme impliquée dans la biosynthèse de la Pyridoxine	5,3	9,43E-04
BL 3525	glutamine aminotransférase	5,2	1,87E-03

**Tableau 8 (suite) : Gènes discutés dans le ce travail et différentiellement exprimés en co-culture et Mono-culture à 58 h.**

Gènes	Fonctions/similarités	58 h	
		Co/Ba	P value
<b>Métabolisme des Nucléotides</b>			
BL 306	PurM phosphoribosylaminoimidazole synthetase	6,6	6,10E-04
BL 298	PurD phosphoribosylamine-glycine ligase	2,1	7,14E-03
BL 3847	DeoD purine nucléoside phosphorylase	3,2	7,08E-04
BL 1532	PyrG CTP synthase	2,3	2,64E-03
BL190	PyrR, PyrR, répresseur de la voie des pyrimidines	2,4	3,06E-03
BL 3856	Cdd Cytidine deaminase	0,5	2,90E-03
BL3421	Xanthine/uracil perméase	0,5	1,07E-02
BL 668	PyrE putative Orotate phosphoribosyltransferase	0,5	8,56E-03
BL 137	Gmk putative Guanylate kinase	0,5	7,34E-03
<b>Métabolisme des métabolites secondaires</b>			
BL 2909	CrtU Bétacarotène désaturase	2,9	2,03E-03
BL 2905	Idi Isopentenyl-diphosphate delta-isomérase	3,4	6,84E-04
BL 2907	CrtY Lycopène cyclase	2,0	9,44E-03
<b>Réponse au stress et résistance</b>			
BL 2926	chaperone	2,3	2,03E-03
BL 503	CspB, protéine de reponse au choc froid	2,7	5,84E-03
BL 785	UspA, protéine universel de réponse au stress	2,8	2,86E-03
BL 2833	Protéine de résistance multi drogue	4,3	8,32E-04
BL 3302	Protéine appartenant à la famille des $\beta$ -lactamases	2,4	1,16E-03
BL 2975	CopC, protéine de résistance au cuivre	2,6	8,07E-03
BL 96	Protéine de résistance au tellurium	5,5	3,20E-04
BL 1549	superoxide dismutase	2,0	1,32E-02
BL 3367	Protéine appartenant à la famille des dioxygénase	2,0	3,04E-02
BL 1533	Hydrolase (famille NUDIX)	3,0	3,56E-03
BL 116	Hydrolase (famille NUDIX)	5,5	2,23E-03
BL 1012	Peroxydase fer-dependante	9,0	2,15E-05
<b>Régulateurs putatifs</b>			
BL 1686	Régulateur appartenant à la famille des régulateurs TetR	2,7	2,03E-03
BL 190	PyrR, répresseur de la voie de biosynthèse des pyrimidines	2,4	3,06E-03
BL 2747	Régulateur appartenant à la famille des régulateurs MarR	2,0	4,27E-03
BL 714	Régulateur appartenant à la famille des régulateurs MarR	2,9	2,73E-03
BL 2967	Système à deux composants, senseur	2,1	8,02E-03
BL 3877	ArgR, répresseur de la voie de biosynthèse de la Arginine	2,1	5,92E-03
BL 495	PhoR, Système à deux composants, senseur	2,1	5,84E-03
BL 496	PhoP, Système à deux composants, régulateur	3,5	3,71E-04
BL 622	Régulateur appartenant à la famille des régulateurs ArsR	2,8	2,83E-03
BL 735	Régulateur appartenant à la famille des régulateurs AcrR,	6,7	5,06E-05
BL 2811	Regulateur putatif	2,3	5,32E-03
BL 415	Régulateur appartenant à la famille des régulateurs LysR	2,5	3,87E-03
BL 1659	Régulateur appartenant à la famille des régulateurs LysR	3,4	9,16E-04
BL 540	Régulateur appartenant à la famille des régulateurs LysR	5,4	3,08E-05
BL 1154	Régulateur putatif lié à la reponse aux stress	2,2	7,48E-03
BL 431	Régulateur putatif	2,1	3,45E-03
BL 2813	Régulateur putatif	0,5	8,67E-03
BL 2821	Régulateur appartenant à la famille des régulateurs TetR	0,4	9,01E-03
BL 2831	Régulateur appartenant à la famille des régulateurs TetR	0,4	6,38E-03
BL 783	Régulateur appartenant à la famille des régulateurs ArsR	0,4	1,25E-02
BL 3155	Régulateur appartenant à la famille des régulateurs LysR	0,2	3,61E-04

### C-3-Conclusion

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à l'association de deux micro-organismes issus de l'écosystème fromager, la bactérie *B. aurantiacum*, et la levure *K. lactis*. L'objectif était d'identifier les réponses moléculaires à cette interaction. A notre connaissance, seulement deux études transcriptomiques par des approches ciblées (Mansour *et al.*, 2009) ou globales (Mansour, 2009) ont déjà été effectuées en co-culture sur des micro-organismes de l'écosystème fromager. Mais, c'est la première fois, qu'une étude globale a été réalisée simultanément sur ces deux micro-organismes.

Dans cette étude, nous avons observé l'impact de *K. lactis* sur le métabolisme de l'azote, des vitamines mais également sur le métabolisme du carbone, des bases azotés et de la biosynthèse des pigments chez *B. aurantiacum* relié à la production d'éthanol par *K. lactis*. Cette étude montre l'importance que peut avoir l'éthanol dans l'interaction entre deux micro-organismes. Cette hypothèse avait déjà été avancée dans l'étude portant sur l'association entre *L. lactis* et *S. cerevisiae* (Maligoy *et al.*, 2008).

De plus, cette étude permet de proposer des réponses sur les phénomènes de régulation potentiellement impliqués dans l'interaction entre *B. aurantiacum* et *K. lactis*. (Tableau 9). En effet, les résultats ont montré l'induction de 16 régulateurs dont *argR* et *pyrR* en présence de *K. lactis*. 4 régulateurs seulement sont sous-exprimés en co-culture. Parmi les 16 régulateurs induits, on trouve un régulateur de type LysR qui est adjacent au gène codant pour la cystathionine  $\gamma$ -lyase mais également un système à deux composants PhoP-PhoS qui est impliqué dans une réponse à la carence en phosphate. Ces résultats témoignent de la capacité d'adaptation de *B. aurantiacum* lors d'un changement environnemental.

Lors de cette étude nous nous sommes heurtés à un problème technique qui a été résolu dans la Partie A du Chapitre II. En effet, nous n'utilisons pas la souche séquencée ATCC 9174 de *B. aurantiacum*. Aussi, ce qui concerne l'approche transcriptomique avec la souche ATCC 9175, nous avons dû, dans chaque cas présentant une ambiguïté, regarder dans les résultats CGH si les oligonucléotides des gènes hybridaient. Cette analyse nous a révélé que dans la voie de biosynthèse du pigment, la séquence des gènes diverge et nous obtenons une mauvaise hybridation sur les oligonucléotides de la puce à ADN de *B. aurantiacum*. Cette observation permettrait d'expliquer pourquoi dans ces deux cas nous avons observé une induction partielle de la voie. Ce cas a aussi été trouvé pour la voie de biosynthèse de l'arginine.

Cette étude a donc permis de révéler pour la première fois certaines interactions majeures existant entre *B. aurantiacum* et *K. lactis*. Elle permet de montrer que les interactions microbiennes sont très complexes et qu'elles peuvent se faire à différents niveaux. De plus, cette étude est un premier pas vers une compréhension de l'écosystème fromager où plusieurs micro-organismes cohabitent dans une matrice très complexe. La disponibilité des génomes d'intérêt technologique et l'émergence de nouvelles techniques telles que le séquençage à haut débit permettent d'envisager les futures recherches sous un nouvel angle.

# **Chapitre III- Discussion générale et perspectives**



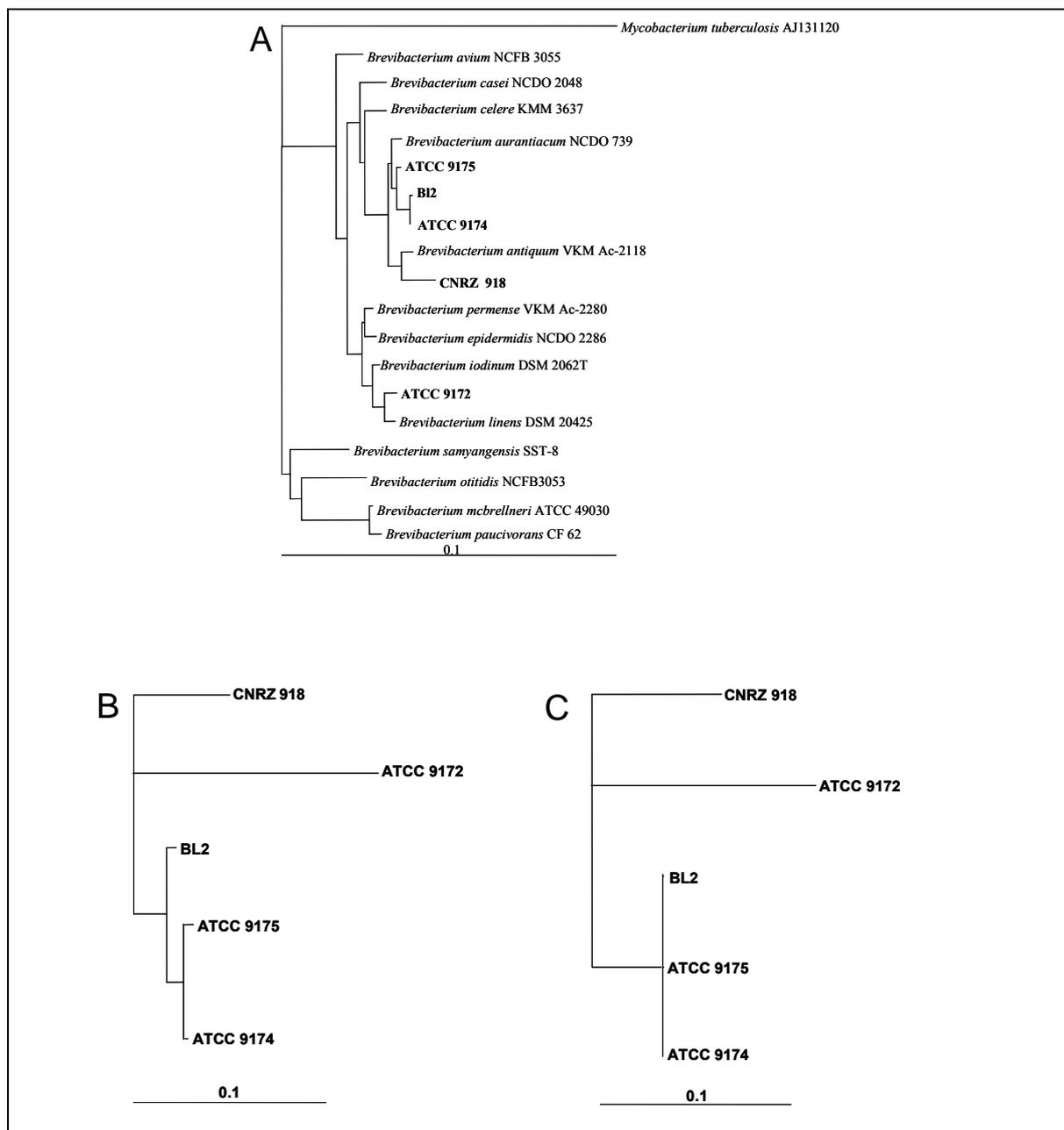
### **Chapitre III- Discussion générale et perspectives**

L'objectif de ce travail était d'étudier la bactérie d'affinage de fromage, *B. aurantiacum* ; i) en développant, dans un premier temps, des outils moléculaires permettant d'explorer la biodiversité du genre *Brevibacterium* ; ii) en étudiant un métabolisme clé de l'affinage : le métabolisme du soufre et sa régulation ; iii) en étudiant son adaptation à la présence d'un autre micro-organisme : la levure d'affinage *K. lactis*.

#### **Développement d'outils moléculaires (MLST et CGH) pour l'étude de la biodiversité du genre *Brevibacterium*.**

Les analyses de MLST combinées au séquençage de l'ARNr 16S sur 5 souches ont confirmé la répartition classique des souches fromagères de *Brevibacteriaceae* entre espèces différentes, *B. linens* et *B. aurantiacum* mais également d'étendre cette classification avec la mise en évidence de l'espèce *B. antiquum* parmi des souches isolées de fromages (Figure 22A). Parmi les 9 gènes de ménages utilisés pour l'analyse MLST (*cysN*, *glnA*, *gyrA*, *metY*, *metX*, *mgl*, *pheS*, *sah* et *tkt*), les gènes *metY*, *metX*, *gyrA* et *tkt* montrent une discrimination au niveau inter espèce, mais seul le gène *tkt* présente le même niveau de discrimination que la séquence concaténée des 9 gènes (Figure 22B et 22C). L'identification des souches par les producteurs de ferments est indispensable pour la commercialisation de ces ferments. L'utilisation de la technique de MLST, et plus particulièrement du marqueur *tkt* constituerait un moyen rapide et efficace pour l'identification des espèces du genre *Brevibacterium*.

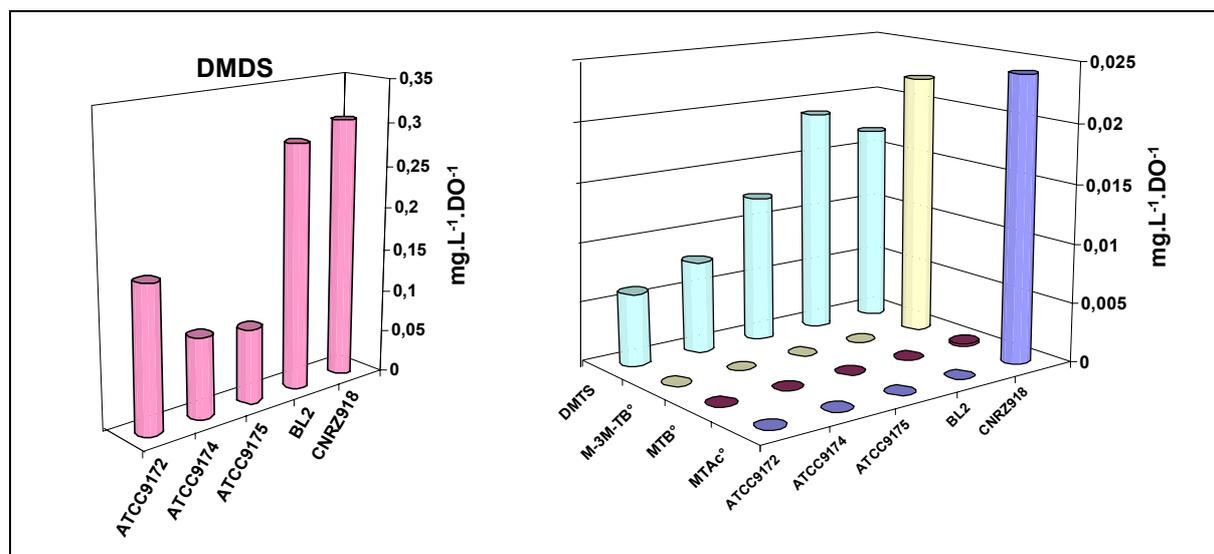
Le développement d'une puce à ADN, à partir du génome de *B. aurantiacum* ATCC 9174, a permis d'étudier la diversité intra-spécifique des 5 souches du genre *Brevibacterium* analysées en MLST. Cette étude confirme que la souche ATCC9172 représentant l'espèce *B. linens* et la souche CNRZ 918 appartenant à l'espèce *B. antiquum* sont phylogénétiquement éloignées de la souche séquencée ATCC 9174. Les divergences sont trop importantes pour que les résultats d'hybridation sur la puce à ADN soient exploités. Par contre, 3308 gènes sont conservés chez les trois souches de *B. aurantiacum* alors que 13% et 15% des gènes du génome de la souche séquencée ATCC 9174 sont absents et/ou trop divergents pour s'hybrider correctement dans les souches BI2 et ATCC 9175. Cette étude montre la pertinence d'une telle approche sur des souches fromagères ; une analyse portant sur un plus grand nombre de souches pourrait donc être envisagée.



**Figure 22. Relations phylogénétiques en différentes souches du genre *Brevibacterium*.** A. Arbre phylogénétique basé sur les séquences des ARN 16S disponibles sur le site « my RDB » et les séquences générées lors de cette étude. B. Arbre phylogénétique basé sur les séquences concaténées des 9 gènes de ménages (*cysN*, *glnA*, *gyrA*, *metY*, *metX*, *mgl*, *pheS*, *sah* et *tkl*) générées lors de cette étude. C. Arbre phylogénétique basé uniquement sur les séquences du gène *tkl*.

De plus, lors de cette étude, nous avons testé la production de composés soufrés volatils par les différentes souches étudiées en MLST et en CGH. Les résultats qui sont présentés dans la figure 23, ont montré une particularité de l'espèce *B. antiquum* qui produit des *S*-méthylthioesters. Une étude récente a montré qu'une autre souche appartenant à l'espèce *B. aurantiacum*, BL171, était aussi capable de produire ces composés (Sourabié *et al.*, 2010),

suggérant ainsi que cette capacité n'était pas un caractère associé à une espèce mais pourrait être due à des régulations particulières que l'on trouverait dans deux espèces.



**Figure 23. Productions spécifiques de composés sulfurés volatils par 5 souches appartenant au genre *Brevibacterium*.**

DMDS : disulfure de diméthyle (en rose); DMTS : trisulfure de diméthyle (en bleu); MTAc : méthylthioacétate (en violet); MTB : méthylthiobutanoate (en bordeaux); M-3M-TB : méthyl-3-méthylthiobutanoate (en jaune). Les quantités sont reportées par rapport à la densité optique à 600 nm. ° exprimé en équivalent DMDS.

### Etude du métabolisme du soufre chez *B. aurantiacum*

L'analyse *in silico* a montré la présence des voies d'assimilation du sulfate (l'opéron *cys*) mais aussi la présence des voies de thiolation conduisant à la synthèse de la cystéine (*cysKE*) et de l'homocystéine (*metXY*). De plus, quatre gènes (*BL56*, *BL541*, *BL613* et *BL929*) codant pour des protéines PLP-dépendante impliquées dans le métabolisme de la cystéine et de l'homocystéine ont été identifiés dont plusieurs sont impliqués dans les voies de transsulfuration ou de transsulfuration inverse. Les croissances ont montré que la souche *B. aurantiacum* ATCC9175 était capable de croître en présence de sulfate, de cystine, et d'homocystéine ce qui indique une conversion efficace de l'homocystéine en cystéine. Cette conversion peut être due à la voie de transsulfuration inverse ou à la présence d'une homocystéine  $\gamma$ -lyase. En présence de méthionine comme seule source de soufre, *B. aurantiacum* pousse très lentement avec un temps de doublement de 24 h au lieu de 3,5 h en présence de cystine ou de sulfate. Ces résultats suggèrent deux hypothèses, i) les transporteurs de la méthionine sont inefficaces, ii) une étape dans la voie de recyclage de la SAM est limitante. Les analyses du métabolome ont montré une accumulation de la méthionine dans la cellule suggérant que la deuxième hypothèse est la plus probable. Des résultats similaires ont été montrés pour *C. perfringens* ou *S. aureus* avec une croissance efficace en présence

d'homocystéine mais une absence de croissance en méthionine (Soutourina *et al.*, 2009a) (Andre, 2009).

