

Etude des médiateurs moléculaires des interactions microbiennes de la levure Yarrowia lipolytica avec les micro-organismes de son environnement biotique

Reine Malek

▶ **To cite this version:**

Reine Malek. Etude des médiateurs moléculaires des interactions microbiennes de la levure Yarrowia lipolytica avec les micro-organismes de son environnement biotique. Sciences agricoles. AgroParisTech, 2012. Français. NNT : 2012AGPT0061 . tel-03128473

HAL Id: tel-03128473
https://pastel.hal.science/tel-03128473

Submitted on 2 Feb 2021

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.

ParisTech
INSTITUT DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES
PARIS INSTITUTE OF TECHNOLOGY

AgroParisTech
INSTITUT DES SCIENCES ET INDUSTRIES DU VIVANT ET DE L'ENVIRONNEMENT
PARIS INSTITUTE OF TECHNOLOGY FOR LIFE, FOOD AND ENVIRONMENTAL SCIENCES

Ecole Doctorale ABIES
Agriculture
Agriculture
Alimentation
Food
Biologie
Biology
Environnement
Environment
Santé
Health

Doctorat ParisTech

T H È S E

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

Reine MALEK

le 13 septembre 2012

Etude des médiateurs moléculaires des interactions microbiennes de la levure *Yarrowia lipolytica* avec les micro-organismes de son environnement biotique

Directeur de thèse : **Jean-Marie BECKERICH**
Co-encadrement de la thèse : **Pascale FREY-KLETT**

Jury

M. Colin TINSLEY, Professeur, AgroParisTech-INRA, Paris	Président
Mme Sylvie DEQUIN, Directeur de Recherche, INRA, Montpellier	Rapporteur
M. Alain SARNIGUET, Directeur de Recherche, INRA, Le Rheu	Rapporteur
M. Pascal BONNARME, Directeur de Recherche, INRA, Grignon	Examinateur
Mme Pascale FREY-KLETT, Directeur de Recherche, INRA, Champenoux	Directeur de thèse
M. Jean-Marie BECKERICH, Directeur de Recherche, INRA, Grignon	Directeur de thèse

AgroParisTech
UMR MICALIS, Laboratoire de Microbiologie et Génétique Moléculaire
AgroParisTech-INRA, CBAI, BP 01, 78850 Thiverval Grignon, France

A mes chers parents Elias & Sabah,

A la confiance que vous m’avez accordée

A l’amour que vous m’avez donné

Au soutien éternel que vous m’avez offert

A votre force et votre courage toutes les années

A tous vos sacrifices

Mille et un Merci…

Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier Michèle Marin, Isabelle souchon de m'avoir accueillie au sein du Laboratoire de Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires, ainsi que Stéphane Aymerich au sein du laboratoire Microbiologie et Génétique Moléculaire, à Grignon et Pascale Frey-Klett au sein du laboratoire Interactions Arbres Micro-organismes à Nancy Champenoux.

Je tiens à remercier Mme Sylvie Dequin et M. Alain Sarniguet d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail de thèse, et M. Colin Tinsley d'avoir accepté d'être le président du jury. Veuillez accepter mes plus vifs remerciements pour votre présence dans ce jury.

Je tiens à remercier Jean-Marie Beckerich, mon directeur de thèse, qui a su m'encadrer et m'accompagner tout au long de ce travail. Merci pour vos précieux conseils, merci pour votre écoute et votre disponibilité ainsi que votre confiance en moi.

Je remercie également, ma co-directrice de thèse Pascale Frey-klett, qui malgré la distance, elle à Nancy et moi à Grignon, elle a su être toujours présente et disponible pour moi et me donner des conseils pertinents tout au long de la thèse.

Je tiens à remercier Pascal Bonnarme, pour avoir co-dirigé cette thèse, pour son aide précieuse, pour sa sympathie et sa disponibilité tout au long de ces trois années.

Un grand Merci à Françoise Irlinger qui a également suivi mon travail de thèse. Merci pour tes conseils et ta disponibilité, un grand merci pour ton humanité et ton soutien à tous les moments.

Je remercie pronfondément Djamila Onésime pour qui j'exprime toute ma reconnaissance pour son aide précieuse et ses conseils pertinents tout au long de cette thèse. Mais surtout, je te remercie Djamila pour ton soutien aux moments les plus difficiles, pour tes encouragements quotidiens et pour ton amitié.

Mes remerciments s'adressent également à Catherine Béal pour m'avoir ouvert les portes du LGMPA un jour de février 2008 ainsi que les portes de sa maison.

Je tiens à remercier Dominique Swennen et Marie-Thérèse Le Dall, Jonathan Verbeke, Julie Aubert, Emmanuelle Rebours et Jérôme Lecardonnel pour leur aide précieuse durant ma thèse et pour le temps qui m'ont consacré.

Je remercie Jérôme Mounier, d'avoir accepté être membre dans mon comité de thèse. Je remercie également Lucien Bettendorff qui m'a accueilli au sein de son équipe à Giga-NeuroSciences en Belgique.

J'adresse mes remerciements aux membres de l'école doctorale Abies, à Françoise launay et à Corinne Fiers, qui rendent la vie de l'étudiant plus facile. Merci Corinne, je pense que t'as plus de 1000 emails intitulés « attestation » ☺. Je remercie également Eric Birlouez, Donald White pour leur sympathie et pour tous qu'ils nous ont appris sur la valorisation de nos travaux de recherche.

Je remercie les secrétaires des 3 laboratoires où j'ai travaillé LGMPA, MGM et IAM. Je remercie Valérie Caudran, Nicole Thirion, Anne Blivet, Agnès Monchablon.

Je tiens à remercier profondément tous les gens qui m'ont accompagné dès les permiers jours de mon arrivée au labo GMPA jusqu'à ce jour là. Un grand Merci à Stéphanie Cénard, qui est parmi les personnes qui a rendu la vie du laboratoire plus agréable. Merci à Jérôme Delettre « pour sa sympathie », à Michel Savy, Merci à Thomas Cattenoz, David Forest « pour sa bonne humeur » et Anne-Sophie Sarthou.

Merci pour tous mes collègues au MGM, IAM et LGMPA. Merci à, Aurélie D., Nicolas, Brigitte T., Catherine M., Jérôme B., David L., Maud, Bruno, Fréderic, Marie-Noêlle, Armelle, Sarah, Daniel, Eric, Marwen, Violaine, Nour, Julie B., Jessie, Isabelle D., Isabelle M., Hervé, Fernanda F., Stéphanie P., Anne SE, Claire, Caroline, Cécile S., Hélène, Thibaut, Christian, Josuha, « la Baronne » Cécile, Sandra, Christophe, Sophie, Steven, Sébastien, Julien, Joseph, Huu-Vang, Noémie, Christelle, Denise, Sandrine M., Sandrine P., Sylvie, Ivan,

Claude, Serge, Guillaume, Olivier, Mathieu, Mathias, Aurélie B., Grégory, Philippe, Dominique LC, Eliane, Houda, Anita.

Un grand Merci pour le groupe des bons moments du GMPA et MGM : Julie L., Nadège, Françine, Djamila NA, Yohan, Perrine, Alexa, Agnès, Marie-Pierre, Aline, Sophie C., Halima, Fernanda S., Amandine, Romain J., Romain C., Pawinee, Monsérrathe, Abder, Ahassan et Ines.

Merci aux filles, pour leur amitié qui me tient particulièrement au cœur : Raquel Leitâo, Ana Carolina Florence, Severine Louesdon, Bouchra Lamrini, Najeh Gharbi, merci pour tous les bons moments qu'on a passé ensemble.

Au groupe inséparable, aux anciens du LGMPA, à mes amis : Roselyne Tâche, merci d'être présente dans ma vie, je considère que j'ai une famille ici en France, ta famille! Yoann Le Digabel, merci pour ton soutien dans les moments les plus difficiles, merci pour ton amitié qui m'est très précieuse. Merci à Soulaf Mansour, Alain Sourabié et Lova pour les moments agréables passés ensemble, et pour votre amitié et votre support.

Mille mercis à Chrisse Ngari « ma Chrisse ». Tu es plus qu'une sœur pour moi. Merci pour toutes les nuits qu'on a passé à travailler ensemble au labo, merci pour ta force, ton écoute, ton support, ton aide, merci pour l'année agréable où on a partagé la même chambre, surtout merci pour ton amitié précieuse.

A mes collocatrices, un grand merci pour l'agréable ambiance que nous avons à la maison, le calme et la sérénité. Merci à Lei, Meryem et surtout à Amira qui est plus qu'une collocatrice, est une amie qui m'accomagne jour par jour, merci pour TOUT Amira.

A mes amies de Fac au Liban, depuis plus que huit ans, Antoinette Fares, Christine Attieh, Nermine Salloum, Mirna Betto, Cosette Karam, Christine Ohanian et Chantal Eid.

Je remercie le comité de l'église de Notre Dame de Liban NDL et les jeunes NDL, que je considère ma deuxième famille. Un grand Merci à Msr. Said Said,

P. Elie Akoury, Sr. Marie Thérèse Harika, Jamil Harb, Josiane Saleh, Maroun Nemer, Joe Bou Eid, Elias Zgheib, Samer El Sokhen, Hélène Chalhoub, Gilbert Sawma, Farah Hanna, Georges Nehmé, Josiane Maalouf, Rana Maroun, Younane Nassif, Johnny et Nissrine Najjar, Christelle El Hakim, Roger Abi Saad, Fouad Abi Dib, Charbel, Joelle, Estelle& Karl Nehmé, Marcel, Viviane, Sabine, Vanessa, Giscard, Toni Massoud, Camille, Toni Kattar, Fares, May, Marie, Joanna, Racha, Christelle N., Zeena, Diana, Steve, Samar, Joe, Chadi, Fadi et Tante Gisèle.

Aux personnes qui ont décoré mes jours avec la joie et la bonne humeur. Sans eux, la vie sera moins belle et plus difficile. Merci à mes meilleurs amis Myriam Bou Nader « ma jumelle w chbinté hayda eza …☺», merci pour ton grand cœur et surtout pour ton amitié qui m'est plus que précieuse. Merci à Elie Al Alam, merci pour ta présence à côté de moi, ton encouragement, ton écoute. Merci à Layane Abboud mon ange gardien…merci pour tout…Merci à Walid Abou Jaoudé et Wissam Bou Nader, merci pour votre âme si pure, merci pour votre amitié.

Là, les larmes tombent et biensûr…à mes chers frères Georges, Malek, Sleiman, Alexandre et Charles. Vous êtes mon rayon de soleil, vous êtes la force qui réside en moi, vous êtes ma joie de vivre. Simplement vous êtes TOUT pour moi.

A « Jeddo » Malek et Halim et « Téta » Wadad et Zahra….je vous aime

A mes chers parents, les mots ne suffisent pas pour vous remercier et pour rendre une petite goutte de tout ce que vous m'avez offert toutes ces années…..vous êtes mon cœur et ma raison de vivre…je vous aime

Publications-Communications orales

Publications dans des revues à comité de lecture

Adaptive response of *Debaryomyces hansenii* in co-culture with *Yarrowia lipolytica*: switch from respiratory to fermentative metabolism
Reine Malek, Pascal Bonnarme, Françoise Irlinger, Pascale Frey-Klett, Djamila Onésime, Julie Aubert, Valentin Loux, Jean-Marie Beckerich (Appl. Environ. Microbiol., Soumis)

Transcriptomic study revealing the effect of thiamin on the morphology of *Yarrowia lipolytica*
Reine Malek, Pascale Frey-Klett, Djamila Onésime, Dominique Swennen, Pascal Bonnarme Françoise Irlinger, Julie Aubert, Jean-Marie Beckerich (Version 1)

Communications orales

Etude de l'interaction de deux levures fromagères dans un milieu chimiquement défini Journées de l'école doctorale ABIES, Paris, France, Avril 2010. Prix de meilleur poster.

Inhibition of *Debaryomyces hansenii* by *Yarrowia lipolytica*, competing for substrates. Journées des Microbiologistes de l'INRA, Futuroscope, Poitiers, France, Mai 2010. Poster

Inhibition of *Debaryomyces hansenii* by *Yarrowia lipolytica*, competing for substrates. Levures Modèles et Outils IX, Strasbourg, France, août 2010. Poster

Adaptive response of *Debaryomyces hansenii* in co-culture with *Yarrowia lipolytica*: switch from respiratory to fermentative metabolism. 111th American Society For Microbiology General Meeting (ASM), New Orleans, USA, Mai 2011. Poster

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN: Acide désoxyribonucléique

AHL: Acyl homosérine lactone

AI: Auto-inducteur

AMPc-PKA: Adénosine monophosphate cyclique-Protéine kinase A

ARN: Acide ribonucléique

CSVs: Composés soufrés volatils

DMDS: Diméthyldisulfure

DMS: Diméthylsulfure

DMTS: Diméthyltrisulfure

FDA: American Food and Drug Administration

GLcNAc: N-acétylglucosamine

GRAS: Generally Recognized As Safe

MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase

MCD: Milieu Chimiquement Défini

MTA: Méthylthioadénosine

MTAc: Méthythioacétate

MTL: Méthanethiol

TDP: Thiamine Diphosphate

TH: Thiamine

TH- : Absence de thiamine

TH+: Présence de thiamine

TMP: Thiamine monophosphate

TTP: Thiamne triphosphate

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION……... 23

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE……. 27

I. LES INTERACTIONS MICROBIENNES AU SEIN D'UN ECOSYSTEME……. 27

I.A. Définition d'une interaction…… 27

I.B. Les différentes interactions microbiennes…… 30

I.B.1. Interactions trophiques ou nutritionnelles……... 30

I.B.2. Interaction par antibiose…….. 31

I.B.3. Interaction par chimiotaxie et par contact physique…… 31

I.B.4. Les biofilms……. 31

I.B.5. Le "Quorum sensing"…….. 33

a. Le "Quorum sensing" chez les bactéries…… 33

b. Le "Quorum sensing" chez les levures…….. 35

c. Les communications bactéries-levures…….. 36

I.C. Exemple d'un écosystème microbien: le fromage……..... 37

I.C.1. Le fromage: un écosystème complexe…… 37

I.C.2. La fabrication du fromage…….. 38

I.C.3. Les acteurs de l'écosystème fromager…… 39

I.C.3.1. Les levures……... 39

a. Genre *Yarrowia*…… 40

b. Genre *Debaryomyces*……..... 42

I.C.3.2. Les bactéries……... 43

a. Genre *Brevibacterium*…….. 45

b. Genre *Arthrobacter*…… 50

c. Genre *Pseudomonas*…… 51

I.C.4. Les différents types d'interaction: exemples des produits laitiers……. 51

a. Amensalisme…….. 51

b. Compétition……..... 53

c. Parasitisme……. 54

d. Commensalisme…….. 55

e. Mutualisme…….. 55

II. LE DIMORPHISME…… 56

II.A. Le dimorphisme chez *Saccharomyces cerevisiae*…… 57

II.A.1. Les facteurs responsables du dimorphisme……. 57
II.A.2. Les voies de signalisation impliquées dans le contrôle du dimorphisme… 58
II.B. Le dimorphisme chez *Candida albicans*……... 61
II.B.1. Les facteurs responsables du dimorphisme……. 61
II.B.2. Les voies de signalisations qui contrôlent le dimorphisme…….. 61
II.C. Le dimorphisme chez *Yarrowia lipolytica*…… 62
II.C.1. Les facteurs responsables du dimorphisme……. 63
II.C.2. Les voies de signalisation qui contrôlent le dimorphisme……... 64
II.C.3. Le "mating" et son rôle dans le dimorphisme…….. 64
RESULTATS-DISCUSSION……. 68
I. Etude de l'interaction entre deux levures fromagères *Yarrowia lipolytica* et *Debaryomyces hansenii* sur un milieu chimiquement défini (MCD)……..… **69**
A. Introduction……. 69
B. *Publication n°1*: Adaptive response of *Debaryomyces hansenii* in co-culture with *Yarrowia lipolytica*: switch from respiratory to fermentative metabolism……... 70
C. Conclusions……. 97
II. Effet de la thiamine sur la morphologie et la croissance de la levure *Yarrowia lipolytica* 1E07……. **99**
A. Introduction…… 99
B. Publication *n°2*: Transcriptomic study revealing the effect of thiamin on the morphology of *Yarrowia lipolytica*…….. 100
C. Conclusions…… 129
III. Effet des bactéries sur la croissance et la morphologie de la levure *Yarrowia lipolytica* 1E07……. **130**
A. Introduction…….. 130
B. Confrontations de la levure *Yarrowia lipolytica* 1E07 avec différentes bactéries sélectionnées…….. 131
C. Dosage de la thiamine…… 138
D. Etude transcriptomique de *Yarrowia lipolytica* 1E07……... 139
a. Conditions expérimentales pour l'étude transcriptomique…….. 139
b. Résultats transcriptomiques……. 140
E. Validation des données transcriptomiques par RT qPCR…… 162
F. Conclusions…….. 164
CONCLUSION-PERSPECTIVES…… 169
FICHES TECHNIQUES…….. 175
Fiche n°1: Milieux gélosés utilisés…… 175
Fiche n°2: Milieu Chimiquement défini (MCD)……... 176

Fiche n°3: Suivi de la croissance microbienne…….. 180
Fiche n°4: Dosage par HPLC…… 182
Fiche n°5: Dosage de l'ammoniaque par le test de Nessler……... 185
Fiche n°6: Dosage de l'éthanol par la méthode enzymatique…… 187
Fiche n°7: Test de confrontations des micro-organismes sur milieu agar…… 189
Fiche n°8: Extraction des ARN totaux dans des cultures liquides…… 191
Fiche n°9: Extraction des ARN totaux sur des colonies microbiennes cultivées sur milieu agar……. 193
Fiche n°10: Etude transcriptomique par puce à ADN……... 197
Fiche n°11: RT-PCR quantitative…….. 198
BIBLIOGRAPHIE…… 203

TABLE DES ILLUSTRATIONS

FIGURES

Figure 1. Les différentes interactions biologiques pouvant s'établir entre un ou plusieurs individus d'espèces identiques ou différentes, suivant l'effet qu'elles produisent…… 28

Figure 2. Les différentes interactions biologiques classées en fonction des mécanismes impliqués…….. 29

Figure 3. Un exemple d'un biofilm chez *Escherichia coli*……. 32

Figure 4. Mécanisme du « Quorum sensing »……. 34

Figure 5. Interaction entre *P. aeruginosa* et *C. albicans* via des molécules du « Quorum sensing »……. 37

Figure 6. Les différentes étapes de fabrication d'un fromage à pâte molle…… 38

Figure 7. Les voies de signalisation (MAP kinase et AMPc-PKA) qui contrôlent la filamentation chez *S. cerevisiae*……. 59

Figure 8. Les deux cascades de la voie de la MAP kinase qui contrôlent le « mating » et la croissance filamenteuse chez *S. cerevisiae*…….. 60

Figure 9. Les 2 voies de signalisation qui contrôlent la filamentation chez *C. albicans* : MAP kinase et l'AMPc-PKA……. 62

Figure 10. La croissance de *Y. lipolytica* 1E07 sur le milieu MCD carencé ou supplémenté en thiamine, au cours du temps (en jours)……. 131

Figure 11. *Y. lipolytica* 1E07 en confrontation avec *A. arilaitensis* Re117 (Aa Re117) sur le milieu MCD carencé ou supplémenté en thiamine, au cours du temps (en jours)…… 132

Figure 12. *Y. lipolytica* 1E07 en confrontation avec *B. aurantiacum* 171 (BA 171) sur le milieu MCD carencé ou supplémenté en thiamine, au cours du temps (en jours)…… 133

Figure 13. *Y. lipolytica* 1E07 en confrontation avec *B. aurantiacum* 9175 (Ba 9175) sur le milieu MCD carencé ou supplémenté en thiamine, au cours du temps (en jours)…….. 134

Figure 14. *Y. lipolytica* 1E07 en confrontation avec *P. fluorescens* BB6cR8 sur le milieu MCD carencé ou supplémenté en thiamine, au cours du temps (en jours)… 135

Figure 15. *Y. lipolytica* 1E07 en confrontation avec *P. fluorescens* NZI7 sur le milieu MCD carencé ou supplémenté en thiamine, au cours du temps (en jours)… 136

Figure 16. *Y. lipolytica* 1E07 en confrontation avec le mutant de *P. fluorescens* NZI7 (ΔNZI7) sur le milieu MCD carencé ou supplémenté en thiamine, au cours du temps (en jours)…….. 136

Figure 17. La forme cellulaire de *Y. lipolytica* 1E07 en confrontation avec Ba 171 « productrice de l'aspect ridé » et Ba 9175 « productrice de l'aspect lisse» sur le milieu MCD sans thiamine à J8…… 138

TABLEAUX

Tableau 1. Molécules du « Quorum sensing » chez les bactéries à Gram-positive.. 35

Tableau 2. Les différents agents antimicrobiens des *Brevibacteriaceae*..... 48

Tableau 3. Les différents composés soufrés volatils produits par les *Brevibacteriaceae*…….. 49

Tableau 4. Interactions microbiennes inter-espèces observées dans les différents produits laitiers……. 52

Tableau 5. Dosage de la thiamine dans les culots cellulaires de *B. auranticaum* 171 et *B. auranticaum* 9175…… 139

Tableau 6. Catégories fonctionnelles des gènes différentiellement exprimés chez *Y. lipolytica* 1E07, dans les 4 conditions TH- vs TH+, TH- vs 171, TH+ vs 171 et 9175 vs 171, au jour 8 de la croissance…….. 142

Tableau 7. Gènes différentiellement exprimés chez *Y. lipolytica* 1E07 en confrontation avec les bactéries, et qui sont discutés dans ce travail……. 156

Tableau 8. Comparaison du niveau d'expression des gènes sélectionnés chez *Y. lipolytica* en confrontation avec les bactéries (condition Ba 9175 vs Ba 171), entre les deux techniques de transcriptome et la RT qPCR ……. 163

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Les bactéries et les levures qui cohabitent dans de multiples environnements (tels que le fromage, et les sols forestiers, etc…), interagissent au niveau physique et fonctionnel. Mieux connaître ces interactions et les maîtriser permettraient de répondre aux préoccupations actuelles de notre société en matière de procédés de fabrication des aliments qui préservent la santé humaine, ainsi qu'en matière de production végétale à faibles intrants, qui soit respectueuse de l'environnement. Pourtant jusqu'à récemment, que ce soit dans les procédés de transformation des aliments ou dans les processus de pathogénie des plantes ou des animaux, seul le rôle dominant d'une seule espèce, levure ou bactérie, était appréhendé ; l'existence d'interactions positives ou négatives avec des bactéries ou levures n'était que très rarement pris en compte. En conséquence, pouvoir élucider le déterminisme et la dynamique des associations bactéries-levures, levures-levures et améliorer notre connaissance de l'impact de ces associations sur le fonctionnement biologique des écosystèmes tels que les sols et le fromage et les processus d'intérêt biotechnologique, demeure un enjeu majeur des recherches des dix prochaines années.

L'objectif de ce travail vise à étudier les mécanismes d'interaction entre une cellule eucaryote modèle *Yarrowia lipolytica* et des cellules procaryotes bactériennes ou eucaryotes levures, de manière à identifier la généricité et la spécificité de ces mécanismes. La levure d'origine fromagère *Y. lipolytica* a été retenue comme modèle d'étude car i) elle a été isolée dans un nombre important d'écosystèmes, ii) elle intervient dans le processus d'affinage des fromages au cours duquel elle interagit avec la communauté bactérienne et levurienne résidente, iii) elle est capable de mobiliser le phosphore inorganique du sol et de stimuler la symbiose entre les racines et les champignons mycorhiziens, améliorant ainsi significativement la croissance des plantes et iv) la génétique de cette levure est bien connue et des outils de biologie moléculaire et de post-génomique sont disponibles. A terme, les connaissances générées par cette étude des mécanismes moléculaires qui contrôlent les interactions entre *Y. lipolytica* et son environnement biotique devraient nous permettre d'améliorer notre maîtrise des processus microbiens d'intérêt biotechnologique en agroalimentaire ainsi qu'en agriculture, qui sont sous la dépendance de consortia microbiens mixtes levuriens et bactériens.

Ce manuscrit est structuré en deux chapitres. Le premier chapitre est consacré à l'état des connaissances et comporte deux parties. Dans la première partie, les types d'interactions observées dans plusieurs écosystèmes, entre levures-levures, levures-bactéries et bactéries-bactéries sont décrites et des exemples appliqués à l'écosystème fromager et les produits laitiers sont présentés. La transition dimorphique chez la levure *Y. lipolytica* et chez d'autres levures comme *Saccharomyces cerevisiae* et *Candida albicans*, les facteurs impliqués ainsi que les voies de signalisation qui contrôlent le dimorphisme sont présentés dans la deuxième partie.

Les résultats des principaux travaux expérimentaux effectués au cours de cette thèse sont exposés dans le deuxième chapitre du manuscrit, qui est composé de trois parties. La première partie est consacrée à l'étude de l'interaction entre les deux levures fromagères *Y. lipolytica* et *Debaryomyces hansenii*, sur un Milieu Chimiquement Défini (MCD) liquide. Des analyses microbiologiques, biochimiques et transcriptomiques ont été effectueés afin de déterminer les mécanismes de cette interaction. La deuxième partie est consacrée à une étude de l'interaction de *Y. lipolytica* cette fois sur le même milieu MCD agar avec plusieurs espèces bactériennes isolées à partir d'écosystèmes différents tels que le fromage et le sol. Les deux premières parties des résultats sont présentées sous forme d'articles, rédigés en anglais, soumis ou à soumettre pour publication.

Enfin, une conclusion générale permet de récapituler les principaux résultats de ce travail et de proposer des idées sur la maîtrise des écosystèmes microbiens par la connaissance approfondie des mécanismes impliqués dans les interactions microbiennes. Le manuscrit se conclut en présentant les principales perspectives envisagées pour la poursuite de cette thématique de recherche.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. LES INTERACTIONS MICROBIENNES AU SEIN D'UN ECOSYSTEME

Un écosystème microbien est composé d'une grande diversité de micro-organismes (levures, bactéries, moisissures et champignons), dans lequel des interactions se mettent en place en fonction des populations présentes mais aussi du milieu dans lequel ces populations se développent. Les écosystèmes apparaissent être des acteurs de première importance dans des domaines extrêmement variés, depuis l'agriculture (rhizosphère, sols, etc) jusqu'aux procédés de transformation des aliments (saucisson, bière, fromage, etc…). Cependant, ils sont encore empiriquement utilisés et surtout très mal compris. Leur compréhension et leur maîtrise représentent un enjeu scientifique, sanitaire et économique et passent par l'identification et la compréhension des interactions qui régissent le fonctionnement de ces écosystèmes.

I. A. Définition d'une interaction

Une interaction biologique désigne un processus impliquant des échanges ou relations réciproques entre deux ou plusieurs éléments biologiques (espèces, populations, groupes) dans un écosystème. Les interactions constituent un ensemble complexe de phénomènes biologiques hétérogènes dont la classification s'avère être nécessaire.

Si une interaction biologique a lieu entre deux individus issus d'espèces différentes, alors nous parlons d'interaction interspécifique. Si une interaction concerne des individus d'une même espèce, alors elle est dite intra-spécifique.

Historiquement, les interactions ont été caractérisées par les effets qu'elles produisent, avant même de comprendre le mécanisme biologique impliqué. Six catégories peuvent exister (Figure 1) : Le neutralisme, le mutualisme ou la symbiose, l'inhibition, le commensalisme, le parasitisme ou la prédation et l'amensalisme. Elles sont définies ci-dessous et sont dévéloppées dans les paragraphes suivants en illustrant par quelques exemples.

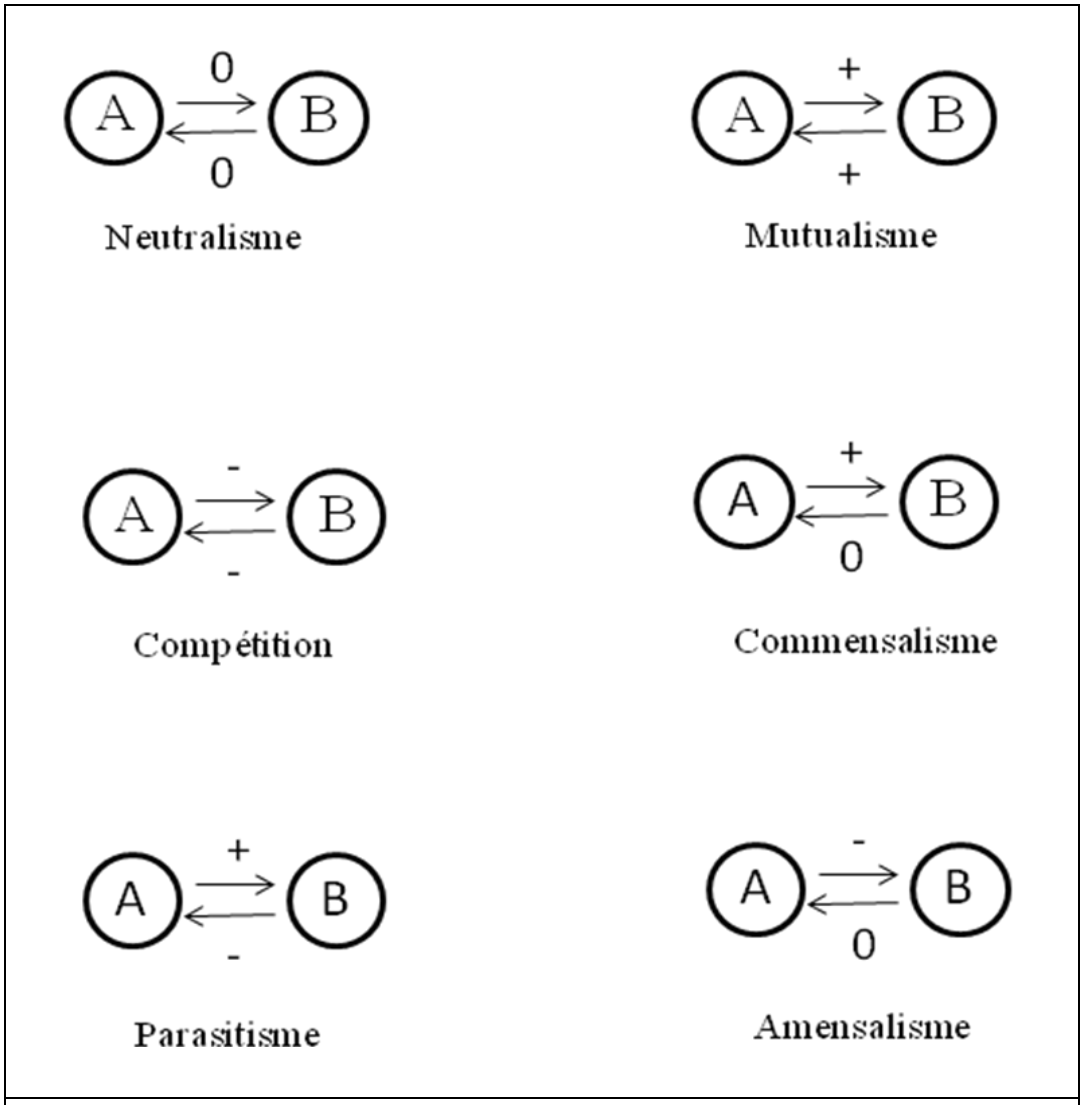


Figure 1. Les différentes interactions biologiques pouvant s'établir entre un ou plusieurs individus d'espèces identiques ou différentes, suivant l'effet qu'elles produisent.

A : le micro-organisme 1 ; B : le micro-organisme 2 ; - : effet négatif ; + : effet positif ; 0 : pas d'effet

Le neutralisme est une interaction où la présence d'un ou de plusieurs micro-organismes n'a aucun effet sur les autres micro-organismes présents dans le même environnement.

Le mutualisme est une interaction entre une ou plusieurs espèces, dans laquelle toutes les parties tirent profit.

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

Le commensalisme est une interaction où un micro-organisme bénéficie de la présence d'un

autre, sans que ce dernier en tire profit.

Le parasitisme est une interaction où un micro-organisme tire profit d'un autre au dépend de ce dernier.

Enfin, **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.

Les interactions peuvent être également caractérisées en fonction des mécanismes impliqués lorsque ceux-ci sont connus (Figure 2).

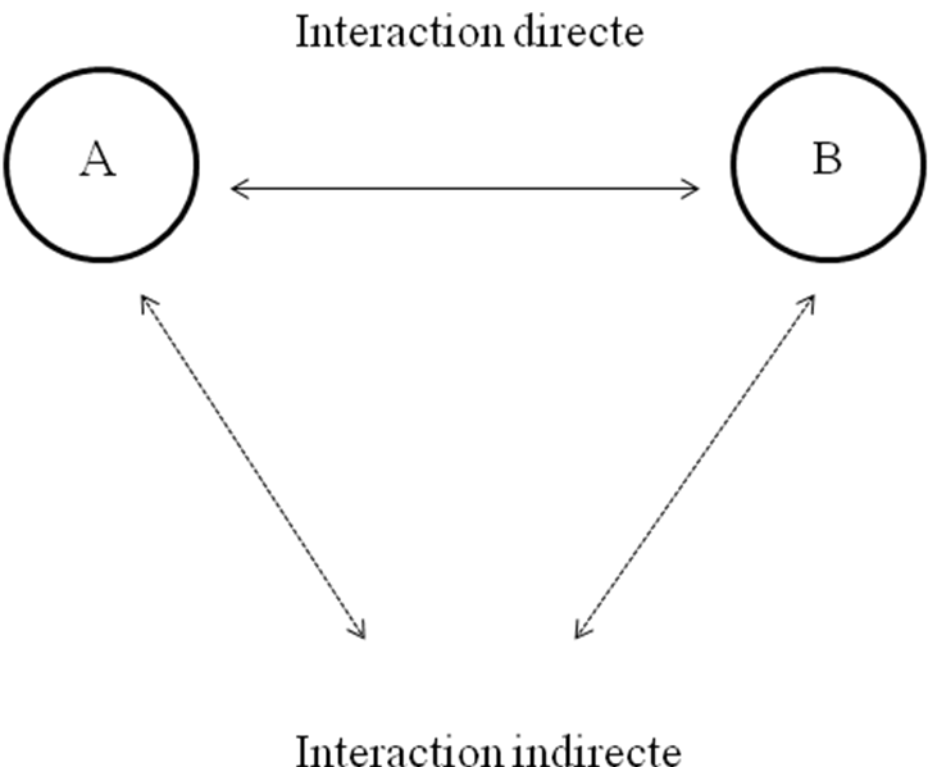


Figure 2. Les différentes interactions biologiques classées en fonction des mécanismes impliqués.
A : le micro-organisme 1 ; B : le micro-organisme 2

Les interactions directes peuvent s'établir par le contact physique des micro-organismes qui se trouvent dans le même environnement, tandis que les interactions indirectes peuvent se dérouler par le biais des facteurs physico-chimiques, par la sécrétion des toxines ou autres molécules signals.

I. B. Les différentes interactions microbiennes

I. B. 1. Interactions trophiques ou nutritionnelles

Les substances nutritionnelles jouent un rôle important dans l'établissement des interactions entre les différents micro-organismes (Frey-Klett *et al.*, 2011). Une compétition pour les nutriments tels que les sources de carbone (Elad *et al.*, 1985; Sivan *et al.*, 1989), les sources d'azote et le fer (Elad *et al.*, 1985;Whipps *et al.*, 2001; Sieuwerts *et al.*, 2008; Irlinger *et al.*, 2009), est observée dans la rhizosphère où les bactéries entrent en compétition pour ces nutriments avec des champignons qui peuvent être pathogènes pour la plante. De même une telle compétition est observée également dans les écosystèmes fromagers (paragraphe I.C).

Dans d'autres cas, les bactéries et les champignons peuvent profiter mutuellement l'un de l'autre, et ceci par la production de certains composés par l'un des partenaires qui ne peuvent pas être synthétisés par l'autre ou qui sont produits en quantités trop faibles (Frey-Klett *et al.*, 2011). A titre d'exemple, les bactéries de la mycorrhize produisent de l'acide citrique et de l'acide malique qui sont métabolisés par *Laccaria bicolor*, favorisant ainsi sa croissance (Duponnois *et al.*, 1990). De même, la thiamine (vitamine B1) produite par les bactéries favorise la croissance de *Debaryomyces vanriji* en interaction avec *Bacillus sp*. TB-1 (Rikhvanov *et al.*, 1999), et la croissance de *L. biocolor* S238N en interaction avec *Pseudomonas fluorescens* BBc6R8 (Deveau *et al.*, 2010). De leur côté, les champignons ectomycorrhiziens peuvent produire des acides organiques ou des sucres comme le tréhalose, qui peuvent influencer la composition et la croissance des bactéries associées (Frey *et al.*, 1997; Olsson and Wallander, 1998). Similairement, grâce à la présence de *Geotrichum candidum* et à son activité désacidifiante, *Salmonella* peut pousser et croître sur la surface des tomates (Wade *et al.*, 2003). De plus, la présence de *S. cerevisiae* dans le jus de raisin ou dans un milieu synthétique riche en glucose permet la croissance et la viabilité de *Pseudomonas putida*, et ceci en diminuant la concentration en acides gluconiques produits par cette bactérie (Romano and Kolter, 2005). Chez les plantes, *S. cerevisiae* permet à *Lactobacillus plantarum* d'utiliser le L-arabinose formant la fraction ligno-cellulosique (Sieuwerts *et al.*, 2008).

Un autre exemple de commensalisme est celui de *Klebsiella aerogenes* et de *Cryptococcus neoformans*. *C. neoformans* est capable d'utiliser l'acide homogentésique, produit par *K. aerogenes*, comme un précurseur pour la biosynthèse des pigments de mélanine. Cette synthèse augmente la virulence de la levure et lui permet de se protéger contre les rayons UV et contre les différentes sources de stress (Frases *et al.*, 2006; Frases *et al.*, 2007).

I. B. 2. Interaction par antibiose

L'antibiose est une communication qui se fait par diffusion de molécules chimiques d'un micro-organisme vers un autre. La connaissance de ce domaine a permis le développement de nombreux antibiotiques qui sont utilisés pour la défense contre les infections microbiennes. Un exemple courant est la « pénicilline » qui est produite lors de l'antibiose entre *Penicillium* et *Staphylococcus*. Cette catégorie d'interaction existe dans le domaine clinique ainsi que dans les sols forestiers (Frey-Klett *et al.* 2011).

I. B. 3. Interaction par chimiotaxie et par contact physique

La chimiotaxie est un mouvement généralement observé chez les micro-organismes comme les bactéries par exemple, vers un gradient de nutriments ou d'autres molécules chimiques; c'est la réponse efficace d'un micro-organisme à son environnement.

L'acide fusarique est un signal chimiotactique produit par *Fusarium oxysporum* envers *P. fluorescens* WCS365. Il permet à ce dernier de coloniser *F. oxysporum* limitant ainsi l'infection des tomates par le champignon phytopathogène (de Weert *et al.*, 2004).

Dans l'établissement des interactions par contact cellulaire, il s'est avéré que les protéines de la membrane avaient un rôle majeur. Dans l'interaction entre *A. baumannii* et *C. albicans*, la protéine OmpA de la membrane externe de *A. baumannii* assure son attachement à la levure (Gaddy *et al.*, 2009), tandis que l'attachement de *Streptococcus gordonii* à *C. albicans* se fait d'une part par les protéines bactériennes SspA et SspB (2 protéines qui sont ancrées à la paroi cellulaire) (Bamford *et al.*, 2009) et d'autre part par la protéine de la paroi hyphale, Als3 (Silverman *et al.*, 2010).

De même, les polysaccharides bactériens jouent un rôle important dans les interactions ; ils participent notamment à l'adhésion de *Pseudomonas* qui possède une activité anti-fongique, sur le champignon *Agaricus bisporus* (Rainey, 1991). Un rôle similaire a été rapporté pour les polysaccharides extracellulaires qui jouent un rôle dans l'attachement de certaines bactéries sur des champignons de la mycorrhize (Bianciotto *et al.*, 2009).

I. B. 4. Les biofilms

Un biofilm est une communauté multicellulaire plus ou moins complexe et symbiotique de micro-organismes (bactéries, levures, champignons, algues ou protozoaires), adhérant entre

eux et à une surface, et marquée par la sécrétion d'une matrice adhésive et protectrice (Figure 3).

Plusieurs types d'interactions sont observés entre les micro-organismes se trouvant dans les biofilms. On retrouve notamment : i) le commensalisme : lors du traitement des eaux usées, certaines souches de *Pseudomonas* qui possèdent la capacité de dégrader le p-crésol peuvent en diminuer l'effet inhibiteur sur les autres souches de *Pseudomonas* (Cowan *et al.*, 2000) ; ii) le mutualisme : dans le biofilm oral, où *Streptococcus* et *Actinomyces* coopèrent et colonisent ainsi la surface des dents (Palmer *et al.*, 2001). Ce type d'interaction pourrait empêcher l'installation de communautés pathogènes au sein de la plaque dentaire ; iii) la compétition : la limitation en espace et en nutriments au sein d'un biofilm peut aboutir à une compétition entre les micro-organismes présents. A titre d'exemple, l'interaction entre *Pseudomonas* et *Agrobacterium* où le taux de croissance et la motilité sont des facteurs qui influencent chacun des micro-organismes (Dingding *et al.*, 2006).