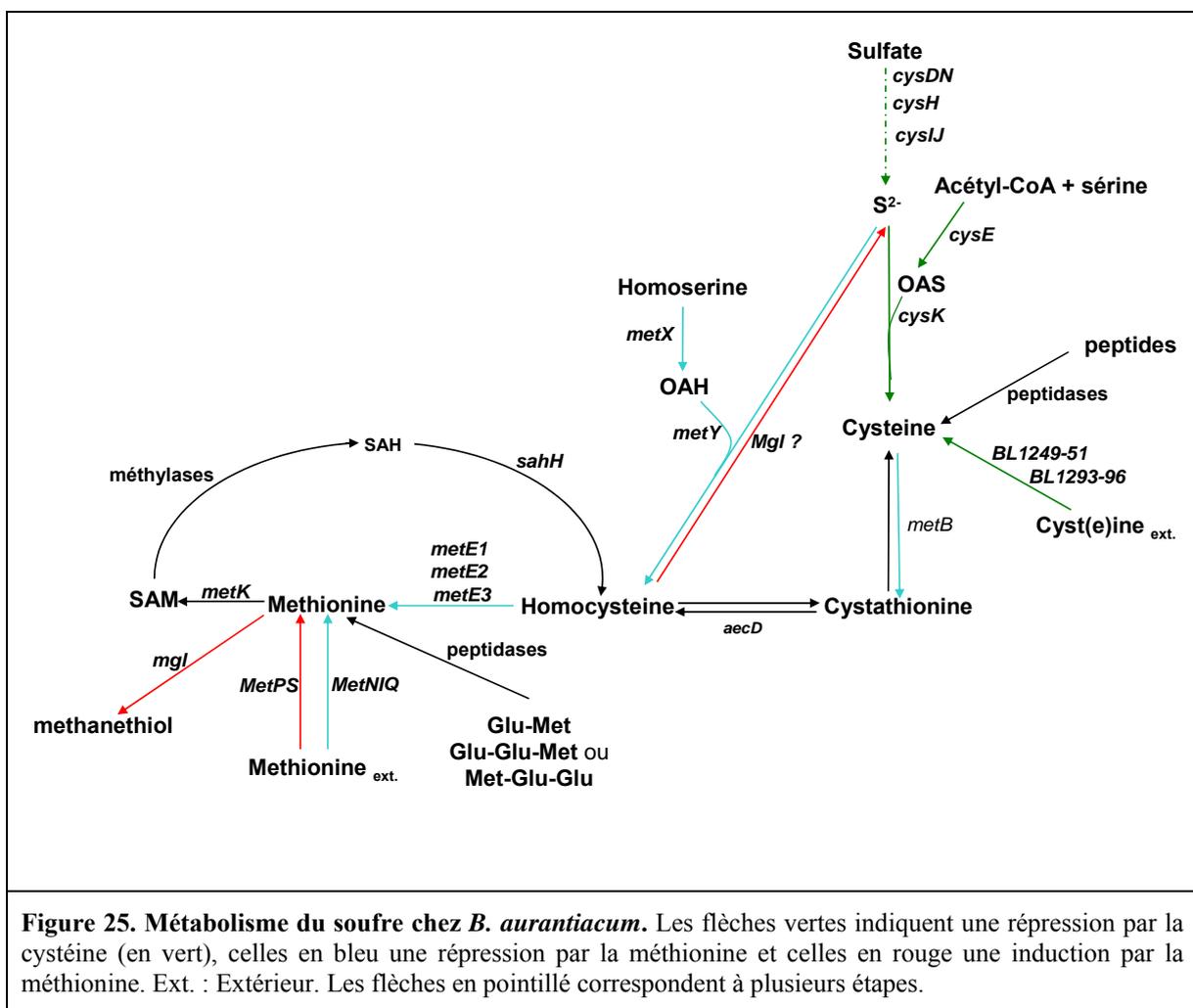
L'attribution des fonctions pour les quatre protéines (BL56, BL541, BL613 et BL929) a été complexe. Ces enzymes qui présentent des similitudes entre elles peuvent avoir des activités cystathionine  $\gamma$ - et  $\beta$ -lyases, cystathionine  $\gamma$ -synthase, méthionine  $\gamma$ -lyase ou *O*-acétyl-homosérine thiol-lyase. L'analyse *in silico* a cependant montré que le gène BL56 codait pour une *O*-acétyl-homosérine thiol-lyase, MetY, car ces protéines contiennent une insertion de 30 acides aminés qui est absente chez les autres membres de cette famille. De plus, les alignements effectués, entre les Mgl connues et les quatre protéines (BL56, BL541, BL613 et BL929), ne montraient pas le motif « YGC » qui est proposé comme spécifique des Mgl. Le résidu « cystéine » qui augmente l'affinité pour la méthionine est absent chez les trois protéines de cette famille chez *B. aurantiacum* (Figure 24) (El-Sayed, 2010). La protéine BL613 possède des similarités avec la cystathionine  $\gamma$ -synthase de *C. glutamicum* et de *M. tuberculosis*. De plus, l'expression de ce gène est réprimée en présence d'homocystéine et, dans une moindre mesure, en présence de méthionine suggérant qu'il participe à la synthèse de la méthionine. Nous proposons que cette protéine participe à la voie de transsulfuration et soit une cystathionine  $\gamma$ -synthase car une cystathionine  $\beta$ -lyase de la famille AecD/PatB est présente dans le génome de *B. aurantiacum*. Cependant, une étude transcriptomique qui utilise une puce partielle portant différents gènes du métabolisme de la méthionine a montré que l'expression du gène *BL613* était induite lors d'un ajout de méthionine dans un milieu synthétique (Extrait de levure, lactate, NaCl, CaCl<sub>2</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) (Cholet *et al.*, 2007). L'expression du gène *BL541* n'est pas régulée dans nos expériences. La protéine BL541 possède des similarités avec une cystathionine  $\gamma$ -lyase de *C. glutamicum* (45% d'identité). *In vitro*, les enzymes de cette famille possèdent souvent des activités multiples comme la cystathionine  $\beta$ -lyase de *L. lactis* qui possède aussi des activités méthionine  $\gamma$ -lyase ou encore homocystéine  $\gamma$ -lyase. On ne peut donc pas exclure que les protéines BL613 et BL541 aient également des activités Mgl comme cela a déjà été montré pour la cystathionine  $\gamma$ -lyase de *L. fermentum*, *L. lactis* subsp. *cremoris* et *G. candidum* (Smacchi et Gobbetti, 1998 ; Gente *et al.*, 2007) (Bruinenberg *et al.*, 1997). Cependant, les analyses transcriptomiques ont aussi montré clairement que le gène *BL929* était induit en présence de méthionine (Figure 25), et que cette induction était couplée avec une production de CSVs. Il a été montré que l'expression des gènes codant pour la Mgl de *Pseudomonas putida* et *Citrobacter freundii* était induite par la méthionine tout comme l'expression du gène BL929 (Inoue *et al.*, 1997) (Manukhov *et al.*, 2005). Ces résultats suggèrent que le gène BL929 code pour la Mgl de *B.*

*aurantiacum* ce qui est en accord avec le fait que l'activité Mgl de la souche CNRZ918 augmente en présence de méthionine (Ferchichi *et al.*, 1986b).

MGL_CF	-----	MSDXRTY-GF	NTQIVHAGQQ	PD	----	PSTGA
MGL_TV	-----	MSHERMPAT	ACI--HANP-	QK	----	DQFGA
MGL_PP	-----	MHGSKNLPGF	ATRAIHGQYD	PQ	----	DHGGA
MGL_AT	MAHFLETQEP	LVFSGKRRND	RDDEGDALV	AKKSALAVCD	ADPAAAIANI	RHEFGEHGGV
BL929	-----	-----	-----	-----	MVHGGM-	----
BL541	-----	MTTRDSSHAP	ETVVVEAGRP	QR	----	SNGSS
BL613	-----	MSITQN--GI	STRSVHSGAD	PE	----	SHTGS
MGL_CF	LST-----	P-----	-----IF	QTSTFVFDSA	EQGAARFALE	ESGYIITRLG
MGL_TV	AIP-----	P-----	-----IY	QTSTFVFDNC	QQGGNRFAGQ	ESGYIITRLG
MGL_PP	LVP-----	P-----	-----VY	QTATFTFTPTV	EYGAACFAGE	QAGHFVSRIS
MGL_AT	NMSIEASATF	TVMEP----	-----DT	MRRMFTGELG	-----PD	NDFYVSRHF
BL929	KGLTEAGVHV	PAIDLSTTNP	VNDVATGGDS	YEWLATGHTL	-----KD	GDSAVVQRLW
BL541	VNP-----	P-----	-----IE	LSSTFVGSGE	-----ID	HSDYVGRFS
BL613	VVA-----	P-----	-----IF	QTSTFMMDTP	GQT-----	RAGFDVARTG
MGL_CF	NPTTDALEKK	LAVLERGEAG	LATASGISAI	TTTLTLTLCQQ	GD-HIVSASA	INGCTHAFLS
MGL_TV	NPTVSNLEK	IAFLEKTEAC	VATSSGMGAI	AATVLTILKA	GD-HLISDEC	INGCTHALFE
MGL_PP	NPTLNLLEAR	MASLEGGEG	LALASGMGAI	TSTLWTLRP	GD-EVLLGNT	LYGCTFAFLH
MGL_AT	NPTVNLRSRQ	MAALEGTQAA	YCTSSGMSAI	SSVMLQLCSS	GG-HVVAAST	LYGGTHALLS
BL929	QPGVARFETA	LAGLEHAEBA	VAFATGMAAM	TAALLAAVSA	GTPHIVAVRP	LYGGSDHLE
BL541	TEAWTPFEEA	LAELEHAELP	GLVFGSGLAA	IAAALSLVPR	EG-TLIMPRH	LYQGSLESA
BL613	TENRSDLEQV	LCELENASFA	AAVNSGTSAE	VAVFSALLGP	GD-EIIPRD	LYGGTYRLLK
MGL_CF	HSMPKF-GIN	VRFVDAAKPE	EIR-AA---M	RPETKVVYIE	TPANFTLSLV	DIETVAGIAH
MGL_TV	HALTKF-GIQ	VDFINTAIPG	EVK-KH---M	KPNTKIVYFE	TPANFTLKII	DMERVCKDAH
MGL_PP	HGIGEF-GVK	LRHVDMADLQ	ALE-AA---M	TPATRVIFYE	SPANPNMHMA	DIAGVAKIAR
MGL_AT	HFLPRTCNIIT	TSFVDITDHG	AVANAI---V	EGRTQVLYFE	SVANFTLTVA	DIPELSRMAH
BL929	-----TGLLG--	---TTVTWAKEA	DIA-SA---I	QDDTGLVIVE	TPANFTSLDLV	DLDSVVSAAG
BL541	EVAERS-GFT	LTTVDIADTE	AVV-SALDDV	SATSAVLWIE	SPTNPMLEVA	DTPALISAAR
BL613	NEYERW-GIS	IRTVDLTDTE	ALA-AA---I	SAKTAIVWVE	TPSNFTGLDIV	DIAETAKLAH
MGL_CF	-QQGALLVVD	NTFMSFYCQQ	FLQLGADIVV	HSVTXYINGH	GDVIGGI-IV	GKQEFIDQ--
MGL_TV	SQEGVLVIAD	NTFCSMIMTN	PVDFGVDVVV	HSATKYINGH	TDVVAGL-IC	GKADLLQQ--
MGL_PP	-KHGATVVVD	NTYCTFYLQR	ELELGADLVV	HSATKYLSGH	GGITAGI-VV	GSQALVDR--
MGL_AT	-EKGVTVVVVD	NTF-APMVLVS	PAKLGADVVD	HSISKFISGG	ADIIAGA-VC	GSENLVKEMM
BL929	N---VPVLVD	NTFCTFVLQQ	FISHGAALLV	HSATKYLGGH	GDAMGGI-IA	TN-----
BL541	--DRGILTVVD	NTFATLLOQT	FLDLGADVVD	HSVTKYLAGH	SDVVLGAALT	SS-----
BL613	-GANAILAVD	STFATFILQR	PIELGADVVI	HSTTKFINGH	SDVIGGA-VL	AGDGSTCPRA
MGL_CF	---ARFVGL	KDITGGCMSP	FNAWLTLRGV	KTLGIRMERH	CENALKIARF	LEGHPSITRV
MGL_TV	---IRMVGI	KDITGSVISP	HDAWLITRGL	STLNIRMKAE	SENAMKVAEY	LKSHPAVEKV
MGL_PP	---IRLQGL	KDMTCVAVLSP	HDAALLMRGI	KTLNLRMDRH	CANAQVLAEF	LARQPQVELI
MGL_AT	DLRG---GS	LMLLCPTMNA	KVAFELSERI	PHLGLRMREH	SHRAQVYAEER	MRDLGM--KV
BL929	ADWAMRLRQV	RAITCALLHP	MGAYLLHRGL	RTLAVRMRRA	QTTAGELAEER	LDAHPAISVV
BL541	EDLHKRLHSE	RSLRCAIAGP	FEVWLALRGL	RTLSVRMERA	QANAALIAER	LNAHPNVVET
BL613	AEVVERLESY	LTSVCLGIAP	FDAWLTRRGI	KTLPVRMAKH	CENAQVAEAW	LESRPEIDEV
MGL_CF	YYPGLSSHPQ	YELGQRQMSL	PGG---IISF	EIAGGLEAGR	RMI---NSV	ELCLLAVSLG
MGL_TV	YYPGFEDHEG	HDIAKKQMRM	SGS---MITF	ILKSGFEGAK	KLL---DNL	KLITLAVSLG
MGL_PP	HYPGLASFPQ	YTLARQMSQ	PGG---MIAF	ELKGGIGAGR	RFM---NAL	QLFSRAVSLG
MGL_AT	IYPGLETHPQ	HKLFKGMVNR	DYGYGGLLSI	DMETE-EKAN	KLMAYLQDAT	QPGFMAVSLG
BL929	HYPGLKGQDP	RGLLGRQMSG	GGA---MIAM	ELAGGFDAAR	SFV---EHC	NLVVHAVSLG
BL541	RYPGLPTDPG	HKRAAAQLSG	FGA---VVAF	CTKTA-EQAT	AVA---EAV	RVWTPATSLG
BL613	YYPGLSSHPQ	HEVAKKQMSG	FGG---VVSF	RTDTE-ARAL	SLV---KST	KLITLAVSLG
MGL_CF	DTETLIQHPA	SMTHSPVAPE	ERLKAGITDG	LIRLSVGLD	PEDIINDLEH	AIRKATF---
MGL_TV	GCESLIQHPA	SMTHAVPKE	EREAGITDG	LVRLSVGLD	IDDLADVQQ	ALKASA---
MGL_PP	DAESLAQHPA	SMTHSSYTP	ERAHYGISEG	LVRMSVGVVG	TLEQKWTQFE	KAFLRM---
MGL_AT	YYETLMSCSG	SSTSSSELDPS	QKEAAGISPG	LIRLSVGLD	VDDLADLIA	ALDASRAAA-
BL929	GADTLIQHPA	SLTHRPVAAT	AKPG---DG	LLRLSVGLD	AEDLWADLDA	AIKAAHSA--
BL541	GVESITERRR	RNAS-----	--EPESVPDG	-----	-----	-----
BL613	GVESLIDHPA	TMTHLAVADC	EL---SVSPT	FIRLSGLD	IADILADLES	ALAAAAQTPD

Figure 24. Alignement des méthionine  $\gamma$ -lyases de *Citrobacter freundii* (CF), *Pseudomonas putida* (PP), *Trichomonas vaginalis* (TV), *Arabidopsis thaliana* (AT) incluant les protéines BL613, BL541 et BL929 de la souche de *B. aurantiacum* ATCC 9174. En rouge, on observe les acides aminés conservés dans les 7 méthionine  $\gamma$ -lyases, en bleu, les acides aminés conservés dans au moins 5 séquences. Les étoiles (\*\*\*) montrent le site « YGC » fortement conservé chez les méthionine  $\gamma$ -lyases des bactéries

Nous avons également comparé le profil d'expression des gènes suite à une croissance avec différentes sources de soufre (méthionine + cystine ; cystine ; sulfate). Les résultats montrent une répression des voies d'assimilation du sulfate (opéron *cys*) et de la biosynthèse de la cystéine (*cysKE*) en présence de cystine et une répression par la méthionine de la biosynthèse de la méthionine via la voie de thiolation (*metXY*) ou d'une étape de la voie de transulfuration (BL613) ainsi que de 2 des 3 gènes codant les méthionine synthétases (*metE1*, *metE2*) (Figure 24). Nous avons aussi mis en évidence la présence de deux ABC transporteurs de cystine/cystéine (BL1249-51 et BL1293-96) dont la synthèse est induite par la carence en cystine et d'un ABC transporteur de la méthionine (MetNIQ) qui est plus fortement exprimé en carence en méthionine (figure 25)



Nous observons une régulation transcriptionnelle pour l'expression des gènes des principales voies du métabolisme du soufre chez *B. aurantiacum*. Cependant, cette étude n'a pas permis de trouver chez *B. aurantiacum* des régulateurs équivalents à McbR de *C. glutamicum* ou à CymR de *B. subtilis* (Rey *et al.*, 2003 ; Even *et al.*, 2006). La régulation

coordonnée des gènes codant pour la Mgl et un système de transport de la méthionine (MetPS) suggère la présence d'un régulateur qui aurait un rôle clé dans la production des CSVs. De plus, un motif commun « GAGTRYWMMAMAKCWC » été trouvé positionné 51 pb en amont des sites de démarrage de la transcription des gènes *mgl* et *metP*. Le gène *BL891* codant pour un régulateur positionné en opéron avec le gène codant pour la Mgl dont l'expression est également induite en présence de méthionine constitue un candidat intéressant pour une prochaine étude. Il appartient à la famille de régulateur MerR, et il ne montre aucune ressemblance avec MdeR de *P. putida* qui est le seul régulateur connu d'une Mgl, (Inoue *et al.*, 1997). La surproduction de ce régulateur chez un autre micro-organisme, et des expériences de retard sur gel avec les régions promotrices de la *mgl* et du transporteur MetPS pourraient être envisagées pour valider cette hypothèse ainsi que le site de fixation potentiel « GAGTRYWMMAMAKCWC ».

La manipulation génétique de cette bactérie représente néanmoins un défi pour l'avenir. En effet, différentes hypothèses pourraient être validées par la construction de mutants. Au cours de ce travail, plusieurs tests de transformation par électroporation ont été tentés en collaboration avec Sandra Helinck et Audrey le Guicher (stagiaire). Il semble cependant qu'un choc électrique entraînerait des résistants spontanés à certains antibiotiques testés ce qui complique l'analyse des résultats. Nous avons cependant obtenu quelques clones dont certains sont en cours de vérification.

L'analyse des métabolites par spectrométrie de masse effectuée dans ce travail est un outil puissant. En effet, l'Orbitrap utilisé permet d'obtenir des masses exactes (5 ppm), et donc de discriminer des isobares. L'ensemble de ces données permet de déterminer la formule brute des composés et donc facilite l'identification des composés (Madalinski *et al.*, 2008). Cette particularité est importante dans des approches globales car elle permet de trouver des métabolites soufrés non recherchés. L'équipe de Christophe Junot au sein de laquelle nous avons effectué nos expériences de métabolomique au CEA, a développé un logiciel permettant d'extraire automatiquement les pics d'une empreinte métabolomique puis de regrouper des signaux en cluster. Ces données sont ensuite traitées par un logiciel statistique. Cette approche nous a permis de détecter la présence d'un dipeptide et d'un tripeptide contenant de la méthionine. Des études antérieures ont montré que différentes souches du genre *Brevibacterium* possèdent des peptidases intracellulaires (Ratray et Fox, 1997a) (Ratray *et al.*, 1995). De plus, la souche CNRZ 918 est capable d'utiliser des peptides contenant de la méthionine pour la production de MTL (Ferchichi *et al.*, 1985). Ces peptides pourraient être une forme de stockage de la méthionine pour la cellule qui permettrait ensuite

la production de CSVs. Cette approche nous a aussi montré la présence de méthylthioadénosine MTA. Ce métabolite n'avait pas été cherché lors de l'approche ciblée car les gènes codant pour sa biosynthèse sont absents du génome. Une expérience de MS/MS a confirmé son identification. Trois hypothèses peuvent être émises, i) Les gènes sont présents dans le génome mais son séquençage n'étant pas achevé, nous ne les avons pas trouvés ; ii) Les gènes sont présents dans le génome de la souche ATCC 9175 mais pas dans celui de la souche ATCC 7174 ; iii) L'existence d'une voie originale permet la synthèse de ce composé. Enfin, 5 composés soufrés putatifs inconnus ont été mis en évidence par cette méthode. Des expériences de MS/MS doivent être effectuées pour identifier ces composés.

Cette étude a donc permis de poser les bases pour une meilleure compréhension d'un métabolisme essentiel de *B. aurantiacum* : le métabolisme du soufre.

### **Etude de l'interaction entre *B. aurantiacum* et *K. lactis*, deux micro-organismes d'affinage de fromage.**

L'analyse du transcriptome de *B. aurantiacum* en présence ou en absence de *K. lactis* a montré que 509 gènes sont différentiellement exprimés chez *B. aurantiacum* dans ces deux conditions à 58 h. Grâce à ce travail, nous pouvons proposer pour la première fois un modèle d'interaction entre *B. aurantiacum* et *K. lactis* présenté dans la figure 26.

Parmi ces gènes, plusieurs sont impliqués dans le cycle de Krebs, l'assimilation de l'éthanol et du lactate, dans le métabolisme de l'arginine, du glutamate et de la glutamine, dans une voie de biosynthèse des métabolites secondaires (pigments) et dans métabolisme de la biotine (figure 26). On observe une complémentarité métabolique probable pour la voie de biosynthèse de la biotine entre *B. aurantiacum* et *K. lactis* (figure 26). De plus, la présence d'éthanol produit par *K. lactis* dans le milieu, entraîne une réaction de *B. aurantiacum* par la mise en place de stratégie de défenses comme la consommation de l'éthanol ou la production de pigment (figure 26).

Lors de la synthèse bibliographique, nous avons vu que les interactions entre les micro-organismes pouvaient être classées en différents types. L'accélération de la croissance de *B. aurantiacum* dans les 30 premières heures de culture (phase exponentielle) en association avec *K. lactis* puis la chute de cultivabilité dans les dernières heures (phase stationnaire) ainsi que l'absence de variation de croissance de la levure tendent à classer leur relation en 2 types d'interaction si on se restreint aux observations physiologiques. En phase exponentielle, *B. aurantiacum* entretiendrait une relation de commensalisme avec *K. lactis*. Puis, en phase stationnaire, la bactérie rentrerait en compétition pour un substrat avec la levure. Néanmoins,



molécules du « Quorum sensing » (phényléthanol, tryptophol et ammoniac) (Palková *et al.*, 2003 ; Chen et Fink, 2006). La présence de *B. aurantiacum* semble donc être détectée par la levure mais la ou les molécule(s) de communication entre les deux microorganismes doivent encore être identifiées.

De plus, une deuxième piste est aussi à explorer, en effet, lors de nos analyses de métabolomique effectuées dans la partie précédente et donc en mono-culture de *B. aurantiacum*, une molécule a particulièrement attirée notre attention. Ce métabolite est annoté comme étant du  $\gamma$ -butyrolactone, molécule du « Quorum sensing » du genre *Streptomyces*. Une étude phylogénétique sur les gènes *afsA* et *arpA* codant respectivement pour une  $\gamma$ -butyrolactone synthase et le récepteur du  $\gamma$ -butyrolactone a montré que le gène *afsA* est absent chez *B. aurantiacum* ATCC 9174 (Nishida *et al.*, 2007). De plus, le récepteur du  $\gamma$ -butyrolactone de *B. aurantiacum*, ArpA, (BL3929) montre une divergence en ce qui concerne sa partie de fixation avec cette molécule (29% identité avec AprA de *S. griseus*) (Nishida *et al.*, 2007). Des analyses complémentaires sur ce métabolite sont nécessaires pour confirmer sa présence et, dans le cas échéant, son identification chez *B. aurantiacum*.

Certaines études ont montré que l'association entre la souche CNRZ 918 appartenant à l'espèce *B. antiquum* et la levure *K. lactis* entraînait la formation de *S*-méthylthioacétate (MTAc) en plus grande quantité. Les auteurs montrent que le MTL représente un substrat limitant dans la synthèse de MTAc chez *K. lactis*, mais cette limitation peut être contournée en lui associant *B. antiquum* qui lui fournit du MTL (Arfi *et al.*, 2002). Dans nos conditions, nous n'observons pas d'augmentation de production de composés soufrés volatils, mais une libération importante d'éthanol, et plus généralement d'alcools produits par la levure. Les conditions de cultures ainsi que les souches utilisées ne sont pas identiques ce qui influence vraisemblablement les résultats. En effet, l'association entre *B. antiquum* CNRZ 918 et *K. lactis* 44<sub>8</sub> a été effectuée dans des fromages modèles de type camembert. Une étude sur l'association entre *B. aurantiacum* et *K. lactis* devrait être réalisée dans des conditions plus proches des conditions fromagères comme l'utilisation d'un milieu rétentat ou des fromages modèles de type camembert ou munster mais également avec d'autres micro-organismes de l'écosystème fromager (association avec une autre levure ou une autre bactérie).

Dans ce travail, nous avons pour la première fois utilisé des outils moléculaires comme la recherche du démarrage de la transcription, la PCR quantitative ou encore les analyses transcriptomiques par puce à ADN chez *B. aurantiacum*. Ces approches ont permis l'étude du métabolisme des acides aminés soufrés qui sont les précurseurs des CSVs mais aussi l'étude

d'une interaction complexe entre deux micro-organismes du fromage, *B. aurantiacum* et *K. lactis*. La connaissance des métabolismes des micro-organismes du fromage mais également des mécanismes d'interaction entre ces micro-organismes est importante pour le développement de la maîtrise des qualités organoleptiques du fromage.

# **Fiches techniques**



## Fiche technique n°1 : Milieu Chimiquement défini (MCD)

### **Objectif**

L'utilisation d'un milieu chimiquement défini permet la maîtrise de la concentration des différents composés présents dans ce milieu.

### **Méthode**

Toutes les solutions sont préparées avec de l'eau osmosée et les quantités sont données pour la préparation d'un litre de milieu. Il est constitué de 8 solutions et avec un ajustement de pH pour les expériences en présence de différentes sources de soufres à pH 7, ou pH de 6,9 pour les expériences en co-culture.

### **Composition du milieu**

#### Solution 1A : source de carbone

*Préparation de cette solution à 10X*

Composé	Concentration 1X (g/l)	Concentration 1X (mM)
lactose*	20	55,50
Lactate de sodium 60 %*	15	133,86

#### Solution 1B : sels 1

*Préparation de cette solution à 10X*

Composé	Concentration 1X (g/l)	Concentration 1X (mM)
Acétate de sodium	1	12,19
Citrate d'ammonium	0,6	2,65
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	7,9	58
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	16	91,8
NaCl	20	342

(ajout du NaCl petit à petit après dissolution des autres composés)

#### Solution 2 : sels 2

*Préparation de cette solution à 50 X.*

Composé	Concentration 1X (g/l)	Concentration 1X (mM)
MgCl <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O	0,2	2,1
FeCl <sub>2</sub> , 4 H <sub>2</sub> O	0,011	0,087
CaCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O	0,050	0,45
ZnCl <sub>2</sub> ,	0,005	0,037
CoCl <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O	0,0025	0,019

### Solution 3 : acides aminés

*Préparation de cette solution à 20X*

Composé	Concentration 1X (g/l)	Concentration 1X
Alanine	0,24	2,7mM
Arginine	0,12	570µM
Asparagine	0,34	2,6mM
Glutamate	0,68	3,5mM
Glutamine	0,51	2,3mM
Glycine	0,17	4mM
Histidine	0,11	520µM
Isoleucine	0,20	1,5mM
Leucine	0,47	3,6mM
Lysine	0,35	1,6mM
Proline	0,68	5,6mM
Sérine	0,34	3,2mM
Thréonine	0,23	2mM
Tryptophane	0,05	250µM
Valine	0,33	2,8mM

### Solution 4 : Phénylalanine

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

Composé	Concentration 1X (g/l)	Concentration 1X
Phénylalanine	0,28	1,7mM

### Solution 5 : Tyrosine

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

Composé	Concentration 1X (g/l)	Concentration 1X
Tyrosine	0,29	1,6mM

### Solution 6 : Bases

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

Composé	Concentration 1X (g/l)	Concentration 1X
Adénine	0,010	70µM
Guanine	0,010	73µM
Uracile	0,010	90µM
Xanthine	0,010	65µM

### Solution 7 : Vitamines

*Préparation de cette solution à 20X.*

Composé	Concentration (g/l)	Concentration 1X
Acide P-aminobenzoïque	0,010	72µM
Biotine	0,010	41µM
Cyano-cobalamine	0,001	0,75µM
Acide folique	0,001	2,3µM
Inosine	0,005	19µM
Acide nicotinique	0,001	8µM
Acide orotique	0,005	3,2µM
Pantothénate de calcium	0,001	2,1µM
Pyridoxamine	0,005	11,8µM
Pyridoxine	0,002	9,7µM
Riboflavine	0,001	2,6µM
Thiamine	0,001	3µM
Acide D,L 6-8 thioctique	0,0025	12,1µM
Thymidine	0,005	20,6µM
Pyridoxal-5-phosphate	0,0006	2,4µM

### Solution 8: Cystine

*Préparation de cette solution à 20X.*

Composé	Concentration 1X (g/l)	Concentration 1X
Cystine	Variable selon l'expérience	

### Solution 8: Méthionine

*Préparation de cette solution à 20X.*

Composé	Concentration 1X (g/l)	Concentration 1X
Méthionine	Variable selon l'expérience	

### Préparation du milieu

Les solutions sont stérilisées par filtration membranaire de 0,22 µm (TPP, vacuum filtration-system) ou par autoclavage (Solution 2) et mélangées dans l'ordre indiqué. De l'eau osmosée est ajoutée afin de compléter le volume final souhaité.

<b>Solution</b>	<b>concentration</b>	<b>Volume (mL)</b>
Solution 1A	10x	100
Solution 1B	10x	100
Solution 2	50x	20
Solution 3	20x	50
Solution 4	20x	50
Solution 5	20x	50
Solution 6	50x	20
Solution 7	20x	50
Solution 8	20x	variable
Solution 9	20x	variable
Eau osmosée		qsp 1000
Volume final		1000 mL

## Fiche technique n°2 : Dosage des sources de carbone par HPLC

### Principe

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

### Méthode

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

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

#### Analyse du lactate

Un appareil HPLC Waters TCM (Millipore, France) équipé d'une pompe LC-6A (Shimadzu, Japon), d'un injecteur automatique (Waters), d'un intégrateur CR-3A (Shimadzu) et d'une colonne, échangeuse de cations, Aminex HPX 87H (Biorad Hercules, CA 94547, USA) est utilisé. La solution éluée est analysée par un détecteur à longueur d'onde variable Waters 490 (programmable multiwave detector) et un réfractomètre différentiel RID-6A (Shimadzu), tous deux connectés en série. Un volume de 20  $\mu\text{l}$  est injecté par un injecteur automatique d'échantillons (717 plus Waters). Les analyses sont réalisées à 35 °C, avec une vitesse d'écoulement de 0,6 mL/min. La colonne de 7,8 mm de diamètre et de 300 mm de longueur est couplée à une pré-colonne Aminex HPX-87H de 50 mm (Biorad). Cette colonne permet de

séparer les acides organiques, les sucres et les alcools. L'identification du lactate se fait à l'aide du détecteur UV Waters 486, dont la longueur d'onde est ajustée à 210 nm.

## Fiche technique n°3 : Analyse des composés volatils par GC/MS

### **Principe**

L'analyse des composés volatils repose essentiellement sur 3 étapes : La concentration en tête de colonne (Purge and Trap), la séparation par chromatographie en phase gazeuse (GC) et l'identification des molécules par spectrométrie de masse (MS).

### Dispositif instrumental

Les composés volatils sont analysés par extraction dynamique de l'espace de tête (Purge and Trap HP 3547A, Agilent Technologies) comprenant un piège absorbant (Tenax, 60 à 80 mesh, 0.25 g, 30 x 0.32 cm) couplé à un module de cryo-concentration. Ce module est couplé à un chromatogramme en phase gazeuse (GC G1530A, Agilent Technologies) assurant la séparation du mélange de composés extraits, lui-même équipé d'un spectromètre de masse (MSD 5973; Agilent Technologies) pour la détection/quantification.

### **Méthode**

#### Extraction des composés volatils et séparation des composés

Cette analyse a été conduite sur des échantillons issus de cultures en milieu chimiquement défini. Les échantillons stockés à -80 °C après prélèvement, sont rapidement décongelés à 4 °C. Cinq millilitres de culture non filtrée sont préchauffés (3 min) puis maintenus à 60°C et subissent une extraction pendant 15 min sous un flux d'hélium ultra pur (qualité GC - débit de 15 ml.min<sup>-1</sup>). Les composés volatils extraits sont retenus et concentrés par absorption sur le piège (Tenax) maintenu à 40°C. La vapeur d'eau extraite est ensuite éliminée par un balayage du piège par de l'hélium sec (3 min – dry purge). Le piège est alors chauffé à 225°C pendant 2 min pour désorber les composés volatils, qui sont directement transférés (via une ligne de transfert maintenue à 150°C) en tête de colonne capillaire et reconcentrés par le froid (cryo-concentration à -150°C). Les composés reconcentrés sont alors injectés par chauffage (180°C) et balayage à l'hélium du piège de cryo-concentration sur une colonne capillaire apolaire (HP-5MS, 30.0 m x 0.25 mm,

0.25µm épaisseur de film). Cette colonne est balayée par de l'hélium à un débit constant (1.2mL.min<sup>-1</sup>). L'injection se fait en mode split/splitless (fermeture de la fuite pendant 1 min – débit de 24mL/min). Afin d'optimiser la séparation des composés du mélange complexe, un programme de montée en température de four du chromatogramme est appliqué : maintien de la température initiale (5°C) du four pendant 8 min ; augmentation de 5°C à 20°C à un gradient de 3°C.min<sup>-1</sup>, suivi d'un deuxième gradient de 10°C.min<sup>-1</sup> de 20 à 150°C. La température du four est alors maintenue à 150°C pendant 10 min.

### Identification des composés

Le principe de fonctionnement du spectromètre de masse (MS) est basé sur la séparation des ions en fonction du rapport de la masse à la charge de leurs ions (m/z). Le MS est constitué de plusieurs parties (sources, analyseurs et détecteur) permettant de réaliser les étapes suivantes :

L'ionisation. Les molécules séparées sont dirigées vers une chambre d'ionisation où un flux d'électrons de forte énergie les fragmente en ions. La molécule est ionisée suivant la réaction :  $M + e^- \rightarrow 2 e^- + M^+$ . L'ion mono-chargé obtenu, appelé ion moléculaire, correspond au poids moléculaire du composé. En raison de la forte énergie du faisceau électronique, cet ion se décompose ensuite selon la structure, en une série d'ions dont la proportion et la nature sont caractéristiques de la molécule étudiée.

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

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

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

proportionnelle à la quantité d'ions reçus. L'ensemble des signaux émis par les ions permet d'obtenir un spectre de masse caractéristique de la molécule.

Identification. Les composés sont finalement identifiés par comparaison de leur spectre de masse avec ceux de la base de données spectrales Wiley275 (Agilent Technologies). Les temps de rétention sont aussi notés. La quantification se réalise en utilisant les composés du commerce (pureté GC) lorsqu'ils sont disponibles et en réalisant une courbe d'étalonnage (surface pic TIC- Total Ion Chromatogram / concentrations en  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ou  $\text{mg}/\text{kg}$ ). Si le composé n'est pas disponible, une quantification relative en équivalent d'un composé proche (même famille chimique) peut être utilisée. Cela sera précisé dans les résultats. Chaque dosage est réalisé en triple (3 échantillons biologiques indépendants) et les résultats sont exprimés par la moyenne  $\pm$  écart type.



## Fiche technique n°4 : Extraction d'ARN par le Trizol

### **Objectif**

L'utilisation du Trizol<sup>®</sup> reagent (Invitrogen, 15596-018) étant une solution monophasique de phénol et de guanidine isothiocyanate, d'une méthode mécanique (Bead-beating) permet d'extraire les ARNs.

### **Méthode**

#### Préparation des réactifs et du matériel

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

#### Préparation des échantillons

Les cultures (10<sup>9</sup> de cellules) sont centrifugées 10 ml dans des tubes Falcon de 15 ml à 7000 rpm pendant 2 minutes à 4°C. Le surnageant est éliminé et les culots sont immédiatement congelés par de la carboglace puis stockés à -80°C. Les culots sont ensuite décongelés et ressuspendus dans 400 µl de solution de resuspension (½ glucose (20%) + ½ Tris 25 mM pH 7,6 EDTA A 10 mM) et 60 µl d'EDTA 0,5 M. Ces cellules ressuspendues sont placées dans des tubes à vis de 2 ml préalablement remplis de 400mg de billes de zirconium (100µm, BioSpec Products), et 500µl de phénol acide. Chaque tube est ensuite vigoureusement agité au broyeur MP-FastPrep-24 pendant 30 secondes à 6,5 m/s puis incubé 5 minutes à 4°C après traitement. Les tubes sont agités deux fois dans ses conditions. Après refroidissement les tubes sont centrifugés 10 min à 13 000 g à 4°C. Le surnageant limpide est transféré par pipetage dans un tube eppendorf de 2 ml à température ambiante préalablement remplis par 1ml de trizol. Les tubes sont incubés 5 minutes à température ambiante permettant ainsi une meilleure dissociation des complexes nucléoprotéiques. Après incubation, 100 µl d'une solution de chloroforme/ alcool isoamylique 24/1 (v/v) est ajouté à chaque tube. Ces derniers, une fois fermés, sont mélangés doucement mais consciencieusement à la pipette puis incubés 3 minutes à température ambiante. Les tubes sont

alors centrifugés 5 minutes à 13 000 g à 3°C (la température doit être basse afin d'éviter que l'ADN reste en phase aqueuse). Les surnageants translucides contenant l'ARN sont récupérés. La phase organique inférieure rose contient les protéines. 200 µl de la solution de chloroforme/alcool isoamylique 24/1 (v/v) est ajouté puis mélangé doucement mais consciencieusement à la pipette. Après une incubation de 5 minutes à température ambiante, les tubes sont centrifugés 5 minutes à 4°C. Les phases aqueuses supérieures sont ajoutées à 500µl d'isopropanol avant d'être incubés 15 minutes à 4°C. Les tubes sont ensuite centrifugés 15 minutes à 4°C. Cette étape permet de précipiter l'ARN. Le culot est ensuite lavé 2 fois dans 800µl d'éthanol à 70%, puis séché au « speed vac » pendant 2 min. Le culot est resuspendu dans une solution Tris-HCl 10 mM pH 7,6 EDTA 1 mM pré-incubé à 37°C. L'ARN est ensuite traité deux fois avec de la turbo DNase (Ambion).

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

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

## Fiche technique n°5 : RT-PCR quantitative

### Objectif

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

### Méthode

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

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

-Chaque échantillon contient 2 µg d'ARN

-Le mélange pour la reverse transcription est préparé comme suit :

2 µg d'ARN	<i>n</i> µl
Amorce 50 ng/ µl d'amorces aléatoire	1 µl
10 mM de mix de dNTP	1 µl
Eau RNase free	qsp 10 µl

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

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

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

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

	10 min à 25 °C suivit
Amorces aléatoires	de 50 min à 50 °C

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

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

5 min

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

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

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

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

Une Réaction	
H <sub>2</sub> O, PCR grade	4.1 µl
MgCl <sub>2</sub>	1.2 µl
PCR primer mix	1.2 µl*
Lightcycler® FastStart DNA Master SYBR Green I	1 µl†

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

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

-Chaque capillaire contient un volume total de 10 µl : 2.5 µl de l'échantillon à amplifier dilué au 1/100<sup>e</sup> + 7.5 µl du mix de PCRq

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

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

Contrôles indispensables requis

-Un gène rapporteur est utilisé en parallèle ; ce gène dont l'expression n'est pas modifiée dans les différentes conditions biologiques permet d'éviter que des modifications de quantités d'ADN dans l'essai soient analysées comme des différences d'expression. Chez *B. aurantiacum* ATCC 9175 nous avons choisi le gène *rpoB*.