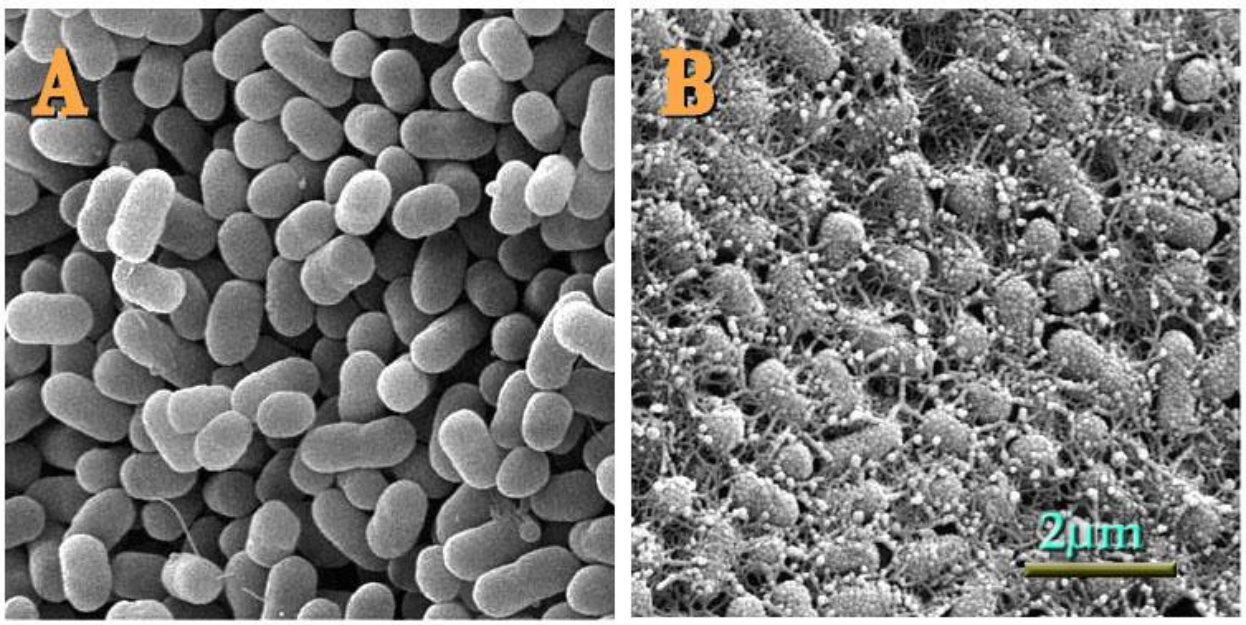


Figure 3. Un exemple d'un biofilm chez *Escherichia coli*.

Vue en microscopie électronique de deux colonies de deux souches différentes *d'Escherichia coli* O157:H7 ; la première (A) 43895OW (ne produisant pas de curli) et la seconde (B) 43895OR (produisant des curli, lui permettant de former un biofilm, de se fixer sur des parois lisses (verre, inox, téflon) et de mieux résister aux désinfectants). USDA (Pina Fratamico Microbiologist/Lead Scientist) en 2006.

Les biofilms ont un impact considérable dans le domaine de la médecine clinique. Ils peuvent être à l'origine d'infections (Hogan *et al.*, 2007) et peuvent présenter une resistance aux

antibiotiques. A titre d'exemple, *C. albicans* permet la formation du biofilm de *S. aureus* et lui confère la resistance à la vancomycine dans le sérum (Harriott and Noverr, 2009; Harriott and Noverr, 2010).

I. B. 5. 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 aussi connus chez les levures. En 2009, 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 (Monds and O'Toole, 2009).

a. Le « Quorum sensing » chez les bactéries

La communication entre les micro-organismes via des signaux chimiques appelés les auto-inducteurs, bien définie chez les bactéries, est appelée le « quorum sensing » car il repond en général à la densité cellulaire du micro-organisme (Sprague and Winans, 2006).

Le système de « quorum sensing » a été décrit pour la première fois chez *Vibrio fischeri*, une bactérie marine à Gram-négatif dont la capacité à devenir bioluminescente est liée au quorum sensing (Nealson and Hastings, 1979). Chez les bactéries à Gram négatif, le quorum sensing contrôle la synthèse enzymatique de molécules 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 de gènes cibles (Waters and Bassler, 2005) (Figure 4A). 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.

Chez les bactéries à Gram-positif à faible contenu en G+C, la communication se fait via des peptides qui sont détectés le plus souvent par un système à deux composants (Figure 4B) (Waters and 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 4B).

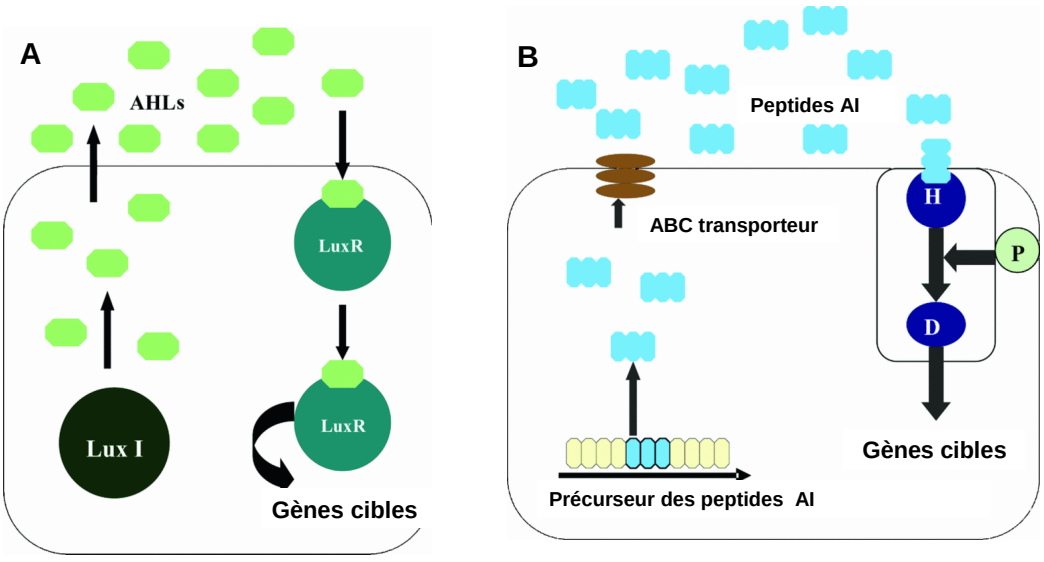


Figure 4. Mécanisme du « Quorum sensing ». D'après Waters *et al*. 2005
A- Chez les bactéries à Gram négatives **B-** Chez les bactéries à Gram positives **AHL :** Acyl-Homosérine Lactone, AI : Auto-Inducteurs, H : Histidine, D : Aspartate, P : Phosphorylation

Le « quorum sensing » a été largement étudié chez les bactéries pathogènes comme *S. aureus* pour son implication dans le contrôle de la virulence (tableau 1). 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 and 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 γ-butyrolactones, un homologue structural des AHL, contrôlent la production d'antibiotiques et la différentiation (tableau 1) (Takano 2006). Ces molécules sont synthétisées et perçues respectivement par une γ-butyrolactones synthase, AfsA, et un récepteur, ArpA.

Organisme	Molécule signal	Fonction
Bacillus subtilis	ComX	Sporulation
Lactococcus lactis	Nisine	autorégulation de Nisine
Staphylococcus aureus	AgrD	Virulence
Streptomyces coelicor	SCB1	production d'actinorhodine
Streptomyces griseus	A-Factor	production destreptomycine
Streptomyces natalensis	PI-factor	production de pimaricine
Streptomyces virginiae	virginiae butanolides	production de virginiamycin

Tableau 1. Molécules du « Quorum sensing » chez les bactéries à Gram-positive. D'après Sheetal *et al.* 2009

b. Le « Quorum Sensing » chez les levures

Chez les levures, c'est *C. albicans* qui est la levure la plus étudiée pour le phénomène du « quorum sensing ». Cette levure est un pathogène de l'être humain ; elle est dimorphique, et peut être présente soit sous forme unicellulaire, soit sous forme filamenteuse. Deux molécules de quorum sensing contrôlent sa morphogenèse : i) Le farnesol qui inhibe la forme filamenteuse à haute densité cellulaire; ii) Le tyrosol qui 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 la levure *S. cerevisiae* impliquant la production de deux alcools aromatiques. En effet, il a été montré qu'une carence en azote chez *S. cerevisiae* induit la production de phényléthanol et de tryptophol qui stimulent la morphogenèse 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 qui exerce un rétrocontrôle sur cette production (Chen and Fink, 2006).

L'ammoniaque pourrait aussi jouer le rôle d'une molécule du « quorum sensing » chez les levures (Palková *et al.,* 2003). Palková et coll. ont ainsi montré que la production

d'ammoniaque dépend de la concentration en acides aminés extra-cellulaires. En effet, une alcalinisation est observée en carence azotée et corrélée avec la production d'ammoniaque au sein même de la colonie ou des colonies voisines. En carence azotée, on observe un changement périodique de pH autour des colonies de levures (*Saccharomyces, Candida, Kluyveromyces, Hansenula*) qui passent d'une phase acide à une phase alcaline (Palková and Váchová, 2006).

L'ammoniaque 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 and Forstová, 2000; Palková and Váchová, 2006). Cette alcalinisation induit une inhibition de la croissance des levures qui rentrent ainsi en phase de latence. Cela 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'ammoniaque se réduit, ce qui provoque une chute du pH et une induction de la croissance des levures (Palková and Váchová, 2003).

Par ailleurs, des travaux ont mis en évidence le rôle de l'ammoniaque comme médiateur chez une levure d'affinage, *D. hansenii.* Sa production par une colonie de levure est transmise vers les colonies voisines, leur permettant à leur tour de produire de l'ammoniaque, aboutissant ainsi à leur développement et leur croissance (Palková and Forstová 2000; Gori et *al.,* 2007).

c. 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 *Pseudomonas 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 des facteurs de virulence lui permettant de se fixer sur la forme filamenteuse de *C. albicans* provoquant sa mort. Afin de se défendre, la levure produit du farnesol, qui va favoriser la formation de la forme levure et l'inhibition de la forme filamenteuse (Hogan *et al.,* 2004). De plus, la production de farnesol par la levure réprime les gènes impliqués dans le quorum sensing de *P. aeruginosa.* Ces deux micro-organismes ont donc mis en place un système complexe via une signalétique moléculaire qui leur assure une

co-existence au sein d'un environnement donné (Figure 5).

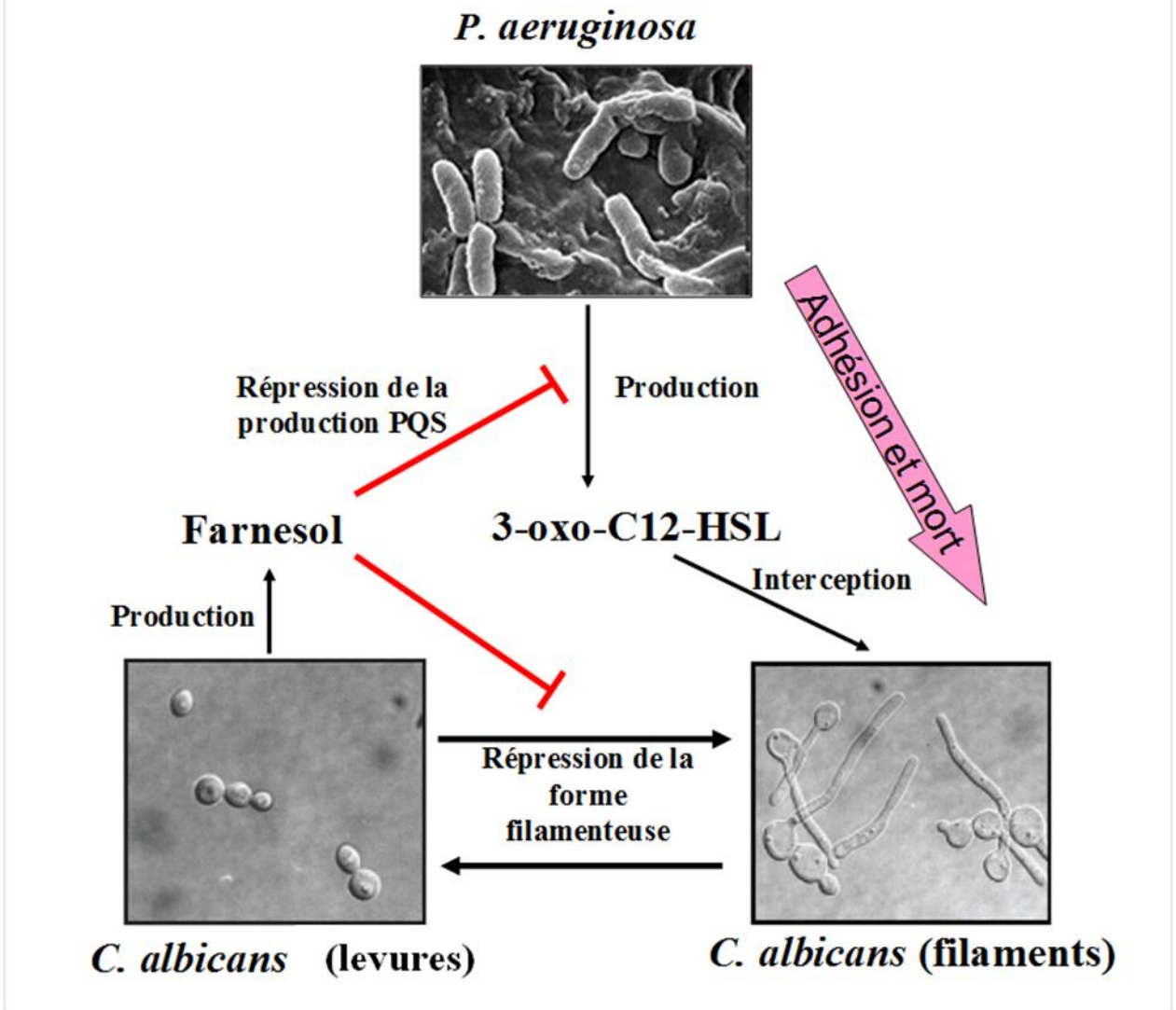


Figure 5. Interaction entre *P. aeruginosa* et *C. albicans* via des molécules du Quorum sensing, Homoserine lactone (HSL), « quorum sensing » de *P. aeruginosa* (PQS). Les flèches en rouge représentent une répression. Adapté de De Sordi *et al.* 2009

I. C. Exemple d'un écosystème microbien : le fromage

I. C. 1. 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'Epoisse, le Livarot et le Munster.

I. C. 2. La fabrication du fromage

La transformation du lait en fromage comporte quatre étapes principales (Figure 6).

- **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.

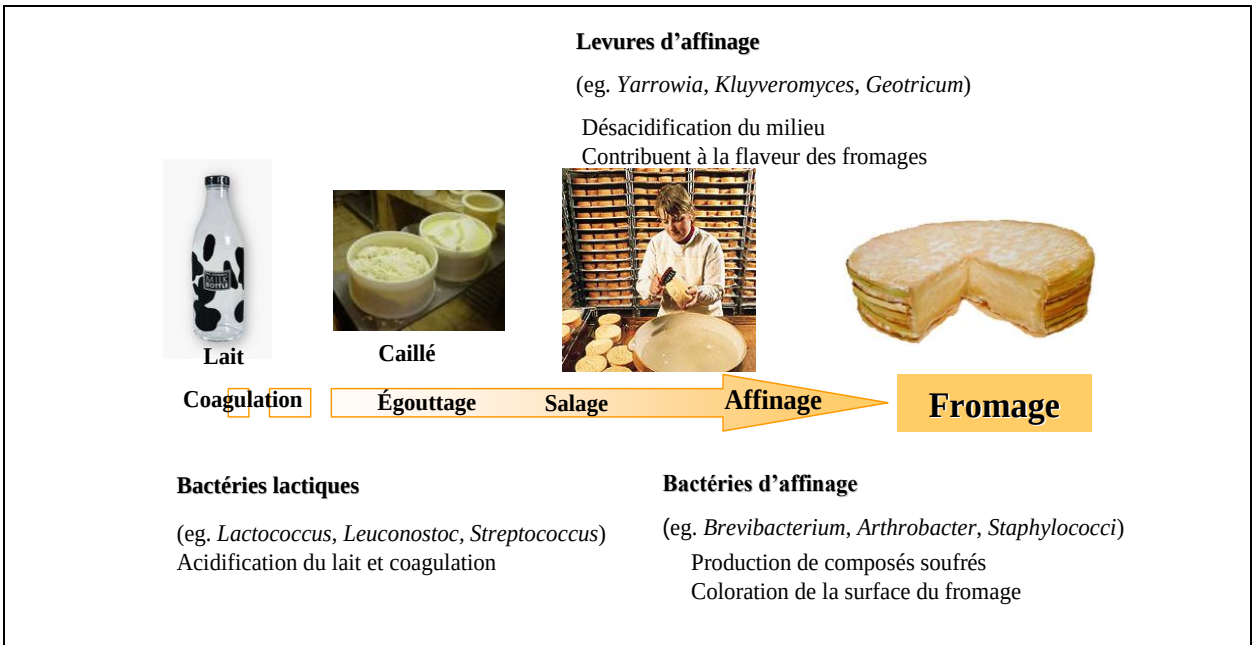


Figure 6. Les différentes étapes de fabrication d'un fromage à pâte molle.

I. C. 3. Les acteurs de l'écosystème fromager

I.C.3.1. Les levures

Les levures appartiennent à la flore naturelle du lait cru avec des teneurs moyennes de 10^4 ufc. mL^{-1} (Baroiller and Schmidt, 1990). De nombreux genres de levures sont donc retrouvés dans les fromages soit de façon naturelle, soit de façon dirigée comme le levain d'affinage. En effet, ces micro-organismes sont particulièrement adaptés à ce type de substrat car ils ont la capacité de se développer à basse température, à un faible pH et, pour certaines espèces, à de fortes concentrations en sel (Fleet, 1990).

Dans la fabrication d'un fromage, l'action des levures commence dès les premières heures de l'égouttage et se poursuit pendant tout l'affinage (Guéguen, 1995; Jacobsen and Poulsen, 1995; Leclercq-Perlat *et al.,* 1999; Leclercq-Perlat *et al.,* 2004). Des espèces variées telles que *D. hansenii*, *Y. lipolytica*, *Kluyveromyces marxianus* et *S. cerevisiae* sont fréquemment isolées en concentration élevée dans le fromage (Mounier *et al.,* 2005; Mounier *et al.,* 2006). Elles contribuent au développement des qualités organoleptiques du fromage par leurs contributions aux phénomènes telles que la protéolyse, la lipolyse, la consommation d'acide lactique et la fermentation du lactose (Addis *et al.,* 2001). Par la consommation du lactate et la production des métabolites alcalins, les levures sont les principaux agents contribuant à la remontée du pH lors des quatre à cinq premiers jours d'affinage. Cette désacidification progressive de la surface des fromages par les levures est un phénomène fondamental pour l'affinage des fromages. En effet, elle permet l'installation et le développement des bactéries acido-sensibles (Lenoir *et al.,* 1985; Guéguen and Schmidt, 1992). Ainsi, l'implantation précoce de *Brevibacterium aurantiacum* ou de la flore corynéforme est favorisée par la croissance de *G. candidum* (Lecocq *et al.,* 1996) ou de *D. hansenii* (Eliskases-Lechner and Ginzinger, 1995). D'autre part, la désacidification de la pâte contribue aux modifications de la texture (Vassal *et al.,* 1986), à l'accroissement des activités enzymatiques (Lenoir *et al.,* 1985) et à la répartition des minéraux dans le fromage (Le Graët *et al.,* 1986).

Les levures peuvent aussi être utilisées comme barrière biologique contre les micro-organismes indésirables et comme agents probiotiques (Fleet, 1999; Goerges *et al.,* 2006). Elles sont impliquées dans l'excrétion de facteurs de croissance (Ex : vitamines-B, acide pantothénique, acide nicotinique, riboflavine et biotine) (Fleet, 1990).

a. Genre *Yarrowia*

- **Taxonomie**

Y. lipolytica est un ascomycète de la famille des *Saccharomycetaceae* (sous famille des *Saccharomycetoideae*). Aucun stade sexué n'ayant été observé, elle fut dans un premier temps, classée dans le genre *Candida* jusqu'à l'identification d'une forme parfaite à la fin des années 60 (Wickerham *et al.,* 1970). La fusion entre deux cellules haploïdes de type opposé, aboutit à la formation d'un zygote diploïde capable de se maintenir de façon stable en culture mais aboutissant à la formation d'ascospores dans des conditions favorables. Cette découverte d'une reproduction sexuée a conduit à renommer la levure *Endomycopsis lypolytica* (Wickerham *et al.,* 1970), puis *Saccharomycopsis lipolytica* (Barnett *et al.,* 2000) et finalement *Y. lipolytica* (van der Walt and Von Arx, 1980). La reproduction de *Y. lipolytica* peut être également asexuée. Dans ce cas, elle consiste en un bourgeonnement bipolaire (Kreger van Rij, 1984).

- **Caractéristiques physiologiques**

Y. lipolytica est une levure non pathogène, qui présente un métabolisme aérobie strict, retrouvée dans les matrices alimentaires riches en lipides et en protéines telles que les yaourts, les fromages et la charcuterie. Elle peut aussi être retrouvée dans les sols et les effluents des égouts. C'est une levure mésophile qui croît entre 10 et 30 ºC (Kreger van Rij, 1984). Elle est reconnue comme un organisme GRAS (« Generally Recognized As Safe ») par le FDA (« American Food and Drug Administration »). Ceci permet donc de l'utiliser dans les industries agroalimentaires ou pharmaceutiques. C'est une levure dimorphique qui forme des cellules bourgeonnantes, des hyphes ou des pseudohyphes en fonction du milieu de culture.

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

Cette levure est capable d'assimiler une grande variété de substrats carbonés tels que les sucres comme le glucose, le mannitol (Kreger van Rij, 1984), des acides tels que le lactate et le citrate (Lanciotti *et al.,* 2005) ainsi que les acides aminés tels que la méthionine (Cernat Bondar *et al.,* 2005). De plus, elle peut utiliser l'éthanol (à une concentration inférieure à 3%) comme seul source de carbone (Barth and Gaillardin, 1997) ainsi que le glycérol

(Papanikolaou and Aggelis, 2003). Cette levure ne peut pas consommer le lactose et le galactose, contrairement à *D. hansenii* (Van den Tempel and Jakobsen, 2000), mais elle utilise préférentiellement les acides aminés libres comme source de carbone par rapport à l'acide lactique (Mansour *et al.*, 2008). Du fait que les acides aminés soint peu disponibles sous forme libre (caséines) dans les conditions fromagères, *Y. lipolytica* participe activement à la protéolyse grâce à des protéases et des transporteurs de peptides et d'acides aminés.

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

Les activités protéolytiques et lipolytiques de *Y. lipolytica* ainsi que sa forte adaptation au milieu fromager en font une levure intéressante, mais la rendent difficilement maîtrisable. Par conséquent, un ensemencement volontaire de cette espèce dans le lait n'est pas désiré. Sa présence dans le fromage est principalement dûe à une contamination de l'environnement laitier.

- **Caractéristiques génomiques**

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

- **Outils génétiques**

Y. lipolytica a fait l'objet de développement d'outils génétiques adaptés et performants. Ainsi, un système de transformation (Gaillardin *et al.,* 1985), un système de disruption (Fickers *et al.,* 2003), des vecteurs de type réplicatif (Fournier *et al.,* 1991) et intégratif (Gaillardin and Ribet, 1987), un système d'amplification de gènes (Le Dall *et al.,* 1994) et la caractérisation de promoteurs fortement régulés ou constitutifs (Blanchin-Roland *et al.,* 2005) facilitent l'élaboration de stratégies d'ingénierie génétique. De plus, la connaissance du génome de cette levure non conventionnelle a permis la construction d'une puce à ADN complète, permettant une étude transcriptomique.

b. Genre *Debaryomyces*

- **Caractéristiques physiologiques**

D. hansenii est une levure marine halotolérante, elle peut supporter des concentrations en sel pouvant aller jusqu'à 24%, contrairement à *S. cerevisiae* dont la croissance est inhibée quand la concentration en sel atteint les 10%. De plus, son aptitude à utiliser le lactose et l'acide lactique, sa capacité à croître à basse température, en milieu acide et en présence de sel sont autant de raisons qui permettent à cette espèce de dominer dans les saumures et les fromages (Besançon *et al.,* 1992; Roostita and Fleet, 1996a; Fleet, 1999). *D. hansenii* présente la particularité de consommer simultanément le lactose et l'acide lactique (Soulignac, 1995). Cette levure désacidifie très rapidement le caillé lors de la fabrication fromagère (consommation de l'acide lactique et production d'ammoniaque lors de la dégradation des acides aminés) (Mounier *et al.,* 2008).

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

- **Caractéristiques génomiques**

La séquence du génome entier de la souche CBS767 de *D. hansenii* a été déterminée par le consortium Génolevures. Cette levure présente un génome de 12.2 Mb sans l'ADNr, composée de sept chromosomes (Génolevures).

C'est une levure homothallique avec un cycle de vie haploide (Dujon *et al.,* 2004), elle possède les caractéristiques suivantes: i) la densité de gènes est similaire à celle de *S. cerevisiae* (un gène pour 2kb contre un pour 3,3 kb pour *Y. lipolytica*) ; ii) les introns se trouvent dans le quart de ces ADNt comme chez *S. cerevisiae*, au contraire de *Y. lipolytica* où 26 parmi 44 ADNt contiennent des introns (Marck *et al.,* 2006) ; iii) son ADNr est répati dans 3 loci intrachromosomaux différents (un seul locus chez *S. cerevisiae*) ; iv) 2 copies du gène 5S ARNr sont produites en tandem dans chaque répétition de l'unité 35S, au contraire de *S. cerevisiae* où une seule copie du 5S ARNr est située en orientation opposée entre chaque répétition du 35S (Dujon *et al.,* 2004) ; v) le codon CUG (leucine) est utilisé comme un codon sérine et il est lu par l'ARNt Ser-(ACG) similairement à *C. albicans* ; vi) son génome est plus redondant que toutes les autres levures avec une redondance globale de 49,2% (Dujon *et al.,* 2004).

I.C.3.2. Les bactéries

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

Les bactéries lactiques : la première flore à intervenir dans la fabrication du fromage est la flore lactique. Elles appartiennent au genre *Lactococcus*, *Leuconostoc* ou *Streptococcus*. Les bactéries lactiques sont des bactéries à Gram positif, anaérobie-aérobie-facultatives, mésophiles, non-mobiles, non sporulantes, ne produisant pas de catalase, ne réduisant pas les nitrates (Cantéri, 1997). Elles sont initialement présentes dans le lait ou sont inoculées volontairement à partir de ferments. Leur rôle majeur dans la fabrication du fromage est l'acidification, conduisant à la coagulation du lait, par la consommation du lactose et sa transformation en lactate (Cantéri, 1997). Cette acidification constitue une barrière pour le développement des flores acido-sensibles dont certaines espèces comme *Listeria monocytogenes* ou *Escherichia coli* sont potentiellement pathogènes.

Le deuxième intérêt fonctionnel des bactéries lactiques concerne leur activité protéolytique vis à vis des protéines du lait qui correspondent majoritairement à des caséines. Cette activité protéolytique joue un rôle important dans l'affinage du fromage et assure les besoins en acides aminés libres. La libération d'acides aminés libres est la source des précuseurs d'arômes qui contribuent à la flaveur des fromages (Bourdat-Deschamps *et al.,* 2004). De même, ils peuvent produire des arômes comme l'acétaldéhyde, l'acide acétique, l'éthanol et le diacétyle à partir du lactose et/ou du citrate (Olson, 1990; Urbach, 1995). Les bactéries

lactiques sont considérées comme faiblement lipolytiques par comparaison avec des espèces comme *Pseudobacter*, *Acinetobacter* et *Flavobacterium* (Brennan *et al.,* 2002).

Les bactéries de surface ou bactéries d'affinage, se trouvent sur la surface de plusieurs types de fromage : les fromages à pâtes molles (Ex: Camembert, Munster), les fromages à pâtes persillées (Ex : Roquefort) et les fromages à pâtes pressées cuites (Ex : Comté et Gruyère). Les bactéries d'affinage appartiennent principalement à trois groupes. Le premier est constitué de bactéries à Gram négatif, dont la présence dans les fromages est très controversée. En effet, la présence de bactéries à Gram négatif est généralement perçue comme un manque d'hygiène. Nous verrons cependant que ce groupe contient aussi des bactéries dont l'intérêt technologique est non négligeable (ex : *Hafnia alvei*, *Psychrobacter sp* et *Proteus vulgaris*) (Dahl *et al.,* 2000; Deetae *et al.,* 2007; Deetae *et al.,* 2009). Deux autres groupes, constitués de bactéries à Gram positif, sont les staphylocoques et les bactéries corynéformes (Dahl *et al.,* 2000; Mounier *et al.,* 2005; Goerges *et al.,* 2008; Mounier *et al.,* 2008).

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 (Mounier *et al.,* 2008). *Staphylococcus equorum*, *Staphylococcus vitulinus* et *Staphylococcus xylosus* sont les espèces les plus fréquemment retrouvées dans les fromages à croûte lavée (Irlinger *et al.,* 1997; Hoppe-Seyler *et al.,* 2004). 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 (Bockelmann and Hoppe-Seyler, 2001; Curtin *et al.,* 2002). Dans certains fromages, les souches de staphylocoques isolées représentent entre 2,5 à 15 % de la microflore (Bockelmann and Hoppe-Seyler, 2001; Brennan *et al.,* 2002).

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 G+C 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/ou la production d'ammoniaque. 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 (Rattray and Fox 1999; Arfi, Tâche et al. 2003; Arfi, Leclercq-Perlat et al. 2005). Elles possèdent des activités estérolytiques conduisant ainsi à la synthèse de composés d'arôme qui participent à la flaveur des fromages (Curtin *et al.,* 2002). La flore corynéforme appartient aux genres *Brevibacterium, Micrococcus, Arthrobacter, Brachybacterium, Microbacterium,* ou encore *Corynebacterium.* Récemment, de nouvelles espèces de bactéries corynéformes ont été décrites à la surface du fromage telles qu'*Arthrobacter arilaitensis*, *Arthrobacter bergerei*, *Corynebacterium casei*, *Corynebacterium mooreparkense*, *Microbacterium gubbeenense* et *Brevibacterium aurantiacum* (Brennan *et al.,* 2001a; Brennan *et al.,* 2001b; Gavrish *et al.,* 2004; Irlinger *et al.,* 2005; Mounier *et al.,* 2007).

a. Genre *Brevibacterium*

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.

- **Taxonomie et généralités**

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 G+C dans leurs génomes est élevée. 62,3% de G+C dans la 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 leur croissance. En phase exponentielle, elles sont en forme de bâtonnet mais à l'entrée de la phase stationnaire, elles se transforment en coque.

Le genre *Brevibacterium* est capable d'utiliser differentes 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'ammoniaque 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). 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[1]. 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. linen*s en deux espèces distinctes *B. linens*, dont la souche type est ATCC 9172, et *B. aurantiacum*, representée par la souche ATCC 9175 (Gavrish *et al.*, 2004). Bien que *B. linens* soit l'espèce type du genre *Brevibacterium*, c'est *B. aurantiacum* qui est la plus représentée à la surface des fromages (Gavrish *et al.*, 2004; Rea *et al.*, 2007).

[1]http://www.dsmz.de/microorganisms/bacterial_nomenclature_info.php?genus=Brevibacterium&show_all_details=1 (date 25/03/10)

- ***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.

✓ **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 (tableau 2). Le premier agent inhibiteur a été découvert par Grecz et coll. en 1959 dans le surnageant de culture de deux souches de *B. aurantiacum* (ATCC 9174 et 9175) (Grecz *et al.,* 1959). 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 and 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 and Scherer, 1994; Valdes-Stauber and 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 and 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.

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

id= indéterminé

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

✓ **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; Dufossé *et al.*, 2001).

✓ **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 composés souffrés volatils CSVs. Ces CSVs sont principalement le méthanethiol (MTL) mais aussi le sulfure d'hydrogène (H_2S) et des polysulfures comme le DMDS et le DMTS, les thioethers dont le principal est le Sulfure de Méthyl (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.

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 (Rattray and Fox, 1999).

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

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

b. Genre *Arthrobacter*

- **Taxonomie et généralités**

Le genre *Arthrobacter* appartient à la classe des *Actinobacteria*, à la sous-classe des *Actinobacteridae*, à l'ordre des Actinomycetales, au sous-ordre des *Micrococcineae* et à la famille des *Micrococcaceae*. Il est constitué de bactéries Gram-positives non sporulées, parfois mobiles, aérobies strictes, à métabolisme respiratoire, catalase positive, se présentant comme des bacilles de forme irrégulière et parfois ramifiés durant la phase exponentielle de croissance et sous la forme de cellules coccoïdes durant la phase stationnaire de croissance. En fonction de la structure du peptidoglycane, les *Arthrobacter* sp. sont divisés en deux groupes : les espèces possédant un peptidoglycane du type A3 alpha et les espèces possédant un peptidoglycane du type A4 alpha.

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

Le génome d'*A. arilaitensis* Re117 est composé d'un seul chromosome de 3,859,257 pb et de deux plasmides de 50,407 et 8,528 pb. Son contenu en G+C est environ 59,3 % (Monnet *et al*. 2010).

c. Genre *Pseudomonas*

Pseudomonas fluorescens est une bactérie à Gram négatif, oxydase positive, en forme de bâtonnet appartenant au genre des *Pseudomonas*. Elle est mobile grâce à ses multiples flagelles. De plus, elle tient la deuxième partie de son nom (*fluorescens*) du fait qu'elle est fluorescente. Cette fluorescence est due à la production d'un pigment appelé fluorescéine. Sa température de croissance optimale se situe entre 25 et 30°C. C'est un micro-organisme aérobie (Palleroni, 1984). La contamination de fromages par *P. fluorescens* est possible, la bactérie étant très présente dans l'environnement des vaches laitières (sol et plantes). Cela a pour conséquence de graves défauts sur les fromages : tâches, défauts de goûts, défauts de l'aspect des croûtes.

Les bactéries appartenant au genre *Pseudomonas*, se trouvent dans le sol, les eaux, sur les plantes et sur les animaux. Dans la nature, elles peuvent former des biofilms ou peuvent se trouver sous la forme planctonique. Dans le dernier cas, elles sont mobiles grâce à leurs flagelles. La plupart des souches appartenant au genre *Pseudomonas* sont pathogènes, tandis que *Pseudomonas fluorescens* est une bactérie non-pathogène, qui habite le sol, les plantes et les eaux. Un certain nombre de souches permet l'amélioration de la santé des plantes par le recyclage des nutriments, et possède aussi la capacité à supprimer les pathogènes agricoles telles que les infections fongiques (Silby *et al.*, 2009).

I.C.4. Les différents types d'interaction : exemples des produits laitiers

Tout au long du processus de fabrication des produits laitiers, certains micro-organismes se multiplient activement, alors que d'autres tendent à disparaître. Les interactions observées peuvent être bénéfiques, néfastes ou encore neutres. Nous pouvons citer l'amensalisme, la compétition, le parasitisme, le commensalisme et le mutualisme. Elles sont présentées dans le tableau 4 ci-dessous.

a. Amensalisme

Certains métabolites tel que les acides carboxyliques, le lactate, le peroxyde d'hydrogène ou encore les bactériocines participent à ce phénomène (Caplice and 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).

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

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

- **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 abaisse 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 and 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 and 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 and 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 and 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'H2O2 est réduit en anion superoxyde et en radical hydroxyle via la réaction de Fenton : (Fe2+ + H2O2 -> Fe3+ + HO° + 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.

b. Compétition

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 microorganismes 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 and Holden, 2002), peu d'études concernent 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 sidéphores 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 pour capter le fer en formant des complexes avec celui-ci, permettant ainsi 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).

c. Parasitisme

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 d'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 and Rassoulzadegan, 2004).

d. Commensalisme

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-tolérentes. Ces 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'ammoniaque. Ainsi, la flore bactérienne aérobie acido-sensible qui inclut *B. aurantiacum, Arthrobacter arilaitensis, C. casei, et staphylococcus equorum* 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 and Fleet, 1996; Addis *et al.*, 2001; Toelstede and 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 (Sieuwerts *et al.*, 2008).

e. Mutualisme

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 and Corrieu, 1989 ; Herve-Jimenez *et al.*, 2008).

Différentes explications ont été avancées pour expliquer ce phénomène. *S. thermophilus* possède une protéase extracellulaire 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. Cette protéase dégraderait la

caséine en oligopeptides et en acides aminés libres qui deviendraient donc assimilables par *S. thermophilus* favorisant sa croissance (Abu-Tarboush, 1996). A son tour, *S. thermophilus* stimulerait la croissance de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Ascon-Reyes *et al.*, 1995) par la production de différents produits tels que le CO_2, 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 dévéloppement. 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 un 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).

Dans la première partie de la synthèse bibliographique, nous avons vu les types d'interactions qui existent entre les micro-organimses au sein des écosystèmes. Ces interactions sont classées selon les conséquences produites ou selon le type des mécanismes impliqués. Nous avons vu aussi, que des molécules du quorum sensing produites par la bactérie comme dans le cas d'interaction entre *P. fluorescens* et *C. albicans*, induisent des changements morphologiques chez la levure (transition de la forme levure vers une forme hyphale). Nous nous sommes donc intéressés, dans le cadre de l'étude des interactions entre levures-bactéries, à étudier les changements morphologiques que peut subir la levure *Y. lipolytica* ainsi que les facteurs et les voies de signalisation qui contrôlent ces changements.

II. LE DIMORPHISME

Les levures sont des micro-organismes qui possèdent une énorme capacité à subir des changements morphologiques, afin de coloniser et de s'adapter à de nouveaux environnements. Certains d'entre eux partagent le même critère morphologique, le dimorphisme.

Le dimorphisme est la capacité que possèdent certains micro-organismes de croître sous la forme ronde type levure connue par « yeast-like » ou sous la forme filamenteuse et ceci sous l'effet de plusieurs facteurs environmentaux (Ruiz-Herrera and Sentandreu, 2002) (Adan Topiltzin *et al.*, 2012). Cette propriété n'est pas spécifique pour un seul groupe taxonomique, mais elle est partagée par plusieurs espèces représentatives des basidiomycètes, des

ascomycètes et des zygomycètes.

L'étude du dimorphisme a pris beaucoup d'importance, non pas parce qu'il représente un modèle expérimental pour l'étude de la différenciation cellulaire chez les eucaryotes, mais parce qu'il est impliqué dans la virulence chez certaines levures comme *Candida albicans*. La nature diploïde de *C. albicans* ainsi que l'absence d'un cycle sexuel, rendent néanmoins son utilisation et sa manipulation plus difficile. *S. cerevisiae* a été aussi utilisée pour étudier le dimorphisme, elle n'est capable de pousser que sous forme pseudohyphale, à la différence de *Yarrowia lipolytica* qui pousse sous forme levure « yeast-like », pseudohyphes et hyphes. Puisqu'il existe des différences dans les voies qui contrôlent ces deux formes pseudohyphales et hyphales, *Y. lipolytica* semble être le modèle le mieux adapté pour étudier le dimorphisme et ceci pour plusieurs raisons : i) sa capacité à croître sous forme « yeast-like », hyphale et pseudohyphale ; ii) elle présente un cycle sexuel et peut pousser sous forme diploide et haploide. Enfin, elle présente une facilité pour la manipulation génétique (Morín *et al.*, 2007).

II. A. Le dimorphisme chez *Saccharomyces cerevisiae*

Sous l'effet de certains facteurs environmentaux, les cellules de *Saccharomyces cerevisiae* subissent une transition dimorphique depuis la fome ronde connue sous le nom de « yeast-like » vers la forme filamenteuse. Les cellules diploïdes de *S. cerevisiae* présentent une forme pseudohyphale tandis que les cellules haploïdes présentent une croissance invasive dite « invasive growth » (Lengeler *et al.*, 2000). Les pseudohyphes sont des chaînes linéaires formées de cellules allongées où les cellules filles restent attachées à la cellule mère (Pérez-Campo and Domínguez, 2001), tandis que la forme invasive présente la capacité des cellules de pénétrer l'agar sur un milieu solide, ceci pouvant être mis en évidence après un lavage des cellules à l'eau (Pérez-Campo and Domínguez, 2001) Ces deux formes morphogénétiques partagent certaines similarités au niveau des voies de signalisations qui les contrôlent, qui seront décrites dans le paragraphe dédié pour ce but.

II. A. 1. Les facteurs responsables du dimorphisme

Quand le milieu est carencé en sources azotées, les cellules haploides et diploides de *S. cerevisiae* présentent une croissance invasive et une capacité de pénétrer l'agar sur un milieu solide (Pérez-Campo and Domínguez, 2001). En revanche, le sérum, contrairement à ce qui est observé chez *C. albicans*, n'a aucun effet sur la transition dimorphique chez *S. cerevisiae* (Kim, 2000).