-Un capillaire contenant de l'eau à la place de l'échantillon est indispensable afin de contrôler la non contamination (par de l'ADN ou de l'ARN) des différents mix préparés.

-Il est indispensable de contrôler l'efficacité des amorces choisies pour cela, 5 dilutions successives de l'ADN du micro-organisme d'intérêt allant de 50 ng/μl à 5 pg/μl sont réalisées. Une PCR quantitative est réalisée en utilisant le couple d'amorce choisi. Pour une efficacité de PCR à 100 %, la pente de la droite Ct en fonction du log de la concentration en ADN matrice doit être égale à -3.33. Lorsque toutes ces manipulations préliminaires sont réalisées, on analyse les échantillons d'intérêts.



## Fiche technique n°6 : Marquage par synthèse d'ADNc

### Principe

Adaptation du kit *Superscript Direct cDNA Labelling System* (Invitrogen) pour procéder au marquage direct de l'ARN de la bactérie *B. aurantiacum*. L'étape de marquage a lieu directement au cours de la synthèse d'ADNc par l'incorporation d'un nucléotide couplé à un fluorochrome. Les fluorochromes utilisés sont la cyanine 3 (Cy 3) et cyanine 5 (Cy 5) qui émettent respectivement à 532 nm et 645 nm.

### Méthode

Le marquage s'effectue à partir de 10 µg d'ARN total.

#### Mix d'hybridation des amorces

Pour chaque échantillon préparer le mix d'hybridation dans un tube de PCR comme suit :

	Volume en µl	
	cyanine 3	cyanine 5
pdN6 primer	1,6	1,6
ARN (10 µg)	X	X
Eau (qsp)	13	13

Les échantillons sont mis 5 min à 70 °C, puis 1 min dans la glace.

#### Mix de marquage

Le mix de marquage est alors ajouté pour chaque échantillon comme suit :

	Volume en µl	
	cyanine 3	cyanine 5
5 X First Strand Buffer	6	6
0.1 DTT	3	3
dNTP pour dCTP marqué	2	2
RNAse out	1	1
dCTP-cyanine 3 ou 5	3	3
Superscript III RT	2	2

Une fois le mix de marquage ajouté, les tubes sont placés 3 h à 46 °C (Bain Marie). L'ARN restant est dégradé en ajoutant 15 µl de NaOH à 0,1 M, le tout est alors mélangé puis incubé 30 min à 70 °C. La réaction est ensuite neutralisée en ajoutant 15 µl d'HCl à 0,1 M.

### Purification des cDNA marqués

-Ajuster le volume à 100µl avec de l'eau ultra-pure.

-Ajouter 500µl « Loading Buffer » (LB) dans chaque échantillon.

-Le volume ADNc marqué + LB est placé sur la colonne pour fixer l'ADNc. Centrifuger 1 min à 14000 g à température ambiante et éliminer le liquide collecté.

-Un premier lavage de la colonne s'effectue avec 700 µl de tampon de lavage sur la colonne, et centrifuger 2 min à 14000 g à température ambiante. Renouveler le lavage.

-La colonne est séchée en centrifugeant 5 min à 14000 g à température ambiante.

-Mettre 70 µl du tampon d'élution, attendre 1 min, centrifuger 2 min à 14000 g à température ambiante.

L'ADNc marqué peut être stocké à -20°C, à l'obscurité.

## Fiche technique n°7 : Hybridation et lavages de la puce technologie Agilent

### Hybridation

La quantité de cyanine 3 ou 5 incorporée est dosée au Nanodrop pour chaque échantillon. 150 pmol de cyanine 3 et 5 des cibles marquées sont placées sur colonne Amicon® (Millipore) et centrifugées 13 min à 8000 g. Puis 1µl des cibles marquées sont récupérées par centrifugation pendant 1 min à 13000 rpm. Puis 19µl d'eau Ultra-Pure et 5µl « locking buffer » et 25 µl du tampon d'hybridation 2X HI (AgilentTechnology) sont ajoutés. Les cibles marquées sont ensuite dénaturées 2min à 95°C puis centrifugées brièvement. 40µl des cibles marquées sont alors déposées sur la « gaskette » puis la puce à ADN (8X15K) est placée au dessus. La lame est placée dans la chambre d'hybridation en suivant les indications fournies par Agilent (Agilent Microarray Hybridization Chamber User Guide). L'hybridation se déroule dans le four Agilent (rotation 10 rpm) à 65 °C pendant 17 h.

### Lavages

Une fois l'hybridation terminée, la lame est plongée dans différentes solutions de lavage. Cette étape permet d'éliminer les sondes non hybridées et diverses hybridations aspécifiques. La lame est placée dans un bain n°1 contenant le tampon « GE Wash Buffer 1 » (AgilentTechnology) afin de décoller la lame de la « gaskette ». La lame est à nouveau placée dans un bain n°1 pendant 1 min. La lame est ensuite lavée dans le bain contenant le tampon « GE Wash Buffer 2 » préalablement incubé à 37°C pendant 1min. La lame est finalement séchée en la sortant délicatement du bain. Puis immédiatement scannée.



## Fiche technique n°8 : Extraction d'ADN chromosomique

### Objectif

L'utilisation du phénol et du chloroforme couplé à une lyse enzymatique permet d'extraire les ADN avec une grande pureté.

### Méthode

Les cultures ( $10^9$  de cellules) sont centrifugées 10 ml dans des tubes Falcon de 15 ml à 7000 rpm pendant 2 minutes à 4°C. Les culots ressuspendus dans 400 µl de TEN (Tris 0,1M pH 8 EDTA 0,1M, NaCl 0,15 M). Ces cellules resuspendues sont placées dans des tubes eppendorf puis 8 µL de Lysozyme (50 mg/mL) sont ajoutés au mélange. Les cellules sont ensuite incubées 20 min à 37°C pour effectuer la lyse bactérienne. 4µL de RNase (5mg/mL) sont ajoutés pour éliminer l'ARN, la préparation est ensuite incubée 3 minutes à 65°C puis 15 minutes à 50°C. Puis 40µL de SDS à 10% et une pincée de protéinase K sont ajoutés à la préparation et complétée à 1mL avec du TEN. Le mélange est ensuite clarifié 2h à 60°C.

Une extraction phénolique est ensuite réalisée, le lysat et le phénol sont mélangés manuellement vol à vol (sans vortexer) et centrifugés à 14000 rpm pendant 5 minutes à 4°C afin de séparer les déchets protéiques entre les deux phases. La phase inférieure contient le phénol coloré en jaune, un anneau protéique se trouve à l'interphase et l'ADN est contenu dans la phase aqueuse. Cette étape est réalisée deux fois. Puis on procède de la même façon avec le chloroforme. Le surnageant est récupéré et introduit délicatement dans un tube falcon de 15mL contenant 10mL d'éthanol absolu glacé. Cette étape permet la précipitation de l'ADN puis, le précipité d'ADN est enroulé à l'aide d'une pipette pasteur recourbée. Le précipité est aussitôt lavé avec de l'éthanol à 70% puis séché sur la pipette afin d'éliminer le maximum d'éthanol. L'ADN est ensuite ressuspendu dans 300µl de TEN\* (10mM Tris-HCl pH8, 1mM EDTA, 50mM NaCl) à 65°C pendant 1h.



## Fiche technique n°9 : Marquage de l'ADN génomique

### Principe

Adaptation du kit *Bioprime array CGH genomic Labelling System* (Invitrogen) pour procéder au marquage direct de l'ADN de la bactérie *B. aurantiacum*. L'étape de marquage a lieu directement au cours de la synthèse d'ADN par l'incorporation d'un nucléotide couplé à un fluorochrome. Les fluorochromes utilisés sont la cyanine 3 (Cy 3) et cyanine 5 (Cy 5) qui émettent respectivement à 532 nm et 645 nm.

### Méthode

Le marquage s'effectue à partir de 4 µg d'ADN total.

#### Mix d'hybridation des amorces

Pour chaque échantillon préparer le mix d'hybridation dans un tube de PCR comme suit :

	Volume en µl	
	cyanine 3	cyanine 5
Amorces aléatoires	20	20
ADN (2 µg)	X	X
Eau (qsp)	41	41

Les échantillons sont mis 5 min à 95 °C, puis 5 min dans la glace.

#### Mix de marquage

Le mix de marquage est alors ajouté pour chaque échantillon comme suit :

	Volume en µl	
	cyanine 3	cyanine 5
dNTP pour dCTP marqué	5	5
dCTP-cyanine 3 ou 5	3	3
Exo-klenow	1	1

Une fois le mix de marquage ajouté, les tubes sont placés 2 h à 37 °C (Bain Marie). La réaction est ensuite neutralisée en ajoutant 5 µl de « Stop Buffer ».

#### Purification des cibles marquées

- Ajuster le volume à 45µl avec de Tris-EDTA, pH8.
- Ajouter 400µl « Purification Buffer A » (PBA) dans chaque échantillon puis vortexer 30s.
- Le volume cibles marquées + PBA est placé sur la colonne pour fixer l'ADN. Centrifuger 1 min à 11000 g à température ambiante et éliminer le liquide collecté.

-Un premier lavage de la colonne s'effectue avec 600 µl de « Purification Buffer B » (PBB) sur la colonne, et centrifuger 1 min à 11000 g à température ambiante. Renouveler le lavage avec 200µl de PBB.

-La colonne est séchée en centrifugeant 1 min à 11000 g à température ambiante.

-Mettre 50 µl de l'eau « Ultra-Free », attendre 1 min, centrifuger 2 min à 14000 g à température ambiante. L'ADN marqué peut être stocké à -20°C, à l'obscurité.

## Fiche technique n° 10 : Analyse des métabolites intracellulaires par LC/MS

### **Principe**

L'obtention d'une empreinte métabolique repose essentiellement sur 3 étapes : la séparation par chromatographie en phase liquide (LC), la détection des molécules par spectrométrie de masse à haute résolution impliquant un instrument de type LTQ/Orbitrap (MS) et enfin une identification des composés réalisée d'une part, sur la base de la masse précise et d'autre part sur la comparaison du temps de rétention chromatographique et du spectre de fragmentation du composé à identifier avec ceux d'un composé de référence.

### **Méthode**

#### Extraction des métabolites intracellulaires

Cette analyse a été conduite sur des échantillons issus de cultures en milieu chimiquement défini. Les échantillons sont centrifugés et lavés 2 fois dans de l'eau osmosée glacée. Puis,  $10^{10}$  cellules sont stockées à  $-80^{\circ}\text{C}$ . Les culots sont ensuite décongelés 15 min à  $4^{\circ}\text{C}$  puis resolubilisés dans 1ml d'acide formique 1%. La solution est ensuite incubée 10 min à  $95^{\circ}\text{C}$  puis centrifugée 30 min à  $4^{\circ}\text{C}$ . Les surnageants sont lyophilisés et stocker à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### Séparation des métabolites intracellulaires

Les échantillons sont repris dans 400  $\mu\text{l}$  d'acide formique 1%, puis placés dans des flacons et mis dans le rail de l'injecteur automatique thermostaté à  $4^{\circ}\text{C}$  de la chaîne chromatographique. Les composés sont séparés par chromatographie en phase liquide. La séparation est réalisée avec une colonne de type HS-F5 (2,1 x 250mm, 5 $\mu\text{m}$ ) avec un système d'élution impliquant l'utilisation d'un gradient eau (A) / acétonitrile contenant 0,1% d'acide formique (B) passé à 200  $\mu\text{l}/\text{min}$  : 0-3 min: 0% B ; 3-20 min: augmentation linéaire de 0-100% de B ; 20-25 min: 100% de B ; 25-45 min: 0% de B.

#### Détection des métabolites intracellulaires

Le principe de fonctionnement d'un spectromètre de masse est basé sur la séparation des ions en fonction de leur rapport masse sur charge ( $m/z$ ). Un spectromètre de masse comporte une source,

qui permet d'ioniser les analytes, qui sont ensuite séparés dans un ou plusieurs analyseurs selon leurs rapports  $m/z$ .

L'ionisation électrospray: cette technique, développée par J.B. Fenn au milieu des années 1980, est utilisée en spectrométrie de masse pour produire des ions à partir de composés en solution. L'électrospray est produit par application à pression atmosphérique d'un fort champ électrique sur un liquide traversant un tube capillaire avec un faible débit. Le champ électrique est obtenu par application d'une différence de potentiel de 3 à 6 kV entre ce capillaire et la contre-électrode. Il provoque l'accumulation de charges à la surface du liquide, situé à l'extrémité du capillaire, qui va se rompre pour former des gouttelettes fortement chargées. L'évaporation du solvant contenu dans ces gouttelettes va provoquer la réduction de leur taille jusqu'au moment où les forces coulombiennes vont approcher le niveau des forces de cohésions de celles-ci et provoquer leur explosion. Alors une véritable cascade de fissions donne des gouttelettes de plus en plus petites, jusqu'au moment où le champ électrique en leurs surfaces devient suffisant pour provoquer la désorption des ions. Ceux-ci sont accélérés vers l'analyseur alors que les molécules non chargées sont éliminées. Les ions ainsi produits sont notamment des ions protonés (en mode positif) ou déprotonés (en mode négatif) qui permettent d'accéder à la masse moléculaire du composé intact.

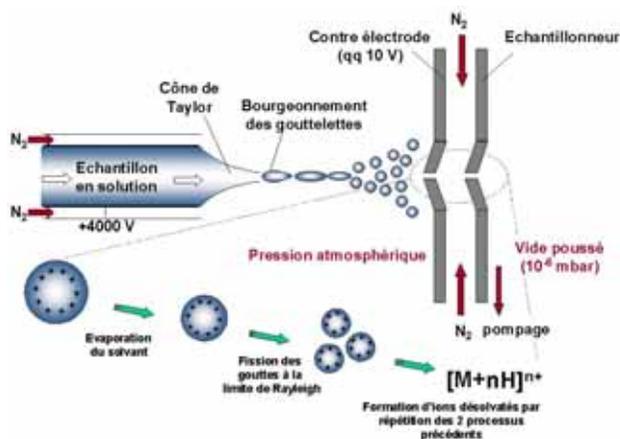


Schéma d'une source électrospray

Les analyseurs de type Orbitrap: ce sont des analyseurs à haute, voire ultra-haute résolution qui permettent d'accéder aux mesures de masses précises avec des erreurs de l'ordre de la partie pour million (ppm). L'Orbitrap est constitué de deux électrodes: la première est centrale et possède la forme d'un fuseau, la deuxième est extérieure et possède la forme d'un tonneau coupé en deux parties égales séparées par un espace étroit. Des tensions continues et un champ quadripolaire

sont appliqués aux électrodes. Les ions sont injectés tangentiellement par l'interstice séparant les deux moitiés de l'électrode externe. Les ions sont injectés à une énergie cinétique de quelques keV et se mettent à osciller suivant des spirales entremêlées autour de l'électrode centrale sous l'effet des tensions continues et de la géométrie du piège. Le vide y est poussé (10<sup>-10</sup> torr). A chaque passage devant les ions génèrent un courant induit sur lequel sera appliqué une transformée de Fourier afin de convertir le signal en m/z.

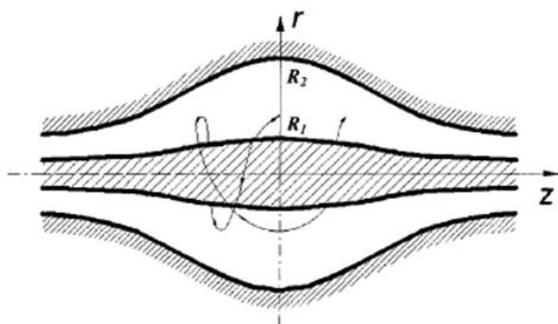


Schéma d'un piège électrostatique ou « orbitrap » d'après la description de A. Makarov

L'Orbitrap possède une vitesse de balayage très rapide ce qui lui permet d'accéder à l'ultra haute résolution sans utilisation de champ magnétique. Elle a été couplée par la société ThermoFisher scientifics avec un piège linéaire pour former un spectromètre de masse hybride, le LTQ Orbitrap™. Cet hybride permet ainsi de réaliser des expériences de fragmentation de type MS<sup>n</sup>, les ions produits étant analysés avec la même résolution que celle de l'ion parent.

#### Identification des métabolites.

L'empreinte métabolique est ensuite traité par le logiciel XCMS (Smith, Want et al. 2006) qui détecte les pics automatiquement et les aligne d'un chromatogramme à l'autre dans les domaines des masses et des temps de rétention. Puis, les temps de rétention et les masses exactes sont comparés à la base de données spectrale du laboratoire et aux bases de données publiques (KEGG, HMDB et METLIN).



# Références



## Références

- 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. March 1, 1996.
- Adamitsch, B. F. et Hampel, W. A. (2000).** Formation of lipolytic enzymes by *Brevibacterium linens*. *Biotechnology Letters* **22**, 1643-1646. 2000.
- Adamitsch, B. F., Karner, F. et Hampel, W. A. (2003).** High cell density cultivation of *Brevibacterium linens* and formation of proteinases and lipase. *Biotechnology Letters* **25**, 705-708.
- Adams, M. R. et 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. et 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. et Marth, E. H. (1989).** Behavior of *Listeria monocytogenes* at 7, 13, 21, and 35°C in tryptose broth acidified with acetic, citric, or lactic acid. *Journal of food protection* **52**, 688-695.
- Albanesi, D., Mansilla, M. C., Schujman, G. E. et De Mendoza, D. (2005).** *Bacillus subtilis* cysteine synthetase is a global regulator of the expression of genes involved in sulfur assimilation. *Journal of bacteriology* **187**, 7631-7638. November 15, 2005.
- Alting, A. C., Engels, W. J. M., van Schalkwijk, S. et 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. November 1, 1995.
- Amarita, F., Yvon, M., Nardi, M., Chambellon, E., Delettre, J. et Bonnarme, P. (2004).** Identification and functional analysis of the gene encoding Methionine-gamma-Lyase in *Brevibacterium linens*. *Applied and environmental microbiology* **70**, 7348-7354. December 1, 2004.
- Amoroso, M. J., Manca de Nadra, M. C. et Oliver, G. (1989).** The growth and sugar utilization by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* and *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* isolated from market yogurt. *Le Lait* **69**, 519-528.
- Anderberg, S. J., Newton, G. L. et Fahey, R. C. (1998).** Mycothiol biosynthesis and metabolism. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 30391-30397. November 13, 1998.
- Andre, G. (2009).** Mécanismes de régulation en réponse à la disponibilité en soufre chez *Clostridium acetobutylicum* et *Clostridium perfringens*. Paris 6, Paris. 171 p.

- Arfi, K., Spinnler, H. E., Tache, R. et 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. 2002 March.
- Arfi, K., Amarita, F., Spinnler, H. E. et Bonnarme, P. (2003).** Catabolism of volatile sulfur compounds precursors by *Brevibacterium linens* and *Geotrichum candidum*, two microorganisms of the cheese ecosystem. *Journal of biotechnology* **105**, 245-253.
- Arfi, K., Leclercq-Perlat, M. N., Spinnler, H. E. et Bonnarme, P. (2005).** Importance of curd-neutralising yeasts on the aromatic potential of *Brevibacterium linens* during cheese ripening. *International Dairy Journal* **15**, 883-891. 2005/9//.
- Arfi, K., Landaud, S. et Bonnarme, P. (2006).** Evidence for distinct L-methionine catabolic pathways in the yeast *Geotrichum candidum* and the bacterium *Brevibacterium linens*. *Applied and Environmental Microbiology* **72**, 2155-2162. March 1, 2006.
- Ascon-Reyes, D. B., Ascon-Cabrera, M. A., Cochet, N. et 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. January 1, 1995.
- Ashida, H., Saito, Y., Kojima, C. et Yokota, A. (2008).** Enzymatic characterization of 5-Methylthioribulose-1-phosphate dehydratase of the methionine salvage pathway in *Bacillus subtilis*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **72**, 959-967.
- Auger, S., Yuen, W. H., Danchin, A. et Martin-Verstraete, I. (2002a).** The *metIC* operon involved in methionine biosynthesis in *Bacillus subtilis* is controlled by transcription antitermination. *Microbiology* **148**, 507-518. February 1, 2002.
- Auger, S., Danchin, A. et Martin-Verstraete, I. (2002b).** Global expression profile of *Bacillus subtilis* grown in the presence of sulfate or methionine. *Journal of bacteriology* **184**, 5179-5186. September 15, 2002.
- Auger, S., Gomez, M. P., Danchin, A. et Martin-Verstraete, I. (2005).** The PatB protein of *Bacillus subtilis* is a C-S-lyase. *Biochimie* **87**, 231-238.
- Autry, A. R. et Fitzgerald, J. W. (1990).** Sulfonate S : a major form of forest soil organic sulfur. *Biology and Fertility of Soils* **10**, 50-56.
- Ayling, P. D., Mojica-A, T. et Klopotoski, T. (1979).** Methionine transport in *Salmonella typhimurium*: Evidence for at least one low-affinity transport system. *Journal of general microbiology* **114**, 227-246. October 1, 1979.
- Ayling, P. D. (1981).** Methionine sulfoxide is transported by high-affinity methionine and glutamine transport systems in *Salmonella typhimurium*. *Journal of bacteriology* **148**, 514-520. November 1, 1981.
- Baptist, E. W. et Kredich, N. M. (1977).** Regulation of L-cystine transport in *Salmonella typhimurium*. *Journal of bacteriology* **131**, 111-118. July 1, 1977.

- Belfaiza, J., Parsot, C., Martel, A., de la Tour, C. B., Margarita, D., Cohen, G. N. et Saint-Girons, I. (1986).** Evolution in biosynthetic pathways: two enzymes catalyzing consecutive steps in methionine biosynthesis originate from a common ancestor and possess a similar regulatory region. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **83**, 867-871. February 1986.
- Belfaiza, J., Martel, A., Margarita, D. et Saint Girons, I. (1998).** Direct sulfhydrylation for methionine biosynthesis in *Leptospira meyeri*. *Journal of bacteriology* **180**, 250-255. January 15, 1998.
- Benthin, S. et Villadsen, J. (1995).** Different inhibition of *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* by D- and L-lactic acid: effects on lag phase, growth rate and cell yield. *Journal of Applied Microbiology* **78**, 647-654.
- Berger, B. J., English, S., Chan, G. et Knodel, M. H. (2003).** Methionine Regeneration and Aminotransferases in *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus anthracis*. *Journal of bacteriology* **185**, 2418-2431. April 15, 2003.
- Berger, C., Khan, J. A., Molimard, P., Martin, N. et Spinnler, H. E. (1999).** Production of sulfur flavors by ten strains of *Geotrichum candidum*. *Applied and environmental microbiology* **65**, 5510-5514. December 1, 1999.
- Berndt, C., Lillig, C. H., Wollenberg, M., Bill, E., Mansilla, M. C., de Mendoza, D., Seidler, A. et Schwenn, J. D. (2004).** Characterization and Reconstitution of a 4Fe-4S Adenylyl Sulfate/Phosphoadenylyl Sulfate Reductase from *Bacillus subtilis*. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 7850-7855. February 27, 2004.
- Betteridge, P. R. et Ayling, P. D. (1975).** The role of methionine transport-defective mutations in resistance to methionine sulphoximine in *Salmonella typhimurium*. *Molecular & general genetics : MGG* **138**, 41-52. 1975.
- Bockelmann, W. et Hoppe-Seyler, T. S. (2001).** The surface flora of bacterial smear-ripened cheeses from cow's and goat's milk. *International Dairy Journal* **11**, 307-314.
- Bockelmann, W., Willems, K. P., Neve, H. et Heller, K. H. (2002).** Cultures for the ripening of smear cheeses. *International Dairy Journal* **15**, 719-732. 2005/9//.
- Bockelmann, W. (2003).** Smear ripened cheeses. H. Roginski, J.W. Fuquay and P.F. Fox, Editors. *Encyclopedia of dairy sciences, Academic Press*, 391–401.
- Bogdanova, N. et Hell, R. (1997).** Cysteine synthesis in plants: protein-protein interactions of serine acetyltransferase from *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **11**, 251-262.
- Bonnarme, P., Psoni, L. et Spinnler, H. E. (2000).** Diversity of L-Methionine Catabolism Pathways in Cheese-Ripening Bacteria. *Applied and environmental microbiology* **66**, 5514-5517. December 1, 2000.

- Bonnarme, P., Lapadatescu, C., Yvon, M. et Spinnler, H. E. (2001).** L-methionine degradation potentialities of cheese-ripening microorganisms. *The Journal of dairy research* **68**, 663-674.
- Bonnarme, P., Amarita, F., Chambellon, E., Semon, E., Spinnler, H. E. et Yvon, M. (2004).** Methylthioacetaldehyde, a possible intermediate metabolite for the production of volatile sulphur compounds from -methionine by *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiology Letters* **236**, 85-90.
- Bonner, E. R., Cahoon, R. E., Knapke, S. M. et Jez, J. M. (2005).** Molecular basis of cysteine biosynthesis in plants. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 38803-38813. November 18, 2005.
- Bornemann, C., Jardine, M. A., Spies, H. S. et Steenkamp, D. J. (1997).** Biosynthesis of mycothiol: elucidation of the sequence of steps in *Mycobacterium smegmatis*. *The Biochemical journal* **325**, 623-629. 1997 Aug 1.
- Boucabeille, C., Mengin-Lecreulx, D., Henckes, G., Simonet, J. M. et van Heijenoort, J. (1997).** Antibacterial and hemolytic activities of linenscin OC2, a hydrophobic substance produced by *Brevibacterium linens* OC2. *FEMS Microbiology Letters* **153**, 295-301.
- Bourdat-Deschamps, M., Le Bars, D., Yvon, M. et Chapot-Chartier, M. P. (2004).** Autolysis of *Lactococcus lactis* AM2 stimulates the formation of certain aroma compounds from amino acids in a cheese model. *International Dairy Journal* **14**, 791-800.
- Boutrou, R. et Guéguen, M. (2005).** Interests in *Geotrichum candidum* for cheese technology. *International Journal of Food Microbiology* **102**, 1-20.
- Brennan, N., Ward, A., Beresford, T., Fox, P., Goodfellow, M. et Cogan, T. (2002).** Biodiversity of the Bacterial Flora on the Surface of a Smear Cheese. *Applied and environmental microbiology* **68**, 820-830. February 1, 2002.
- Brennan, N. M., Brown, R., Goodfellow, M., Ward, A. C., Beresford, T. P., Vancanneyt, M., Cogan, T. M. et Fox, P. F. (2001).** *Microbacterium gubbeenense* sp. nov., from the surface of a smear-ripened cheese. *International journal of systematic bacteriology* **51**, 1969-1976. November 1, 2001.
- Breunig, K. D., Bolotin-Fukuhara, M., Bianchi, M. M., Bourgarel, D., Falcone, C., Ferrero, I., Frontali, L., Goffrini, P., Krijger, J. J., Mazzoni, C., Milkowski, C., Steensma, H. Y., Wésolowski-Louvel, M. et Zeeman, A. M. (2000).** Regulation of primary carbon metabolism in *Kluyveromyces lactis*. *Enzyme and Microbial Technology* **26**, 771-780.
- Brown, J. S. et Holden, D. W. (2002).** Iron acquisition by Gram-positive bacterial pathogens. *Microbes and Infection* **4**, 1149-1156.
- Bruinenberg, P. G., De Roo, G. et Limsowtin, G. K. Y. (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. February 1, 1997.

**Brush, A. et Paulus, H. (1971).** The enzymic formation of *O*-acetylhomoserine in *Bacillus subtilis* and its regulation by methionine and S-adenosylmethionine. *Biochemical and biophysical research communications* **45**, 735-741.

**Bryan, J., Liles, R., Cvek, U., Trutschl, M. et Shelver, D. (2008).** Global transcriptional profiling reveals *Streptococcus agalactiae* genes controlled by the MtaR transcription factor. *BMC Genomics* **9**, 607.

**Bryson, K., Loux, V., Bossy, R., Nicolas, P., Chaillou, S., van de Guchte, M., Penaud, S., Maguin, E., Hoebeke, M., Bessieres, P. et Gibrat, J. F. (2006).** AGMIAL: implementing an annotation strategy for prokaryote genomes as a distributed system. *Nucleic acids research* **34**, 3533-3545. July 19, 2006.

**Buchmeier, N. A., Newton, G. L., Koledin, T. et Fahey, R. C. (2003).** Association of mycothiol with protection of *Mycobacterium tuberculosis* from toxic oxidants and antibiotics. *Molecular Microbiology* **47**, 1723-1732.

**Burguiere, P., Auger, S., Hullo, M.-F., Danchin, A. et Martin-Verstraete, I. (2004).** Three different systems participate in L-cystine uptake in *Bacillus subtilis*. *Journal of bacteriology* **186**, 4875-4884. August 1, 2004.

**Burguiere, P., Fert, J., Guillaouard, I., Auger, S., Danchin, A. et Martin-Verstraete, I. (2005).** Regulation of the *Bacillus subtilis* *ytmI* Operon, Involved in Sulfur Metabolism. *Journal of bacteriology* **187**, 6019-6030. September 1, 2005.

**Butler, J. D., Levin, S. W., Facchiano, A., Miele, L. et Mukherjee, A. B. (1993).** Amino acid composition and N-terminal sequence of purified cystine binding protein of *Escherichia coli*. *Life sciences* **52**, 1209-1215.

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

**Cernat-Bondar, D., Beckerich, J. M. et 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. August 1, 2005.

**Chaves-López, C., De Angelis, M., Martuscelli, M., Serio, A., Paparella, A. et Suzzi, G. (2006).** Characterization of the *Enterobacteriaceae* isolated from an artisanal Italian ewe's cheese (Pecorino Abruzzese). *Journal of Applied Microbiology* **101**, 353-360.

**Chen, H., Fujita, M., Feng, Q., Clardy, J. et Fink, G. R. (2004).** Tyrosol is a quorum-sensing molecule in *Candida albicans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 5048-5052. April 6, 2004.

**Chen, H. et Fink, G. R. (2006).** Feedback control of morphogenesis in fungi by aromatic alcohols. *Genes & development* **20**, 1150-1161.

**Cherest, H. et Surdin-Kerjan, Y. (1992).** Genetic analysis of a new mutation conferring cysteine auxotrophy in *Saccharomyces cerevisiae*: Updating of the sulfur metabolism pathway. *Genetics* **130**, 51-58. January 1, 1992.

**Cherest, H., Thomas, D. et Surdin-Kerjan, Y. (1993).** Cysteine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* occurs through the transsulfuration pathway which has been built up by enzyme recruitment. *Journal of bacteriology* **175**, 5366-5374. September 1, 1993.

**Cholet, O., Hénaut, A. et Bonnarme, P. (2007).** Transcriptional analysis of L-methionine catabolism in *Brevibacterium linens* ATCC9175 *Applied Microbiology and Biotechnology* **74** ( 6), 1320-1332. avril 2007.

**Christensen, J., Dudley, E., Pederson, J. et Steele, J. (1999).** Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* **76** 217-246. novembre 1999.

**Cornell, K. A. et Riscoe, M. K. (1998).** Cloning and expression of *Escherichia coli* 5'-methylthioadenosine/S-adenosylhomocysteine nucleosidase: Identification of the pfs gene product. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* **1396**, 8-14.

**Corrieu, G. et Luquet, F. M. (2008).** *Bactéries lactiques : De la génétique aux ferments*. Lavoisier, Paris, pp. 849.

**Corroler, D., Mangin, I., Desmasures, N. et Gueguen, M. (1998).** An ecological study of *Lactococci* isolated from raw milk in the camembert cheese registered designation of origin area. *Applied and environmental microbiology* **64**, 4729-4735. December 1, 1998.

**Curtin, A. C., Gobbetti, M. et McSweeney, P. L. H. (2002a).** 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.

**Curtin, Á. C., Gobbetti, M. et McSweeney, P. L. H. (2002b).** 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.

**Dahl, S., Tavaría, F. K. et Malcata, F. X. (2000).** Relationships between flavour and microbiological profiles in Serra da Estrela cheese throughout ripening. *International Dairy Journal* **10**, 255-262.

**Dassler, T., Maier, T., Winterhalter, C. et Böck, A. (2000).** Identification of a major facilitator protein from *Escherichia coli* involved in efflux of metabolites of the cysteine pathway. *Molecular Microbiology* **36**, 1101-1112.

**De Sordi, L. et Mühlischlegel, F. A. (2009).** Quorum sensing and fungal–bacterial interactions in *Candida albicans*: a communicative network regulating microbial coexistence and virulence. *FEMS Yeast Research* **9**, 990-999.

**Deetae, P., Bonnarme, P., Spinnler, H. E. et Helinck, S. (2007).** Production of volatile aroma compounds by bacterial strains isolated from different surface-ripened French cheeses. *Applied microbiology and biotechnology* **76**, 1161-1171. 2007 October.

**Deetae, P., Spinnler, H. E., Bonnarme, P. et Helinck, S. (2009).** Growth and aroma contribution of *Microbacterium foliorum*, *Proteus vulgaris* and *Psychrobacter sp.* during

ripening in a cheese model medium. *Applied microbiology and biotechnology* **82**, 169-177. 2009 February.

**del Castillo-Lozano, M. L., Mansour, S., Tâche, R., Bonnarme, P. et Landaud, S. (2008).** The effect of cysteine on production of volatile sulphur compounds by cheese-ripening bacteria. *International Journal of Food Microbiology* **122**, 321-327.

**Delmar, P., Robin, S. et Daudin, J. J. (2005).** VarMixt: efficient variance modelling for the differential analysis of replicated gene expression data. *Bioinformatics* **21**, 502-508. February 15, 2005.

**Demarigny, Y., Berger, C., Desmasures, N., Gueguen, M. et Spinnler, H. E. (2000).** Flavour sulphides are produced from methionine by two different pathways by *Geotrichum candidum*. *The Journal of dairy research* **67**, 371-380.

**Dias, B. et Weimer, B. (1998a).** Purification and characterization of L-Methionine gamma - Lyase from *Brevibacterium linens* BL2. *Applied and environmental microbiology* **64**, 3327-3331. September 1, 1998.

**Dias, B. et Weimer, B. (1998b).** Conversion of methionine to thiols by *Lactococci*, *Lactobacilli*, and *Brevibacteria*. *Applied and environmental microbiology* **64**, 3320-3326. September 1, 1998.

**Dobric, N., Limsowtin, G. K. Y., Hillier, A. J., Dudman, N. P. B. et 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.

**Duchange, N., Zakin, M. M., Ferrara, P., Saint-Girons, I., Park, I., Tran, S. V., Py, M. C. et Cohen, G. N. (1983).** Structure of the *metJBLF* cluster in *Escherichia coli* K12. Sequence of the *metB* structural gene and of the 5'- and 3'-flanking regions of the *metBL* operon. *Journal of Biological Chemistry* **258**, 14868-14871. December 25, 1983.

**Dufosse, L., Mabon, P. et 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. February 1, 2001.

**Dufossé, L. et de Echanove, M. C. (2005).** The last step in the biosynthesis of aryl carotenoids in the cheese ripening bacteria *Brevibacterium linens* ATCC 9175 (*Brevibacterium aurantiacum* sp. nov.) involves a cytochrome P450-dependent monooxygenase. *Food Research International* **38**, 967-973.

**Eichhorn, E., van der Ploeg, J. R., Kertesz, M. A. et Leisinger, T. (1997).** Characterization of alpha-Ketoglutarate-dependent Taurine Dioxygenase from *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 23031-23036. September 12, 1997.

**Eichhorn, E., van der Ploeg, J. R. et Leisinger, T. (1999).** Characterization of a Two-component Alkanesulfonate Monooxygenase from *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 26639-26646. September 17, 1999.

- Eichhorn, E., van der Ploeg, J. R. et Leisinger, T. (2000).** Deletion Analysis of the *Escherichia coli* Taurine and Alkanesulfonate Transport Systems. *Journal of bacteriology* **182**, 2687-2695. May 15, 2000.
- El-Sayed, A. S. (2010).** Microbial L-methioninase: production, molecular characterization, and therapeutic applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* **86**, 445-467. March 2010.
- Entian, K. D. et de Vos, W. M. (1996).** Genetics of subtilin and nisin biosyntheses: biosynthesis of lantibiotics. *Antonie Van Leeuwenhoek*. **69**, 109-117. Feb.
- Eppert, I., Valdes-Stauber, N., Gotz, H., Busse, M. et Scherer, S. (1997).** Growth reduction of *Listeria spp.* caused by undefined industrial red smear cheese cultures and bacteriocin-producing *Brevibacterium linens* as evaluated in situ on soft cheese. *Applied and environmental microbiology* **63**, 4812-4817. December 1, 1997.
- Even, S., Burguiere, P., Auger, S., Soutourina, O., Danchin, A. et Martin-Verstraete, I. (2006).** Global control of cysteine metabolism by CymR in *Bacillus subtilis*. *Journal of bacteriology* **188**, 2184 - 2197.
- Even, S., Charlier, C., Nouaille, S., Ben Zakour, N. L., Cretenet, M., Cousin, F. J., Gautier, M., Coccagn-Bousquet, M., Loubiere, P. et Le Loir, Y. (2009).** *Staphylococcus aureus* virulence expression is impaired by *Lactococcus lactis* in mixed cultures. *Applied and environmental microbiology* **75**, 4459-4472. July 1, 2009.
- Famelart, M.-H., Kobilinsky, A., Bouillanne, C. et Desmazeaud, M. J. (1987).** Influence of temperature, pH and dissolved oxygen on growth of *Brevibacterium linens* in a fermentor. *Applied Microbiology and Biotechnology* **25( 5)** 442-448. février 1987.
- Ferchichi, M., Hemme, D., Nardi, M. et Pamboukdjian, N. (1985).** Production of Methanethiol from Methionine by *Brevibacterium linens* CNRZ 918. *Journal of general microbiology* **131**, 715-723. April 1, 1985.
- Ferchichi, M., Hemme, D. et Bouillanne, C. (1986a).** Influence of Oxygen and pH on Methanethiol Production from L-Methionine by *Brevibacterium linens* CNRZ 918. *Applied and environmental microbiology* **51**, 725-729. April 1, 1986.
- Ferchichi, M., Hemme, D. et Nardi, M. (1986b).** Induction of methanethiol production by *Brevibacterium linens* CNRZ 918. *Journal of General Microbiology* **132**, 3075-3082. November 1, 1986.
- Ferchichi, M., Hemme, D. et Nardi, M. (1987).** Na<sup>+</sup>-stimulated transport of L-methionine in *Brevibacterium linens* CNRZ 918. *Applied and environmental microbiology* **53**, 2159-2164. September 1, 1987.
- Fernandez, M., Kleerebezem, M., Kuipers, O. P., Siezen, R. J. et van Kranenburg, R. (2002).** Regulation of the *metC-cysK* Operon, involved in sulfur metabolism in *Lactococcus lactis*. *Journal of bacteriology* **184**, 82-90. January 1, 2002.