II. A. 2. Les voies de signalisations impliquées dans le contrôle du dimorphisme

Deux voies de signalisation contrôlent la transition dimorphique chez la levure *S. cerevisiae* ainsi que chez d'autres levures, la voie de « MAP kinase ou MAPK » et la voie de « AMPc-PKA », qui sont shématisées dans la figure 7. La voie de signalisation MAPK, contrôle à la fois la filamentation dans les cellules diploïdes sous l'effet d'une carence en sources azotées ou autres facteurs environnementaux et la conjugaison ou le « mating » dans les cellules haploïdes sous l'action des phéromones (figure 8).

La différence entre ces deux cascades MAPK est la suivante : i) La MAPK cascade qui contrôle la conjugaison ou « mating » est activée par les sous-unités ßγ de la protéine héterotrimérique G, à la différence de la MAPK cascade qui contrôle la filamentation, qui elle est activée par un mécanisme différent impliquant la participation des protéines Cdc42, Ras2, Bmh1 et Bmh2 ; ii) dans la voie du « mating », les composants de la voie MAPK (Ste11, Ste7, Fus3) sont attachés ensemble par la protéine d'échafauage Ste5, qui ne joue pas de rôle durant la filamentation dans les cellules diploïdes. Il a été proposé que la protéine Spa2, pourrait jouer un rôle dans l'attachement des composants de la MAPK (Ste11, Ste7 et Kss1) pendant la croissance filamenteuse ; iii) Fus3 contrôle la voie de « mating » et inhibe la croissance invasive de *S. cerevisiae*, tandis que la protéine kinase Kss1 contrôle la filamentation et joue un rôle dans la levée de la représsion de Dig1 et Dig2 sur Ste12 (figure 7 et 8) ; iv) Finalement, dans le « mating », Ste12 interagit avec la protéine Mcm1 pour activer la transcription des gènes responsables de la réponse aux phéromones, tandis que Ste12 interagit avec Tec1 afin d'activer la transcription des gènes responsables de la filamentation (figure 8).

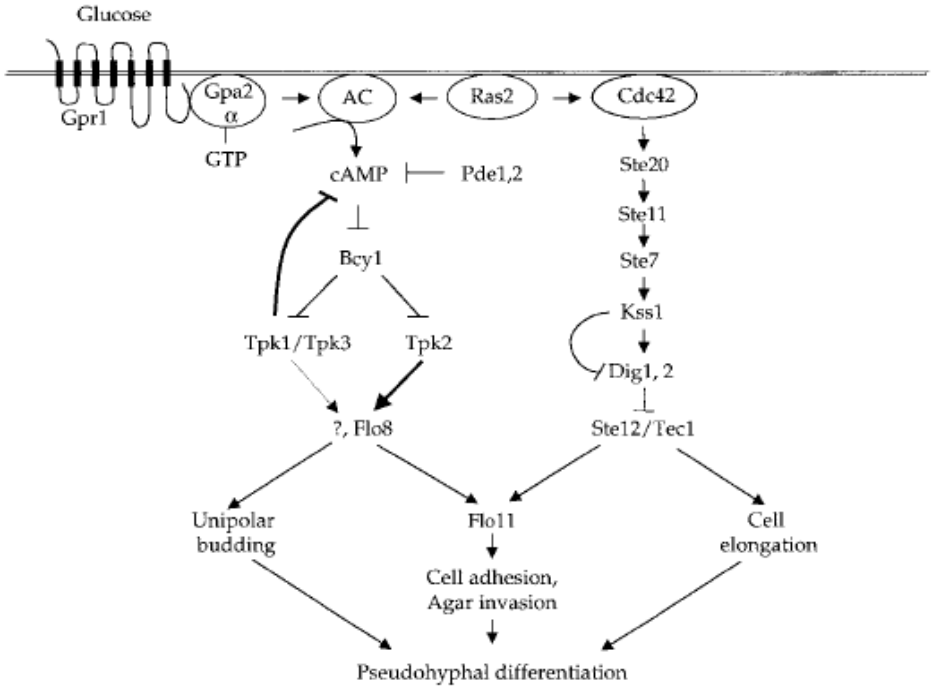


Figure 7 : les voies de signalisation (MAP kinase et AMPc-PKA) qui contrôlent la filamentation chez *S. cerevisiae*. AC : adényle cyclase. Adapté de Lengeler *et al.*, 2000.

L'hétérodimère Ste12-Tec1 de la voie MAPK permet la régulation de l'expression de Tec1 lui-même, et de la flocculine Flo11 qui est nécessaire pour la filamentation chez *S. cerevisiae*. Les phéromones, les récepteurs à phéromones, les sous-unités de la protéine G hétérotrimérique, sont indispensables à la filamentation de *S. cerevisiae* mais ne sont pas exprimés dans les cellules diploïdes.

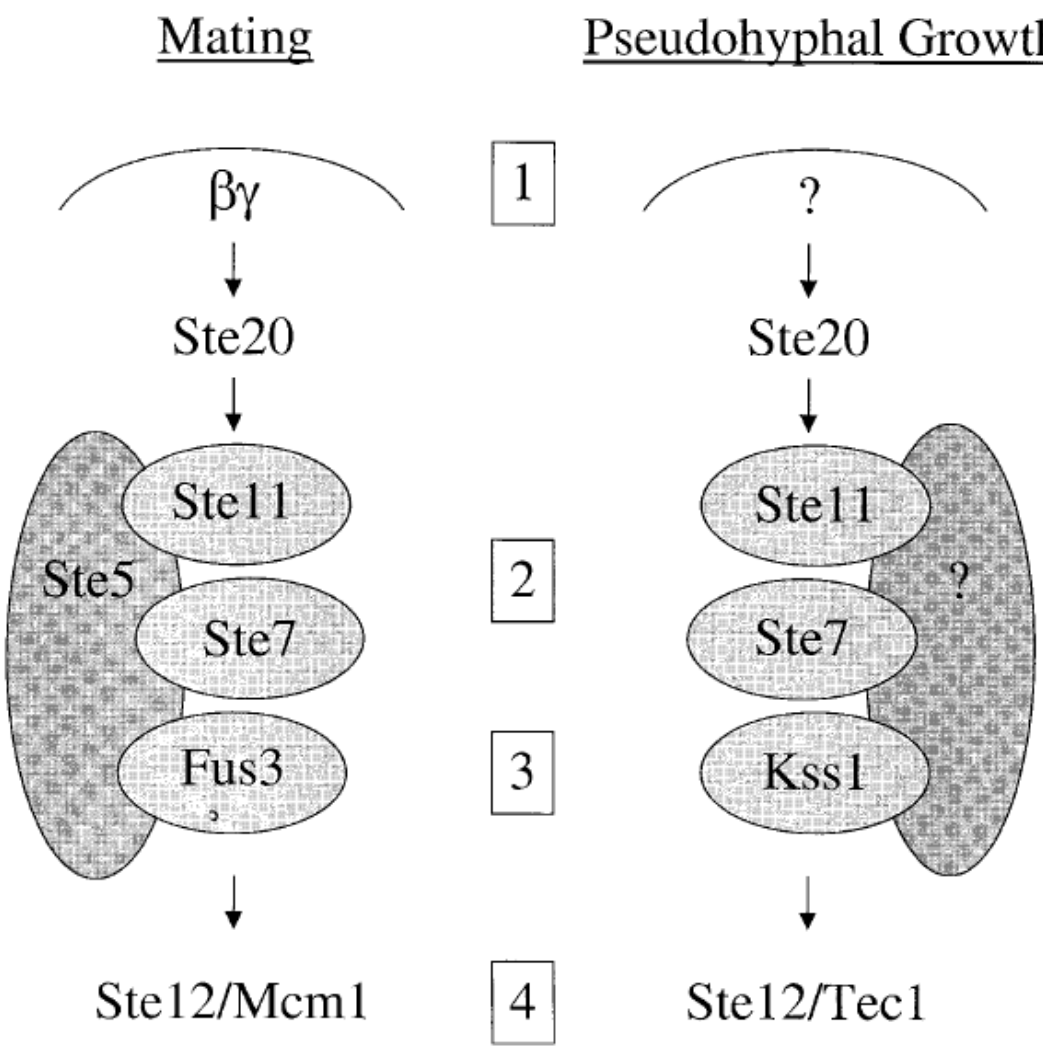


Figure 8 : les deux cascades de la voie de la MAP kinase qui contrôlent le « mating » phénomène et la croissance filamenteuse chez *S. cerevisiae*. Adapté de Lengeler *et al.*, 2000.

La voie de signalisation AMPc-PKA, implique la participation du récepteur Gpr1, des protéines G Gpa2 et Ras2, de l'adényle cyclase (AC), de l'AMP cyclique (AMPc) et de la protéine kinase AMP cyclique dépendante (formée d'une sous-unité régulatrice codée par le gène *BCY1* et de 3 sous-unités catalytiques codées par les 3 gènes *TPK1*, *TPK2* et *TPK3*) (figure 7). Le récepteur Gpr1 est couplée à la sous-unité α de la protéine G hétérotrimérique Gpa2, et tous les deux sont impliqués dans la différenciation pseudohyphale chez *S. cerevisiae*. De même pour les sous-unités catalytiques de la protéine kinase AMP cyclique dépendante qui sont impliquées dans la régulation de la filamentation. La sous-unité catalytique Tpk2, contrôle positivement la filamentation et ceci par la régulation du facteur de transcription Flo8 qui à son tour permet la régulation de l'expression du gène *FLO11*. Flo11 est une protéine de surface en liaison avec un groupement glycosylphosphatidylinositol (GPI),

qui joue un rôle dans la croissance en pseudohyphes et dans la croissance invasive dans les cellules haploides. Les sous-unités catalytiqus Tpk1 et Tpk3 contrôlent négativement la filamentation et ceci probablement par inhibition de la production de l'AMP cyclique. La mutation de la sous-unité régulatrice de la voie « AMPc-PKA », Bcy1, favorise la croissance filamenteuse chez la levure.

II. B. Le dimorphisme chez *Candida albicans*

Candida albicans qui est un micro-organisme diploïde avec un cycle sexuel inconnu, est considérée comme étant la levure pathogène commune de l'être humain. Cette levure est à l'origine de plusieurs infections superficielles de la muqueuse et peut causer des maladies mortelles chez les patients immunodéprimés. Cette levure est dimorphique, elle a l'aptitude de pousser sous la forme ronde « yeast-like », ainsi que sous la forme filamenteuse (pseudohyphes ou hyphes) et ceci sous l'effet de plusieurs facteurs environmentaux. La capacité de subir ces changements dimorphiques reversibles, est essentielle à la virulence de cette levure pathogène (Lengeler *et al.*, 2000).

II. B. 1. Les facteurs responsables du dimorphisme

Similairement aux autres levures, le N-acétylglucosamine (GlcNAc), le pH, le sérum, la proline et la température contribuent à la transition dimorphique chez *C. albicans* (Pérez-Campo and Domínguez, 2001). Le sérum constitue le facteur le plus puissant qui induit la transition dimorphique chez *C. albicans* (Brown and Gow, 1999; Kim *et al.*, 2000).

II. B. 2. Les voies de signalisation qui contrôlent le dimorphisme

La voie de la MAPK qui gère la croissance filamenteuse chez *C. albicans* présente certaines différences avec celle de *S. cerevisiae*. Le facteur de transcription Cph1 a été identifié chez *C. albicans* comme l'homologue de Ste12 de *S. cerevisiae* (figure 9). La voie MAPK implique la participation des protéines kinases suivantes : Cst20 (homologue de Ste20 chez *S. cerevisiae*), Hst7 (homologue de Ste7 de *S. cerevisiae*) et Cek1 (homologue de Fus3 et Kss1 de *S. cerevisiae*) (figure 9).

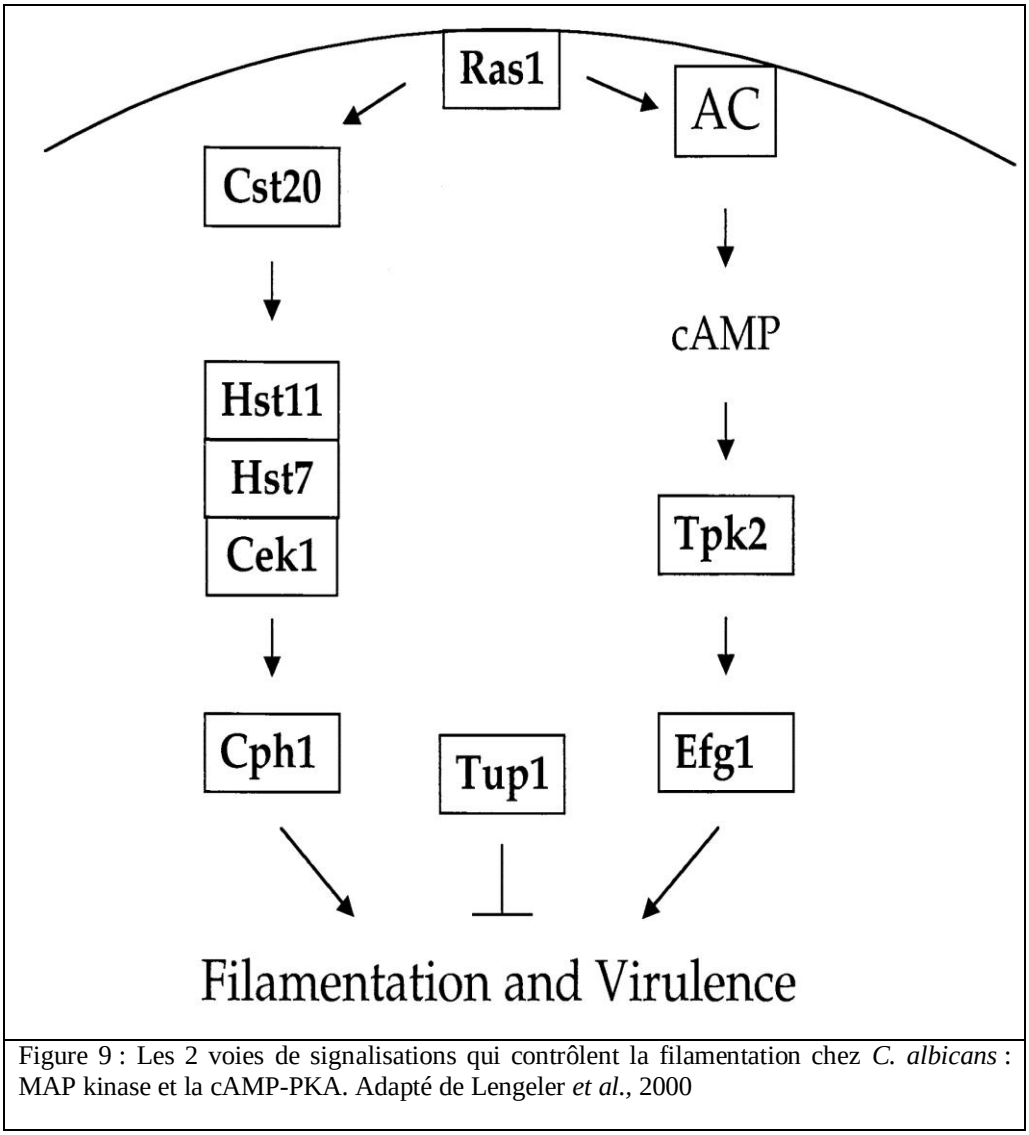


Figure 9 : Les 2 voies de signalisations qui contrôlent la filamentation chez *C. albicans* : MAP kinase et la cAMP-PKA. Adapté de Lengeler *et al.*, 2000

II. C. Le dimorphisme chez *Yarrowia lipolytica*

Yarrowa lipolytica est une levure ascomycète non-conventionnelle, qui possède une importance majeure par son utilisation dans de nombreuses applications biotechnologiques. En effet, cette levure présente un certain nombre de propriétés intéressantes, parmi lesquelles sa capacité à dégrader les acides gras et les hydrocarbones, sa capacité à exprimer des protéines hétérologues et homologues, sa capacité à produire des acides organiques ainsi que des molécules intéressantes pour l'industrie arômatique (Barth and Gaillardin, 1997; Ruiz-Herrera and Sentandreu, 2002; Fickers *et al.,* 2005; Cervantes-Chavez *et al.,* 2009). Cette levure est généralement isolée des produits riches en lipides comme le fromage, les olives et les huiles, etc (Pérez-Campo and Domínguez, 2001).

II. C. 1. Les facteurs responsables du dimorphisme

Parmi les facteurs étudiés pour induire le dimorphisme peuvent être cités: le pH, les sources de carbones (comme le glucose, le N-acétylglucosamine connu par « GlcNAc ») et les sources azotées (comme l'ammonium), le citrate, le sérum, la température et le stress anaérobique (Rodriguez and Dominguez, 1984; Ruiz-Herrera and Sentandreu, 2002).

Le pH neutre (pH =7) favorise la forme mycéliale et le pH acide (pH= 3) favorise la forme type levure « yeast like », ceci est observé sur un milieu liquide, chez la souche sauvage de Y. lipolytica W29 et de son mutant auxotrophique PO1a (Ruiz-Herrera and Sentandreu, 2002). Tandis que chez le basidiomycère *Ustilago maydis* à titre d'exemple, c'est le phénomène inverse qui est observé (Ruiz-Herrera *et al.,* 1995). De plus, Chez la souche de Y. lipolytica (SA-1), il a été démontré que le pH n'a aucun effet sur la formation des filaments (Pérez-Campo and Dominguez, 2001), indiquant que les facteurs qui influencent le dimorphisme, peuvent varier d'une espèce à l'autre, mais aussi d'une souche à l'autre.

Le rôle du glucose dans la transition dimorphique a également été observé chez la souche *Y. lipolytica* W29 et de son mutant auxotrophique PO1a (Ruiz-Herrera and Sentandreu, 2002), au contraire de ce qui est observé chez la souche *Y. lipolytica* SA-1, où l'addition de « GlcNAc » ou de sérum est nécessaire pour favoriser cette transition (Pérez-Campo and Dominguez, 2001).

De même, il a été décrit que les sources azotés permettent la transition dimorphique de la forme type levure « yeast-like » vers la forme mycéliale. L'ammonium peut présenter un exemple, tandis que la glutamine et la glutamate ne favorisent pas la transition dimorphique et peuvent même l'inhiber, ceci est observé chez *Y. lipolytica* W29 et de son mutant auxotrophique PO1a (Ruiz-Herrera and Sentandreu, 2002). Par contre, chez *Y. lipolytica* SA-1, l'ajout de la lysine et de la proline comme sources azotées favorisent la formation mycéliale (Pérez-Camp and Dominguez, 2001). Ce résultat est contradictoire avec celui décrit chez *C. albicans* et *S. cerevisiae* où une carence en sources azotés favorise la formation mycéliale (Gimeno *et al.,* 1991; Brown, 1999).

Le sérum qui n'est pas un constituant naturel de l'environnement de la levure *Y. lipolytica*, joue un rôle dans la transition dimorphique de la forme type levure « yeast-like » vers la forme mycéliale. De plus le sérum peut favoriser la croissance invasive des cellules diploides et haploides chez *Y. lipolytica* SA-1 et ceci sur un milieu solide.

De même, le stress anaérobique peut contribuer au dimorphisme chez *Y. lipolytica*, avec des cellules qui présentent de longues hyphes dans les conditions semi-anoxiques (Ruiz-Herrera and Sentandreu, 2002).

II. C. 2. Les voies de signalisation qui contrôlent le dimorphisme

De même que chez *S. cerevisiae* et *C. albicans*, les facteurs qui influencent le dimorphisme chez *Y. lipolytica*, agissent à travers les deux voies de signalisation MAPK et AMPc (Lengeler, *et al.*, 2000; Martínez-Espinoza *et al.*, 2004). Contrairement à *C. albicans* où les deux voies agissent dans le même sens pour réguler la transition dimorphique, ces deux voies MAPK et AMPc-PKA agissent de façon opposée sur le dimorphisme chez *Y. lipolytica* (Biswas *et al.*, 2007). Ruiz-Herrera et Sentandreu en 2002 ont montré que l'addition d'AMP cyclique favorise la forme « yeast-like » (Ruiz-Herrera and Sentandreu, 2002) contrairement à *C. albicans* et *S. cerevisiae* (Sabie and Gadd, 1992; Lorenz, 1997), De plus, Cervantes-Chavez et Ruiz-Herrera en 2006 ont montré que la délétion du gène STE11 (le premier membre de la cascade MAPK) permet la croissance des celllules sous la forme levure « yeast-like » (Cervantes-Chávez and Ruiz-Herrera, 2006). Ce qui indique que la voie MAPK favorise la forme mycéliale alors que la voie AMPc-PKA favorise plutôt la forme levure « yeast-like ». De plus, il a été observé que les mutants du gène STE11 sont incapables de subir la transition dimorphique en réponse au pH neutre, au sérum ou encore au citrate. Ces résultats montrent que Ste11, est impliqué dans une voie unique qui contrôle le dimorphisme, indépendamment des autres stimuli connus pour influencer la morphologie (comme le pH, le sérum, etc). Par contre, chez les autres levures comme *C. albicans*, il y a une multiplicité de voies qui régulent le dimorphisme (Cervantes-Chávez and Ruiz-Herrera, 2006).

Des analyses *in silico* ont montré qu'il n'y a qu'un seul gène qui code la sous-unité catalytique de PKA, le gène *TPK1*, tandis que 2 gènes sont trouvés chez *C. albicans* (Sonneborn *et al.*, 2000) et 3 gènes chez *S. cerevisiae* (Toda *et al.*, 1987). Malgré la multiplicité de ce gène chez les différents micro-organismes, généralement un seul gène est responsable de l'activité de la voie PKA. Le mutant en Tpk1 de *Y. lipolytica*, croît essentiellement sous la forme hyphale (Cervantes-Chavez *et al.*, 2009).

II. C. 3. Le « Mating » et son rôle dans le dimorphisme

Des travaux ont montré que la délétion du gène TPK1 de la voie AMPc-PKA diminue fortement la capacité des cellules à réaliser le « mating » tandis que le double mutant

Tpk1 /Ste11, perd totalement la capacité du « mating ». Ce résultat montre que la voie de la MAPK et la voie AMPc-PKA agissent en synergie pour réguler le « mating » chez *Y. lipolytica*, contrairement à leur action pendant la filamentation (Cervantes-Chavez *et al.*, 2009).

RESULTATS-DISCUSSION

RESULTATS-DISCUSSION

I. Etude de l'interaction entre deux levures fromagères *Yarrowia lipolytica* et *Debaryomyces hansenii* sur un milieu chimiquement défini (MCD)

A. Introduction

Le fromage est un milieu complexe où les levures, bactéries et moisissures sont en interaction. Les travaux (Mounier *et al.*, 2008) ont montré une inhibition de croissance de la levure *D. hansenii* en présence de *Y. lipolytica* et/ou *G. candidum* dans un modèle fromager. Mais les mécanismes responsables de cette interaction restent à élucider. Afin de faciliter l'étude de cette interaction et la compréhension de ses mécanismes, nous avons entrepris d'utiliser un milieu chimiquement défini (MCD). En effet, le milieu MCD présente l'avantage d'être facilement manipulable, il contient tous les éléments essentiels qui sont présents dans un fromage (lactose, lactate, acides aminés, sels et vitamines) et les concentrations de ces éléments peuvent être contrôlées. De même, ce milieu permet de s'affranchir des difficultés d'extraction d'ARN, dans la matrice fromagère, permettant ainsi la possibilité d'étude des mécanismes d'interactions par la technologie de puces à ADN ou microarrays, avec des techniques éprouvées.

L'interaction entre les deux levures fromagères *D. hansenii* 1L25 et *Y. lipolytica* 1E07 a été étudiée. Des mono- et des co-cultures de ces deux levures ont été conduites dans le milieu MCD. La croissance des deux levures a été suivie, et des analyses microbiologiques, chimiques et transcriptomiques ont été effectuées. L'analyse des résultats nous permettra de mieux comprendre le type d'interaction qui existe entre les deux levures dans un milieu chimiquement défini, et d'appréhender les mécanismes impliqués dans ces interactions.

B. *Publication n°1*: "Adaptive response of *Debaryomyces hansenii* in co-culture with *Yarrowia lipolytica*: switch from respiratory to fermentative metabolism"

Soumis dans le Journal: Applied and Environmental Microbiology

Adaptive response of *Debaryomyces hansenii* in co-culture with *Yarrowia lipolytica*: switch from respiratory to fermentative metabolism.

Reine Malek[1], Pascal Bonnarme[2], Françoise Irlinger[2], Pascale Frey-Klett[3], Djamila Onésime[1], Julie Aubert[4], Valentin Loux[5], Jean-Marie Beckerich[1*]

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

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

[3] UMR 1136 INRA-Université de Lorraine Interactions Arbres/Microorganismes, 54280 Champenoux, France.

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

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

[*]Corresponding author:

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

KEY WORDS: *Yarrowia lipolytica*, *Debaryomyces hansenii*, inhibition of growth, respiration and fermentation.

ABSTRACT

Yeasts play a crucial role in cheese ripening. They contribute to the deacidification of the curd, the establishment of acid-sensitive bacterial communities, and the production of flavour compounds via proteolysis and catabolism of amino acids (AA). Negative yeast-yeast interaction was observed between the yeast *Yarrowia lipolytica* 1E07 and the yeast *Debaryomyces hansenii* 1L25 in a model cheese but needed to be elucidated. *Y. lipolytica* 1E07 and *D. hansenii* 1L25 were cultivated in pure and mixed cultures in a liquid synthetic medium mimicking the cheese environment and the growth inhibition of *D. hansenii* 1L25 in the presence of *Y. lipolytica* 1E07 was reproduced. We carried out microbiological, biochemical analysis (consumption of lactose, lactate, amino acids and ammonia production) and transcriptomic analyses by microarray technology to highlight the mechanisms of interaction. We showed that the inhibition of *D. hansenii* 1L25 growth in the presence of *Y. lipolytica* 1E07 was neither due to the ammonia production nor to the nutritional competition for the carbon sources of the medium between the two yeasts. The transcriptomic study was the key towards comprehension of yeast-yeast interaction, and revealed that the inhibition of *D. hansenii* 1L25 in mixed culture is due to a dysfunction of the mitochondrial respiratory chain.

INTRODUCTION

In surface-ripened cheese, lactic acid produced by starter LAB is consumed by yeasts such as *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces lactis* and *Geotrichum candidum*. This leads to the deacidification of the cheese surface, enabling the development of acid-sensitive bacteria (18, 26, 27). Deacidification is also related to the ability of yeasts to degrade amino acids (26) and to produce alkaline metabolites such as ammonia (6, 14, 22, 26). Cheese is thus a complex ecosystem where microbial interactions take place (9). The functional interactions between yeasts are not yet understood, and only a few ones have been studied so far (27). The yeast *Yarrowia lipolytica* was observed inhibiting the mycelial growth and sporulation of *Penicillium roqueforti* in Danablu cheese (40), as well as the growth of *G. candidum* and *D. hansenii* in model cheeses (27). The mechanisms involved in the growth inhibition of *D. hansenii* by *Y. lipolytica* needed to be identified.

Ammonia, carbon and/or nitrogen sources were suggested to play a role in the interactions between yeasts. Amino acids play an important role in cheese ripening. They are precursors of volatile aroma compounds and are thus involved in the complex process of cheese flavor development (43). Their presence in the medium is required for the production of ammonia (26, 31) which participated to the deacidification of cheese curd and which has been observed to negatively impact the development and survival of neighboring yeast colonies on agar plates (14, 30, 31). Because *Y. lipolytica* produces large amounts of ammonia (26, 27), it has been proposed that ammonia produced by *Y. lipolytica* could inhibit the growth of *D. hansenii* (27).

Growth inhibition may also result from a yeast-yeast competition for nutrients such as carbon and/or nitrogen sources (e.g. lactate, lactose, amino acids). Lactate which results from the conversion of lactose by the lactic acid bacteria (LAB), and amino acids which result from casein proteolysis, constitute the main carbon and/or nitrogen sources necessary for microbial growth (17, 26, 37, 42). The majority of yeast species isolated from cheese efficiently degrade lactate (9, 10), whereas, for instance, *K. lactis*, *K. marxianus* and *D. hansenii* assimilate lactose (8). It has been reported that *D. hansenii* simultaneously assimilates lactose and lactate (21, 26, 34), while *Y. lipolytica* assimilates only lactate but not lactose (2, 26).

The aim of this study was to reproduce in a synthetic liquid medium, the negative interaction observed between *Y. lipolytica* and *D. hansenii* in a model cheese (27) in order to give insights into the mechanisms of the inhibition of growth. In the first part of this work, yeast growth dynamics were described and targeted biochemical analyses were performed to test different mechanistic hypotheses. In the second part, a non-targeted transcriptomic approach

based on cDNA microarray was carried out which was essential for the comprehension of the yeast-yeast inhibition.

MATERIALS AND METHODS

Yeast strain and storage conditions. The microorganisms used throughout this work were *Yarrowia lipolytica* 1E07 and *Debaryomyces hansenii* 1L25, originally isolated from the Livarot French cheese. They were obtained from the MILA culture collection (Laboratoire des Micro-organismes d'Intérêt Laitier et Alimentaire (Université de Caen, France)) and selected for their biotechnological potential. Yeasts were stored in a 10 % glycerol yeast-potato-dextrose (YPD, Difco laboratories, USA) at -80ºC.

Culture conditions. Yeasts were first precultured in 100 ml flask containing 20 ml of liquid synthetic medium (SM), inoculated with thawed stock suspension, for 48 hours at 25ºC and 150 rpm. This synthetic medium, described by Mansour *et al.* 2008 (26), is close to the cheese medium. Four hundred µl of each preculture were used to inoculate 20 ml of liquid SM in 100-ml flasks, incubated at 25°C for 24 h at 150 rpm. These second pre-cultures were then inoculated in a 500-ml flask containing 100 ml of medium. The pH of the culture media was adjusted to 6.7. Two concentrations of amino acids (AA) were used (2XAA and 0.1XAA) in order to modulate the quantity of ammonia produced by *Y. lipolytica* (26) and to test its possible effect on yeast-yeast interactions. *D. hansenii* 1L25 and *Y. lipolytica* 1E07 were cultivated in pure and mixed cultures. In the first part of the study, both yeasts *D. hansenii* and *Y. lipolytica* were inoculated at 1:1 *ie* 1E+05 CFU ml^{-1} in mixed culture. In the second part of the study, these two yeasts were inoculated at 3/4:1/4 *ie* 1.5E+05 CFU ml^{-1} and 5E+04 CFU ml^{-1}, respectively.

Microbial and substrate analyses. The yeast population was quantified by surface plating in triplicate using yeast-glucose-chloramphenicol agar (YEGC, Biokar Diagnostics, Paris, France) supplemented with 0.01 g l^{-1} tetrazolium chloride (TTC, Sigma, USA) after two days of incubation at 25°C. Addition of TTC was used to ensure immediate differentiation of the colonies based on their size, appearance and pigmentation, and to detect any microbial contamination.

The pH was measured and pH values were arithmetic means of three measurements. The lactose and lactate contents were determined using high-performance liquid chromatography as previously described by Mansour *et al.* 2008 (26).

Free amino acids in the medium were measured by high-performance liquid chromatography (1200 series, Agilent). The amino acids were automatically derived with *o*-phthaldialdehyde

(OPA) for primary amino acids and 9-fluorenylmethyl-chloroformiate (FMOC) for secondary amino acids. The derivatives were separated on column Hypersil C18 (Agilent) (200 x 2.1 mm, 5 µm) at 40°C by a gradient of acetate buffer (pH 7.2) and acetonitrile. A diode-array detector was used to measure the amino acid derivatives at 338 nm for OPA derivatives and 262 nm for FMOC derivatives.

Ammonia content was measured using Nessler reagent. One hundred µl of supernatant was mixed with 50 ml of distilled water. One milliliter of Nessler reagent was then added (Prolabo, Paris, France), incubated (10 min, 25°C), and analysed at 430 nm with a spectrophotometer (Shimadzu UV-160A, Kyoto, Japan).

Ethanol production was determined by the UV method (Boehringer Mannheim, Germany). It consisted in two reactions; the first consisted to oxidize ethanol to acetaldehyde, by the nicotinamide-adenine-dinucleotide (NAD^+), in the presence of alcohol dehydrogenase (ADH). One molecule of NADH was formed. In the second reaction, the acetaldehyde was oxidized into acetic acid, by NAD^+ in the presence of aldehyde dehydrogenase (AL-DH), and another molecule of NADH was formed. To calculate the concentration of ethanol, we measured the quantity of NADH produced in the 2 reactions, by measuring its absorption at 334 nm, 340 nm or 365 nm.

Microbiological data such as cell counts (CFU ml^{-1}) were statistically compared by the Student test using the R software (version 2.12.0). Means and standard deviation were calculated for all the parameters carried out in triplicate (CFU ml^{-1}, pH, ammonia, lactose, lactate and ethanol).

Extraction and purification of total RNA. Pure and mixed cultures of *D. hansenii* 1L25 and of *Y. lipolytica* 1E07 were cultivated in the SM 2XAA and centrifuged for 10 min at 4000 g and 4ºC. Pellets were resuspended in Trizol®Reagent (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) (100 mg of pellets per 1 ml of Trizol) and total RNA was extracted according to Mansour et al., 2009 (25). RNA quality and quantification were analyzed using a NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA) and a Bioanalyser Agilent 2100 (Agilent, Palo Alto, CA, USA).

Synthesis and purification of fluorescent cRNA. Since *D. hansenii* 1L25 cells represented 29% of the total cells in the coculture condition in SM 2XAA at time 12h and 27h, 50 ng and 146 ng of total RNA were respectively used for the pure culture and the mixed culture. Total RNA was lineary amplified and labeled using two different fluorescent dyes: cyanine 3-CTP (Cy-3), and cyanine 5-CTP (Cy-5) as described in the Agilent Low Input Quick Amp Labeling kit (Version 6.5, May 2010). Amplified fluorescent cRNA probes were purified

using the Qiagen's RNeasy mini-spin columns. Finally, fluorescently labeled cRNA samples were analyzed for yield, dye incorporation and quality using the NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA) and a Bioanalyser Agilent 2100 (Agilent, Palo Alto, CA, USA). Only samples that presented a concentration of > 6 pmol/µg (a measure representing efficient dye incorporation) were used for hybridization, as recommended by the manufacturer.

***D. hansenii* microarray design.** *D. hansenii* genome sequence data obtained from the Génolevures public database (http://www.genolevures.org/) were used as a base for microarray design. Probe design was performed using ROSO (33) 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 (Tm), iii) lack of secondary structures, iv) distance from the 3' end of the gene. We ran ROSO on the 6276 candidate target genes. Our objective was to obtain one probe of length between 40 and 60 nucleotides per target gene with a Tm around 80°C. Probes have to be in exon and should be 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, 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.

27 target genes (0.47%) have no probes 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. 3 negative controls of length 40, 50 and 60 (randomly generated with the same GC% as *D. hansenii* and no cross-hybridation) were also included in the array.

Hybridization and washing protocol. The expression profiles of *D. hansenii* 1L25 grown in the presence or in the absence of *Y. lipolytica* 1E07 were analysed using DNA microarray (Agilent USA). Cy-3 labeled cRNA were combined with Cy-5 labeled cRNA experimental targets obtained respectively from 12 h and 27 h samples, in both pure culture of *D. hansenii* 1L25 and mixed culture. The combined pure and mixed culture cRNA experimental targets at 12 h or 27 h were used for probe hybridization onto microarrays. Dye switches were done using four biological replicates for both pure culture of *D. hansenii* 1L25 and mixed culture experimental targets, at 12 h and 27 h. Dye swaps were done to correct for any cross hybridation bias using one biological sample of pure cultures of *Y. lipolytica* 1E07 and of *D.*

hansenii 1L25. The hybridization and washing protocols were done as recommended by the manufacturer (Two-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis Protocol, version 6.5, May 2010, from Agilent Technologies). Three hundred ng of Cy-3 and Cy-5 labeled cRNA were combined with 10x blocking agent, and 25x fragmentation buffer at 60 ºC for 30 min. The reaction was stopped with 2x GE hybridization buffer HI-RPM and hybridized to the oligo microarray for 17 h at 65 ºC with continuing rotation (10 r.p.m). After hybridization, slides were washed for 1 min at room temperature, using GE wash buffer 1, and 1 min at 37 ºC with GE wash buffer 2. Next, the slides were washed for 1 min with acetonitrile (Sigma). A final washing was done using stabilization and drying solution for 30 s.

Data processing and statistical analysis. Data images were obtained by laser-based scanning using a microarray scanner from Agilent in extended dynamic range (XDR), with a resolution of 5 nm per pixel. Scanning parameters were as recommended by the manufacturer. The complete experimental data set was deposited in the GEO database with accession number GSE37688. For further analysis, intensity-dependent normalization was performed with the LOESS (41) 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 (11). Differential analysis was performed with the *varmixt* package of R (11). Finally, the raw *P* values were adjusted by the Bonferroni method, which controls the family-wise error rate. We considered genes with a *P* value ≤ 0.05 to be differentially expressed.

Reverse transcription and Real-time PCR conditions for Microarray-Data validation. After RNA extraction, the cDNA was synthesized using the SuperScript^{TM} III First – Strand Synthesis System (InVitrogen) with random hexamers, according to the manufacturer's recommendations. Primers were designed with LightCycler software (Roche, Mannheim, Germany) and synthesized by Eurogentec (Seraing, Belgium). The primers used are listed in Table 1. The quantitative real-time RT-PCR was performed using a LightCycler (Roche) and LightCycler FastStart DNA Master^{plus} SYBR Green I kit (Roche), according to the manufacturer's recommendations.

The threshold cycle (C_T) values were determined with LightCycler software (version 3.3), using the second derivative method. Standard curves were generated by plotting the C_T values as a function of the initial RNA concentration log. PCR efficiency (E) was then calculated using the following formula: $E=10^{-1/slope}$. The Actin gene (5) was chosen as a suitable internal control gene to normalize the results. The Pfaffl (32) method was used to calculate the fold change in transcript abundance normalized to the Actin gene and relative to the sample collected.

RESULTS AND DISCUSSION

In order to test the possible effect of ammonia on the growth of *D. hansenii* 1L25 in co-culture with *Y. lipolytica* 1E07, pure and mixed cultures were carried out in the same Synthetic Medium (SM) using two different concentrations of amino acids (AA): SM 2XAA (rich in AA) and SM 0,1XAA (poor in AA, twenty times less amino acids than SM 2XAA). Moreover, the ratio of the initial inoculum of both yeasts in co-culture was modulated in order to check the impact of the inoculum on the competition between the strains.

The following abbreviations are used for the different treatments: Y= *Y. lipolytica* 1E07 pure culture; D= *D. hansenii* 1L25 pure culture; DY= *D. hansenii* 1L25 and *Y. lipolytica* 1E07 mixed culture.

Growth and ammonia production

In order to control the content of the growth medium, the experiments have been carried out in a Synthetic Medium (SM) that mimics the cheese environment.

(i) SM 2XAA. Initial inoculum percentage in DY (50% D and 50% Y). Up to 12 h of culture, the cell counts of *D. hansenii* 1L25 were similar in both pure D and mixed DY conditions (6 x 10^5 CFU ml^{-1}) (Fig. 1A). After 12 h of culture, *D. hansenii* 1L25 started the stationary phase in DY and maximum cell counts were 5 x 10^7 CFU ml^{-1}, while, *D. hansenii* 1L25 continued to grow in D and maximum cell counts were 5 x 10^8 CFU ml^{-1}. At 123 h, *D. hansenii* 1L25 cell counts dropped 10-fold in DY compared to D (P-value=0.003, with the Student's t-test). This result is consistent with that obtained by Mounier *et al.* 2008 (27) in a model cheese, where *D. hansenii* 1L25 population dropped by 1.5 $\log_{10}$ between day 6 and day 21, in the presence of either *Y. lipolytica* 1E07 and/or *G. candidum* 3E17 (27). The presence of *D. hansenii* 1L25 in DY had no significant impact on the growth of *Y. lipolytica* 1E07 during the whole culture (Fig. 1B).

D. hansenii 1L25 produced small amounts of ammonia. Values have reached only 1.5 µmol ml^{-1} (Fig. 1A). In contrast, *Y. lipolytica* produced large quantities of ammonia. Values have reached 19.4 µmol ml^{-1} (Fig. 1B). In DY, amounts of ammonia varied between 0 up to 16.41 µmol ml^{-1}. This production was mainly due to *Y. lipolytica* 1E07. These results are in agreement with those obtained by Gori *et al.* 2007 (14), Mansour *et al.* 2008 (26) for *Y. lipolytica* CBS 2075 and 1E07 respectively, in cheese agar and in SM. However, our results differ from the results obtained for *D. hansenii* D18335 in glycerol medium agar (14), where this yeast was the most productive for ammonia among the yeasts studied. Production of ammonia increased after 27 h in Y and DY, which coincided with a decrease in the growth of

D. hansenii 1L25 in DY (Fig. 1A). This suggested that ammonia could behave as an inhibitor of the growth of *D. hansenii* 1L25 in SM 2XAA as previously hypothesized (27).

(ii) SM 0.1XAA. Initial inoculum percentage in DY (50% D and 50% Y). In order to check the role of the amino acids on ammonia production together with a possible effect on microbial growth, a medium containing twenty times less amino acids was used. In the SM 0.1XAA medium, no production of ammonia was detected and the inhibition of the growth of *D. hansenii* 1L25 in DY (Fig. 1C) was lower than in the SM 2XAA medium (Fig.1A).

(iii) SM 2XAA. Initial inoculum percentage in DY (75% D and 25% Y). We changed the ratio of the initial inoculum from 1:1 to 3/4:1/4, in order to test the effect of the concentrations of the initial inocula on the growth of *D. hansenii* 1L25 in the presence of *Y. lipolytica* 1E07. In these conditions, the growth of *D. hansenii* 1L25 in DY was similar to its growth in D (at 120h, P-value=0.01, with the Student's t-test). Even though, the production of ammonia at 120 h was 13.0 µmol ml^{-1} in Y, 7.7 µmol ml^{-1} in DY and 3.8 µmol ml^{-1} in D (Fig 2A and 2B). Consequently, our result do not validate the hypothesis that the ammonia produced by *Y. lipolytica* 1E07 is the main mechanism explaining the growth inhibition of *D. hansenii* 1L25 in the presence of *Y. lipolytica* 1E07.

Amino acids, lactate and lactose consumption

(i) Amino acids utilization. Amino acids were simultaneously consumed by both yeasts. In the SM 2XAA medium, amino acids were highly consumed after 12 h in Y, DY and D, but were not totally depleted from the medium (Fig. 3A and 3B), since 0.08 g l^{-1}, 0.12 g l^{-1} and 2.33 g l^{-1} still remained respectively in Y, DY and D after 120 hours. None of the amino acids were limiting for growth of *D. hansenii* 1L25 in DY in the SM 2XAA (1:1) (data not shown). In the SM containing 0.1XAA, amino acids were totally exhausted after 12 h of cultures in Y, D and DY (Fig 3C and 3D).

(ii) Lactate utilization. Lactate was consumed late after the consumption of the amino acids, by both yeasts. In the SM 2XAA medium (1:1 and 3/4:1/4), *D. hansenii* 1L25 poorly consumed lactate (< 3 g l^{-1}) after 78 h in D or in DY (Fig. 2C and 3A), while 5.9 g l^{-1} of lactate were utilized by *Y. lipolytica* 1E07 in Y (1:1) (Fig. 3B) and 8 g l^{-1} in Y (3/4:1/4) (Fig. 2D) without being totally depleted. Consequently, we can conclude that *D. hansenii* 1L25 and *Y. lipolytica* 1E07 did not compete for lactate in SM 2XAA (1:1).

With low amino acids supply (SM 0.1XAA), lactate was highly assimilated in Y and DY compared to the SM 2XAA: 13.46 g l^{-1} were consumed by *Y. lipolytica* 1E07 in Y (Fig. 3D) and 7.77 g l^{-1} in DY, while *D. hansenii* 1L25 consumed only 1.34 g l^{-1} of lactate in D (Fig. 3C). The fact that consumption of lactate by *Y. lipolytica* 1E07 was increased when the

medium was depleted from amino acids (SM 0.1XAA), is in accordance with the results of Mansour *et al.* (2008) (26).

(iii) Lactose utilization. In the SM 2XAA medium (1:1 or 3/4:1/4) and in the SM 0.1XAA medium, lactose was not consumed by *Y. lipolytica* 1E07 (Fig. 2D and Fig. 3B, D). This is consistent with results of Cholet *et al.* 2007 (8), Mansour *et al.* 2008 (26) and Van den Tempel and Jakobsen, 2000 (40). On the other hand, lactose was highly consumed by *D. hansenii* 1L25 in D and DY and in SM 2XAA (after 12 h, Fig 3A) and SM 0.1XAA (after 8 h, Fig 3C). These results are similar to those obtained by Arfi *et al.* 2005 (1), with *D. hansenii* 304 in a cheese slurry. Consequently, we can conclude that both yeasts do not compete for lactose in the SM 2XAA (1:1). Whatever the treatment and the culture condition, lactose was never totally depleted from the medium.

(iv) pH evolution. pH values increased from 6.5 at the beginning of the culture up to 9.1, 7.0 and 8.6 respectively in Y, D and DY in SM 0.1XAA, from 6.6 to 8.8, 8.0 and 8.5 in SM 2XAA (1:1) and from 6.8 to pH 9.1, 8.4 and 8.5 in SM 2XAA (3/4:1/4) (data not shown). pH values in SM 0.1XAA and SM 2XAA, were maximal in the presence of *Y. lipolytica* 1E07 whereas, they were lower in the presence of *D. hansenii* 1L25. This difference existed because *Y. lipolytica* 1E07 consumed large quantities of lactate while *D. hansenii* 1L25 poorly assimilated lactate. Therefore, the pH in co-culture on SM 2XAA cannot account for the growth inhibition of *D. hansenii* 1L25, as the final pH appeared to be very similar in co-cultures on SM 2XAA and SM 0.1XAA.

To conclude, *Y. lipolytica* 1E07 consumed firstly the amino acids, and the lactate in a second time when the amino acids were depleted or highly consumed in the SM 2XAA (1:1). *Y. lipolytica* 1E07 did not use lactose.

D. hansenii 1L25 used lactose and amino acids at the same time at the beginning of the growth phase and poorly consumed lactate at the end of the stationary phase (<3 g l^{-1}). Lactate was not totally depleted from the SM 2XAA (1:1). Consequently, there was no competition between both yeasts for lactose and lactate in the SM 2XAA (1:1), because each yeast utilized different carbon source. Similarly, none of amino acids were limiting for the growth of *D. hansenii* 1L25 in SM 2XAA (1:1).

In addition, the production of ammonia by *Y. lipolytica* 1E07 did not appear to inhibit the growth of *D. hansenii* 1L25 in SM 2XAA (1:1) contrary to the hypothesis of Mounier *et al.* in 2008 (27), because no inhibition of the growth of *D. hansenii* 1L25 was observed in DY in the the SM 2XAA (3/4:1/4) despite the production of ammonia by *Y. lipolytica* 1E07.

Transcriptomic analysis of *D. hansenii* 1L25 in co-culture with *Y. lipolytica* 1E07 in SM 2XAA (50% D and 50% Y)

In order to understand the metabolic changes induced in *D. hansenii* 1L25 when grown in co-culture with *Y. lipolytica* 1E07 in SM 2XAA (1:1), a transcriptomic study was carried out. Gene expression of *D. hansenii* 1L25 in pure culture was compared to gene expression in co-culture with *Y. lipolytica* 1E07. Two times in the growth kinetics were chosen: T12h, a phase where both yeasts seemed to grow independently, and T27h where the competition between the yeasts was noticeable. 242 and 166 genes were found differentially expressed in co-culture compared to pure culture, at 12 h and 27 h, respectively (equivalent to 4% and 2.5% of the total genome). Among these genes, cross hybridation was observed for few genes (12 and 13 genes at 12 h and 27 h respectively), and those genes were not considered in our analysis. Among the genes differentially expressed, 29% and 30% were unknown at 12 h and 27h, respectively. The differentially expressed genes were classified according to functional categories and we focused on the main functional categories (respiration, mitochondrial biogenesis, fermentation, glycolysis, TCA cycle, metals and oxidative stress) presented in Tables 2 and 3.

(i) Respiration and mitochondrial biogenesis. The expression of different genes involved in the oxidative phosphorylation pathway was down-regulated in DY compared to D at 12 h (*QCR7, QCR8, COX9, COX16, PET117* and *PET191*, Table 2) and at 27 h (*CYT1, QCR6, ATP15* and *COX7*, Table 3). All enzymes encoded by genes listed above, are good indicator of the mitochondrial respiratory functions which appeared to be kept turned down in DY compared to D at 12 h and 27 h. These results are similar to those obtained by Linde *et al.* in 1999 and Lai *et al.* in 2006 for the yeast *S. cerevisiae* when the medium is lacking in oxygen (20, 24).

In contrast, the expression of a few genes was up-regulated at 12 h (*NDI1*) and 27 h (*COX11, COX15, COX18* and *MBA1*), showing that the inhibition of the respiration of *D. hansenii* 1L25 in DY compared to D appeared to be less pronounced at 27 h than at 12 h. An explanation of this result could be that at 12 h, the differential expression of genes encoding the respiration pathway in DY compared to D was noticeable because the cell counts of *D. hansenii* 1L25 were similar in D and DY (Fig. 1A). Whereas, *D. hansenii* 1L25 cell counts were 10-fold higher in D compared to DY at 27 h (Fig. 1A). The high density of cells in D could decrease the availability of oxygen in D culture. Consequently, the decreasing in oxygen in D and DY at 27 h, could be the reason behind the attenuated differential expression of genes at 27 h.

Moreover, the down regulation of the mitochondrial respiratory pathway appeared to be correlated with the repression of components of the mitochondrial ribosomes. The expression of 10 genes encoding mitochondrial components appeared to be repressed at T12h (Table 2).

(ii) Fermentation. The expression of several genes of the fermentative pathway was induced as shown by the induction of the key enzymes expression such as *PDC1* (DEHA2G18348g) and *ADH1* (DEHA2G21032g) at 12 h (Table 2). Induction of *ADH1* expression at 12 h could indicate that *D. hansenii* 1L25 in DY shifted from aerobic to fermentative metabolism to preserve its growth. *ADH1* was down-regulated at 27 h: as we mentioned previously, cell densities of *D. hansenii* 1L25 in D were higher than in DY and they have turned to fermentative metabolism. Consequently, the differential expression of *ADH1* in DY compared to D appeared down-regulated.

Measurement of ethanol production was carried out at 12 h and 27 h in *D. hansenii* 1L25 pure and mixed cultures (Table 4). Ethanol production was more important in D compared to DY. This result may be explained by the fact that *Y. lipolytica* 1E07 is able to consume ethanol (4) produced by *D. hansenii* 1L25 in DY. Whereas, the important quantity of ethanol present at 27 h compared to 12 h, may be explained by the higher cell densities of *D. hansenii* 1L25 at 27 h than 12 h of culure. The ability of *D. hansenii* to produce ethanol in our conditions under reduced oxygen availability has been already demonstrated by Sanchez *et al.* in 2006 (35).

(iii) Glycolytic pathway. Correlatively to the fermentation pathway, the expression of several genes of the glycolytic pathway was induced as shown by the induction of *GAL1*0 (DEHA2C02464g) and *GAL3* (DEHA2C02486g) expression (Table 2), for the lactose assimilation pathway; by the induction of *HXK2* (DEHA2F13992g) and *TPI1* (DEHA2F06754g) expression (Table 2), for the Emden-Meyerhoff pathway, and by the induction of *SOL4* (DEHA2G23452g) expression (Table 3), for the pentose phosphate pathway. The induction of the homologue of *Candida albicans HGT1* expression (DEHA2E01166g) and of three members of the HXT gene family expression (DEHA2C05918g, DEHA2C05874g, DEHA2B16280g) (Table 3), showed the stimulation of the import of sugars. All together our results (induction of the fermentative and glycolytic pathways and induction of import of sugars), were similar to those observed in the literature for *S. cerevisiae* JM43 strain growing in the semisynthetic galactose medium (19, 20) and for all four kingdoms of life (28), in the objective to preserve cellular energy during deprivation or decreasing in oxygen.

In addition, gene expression of *ATH1* (DEHA2D14498g) at 27 h and *GPH1* (DEHA2F22374g) at 12 h and 27 h was up-regulated (Table 2 and 3). These two genes

responsible of the mobilization of stored carbohydrates, presented another indice of hypoxia. This is due to the high demand in the entry of soluble sugars in the glycolytic pathway which induces the cleavage of reserve carbohydrates. Such a behavior is conserved in all four kingdoms of life (28). Moreover, in our study the expression of *RHR2* (DEHA2E16346g) involved in the biosynthesis of glycerol was up-regulated at 12 h and 27 h (Table 2 and 3). The assimilation of sugars generates excess NADH which is recycled by synthesis of a reduced end product glycerol as reported by Pahlman in 2001 (29).

(iv) TCA cycle. Concerning the enzymes of the tricarboxylic acid cycle (TCA), it appeared that the expression of *ACO2* (DEHA2E21824g), *FUM1* (DEHA2F13949g) and *KGD1* (DEHA2F17798g) was up-regulated (Table 2). This result is not consistent with Mustroph *et al.* in 2010 that showed a decline in TCA cycle enzyme in species of all four kingdoms of life, in oxygen deprivation conditions (28). Our results could be explained if the conclusions of Camarasa *et al.* in 2003 are followed: residual TCA pathway activity is maintained during anaerobiosis in *S. cerevisiae*, for supplying cells with biosynthetic molecules like C4 and C5 compounds (oxaloacetate and 2-oxoglutarate) required for aspartate and glutamate biosynthesis (7).

(v) Metals. Metals (such as copper, iron, zinc and sulfur) play an important role in the mitochondrial respiration chain. They form prosthetic groups of many enzymatic complexes especially the cytochrome c oxidase that catalyses the reduction of molecular oxygen, the final acceptor of electrons, to water. In our study, several genes involved in the transport of metals were up-regulated at 12 h and 27 h: *CTR1* and *FRE7* (T12 h, T27 h) for the transport of copper, *FET3* (T12 h, T27 h) and *SIT1* (T27 h) for the transport of iron, *ZRT1* (T27 h) for the transport of zinc. In addition, *FRE5* was up-regulated at 27 h whose expression is also induced by low iron levels in the medium. These genes are known to encode for high affinity transporters, whose expression is induced when the medium is depleted in the corresponding metals. *COX17* and *COX23* expression was also down regulated at 12 h in DY. *COX17* is believed to encode the copper donor to *SCO1* and *COX11*, which are thought to encode copper donors to the cytochrome c oxidase (16). *COX23* is known as an homologue of *COX17* (3). Taken together, our results suggested that the deficiency in metals in the medium indicated by the up-regulation of their high affinity transporters (*CTR1*, *FRE7*, *FET3*, *SIT1* and *ZRT1*), and/or the down regulation of *COX17* and *COX23*, may cause a respiratory dysfunction (hypoxia conditions) due to the deficiency in the cytochrome c oxidase of the mitochondrial respiratory chain.

Some reports showed in a study carried out in *S. cerevisiae* JM43 strain growing in a semisynthetic glucose medium, that the shift to anaerobiosis results in a down regulation in the expression of a number of genes involved in the import of metals, including those encoding high-affinity metal transporters and, at the same time an up-regulation of another group of genes encoding low-affinity metal transporters (19).

(vi) Oxidative stress. Several genes involved in oxidative stress were found differentially expressed in our study. The expression of the homologue of *Candida albicans SOD4* (DEHA2E15004g) was up-regulated at 12 h and 27 h. *SOD4* encodes for a superoxide dismutase, an enzyme playing a role in the detoxification of cells from reactive oxygen species (ROS) which can damage all cellular constituents (13). SODs family convert O_2^- into molecular oxygen and hydrogen peroxide, thereby scavenging the toxic effects of O_2^- and preventing higher H_2O_2 levels (13, 39). *SOD2* expressed at 12 h, has the same role as SODs family. *CCS1* which is involved in oxidative stress protection, *AHP1* which reduces hydroperoxides to protect against oxidative damage (23), and *POS5* which are required for the response to oxidative stress (38) were also induced at 27 h (Table 3).

In contrast, two genes *SOD1* and *GPX2* which are known to be involved in the protection against oxidative stress (12, 15), were found down-regulated in DY compared to D, at 12 h. This result is consistent with the result of Lai *et al.* in 2006 for *S. cerevisiae* JM43 strain growing in a semisynthetic galactose medium, showing that the expression of *SOD1* and *GPX2* genes was up-regulated when this medium is oxygenated (20).

To conclude, the down regulation of the respiratory chain correlated with: i) the reconfiguration of the energy metabolism shown by the induction of fermentative and glycolytic pathways, ii) the induction of the TCA cycle, iii) the induction of high affinity transporters of metals (e. g. *CTR1*, *FRE7*, *FET3*, *SIT1*, *ZRT1*, *FRE5*) and the down regulation of *COX17* and *COX23* transporters of metals, iv) the induction of some enzymes of oxidative stress (e. g. *SOD4*, *SOD2 CCS1*, *AHP1*, *POS5*), showed a similar pattern observed in hypoxia conditions across species scattered along all the living world (28).

Validation of transcriptomic analyses by RT-qPCR

Five candidate genes (*CYT1*, *QCR7*, *CTR1*, *SOD4* and *ADH1*) were selected among the genes differentially expressed in DY compared to D. *CYT1* and *QCR7* were selected as markers for the mitochondrial respiratory chain, *CTR1* for metal transporters, *SOD4* for oxidative stress and *ADH1* for glycolytic pathway. At T12 h and T27 h, *CYT1* and *QCR7* were found down regulated, while *CTR1* and *SOD4* were up-regulated (Table 5), *ADH1* was up-regulated at

T12 h and repressed at T27 h. These results were consistent with those obtained with the DNA microarray approach (Table 2 and 3).

CONCLUSION

We reproduced in a liquid synthetic medium mimicking the cheese environment, the growth inhibition of *D. hansenii* 1L25 in co-culture with *Y. lipolytica* 1E07. We demonstrated that the inhibition of *D. hansenii 1L25* was neither due to ammonia production nor to a competition for nutritive substrates. We observed that the expression of several genes implicated in cell respiration were repressed in the DY co-culture compared to the D pure culture, suggesting a dysfunction in the respiration pathway of *D. hansenii* 1L25. Consequently, we hypothesized that *D. hansenii* 1L25 shifted from a respiratory metabolism in pure culture to a fermentative metabolism in mixed culture to preserve its growth.

ACKNOWLEDGMENTS

Reine Malek is grateful to the ABIES Doctoral School and Region Lorraine for awarding her a Ph.D. scholarship.

REFERENCES

1. **Arfi, K., M. N. Leclercq-Perlat, H. E. Spinnler, and P. Bonnarme.** 2005. Importance of curd-neutralising yeasts on the aromatic potential of Brevibacterium linens during cheese ripening. International Dairy Journal **15:**883-891.
2. **Barnett, J. A., R. W. Payne, and D. Yarrow.** 2000. Yeasts: Characteristics and Identification. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.
3. **Barros, M. H., A. Johnson, and A. Tzagoloff.** 2004. *COX23*, a homologue of *COX17*, is required for cytochrome oxidase assembly. The Journal of Biological Chemistry **279:**31943-31947.
4. **Barth, G., and C. Gaillardin.** 1997. Physiology and genetics of the dimorphic fungus Yarrowia lipolytica. FEMS Microbiol Rev **19:**219-37.
5. **Blanchin-Roland, S., G. g. D. Costa, and C. Gaillardin.** 2005. ESCRT-I components of the endocytic machinery are required for Rim101-dependent ambient pH regulation in the yeast Yarrowia lipolytica. Microbiology **151:**3627-3637.
6. **Brennan, N. M., T. M. Cogan, M. Loessner, S. Scherer, and P. L. H. M. T. M. C. a. T. P. G. Patrick F. Fox.** 2004. Bacterial surface-ripened cheeses, p. 199-225, Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, vol. Volume 2. Academic Press.
7. **Camarasa, C., J.-P. Grivet, and S. Dequin.** 2003. Investigation by 13C-NMR and tricarboxylic acid (TCA) deletion mutant analysis of pathways for succinate formation in Saccharomyces cerevisiae during anaerobic fermentation. Microbiology **149:**2669-2678.
8. **Cholet, O., A. Hénaut, S. Casaregola, and P. Bonnarme.** 2007. Gene Expression and Biochemical Analysis of Cheese-Ripening Yeasts: Focus on Catabolism of L-Methionine, Lactate and Lactose. Applied and Environmental Microbiology **73:**2561-2570.
9. **Corsetti, A., J. Rossi, and M. Gobbetti.** 2001. Interactions between yeasts and bacteria in the smear surface ripened cheeses International Journal of Food Microbiology **69:**1-10.
10. **Cosentino, S., M. E. Fadda, M. Deplano, A. F. Mulargia, and F. Palmas.** 2001. Yeasts associated with Sardinian ewe's dairy products. International Journal of Food Microbiology **69:**53-58.
11. **Delmar, P., S. Robin, and J.-J. Daudin.** 2005. VarMixt: efficient variance modelling for the differential analysis of replicated gene expression data. Bioinformatics **4:**502-508.

12. **Fischer, L. R., Y. Li, S. A. Asress, D. P. Jones, and J. D. Glass.** 2011. Absence of SOD1 leads to oxidative stress in peripheral nerve and causes a progressive distal motor axonopathy. Experimental neurology **233:**163-171.
13. **Frohner, I. E., C. Bourgeois, K. Yatsyk, O. Majer, and K. Kuchler.** 2009. *Candida albicans* cell surface superoxide dismutases degrade host-derived reactive oxygen species to escape innate immune surveillance Molecular Microbiology **71:**240-52.
14. **Gori, K., H. D. Mortensen, N. Arneborg, and L. Jespersen.** 2007. Ammonia production and its possible role as a mediator of communication for Debaryomyces hansenii and other cheese-relevant yeast species. Journal of Dairy Science **90:**5032-5041.
15. **Hayes, J. D., and L. I. McLellan.** 1999. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. Free Radical Research **31:**273-300.
16. **Horng, Y., P. A. Cobine, A. B. Maxfield, H. S. Carr, and D. R. Winge.** 2004. Specific copper transfer from the Cox17 metallochaperone to both Sco1 and Cox11 in the assembly of yeast cytochrome c oxidase. The Journal of Biological Chemistry **279:**35334-35340.
17. **Iraqui, I., S. Vissers, B. André, and A. Urrestarazu.** 1999. Transcriptional Induction by Aromatic Amino Acids in *Saccharomyces cerevisiae*. Molecular and cellular Biology **19:**3360-3371.
18. **Irlinger, F., and J. Mounier.** 2009. Microbial interactions in cheese: implications for cheese quality and safety. Current Opinion in Biotechnology **20:**142-148.
19. **Lai, L. C., A. Kosorukoff, P. V. Burke, and K. E. Kwast.** 2005. Dynamical remodeling of the transcriptome during short-term anaerobiosis in *Saccharomyces cerevisiae*: differential response and role of Msn2 and/or Msn4 and other factors in galactose and glucose media. Molecular and Cellular Biology **25:**4075-4091.
20. **Lai, L. C., A. Kosorukoff, P. V. Burke, and K. E. Kwast.** 2006. Metabolic-state-dependent remodeling of the transcriptome in response to anoxia and subsequent reoxygenation in *Saccharomyces cerevisiae*. Eukaryotic Cell **5:**1468-1489.
21. **Leclercq-Perlat, M. N., F. Buono, D. Lambert, H. E. Spinnler, and G. Corrieu.** 2004. Controlled production of Camembert-type cheeses: Part I. Microbiological and physicochemical evolutions. Journal of Dairy Research **71:**346-354.
22. **Leclercq-Perlat, M. N., A. Oumer, J. L. Bergere, H. E. Spinnler, and G. Corrieu.** 2000. Behavior of Brevibacterium linens and Debaryomyces hansenii as ripening flora

in controlled production of smear soft cheese from reconstituted milk: growth and substrate consumption dairy foods. J Dairy Sci **83:**1665-73.

23. **Lee, J., D. Spector, C. Godon, J. Labarre, and M. B. Toledano.** 1999. A New Antioxidant with Alkyl Hydroperoxide Defense Properties in Yeast. Journal of Biological Chemistry **274:**4537-4544.
24. **Linde, J. J. M., H. Liang, R. W. Davis, H. Y. Steensma, J. P. Dijken, and J. T. Pronk.** 1999. Genome-wide transcriptional analysis of aerobic and anaerobic chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Bacteriology **181:**7409-7413.
25. **Mansour, S., J. Bailly, J. Delettre, and P. Bonnarme.** 2009. A proteomic and transcriptomic view of amino acids catabolism in the yeast Yarrowia lipolytica. PROTEOMICS **9:**4714-4725.
26. **Mansour, S., J. M. Beckerich, and P. Bonnarme.** 2008. Lactate and amino acid catabolism in the cheese-ripening yeast *Yarrowia lipolytica*. Applied and Environmental Microbiology **74:**6505-12.
27. **Mounier, J., C. Monnet, T. Vallaeys, R. Arditi, A.-S. Sarthou, A. Helias, and F. Irlinger.** 2008. Microbial Interactions within a Cheese Microbial Community. Applied And Environmental Microbiology **74:**172-181.
28. **Mustroph, A., S. C. Lee, T. Oosumi, M. E. Zanetti, H. Yang, K. Ma, A. Yaghoubi-Masihi, T. Fukao, and J. Bailey-Serres.** 2010. Cross-kingdom comparison of transcriptomic adjustments to low-oxygen stress highlights conserved and plant-specific responses. plant physiology **152:**1484-1500.
29. **Pahlman, A.-K., K. Granath, R. Ansell, S. Hohmann, and L. Adler.** 2001. The Yeast Glycerol 3-Phosphatases Gpp1p and Gpp2p Are Required for Glycerol Biosynthesis and Differentially Involved in the Cellular Responses to Osmotic, Anaerobic, and Oxidative Stress. Journal of Biological Chemistry **276:**3555-3563.
30. **Palková, Z., and J. Forstová.** 2000. Yeast colonies synchronise their growth and development. Journal of Cell Science **113:**1923-1928.
31. **Palková, Z., B. Janderová, J. Gabriel, B. Zikánová, M. Pospíšek, and J. Forstová.** 1997. Ammonia mediates communication between yeast colonies. Nature **390:**532-536.
32. **Pfaffl, M. W.** 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Research **29:**45.

33. **Reymond, N., H. Charles, L. Duret, F. Calevro, G. Beslon, and J.-M. Fayard.** 2004. ROSO: optimizing oligonucleotide probes for microarrays. Bioinformatics **20:**271-273.

34. **Riahi, M. H., I. C. Trelea, D. Picque, M. N. Leclercq-Perlat, A. Hélias, and G. Corrieu.** 2007. A model describing *Debaryomyces hansenii* growth and substrate consumption during a smear soft cheese deacidification and ripening. Journal of Dairy Science **90:**2525-2537.

35. **Sánchez, N. S., M. Calahorra, J. C. González-Hernández, and A. Peña.** 2006. Glycolytic sequence and respiration of Debaryomyces hansenii as compared to Saccharomyces cerevisiae. Yeast **23:**361-374.

36. **Sieuwerts, S., F. A. M. De Bok, J. Hugenholtz, and J. E. T. V. H. Vlieg.** 2008. Unraveling microbial interactions in food fermentations: from classical to genomics approaches. Applied and Environmental Microbiology **74:**4997-5007.

37. **Smit, G., B. A. Smit, and W. J. M. Engels.** 2005. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. FEMS Microbiology Reviews **29:**591-610.

38. **Strand, M. K., G. R. Stuart, M. J. Longley, M. A. Graziewicz, O. C. Dominick, and W. C. Copeland.** 2003. POS5 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a mitochondrial NADH kinase required for stability of mitochondrial DNA. Eukaryotic Cell **2:**809-820.

39. **Teixeira, H. D., R. I. Schumacher, and R. Meneghini.** 1998. Lower intracellular hydrogen peroxide levels in cells overexpressing CuZn-superoxide dismutase. Proceedings of the National Academy of Sciences USA **95:**7872-5.

40. **Van den Tempel, T., and M. Jakobsen.** 2000. The technological characteristics of Debaryomyces hansenii and Yarrowia lipolytica and their potential as starter cultures for production of Danablu. International Dairy Journal **10:**263-270.

41. **Yang, Y., S. Dudoit, P. Luu, D. Lin, V. Peng, J. Ngai, and T. Speed.** 2002. Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. Nucleic Acids Research **30:**e15.

42. **Yvon, M., and L. Rijnen.** 2001. Cheese flavour formation by amino acid catabolism. International Dairy Journal **11:**185-201.

43. **Yvon, M., S. Thirouin, L. Rijnen, D. Fromentier, and J. C. Gripon.** 1997. An aminotransferase from *Lactococcus lactis* initiates conversion of amino acids to cheese flavor compounds. Applied and Environmental Microbiology **63:**414-419.

FIG. 1. Growth and ammonia production in pure and mixed culture of *D. hansenii* 1L25 (A, C) and *Y. lipolytica* 1E07 (B, D). A and B in a SM 2XAA medium (high concentrations of amino acids), C and D in a SM 0.1XAA medium (poor concentrations of amino acids). Y: *Y. lipolytica* 1E07; D: *D. hansenii* 1L25; DY: *Y. lipolytica* 1E07 + *D. hanseni* 1L25. The initial percentage of both yeasts in the mixed culture (DY) is as follows: 50% D and 50% Y.

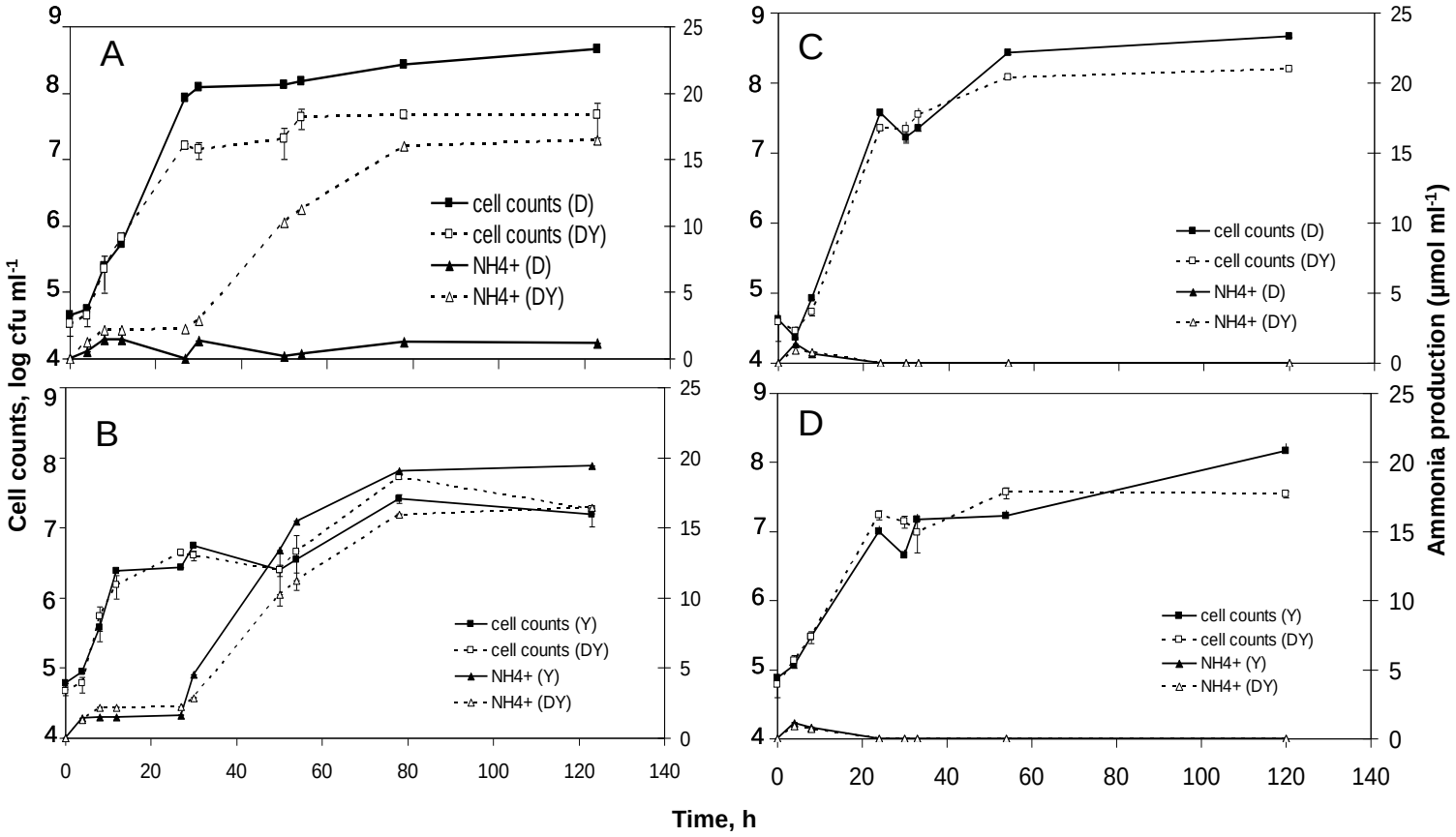


FIG. 2. Growth, ammonia production and carbon sources consumption in pure and mixed culture of *D. hansenii* 1L25 (A, C) and *Y. lipolytica* 1E07 (B, D) in SM 2XAA medium. A and B describe growth and ammonium production. C and D show the carbon sources consumption. Y: *Y. lipolytica* 1E07; D: *D. hansenii* 1L25; DY: *Y. lipolytica* 1E07 + *D. hanseni* 1L25. The initial percentage of both yeasts in the mixed culture (DY) is as follows: 75% D and 25% Y.

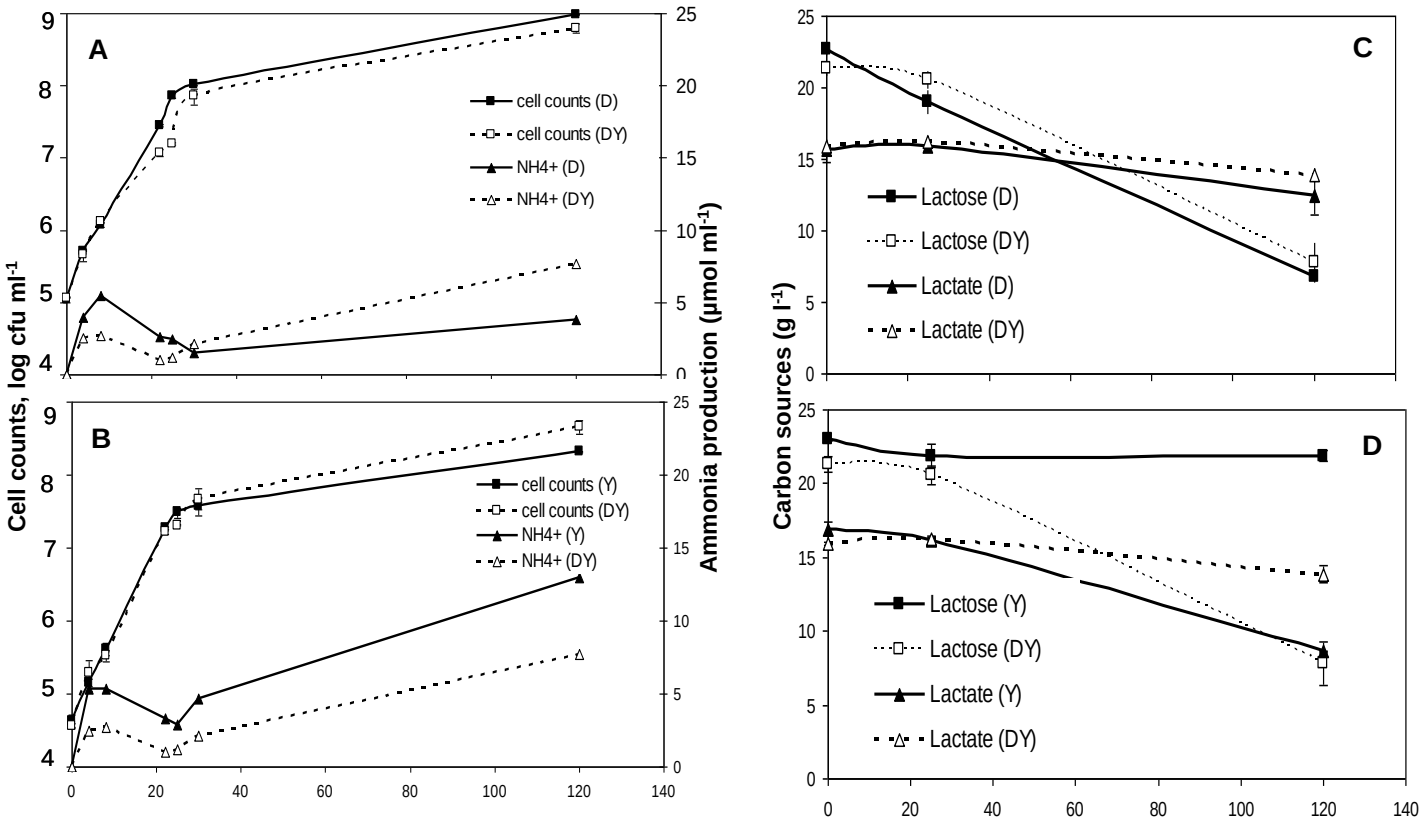


FIG.3. Consumption of carbon sources (lactose, lactate, amino acids) in pure and mixed cultures of *D. hansenii* 1L25 (A, C) and *Y. lipolytica* 1E07 (B, D). A and B in SM 2XAA medium (high concentrations of aminoacids), C and D in a SM 0.1XAA medium (poor concentrations of amino acids). Y: *Y. lipolytica* 1E07; D: *D. hansenii* 1L25; DY: *Y. lipolytica* 1E07 + *D. hanseni* 1L25. The initial percentage of both yeasts in the mixed culture (DY) is as follows: 50% D and 50% Y.

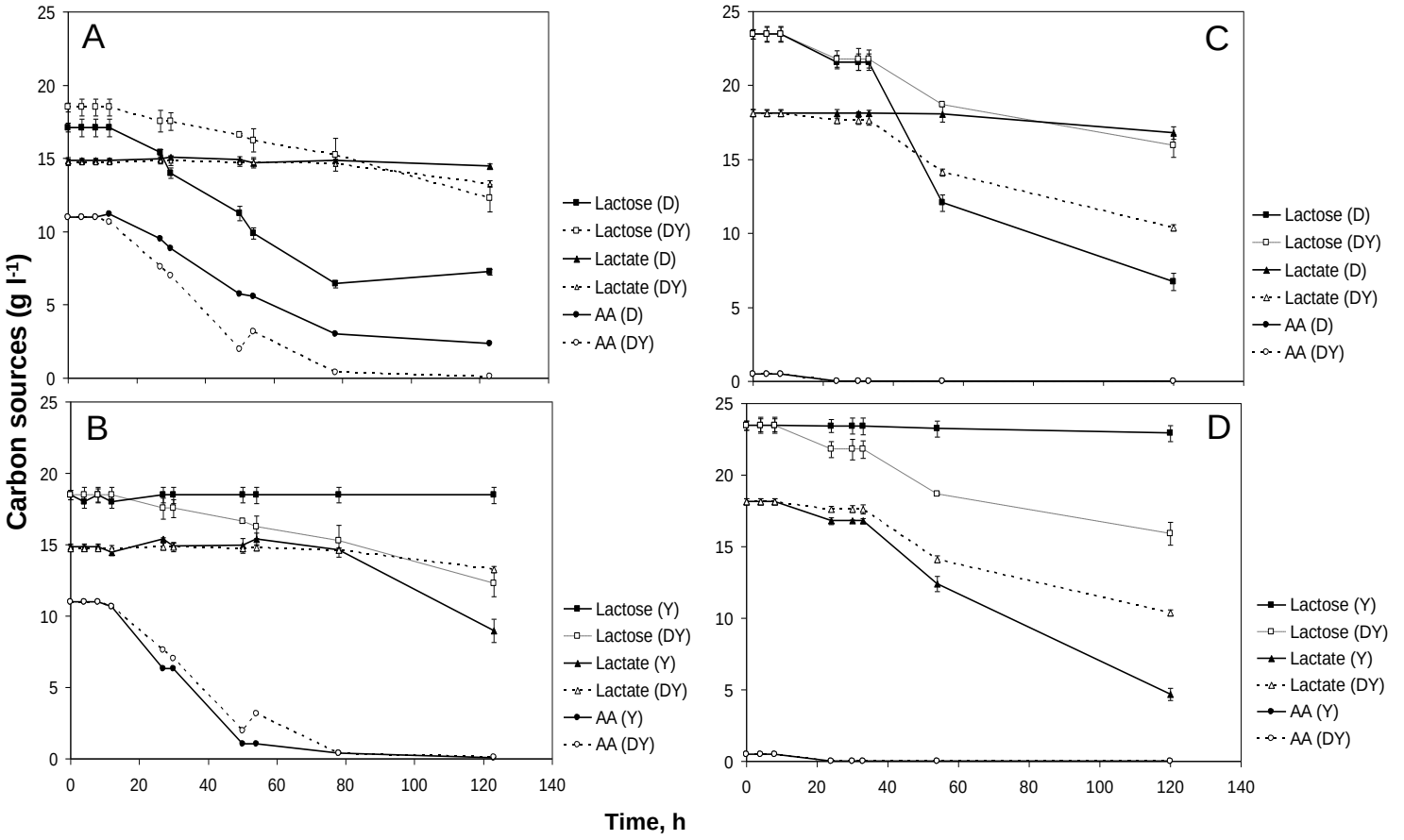


Table 1: Primers used in this study

Primer	Accession no.	Sequence (5'-3')	Putative function
QCR7-R	DEHA2E19756g	ATCTGGTAATCTGGAAATAGCCT	Subunit VII of the ubiquinol cytochrome c reductase complex
QCR7-F	DEHA2E19756g	TACCTCTATTGTTAAGACTGCTGAC	
CYT1-R	DEHA2C06402g	GCCAACTTACCTGGTCTCT	subunit of the ubiquinol cytochrome c reductase complex
CYT1-F	DEHA2C06402g	TGTGCTGCTTGTCACTCA	
CTR1-R	DEHA2F15114g	CCTACAGCCAGGGACGA	Copper transporter
CTR1-F	DEHA2F15114g	AAATCCAAATTATGTTTATGCTTGCC	
SOD4-R	DEHA2E15004g	GGTCATCACGTTAGCACCAT	copper and Zinc superoxide dismutase
SOD4-F	DEHA2E15004g	TCTCTTAACGAAGATAACAAGGCTTT	
ADH1-R	DEHA2G21032g	ATTACTCTATATCCCATAGCAGCG	Alcohol dehydrogenase
ADH1-F	DEHA2G21032g	ACAGACTTAGCTGAAGTAGCTC	
ACT1-R	DEHA2D05412g	GGTTTGGTCAATACCAGCG	Gene encoding actin
ACT1-F	DEHA2D05412g	ATGCAAACTTCATCTCAATCCTC	

Table 2: Genes of *D. hansenii* 1L25 differentially expressed in mixed culture compared to *D. hansenii* 1L25 pure culture at 12 h.