**Finn, R. D., Mistry, J., Schuster-Bockler, B., Griffiths-Jones, S., Hollich, V., Lassmann, T., Moxon, S., Marshall, M., Khanna, A., Durbin, R., Eddy, S. R., Sonnhammer, E. L. L. et Bateman, A. (2006).** Pfam: clans, web tools and services. *Nucleic acids research*, D247 - D251.

**Fogolino, M., Borne, F., Bally, M., Ball, G. et Patte, J. C. (1995).** A direct sulfhydrylation pathway is used for methionine biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **141**, 431-439. February 1, 1995.

**Forquin, M. P., Duvergey, H., Proux, C., Loux, V., Mounier, J., Landaud, S., Coppee, J. Y., Gibrat, J. F., Bonnarme, P., Martin-Verstraete, I. et Vallaeys, T. (2009).** Identification of *Brevibacteriaceae* by Multilocus Sequence Typing and Comparative Genomic Hybridization Analyses. *Applied and Environmental Microbiology* **75**, 6406-6409. October 1, 2009.

**Fox, P. F., McSweeney, P. L. H., Wallace, J. et Guinee, T. P. (2004).** *Cheese : Chemistry, Physics and microbiology General Aspect*. Elsevier Academic Press, Amsterdam, pp. 617.

**Franke, S., Grass, G., Rensing, C. et Nies, D. H. (2003).** Molecular Analysis of the Copper-Transporting Efflux System CusCFBA of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* **185**, 3804-3812. July 1, 2003.

**Furfine, E. S. et Abeles, R. H. (1988).** Intermediates in the conversion of 5'-S-methylthioadenosine to methionine in *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Biological Chemistry* **263**, 9598-9606. July 15, 1988.

**Gagnon, Y., Breton, R., Putzer, H., Pelchat, M., Grunberg-Manago, M. et Lapointe, J. (1994).** Clustering and co-transcription of the *Bacillus subtilis* genes encoding the aminoacyl-tRNA synthetases specific for glutamate and for cysteine and the first enzyme for cysteine biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 7473-7482. March 11, 1994.

**Gal, J., Szvetnik, A., Schnell, R. et Kalman, M. (2002).** The metD D-methionine transporter locus of *Escherichia coli* is an ABC transporter gene cluster. *Journal of bacteriology* **184**, 4930-4932. September 1, 2002.

**Gaucheron, F. (2000).** Iron fortification in dairy industry. *Trends in Food Science & Technology* **11**, 403-409.

**Gavrish, E., Krauzova, V. I., Potekhina, N. V., Karasev, S. G., Plotnikova, E. G., Altyntseva, O. V., Korosteleva, L. A. et Evtushenko, L. I. (2004).** Three new species of *brevibacteria* : *Brevibacterium antiquum* sp. nov., *Brevibacterium aurantiacum* sp. nov. and *Brevibacterium permense* sp. nov. *Mikrobiologiya* **73(2)**, 218-25. 2004 Mar-Apr.

**Gente, S., La Carbona, S. et Guéguen, M. (2007).** Levels of cystathionine gamma-lyase production by *Geotrichum candidum* in synthetic media and correlation with the presence of sulphur flavours in cheese. *International Journal of Food Microbiology* **114**, 136-142.

**Giovanelli, J. (1987).** Sulfur amino acids in plants : an overview. *Methods in enzymology*, 419-426.

**Goerges, S., Mounier, J., Rea, M. C., Gelsomino, R., Heise, V., Beduhn, R., Cogan, T. M., Vancanneyt, M. et Scherer, S. (2008).** Commercial ripening starter microorganisms inoculated into cheese milk do not successfully establish themselves in the resident microbial ripening consortia of a South German red smear cheese. *Applied and environmental microbiology* **74**, 2210-2217. April 1, 2008.

**Golic, N., Schliekelmann, M., Fernandez, M., Kleerebezem, M. et Van Kranenburg, R. (2005).** Molecular characterization of the CmbR activator-binding site in the *metC-cysK* promoter region in *Lactococcus lactis*. *Microbiology* **151**, 439-446. February 1, 2005.

**González-Siso, M. I., Freire-Picos, M. A., Ramil, E., González-Domínguez, M., Rodríguez Torres, A. et Cerdán, M. E. (2000).** Respirofermentative metabolism in *Kluyveromyces lactis*: : Insights and perspectives. *Enzyme and Microbial Technology* **26**, 699-705.

**Gori, K., Mortensen, H. D., Arneborg, N. et Jespersen, L. (2007).** Ammonia production and its possible role as a mediator of communication for *Debaryomyces hansenii* and other cheese-relevant yeast species. *Journal of dairy science* **90**, 5032-5041. November 1, 2007.

**Greene, R. C. (1996).** Biosynthesis of Methionine. In *Escherichia coli and Salmonella, cellular and molecular biology*. F. C. Neidhardt, Washinton DC, pp. 542 - 560.

**Grundy, F. J. et Henkin, T. M. (1998).** The S box regulon: a new global transcription termination control system for methionine and cysteine biosynthesis genes in gram-positive bacteria. *Molecular Microbiology* **30**, 737 - 749.

**Guerzoni, M. E., Lanciotti, R., Vannini, L., Galgano, F., Favati, F., Gardini, F. et Suzzi, G. (2001).** Variability of the lipolytic activity in *Yarrowia lipolytica* and its dependence on environmental conditions. *International Journal of Food Microbiology* **69**, 79-89.

**Guillouard, I., Auger, S., Hullo, M. F., Chetouani, F., Danchin, A. et Martin-Verstraete, I. (2002).** Identification of *Bacillus subtilis* CysL, a regulator of the *cysJI* operon, which encodes sulfite reductase. *Journal of bacteriology* **184**, 4681-4689. September 1, 2002.

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

**Guyomarc'h, F., Binet, A. et Dufossé, L. (2000).** Production of carotenoids by *Brevibacterium linens* : variation among strains, kinetic aspects and HPLC profiles *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **24**, 64-70. 2000, january.

**Haitani, Y., Awano, N., Yamazaki, M., Wada, M., Nakamori, S. et Takagi, H. (2006).** Functional analysis of l-serine O-acetyltransferase from *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiology Letters* **255**, 156-163.

**Herve-Jimenez, L., Guillouard, I., Guedon, E., Gautier, C., Boudebouze, S., Hols, P., Monnet, V., Rul, F. et Maguin, E. (2008).** Physiology of *Streptococcus thermophilus* during the late stage of milk fermentation with special regard to sulfur amino-acid metabolism. *Proteomics* **8**, 4273-4286.

Herve-Jimenez, L., Guillouard, I., Guedon, E., Boudebouze, S., Hols, P., Monnet, V., Maguin, E. et Rul, F. (2009). Postgenomic analysis of *Streptococcus thermophilus* cocultivated in milk with *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*: Involvement of nitrogen, purine, and iron metabolism. *Applied and environmental microbiology* **75**, 2062-2073. April 1, 2009.

Hogan, D. A., Vik, A. et Kolter, R. (2004). A *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule influences *Candida albicans* morphology. *Molecular Microbiology* **54**, 1212-1223.

Holzappel, W. H., Geisen, R. et 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. S., Jaeger, B., Bockelmann, W., Noordman, W. H., Geis, A. et Heller, K. J. (2004). Molecular identification and differentiation of *Staphylococcus* Species and strains of cheese origin. *Systematic and Applied Microbiology* **27**, 211-218.

Hornby, J. M., Jensen, E. C., Lisec, A. D., Tasto, J. J., Jahnke, B., Shoemaker, R., Dussault, P. et Nickerson, K. W. (2001). Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by Farnesol. *Applied and environmental microbiology* **67**, 2982-2992. July 1, 2001.

Hryniewicz, M., Sirko, A., Palucha, A., Bock, A. et Hulanicka, D. (1990). Sulfate and thiosulfate transport in *Escherichia coli* K-12: identification of a gene encoding a novel protein involved in thiosulfate binding. *Journal of bacteriology* **172**, 3358-3366. June 1, 1990.

Hulanicka, M. D., Hallquist, S. G., Kredich, N. M. et Mojica-A, T. (1979). Regulation of O-acetylserine sulfhydrylase B by L-cysteine in *Salmonella typhimurium*. *Journal of bacteriology* **140**, 141-146. October 1, 1979.

Hullo, M.-F., Auger, S., Dassa, E., Danchin, A. et Martin-Verstraete, I. (2004). The *metNPQ* operon of *Bacillus subtilis* encodes an ABC permease transporting methionine sulfoxide, D- and L-methionine. *Research in microbiology* **155**, 80-86.

Hullo, M. F., Auger, S., Soutourina, O., Barzu, O., Yvon, M., Danchin, A. et Martin-Verstraete, I. (2007). Conversion of methionine to cysteine in *Bacillus subtilis* and its regulation. *Journal of bacteriology* **189**, 187-197. January 1, 2007.

Hung, J., Cooper, D., Turner, M. S., Walsh, T. P. et Giffard, P. M. (2003). Cystine uptake prevents production of hydrogen peroxide by *Lactobacillus fermentum* BR11. *FEMS Microbiology Letters* **227**, 93-99.

Hwang, B.-J., Yeom, H.-J., Kim, Y. et Lee, H.-S. (2002). *Corynebacterium glutamicum* utilizes both transsulfuration and direct sulfhydrylation pathways for methionine biosynthesis. *Journal of bacteriology* **184**, 1277-1286. March 1, 2002.

Hwang, B. J., Park, S. D., Kim, Y., Kim, P. et Lee, H. S. (2007). Biochemical analysis on the parallel pathways of methionine biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of microbiology and biotechnology* **17**, 1010-1017. June 2007.

**Imlay, J. A. (2003).** Pathways of oxidative Damage. *Annual Review of Microbiology* **57**, 395-418.

**Inoue, H., Inagaki, K., Eriguchi, S. I., Tamura, T., Esaki, N., Soda, K. et Tanaka, H. (1997).** Molecular characterization of the *mde* operon involved in L-methionine catabolism of *Pseudomonas putida*. *Journal of bacteriology* **179**, 3956-3962. June 1, 1997.

**Inoue, H., Inagaki, K., Adachi, N., Tamura, T., Esaki, N., Soda, K. et Tanaka, H. (2000).** Role of Tyrosine 114 of L-Methionine  $\gamma$ -lyase from *Pseudomonas putida* *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **64**, 2336-2343.

**Inoue, H., Nishito, A., Eriguchi, S. I., Tamura, T., Inagaki, K. et Tanaka, H. (2003).** Purification and substrate characterization of alpha-ketobutyrate decarboxylase from *Pseudomonas putida*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **23**, 265-271.

**Irlinger, F., Morvan, A., Solh, N. E. et Bergere, J. L. (1997).** Taxonomic characterization of coagulase-negative staphylococci in ripening flora from traditional French cheeses. *Systematic and applied microbiology* **20**, 319-328

**Irlinger, F., Bimet, F., Delettre, J., Lefevre, M. et Grimont, P. A. D. (2005).** *Arthrobacter bergerei* sp. nov. and *Arthrobacter arilaitensis* sp. nov., novel coryneform species isolated from the surfaces of cheeses. *International Journal of Food Microbiology* **55**, 457-462. January 1, 2005.

**Irlinger, F. (2008).** Safety assessment of dairy microorganisms: Coagulase-negative staphylococci. *International Journal of Food Microbiology* **126**, 302-310.

**Irmeler, S., Schäfer, H., Beisert, B., Rauhut, D. et Berthoud, H. (2009).** Identification and characterization of a strain-dependent cystathionine Beta/Gamma-lyase in *Lactobacillus casei* potentially involved in cysteine biosynthesis. *FEMS Microbiology Letters* **295**, 67-76.

**Jacobson, E. S. et Metzenberg, R. L. (1977).** Control of Arylsulfatase in a Serine Auxotroph of *Neurospora*. *Journal of bacteriology* **130**, 1397-1398. June 1, 1977.

**Jones, D., Watkins, J. et Erickson, S. K. (1973).** Taxonomically Significant Colour Changes in *Brevibacterium linens* Probably Associated with a Carotenoid-like Pigment. *Journal of general microbiology* **77**, 145-150. July 1, 1973.

**Juillard, V., Le Bars, D., Kunji, E. R., Konings, W. N., Gripon, J. C. et Richard, J. (1995).** Oligopeptides are the main source of nitrogen for *Lactococcus lactis* during growth in milk. *Applied and environmental microbiology* **61**, 3024-3030. August 1, 1995.

**Juillard, V., Foucaud, C., Desmazeaud, M. et Richard, J. (1996).** Utilization of nitrogen sources during growth of *Lactococcus lactis* in milk. *Le Lait* **76**, 13-24.

**Kadner, R. J. et Watson, W. J. (1974).** Methionine transport in *Escherichia coli*: physiological and genetic evidence for two uptake systems. *Journal of bacteriology* **119**, 401-409. August 1, 1974.

- Kadner, R. J. (1975).** Regulation of methionine transport activity in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* **122**, 110-119. April 1, 1975.
- Kato, F., Eguchi, Y., Nakano, M., Oshima, T. et Murata, A. (1991).** Purification and characterization of Linecin-A, a bacteriocin of *Brevibacterium linens*. *Agricultural and Biological Chemistry* **55**, 161-166.
- Kertesz, M. A. (2001).** Bacterial transporters for sulfate and organosulfur compounds. *Research in Microbiology* **152**, 279-290. 2001.
- Kiers, J., Zeeman, A. M., Luttkik, M., Thiele, C., Castrillo, J. I., Steensma, H. Y., Van Dijken, J. P. et Pronk, J. T. (1998).** Regulation of alcoholic fermentation in batch and chemostat cultures of *Kluyveromyces lactis* CBS 2359. *Yeast* **14**, 459-469.
- Kim, J. W., Kim, H. J., Kim, Y., Lee, M. S. et Lee, H. S. (2001).** Properties of the *Corynebacterium glutamicum metC* gene encoding cystathionine beta-lyase. *Molecules and cells* **11**, 220-225. 2001 Apr 30.
- Kleerebezem, M. (2004).** Quorum sensing control of lantibiotic production; nisin and subtilin autoregulate their own biosynthesis. *Peptides* **25**, 1405-1414.
- Koch, D. J., Ruckert, C., Albersmeier, A., Huser, A. T., Tauch, A., Puhler, A. et Kalinowski, J. (2005a).** The transcriptional regulator SsuR activates in the absence of sulphate the *Corynebacterium glutamicum ssu* and *seu* genes responsible for sulphonate utilization. *Molecular Microbiology* **58**, 480 - 494.
- Koch, D. J., Ruckert, C., Rey, D. A., Mix, A., Puhler, A. et Kalinowski, J. (2005b).** Role of the *ssu* and *seu* genes of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 in the utilization of sulfonates and sulfonate esters as sulfur sources. *Applied and environmental microbiology* **71**, 6104 - 6114.
- Kovaleva, G. Y. et Gelfand, M. S. (2007).** Transcriptional regulation of the methionine and cysteine transport and metabolism in *streptococci*. *FEMS Microbiology Letters* **276**, 207-215.
- Kredich, N. M. (1996).** *Biosynthesis of Cysteine*. In *Escherichia coli and salmonella, cellular and molecular biology*. F.C Neighardt, pp. 514 - 527.
- Kreis, W. et Hession, C. (1973).** Isolation and purification of L-methionine-alpha-deamino-gamma-mercaptomethane-Lyase (L-Methioninase) from *Clostridium sporogenes*. *Cancer Research* **33**, 1862-1865. August 1, 1973.
- Kromer, J. O., Bolten, C. J., Heinzle, E., Schroder, H. et Wittmann, C. (2008).** Physiological response of *Corynebacterium glutamicum* to oxidative stress induced by deletion of the transcriptional repressor McbR. *Microbiology* **154**, 3917-3930. December 1, 2008.
- Krubasik, P. et Sandmann, G. (2000).** A carotenogenic gene cluster from *Brevibacterium linens* with novel lycopene cyclase genes involved in the synthesis of aromatic carotenoids. *Molecular & general genetics : MGG* **263**, 423-432. 2000 April.

- Kruger, W. D. et Cox, D. R. (1994).** A yeast system for expression of human cystathionine beta-synthase: structural and functional conservation of the human and yeast genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 6614-6618. July 5, 1994.
- Lambrechts, C., Escudero, J. et Galzy, P. (1995).** Purification and properties of three esterases from *Brevibacterium sp. R312*. *Journal of Applied Microbiology* **78**, 180-188.
- Lambrechts, C. et Galzy, P. (1995).** Esterase activities of *Brevibacterium sp. R312* and *Brevibacterium linens* 62 *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **59**, 1464-1471.
- Landaud, S., Helinck, S. et Bonnarme, P. (2008).** Formation of volatile sulfur compounds and metabolism of methionine and other sulfur compounds in fermented food. *Applied Microbiology and Biotechnology* **77( 6)**, 1191-1205. janvier 2008.
- Lange, M., Champagne, C. P. et Goulet, J. (1994).** Contribution of *Lactococcus lactis ssp lactis* biovar *diacetylactis* to the browning of Brie and Camembert-type cheeses. *Le Lait* **74**, 187-195.
- Laudenbach, D. E. et Grossman, A. R. (1991).** Characterization and mutagenesis of sulfur-regulated genes in a *cyanobacterium*: evidence for function in sulfate transport. *Journal of bacteriology* **173**, 2739-2750. May 1, 1991.
- Leclercq-Perlat, M. N., Corrieu, G. et Spinnler, H. E. (2004).** The color of *Brevibacterium linens* depends on the yeast used for cheese deacidification. *Journal of dairy science* **87**, 1536-1544. May 1, 2004.
- Lee, S. M., Hwang, B. J., Kim, Y. et Lee, H. S. (2009).** The *cmaR* gene of *Corynebacterium ammoniagenes* performs a novel regulatory role in the metabolism of sulfur-containing amino acids. *Microbiology* **155**, 1878-1889. June 1, 2009.
- Lindblow-Kull, C., Kull, F. J. et Shrift, A. (1985).** Single transporter for sulfate, selenate, and selenite in *Escherichia coli* K-12. *Journal of bacteriology* **163**, 1267-1269. September 1, 1985.
- Lockwood, B. C. et Coombs, G. H. (1991).** Purification and characterization of methionine gamma-lyase from *Trichomonas vaginalis*. *The Biochemical journal* **279**, 675-682.
- Ludwig, M. L. et Matthews, R. G. (1997).** Structure-based perspectives on B12 dependent enzymes. *Annual review of biochemistry* **66**, 269-313.
- Madalinski, G., Godat, E., Alves, S., Lesage, D., Genin, E., Levi, P., Labarre, J., Tabet, J. C., Ezan, E. et Junot, C. (2008).** Direct Introduction of Biological Samples into a LTQ-Orbitrap Hybrid Mass Spectrometer as a Tool for Fast Metabolome Analysis. *Analytical Chemistry* **80**, 3291-3303.
- Maisnier-Patin, S. et Richard, J. (1995).** Activity and purification of linenscin OC2, an antibacterial substance produced by *Brevibacterium linens* OC2, an orange cheese coryneform bacterium. *Applied and environmental microbiology* **61**, 1847-1852. May 1, 1995.

**Maligoy, M., Mercade, M., Cocaign-Bousquet, M. et Loubiere, P. (2008).** Transcriptome analysis of *Lactococcus lactis* in coculture with *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and environmental microbiology* **74**, 485-494. January 15, 2008.

**Mamaeva, D. V., Morozova, E. A., Nikulin, A., D., Revtovich, S. V., S.V., N., Garber, M. B. et Demidkina, T. V. (2005).** Structure of *Citrobacter freundii* L-methionine gamma-lyase. *Acta crystallographica. Section F, Structural biology and crystallization communications* **61**, 546-549.

**Mansilla, M. C. et De Mendoza, D. (2000).** The *Bacillus subtilis* *cysP* gene encodes a novel sulphate permease related to the inorganic phosphate transporter (Pit) family. *Microbiology* **146**, 815-821. April 1, 2000.