***Debaryomyces* gene name**	***Saccharomyces* gene name**	**Factor change**	**Function**
Respiration			
DEHA2E19756g	*QCR7*	0,17	Subunit 7 of the ubiquinol cytochrome-c reductase complex
DEHA2F08250g	*QCR8*	0,36	Subunit 8 of ubiquinol cytochrome-c reductase complex
DEHA2E10626g	*COX9*	0,25	Subunit VIIa of cytochrome c oxidase
DEHA2A13442g	*COX16*	0,39	Mitochondrial inner membrane protein, required for assembly of cytochrome c oxidase
DEHA2A01232g	*COX17*	0,23	Copper metallochaperone
DEHA2F20526g	*COX23*	0,29	Mitochondrial intermembrane space protein, homologous to Cox17p
DEHA2D14322g	*PET117*	0,35	Protein required for assembly of cytochrome c oxidase
DEHA2A08998g	*PET191*	0,35	Protein required for assembly of cytochrome c oxidase
DEHA2D18106g	*CRD2*	0,32	Metallothionein copper binding
DEHA2G06050g	*NDI1*	2,2	NADH-ubiquinone oxidoreductase
Mitocondrial ribosomes			
DEHA2B04378g	*MRPL31*	0,15	Mitochondrial ribosomal protein
DEHA2E12826g	*MRP17*	0,17	Mitochondrial ribosomal protein
DEHA2E13156g	*MRP10*	0,23	Mitochondrial ribosomal protein
DEHA2A03344g	*RTC6*	0,25	Putative mitochondrial ribosomal protein

DEHA2C17336g	*MRPL49*	0,26	Mitochondrial ribosomal protein
DEHA2A03234g	*MRPL37*	0,27	Mitochondrial ribosomal protein
DEHA2B07876g	*Not found*	0,30	Putative mitochondrial ribosomal protein
DEHA2E10890g	*RSM19*	0,31	Mitochondrial ribosomal protein
DEHA2C03080g	*MRPL51*	0,32	Mitochondrial ribosomal protein
DEHA2D01848g	*MRPL39*	0,37	Mitochondrial ribosomal protein
DEHA2C10538g	*RSM25*	2,60	Mitochondrial ribosomal protein
Carbohydrate metabolism			
DEHA2F13992g	*HXK2*	5,6	Hexokinase
DEHA2E06556g	*GLK1*	6	Glucokinase
DEHA2F13156g	*PGI1*	3,4	Glycolytic enzyme phospho-glucose isomerise
DEHA2D10186g	*PFK2*	3,2	Phospho-fructokinase
DEHA2F06754g	*TPI1*	3	Triose phosphate isomerase
DEHA2G18348g	*PDC1*	8,4	Major of three pyruvate decarboxylase isozymes
DEHA2G21032g	*ADH1*	5,1	Alcohol dehydrogenase
DEHA2G12870g	*PDA1*	3,2	Subunit of the pyruvate dehydrogenase complex
DEHA2F22374g	*GPH1*	4,60	Non-essential glycogen phosphorylase
DEHA2C02464g	*GAL10*	4,6	UDP-glucose-4-epimerase (highly similar to *S. cerevisiae*)
DEHA2E05148g	*RHR2*	3,7	Isoform of DL-glycerol-3-phosphatase
DEHA2C02486g	*GAL3*	5,9	Transcriptional regulator
DEHA2B16016g	*YPR1*	0,25	2-methylbutyraldehyde reductase
DEHA2A12254g	*SGA1*	0,3	Glucoamylase
TCA cycle			
DEHA2E21824g	*ACO2*	3,2	Aconitase
DEHA2F17798g	*KGD1*	4,2	Alpha-ketoglutarate dehydrogenase
DEHA2F13948g	*FUM1*	2,6	Fumarase
Transport			
DEHA2F15114g	*CTR1*	3,00	High-affinity copper transporter of the plasma membrane
DEHA2G05082g	*FET3*	3,00	Ferro-O2-oxidoreductase required for high-affinity iron uptake
DEHA2D01452g	*FRE7*	3,10	Putative ferric reductase
DEHA2D14586g	*CCH1*	3,20	Voltage-gated high-affinity calcium channel
DEHA2G09108g	*Not found*	12,50	Plasma membrane Na+ ATPase
DEHA2C01320g	*PMP3*	0,20	Small plasma membrane protein
DEHA2F23166g	*VMA10*	0,29	Subunit of the vacuolar H+-ATPase
DEHA2A00506g	*TPO2*	0,13	Polyamine transport protein

Oxidative stress			
DEHA2C08316g	*GPX2*	0,22	Phospholipid hydroperoxide glutathione
DEHA2G17732g	*SOD1*	0,23	Cytosolic copper-zinc superoxide dismutase
DEHA2B00946g	*Not found*	0,17	protein-methionine-R-oxide-reductase-activity, response to oxidative stress
DEHA2E15004g	*Not found*	3,1	similar to *Candida albicans* (*SOD4*), Superoxide dismutase
DEHA2E01232g	*SOD2*	4,3	Similar to *Candida* (*Mn-SOD*), Mn-superoxide dismutase protein precursor

Table 3: Genes of *D. hansenii* 1L25 differentially expressed in mixed culture compared to *D. hansenii* 1L 25 pure cultures at 27 h.

***Debaryomyces* gene name**	***Saccharomyces* gene name**	**Factor change**	**Function**
Respiration			
DEHA2C06402g	*CYT1*	0,30	Component of the mitochondrial respiratory chain
DEHA2D11990g	*QCR6*	0,36	Subunit 6 of ubiquinol cytochrome-c-reductase complex
DEHA2B07150g	*ATP15*	0,45	Subunit of the F1 sector of mitochondrial ATP synthase
DEHA2F16302g	*COX7*	0,48	Subunit VII of cytochrome c oxidase
DEHA2G07018g	*Not found*	0,46	Similar to *Candida albicans*, NADH-ubiquinone oxidoreductase
DEHA2D08778g	*Not found*	0,47	Similar to *Neurospora crassa*, NADH-ubiquinone oxidoreductase 14.8 kDa subunit
DEHA2F02552g	*Not found*	0,50	Similar to *Yarrowia lipolytica*, subunit of protein NADH:ubiquinone oxidoreductase precursor
DEHA2B11528g	*Not found*	0,52	Similar to *Paracoccidioides brasiliensis*, NADH-ubiquinone oxidoreductase
DEHA2G23826g	*COX11*	2,70	Mitochondrial inner membrane protein
DEHA2F15246g	*COX15*	2,30	Protein required for the hydroxylation of heme O to form heme A
DEHA2G20064g	*COX18*	2,00	Mitochondrial integral inner membrane protein
DEHA2D15906g	*MBA1*	2,20	Protein involved in assembly of mitochondrial respiratory complexes
Mitochondrial ribosomes			
DEHA2F19690g	*MRPL7*	1,94	Mitochondrial ribosomal protein
DEHA2F14762g	*MRPL40*	2,08	Mitochondrial ribosomal protein

DEHA2C06622g	*MRPL10*	2,08	Mitochondrial ribosomal protein
DEHA2C08492g	*MRPS12*	2,11	Putative mitochondrial ribosomal protein
Carbohydrate metabolism			
DEHA2G21032g	*ADH1*	0,46	Alcohol dehydrogenase
DEHA2F01738g	*SYM1*	0,48	Protein required for ethanol metabolism
DEHA2G22572g	*ALD2*	2,00	Aldehyde dehydrogenase
DEHA2F22374g	*GPH1*	2,05	Non-essential glycogen phosphorylase
DEHA2G23452g	*SOL4*	2,00	6-phosphogluconolactonase
DEHA2E05676g	*ACS1*	2,21	Acetyl-coA synthetase isoform
DEHA2B02310g	*not found*	2,36	Similar to *Bordetella bronchiseptica*, putative aldolase
DEHA2D14498g	*ATH1*	2,62	Acid trehalase
DEHA2E16346g	*RHR2*	2,34	Isoform of DL-glycerol-3-phosphatase
Transport			
DEHA2G02156g	*MEP1*	0,43	Ammonium permease
DEHA2D03234g	*MEP2*	0,22	Ammonium permease
DEHA2C07810g	*ADY2*	2,10	Acetate transporter
DEHA2B13706g	*CCC1*	0,46	Putative vacuolar Fe2+/Mn2+ transporter
DEHA2F15114g	*CTR1*	3,80	High-affinity copper transporter of the plasma membrane
DEHA2G05082g	*FET3*	2,50	Ferro-O2-oxidoreductase
DEHA2D01452g	*FRE7*	3,10	Putative ferric reductase
DEHA2E23958g	*ZRT1*	2,00	High-affinity zinc transporter of the plasma membrane
DEHA2C05390g	*SIT1*	2,20	Ferrioxamine B transporter
DEHA2C05918g	*HXT3*	3,10	Low affinity glucose transporter of the major facilitator superfamily
DEHA2B16280g	*HXT3*	2,00	Low affinity glucose transporter of the major facilitator superfamily
DEHA2E01166g	*Not found*	2,00	Similar to *Candida albicans* (*HGT1*), high-affinity glucose transporter
DEHA2C05896g	*HXT3*	2,20	Low affinity glucose transporter of the major facilitator superfamily
DEHA2C05874g	*HXT3*	2,20	Low affinity glucose transporter of the major facilitator superfamily
DEHA2A00748g	*GNP1*	2,80	High-affinity glutamine permease
DEHA2C07832g	*DIP5*	3,60	Dicarboxylic Aminoacid permease
DEHA2F15642g	*QDR3*	1,90	Multidrug transporter of the major facilitator superfamily
DEHA2A10802g	*SAL1*	1,90	ADP/ATP transporter
DEHA2C06380g	*ITR1*	0,31	Myo-inositol transporter
DEHA2E16082g	*SUL1*	0,44	High affinity sulfate permease
DEHA2G09108g	*not found*	2,80	Plasma membrane Na+ ATPase

Oxidative Stress			
DEHA2E15004g	*Not found*	1,81	Similar to *Candida albicans* (*SOD4*), superoxide dismutase
DEHA2F02442g	*POS5*	2,12	Mitochondrial NADH kinase
DEHA2B07744g	*AHP1*	3,31	Thiol-specific peroxiredoxin
DEHA2F24486g	*CCS1*	2,00	Copper chaperone for superoxide dismutase Sod1p
Fer			
DEHA2B15994g	*FRE5*	2,10	Putative ferric reductase

Table 4: Production of ethanol (mg/l^{-1}) in pure and mixed cultures of *D. hansenii* 1L25, at 12 h and 27 h in the SM 2XAA medium. The initial percentage of both yeasts in the mixed culture (DY) is as follows: 50% D and 50% Y.

	Production of ethanol (mg/l)	
Cultures	**T12 h**	**T27 h**
D	9 ± 4	101 ± 5
DY	4 ± 2	10 ± 1

Table 5: Levels of expression of *CYT1*, *QCR7*, *CTR1*, *SOD4* and *ADH1* genes, as measured by real-time quantitative PCR in *D. hansenii* 1L25 mixed culture compared to the pure culture, at 12 h and 27 h.

	Expression level			
	Microarray		**RT qPCR**	
Genes	**T12h**	**T27h**	**T12h**	**T27h**
CYT1	nd	0,3	0,7 ± 0,3	0,7 ± 0,3
QCR7	0,2	nd	0,4 ± 0,3	0,8 ± 0,2
CTR1	3	3,8	3,1 ± 1,3	2,9 ± 0,6
SOD4	3,1	1,8	8,5 ± 0,6	3,9 ± 1,9
ADH1	5,1	0,5	8,1 ± 0,4	0,7 ± 0,2

C. Conclusions

Nous avons observé que la croissance de la levure *D. hansenii* 1L25 est réduite d'un facteur 10 lorsqu'elle est cultivée en présence de la levure *Y. lipolytica* 1E07, sur le milieu MCD riche en acides aminés (2XAA) et que les deux levures sont inoculées à la même concentration dans la co-culture (50% Dh et 50% Yl). L'inhibition est observée à partir de 12 heures de culture et persistera jusqu'à la fin de la culture (123 heures). De plus, nous avons observé que la levure *D. hansenii* 1L25 produit des quantités faibles d'ammoniaque, contrairement à la levure *Y. lipolytica* 1E07 qui elle en produit de larges quantités. Nous avons donc émis l'hypothèse que l'ammoniaque produit par *Y. lipolytica* 1E07 pourrait jouer un rôle dans l'inhibition de la croissance de *D. hansenii* 1L25 sur le milieu MCD 2XAA (50% Dh et 50% Yl). Afin de tester l'éventuel rôle de l'ammoniaque, nous avons effectué la co-cutlure des deux levures sur un milieu appauvri en acides aminés MCD 0.1XAA, qui contient vingt fois moins d'acides aminés que le milieu MCD 2XAA (compte-tenu du rôle des acides aminés sur la production de l'ammoniaque). Nous n'avons pas pu détecter de production d'ammoniaque chez les deux levures dans ces conditions, et la croissance de *D. hansenii* 1L25 ne diminue que légèrement en présence de *Y. lipolytica* 1E07 sur le milieu MCD 0,1XAA. Ce résultat confortait l'hypothèse du rôle probable de l'ammoniaque produit par *Y. lipolytica* 1E07 sur la croissance de *D. hansenii* 1L25. Nous avons ensuite testé, l'effet de l'inoculation de *D. hansenii* 1L25 à une concentration plus élevée dans la co-culture (milieu MCD 2XAA, 75% Dh et 25% Yl), afin de voir si l'inhibition persistera. Les résultats ont montré que bien que la levure *Y. lipolytica* 1E07 produise de l'ammoniaque, la croissance de *D. hansenii* 1L25 n'est plus inhibée en co-culture, démontrant que l'ammoniaque n'est pas impliquée dans cette inhibition.

Les analyses biochimiques ont montré que *D. hansenii* 1L25 consomme simultanément le lactose et les acides aminés pendant la phase exponentielle de la croissance, tandis qu'elle ne consomme que faiblement le lactate et ceci pendant la phase stationnaire. *Y. lipolytica* 1E07 consomme quant à elle, les acides aminés dans un premier temps et ceci pendant la phase exponentielle, puis le lactate dans un second temps dans la phase stationnaire, elle ne consomme pas le lactose. Les deux levures n'entrent donc pas en compétition pour les sources de carbone, puisque chacune possède une source nutritionnelle différente, ni pour les acides aminés puisque les dosages ont montré qu'ils ne sont pas limitants pour la croissance de *D. hansenii* 1L25 sur le milieu MCD 2XAA.

L'étude transcriptomique a été réalisée chez la levure *D. hansenii* 1L25 cultivée en co-culture en comparasion à sa croissance en mono-culture, aux deux temps de croissance, 12 h et 27 h. En effet, à 12 h les cellules de *D. hansenii* sont en concentrations identiques dans la mono et dans la co-culture, alors qu'à 27 h les cellules de *D. hansenii* sont en concentration inférieure dans la co-culture par rapport à la mono-culture. Les résultats de l'étude transcriptomique ont montré qu'il y a une inhibition de l'expression de gènes de la chaîne respiratoire mitochondriale chez *D. hansenii* en présence de *Y. lipolytica*, ceci est accompagné par une induction de l'expression de gènes impliqués dans la voie fermentaire (induction du gène *ADH1*). L'inhibition de la voie respiratoire est aussi accompagnée par une activation de gènes de la glycolyse et du transport des sucres afin de préserver l'énergie cellulaire et pallier à la carence en oxygène. Ce comportement a déjà été décrit chez plusieurs micro-organismes vivants quand ils sont carencés en oxygène (Mustroph *et al.*, 2010).

II. Effet de la thiamine sur la croissance et la morphologie de la levure *Yarrowia lipolytica* 1E07

A. Introduction

Nous nous intéressons tout particulièrement, à l'étude des interactions microbiennes de type levures-levures et levures-bactéries. Dans ce cadre, nous nous sommes appuyés sur l'interaction décrite entre des micro-organismes du sol, *Pseudomonas fluorescens* BBc6R8 et *Laccaria bicolor* S238N et pour lesquels a été montré que *P. fluorescens* BBc6R8 favorise la croissance du champignon *L. bicolor* S238N et induit des modifications morphologiques dans ce dernier (Deveau *et al.*, 2007). D'autre part, il a été montré qu'il existe un effet bénéfique pour ces deux micro-organismes du sol puisque la bactérie produit de la thiamine qui favorise la croissance du champignon et que le champignon produit du tréhalose qui pourrait favoriser à son tour la croissance de la bactérie (Deveau *et al.*, 2010).

Nous avons donc, émis l'hypothèse, que la thiamine produite par les bactéries, pourrait induire des changements morphologiques chez les champignons ou chez les levures. En conséquence et dans un premier temps, nous avons testé l'effet de la thiamine ajoutée dans le milieu MCD agar, sur la morpholopgie de la levure *Y. lipolytica* 1E07. Nous avons observé, que la colonie de levure subit un changement de morphologie depuis une forme ridée sur le milieu MCD supplémenté en thiamine vers une forme lisse sur un milieu carencé en thiamine.

A la lumière de ces résulats, nous avons choisi d'effectuer une étude transcriptomique de la levure *Y. lipolytica* 1E07, en comparant une condition de croissance sur un milieu MCD carencé en thiamine à la croissance sur le milieu MCD supplémenté en thiamine. Cette étude doit nous permettre de reconstruire les voies impliquées dans les changements de morphologie de la levure (tant au niveau macroscopique de la colonie, que microscopique de la cellule) induit en présence de thiamine dans le milieu de culture.

B. Publication n°2: "Transcriptomic study revealing the effect of thiamin on the morphology of *Yarrowia lipolytica*"

A soumettre dans le Journal: Applied and Environmental Microbiology

Transcriptomic study revealing the effect of thiamin on the morphology of *Yarrowia lipolytica*

Reine Malek[1], Pascale Frey-Klett[2], Djamila Onésime[1], Dominique Swennen[1], Pascal Bonnarme[3], Françoise Irlinger[3], Julie Aubert[4], Jean-Marie Beckerich[1*]

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

[2]UMR 1136 INRA-Université de Lorraine Interactions Arbres/Microorganismes, 54280 Champenoux, France.

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

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

[*]Corresponding author:

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

KEY WORDS: *Yarrowia lipolytica*, thiamin, microarray analysis, gene expression, dimorphism.

ABSTRACT

In the first bioassays carried out in SM medium depleted in thiamin, we have confronted *Yarrowia lipolytica* 1E07 to a gradient of thiamin concentration from 3µM to 100µM, in the objective of studying the effect of thiamin on *Y. lipolytica* 1E07 growth and morphology. We have observed a change in the morphology of the yeast between the SM medium which is not containing any source of thiamin and the SM medium in which thiamin was added. *Y. lipolytica* 1E07 grows in a rough morphology on SM confronted with thiamin, while it grows in a smooth morphology on SM without thiamin. In the objective to understand the morphological changes observed in the SM medium depleted or supplemeted with thiamin, we compared the transcriptome of *Y. lipolytica* 1E07, grown in SM medium with or without thiamin. Transcriptomics revealed a very large change in cell wall organization and metabolism linked to the large morphogenetic differences. These transcriptomic study allowed to understand the requirement in thiamin for hyphal transition. This allowed to identify the set of genes whose expression was modified during hyphal transition.

INTRODUCTION

Yarrowia lipolytica is a non-conventional yeast which has received much attention due to its possible applications in biotechnology. These include its capacity to metabolize hydrophobic substrates such as alkanes, fats, oils and fatty acids, to produce organic acids, and to express homologous and heterologous proteins (1, 3, 17). In addition, *Y. lipolytica* has been widely used as a cell differenciation model system because its of dimorphic properties (6). Under natural conditions, *Y. lipolytica* grows as mixture of budding yeasts and short mycelial cells, but under controlled conditions it may grow as almost homogeneous populations of either yeast-like cells or branched hyphae (1, 19, 44). This dimorphic capacity, i.e. the ability to have a yeast-like as well as a hyphal growth, depending on the environmental conditions, is a property of a number of fungal species independent of their taxonomic position (7). The phenomenon of dimorphism is important, since for a number of human and plant pathogenic fungi the dimorphic capacity is directly related to the virulence (24, 36). In this sense it is important to note that the dimorphic transition of *Y. lipolytica* shares many similarities with that of *Candida albicans*, the most important human pathogenic fungus (28).

Different effectors involved in the dimorphic transition of *Y. lipolytica* have been described. Among these, carbon sources (44), nitrogen source (46, 49), blood serum (12, 22), citrate and pH of the medium (46). Evidence exists that the dimorphic response sensed through the operation of two signaling transduction mechanism: the mitogen activated protein kinase (MAPK), and the cyclic-AMP (cAMP) dependent protein kinase (PKA) pathways (32). It is known that in *Y. lipolytica*, these pathways are oppositely involved in dimorphism, the MAPK signaling pathway is necessary for mycelial growth while the PKA pathway is required for growth in the yeast-like form (1, 6, 7). These results are opposite to those displayed in *C. albicans* and other fungi, where MAPK and PKA pathways work together in the regulation of the dimorphic transition (27), but are similar to the case of *Ustilago mayadis* (32).

In this work, we are interested in the study of the effect of thiamin (vitamin B1) on the growth and the morphology of *Y. lipolytica*. Thiamin was demonstrated to have a role in the enhancing of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* S238N growth, as reported by Deveau *et al*. in 2010 (11). We have remplaced *L. bicolor* by the eukaryotic model *Y. lipolytica*, because of the disponibility of the genome of *Y. lipolytica* and the facility of its genetic manipulations. The aim of this work was to elucidate the molecular mechanisms by which thiamin influences the growth and the morphology of *Y. lipolytica*. For this purpose, transcriptomic study was carried out for *Y. lipolytica* growing in a SM agar medium, supplemented or not with thiamin.

MATERIALS AND METHODS

Yeast strain, growth conditions and confrontations bioassays. *Yarrowia lipolytica* 1E07 (Yl 1E07) originally isolated from the Livarot French cheese, was obtained from the MILA culture collection (Laboratoire des Micro-organismes d'Intérêt Laitier et Alimentaire (Université de Caen, France))**.** Yl 1E07 was maintained at - 80ºC in a 10 % glycerol yeast-potato-dextrose (YPD, Difco laboratories, USA).

When necessary, cells were first precultured in 100 ml flask containing 20 ml of liquid Synthetic Medium (SM) with or without thiamin (TH+ or TH-), inoculated with thawed stock suspension, for 48 hours at 25ºC and 150 rpm. This synthetic medium, described by Mansour *et al.* 2008 (31), presented optimal conditions for the growth of Yl 1E07 and gave us the possibility to control the composition of the medium by adding or suppressing of some important molecules to our research like thiamin in this study.

Confrontations bioassays were developed using 9-cm-diameter Petri dishes containing 20 ml per plate of a SM agar medium, supplemented or not with thiamin. After 48 h of growth of the first preculture, Yl 1E07 was inoculated in the SM agar at the concentration of $1x10^7$ CFU ml^{-1} in a drop of 25 µl.

First precultures and SM agar medium used in the first confrontation bioassays did not contain thiamin. A gradient of thiamin from 3µM to 100µM, in a form of drops, was confronted at 1.5 cm from the center of the colony of Yl 1E07. In confrontation bioassays used for transcriptomic study, thiamin was added to the SM agar medium, at a concentration of 3µM. Plates were incubated at 25 ºC for 15 days.

Growth and morphology measurements. The diameter of Yl 1E07 colony was measured from day 1 to day 15, with 5 replicates per condition. For each condition, three photographs were taken using a digital camera (Canon EOS 350D). The cell morphology was vizualized with fluorescent microscopy (Olympus BX51) and photographed at 100x magnification. Similarly, three photographs were taken at random for each condition.

Extraction and purification of total RNA. One plate was collected to extract RNA from SM TH+, which is equivalent to 500 mg of pellets. Pellets were resuspended in Trizol®Reagent (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) (100 mg of pellets per 1 ml of Trizol) and total RNA was extracted according to Mansour *et al.*, 2009 (30). 6 plates were used to isolate RNA from SM TH- , using the mini Kit RNeasy (Qiagen, Courtaboeuf, France), according to manufacturer's instructions. In SM TH-, we are unable to collect cells without agar, in the contrary of cells growing in SM TH+ where cells were easily separated from agar. For this

reason, we have used two different ways to extract RNA. The zone collected to extract RNA was presented in Figure 1.

RNA quality and quantification were analyzed using a NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA) and a Bioanalyser Agilent 2100 (Agilent, Palo Alto, CA, USA).

Synthesis and purification of fluorescent cRNA. 200 ng of total RNA were used for Yl 1E07 growing in SM TH- and SM TH+. Total RNA was lineary amplified and labeled using two different fluorescent dyes: cyanine 3-CTP (Cy-3), and cyanine 5-CTP (Cy-5) as described in the Agilent Low Input Quick Amp Labeling kit (Version 6.5, May 2010). Amplified fluorescent cRNA probes were purified using the Qiagen's RNeasy mini-spin columns. Finally, fluorescently labeled cRNA samples were analyzed for yield, dye incorporation and quality using the NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA) and a Bioanalyser Agilent 2100 (Agilent, Palo Alto, CA, USA). Only samples that presented a concentration of > 6 pmol/µg (a measure representing efficient dye incorporation) were used for hybridization, as recommended by the manufacturer.

***Yarrowia lipolytica* microarray design.** Microarray design was performed on a draft version of the *Yarrowia lipolytica* genome (C. Neuvéglise, personal communication). Design of the probes was done using PrSto, a newly developed probe designer and selector (Loux *et al.*, to be published). A complete description of the microarray can be found in NCBI's Gene Expression Omnibus (Edgar *et al.*, 2002), under the accession number GPL15177.

Hybridization and washing protocol. The expression profiles of Yl 1E07 growing in SM TH- and SM TH+ were analysed using DNA microarray (Agilent USA). Cy-3 labeled cRNA were combined with Cy-5 labeled cRNA experimental targets obtained from Yl 1E07 cultures in SM TH- and SM TH+ at day 8. The cRNA of the combined Yl 1E07 cultures TH- and TH+ were used for probe hybridization onto the microarrays. Dye switches were done using four biological replicates for both Yl 1E07 TH- and TH+ treatments. The hybridization and washing protocols were done as recommended by the manufacturer (Two-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis Protocol, version 6.5, May 2010, from Agilent Technologies). Three hundred ng of Cy-3 and Cy-5 labeled cRNA were combined with 10x blocking agent, and 25x fragmentation buffer at 60 ºC for 30 min. The reaction was stopped with 2x GE hybridization buffer HI-RPM and hybridized to the oligo microarray for 17 h at 65 ºC with continuing rotation (10 r.p.m). After hybridization, slides were washed for 1 min at room temperature, using GE wash buffer 1, and 1 min at 37 ºC with GE wash buffer 2. Next,

the slides were washed for 1 min with acetonitrile (Sigma). A final washing was done using stabilization and drying solution for 30 s.

Data processing and statistical analysis. Data images were obtained by laser-based scanning using a microarray scanner from Agilent in extended dynamic range (XDR), with a resolution of 5 nm per pixel. Scanning parameters were as recommended by the manufacturer. The complete experimental data set was deposited in the GEO database with accession number xxx. For further analysis, intensity-dependent normalization was performed with the LOESS (53) procedure followed by subtraction of the log-ratio median calculated over the values for an entire block from each individual log-ratio, using the *anapuce* package of R (10). Differential analysis was performed with the *varmixt* package of R (10). Finally, the raw *P* values were adjusted by the Bonferroni method, which controls the family-wise error rate. We considered genes with a *P* value ≤ 0.05 to be differentially expressed.

Reverse transcription and Real-time PCR conditions for Microarray-Data validation. After RNA extraction, the cDNA was synthesized using the **SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis Kit** Synthesis System (Invitrogen) with random hexamers, according to the manufacturer's recommendations. Primers were designed with LightCycler software (Roche, Mannheim, Germany) and synthesized by Eurogentec (Seraing, Belgium). The primers used are listed in Table 1. The quantitative real-time RT-PCR was performed using a LightCycler (Roche) and LightCycler FastStart DNA Master^{plus} SYBR Green I kit (Roche), according to the manufacturer's recommendations.

The threshold cycle (C_T) values were determined with LightCycler software (version 3.3), using the second derivative method. Standard curves were generated by plotting the C_T values as a function of the initial RNA concentration log. PCR efficiency (E) was then calculated using the following formula: $E=10^{-1/slope}$. The TFC1 gene encoding for one of the six subunits of the RNA polymerase III transcription initiation factor complex (TFIIIC) was chosen as a suitable internal control gene to normalize the results (Teste *et al.*, 2009). In each sample, the quantity of cDNA for each gene was normalized to the quantity of the TFC1 cDNA, which is stable in our conditions. The relative change in gene expression was recorded as the ratio of normalized target concentrations ($\Delta\Delta$ct).

RESULTS AND DISCUSSION

Effect of thiamin on the morphology of *Yarrowia lipolytica* 1E07 (Yl 1E07).

(i) Addition of a gradient of thiamin from 3µM to 100µM, in the form of drops in front of the colony of Yl 1E07. Significative differences were observed between the morphology and growth of Yl 1E07 grown on SM medium depleted in thiamin, and those of Yl 1E07 grown on the same medium but facing a gradient of concentrations of thiamin (from 3µM to 100µM of thiamin) (Figure 2). In standard samples (Figure 2A), Yl 1E07 colony grew in a smooth morphology whatever the times studied (d4, d8, d12, d15). Whereas morphological changes appeared in presence of 10µM thiamin concentration from d4 (Figure 2B) and in presence of 3µM thiamin concentration from d8, d12, d15 (Figure 2C, D, E). Yl 1E07 colony changed from a smooth to a rough morphology and changes were observed in front of the drop of thiamin added on the agar medium. The effect of thiamin added, was very noticeable at the four times of culture, for concentrations superior to 10µM thiamin concentration.

Morphological changes from smooth to rough morphology in the presence of a gradient concentration of thiamin, corresponded to the transition of Yl 1E07 from single cell yeast form to mycelial growth form (Figure 3). The morphological transition was more noticeable with 100µM thiamin concentration (Figure 3D). Transition between single cell yeast form and mycelial form is named as the dimorphic transition and this phenomenon was previously observed in several species of fungi like *Yarrowia lipolytica*, *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*, depending on the environmental conditions (1).

(ii) Addition of thiamin at 3µM, in a dissolved form in the SM medium. We have chosen to add 3µM of thiamin in the SM medium since it was the minimal concentration of thiamin where morphological changes in Yl 1E07 were observed. The addition of thiamin in a dissolved form in the SM medium, allows the homogeneous distribution of thiamin in the medium while in the first experimentations, thiamin was present only at one side of the colony of Yl 1E07.

Similar morphological changes were observed when thiamin was added in a gradient of concentration as those observed when added in front of the colony of Yl 1E07. Yl 1E07 colony presented a smooth morphology (Figure 1A) in the medium without thiamin, corresponding to single cell yeast form (Figure 5A). In contrast, Yl 1E07 colony presented hyphal cells (Figure 5B) corresponding to colonies with a rough morphology (Figure 1B) in the medium complemented with 3µM of thiamin.

Transcriptomic study of *Yarrowia lipolytica* 1E07, growing in SM medium with or without thiamin at day 8 (d8). To gain further insight into the transition in the colony and cell morphology of Yl 1E07 induced in the presence of thiamin, a transcriptomic study was carried out on Yl 1E07 grown either in SM medium supplemented or not with 3µM of thiamin, both at day 8. We have chosen to collect cells at d8 because as shown in Figure 4, Yl 1E07 was in the exponential growth phase at that time (Figure 4). 605 genes were found differentially expressed when comparing Yl 1E07 on SM without thiamin (TH-) to Yl 1E07 on SM with thiamin (TH+) (equivalent to 9,3 % of the total genome). 33 % were unknown among the genes differentially expressed. The differential expressed genes were classified in functional categories represented in Table 2, and we will focus only on the main genes categories (thiamin metabolism, carbon metabolism, cell wall maintenance, hyphal transition, signaling pathway, mitosis cycle) represented in Table 3.

(i) Thiamin and carbon metabolism. When Yl 1E07 was grown on the SM medium depleted in thiamin (TH-), the pathway of biosynthesis and the transport of thiamin seemed to be activated. Indeed, *THI4* (YALI0A09768g), *THI6* (YALI0C15554g), *THI20* (YALI0E04224g) and *THI80* (YALI0E21351g) genes, which encoded enzymes implicated in the biosynthesis pathway of thiamin (38) and, YALI0D19756g gene which encoded an enzyme involved in the transport of thiamin, were up-regulated in our study (Table 2). These results showed the importance and the need of thiamin for the growth of Yl 1E07.

The carbon metabolism was found affected in TH-, when Yl 1E07 was grown in a single yeast form. Among genes differentially expressed in the category of carbon metabolism, the following were considered to be the most relevant: i) *PDC6* (YALI0D06930g), *PDA1* (YALI0F20702g), *KGD2* (YALI0D23815g) and two homologous of *S. cerevisiae PDB1* (YALI0F05038g and YALI0E27005g) were down-regulated in TH-. These genes encoded enzymes that are thiamin dependent (15, 39). *PDA1* and *PDB1* which encoded subunits of the pyruvate dehydrogenase, supplied the tricarboxylic acid (TCA) cycle by the acetyl coenzyme A. *KGD2* which encoded the alpha-ketoglutarate dehydrogenase, transformed the alpha-ketoglutarate to succinyl-coenzyme A in the TCA cycle itself (15). In consequence, their down-regulation in TH-, could disturb the TCA cycle which is essential for the growth of Yl 1E07; ii) *SHB17* (YALI0D09229g) and *XKS1* (YALI0F10923g) were up-regulated in TH-, in the aim of the restoration of thiamin. *SHB17* gene, encoded the sedoheptulose bisphosphatase involved in riboneogenesis; dephosphorylates sedoheptulose 1,7-bisphosphate, which is converted via the non oxidative pentose phosphate pathway to ribose-5-phosphate. *XKS1* gene, encoded the xylulokinase, which converts D-xylulose and ATP to xylulose 5-phosphate

and ADP. Ribose-5-phosphate and xylulose-5-phosphate could be the initial substrates for thiazole biosynthesis in the thiamin biosynthesis pathway (39). It shoud be noted that the thiamin biosynthesis involves the independent formation of two rings structures, 2-methyl-4-amino-5-hydroxymethylpyrimidine (HMP) and 4-methyl-5-ß-hydroxyethylthiazole (HET) (37); iii) *ADH1* (YALI0D25630g) and two homologous of *S. cerevisiae* ADH3 (YALI0A16379g and YALI0A15147g) were down-regulated in TH-. *ADH1* and *ADH3*, two genes which encoded an alcohol dehydrogenase, are involved in the transformation of acetaldehyde to ethanol. In consequence, our results indicated that the fermentation pathway was repressed in TH-.

Changes observed in the carbon metabolism during morphological changes of Yl 1E07 growing in the SM medium, were also observed in the work of Meyer *et al*. in 2009 (34). These authors, have tried to reconstruct a model for the process of apical branching observed in the ramosa-1-mutant of *Aspergillus niger* (ramosa-1-mutant was obtained from the wild type strain of *A. niger* T312, after UV mutagenesis) (34). They observed changes in the energy metabolism: the pyruvate decarboxylase and the alcohol dehydrogenase were up-regulated in ramosa-1-mutant presenting apical branching. These results were similar to the results we obtained, when Yl 1E07 was grown in TH+ and presented a mycelial growth.

(ii) Cell wall maintenance, hyphal transition, signaling pathway and mitosis. Morphological changes which occurred in Yl 1E07 growing in TH- (single cell form), were accompanied by the differential expression of several genes implicated in the integrity, synthesis and organization of the cell wall. 41 genes were down-regulated while 16 genes were found up-regulated in Yl 1E07 growing in TH-. Among these genes, 18 and 8 genes respectively, did not present a homology to *S. cerevisiae* and were identified as GPI anchored proteins.

Among genes down-regulated, the following were considered to be the most relevant: i) the three homologous of *S. cerevisiae FLO11* or *MUC1* (YALI0D09185g, YALI0E07557g and YALI0A00176g), the homologous of *C. albicans NAG1* (YALI0C01419g) and *PUN1* (YALI0B07601g), which are implicated in filamentous growth (Table 2). *FLO11/MUC1* genes, which encoded a GPI-anchored cell surface glycoprotein, are required for filamentation (26, 47). *NAG1*, the homologous of *C. albicans*, which encoded glucosamine-6-phosphate deaminase that converted glucosamine-6-P to fructose-6-P, is required for mycelial growth in *C. albicans* (35). *PUN1* which encoded a plasma membrane protein, was required for filamentous growth and cell adhesion in *S. cerevisiae* (27). The down-regulation of these genes which are markers of filamentous growth, could explain the single cell form of Yl 1E07

observed in TH-; ii) *GAS5* (YALI0D04851g) which encoded a ß-(1,3) glucosyl transferase, was known to be related to the biogenesis and reorganization of the cell wall (33). The cell wall of *Y. lipolytica* contains ß-glucans as the quantitatively most important component followed by mannoproteins and chitin, indicating the importance of ß-glucan modifications on the biogenesis and reorganization of the cell wall (1). *GAS5* was down-regulated in Yl 1E07 growing in a single cell form, suggestinga destabilization in the organization of the cell wall in this case; *DCW1* (YALI0F18722g) which encoded a putative mannosidase, GPI-anchored membrane protein required also for cell wall biosynthesis (23); *CRH1* (YALI0C09680g) and *UTR2* or *CRH2* (YALI0B15510g) which encoded a chitin transglycosylase, were required for the cross-linking of chitin to ß-(1,6)-glucan in the *S. cerevisiae* cell wall (5). These cross-links between the different components, allowed the synthesis and the stabilization of the cell wall. Genes cited above were down-regulated in TH-, indicating a modification of the cell wall structure; iii) *RHO1* (YALI0B13662g) was down-regulated in Yl 1E07 growing in single cell form. This gene which encoded a guanosine triphosphate (GTP)-binding protein, is involved in the establishment of the cell polarity playing a role in the reorganization of the actin cytoskeleton (14) and the regulation of the cell wall synthesizing enzyme 1,3-beta-glucan synthase (42); *RGA1* (YALI0A12111g) which encoded a Rho GTPase activating protein, has as target the protein Cdc42p which is required for polarity establishment and bud emergence. Findings indicated that Cdc42p can interact with and activate Ste20p, a protein kinase that operates in the pheromone pathway (48) which in turn controls the filamentous growth (43). This gene was also down-regulated in TH-; Two homologous of *S. cerevisiae RDI1* (YALI0D12408g and YALI0A07403g) were down regulated in TH-. *RDI1* is the sole Rho GDI (guanosine dissociation inhibitor) of the yeast *S. cerevisiae*, which interacts with Cdc42, Rho1 and Rho4, Rho GTPases known to be implicated in the establishment and the maintenance of cell polarity (50). It was shown that *RDI1* contributed to pseudohyphal growth,since the deletion of the homologous gene *RDI1* in *C. albicans*, greatly reduces the filamentous growth (9). *YlRAC1* (YALI0E25845g) which encoded a G protein of the Rho family was also down-regulated in Yl 1E07 TH-. Homology studies have indicated that the nearest homologue in *S. cerevisiae* was CDC42. In literature *YlRAC1* was reported to play a role in the induction of yeast-to-mycelium transition. Therefore the transcription of four genes involved in the same regulatory process were modified in the same way by thiamin starvation.

iv) *TPM2* (YALI0F27049g) which encoded a minor isoform of tropomyosin, binds to and stabilizes actin cables and filaments, which direct polarized cell growth and the distribution of several organelles (13, 41); *TUB1* (YALI0E19360g) which encoded the alpha-tubulin; is

associated with the beta-tubulin (Tub2p encoded by *TUB2* "YALI0E00726g") to form tubulin dimer, which polymerizes to form microtubules. Microtubules are conserved cytoskeletal elements that function in nuclear processes: chromosome segregation in mitosis and meiosis, spindle orientation, and nuclear migration during mitosis and mating (52). Down-regulation of these two genes *TUB1* and *TUB2* may disturb the cell cycle process; iv) *YPK2* (YALI0C04158g) which encoded a protein kinase participating in a signaling pathway, is required for optimal cell wall integrity (45); *ZEO1* (YALI0F08327g) which encoded a peripheral membrane protein of the plasma membrane that regulated the cell wall integrity (18).

Other interesting genes classified in the category of hyphal transition (Table 2), were acted as markers of the filamentous growth. Among them, *HOY1* (YALI0A18469g) and *MHY1* (YALI0B21582g) were down-regulated in Yl 1E07 TH-. It was reported that the expression of the transcription factors Hoy1p and Mhy1p, was increased in *Y. lipolytica* during the yeast-to-mycelium transition and their deletion could prevent the transition (21, 51). *YlRAC1* (YALI0E25845g) which encoded a G protein of the Rho family was also down-regulated in Yl 1E07 TH-. Similarly, in literature *YlRAC1* was reported to play a role in the induction of yeast-to-mycelium transition (20). *CCN1* (YALI0C15114g) the homologous of *C. albicans*, which is down-regulated in our study, encoded G1 cyclin and is required for hyphal growth maintenance but not for hyphal initiation (29).

A group of genes (IME2, *STE3, STE4, STE18, MF(ALPHA)1, GPA1*) was down-regulated in Yl 1E07 TH-. Those genes were shown to participate in the pheromone response pathway so-called mating pathway in *Saccharomyce cerevisiae* (25, 43, 48). This pathway could be summarized as follows in *S. cerevisiae*: *S. cerevisiae* may be present in one of two haploid cell types, which are able to mate, *MAT***a** and *MATα* cells. Pheromones released by one type bind to a specific plasma membrane receptor of the respective other type. The pheromone receptor activates an heterotrimeric G protein, which transmits the signal from the cell surface receptor to intracellular effectors. It follows the activation of a scaffold protein-bound mitogen-activated protein (MAP) kinase (K) cascade, responsible of the activation of genes required for mating response (25, 48) .

In our study, as cited above, we observed the down-regulation of *STE3* (YALI0F11913g) which encoded a receptor for a factor pheromone, STE4 (YALI0E01364g) and STE18 (YALI0A06699g) which encoded G protein beta and gamma subunits, respectively. *GPA1* (YALI0E11627g) which encoded the GTP-binding alpha subunit of the heterotrimeric G protein. Ste4p formed a dimer with Ste18p to activate the mating signaling pathway, while

formed a heterotrimer with Gpa1p and Ste18p to dampen signaling. The two homologous of *MF(ALPHA)1* of *S. cerevisiae* (YALI0E30415g and YALI0E16533g) which encoded mating pheromone alpha factors.

It was previously shown that the mating pheromone response MAPK signal transduction (*STE20, STE11, STE7* and *STE12*) may be the key to filamentous growth in all fungi (43). The same reports indicated that the mating pheromone receptors and the G protein, are not required for filamentous growth in *S. cerevisiae*, while in *Ustilago*, pheromones and their receptors, play a role in filamentous growth (43). Probably, in the case of *Y. lipolytica*, pheromones (shown in our study by *MF(ALPHA)1*) and their receptors (shown by *STE4, STE18*) and the G protein (shown by *GPA1*) were also implicated in filamentous growth.

RAS1 (YALI0E08756g) which was down-regulated in TH-, encoded a GTPase involved in G-protein signaling in the adenylate cyclase activating pathway. Mutants of *RAS1* in *C. albicans*, were shown to be defective in the formation of hyphae (16). This result in *C. albicans* could explain the down-regulation of *RAS1* in Yl 1E07 grown in the single cell form and not in the filamentous form.

Several genes related to the mitosis cycle were down- regulated in TH-: i) *CLB3* (YALI0C13926g) and *CLB4* (YALI0B19206g), encoded a B-type cyclin involved in cell cycle progression and activation of Cdc28 the catalytic subunit of the main cell cycle cyclin-dependent kinase. Cdc28 was snown to enhance the filamentous growth (2). Consequently, the down-regulation of *CLB3* and *CLB4*, could impair cdc28 activity leading to single cell form of Yl 1E07 grown in TH-; ii) *CDC10* (YALI0C21087g) and *CDC12* (YALI0D27148g) were also down-regulated in single cell form. They encoded components of the septin ring which are required for cytokinesis. Septins are GTP-binding proteins that assemble into rod-like hetero-oligomers that can associate with other rods to form filaments (8). These two genes presented also another markers of the filamentous growth.

Validation of transcriptomic analyses by RT-qPCR. Five candidate genes (*THI20, THI4, PDC6, CTT1* and *STE3*) have been selected among the genes differentially expressed in Yl TH- compared to Yl TH+. *THI20*, *THI4* and *PDC6* were selected as markers for the thiamin and carbon metabolisms, *CTT1* for oxidative stress and *STE3* for mating.

In YL TH-, *THI20*, *THI4* and *CTT1* were up-regulated, *CTT1* and *STE3* was down-regulated (Table 4). These results were consistent with those obtained by the DNA microarray approach (Table 3).

CONCLUSION

We studied the morphogenesis dependence to thiamine in the yeast *Yarrowia lipolytica*, which is a dimorphic yeast being able to grow in a pure yeast-like form or in a hyphal form. This differentiation implies a very large change in cell organization and metabolism. We revealed a strong dependence of the yeast growth to thiamin limitation which mechanisms we wanted to elucidate by a transcriptomic approach. This was possible because the thiamin starvation did not stop growth of the colonies as shown in Figure 4 and gave the opportunity to have a view on the genetic network carrying out this differentiation program. We showed that a large part of the genome expression pattern was modified in these conditions and many functional classes appeared to be modified.

A more direct approach was used by Adan-Toplitzin *et al.* in 2012. They have compared the transcriptome of *Y. lipolytica* strains *ΔSTE11* defective in hyphal transition and *ΔTpk1* which unable to grow in yeast-like form. In fact, these mutants are respectively defective in the MAP kinase signal transduction pathway and in the PKA signal transduction pathway which play general roles in the functioning of the cell. A complex treatment of the transcriptome data has been carried out so that to extract differential expression directly related to the dimorphic transition. A total of 226 genes have been identified belonging to a very diverse set of functional categories. It is noteworthy that the main classes highlighted were “metabolism and energy” and “transport” rather than “cell wall organization and biogenesis” or “morphogenesis”. To this respect, our screening of differentially expressed genes has allowed to identify a larger proportion of genes involved in “hyphal transition” and “cell wall composition”. To these obvious categories,” DNA maintenance and chromatin remodeling”, “cell cycle”, “signaling” and “vesicle transport” were added because all these categories are known to be modified by cell differentiation from the chromatin whose structure was changed to allow a major change in the expression pattern, to the components of the protein secretion pathway through which transit the components of the cell wall, including the components of the cytoskeleton whose rearrangement is required to direct the budding apparatus and the cell wall components in their new places. Concerning all these genes, no gene has been found to be expressed in only one of the two conditions or with a large factor of differential expression. This indicated that between these two morphological states, there was only a difference in expression dosage and that all the cell wall components were found in the two types of cell wall.

The question raised by our experiment is what is the link between a thiamin starvation and a block in hyphal transition. Thiamin is mainly reported to be involved in enzymatic reactions

of decarboxylation. The pyruvate decarboxylation is the main enzymatic step because it mediates the first step of the fermentation pathway leading to ethanol production. This fermentative pathway seemed important to hyphal transition. For instance, in *Aspergillus niger*, alcohol dehydrogenase appeared to be induced in the hyperfilamentation mutant *ramosa-1* indicating that an transient anerobic phase was necessary to branching of the hyphae. This could be due to a transient high demand in ATP which is more quickly available through a respire-fermentative energy pathway. This could be also linked to the rearrangement of the cytoskeleton network linked to the redirection of the protein transport fluxes to the new sites of cell elongation and of budding. The study of the transcriptome has shown the repression of the genes encoding the components of the pyruvate dehydrogenase complex which needs also thiamine pyrophosphate as cofactor and which transforms pyruvate into acetyl-CoA allowing the entry in the Krebs cycle. A dependence of the filamentation on this pyruvate dehydrogenase complex has been shown in *C. albicans* (Vellucci *et al.*, 2007; Kim and Kim, 2010). This impairment in energy supply directly linked to thiamin shortage could explain the observed morphology deficiency. This appeared as a very efficient tool to identify components of the cellular machinery involved in the hyphal transition.

ACKNOWLEDGMENTS

Reine Malek is grateful to the ABIES Doctoral School and Region Lorraine for awarding her a Ph.D. scholarship.

References

1. **Adan Topiltzin, M.-V., A. Dominguez, and J. Ruiz-Herrera.** 2012. Identification of dimorphism-involved genes of Yarrowia lipolytica by means of microarray analysis. Research in Microbiology.
2. **Ahn, S.-H., A. Acurio, and S. J. Kron.** 1999. Regulation of G2/M Progression by the STE Mitogen-activated Protein Kinase Pathway in Budding Yeast Filamentous Growth. Molecular Biology of the Cell **10:**3301-3316.
3. **Barth, G., and C. Gaillardin.** 1997. Physiology and genetics of the dimorphic fungus Yarrowia lipolytica. FEMS Microbiol Rev **19:**219-37.
4. **Blanchin-Roland, S., G. g. D. Costa, and C. Gaillardin.** 2005. ESCRT-I components of the endocytic machinery are required for Rim101-dependent ambient pH regulation in the yeast Yarrowia lipolytica. Microbiology **151:**3627-3637.
5. **Cabib, E., N. Blanco, C. Grau, J. M. Rodríguez-Peña, and J. Arroyo.** 2007. Crh1p and Crh2p are required for the cross-linking of chitin to β(1-6)glucan in the Saccharomyces cerevisiae cell wall. Molecular Microbiology **63:**921-935.
6. **Cervantes-ChÃ¡vez, J. A., F. Kronberg, S. Passeron, and J. Ruiz-Herrera.** 2009. Regulatory role of the PKA pathway in dimorphism and mating in Yarrowia lipolytica. Fungal Genetics and Biology **46:**390-399.
7. **Cervantes-Chávez, J. A., and J. Ruiz-Herrera.** 2006. STE11 disruption reveals the central role of a MAPK pathway in dimorphism and mating in Yarrowia lipolytica. FEMS Yeast Research **6:**801-815.
8. **Cid, V. J., L. AdamÃ-kovÃ¡, R. Cenamor, M. a. Molina, M. SÃ¡nchez, and C. s. Nombela.** 1998. Cell integrity and morphogenesis in a budding yeast septin mutant. Microbiology **144:**3463-3474.
9. **Court, H., and P. Sudbery.** 2007. Regulation of Cdc42 GTPase Activity in the Formation of Hyphae in Candida albicans. Molecular Biology of the Cell **18:**265-281.
10. **Delmar, P., S. Robin, and J.-J. Daudin.** 2005. VarMixt: efficient variance modelling for the differential analysis of replicated gene expression data. Bioinformatics **4:**502-508.
11. **Deveau, A., C. Brulé, B. Palin, D. Champmartin, P. Rubini, J. Garbaye, A. Sarniguet, and P. Frey-Klett.** 2010. Role of fungal trehalose and bacterial thiamine in the improved survival and growth of the ectomycorrhizal fungus Laccaria bicolor

S238N and the helper bacterium Pseudomonas fluorescens BBc6R8. Environmental Microbiology Reports **2:**560-568.

12. **Dominguez, A., E. Ferminan, and C. Gaillardin.** 2000. Yarrowia lipolytica: an organism amenable to genetic manipulation as a model for analyzing dimorphism in fungi. Contributions to Microbiology **5:**151-172.
13. **Drees, B., C. Brown, B. G. Barrell, and A. Bretscher.** 1995. Tropomyosin is essential in yeast, yet the TPM1 and TPM2 products perform distinct functions. Journal of Cell Biology **128:**383-392.
14. **Drgonova, J., T. Drgon, K. Tanaka, R. Kollar, G. C. Chen, R. A. Ford, C. S. Chan, Y. Takai, and E. Cabib.** 1996. Rho1p, a yeast protein at the interface between cell polarization and morphogenesis. Science **272:**277-279.
15. **Dubuis, C., J. Rolli, M. Lutz, G. Defago, and D. Haas.** 2006. Thiamine-auxotrophic mutants of Pseudomonas fluorescens CHA0 are defective in cell-cell signaling and biocontrol factor expression. Applied and Environmental Microbiology **72:**2606-2613.
16. **Feng, Q., E. Summers, B. Guo, and G. Fink.** 1999. Ras Signaling Is Required for Serum-Induced Hyphal Differentiation in Candida albicans. Journal of Bacteriology **181:**6339-6346.
17. **Fickers, P., P. H. Benetti, Y. Waché, A. Marty, S. Mauersberger, M. S. Smit, and J. M. Nicaud.** 2005. Hydrophobic substrate utilisation by the yeast Yarrowia lipolytica, and its potential applications. FEMS Yeast Research **5:**527-543.
18. **Green, R., G. Lesage, A.-M. Sdicu, P. MÃ©nard, and H. Bussey.** 2003. A synthetic analysis of the Saccharomyces cerevisiae stress sensor Mid2p, and identification of a Mid2p-interacting protein, Zeo1p, that modulates the PKC1â€“MPK1 cell integrity pathway. Microbiology **149:**2487-2499.
19. **Guevara-Olvera, L., C. Calvo-Mendez, and J. Ruiz-Herrera.** 1993. The role of Polyamine Metabolism in Dimorphism of Yarrowia Lipolytica. Journal of General Microbiology **139:**485-493.
20. **Hurtado, C. A. R., J.-M. Beckerich, C. Gaillardin, and R. A. Rachubinski.** 2000. A Rac Homolog Is Required for Induction of Hyphal Growth in the Dimorphic Yeast Yarrowia lipolytica. Journal of Bacteriology **182:**2376-2386.
21. **Hurtado, C. A. R., and R. A. Rachubinski.** 1999. MHY1 Encodes a C2H2-Type Zinc Finger Protein That Promotes Dimorphic Transition in the Yeast Yarrowia lipolytica. Journal of Bacteriology **181:**3051-3057.

22. **Kim, J., S. A. Cheon, S. Park, Y. Song, and J. Y. Kim.** 2000. Serum-induced hypha formation in the dimorphic yeast Yarrowia lipolytica. FEMS Microbiology Letters **190:**9-12.

23. **Kitagaki, H., H. Wu, H. Shimoi, and K. Ito.** 2002. Two homologous genes, DCW1 (YKL046c) and DFG5, are essential for cell growth and encode glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored membrane proteins required for cell wall biogenesis in Saccharomyces cerevisiae. Molecular Microbiology **46:**1011-1022.

24. **Klein, B. S., and B. Tebbets.** 2007. Dimorphism and virulence in fungi. Current Opinion in Microbiology **10:**314-319.

25. **Kofahl, B., and E. Klipp.** 2004. Modelling the dynamics of the yeast pheromone pathway. Yeast **21:**831-850.

26. **Lambrechts, M. G., F. F. Bauer, J. Marmur, and I. S. Pretorius.** 1996. Muc1, a mucin-like protein that is regulated by Mss10, is critical for pseudohyphal differentiation in yeast. Proceedings of the National Academy of Sciences **93:**8419-8424.

27. **Lengeler, K. B., R. C. Davidson, C. D'Souza, T. Harashima, W.-C. Shen, P. Wang, X. Pan, M. Waugh, and J. Heitman.** 2000. Signal Transduction Cascades Regulating Fungal Development and Virulence. Microbiology and Molecular Biology Reviews **64:**746-785.

28. **Liu, H.** 2001. Transcriptional control of dimorphism in Candida albicans. Current Opinion in Microbiology **4:**728-735.

29. **Loeb, J. D. J., M. Sepulveda-Becerra, I. Hazan, and H. Liu.** 1999. A G1 Cyclin Is Necessary for Maintenance of Filamentous Growth in Candida albicans. Molecular and Cellular Biology **19:**4019-4027.

30. **Mansour, S., J. Bailly, J. Delettre, and P. Bonnarme.** 2009. A proteomic and transcriptomic view of amino acids catabolism in the yeast Yarrowia lipolytica. PROTEOMICS **9:**4714-4725.

31. **Mansour, S., J. M. Beckerich, and P. Bonnarme.** 2008. Lactate and amino acid catabolism in the cheese-ripening yeast *Yarrowia lipolytica*. Applied and Environmental Microbiology **74:**6505-12.

32. **Martínez-Espinoza, A. D., J. Ruiz-Herrera, C. G. León-Ramírez, and S. E. Gold.** 2004. MAP Kinase and cAMP Signaling Pathways Modulate the pH-Induced Yeast-to-Mycelium Dimorphic Transition in the Corn Smut Fungus Ustilago maydis. Current Microbiology **49:**274-281.

33. **Mazan, M., E. Ragni, L. Popolo, and V. Farkas.** 2011. Catalytic properties of the Gas family beta-(1,3)-glucanosyltransferases active in fungal cell-wall biogenesis as determined by a novel fluorescent assay. Biochemical Journal **438:**275-282.

34. **Meyer, V., M. Arentshorst, S. J. Flitter, B. M. Nitsche, M. J. Kwon, C. G. Reynaga-PeÃ±a, S. Bartnicki-Garcia, C. A. M. J. J. van den Hondel, and A. F. J. Ram.** 2009. Reconstruction of Signaling Networks Regulating Fungal Morphogenesis by Transcriptomics. Eukaryotic Cell **8:**1677-1691.

35. **Natarajan, K., and A. Datta.** 1993. Molecular cloning and analysis of the NAG1 cDNA coding for glucosamine-6-phosphate deaminase from Candida albicans. Journal of Biological Chemistry **268:**9206-14.

36. **Nemecek, J. C., M. Wüthrich, and B. S. Klein.** 2006. Global Control of Dimorphism and Virulence in Fungi. Science **312:**583-588.

37. **Nosaka, K.** 2006. Recent in understanding thiamin biosynthesis and its genetic regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. Applied Microbiology and Biotechnology **72:**30-40.

38. **Nosaka, K.** 2006. Recent progress in understanding thiamin biosynthesis and its genetic regulation in Saccharomyces cerevisiae. Applied Microbiology and Biotechnolgy **72:**30-40.

39. **Pahlman, A.-K., K. Granath, R. Ansell, S. Hohmann, and L. Adler.** 2001. The Yeast Glycerol 3-Phosphatases Gpp1p and Gpp2p Are Required for Glycerol Biosynthesis and Differentially Involved in the Cellular Responses to Osmotic, Anaerobic, and Oxidative Stress. Journal of Biological Chemistry **276:**3555-3563.

40. **Pfaffl, M. W.** 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Research **29:**45.

41. **Pruyne, D., and A. Bretscher.** 2000. Polarization of cell growth in yeast. Journal of Cell Science **113:**571-585.

42. **Qadota, H., C. P. Python, S. B. Inoue, M. Arisawa, Y. Anraku, Y. Zheng, T. Watanabe, D. E. Levin, and Y. Ohya.** 1996. Identification of yeast Rho1p GTPase as a regulatory subunit of 1,3-beta-glucan synthase. Science **272:**279-281.

43. **Roberts, R. L., and G. R. Fink.** 1994. Elements of a single MAP kinase cascade in Saccharomyces cerevisiae mediate two developmental programs in the same cell type: mating and invasive growth. Genes & Development **8:**2974-2985.

44. **Rodriguez, C., and A. Dominguez.** 1984. The growth characteristics of Saccharomycopsis lipolytica: morphology and induction of mycelium formation. Canadian Journal of Microbiology **30:**605-612.

45. **Roelants, F. o. M., P. D. Torrance, N. Bezman, and J. Thorner.** 2002. Pkh1 and Pkh2 Differentially Phosphorylate and Activate Ypk1 and Ykr2 and Define Protein Kinase Modules Required for Maintenance of Cell Wall Integrity. Molecular Biology of the Cell **13:**3005-3028.

46. **Ruiz-Herrera, J., and R. Sentandreu.** 2002. Different effectors of dimorphism in <SMALL>Yarrowia lipolytica</SMALL&gt. Archives of Microbiology **178:**477-483.

47. **Rupp, S., E. Summers, H.-J. Lo, H. Madhani, and G. Fink.** 1999. MAP kinase and cAMP filamentation signaling pathways converge on the unusually large promoter of the yeast FLO11 gene. EMBO J **18:**1257-1269.

48. **Stevenson, B. J., B. Ferguson, C. De Virgilio, E. Bi, J. R. Pringle, G. Ammerer, and G. F. Sprague.** 1995. Mutation of RGA1, which encodes a putative GTPase-activating protein for the polarity-establishment protein Cdc42p, activates the pheromone-response pathway in the yeast Saccharomyces cerevisiae. Genes & Development **9:**2949-2963.

49. **Strudwick, N., M. Brown, V. M. Parmar, and M. SchrÃ¶der.** Ime1 and Ime2 Are Required for Pseudohyphal Growth of Saccharomyces cerevisiae on Nonfermentable Carbon Sources. Molecular and Cellular Biology **30:**5514-5530.

50. **Szabo, R., and V. Stofanikova.** 2002. Presence of organic sources of nitrogen is critical for filament formation and pH-dependent morphogenesis in Yarrowia lipolytica. FEMS Microbiology Letters **206:**45-50.

51. **Tiedje, C., I. Sakwa, U. Just, and T. Hofken.** 2008. The Rho GDI Rdi1 Regulates Rho GTPases by Distinct Mechanisms. Molecular Biology of the Cell **19:**2885-2896.

52. **Torres-Guzman, J. C., and A. Dominguez.** 1997. HOY1, a homeo gene required for hyphal formation in Yarrowia lipolytica. Molecular and Cellular Biology **17:**6283-93.

53. **Winsor, B., and E. Schiebel.** 1997. Review: An Overview of the Saccharomyces cerevisiae Microtubule and Microfilament Cytoskeleton. Yeast **13:**399-434.

54. **Yang, Y., S. Dudoit, P. Luu, D. Lin, V. Peng, J. Ngai, and T. Speed.** 2002. Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. Nucleic Acids Research **30:**e15.

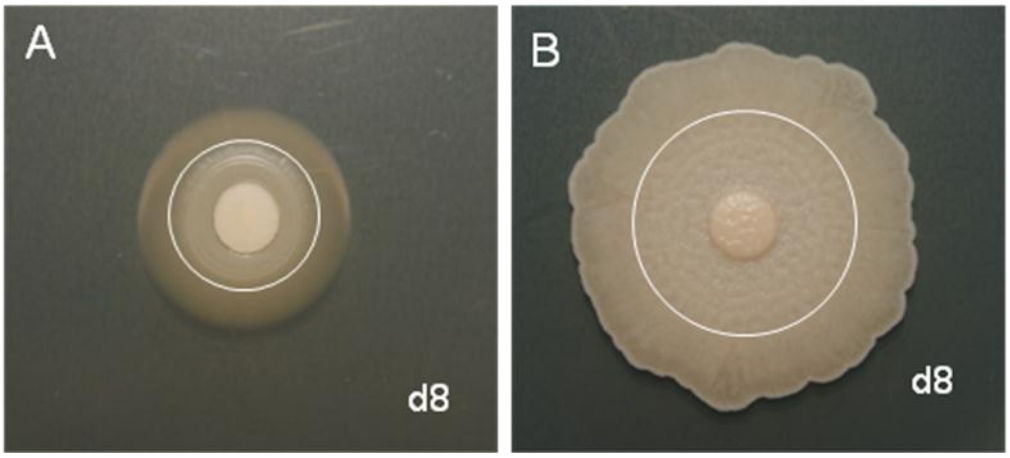


Figure 1. Effect of thiamin on the growth and the morphology of *Y. lipolytica* 1E07. A: Yl 1E07 growing in SM without thiamin at day 8, B: Yl1E07 growing in SM with thiamin at day 8. The external zone was collected for The extraction of total RNA.

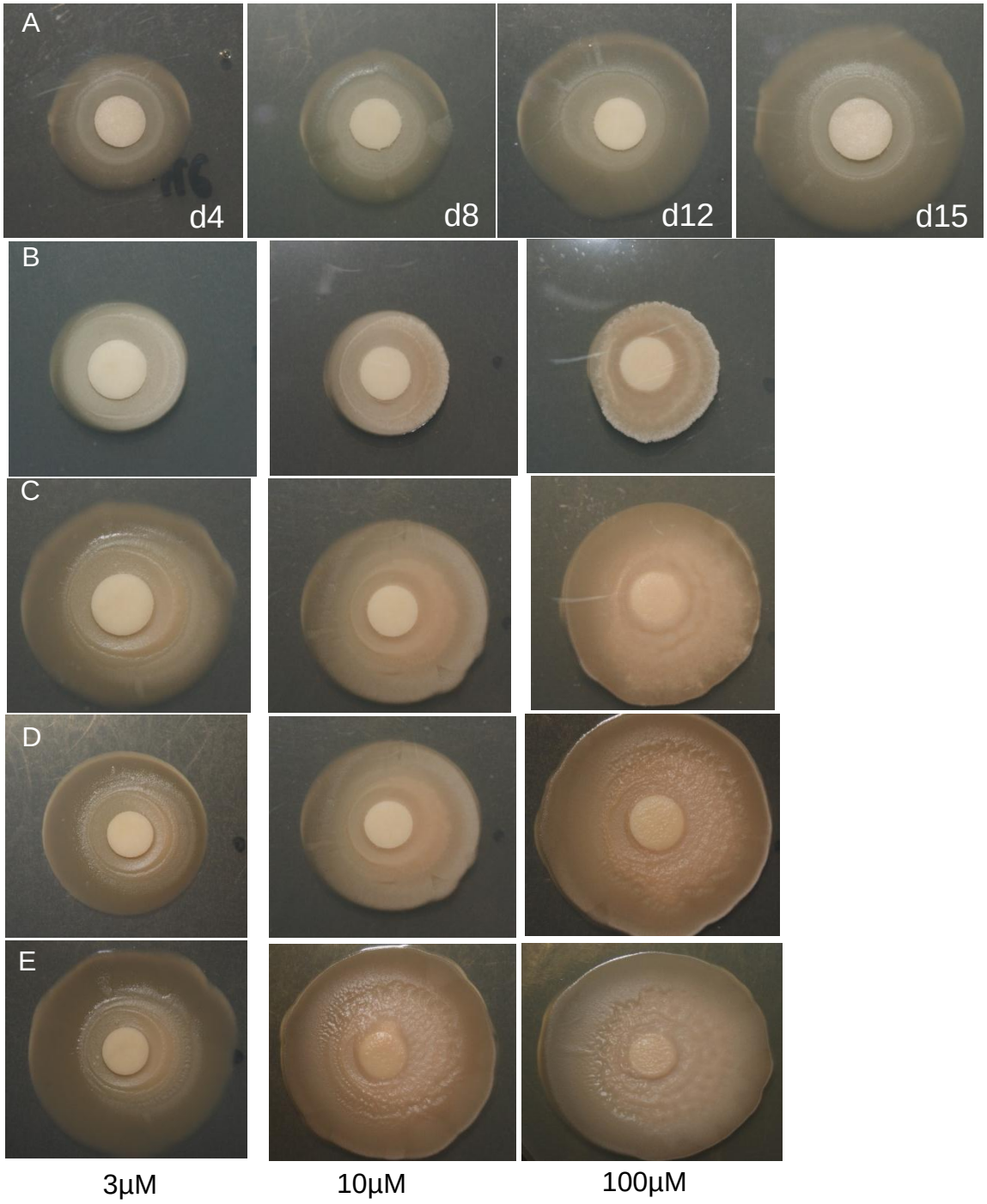


Figure 2. Effect of thiamin on the morphology of *Yarrowia lipolytica* 1E07. A: *Yarrowia lipolytica* 1E07 standard, growing on SM medium not containing thiamin, at four times, day 4 (d4), day 8 (d8), day 12 (d12) and day 15 (d15). B: Addition of a drop of thiamin at different concentrations (3µM, 10µM and 100µM) in front of the colony of *Yarrowia lipolytica* at d4, C at d8, D at d12 and E at day 15. The distance between the colony and the drop of thiamin was 1,5 cm and photos were taked by the digital camera (Canon EOS 350D) and were representative of three biological replicates

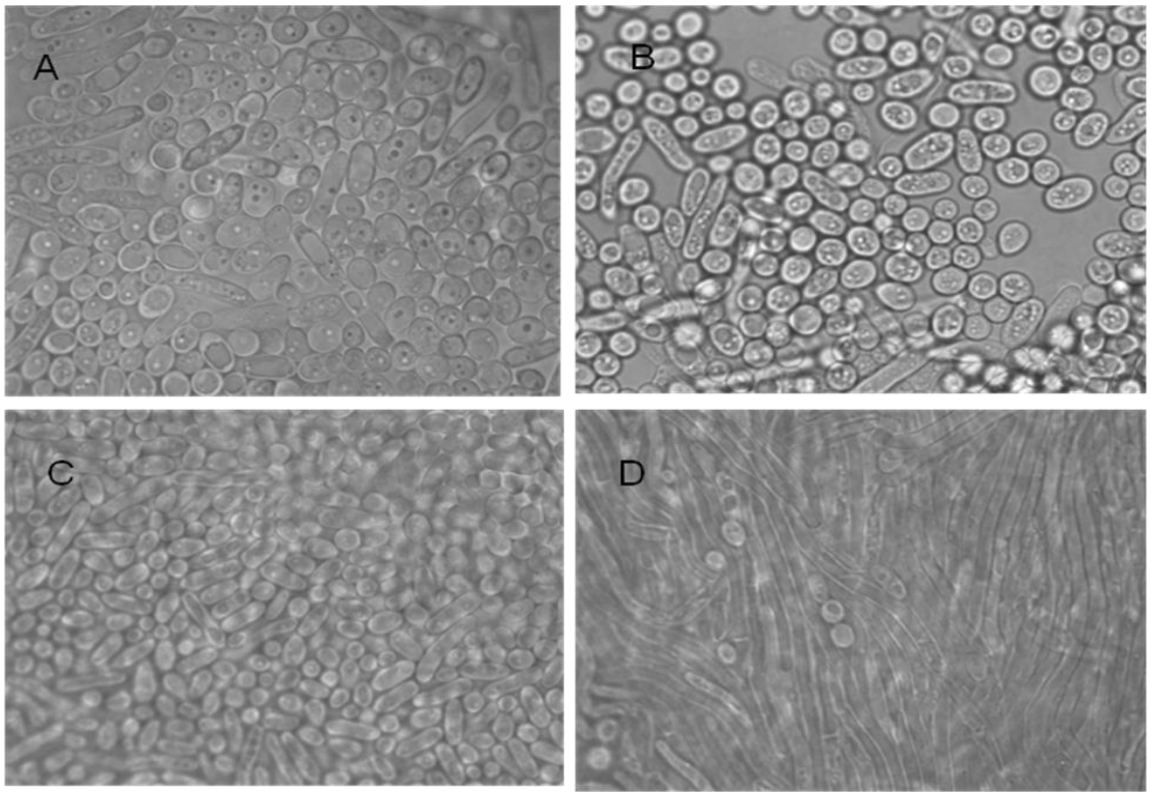


Figure 3. Effect of thiamin on the morphology of *Yarrowia lipolytica* 1E07 cells at day 8. A: *Y.lipolytica* standard growing on SM medium not containing thiamin. B: *Y. lipolytica* 1E07 confronted with 3µM of thiamin, C: with 10 µM, D: with 100 µM of thiamin. Cells were vizualized with a fluorescent microscope (Olympus BX51) and photographed at 100x magnification. Images are representative of three biological replicates.

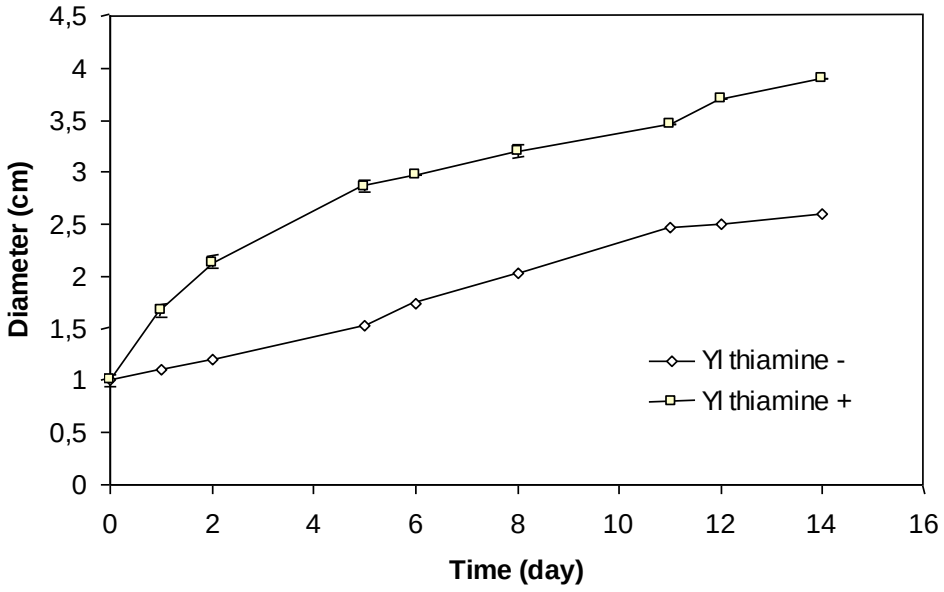


Figure 4. Growth of *Yarrowia lipolytica* 1E07 on SM medium with or without thiamin

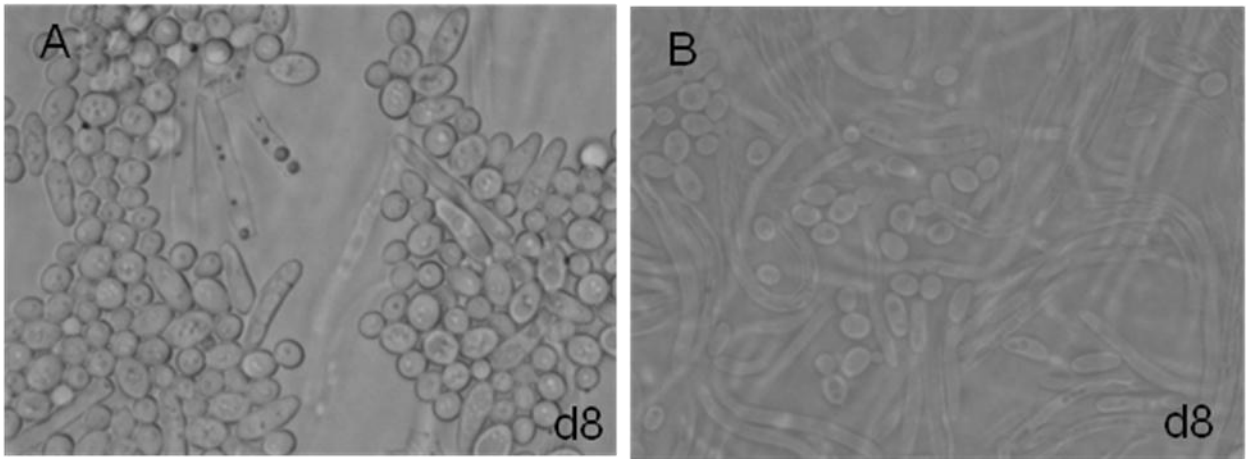


Figure 5. Effect of thiamin on the morphology of *Yarrowia lipolytica* cells at day 8. A : *Y. lipolytica 1E07* growing on SM medium not containing thiamin. B: *Y. lipolytica 1E07* growing on SM medium containing thiamin. Cells were vizualized with a fluorescent microscope (Olympus BX51) and photographed at 100x magnification. Images are representative of three biological replicates.

Table 1: Primers used in this study

Primer	**Accession no.**	**Sequence (5'-3')**	**Putative function ***
THI20-R	YALI0E04224g	GTAAAGTCCTTTCCATCGTAAAGC	Multifunctional protein involved in thiamine biosynthesis and degradation
THI20-F	YALI0E04224g	ATGAAGGATCTAGCCGTTTCTAT	
THI4-R	YALI0A09768g	CGTAGTCTCCCTCATCTTCGTAA	Putative thiamin biosynthetic enzyme
THI4-F	YALI0A09768g	CGACCCGACCTCAAGATT	
PDC6-R	YALI0D06930g	GGGAGGAGAAATCGTGGG	Minor isoform of pyruvate decarboxylase, decarboxylates pyruvate to acetaldehyde
PDC6-F	YALI0D06930g	CTCAAGGACGAGAACACAAT	
CTT1-R	YALI0E34749g	AGAATGGAGTACCGGAACTTT	Cytosolic catalase T, has a role in protection from oxidative damage by hydrogen peroxide
CTT1-F	YALI0E34749g	CCTGTCTGCCGAGAAGG	
STE3-R	YALI0F11913g	TGGGTCAGGTCGATGACAAA	Receptor for a factor pheromone
STE3-F	YALI0F11913g	TATCTACAGAGTCTACAAGAAGCGAAA	
TFC1-R	YALI0E14663g	GTAATGACGCAGTCCCTGG	One of six subunits of the RNA polymerase III transcription initiation factor complex (TFIIIC)
TFC1-F	YALI0E14663g	AGATGCTGAGATGGACACTT	

Table 2: Functional categories of genes up- or down-regulated in *Yarrowia lipolytica* 1E07 growing in SM medium lacked in thiamin compared to its growth in SM medium supplemented with thiamine, at d8 of culture.

FUNCTIONAL CATEGORIES	**NUMBER OF GENES**	
	down-regulated	**up-regulated**
METABOLISM	**62**	**63**
carbon metabolism	13	13
amino acid metabolism	10	11
lipid metabolism	14	9
Peroxysome	1	2
cation homeostasis	2	3
metal homeostasis	8	2
metabolite transport	14	23
VITAMIN METABOLISM	**0**	**11**
Thiamin	0	5
other vitamins	0	6
MORPHOGENESIS	**93**	**29**
cell cycle (meiosis and mitosis)	8	3
Signaling	13	3
hyphal transition	11	4
cell wall	38	18
vesicle transport	7	1
DNA maintenance and chromatin remodeling	16	0
STRESS	**16**	**29**
oxidative stress	4	21
other stresses	4	4
Autophagy	1	0
Proteasome	7	4
MITOCHONDRION	**5**	**8**
PROTEIN BIOSYNTHESIS	**1**	**7**
TRANSCRIPTION	**6**	**8**
UNCLASSIFIED	**27**	**37**
UNKNOWN	**111**	**92**
TOTAL	**321**	**284**

Table 3: Categories of genes which are important in the morphogenetic changes of *Y. lipolytica* 1E07 growing in SM depleted in thiamin.