**Mansilla, M. C., Albanesi, D. et de Mendoza, D. (2000).** Transcriptional Control of the Sulfur-Regulated *cysH* Operon, Containing Genes Involved in L-Cysteine Biosynthesis in *Bacillus subtilis*. *Journal of bacteriology* **182**, 5885-5892. October 15, 2000.

**Mansour, S., Beckerich, J. M. et Bonnarme, P. (2008).** Lactate and amino acid catabolism in the cheese-ripening yeast *Yarrowia lipolytica*. *Applied and Environmental Microbiology* **74**, 6505-6512. November 1, 2008.

**Mansour, S. (2009).** Etude de la levure *Yarrowia lipolytica* dans un écosystème fromager par une approche transcriptomique. AgroParisTech, Paris. 216 p.

**Mansour, S., Bailly, J., Landaud, S., Monnet, C., Sarthou, A. S., Cocaign-Bousquet, M., Leroy, S., Irlinger, F. et Bonnarme, P. (2009).** Investigation of associations of *Yarrowia lipolytica*, *Staphylococcus xylosus*, and *Lactococcus lactis* in culture as a first step in microbial Interaction Analysis. *Applied and environmental microbiology* **75**, 6422-6430. October 15, 2009.

**Manukhov, I. V., Mamaeva, D. V., Rastorguev, S. M., Faleev, N. G., Morozova, E. A., Demidkina, T. V. et Zavilgelsky, G. B. (2005).** A Gene encoding L-Methionine gamma-Lyase is present in *Enterobacteriaceae* family genomes: identification and characterization of *Citrobacter freundii* L-Methionine gamma-Lyase. *Journal of bacteriology* **187**, 3889-3893. June 1, 2005.

**Manukhov, I. V., Mamaeva, D. V., Morozova, E. A., Rastorguev, S. M., Faleev, N. G., Demidkina, T. V. et B., Z. G. (2006).** L-methionine gamma-lyase from *Citrobacter freundii*: cloning of the gene and kinetic parameters of the enzyme. *Biochemistry Mosc.* **71**, 361-369. April 2006.

**Martin, N., Savonitto, S., Molimard, P., Berger, C., Brousse, M. et Spinnler, H. E. (1999).** Flavor generation in cheese curd by coculturing with selected yeast, mold, and bacteria. *Journal of dairy science* **82**, 1072-1080. June 1, 1999.

**Martin, N., Berger, C., Le Du, C. et Spinnler, H. E. (2001).** Aroma compound production in cheese curd by coculturing with selected yeast and bacteria. *Journal of dairy science* **84**, 2125-2135. October 1, 2001.

- Masoud, W. et Jakobsen, M. (2003).** Surface ripened cheeses: the effects of *Debaryomyces hansenii*, NaCl and pH on the intensity of pigmentation produced by *Brevibacterium linens* and *Corynebacterium flavescens*. *International Dairy Journal* **13**, 231-237.
- McAuliffe, O., Ross, P. R. et Hill, C. (2001).** Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiology Reviews* **25**, 285-308.
- Mehta, P. K. et Christen, P. (2000).** The molecular evolution of pyridoxal-5'-phosphate-dependent enzymes. *Advances in enzymology and related areas of molecular biology* **74**, 129-184. 2000.
- Meier, M., Janosik, M., Kery, V., Kraus, J. P. et Burkhard, P. (2001).** Structure of human cystathionine beta-synthase: a unique pyridoxal 5'-phosphate-dependent heme protein. *The EMBO journal* **20**, 3910-3916.
- Merlin, C., Gardiner, G., Durand, S. et Masters, M. (2002).** The *Escherichia coli* *metD* Locus encodes an ABC transporter which includes Abc (MetN), YaeE (MetI), and YaeC (MetQ). *Journal of bacteriology* **184**, 5513-5517. October 1, 2002.
- Mino, K., Yamanoue, T., Sakiyama, T., Eisaki, N., Matsuyama, A. et Nakanishi, K. (1999).** Purification and Characterization of Serine Acetyltransferase from *Escherichia coli* Partially Truncated at the C-Terminal Region. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **63**, 168-179. jan 1999.
- Monnet, C., Irlinger, F., Spinnler, H. E., Loux, V., Gibrat, J. F., Barbe, V., Vacherie, B., Gavory, F., Siguier, P., Simonnot, E., Chandler, M., Elleuch, R. et Vallaey, T. (2010).** Séquençage du génome d'*Arthrobacter arilaitensis*, une espèce appartenant à la flore de surface de nombreux fromages. *JIM 2010*, Poitiers
- Morales, P., Fernández-García, E. et Nuñez, M. (2003).** Caseinolysis in cheese by *Enterobacteriaceae* strains of dairy origin. *Letters in Applied Microbiology* **37**, 410-414.
- Moreau, A., Fillon, M., Truong-Meyer, X. M., Pingaud, H. et Strehalaiano, P. (1998).** Study of lactic acid and amino acid catabolism of *Brevibacterium linens*. *Microbiologie, aliments, nutrition* **16**, 251-258.
- Motoshima, H., Inagaki, K., Kumasaka, T., Furuichi, M., Inoue, H., Tamura, T., Esaki, N., Soda, K., Tanaka, N., Yamamoto, M. et Tanaka, H. (2000).** Crystal structure of the pyridoxal 5'-phosphate dependent L-methionine gamma-lyase from *Pseudomonas putida*. *Journal of biochemistry* **128**, 349-354.
- Motta, A. S. et Brandelli, A. (2002).** Characterization of an antibacterial peptide produced by *Brevibacterium linens*. *Journal of Applied Microbiology* **92**, 63-70.
- Mounier, J., Gelsomino, R., Goerges, S., Vancanneyt, M., Vandemeulebroecke, K., Hoste, B., Scherer, S., Swings, J., Fitzgerald, G. F. et Cogan, T. M. (2005).** Surface microflora of four smear-ripened cheeses. *Applied and environmental microbiology* **71**, 6489-6500. November 1, 2005.

**Mounier, J., Goerges, S., Gelsomino, R., Vancanneyt, M., Vandemeulebroecke, K., Hoste, B., Brennan, N. M., Scherer, S., Swings, J., Fitzgerald, G. F. et Cogan, T. M. (2006).** Sources of the adventitious microflora of a smear-ripened cheese. *Journal of Applied Microbiology* **101**, 668-681.

**Mounier, J., Rea, M. C., O'Connor, P. M., Fitzgerald, G. F. et Cogan, T. M. (2007).** Growth characteristics of *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Microbacterium*, and *Staphylococcus spp.* isolated from surface-ripened cheese. *Applied and environmental microbiology* **73**, 7732-7739. December 1, 2007.

**Mounier, J., Monnet, C., Vallaeyts, T., Sarthou, A. S., Helias, A. et Irlinger, F. (2008).** Microbial interactions within a cheese microbial community. *Applied and environmental microbiology* **74**, 172-181. January 1, 2008.

**Mounier, J., Monnet, C., Jacques, N., Antoinette, A. et Irlinger, F. (2009).** Assessment of the microbial diversity at the surface of Livarot cheese using culture-dependent and independent approaches. *International Journal of Food Microbiology* **133**, 31-37.

**Murphy, B., Grundy, F. et Henkin, T. (2002).** Prediction of gene function in methylthioadenosine recycling from regulatory signals. *Journal of bacteriology* **184**, 2314-2318. April 15, 2002.

**Nagasawa, T., Kanzaki, H. et Yamada, H. (1984).** Cystathionine gamma-lyase of *Streptomyces phaeochromogenes*. The occurrence of cystathionine gamma-lyase in filamentous bacteria and its purification and characterization. *Journal of Biological Chemistry* **259**, 10393-10403. August 25, 1984.

**Nakamori, S., Kobayashi, S., Kobayashi, C. et Takagi, H. (1998).** Overproduction of L-cysteine and L-cystine by *Escherichia coli* strains with a genetically altered serine acetyltransferase. *Applied and environmental microbiology* **64**, 1607-1611. May 1, 1998.

**Nakamura, T., Iwahashi, H. et Eguchi, Y. (1984).** Enzymatic proof for the identity of the S-sulfocysteine synthase and cysteine synthase B of *Salmonella typhimurium*. *Journal of bacteriology* **158**, 1122-1127. June 1, 1984.

**Nealson, K. H. et Hasting, J. W. (1979).** Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance.nih.gov [PDF]. *Microbiological reviews* **43**, 496-518.

**Newton, G. L., Arnold, K., Price, M. S., Sherrill, C., Delcardayre, S. B., Aharonowitz, Y., Cohen, G., Davies, J., Fahey, R. C. et Davis, C. (1996).** Distribution of thiols in microorganisms: mycothiol is a major thiol in most *actinomyces*. *Journal of bacteriology* **178**, 1990-1995. April 1, 1996.

**Newton, G. L., Unson, M. D., Anderberg, S. J., Aguilera, J. A., Oh, N. N., delCardayre, S. B., Av-Gay, Y. et Fahey, R. C. (1999).** Characterization of *Mycobacterium smegmatis* mutants defective in 1-myo-Inosityl-2-amino-2-deoxy-[alpha]-glucopyranoside and mycothiol biosynthesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **255**, 239-244.

- Newton, G. L., Av-gay, Y. et Fahey, R. C. (2000).** N-Acetyl-1-D-myo-Inosityl-2-Amino-2-Deoxy-alpha -D-Glucopyranoside deacetylase (MshB) Is a key enzyme in mycothiol biosynthesis. *Journal of bacteriology* **182**, 6958-6963. December 15, 2000.
- Newton, G. L., Koledin, T., Gorovitz, B., Rawat, M., Fahey, R. C. et Av-Gay, Y. (2003).** The glycosyltransferase gene encoding the enzyme catalyzing the first step of mycothiol biosynthesis (mshA). *Journal of bacteriology* **185**, 3476-3479. June 1, 2003.
- Nickerson, K. W., Atkin, A. L. et Hornby, J. M. (2006).** Quorum Sensing in Dimorphic Fungi: Farnesol and Beyond. *Applied and environmental microbiology* **72**, 3805-3813. June 1, 2006.
- Nishida, H., Ohnishi, Y., Beppu, T. et Horinouchi, S. (2007).** Evolution of gamma-butyrolactone synthases and receptors in *Streptomyces*. *Environmental Microbiology* **9**, 1986-1994.
- Noordman, W. H., Reissbrodt, R., Bongers, R. S., Rademaker, J. L. W., Bockelmann, W. et Smit, G. (2006).** Growth stimulation of *Brevibacterium sp.* by siderophores. *Journal of Applied Microbiology* **101**, 637-646.
- Nouaille, S., Even, S., Charlier, C., Le Loir, Y., Ccaign-Bousquet, M. et Loubiere, P. (2009).** Transcriptomic response of *Lactococcus lactis* in mixed culture with *Staphylococcus aureus*. *Applied and environmental microbiology* **75**, 4473-4482. July 1, 2009.
- Oh, D. H. et 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., Kijima, K., Inoue, T., Miyoshi, S., Matsuda, A. et Shinoda, S. (1994).** Purification and properties of *Saccharomyces cerevisiae* cystathionine beta-synthase. *Yeast* **10**, 333-339. Mars.
- Palková, Z., Váchová, L. et Kwang, W. J. (2003).** Ammonia signaling in yeast colony formation. In *International Review of Cytology*. (ed.). Academic Press, pp. 229-272.
- Palková, Z. et Váchová, L. (2006).** Life within a community: benefit to yeast long-term survival. *FEMS Microbiology Reviews* **30**, 806-824.
- Pardee, A. B. (1966).** Purification and Properties of a Sulfate-binding Protein from *Salmonella typhimurium*. *Journal of Biological Chemistry* **241**, 5886-5892. December 25, 1966.
- Park, S. M., Lu, C. D. et Abdelal, A. T. (1997).** Cloning and characterization of argR, a gene that participates in regulation of arginine biosynthesis and catabolism in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of bacteriology* **179**, 5300-5308. September 1, 1997.
- Patek, M., Nesvera, J., Guyonvarch, A., Reyes, O. et Leblon, G. (2003).** Promoters of *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of biotechnology* **104**, 311 - 323.

- Pei, D. et Zhu, J. (2004).** Mechanism of action of S-ribosylhomocysteinase (LuxS). *Current Opinion in Chemical Biology* **8**, 492-497.
- Perpète, P., Duthoit, O., De Maeyer, S., Imray, L., Lawton, A. I., Stavropoulos, K. E., Gitonga, V. W., Hewlins, M. J. E. et Dickinson, J. R. (2006).** Methionine catabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research* **6**, 48-56.
- Pittman, M. S., Corker, H., Wu, G., Binet, M. B., Moir, A. J. G. et Poole, R. K. (2002).** Cysteine is exported from the *Escherichia coli* cytoplasm by CydDC, an ATP-binding cassette-type transporter required for cytochrome assembly. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 49841-49849. December 20, 2002.
- Poland, J. et Ayling, P. D. (1984).** Methionine and glutamine transport systems in D-methionine utilising revertants of *Salmonella typhimurium*. *Molecular & general genetics : MGG* **194**, 219-226. 1984.
- Pons, N., Batto, J. M., Ehrlich, S. D. et Renault, P. (2008).** Development of software facilities to characterize regulatory binding motifs and application to *streptococcaceae*. *Journal of molecular microbiology and biotechnology* **14**, 67-73. 2008.
- Prescott, L. M., Harley, J. P. et Klein, D. A. (2003).** *Microbiologie*, pp. 1137.
- Quadroni, M., Staudenmann, W., Kertesz, M. A. et James, P. (1996).** Analysis of global responses by protein and peptide fingerprinting of proteins isolated by two-dimensional gel electrophoresis. Application to the sulfate-starvation response of *Escherichia coli*. *European Journal of Biochemistry* **239**, 773-781.
- Ramakrishnan, T. et Adelberg, E. A. (1965).** Regulatory Mechanisms in the Biosynthesis of Isoleucine and Valine II. Identification of Two Operator Genes. *Journal of bacteriology* **89**, 654-660. March 1, 1965.
- Ratray, F. P., Bockelmann, W. et Fox, P. F. (1995).** Purification and Characterization of an Extracellular Proteinase from *Brevibacterium linens* ATCC 9174. *Applied and environmental microbiology* **61**, 3454-3456. September 1, 1995.
- Ratray, F. P. et Fox, P. F. (1997a).** Purification and characterisation of an intracellular aminopeptidase from *Brevibacterium linens* ATCC 9174. *Le Lait* **77**, 169. 180.
- Ratray, F. P. et Fox, P. F. (1997b).** Purification and characterization of an intracellular esterase from *Brevibacterium linens* ATCC 9174. *International Dairy Journal* **7**, 273-278.
- Ratray, F. P. et 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. May 1, 1999.
- Rawat, M., Newton, G. L., Ko, M., Martinez, G. J., Fahey, R. C. et Av-Gay, Y. (2002).** Mycothiol-deficient *Mycobacterium smegmatis* mutants are hypersensitive to alkylating agents, free radicals, and antibiotics. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **46**, 3348-3355. November 1, 2002.

- Rea, M. C., Gorges, S., Gelsomino, R., Brennan, N. M., Mounier, J., Vancanneyt, M., Scherer, S., Swings, J. et Cogan, T. M. (2007).** Stability of the biodiversity of the surface consortia of Gubbeen, a red-smear cheese. *Journal of dairy science* **90**, 2200-2210. May 1, 2007.
- Rébeillé, F., Jabrin, S., Bligny, R., Loizeau, K., Gambonnet, B., Van Wilder, V., Douce, R. et Ravanel, S. (2006).** Methionine catabolism in *Arabidopsis* cells is initiated by a gamma-cleavage process and leads to S-methylcysteine and isoleucine syntheses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 15687-15692. October 17, 2006.
- Rey, D. A., Puhler, A. et Kalinowski, J. (2003).** The putative transcriptional repressor McbR, member of the TetR-family, is involved in the regulation of the metabolic network directing the synthesis of sulfur containing amino acids in *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of biotechnology* **103**, 51 - 65.
- Rey, D. A., Nentwich, S. S., Ruckert, C., Koch, D. J., Puhler, A., Tauch, A. et Kalinowski, J. (2005).** The McbR repressor modulated by the effector substance S-adenosylhomocysteine controls directly the transcription of a regulon involved in sulfur metabolism of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. *Molecular Microbiology* **56**, 871 - 887.
- Richard, J. et Gratadoux, J. J. (1984).** Evolution de la flore microbienne à la surface des Camemberts fabriqués avec du lait cru. *Le Lait* **64**, 496-520.
- Rodionov, D. A., Vitreschak, A. G., Mironov, A. A. et Gelfand, M. S. (2004).** Comparative genomics of the methionine metabolism in Gram-positive bacteria: a variety of regulatory systems. *Nucleic acids research* **32**, 3340-3353. June 23, 2004.
- Roostita, R. et Fleet, G. H. (1996).** Growth of yeasts in milk and associated changes to milk composition. *International Journal of Food Microbiology* **31**, 205-219.
- Rossol, I. et Puhler, A. (1992).** The *Corynebacterium glutamicum* aecD gene encodes a C-S lyase with alpha, beta-elimination activity that degrades aminoethylcysteine. *Journal of bacteriology*. **174**, 2968-2977. May 1, 1992.
- Ruckert, C., Puhler, A. et Kalinowski, J. (2003).** Genome-wide analysis of the L-methionine biosynthetic pathway in *Corynebacterium glutamicum* by targeted gene deletion and homologous complementation. *Journal of biotechnology* **104**, 213 - 228.
- Ruckert, C., Koch, D. J., Rey, D. A., Albersmeier, A., Mormann, S., Puhler, A. et Kalinowski, J. (2005).** Functional genomics and expression analysis of the *Corynebacterium glutamicum* *fpr2-cysIXHDNYZ* gene cluster involved in assimilatory sulphate reduction. *BMC Genomics* **6**, 121.
- Ruckert, C., Milse, J., Albersmeier, A., Koch, D. J., Puhler, A. et Kalinowski, J. (2008).** The dual transcriptional regulator CysR in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 controls a subset of genes of the McbR regulon in response to the availability of sulphide acceptor molecules. *BMC Genomics* **9**, 483.

- Ruckert, C. et Kalinowski, J. (2008).** Sulfur Metabolism in *Corynebacterium glutamicum*. *Corynebacteria-Genomics and Molecular Biology*, 217 - 240.
- Sable, S., Letellier, F. et Cottenceau, G. (1997).** An analysis of the volatile flavour compounds in a soft raw goat milk cheese *Biotechnology Letters* **19**, 143-146. février 1997.
- Saier, M. H. J. (2000).** A Functional-Phylogenetic Classification System for Transmembrane Solute Transporters. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**, 354-411. June 1, 2000.
- Sareen, D., Newton, G. L., Fahey, R. C. et Buchmeier, N. A. (2003).** Mycothiol Is essential for growth of *Mycobacterium tuberculosis* Erdman. *Journal of bacteriology* **185**, 6736-6740. November 15, 2003.
- Schaffrath, R. et Breunig, K. D. (2000).** Genetics and Molecular Physiology of the Yeast *Kluyveromyces lactis*. *Fungal Genetics and Biology* **30**, 173-190.
- Schelle, M. W. et Bertozzi, C. R. (2006).** Sulfate Metabolism in *Mycobacteria*. *Chembiochem : a European journal of chemical biology* **7**, 1516-1524.
- Schroeder, H. R., Barnes, C. J., Bohinski, R. C., Mumma, R. O. et Mallette, M. F. (1973).** Biological production of 5-methylthioribose. . *Canadian journal of microbiology* **19**, 1347-1354.
- Seiflein, T. A. et Lawrence, J. G. (2001).** Methionine-to-Cysteine Recycling in *Klebsiella aerogenes*. *Journal of bacteriology* **183**, 336-346. January 1, 2001.
- Seiflein, T. A. et Lawrence, J. G. (2006).** Two Transsulfurylation Pathways in *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of bacteriology* **188**, 5762-5774. August 15, 2006.
- Sekowska, A. et Danchin, A. (1999).** Identification of *yrrU* as the methylthioadenosine nucleosidase gene in *Bacillus subtilis*. *DNA Research* **6**, 255-264. January 1, 1999.
- Sekowska, A., Robin, S., Daudin, J. J., Henaut, A. et Danchin, A. (2001).** Extracting biological information from DNA arrays: an unexpected link between arginine and methionine metabolism in *Bacillus subtilis*. *Genome Biology* **2**, research0019.1 - research0019.12.
- Sekowska, A. et Danchin, A. (2002).** The methionine salvage pathway in *Bacillus subtilis*. *BMC Microbiology* **2**, 8.
- Sekowska, A., Denervaud, V., Ashida, H., Michoud, K., Haas, D., Yokota, A. et Danchin, A. (2004).** Bacterial variations on the methionine salvage pathway. *BMC Microbiology* **4**, 9.
- Sheetal, R., DeVizio, D., Odell, M., Clements, M., Vanhulle, S. et Keshavarz, T. (2009).** Microbial quorum sensing: a tool or a target for antimicrobial therapy? *Biotechnology and Applied Biochemistry* **54**, 65-84. Jul 14, 2009.
- Shelver, D., Rajagopal, L., Harris, T. O. et Rubens, C. E. (2003).** MtaR, a regulator of methionine transport, is critical for survival of group B *Streptococcus in vivo*. *Journal of bacteriology* **185**, 6592-6599. November 15, 2003.