***Yarrowia* gene name**	***Saccharomyces* gene name**	**Delta**	**Function**
Thiamin metabolism			
YALI0A09768g	*THI4*	5,96	Putative thiamin biosynthetic enzyme
YALI0E04224g	*THI20*	3,80	Multifunctional protein involved in thiamine biosynthesis and degradation
YALI0C15554g	*THI6*	2,12	Bifunctional enzyme required for thiamine biosynthesis
YALI0E21351g	*THI80*	1,55	Thiamine pyrophosphokinase
YALI0D19756g	*not found*	1,45	Thiamin transport
Carbon metabolism			
YALI0E00264g	*ALD4*	4,21	Mitochondrial aldehyde dehydrogenase
YALI0E14256g	*FDH1*	3,24	NAD(+)-dependent formate dehydrogenase
YALI0D09229g	*SHB17*	3,14	Sedoheptulose bisphosphatase involved in riboneogenesis
YALI0E34045g	*not found*	2,60	Homologue of diene lactone hydrolases
YALI0B19976g	*FDH1*	2,17	NAD(+)-dependent formate dehydrogenase
YALI0F28765g	*FDH1*	1,81	NAD(+)-dependent formate dehydrogenase
YALI0E15488g	*GLK1*	1,73	Glucokinase
YALI0D10131g	*PDC1*	1,70	Major of three pyruvate decarboxylase, decarboxylates pyruvate to acetaldehyde
YALI0C08074g	*FDH1*	1,58	NAD(+)-dependent formate dehydrogenase
YALI0A12353g	*FDH1*	1,53	NAD(+)-dependent formate dehydrogenase
YALI0F10923g	*XKS1*	1,51	Xylulokinase, converts D-xylulose and ATP to xylulose 5-phosphate and ADP
YALI0B13970g	*GUT2*	1,29	Mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase
YALI0B14927g	*RBK1*	1,14	Putative ribokinase
YALI0D23815g	*KGD2*	-1,15	alpha-KetoGlutarate Dehydrogenase
YALI0E27005g	*PDB1*	-1,30	E1 beta subunit of the pyruvate dehydrogenase (PDH) complex
YALI0F05038g	*PDB1*	-1,32	E1 beta subunit of the pyruvate dehydrogenase (PDH) complex
YALI0F20702g	*PDA1*	-1,45	E1 alpha subunit of the pyruvate dehydrogenase (PDH) complex
YALI0D25630g	*ADH1*	-1,52	Alcohol-dehydrogenase-activity
YALI0D12661g	*CYB2*	-1,56	L-lactate cytochrome-c oxidoreductase
YALI0A16379g	*ADH3*	-1,82	Mitochondrial alcohol dehydrogenase isozyme III
YALI0B19470g	*JEN1*	-1,82	Monocarboxylate/proton symporter of the plasma membrane, mediates high-affinity uptake of carbon sources lactate, pyuvate, and acetate, and also of the micronutrient selenite
YALI0D12400g	*PGK1*	-1,89	3-phosphoglycerate kinase, key enzyme in glycolysis and gluconeogenesis
YALI0A15147g	*ADH3*	-2,05	Mitochondrial alcohol dehydrogenase isozyme III
YALI0D06930g	*PDC6*	-2,63	Minor isoform of pyruvate decarboxylase, decarboxylates pyruvate to acetaldehyde
YALI0D25960g	*ALD4*	-2,70	Aldehyde dehydrogenase pseudogene
YALI0B22506g	*FDH1*	-2,73	NAD(+)-dependent formate dehydrogenase
Cell wall			

maintenance			
YALI0B20306g	Yl*PIR1*	3,27	Mannose-containing glycoprotein constituent of the cell wall (similar to *Y. lipolytica)*
YALI0A19888g	*not found*	3,21	GPI anchored protein
YALI0A13013g	*YPS3*	3,20	Aspartic protease, member of the yapsin family of proteases involved in cell wall growth and maintenance
YALI0E33891g	*not found*	2,90	GPI anchored protein
YALI0D08646g	*not found*	2,86	Cell wall-GPI-anchored
YALI0B10109g	*not found*	2,83	Cell wall-GPI-anchored
YALI0B13948g	*not found*	2,79	Cell wall-GPI-anchored
YALI0C21912g	*not found*	1,66	Cell wall-GPI-anchored
YALI0F04620g	*not found*	1,64	Cell wall-GPI-anchored
YALI0E11517g	*Yl CWP1*	1,63	Cell wall mannoprotein that localizes specifically to birth scars of daughter cells, linked to a beta-1,3- and beta-1,6-glucan heteropolymer through a phosphodiester bond
YALI0C21252g	*not found*	1,55	Cell wall-GPI-anchored
YALI0A05027g	*BSC1*	1,33	Protein of unconfirmed function, similar to cell surface flocculin Muc1p
YALI0B00836g	*PRS5*	1,23	5-phospho-ribosyl-1(alpha)-pyrophosphate synthetase
YALI0E28534g	*TIR2*	1,22	Putative cell wall mannoprotein of the Srp1p/Tip1p family of serine-alanine-rich proteins
YALI0E18788g	*Yl CWP1*	1,17	Cell wall mannoprotein that localizes specifically to birth scars of daughter cells, linked to a beta-1,3- and beta-1,6-glucan heteropolymer through a phosphodiester bond
YALI0C16434g	*GUK1*	1,14	Guanylate kinase, required for growth and mannose outer chain elongation of cell wall N-linked glycoproteins
YALI0C04158g	*YPK2*	-1,23	Protein kinase participates in a signaling pathway required for optimal cell wall integrity
YALI0B13618g	*FLC2*	-1,33	Putative FAD transporter; required for uptake of FAD into endoplasmic reticulum; involved in cell wall maintenance
YALI0E19360g	*TUB1*	-1,46	Alpha-tubulin; associates with beta-tubulin (Tub2p) to form tubulin dimer, which polymerizes to form microtubules
YALI0C11165g	*not found*	-1,48	Cell wall-GPI-anchored
YALI0F01947g	*SCW11*	-1,50	Cell wall protein with similarity to glucanases; may play a role in conjugation during mating based on its regulation by Ste12p
YALI0E01210g	*not found*	-1,52	Cell wall-GPI-anchored
YALI0E19426g	*not found*	-1,53	Cell wall-GPI-anchored
YALI0E13574g	*not found*	-1,58	Cell wall-GPI-anchored
YALI0F18722g	*DCW1*	-1,62	Putative mannosidase, GPI-anchored membrane protein required for cell wall biosynthesis in bud formation
YALI0B13662g	*RHO1*	-1,65	GTP-binding protein involved in establishment of cell polarity; regulates protein kinase C and the cell wall synthesizing enzyme 1,3-beta-glucan synthase
YALI0F24255g	*not found*	-1,68	Cell wall-GPI-anchored
YALI0C00110g	*not found*	-1,70	Cell wall-GPI-anchored
YALI0E32967g	*not found*	-1,73	Similar to Streptococcus pneumoniae, cell wall surface anchor family protein
YALI0B15510g	*UTR2*	-1,77	Chitin transglycosylase that functions in the transfer of chitin to beta(1-6) and beta(1-3) glucans in the cell wall
YALI0D04851g	*GAS5*	-1,80	1,3-beta-glucanosyltransferase
YALI0A12111g	*RGA1*	-1,83	GTPase-activating protein for the polarity-establishment

			protein Cdc42p; implicated in control of septin organization, pheromone response, and haploid invasive growth
YALI0C15004g	*not found*	-1,88	Cell wall-GPI-anchored
YALI0E22286g	*Yl CWP1*	-1,91	Cell wall mannoprotein that localizes specifically to birth scars of daughter cells, linked to a beta-1,3- and beta-1,6-glucan heteropolymer through a phosphodiester bond
YALI0D20680g	*SCW4*	-1,94	Cell wall protein with similarity to glucanases; scw4 scw10 double mutants exhibit defects in mating
YALI0C01419g	Ca*NAG1*	-1,96	Glucosamine-6-phosphate deaminase; N-acetylglucosamine utilization enzyme; required for normal hyphal growth
YALI0F27049g	*TPM2*	-1,97	Minor isoform of tropomyosin, binds to and stabilizes actin cables and filaments
YALI0B18744g	*not found*	-1,97	Cell wall-GPI-anchored
YALI0E33539g	*SUN4*	-1,99	Cell wall protein related to glucanases, possibly involved in cell wall septation; member of the SUN family
YALI0F02343g	*not found*	-1,99	Cell wall-GPI-anchored
YALI0E35024g	*not found*	-2,03	Cell wall-GPI-anchored
YALI0B18194g	*not found*	-2,05	Cell wall-GPI-anchored
YALI0F21428g	*not found*	-2,08	Cell wall-GPI-anchored
YALI0C09680g	*CRH1*	-2,08	Chitin transglycosylase that functions in the transfer of chitin to beta(1-6) and beta(1-3) glucans in the cell wall; similar and functionally redundant to Utr2; localizes to sites of polarized growth; expression induced by cell wall stress
YALI0D00198g	*not found*	-2,11	Cell wall-GPI-anchored
YALI0E00726g	*TUB2*	-2,19	Beta-tubulin; associates with alpha-tubulin to form tubulin dimer, which polymerizes to form microtubules
YALI0F08327g	*ZEO1*	-2,22	Peripheral membrane protein of the plasma membrane that regulates the cell integrity pathway
YALI0E18700g	*not found*	-2,45	Cell wall-GPI-anchored
YALI0B07601g	*PUN1*	-2,51	Plasma membrane protein with a role in cell wall integrity
YALI0A00176g	*MUC1/FLO11*	-2,59	GPI-anchored cell surface glycoprotein (flocculin) required for pseudohyphal formation, invasive growth, flocculation, and biofilms
YALI0E07557g	*MUC1*	-1,05	GPI-anchored cell surface glycoprotein (flocculin) required for pseudohyphal formation, invasive growth, flocculation, and biofilms
YALI0D09185g	*FLO11/MUC1*	-2,71	GPI-anchored cell surface glycoprotein (flocculin); required for pseudohyphal formation, invasive growth, flocculation, and biofilms; transcriptionally regulated by the MAPK pathway (via Ste12p and Tec1p) and the cAMP pathway (via Flo8p)
YALI0D25586g	*not found*	-2,87	Cell wall-GPI-anchored
YALI0C14630g	*not found*	-2,87	Cell wall-GPI-anchored
YALI0F28325g	*not found*	-3,04	Cell wall-GPI-anchored
YALI0E26125g	*Yl CWP1*	-3,07	Cell wall mannoprotein that localizes specifically to birth scars of daughter cells, linked to a beta-1,3- and beta-1,6-glucan heteropolymer through a phosphodiester bond
YALI0F26565g	*not found*	-3,92	Cell wall-GPI-anchored
Hyphal transition			
YALI0D14322g	*PDX3*	2,15	Pyridoxine (pyridoxamine) phosphate oxidase
YALI0B00924g	*FMP46*	1,85	Putative redox protein containing a thioredoxin fold

YALI0E16753g	*XPT1*	1,56	Xanthine-guanine phosphoribosyl transferase, required for xanthine utilization and for optimal utilization of guanine
YALI0C20251g	*GRE2*	1,54	3-methylbutanal reductase and NADPH-dependent methylglyoxal reductase (D-lactaldehyde dehydrogenase); stress induced (osmotic, ionic, oxidative, heat shock and heavy metals); regulated by the HOG pathway
YALI0C15114g	*CaCCN1*	-1,12	G1 cyclin; required for hyphal growth maintenance
YALI0E25845g	*YlRAC1*	-1,12	GTP-binding protein of RAS superfamily
YALI0C14586g	*ARF3*	-2,22	Glucose-repressible ADP-ribosylation factor, GTPase of the Ras superfamily involved in development of polarity; also has mRNA binding activity
YALI0A18469g	*HOY1*	-2,29	transcritional regulator required for hyphal formation
YALI0B21582g	*not found*	-3,00	C2H2-type zinc finger protein Mhy1p required for dimorphic transition
Signaling			
YALI0E30415g	*MF(ALPHA)1*	-2,58	mating pheromone alpha-1 precursor
YALI0E01364g	*STE4*	-2,90	G protein beta subunit, forms a dimer with Ste18p to activate the mating signaling pathway
YALI0F11913g	*STE3*	-2,99	Receptor for a factor pheromone, couples to MAP kinase cascade to mediate pheromone response; transcribed in alpha cells and required for mating by alpha cells
YALI0E16533g	*MF(ALPHA)1*	-3,01	mating pheromone alpha-1 precursor
YALI0C07480g	*MATALPHA1*	-3,56	Transcriptional co-activator involved in regulation of mating-type-specific gene expression
YALI0A06699g	*STE18*	-3,62	G protein gamma subunit, forms a dimer with Ste4p to activate the mating signaling pathway
YALI0A09592g	GPA2	-1,40	Nucleotide binding alpha subunit of the heterotrimeric G protein that interacts with the receptor Gpr1p, has signaling role in response to nutrients; green fluorescent protein (GFP)-fusion protein localizes to the cell periphery
YALI0E11627g	GPA1	-3,07	GTP-binding alpha subunit of the heterotrimeric G protein
YALI0E08756g	RAS1	-2,32	GTPase involved in G-protein signaling in the adenylate cyclase activating pathway, plays a role in cell proliferation; localized to the plasma membrane; homolog of mammalian RAS proto-oncogenes
YALI0D12408g	RDI1	-1,41	Rho GDP dissociation inhibitor involved in the localization and regulation of Cdc42p and Rho1p
YALI0A07403g	*RDI1*	-1,04	Rho GDP dissociation inhibitor involved in the localization and regulation of Cdc42p and Rho1p
YALI0D15862g	SOK1	1,59	Protein whose overexpression suppresses the growth defect of mutants lacking protein kinase A activity; involved in cAMP-mediated signaling; localized to the nucleus; similar to the mouse testis-specific protein PBS13
Mitosis			
YALI0B12430g	CDC4	1,46	F-box protein required for G1/S and G2/M transition, associates with Skp1p and Cdc53p to form a complex, SCFCdc4, which acts as ubiquitin-protein ligase directing ubiquitination of the phosphorylated CDK inhibitor Sic1p
YALI0C13926g	CLB3	-1,54	B-type cyclin involved in cell cycle progression; activates Cdc28p to promote the G2/M transition; may be involved in DNA replication and spindle assembly; accumulates during S phase and G2, then targeted for ubiquitin-mediated degradation
YALI0B19206g	CLB4	-1,29	B-type cyclin involved in cell cycle progression; activates

			Cdc28p to promote the G2/M transition; may be involved in DNA replication and spindle assembly; accumulates during S phase and G2, then targeted for ubiquitin-mediated degradation
YALI0C21087g	*CDC10*	-1,82	Component of the septin ring that is required for cytokinesis; septins are GTP-binding proteins that assemble into rod-like hetero-oligomers that can associate with other rods to form filaments
YALI0D27148g	CDC12	-1,55	Component of the septin ring of the mother-bud neck that is required for cytokinesis; septins recruit proteins to the neck and can act as a barrier to diffusion at the membrane, and they comprise the 10nm filaments seen with EM
YALI0E03388g	MLC1 (Sp)	-2,19	Essential light chain for Myo1p, light chain for Myo2p/stabilizes Myo2p by binding to the neck region; interacts with Myo1p, Iqg1p, and Myo2p to coordinate formation and contraction of the actomyosin ring with targeted membrane deposition
YALI0F27027g	KIP2	-1,32	Kinesin-related motor protein involved in mitotic spindle positioning, stabilizes microtubules by targeting Bik1p to the plus end; Kip2p levels are controlled during the cell cycle

Table 4: Levels of expression of *THI4*, *THI20*, *CTT1*, *PDC6* and *STE3* genes, as measured by real-time quantitative PCR in *Y. lipolytica* 1E07 growing in SM TH- compared to its growth in SM TH+, at d8

	Expression level	
Genes	**Microarray**	**RT qPCR**
THI4	5,96	12,14 ± 0,46
THI20	3,80	4,67 ± 0,93
CTT1	3,90	4,14 ± 0,34
PDC6	-2,63	-3,26 ± 0,57
STE3	-2,99	-3,20 ± 0,69

C. Conclusions

Des changements morphologiques de *Y. lipolytica* 1E07 ont été observés sur le milieu de croissance MCD sans ou avec thiamine (TH- ou TH+). Ces changements prennent place tant au niveau macroscopique, ie au niveau de la forme de la colonie de *Y. lipolytica* 1E07, qu'au niveau microscopique, ie au niveau de la forme et du type de cellules. Cette levure se présente sous la forme d'une colonie avec un aspect lisse et une forme unicellulaire type levure ou « yeast-like » quand elle est cultivée sur le milieu MCD en absence de thiamine TH-, tandis que la colonie présente un aspect ridé et les cellules une forme hyphale sur le milieu MCD en présence de la thiamine TH+.

L'étude transcriptomique effectuée chez *Y. lipolytica* 1E07, en comparant la condition où *Y. lipolytica* croît sur le milieu TH - à la condition où elle pousse sur le milieu TH+, nous a permis d'identifier des groupes de gènes qui sont impliqués dans le changement morphologique de la levure. Elle nous permet de révéler une relation entre la thiamine et la morphogenèse.

Le changement morphologique observé sous l'effet de la thiamine, implique des modifications au niveau de l'organisation de la paroi cellulaire ainsi qu'au niveau du métabolisme de la levure.

Nos résultats peuvent se résumer de la façon suivante : i) la voie de la biosynthèse de la thiamine est activée dans le milieu carencé TH-; ii) des gènes impliqués dans la biosynthèse et l'organisation de la paroi cellulaire sont inhibés sur TH- (forme « yeast-like »); iii) des gènes spécifiques de la transition dimorphique chez les levures sont inhibés sur TH- (Ex : *MHY1*, *HOY1*, *RAC1*); iv) des gènes impliqués dans la conjugaison ou « mating » et dans les voies de signalisation qui contrôlent le dimorphisme sont inhibés (Ex : *STE3*, *STE4*, *STE18*, *RAS1*, *GPA2*); v) le métabolisme fermentaire est inhibé, ceci par l'inhibition de l'expression des gènes codant des enzymes clés telle que *PDC6* qui est thiamine dépendante. Les travaux de Meyer et coll. en 2007 ont montré que la fermentation est activée dans le mutant *ramosa-1* d'*A. niger,* qui croît sous une forme filamenteuse. Ce résulat indique la présence d'un lien entre la fermentation et la transition dimorphique.

III. Effet des bactéries sur la croissance et la morphologie de la levure *Yarrowia lipolytica* 1E07

A. Introduction

Comme nous l'avons déjà mentionné dans la partie II du chapitre « Résultats et discussion », la thiamine qui est produite par la bactérie du sol *P. fluorescens* BBc6R8, s'est avérée avoir un rôle dans l'amélioration de la croissance du champignon *L. bicolor* S238N (Deveau *et al.* 2010), et un effet sur la morphologie de ce champignon (Deveau *et al.*, 2007). Nous avons voulu tester la généricité de l'effet de bactéries sur la morphologie de cellules fongiques en utilisant les micro-organismes de l'écosystème fromager comme modèle d'étude. Nous avons également testé l'hypothèse que la thiamine produite par certaines souches bactériennes de l'écosystème fromager, pourrait avoir un rôle sur le changement morphologique de *Y. lipolytica* 1E07 (partie II du chapitre Résultats et Discussion).

Dans ce but, nous avons réalisé plusieurs confrontations entre Yl 1E07 et différentes souches bactériennes: des souches issues de l'écosystème fromager (*Brevibacterium aurantiacum* 171, *B. aurantiacum* 9175, *Arthrobacter arilaitensis* Re117), et des souches bactériennes modèles (*Pseudomonas fluorescens* BBc6R8, *P. fluorescens* NZI7 et le mutant de *P. fluorescens* NZI7 qui ne produit pas de la thiamine, le ΔNZI7). Nous avons recherché les souches bactériennes capables d'induire un changement morphologique chez Yl 1E07 en croissance sur le milieu MCD. Nous avons également dosé la thiamine dans le surnageant de culture ainsi que dans les culots cellulaires de certaines de ces souches bactériennes.

En nous basant sur les observations obtenues dans les expériences de confrontations, ainsi que sur les résultats des dosages de la thiamine, nous avons retenu les deux souches de *B. aurantiacum*, Ba 171 et Ba 9175, du fait de leur effet contrasté sur la morphologie des colonies de Yl 1E07. Une étude transcriptomique de la levure Yl 1E07 a été donc entreprise dans les conditions de confrontation avec chacune de ces deux bactéries, afin d'essayer de comprendre l'éventuelle implication de la thiamine produite par la bactérie dans le changement morphologique de Yl 1E07.

B. Confrontations de la levure *Y. lipolytica* 1E07 avec différentes bactéries sélectionnées

Des confrontations de *Y. lipolytica* 1E07 avec les différentes bactéries citées ci-dessus ont été effectuées sur le milieu MCD soit carencé ou supplémenté en thiamine. Des systèmes à 2 « spots » et à 4 « spots » ont été utilisés ; le système à 2 « spots » correspond à la confrontation d'une colonie de Yl 1E07 à une seule colonie bactérienne, alors que dans le système à 4 « spots », la colonie de Yl 1E07 est au centre de la boîte de Petri, est entourée par 4 colonies bactériennes (la même souche bactérienne à chaque fois).

L'utilité de ces deux systèmes vient du fait que : i) le système à 2 « spots » permet une bonne observation du changement morphologique de la colonie de Yl 1E07 en confrontation avec la souche bactérienne, et ceci en comparant le côté de Yl 1E07 qui est en face au spot bactérien à son côté opposé; ii) le système à « 4 spots », permet quant à lui d'avoir suffisament du matériel biologique afin d'extraire des quantités suffisantes d'ARNm pour l'étude transcriptomique ultérieure.

Les observations des confrontations de Yl 1E07 avec les différentes souches bactériennes, ont montré des différences de morphologie des colonies de Yl 1E07 selon les souches bactériennes en présence. Une illustration de ces différences est présentée dans les figures suivantes.

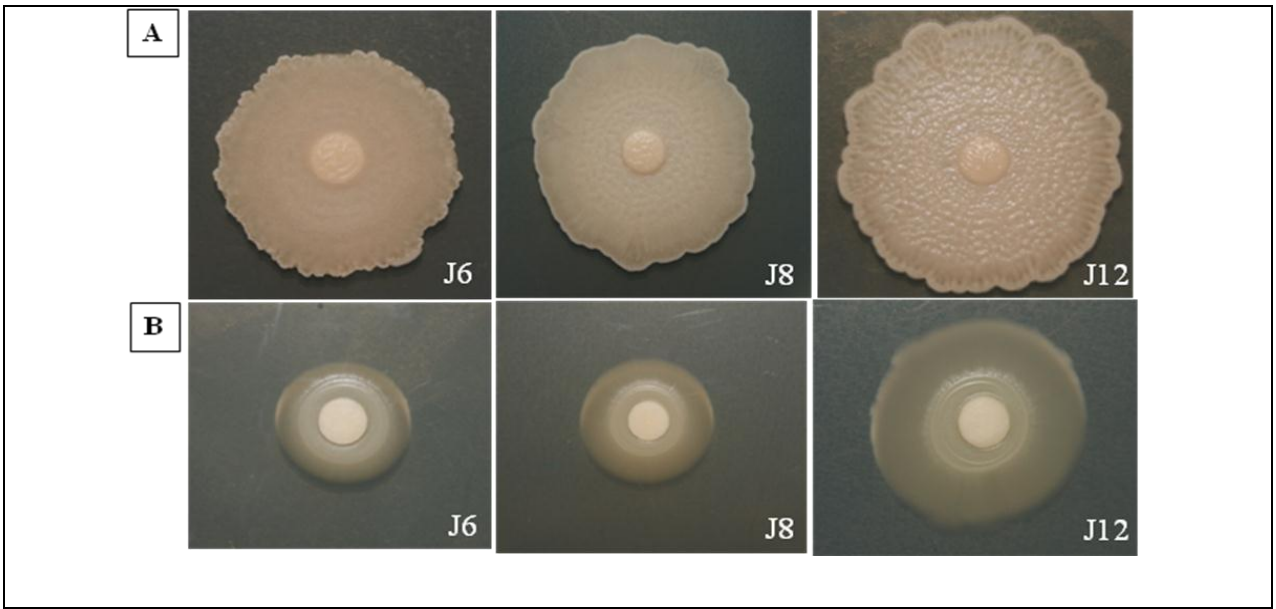


Figure 10 : la croissance de *Y. lipolytica* 1E07 sur le milieu MCD carencé ou supplémenté en thiamine, au cours du temps (en jours). A : MCD avec thiamine, B : MCD sans thiamine

Les images de la figure 10, ont déjà été décrites dans la partie II du chapitre « Résultats et discussion ». Nous les réutilisons dans cette partie, puisqu'elles nous serviront de condition témoin de l'effet de la thiamine sur le changement morphologique de Yl 1E07.

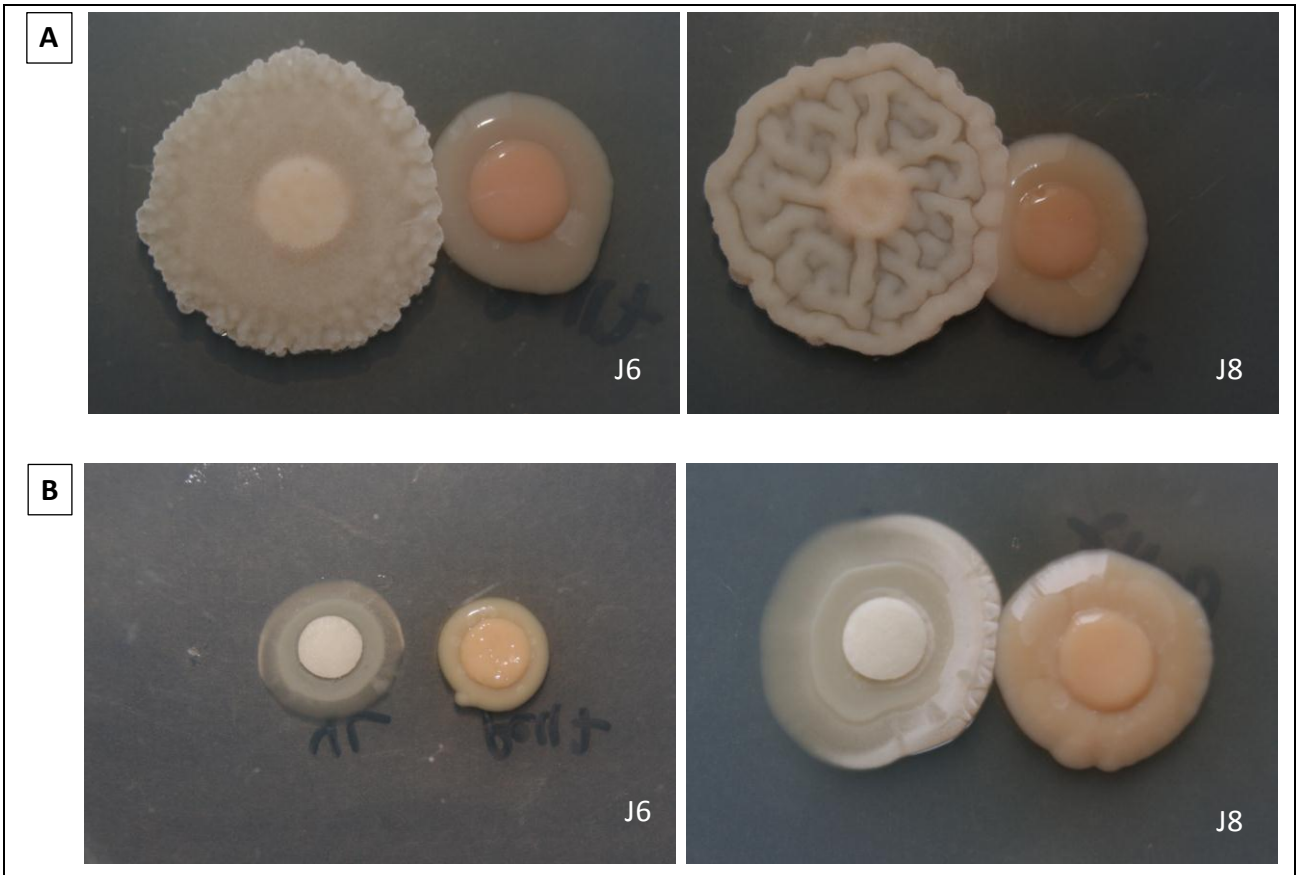


Figure 11 : *Y. lipolytica* 1E07 en confrontation avec *A. arilaitensis* Re117 (Aa Re117) sur le milieu MCD carencé ou supplémenté en thiamine, au cours du temps (en jours). A gauche de chaque image : la colonie de *Y. lipolytica* 1E07, à droite : la colonie bactérienne. A : MCD avec thiamine B : MCD sans thiamine

La figure 11 montre que sur le milieu MCD contenant de la thiamine (Figure 11A), la colonie de Yl 1E07 confrontée à la colonie bactérienne Aa Re117 présente une morphologie ridée, alors qu'elle perd cette morphologie pour devenir lisse quand elle est cultivée sur le milieu MCD carencé en thiamine (Figure 11B). Un changement de la morphologie de la colonie de Yl 1E07 est observé sur le milieu MCD carencé en thiamine, uniquement à partir de J8 au niveau de la colonie levure qui est en face de la souche bactérienne Aa Re117, qui présente alors un aspect ridé contrairement à la face opposée au spot bactérien qui elle est lisse. La morphologie de Yl 1E07 en confrontation avec Aa Re117, sur le côté de la colonie qui est en face de la bactérie, ressemble à la morphologie observée quand elle est cultivée seule sur le milieu MCD riche en thiamine. Cette expérience suggère que la présence de la colonie bactérienne Aa Re117 a un effet sur la morphologie de Yl 1E07, et cet effet pourrait être

médié par la thiamine produite par la bactérie.

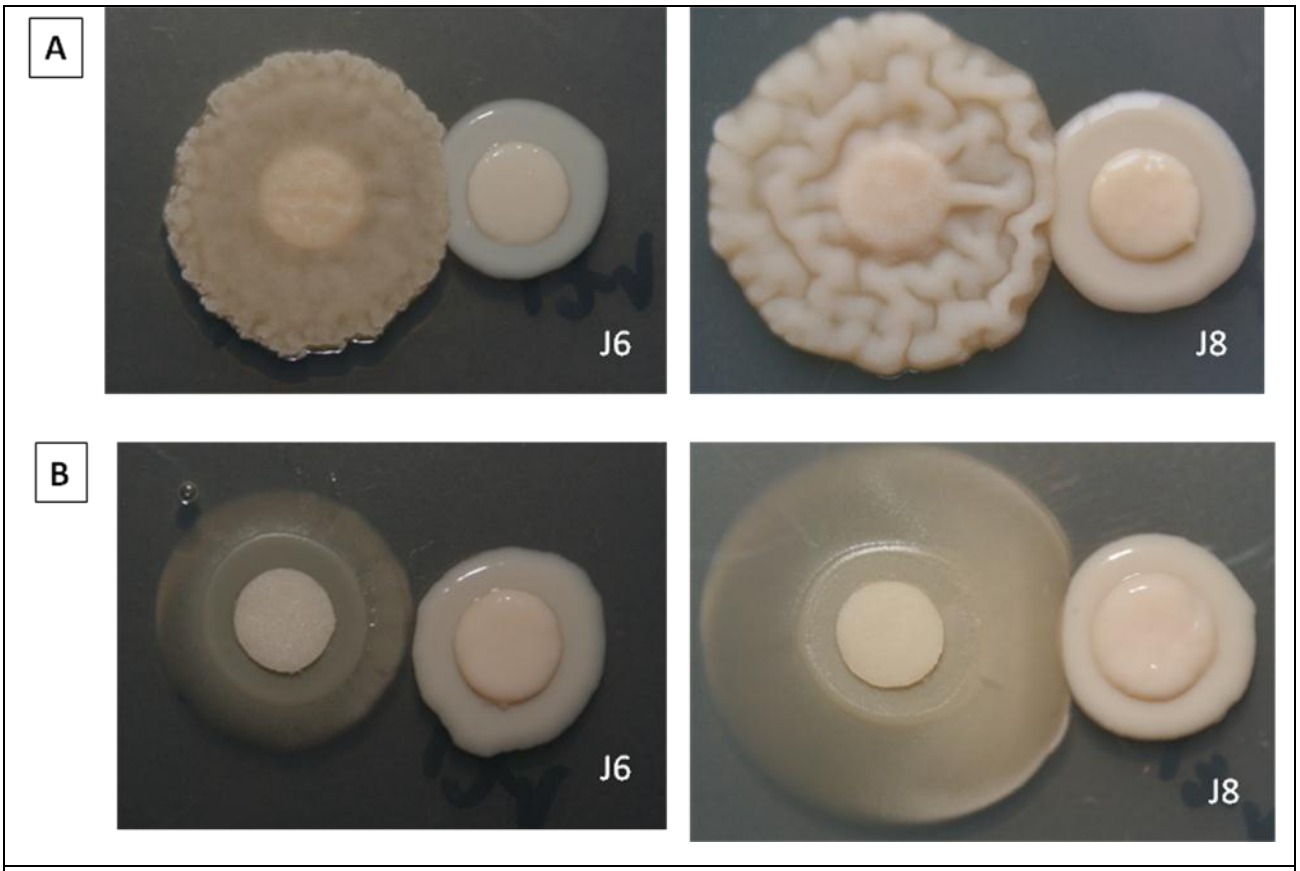


Figure 12 : *Y. lipolytica* 1E07 en confrontation avec B. aurantiacum 171 (BA 171) sur le milieu MCD carencé ou supplémenté en thiamine, au cours du temps (en jours). A gauche de chaque image : la colonie de *Y. lipolytica* 1E07, à droite : la colonie bactérienne A : MCD avec thiamine B : MCD sans thiamine

La présence de Ba 171 induit un changement de la morphologie chez Yl 1E07 sur le milieu MCD TH-. La colonie croit en épaisseur et ceci est visible à J8 sur la partie qui est en face de Ba 171, au contraire de la face opposée qui elle est lisse, suggérant que la présence de cette souche bactérienne pourrait améliorer la croissance de la levure.

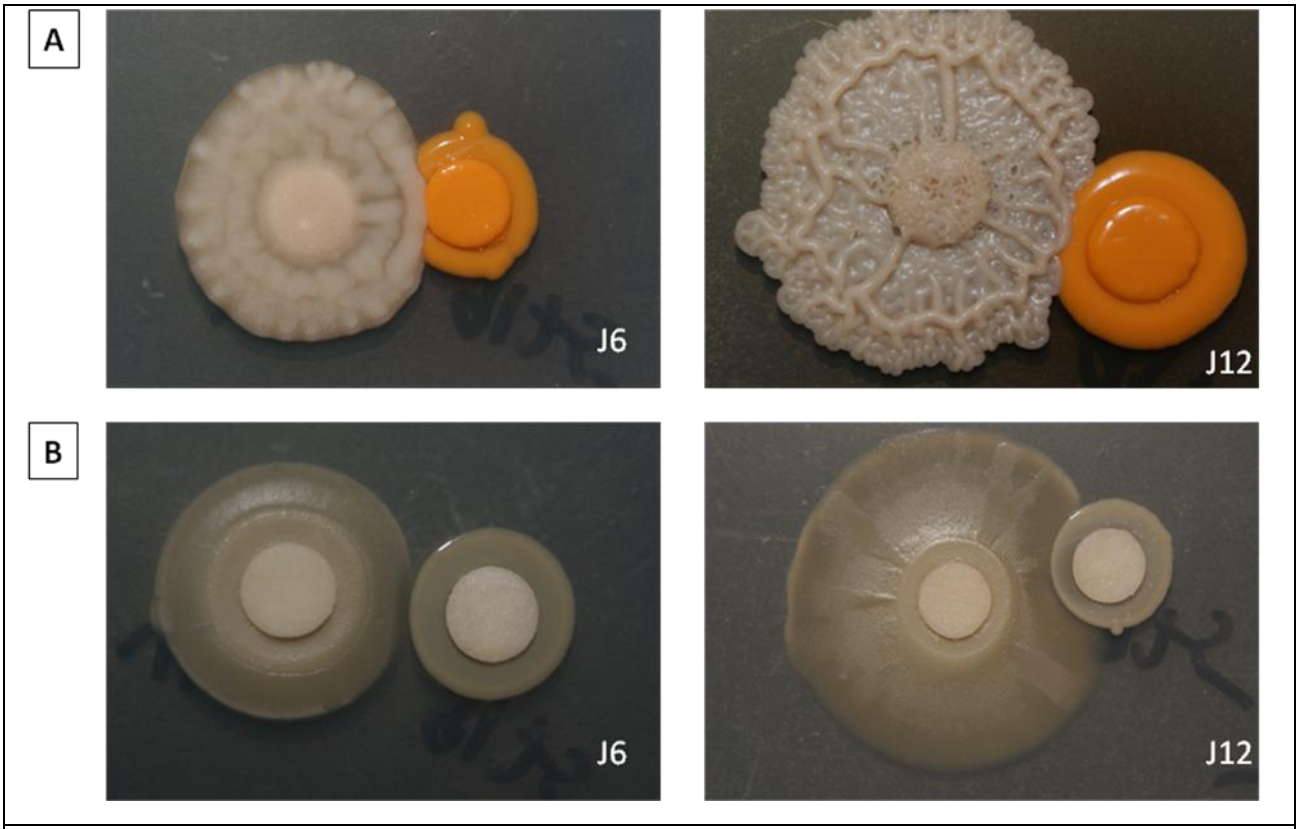


Figure 13 : *Y. lipolytica* 1E07 en confrontation avec B. aurantiacum 9175 (Ba 9175) sur le milieu MCD carencé ou supplémenté en thiamine, au cours du temps (en jours). A gauche de chaque image : la colonie de *Y. lipolytica* 1E07, à droite : la colonie bactérienne A : MCD avec thiamine B : MCD sans thiamine

La figure 13, montre que sur le milieu MCD riche en thiamine, la colonie Yl 1E07 en confrontation avec Ba 9175 présente une morphologie ridée. Sur le milieu MCD carencé en thiamine, Yl 1E07 possède une morphologie lisse sur les deux côtés de la colonie (celle qui est en face ou opposée à la bactérie Ba 171). Ces observations montrent que Ba 9175, n'induit pas une morphologie ridée chez la levure. La morphologie de Yl 1E07 dans ce cas est similaire à celle observée lorsqu'elle est cultivée seule sur le milieu MCD sans thiamine.

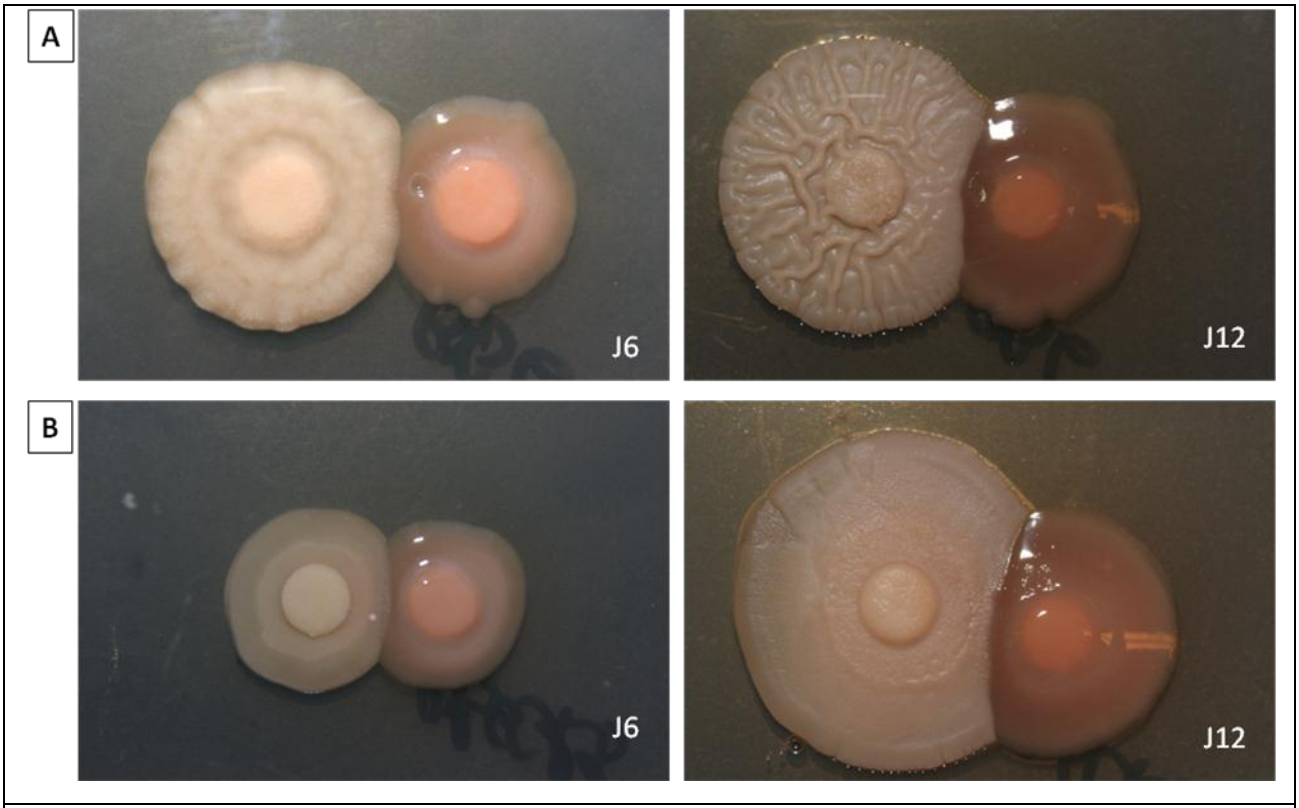


Figure 14 : *Y. lipolytica* 1E07 en confrontation avec *P. fluorescens* BB6cR8 sur le milieu MCD carencé ou supplémenté en thiamine, au cours du temps (en jours). A gauche de chaque image : la colonie de *Y. lipolytica* 1E07, à droite : la colonie bactérienne A : MCD avec thiamine B : MCD sans thiamine

Sur le milieu MCD en présence de thiamine TH+, la morphologie de Yl 1E07 en confrontation avec *P. fluorescens* BBc6R8 est ridée, alors qu'elle est lisse sur le milieu MCD dépourvu de thiamine TH- (Figure 13). Mais, il convient néanmoins de noter que la colonie de Yl 1E07 sur MCD TH- en confrontation avec *P. fluorescens* est plus épaisse que celle en confrontation avec Ba 9175.

Dans la figure 15 ci-dessous, la différence entre les deux colonies de Yl 1E07 en confrontation avec *P. fluorescens* NZI7, sur le milieu MCD TH- et TH+, n'est pas importante du point de vue du critère morphologique lisse ou ridé.