- Sieuwerts, S., de Bok, F. A. M., Hugenholtz, J. et van Hylckama Vlieg, J. E. T. (2008).** Unraveling Microbial Interactions in Food Fermentations: from Classical to Genomics Approaches. *Applied and environmental microbiology* **74**, 4997-5007. August 15, 2008.
- Sirko, A. E., Zatyka, M. et Hulanicka, M. D. (1987).** Identification of the *Escherichia coli* *cysM* Gene Encoding O-Acetylserine Sulphydrylase B by Cloning with Mini-Mu-lac Containing a Plasmid Replicon. *Journal of general microbiology* **133**, 2719-2725. October 1, 1987.
- Smacchi, E. et Gobbetti, M. (1998).** Purification and characterization of cystathionine gamma-lyase from *Lactobacillus fermentum* DT41. *FEMS Microbiology Letters* **166**, 197-202.
- Smith, C. A., Want, E. J., O'Maille, G., Abagyan, R. et Siuzdak, G. (2006).** XCMS: processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification. *Analytical Chemistry* **78**, 779-787.
- Sourabié, A. M., Spinnler, H. E., Bourdat-Deschamps, M., Landaud, S., Tallon, R. et Bonnarme, P. (2010).** Acyl-CoAs produced by *Brevibacterium* from fatty acids and branched-chain amino acids are the central intermediates in the synthesis of short-chain S-methyl thioesters. *Applied and environmental microbiology*.
- Soutourina, O. et Martin-Verstraete, I. (2007).** Global regulatory network of sulfur metabolism in *Bacillus subtilis*. In *Global regulatory networks in Bacillus subtilis*. Fujita, Y. (ed.). Transworld research network, pp. 111-141.
- Soutourina, O., Poupel, O., Coppée, J. Y., Danchin, D., Msadek, T. et Martin-Verstraete, I. (2009a).** CymR, the master regulator of cysteine metabolism in *Staphylococcus aureus*, controls host sulphur source utilization and plays a role in biofilm formation. *Molecular Microbiology* **73**, 194-211.
- Soutourina, O., Poupel, O., Coppée, J. Y., Danchin, A., Msadek, T. et Martin-Verstraete, I. (2009b).** CymR, the master regulator of cysteine metabolism in *Staphylococcus aureus*, controls host sulphur source utilization and plays a role in biofilm formation. *Molecular Microbiology* **73**, 194-211.
- Sperandio, B., Polard, P., Ehrlich, D. S., Renault, P. et Guedon, E. (2005).** Sulfur amino acid metabolism and its control in *Lactococcus lactis* IL1403. *Journal of bacteriology* **187**, 3762-3778. June 1, 2005.
- Sperandio, B., Gautier, C., McGovern, S., Ehrlich, D. S., Renault, P., Martin-Verstraete, I. et Guedon, E. (2007).** Control of Methionine Synthesis and Uptake by MetR and Homocysteine in *Streptococcus mutans*. *Journal of bacteriology* **189**, 7032-7044. October 1, 2007.
- Spinnler, H. E. et 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. et 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. et Ward-Rainey, N. L. (1997).** Proposal for a New Hierarchic Classification System, *Actinobacteria* classis nov. *International journal of systematic bacteriology* **47**, 479-491. April 1, 1997.

**Stackebrandt, E., Schumann, P., Swiderski, J. et Weiss, N. (1999).** Reclassification of *Brevibacterium incertum* (Breed 1953) as *Desemzia incerta* gen. nov., comb. nov. *International journal of systematic bacteriology* **49**, 185-188. January 1, 1999.

**Stansen, C., Uy, D., Delaunay, S., Eggeling, L., Goergen, J. L. et Wendisch, V. F. (2005).** Characterization of a *Corynebacterium glutamicum* lactate utilization operon induced during temperature-triggered glutamate production. *Applied and environmental microbiology* **71**, 5920-5928. October 1, 2005.

**Stepkowski, T., Brzezinski, K., Legocki, A. B., Jaskólski, M. et Béna, G. (2005).** Bayesian phylogenetic analysis reveals two-domain topology of S-adenosylhomocysteine hydrolase protein sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **34**, 15-28.

**Sun, J., Daniel, R., Wagner-Dobler, I. et Zeng, A. P. (2004).** Is autoinducer-2 a universal signal for interspecies communication: a comparative genomic and phylogenetic analysis of the synthesis and signal transduction pathways. *BMC Evolutionary Biology* **4**, 36.

**Suzzi, G., Lanorte, M. T., Galgano, F., Andrighetto, C., Lombardi, A., Lanciotti, R. et Guerzoni, M. E. (2001).** Proteolytic, lipolytic and molecular characterisation of *Yarrowia lipolytica* isolated from cheese. *International Journal of Food Microbiology* **69**, 69-77.

**Takano, E. L. (2006).** gamma-Butyrolactones: *Streptomyces* signalling molecules regulating antibiotic production and differentiation. *Current Opinion in Microbiology* **9**, 287-294.

**Takata, Y., Yamada, T., Huang, Y., Komoto, J., Gomi, T., Ogawa, H., Fujioka, M. et Takusagawa, F. (2002).** Catalytic Mechanism of S-Adenosylhomocysteine Hydrolase. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 22670-22676. June 21, 2002.

**Tanaka, H., Esaki, N. et Soda, K. (1977).** Properties of L-methionine gamma-lyase from *Pseudomonas ovalis*. *Biochemistry* **16**, 100-106. January.

**Tanaka, H., Esaki, N. et Soda, K. (1985).** A versatile bacterial enzyme: L-methionine gamma-lyase. *Enzyme and Microbial Technology* **7**, 530-537. 1985.

**Tanous, C., Soutourina, O., Raynal, B., Hullo, M. F., Mervelet, P., Gilles, A. M., Noirot, P., Danchin, A., England, P. et Martin-Verstraete, I. (2008).** The CymR regulator in complex with the enzyme CysK controls cysteine metabolism in *Bacillus subtilis*. *Journal of Biological Chemistry* **283**, 35551-35560. December 19, 2008.

**Thomas, D. et Surdin-Kerjan, Y. (1997).** Metabolism of sulfur amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**, 503 - 532.

- Toelstede, S. et Hofmann, T. (2009).** Kokumi-active glutamyl peptides in cheeses and their biogenesis by *Penicillium roquefortii*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **57**, 3738-3748.
- Touati, D. (2000).** Iron and oxidative stress in bacteria. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **373**, 1-6.
- Trötschel, C., Follmann, M., Nettekoven, J. A., Mohrbach, T., Forrest, L. R., Burkovski, A., Marin, K. et Krämer, R. (2008).** Methionine uptake in *Corynebacterium glutamicum* by MetQNI and by MetPS, a novel methionine and alanine importer of the NSS neurotransmitter transporter family. *Biochemistry* **47**, 12698-12709.
- Turner, M. S., Woodberry, T., Hafner, L. M. et Giffard, P. M. (1999).** The bspA Locus of *Lactobacillus fermentum* BR11 Encodes an L-Cystine Uptake System. *Journal of bacteriology* **181**, 2192-2198. April 1, 1999.
- Valdes-Stauber, N. et Scherer, S. (1994).** Isolation and characterization of Linocin M18, a bacteriocin produced by *Brevibacterium linens*. *Applied and environmental microbiology* **60**, 3809-3814. October 1, 1994.
- Valdes-Stauber, N. et 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. April 1, 1996.
- van de Guchte, M., Ehrlich, S. D. et Maguin, E. (2001).** Production of growth-inhibiting factors by *Lactobacillus delbrueckii*. *Journal of Applied Microbiology* **91**, 147-153.
- van der Ploeg, J. R., Weiss, M. A., Saller, E., Nashimoto, H., Saito, N., Kertesz, M. A. et Leisinger, T. (1996).** Identification of sulfate starvation-regulated genes in *Escherichia coli*: a gene cluster involved in the utilization of taurine as a sulfur source. *Journal of bacteriology* **178**, 5438-5446. September 1, 1996.
- Van der Ploeg, J. R., Barone, M. et Leisinger, T. (2001).** Functional analysis of the *Bacillus subtilis* *cysK* and *cysJI* genes. *FEMS Microbiology Letters* **201**, 29-35.
- Vermeij, P. et Kertesz, M. A. (1999).** Pathways of assimilative sulfur metabolism in *Pseudomonas putida*. *Journal of bacteriology* **181**, 5833-5837. September 15, 1999.
- Waters, C. M. et Bassler, B. L. (2005).** QUORUM SENSING: Cell-to-Cell Communication in Bacteria. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **21**, 319-346.
- Weerasinghe, J., Dong, T., Schertzberg, M., Kirchhof, M., Sun, Y. et Schellhorn, H. E. (2006).** Stationary phase expression of the arginine biosynthetic operon *argCBH* in *Escherichia coli*. *BMC Microbiology* **6**, 14.
- Weinbauer, M. G. et Rassoulzadegan, F. (2004).** Are viruses driving microbial diversification and diversity? *Environmental Microbiology* **6**, 1-11.
- Weinbauer, M. G. (2004).** Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS Microbiology Reviews* **28**, 127-181.

**Weissbach, H. et Brotn, N. (1991).** Regulation of methionine synthesis in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* **5**, 1593-1597. July 1991.

**Wheeler, P. R., Coldham, N. G., Keating, L., Gordon, S. V., Wooff, E. E., Parish, T. et Hewinson, R. G. (2005).** Functional demonstration of reverse transsulfuration in the *Mycobacterium tuberculosis* complex reveals that methionine is the preferred sulfur source for pathogenic mycobacteria. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 8069-8078. March 4, 2005.

**Williams, S. J., Senaratne, R. H., Mougous, J. D., Riley, L. W. et Bertozzi, C. R. (2002).** 5'-Adenosinephosphosulfate Lies at a Metabolic Branch Point in Mycobacteria. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 32606-32615. September 6, 2002.

**Winzer, K., Hardie, K. R., Burgess, N., Doherty, N., Kirke, D., Holden, M. T. G., Linforth, R., Cornell, K. A., Taylor, A. J., Hill, P. J. et Williams, P. (2002).** LuxS: its role in central metabolism and the in vitro synthesis of 4-hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanone. *Microbiology* **148**, 909-922. April 1, 2002.

**Wooff, E., Michell, S. L. I., Gordon, S. V., Chambers, M. A., Bardarov, S., Jacobs, W. R. J., Hewinson, R. G. et Wheeler, P. R. (2002).** Functional genomics reveals the sole sulphate transporter of the *Mycobacterium tuberculosis* complex and its relevance to the acquisition of sulphur *in vivo*. *Molecular Microbiology* **43**, 653-663.

**Xavier, K. B. et Bassler, B. L. (2003).** LuxS quorum sensing: more than just a numbers game. *Current Opinion in Microbiology* **6**, 191-197.

**Yamagata, S., D'Andrea, R. J., Fujisaki, S., Isaji, M. et Nakamura, K. (1993).** Cloning and bacterial expression of the CYS3 gene encoding cystathionine gamma-lyase of *Saccharomyces cerevisiae* and the physicochemical and enzymatic properties of the protein. *Journal of bacteriology* **175**, 4800-4808. August 1, 1993.

**Yang, Y. H., Dudoit, S., Luu, P., Lin, D. M., Peng, V., Ngai, J. et Speed, T. P. (2002).** Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. *Nucleic acids research* **30**. February 15, 2002.

**Yarwood, J. M. et Schlievert, P. M. (2003).** Quorum sensing in Staphylococcus infections. *The Journal of clinical investigation* **112**, 1620-1625. 2003 Dec.

**Yvon, M., Thirouin, S., Rijnen, L., Fromentier, D. et 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. February 1, 1997.

**Yvon, M., Chambellon, E., Bolotin, A. et Roudot-Algaron, F. (2000).** Characterization and role of the Branched-Chain Aminotransferase (BcaT) isolated from *Lactococcus lactis subsp. cremoris* NCDO 763. *Applied and environmental microbiology* **66**, 571-577. February 1, 2000.

**Zhang, Z., Feige, J. N., Chang, A. B., Anderson, I. J., Brodianski, V. M., Vitreschak, A. G., Gelfand, M. S. et Saier, M. H. J. (2003).** A transporter of *Escherichia coli* specific for L-

and D-methionine is the prototype for a new family within the ABC superfamily. *Archives of microbiology* **180**, 88-100. August 2003.

**Zhao, C., Kumada, Y., Imanaka, H., Imamura, K. et Nakanishi, K. (2006).** Cloning, overexpression, purification, and characterization of O-acetylserine sulphydrylase-B from *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification* **47**, 607-613.

**Zhou, D. et White, R. H. (1991).** Transsulfuration in *archaeobacteria*. *Journal of bacteriology* **173**, 3250-3251. May 1, 1991.

## Abstract

Cheese is a complex ecosystem where different organisms coexist. The objective of this work was to study a cheese-ripening bacterium: *Brevibacterium aurantiacum*. Three approaches were developed:

i) Molecular tools were developed to study the biodiversity of the genus *Brevibacterium*. The MLST approach with 9 housekeeping genes (*cysN*, *glnA*, *gyrA*, *metY*, *metX*, *mgl*, *pheS*, *sah* et *tkl*) is a promising new tool for identifying *Brevibacteriaceae* at inter-species level; we have found a new species belonging to the strains of technological interest: *B. antiquum*. While the development of a DNA microarray was used to study intra-species diversity within the species *B. aurantiacum*, the results show that 13% and 15% of the genome sequenced strain ATCC 9174 are absent and / or divergent in the strains ATCC 9175 and BL2, respectively.

ii) We then conducted a reconstruction of sulfur metabolism in *B. aurantiacum* ATCC 9175 and studied its regulation in the presence of different sulfur sources using transcriptomic and metabolomic approaches. The results showed that the sulfate assimilation pathways (*cys* operon) and the biosynthesis of cysteine (*cysK*) were repressed in the presence of cystine and that the biosynthetic pathways of methionine via homocysteine (*metXY*) together with the transsulfuration pathway (*metB*) were down-regulated by methionine. We have also demonstrated the presence of two ABC transporters of cysteine / cysteine (BL1249-51 and BL1293-96) and an ABC transporter of methionine (BL1655-57). Finally, when we add methionine in the medium, we observed a coordinated induction of genes encoding for a methionine  $\gamma$ -lyase and a methionine transporter (BL3001-3000), suggesting the presence of a specific regulator for this pathway.

iii) Finally, we studied the behavior of *B. aurantiacum* in the presence or absence of the cheese-ripening yeast *Kluyveromyces lactis* by physiological, biochemical and transcriptomic approaches. In *B. aurantiacum*, we observed changes in the carbon metabolism (Krebs cycle, the assimilation of ethanol or lactate), nitrogen metabolism (arginine, glutamate and glutamine) and the biosynthesis of pigments when cultivated in co-culture with *K. lactis*. The presence of ethanol in the medium, produced by *K. lactis*, seems to lead *B. aurantiacum* to develop defense strategies such as consumption of ethanol and the production of pigments. In addition, the cross analyses between the transcriptome data of *B. aurantiacum* and *K. lactis* showed a metabolic complementary for a vitamin biosynthesis, biotin.

Key words : *Brevibacterium aurantiacum*, sulfur metabolism, *Kluyveromyces lactis*, Cheese, Bacteria/yeast interaction, transcriptome, metabolome; CGH; MLST, metabolism of biotin, ethanol stress.

## Résumé

Le fromage est un écosystème complexe dans lequel cohabitent différents micro-organismes. L'objectif de ce travail était d'étudier une bactérie d'affinage de cet écosystème, *Brevibacterium aurantiacum*. Trois axes ont été développés dans ce travail :

i) La mise en place d'outils moléculaires pour l'étude de la biodiversité du genre *Brevibacterium*. L'approche par MLST avec 9 gènes de ménage (*cysN*, *glnA*, *gyrA*, *metY*, *metX*, *mgl*, *pheS*, *sah* et *tkl*) est un nouvel outil prometteur pour l'identification des *Brevibacteriaceae* à un niveau inter-espèce, nous avons identifié une nouvelle espèce appartenant aux souches d'intérêt technologique, *B. antiquum*. Alors que le développement d'une puce ADN a permis d'étudier la diversité intra-espèce au sein de l'espèce de *B. aurantiacum*, les résultats montrent que 13% et 15% du génome de la souche séquencée ATCC 9174 sont absents et/ou divergents dans les souches BL2 et ATCC 9175.

ii) Nous avons ensuite réalisé une reconstruction du métabolisme du soufre chez *B. aurantiacum* ATCC 9175 et étudié sa régulation en fonction de différentes sources de soufre présentes dans le milieu en utilisant des approches transcriptomiques et métabolomiques. Les résultats montrent une répression des voies d'assimilation du sulfate (opéron *cys*) et de la biosynthèse de la cystéine (*cysKE*) en présence de cystine et une répression des voies de biosynthèse de la méthionine via l'homocystéine (*metXY*) et la voie de transsulfuration (*metB*) par la méthionine. Nous avons aussi mis en évidence la présence de deux ABC transporteurs de cystéine/cystéine (BL1249-51 et BL1293-96) et d'un ABC transporteur de la méthionine (BL1655-57). Enfin, lors d'un ajout de méthionine dans le milieu, nous observons une induction coordonnée des gènes codant pour la méthionine  $\gamma$ -lyase et un transporteur de la méthionine (BL3001-3000) suggérant la présence d'un régulateur spécifique pour cette voie.

iii) Enfin, nous avons étudié le comportement de *B. aurantiacum* en présence ou en absence d'une levure d'affinage de fromage *Kluyveromyces lactis* par des approches physiologiques, biochimiques et transcriptomiques. Chez *B. aurantiacum*, on observe une modification du métabolisme carboné (cycle de Krebs, assimilation de l'éthanol, ou du lactate), du métabolisme de l'azote (arginine, glutamate et glutamine), de la voie de biosynthèse des pigments. La présence d'éthanol dans le milieu, produit par *K. lactis*, semble conduire *B. aurantiacum* à mettre en place des stratégies de défense comme la consommation de l'éthanol et la production des pigments. De plus, l'analyse croisée entre les données transcriptomiques de *B. aurantiacum* et de *K. lactis* ont mis en évidence une complémentarité métabolique possible pour la biosynthèse d'une vitamine : la biotine.

Mots Clés : *Brevibacterium aurantiacum*, Métabolisme du Soufre, Fromage, *Kluyveromyces lactis*, interaction bactérie/levure, transcriptome, métabolome, CGH, MLST, métabolisme de la biotine, stress éthanol.