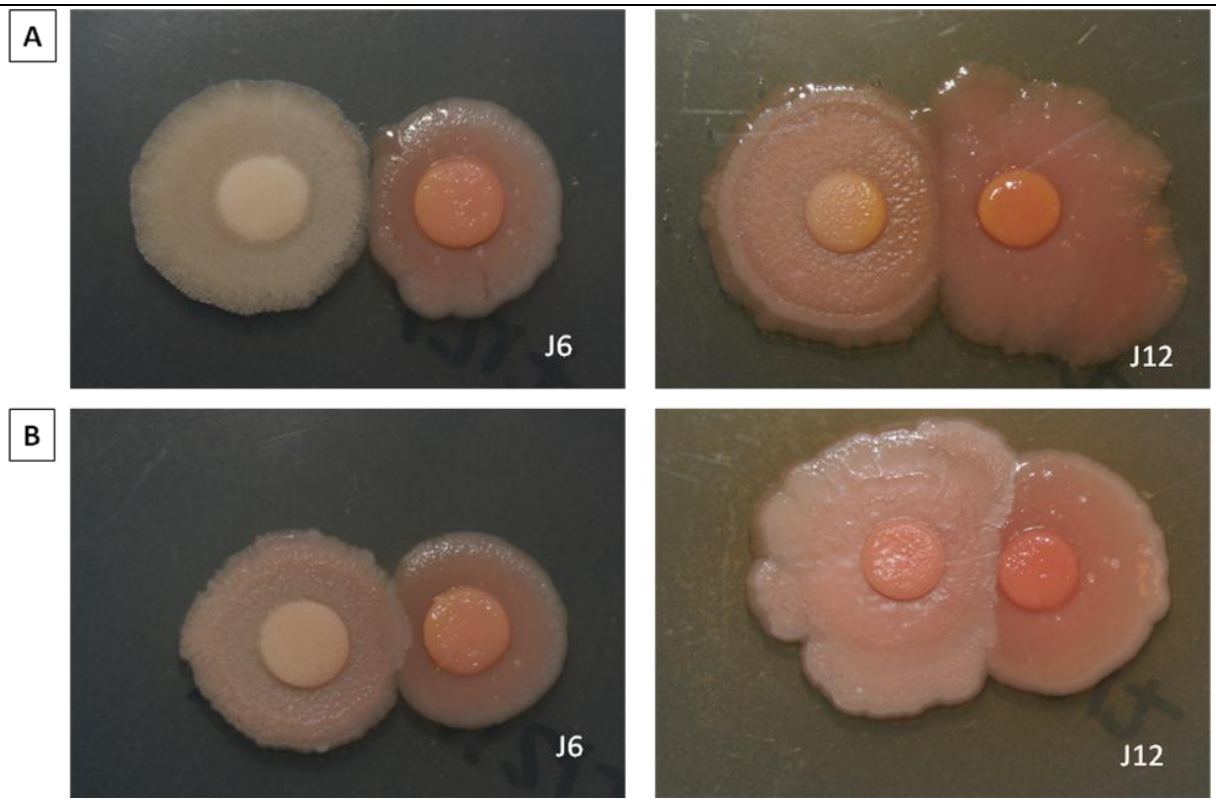


Figure 15 : *Y. lipolytica* 1E07 en confrontation avec *P. fluorescens* NZI7 sur le milieu MCD carencé ou supplémenté en thiamine, au cours du temps (en jours). A gauche de chaque image : la colonie de *Y. lipolytica* 1E07, à droite : la colonie bactérienne A : MCD avec thiamine B : MCD sans thiamine

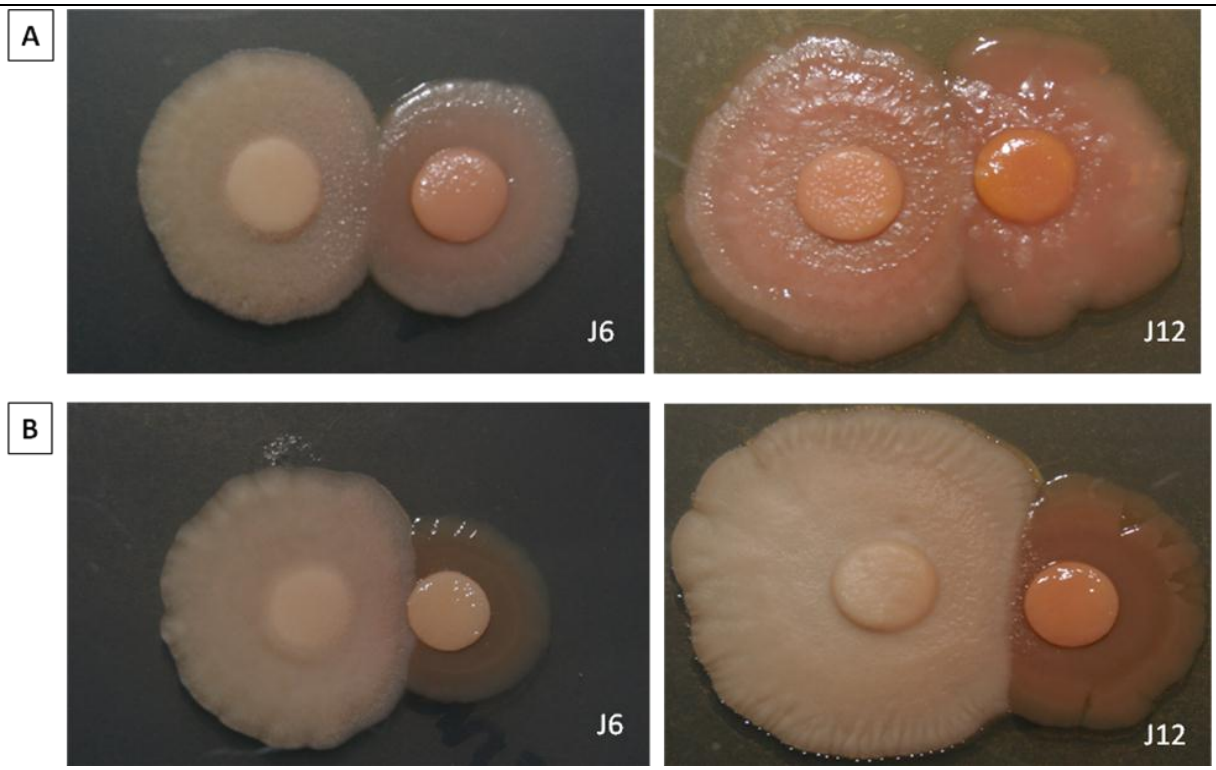


Figure 16 : *Y. lipolytica* 1E07 en confrontation avec le mutant de *P. fluorescens* NZI7 (ΔNZI7) sur le milieu MCD carencé ou supplémenté en thiamine, au cours du temps (en jours). A gauche de chaque image : la colonie de *Y. lipolytica* 1E07, à droite : la colonie bactérienne A : MCD avec thiamine B : MCD sans thiamine

Les confrontations de la levure Yl 1E07 avec le mutant ΔNZI7 de *P. fluorescens*, qui a un défaut de production de thiamine, présentées dans la figure 16, montre que sa présence induit un changement de la morphologie chez Yl 1E07 sur le milieu MDC TH- (Yl 1E07 présente une morphologie ridée dans ce cas). Ce résultat suggère que le changement de morphologie observé chez la levure, n'est probablement pas dû à la thiamine seule, mais pourrait être associé aussi à l'effet de chaque bactérie.

En résumé, nos expériences de confrontations nous ont permis de révéler que les souches Aa Re117, Ba171, ΔNZI7, sont capables d'induire des changements dans la morphologie des colonies de Yl 1E07 qui s'apparentent à ceux observés quand la levure est cultivée seule sur le milieu MCD TH+. A l'inverse, la souche Ba 9175 ne semble pas induire de tels changements.

Pour explorer plus avant l'impact des bactéries sur les régulations géniques chez la levure, nous avons fait le choix de nous intéresser tout particulièrement aux confrontations Yl-Ba 171 et Yl-Ba 9175, deux souches de la même espèce bactérienne *B. aurantiacum*, qui ont été isolées du fromage. Nous avons laissé de côté les confrontations Yl-Aa Re117 et Yl-ΔNZI7, bien qu'un effet ait été observé sur la morphologie de Yl 1E07 et ceci pour les raisons suivantes : i) lorsque Yl 1E07 est confrontée à Aa Re117, bien que la colonie de levure présente un aspect ridé, Yl 1E07 est présente majoritairement sous forme de cellules type levure « yeast-like » (les résultats pour Aa Re117 ne sont pas présentés). Par conséquent, ceci nous éloigne des conditions initiales de Yl 1E07 cultivée seule sur MCD TH+, où elle est présente sous la forme filamenteuse ; ii) le mutant ΔNZI7 induit aussi la forme ridée chez Yl 1E07 en milieu MCD TH-, et ce mutant est décrit comme ayant un défaut dans la production de la thiamine. Or, des travaux très récents (Burlinson, non publié) suggèrent une interaction entre le métabolisme de la thiamine et la production de molécules antifongiques chez ce mutant, ce qui limite fortement l'utilisation de cette souche comme modèle dans notre étude.

Comme précisé plus haut, d'un point de vue macroscopique, la morphologie des colonies de Yl observée dans les confrontations Yl-Ba 171 et Yl-Ba 9175 s'apparente à celle observée lorsque les colonies de Yl sont cultivées seules sur milieu TH+ et TH- (cf, partie II du chapitre « Résultats et Discussion »).

D'un point de vue microscopique également, en co-culture avec Ba171, la forme cellulaire de Yl 1E07 observée à l'aide d'un microscope fluorescent (Olympus BX51) est très majoritairement filamenteuse (Figure 17A).

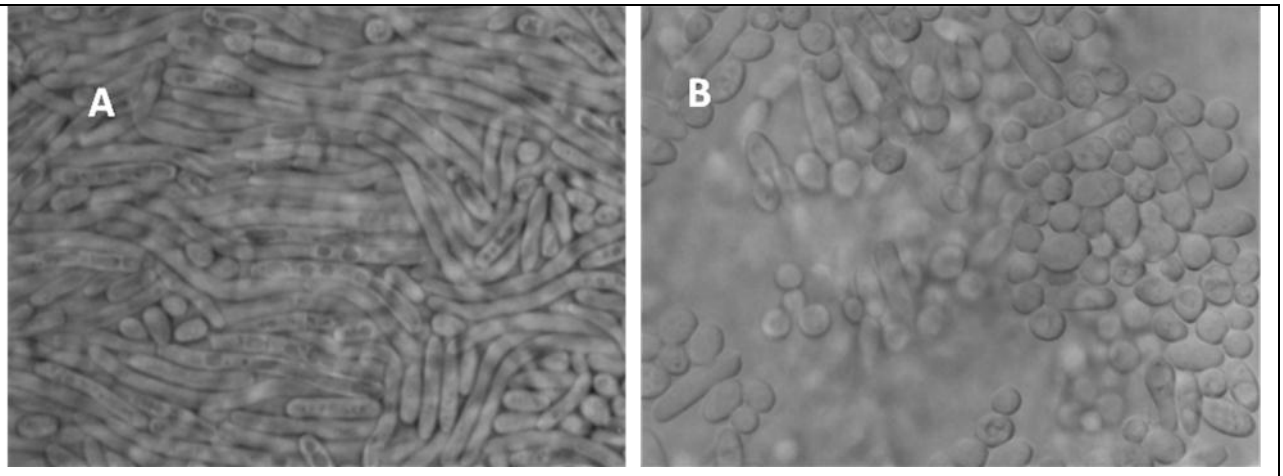


Figure 17 : La forme cellulaire de *Y. lipolytica* 1E07 en confrontation avec Ba 171 « productrice de l'aspect ridé » et Ba 9175 « productrice de l'aspect lisse» sur le milieun MCD sans thiamine à J8. A : Yl-Ba171, B : Yl-Ba9175

A l'inverse, en co-culture avec Ba 9175 (Figure 17B), la levure présente principalement la forme unicellulaire type levure « yeast-like » similaire à celle observée chez Yl TH-.

C. Le dosage de la thiamine

La thiamine a été dosée par HPLC (voir la fiche technique 4 à la fin du manuscrit). Les dosages de la thiamine ont été réalisés dans les culots cellulaires de Yl TH-, Yl TH+, Ba171, Ba 9175, ainsi que dans leur surnageant. Dans les surnageants, la thiamine n'est détectée que dans les échantillons Yl TH+, ce qui est attendu puisque la thiamine a été ajoutée dans le milieu. En revanche, dans les autres conditions, la présence de thiamine n'a pas pu être détectée. Les résultats présentés dans le tableau 5 ci-dessous, concernent uniquement les

analyses effectuées dans les culots cellulaires.

Micro-organismes	TMP (pmol/mg)	TH (pmol/mg)	TDP (pmol/mg)	TTP (pmol/mg)
Ba 171	1,52	X	10,659	X
Yl TH+	0,74	15,36	19,06	X
Ba 9175	X	X	X	X
Yl TH-	X	X	X	X

Tableau 5 : Le dosage de la thiamine dans les culots cellulaires de *B. aurantiacum* 171 et *B. aurantiacum* 9175 et de *Y. lipolytica* 1E07 poussant sur milieu avec thiamine et sans thiamine.

TMP : Thiamine MonoPhosphate ; TH : Thiamine ; TDP : Thiamine DiPhosphate ; TTP : Thiamine TriPhosphate ; x : pas de thiamine détectable par la méthode de dosage utilisée

Les résultats du dosage de la thiamine dans les culots cellulaires montrent qu'il n'y a pas de production de thiamine chez la souche Ba 9175. Cette vitamine n'est pas non plus détectée dans les cellules de *Y. lipolytica* 1E07 cultivées sur le milieu MCD sans thiamine. Par contre, la thiamine monophosphate (1,52 pmol/mg) et la thiamine diphosphate (10,659 pmol/mg) sont détectées dans les cellules de Ba 171. Dans les cellules de *Y. lipolytica* 1E07, de la TMP (0,74 pmol/mg), de la TH (15,36 pmol/mg), de la TDP (19,06 pmol/mg) sont également détectées.

Les résultats obtenus par le dosage de la thiamine confortent l'hypothèse selon laquelle les bactéries pourraient induir la morphologie ridée de la colonie et la forme cellulaire filamenteuse chez Yl 1E07, via la production de thiamine. En nous appuyant sur ces résultats, nous avons entrepris une étude transcriptomique de la levure Yl 1E07 en confrontation avec les souches Ba 171 ainsi que Ba 9175.

D. Etude transcriptomique de *Y. lipolytica* 1E07

a. Conditions expérimentales pour l'étude transcriptomique

Afin d'étudier les déterminants géniques impliqués dans l'effet des bactéries sur la morphologie de Yl1E07 et le rôle potentiel de la thiamine produite par ces bactéries, une étude transcriptomique a été effectuée, au jour 8.

Quatre conditions ont été testées :

i) Yl TH- vs Yl TH+ ; la croissance de Yl 1E07 sur le milieu MCD sans thiamine est comparée à celle conduite sur le milieu MCD avec thiamine. Ici, on s'intéresse à l'effet

thiamine exogène sur la morphologie de la levure;

ii) Yl TH- vs Yl Ba171 ; la croissance de Yl 1E07 sur le milieu MCD TH- est comparée à sa croissance en confrontation avec la bactérie productrice de thiamine Ba171. Cette comparaison est à rapprocher de la précédente mais la thiamine est ici produite par la bactérie;

iii) Yl TH+ vs Yl Ba171 ; la croissance de Yl 1E07 sur le milieu MCD riche en thiamine est comparée à sa croissance avec Ba 171. Ici, on compare l'effet thiamine exogène et l'effet de la bactérie productrice de thiamine;

iv) Yl Ba9175 vs Yl BA171 ; la croissance de Yl 1E07 en présence de Ba 9175 comparée à sa croissance en présence de Ba 171. Ici la colonie de levure étant confrontée dans les deux cas à la présence de bactéries de la même espèce, on espère pouvoir s'affranchir de l'effet bactérie et ne visualiser que l'effet thiamine produit par la souche Ba 171. Nous faisons l'hypothèse que cette condition mime la comparaison TH- vs TH+, puisque Ba 9175 ne produit pas de la thiamine et Ba 171 produit de la thiamine mais en quantité faible.

La première condition a déjà été traitée en détail dans la partie II du chapitre « Résultats et Discussion ». Dans cette partie, on portera donc l'accent sur l'effet de la présence de bactéries sur la morphologie de Yl 1E07.

b. Résultats transcriptomiques

Sur les 6472 ORFs présentes chez *Y. lipolytica*, une expression différentielle d'un facteur supérieur ou égal à 2 a été observé : i) dans la condition TH- vs TH+, 605 gènes (dont 321 sont réprimés et 284 sont induits; ii) dans la condition TH- vs Ba 171, 585 gènes (dont 249 sont réprimés et 336 gènes sont induits); iii) dans la condition TH+ vs Ba 171, 329 gènes (dont 168 sont réprimés et 161 sont induits); et iv) dans la condition Ba 9175 vs Ba 171, 697 gènes (dont 314 gènes sont réprimés et 383 gènes sont induits), soit entre 5% et 11% du génome total de la levure.

En comparant globalement le nombre de gènes différentiellement exprimés dans les différentes conditions, nous pouvons conclure que:

i) dans la condition Ba 9175 vs Ba 171, un nombre plus elevé de gènes différentiellement exprimés (697) est obtenu par rapport à la condition TH- vs TH+ (605 gènes). De plus, seuls 244 gènes sont communs à ces 2 conditions. Ceci nous permet d'en conclure que ces deux conditions ne sont pas identiques en terme de transcriptome et que

l'effet morphologique similaire observé dans les 2 conditions, pourrait ne pas être dû uniquement à la production de thiamine mais qu'il serait aussi dépendant de la présence des bactéries;

ii) dans la condition TH+ vs Ba 171, 329 gènes sont différentiellement exprimés, suggérant qu'il y a un effet propre à la présence de la souche Ba 171 indépendamment de l'effet de la thiamine. Par ailleurs, c'est dans cette condition qu'est observé le nombre le plus bas de gènes différentiellement exprimés par rapport aux autres conditions (ce qui va dans le sens de l'hypothèse de départ).

iii) on devrait s'attendre à ce que la comparaison TH- vs Ba 171 ait le même effet que la comparaison TH- et TH+ et Ba 9175 vs Ba 171. Le nombre de gènes différentiellement exprimés dans cette condition (585) est effectivement proche de la condition TH- et TH+ (605) mais plus éloigné de la condition Ba 9175 vs Ba 171 (697). Ceci suggère qu'il pourrait y avoir un nombre plus important de processus qui sont influencés chez Yl en présence des 2 bactéries (le cas de Ba 9175 vs Ba 171) que d'une seule bactérie (le cas de TH- vs Ba 171).

Les gènes différentiellement exprimés ont été classés en catégories fonctionnelles. Cette répartition a été effectuée manuellement car les protéines de paroi jouent un rôle important dans les changements morphologiques de la cellule, mais elles présentent des séquences difficilement identifiables en utilisant le logiciel Blast, ou par homologie avec *S. cerevisiae*. Ces séquences possèdent une séquence signal en région N-terminal, sont riches en acides aminés tels que la sérine, la thréonine, l'asparagine et la proline et sont souvent attachées à une ancre-GPI. Nous avons pu les identifier en recherchant les ancre-GPI à l'aide du logiciel « Big-PI Fungal predictor » (Eisenhaber *et al.* 2004). Certaines attributions fonctionnelles ont été réalisées en utilisant les domaines fonctionnels répérés par pFAM.

Les catégories fonctionnelles sont réprésentées dans le tableau 6 ci-dessous. Il y a 34%, 36%, 31% et 32% de gènes qui codent pour des protéines dont la fonction n'est pas connue respectivement dans les 4 conditions TH- vs TH+, TH- vs Ba 171, TH+ vs Ba 171 et Ba 9175 vs Ba 171.

	TH- vs TH+		TH- vs 171		TH+ vs 171		9175 vs 171	
Classes fonctionnelles	**G. réprimés**	**G. induits**	**G. réprimés**	**G. induits**	**G. réprimés**	**G. induits**	**G. réprimés**	**G. induits**
METABOLISME	**62**	**63**	**66**	**66**	**41**	**35**	**73**	**59**
métabolisme du carbone	13	13	15	14	13	3	14	8
acides aminés	10	11	13	13	7	6	19	5
lipides	14	9	9	10	6	8	9	11
peroxysome	1	2	0	1	1	1	1	2
homéostasie des cations	2	3	2	2	1	0	5	1
métaux	8	2	8	8	3	10	8	19
transport	14	23	19	19	10	8	17	13
VITAMINES	**0**	**11**	**3**	**3**	**13**	**0**	**4**	**3**
thiamine	0	5	1	1	5	0	2	1
autres vitamines	0	6	2	2	8	0	2	2
MORPHOLOGIE	**93**	**29**	**26**	**81**	**16**	**33**	**63**	**34**
cycle cellulaire (mitose et méiose)	8	3	2	8	1	5	3	0
signalisation	13	3	4	12	1	5	10	2
transition dimorphique	11	4	3	7	2	4	8	1
paroi cellulaire	38	18	16	33	11	12	35	18
vésicules de transport	7	1	1	6	1	2	4	6
maintenance de l'ADN	16	0	0	15	0	5	3	7
STRESS	**16**	**29**	**17**	**15**	**20**	**9**	**16**	**43**
stress oxidatif	4	21	13	3	15	2	2	20
autres stress	4	4	1	4	2	4	8	7
autophagie	1	0	0	1	0	1	0	0
proteasome	7	4	3	7	3	2	6	16
MITOCHONDRIE	**5**	**8**	**7**	**7**	**6**	**1**	**10**	**9**
BIOSYNTHESE DES PROTEINES	**1**	**7**	**5**	**5**	**3**	**2**	**58**	**4**
TRANSCRIPTION	**6**	**8**	**5**	**3**	**1**	**3**	**5**	**18**
NON CLASSIFIES	**27**	**37**	**29**	**38**	**27**	**16**	**28**	**47**
INCONNUS	**111**	**92**	**91**	**118**	**41**	**62**	**57**	**166**
	321	**284**	**249**	**336**	**168**	**161**	**314**	**383**
TOTAL	**605**		**585**		**329**		**697**	

Tableau 6 : Catégories fonctionnelles des gènes différentiellement exprimés chez *Y. lipolytica* 1E07, dans les 4 conditions TH- vs TH+, TH- vs Ba 171, TH+ vs Ba 171 et Ba 9175 vs Ba 171, au jour 8 de la croissance.

Une étude transcriptomique a récemment été publiée et a permis d'identifier les gènes impliqués dans la transition dimorphique chez la levure *Y. lipolytica* (Adan Topiltzin *et al.*, 2012). Une autre étude a permis, quant à elle, de reconstituer les voies qui contrôlent les ramifications apicales et les branchements du mutant *ramosa-1* d'*Aspergillus niger* (*ramosa-1* est le mutant de *A. niger* T312 obtenu après mutagenèse par les UV) (Meyer *et al*., 2009).

Notre étude transcriptomique a permis d'identifier des catégories fonctionnelles communes avec celle des travaux pré-cités (les travaux d'Adan Topiltzin et coll. en 2012 ainsi qu'avec les travaux de Meyer et coll. en 2009).

Ces catégories concernent : i) le métabolisme (le métabolisme de carbone, les acides aminés, les lipides, l'homéostasie des métaux, le transport des métabolites ii) les stress oxidatif iii) la

transition dimorphique iv) la paroi cellulaire v) la signalisation.

Par contre, notre étude a permis d'identifier d'autres catégories fonctionnelles qui n'ont pas été décrites dans les travaux cités auparavant mais qui nous paraissent pertinentes et qui sont les suivantes : i) le métabolisme de la thiamine ii) la synthèse protéique.

Aussi, sont présentées dans le tableau 7, les catégories fonctionnelles qui pourraient être impliquées dans les changements morphologiques de *Y. lipolytica* observés en présence des deux bactéries Ba 171 et Ba 9175.

Yarrowia gene name	Saccharomyces gene name	TH- vs TH+	TH- vs 171	TH+ vs 171	9175 vs 171	Functional categories
Thiamin						
YALI0A09768g	***THI4***	5,96		-6,27		Thiamin biosynthesis
YALI0C15554g	***THI6***	2,12		-2,03		Thiamin biosynthesis
YALI0E04224g	***THI20***	3,80		-4,05	-1,73	Thiamin biosynthesis
YALI0E21351g	***THI80***	1,55				Thiamin biosynthesis
YALI0E21351g	***THI80***			-1,65		Thiamin biosynthesis
YALI0D19756g	***THI72***	1,45	-1,33		2,03	Thiamin transport
YALI0F20262g	***TPC1***		1,19	-1,57	-1,13	Thiamin transport
Carbon metabolism						
YALI0F05038g	***PDB1***	-1,32	2,76	-1,37	-1,83	Thiamin-dependent-enzyme
YALI0D06930g	***PDC6***	-2,63	3,09		-2,57	Thiamin-dependent-Pyruvate decarboxylase
YALI0D10131g	***PDC1***	1,70		-1,11		Thiamin-dependent-Pyruvate decarboxylase
YALI0E27005g	***PDB1***	-1,30	1,83		-1,62	Thiamin-dependent-Pyruvate dehydrogenase
YALI0F20702g	***PDA1***	-1,45	1,40			Thiamin-dependent-Pyruvate dehydrogenase
YALI0D08690g	***PDA1***		2,87	-1,52	-1,98	Thiamin-dependent-Pyruvate dehydrogenase
YALI0F10923g	***XKS1***	1,51				Carbon metabolism-Xylulose catabolism
YALI0C01859g	***ALD5***		1,96		-1,47	Carbon metabolism
YALI0F04095g	***IDP2***				-1,20	Carbon metabolism
YALI0F23947g	***GAL7***		-1,09		1,36	Carbon metabolism
YALI0E30965g	***ACH1***		-1,82			Carbon metabolism
YALI0F05962g	***ACS2***		-1,32			Carbon metabolism
YALI0F23793g	***HFD1***		-1,32			Carbon metabolism
YALI0A15147g	***ADH3***	-2,05	3,67	-1,24	-2,34	Carbon metabolism-Ethanol metabolism
YALI0D25630g	***ADH1***	-1,52	1,15			Carbon metabolism-Ethanol metabolism
YALI0E00264g	***ALD4***	4,21	-1,92	-2,88	1,25	Carbon metabolism-Ethanol metabolism
YALI0E07766g	***ADH3***			-1,26		Carbon metabolism-Ethanol metabolism

YALI0F15917g	***SYM1***		1,44			Carbon metabolism-Ethanol metabolism
YALI0A12353g	***FDH1***	1,53	-2,18			Carbon metabolism-Formate metabolism
YALI0B19976g	***FDH1***	2,17	-3,03			Carbon metabolism-Formate metabolism
YALI0B22506g	***FDH1***	-2,73	2,19		-2,82	Carbon metabolism-Formate metabolism
YALI0C08074g	***FDH1***	1,58	-2,61			Carbon metabolism-Formate metabolism
YALI0E14256g	***FDH1***	3,24	-2,44	-1,90		Carbon metabolism-Formate metabolism
YALI0F28765g	***FDH1***	1,81	-2,12			Carbon metabolism-Formate metabolism
YALI0C16995g	***PCK1***				-1,52	Carbon metabolism-Gluconeogenesis
YALI0E18634g	***MAE1***			-1,20		Carbon metabolism-Gluconeogenesis
YALI0B13970g	***GUT2***	1,29				Carbon metabolism-Glycerol metabolism
YALI0A16379g	***ADH3***	-1,82				Carbon metabolism-Fermentation
YALI0D12400g	***PGK1***	-1,89	1,33			Carbon metabolism-Glycolysis
YALI0D25960g	***ALD4***	-2,70	2,49		-1,35	Carbon metabolism-Ethanol metabolism
YALI0E15488g	***GLK1***	1,73		-1,62		Carbon metabolism-Glycolysis
YALI0F16225g	***ND***				1,28	Carbon metabolism-Glyoxylate pathway
YALI0E27291g	***ND***		-1,64		4,14	Carbon metabolism-Glyoxylate pathway
YALI0D19140g	***MLS1***		-2,69	1,61		Carbon metabolism-Glyoxylate pathway
YALI0D12661g	***CYB2***	-1,56		1,08		Carbon metabolism-Lactate metabolism
YALI0B19470g	***JEN1***	-1,82	2,14			Carbon metabolism-Lactate transport
YALI0E32901g	***JEN1***		-1,52		1,19	Carbon metabolism-Lactate transport
YALI0C21406g	***JEN1***		-1,98			Carbon metabolism-Lactate transport
YALI0E34045g	***ND***	2,60		-1,88	1,28	Carbon metabolism-Lactone catabolism
YALI0D09229g	***SHB17***	3,14	-1,55	-2,05	1,54	Carbon metabolism-Pentose phosphate pathway
YALI0C11880g	***RPE1***				2,00	Carbon metabolism-Pentose phosphate pathway
YALI0B14927g	***RBK1***	1,14				Carbon metabolism-Ribose metabolism
YALI0D23815g	***KGD2***	-1,15	3,07	-1,75	-2,19	Carbon metabolism-TCA cycle
YALI0D16753g	***MDH1***			-1,30	-2,02	Carbon metabolism-TCA cycle

YALI0E02684g	***CIT1***				-1,10	Carbon metabolism-TCA cycle
YALI0C06776g	***FUM1***				-1,04	Carbon metabolism-TCA cycle
Cell wall						
YALI0A05027g	***BSC1***	1,33				Cell wall
YALI0B07601g	***PUN1***	-2,51	1,37	1,38	-1,50	Cell wall
YALI0B13618g	***FLC2***	-1,33			-2,03	Transport FAD
YALI0C01419g	***ND***	-1,96	1,31			Cell wall
YALI0C09680g	***CRH1***	-2,08	1,37		-1,67	Cell wall
YALI0D04851g	***GAS5***	-1,80	1,27			Cell wall
YALI0D20680g	***SCW4***	-1,94	1,27		-1,22	Cell wall-Conjugation
YALI0E19360g	***TUB1***	-1,46				Cytoskeleton
YALI0E28534g	***TIR2***	1,22	-1,23		2,46	Cell wall
YALI0E32967g	***ND***	-1,73		1,62	-1,03	Cell wall
YALI0F08327g	***ZEO1***	-2,22	1,46			Cell wall
YALI0F18722g	***DCW1***	-1,62	1,34		-1,44	Cell wall
YALI0F27049g	***TPM2***	-1,97	1,37			Cytoskeleton
YALI0F01925g	***ND***				-1,42	Cell wall
YALI0C06490g	***PSA1***		1,27		-1,32	Cell wall
YALI0E33473g	***CWH43***				-1,04	Cell wall
YALI0A19976g	***CNB1***				1,18	Cell wall
YALI0F18282g	***ND***				1,20	Cell wall
YALI0C17545g	***CSR1***				1,57	Cell wall
YALI0C22836g	***ND***		-1,75	1,01	2,54	Cell wall
YALI0A09196g	***ND***		-1,95	1,08	2,76	Cell wall
YALI0A13013g	***YPS3***	3,20	-3,56		4,06	Cell wall organization
YALI0A19888g	***ND***	3,21		-2,70		Cell wall organization
YALI0B00836g	***PRS5***	1,23				Cell wall organization

YALI0B07403g	***ECM13***	2,40	-2,12		2,21	Cell wall organization
YALI0B15510g	***UTR2***	-1,34			-1,61	Cell wall organization
YALI0B15510g	***UTR2***	-1,77	1,11			Nucleotide metabolism-Purine, Pyrimidine metabolism
YALI0B20306g	***PIR1***	3,27	-2,07	-2,46	1,44	Cell wall organization
YALI0C02981g	***HSP150***	2,92	-3,08		2,38	Cell wall organization
YALI0C07656g	***ND***	3,21	-1,09	-2,30		Cell wall organization
YALI0C16434g	***GUK1***	1,14		-1,27		Cell wall organization
YALI0E18788g	***CWP1***	1,17	-1,02			Cell wall organization
YALI0E22286g	***CWP1***	-1,91	1,38		-1,68	Cell wall organization
YALI0E26125g	***CWP1***	-3,07	1,96	1,15	-2,11	Cell wall organization
YALI0E33539g	***SUN4***	-1,99	1,18		-2,12	Cell wall organization
YALI0E33891g	***ND***	2,90	-2,22	-1,62	1,75	Cell wall organization
YALI0C10135g	***YPS3***		2,53	-1,44	-2,05	Cell wall organization
YALI0C14190g	***SKN1***				-1,50	Cell wall organization
YALI0D07480g	***ECM33***				-1,29	Cell wall organization
YALI0E20757g	***ECM19***				-1,27	Cell wall organization
YALI0D17006g	***CHS7***				-1,07	Cell wall organization
YALI0C24354g	***CHS3***				-1,07	Cell wall organization
YALI0E21021g	***FKS1***				-1,06	Cell wall organization
YALI0A03597g	***GAS3***				-1,06	Cell wall organization
YALI0E28336g	***HPF1***				1,57	Cell wall organization
YALI0B02420g	***ECM4***			-1,01		Cell wall organization
YALI0C04279g	***YPS3***		-2,09			Cell wall organization
YALI0F09163g	***YPS3***		-1,03			Cell wall organization
YALI0F01947g	***ND***	-1,50	1,04		-1,02	Cell wall-conjugation
YALI0C01485g	***SMP3***		1,31			Cell wall-GPI-anchor biosynthesis
YALI0A00176g	***MUC1***	-2,59	1,56	1,42		Cell wall-GPI-anchored

YALI0B10109g	***ND***	2,83	-2,33		2,45	Cell wall-GPI-anchored
YALI0B13948g	***ND***	2,79		-2,43	1,65	Cell wall-GPI-anchored
YALI0B18194g	***ND***	-2,05	2,11		-2,00	Cell wall-GPI-anchored
YALI0B18744g	***ND***	-1,97	2,27		-1,56	Cell wall-GPI-anchored
YALI0C00110g	***ND***	-1,70	1,28			Cell wall-GPI-anchored
YALI0C11165g	***ND***	-1,48	1,68		-1,08	Cell wall-GPI-anchored
YALI0C14630g	***ND***	-2,87	2,04		-2,04	Cell wall-GPI-anchored
YALI0C15004g	***ND***	-1,88	1,38			Cell wall-GPI-anchored
YALI0C21252g	***ND***	1,55	-1,07			Cell wall-GPI-anchored
YALI0C21912g	***ND***	1,66	-2,10		2,90	Cell wall-GPI-anchored
YALI0D00198g	***ND***	-2,11	1,89		-1,29	Cell wall-GPI-anchored
YALI0D08646g	***ND***	2,86	-1,09	-2,03	1,13	Cell wall-GPI-anchored
YALI0D09185g	***FLO11***	-2,71	1,30	2,01		Cell wall-GPI-anchored
YALI0D25586g	***ND***	-2,87	2,07	1,18	-1,50	Cell wall-GPI-anchored
YALI0E01210g	***ND***	-1,52	1,17			Cell wall-GPI-anchored
YALI0E11517g	***Yl CWP1***	1,63			1,41	Cell wall-GPI-anchored
YALI0E13574g	***ND***	-1,58			-1,53	Cell wall-GPI-anchored
YALI0E18700g	***ND***	-2,45		2,01		Cell wall-GPI-anchored
YALI0E19426g	***ND***	-1,53	3,16	-1,28	-1,72	Cell wall-GPI-anchored
YALI0E35024g	***ND***	-2,03	1,37			Cell wall-GPI-anchored
YALI0F02343g	***ND***	-1,99	1,10		-1,33	Cell wall-GPI-anchored
YALI0F04620g	***ND***	1,64		-1,37		Cell wall-GPI-anchored
YALI0F21428g	***ND***	-2,08		1,41		Cell wall-GPI-anchored
YALI0F24255g	***ND***	-1,68	1,59		-1,69	Cell wall-GPI-anchored
YALI0F26565g	***ND***	-3,92	3,15		-2,11	Cell wall-GPI-anchored
YALI0F28325g	***ND***	-3,04		2,88		Cell wall-GPI-anchored
YALI0E00726g	***TUB2***	-2,19	1,30	1,07		Cytoskeleton

YALI0E02618g	***SDA1***				-1,34	Cytoskeleton
YALI0B04268g	***CBK1***				-1,07	Cytoskeleton
YALI0E18546g	***HSP42***				1,31	Cytoskeleton
Hyphal transition						
YALI0A12111g	***ECM25***	-1,83		1,26		Cell wall-signaling
YALI0B13662g	***RHO1***	-1,65		1,16		Cell wall-signaling
YALI0C04158g	***YPK2***	-1,23		1,07		Cell wall-signaling
YALI0D08140g	***PRY2***		1,92		-2,29	Hyphal induced *C. albicans*
YALI0C17567g	***ND***		1,82		-2,17	Hyphal induced *C. albicans*
YALI0E02266g	***ND***		1,04			Hyphal induced *C. albicans*
YALI0C21087g	***CDC10***	-1,82	1,25			Hyphal induced *C. albicans*-Cell wall
YALI0C14586g	***ARF3***	-2,22	1,63			Hyphal induced *C. albicans*-Cytoskeleton
YALI0C15114g	***ND***	-1,12			-1,10	Hyphal induced *C. albicans*-Mitosis
YALI0A07403g	***RDI1***	-1,04				Hyphal induced *C. albicans*-Signaling
YALI0C20251g	***GRE2***	1,54	-2,38			Hyphal induced *C. albicans*-Stress
YALI0F05324g	***SEC24***				-1,03	Hyphal induced *C. albicans*-Vesicle transport-Secretion
YALI0A18469g	***HOY1***	-2,29	1,77			Hyphal transition
YALI0B21582g	***YlMHY1***	-3,00	1,98	1,29	-1,97	Hyphal transition
YALI0E07557g	***MUC1***	-1,05				Hyphal transition
YALI0E25845g	***YlRAC1***	-1,12				Hyphal transition-Hyphal induction
YALI0B00924g	***FMP46***	1,85		-1,28		Hyphal under expressed
YALI0E14190g	***MDH1***				-1,08	Hyphal under expressed-Carbon metabolism-TCA cycle
YALI0E13255g	***SSE1***				-1,28	Hyphal under expressed-DNA
YALI0D14322g	***PDX3***	2,15	-1,71		1,92	Hyphal under expressed-Lipid metabolism
YALI0E16753g	***XPT1***	1,56	-1,07		-1,01	Hyphal under expressed-Nucleotide metabolism
YALI0B08921g	***SOD2***			-1,12		Hyphal under expressed-Oxydative stress response

Signaling						
YALI0B08558g	***VHS1***	-2,13	1,05	1,40		Protein kinase
YALI0B10758g	***CDC28***	-1,88	1,34			Protein kinase
YALI0C21758g	***CAT1***	-1,67		1,20	-1,11	Protein kinase
YALI0F05852g	***ND***	2,00	-1,09	-1,22		Protein kinase
YALI0F16159g	***HSL1***	1,83	-1,91		1,20	Protein kinase
YALI0F18700g	***CKS1***	-1,19		1,05		Protein kinase
YALI0C15444g	***ND***				-1,13	Protein kinase
YALI0E16533g	***MF(ALPHA)1***	-3,01	3,36		-2,37	Mating
YALI0E30415g	***MF(ALPHA)1***	-2,58	3,40		-2,46	Mating
YALI0A06699g	***STE18***	-3,62	3,27		-2,13	Mating signaling pathway
YALI0C07480g	***Yl-MATB1***	-3,56	3,85		-2,95	Mating signaling pathway
YALI0E01364g	***STE4***	-2,90	3,09		-2,11	Mating signaling pathway
YALI0F11913g	***STE3***	-2,99	3,34		-2,49	Mating signaling pathway
YALI0A09592g	***GPA2***	-1,40	1,07		-1,01	Signaling
YALI0D12408g	***RDI1***	-1,41		1,32		Signaling
YALI0D15862g	***SOK1***	1,59				Signaling
YALI0E08756g	***RAS1***	-2,32	1,45	1,24	-1,52	Signaling
YALI0E11627g	***GPA1***	-3,07	3,33		-2,40	Signaling
YALI0B06710g	***RIM21***		-1,36		1,14	Signaling
YALI0B04796g	***ND***		-1,84			Signaling
YALI0E05489g	***RGD2***		1,08			Signaling
YALI0C06424g	***SNF3***		1,25			Signaling
Protein biosynthesis						
YALI0E20361g	***SPE2***	1,47			-1,43	Polyamine biosynthesis
YALI0C16049g	***TEF4***	-2,69	3,46		-2,04	Protein biosynthesis
YALI0C06820g	***RPL4B***				-2,07	Protein biosynthesis

YALI0F24695g	***RPL8B***				-1,77	Protein biosynthesis
YALI0D05753g	***ND***		1,26		-1,68	Protein biosynthesis
YALI0C24420g	***CAM1***				-1,59	Protein biosynthesis
YALI0A10725g	***RPS7A***				-1,56	Protein biosynthesis
YALI0B12848g	***RPS16A***				-1,50	Protein biosynthesis
YALI0C00539g	***PAB1***				-1,48	Protein biosynthesis
YALI0D13728g	***RPS24B***				-1,47	Protein biosynthesis
YALI0E14597g	***GRS1***				-1,46	Protein biosynthesis
YALI0F20482g	***RPS11A***				-1,44	Protein biosynthesis
YALI0C09141g	***TEF1***				-1,44	Protein biosynthesis
YALI0F31405g	***RPL33B***				-1,40	Protein biosynthesis
YALI0D13882g	***RPL12A***				-1,39	Protein biosynthesis
YALI0E23694g	***RPS3***				-1,39	Protein biosynthesis
YALI0E14465g	***RPS2***				-1,39	Protein biosynthesis
YALI0F11055g	***RPS13***				-1,37	Protein biosynthesis
YALI0D22264g	***DPS1***				-1,36	Protein biosynthesis
YALI0E29073g	***RPL9B***				-1,36	Protein biosynthesis
YALI0D10263g	***RPL23B***				-1,33	Protein biosynthesis
YALI0B12826g	***RPL13A***				-1,32	Protein biosynthesis
YALI0B08866g	***RPL18B***				-1,31	Protein biosynthesis
YALI0C09218g	***RPL16A***				-1,31	Protein biosynthesis
YALI0E04092g	***MKT1***				-1,29	Protein biosynthesis
YALI0C15895g	***RPL17B***				-1,28	Protein biosynthesis
YALI0C03872g	***RPS25B***		1,01		-1,27	Protein biosynthesis
YALI0C21560g	***RPL3***				-1,27	Protein biosynthesis
YALI0E13618g	***RPL7A***				-1,25	Protein biosynthesis
YALI0E21219g	***RPL26B***				-1,24	Protein biosynthesis

YALI0F05803g	***RPS15***				-1,22	Protein biosynthesis
YALI0A18205g	***RPS0A***				-1,21	Protein biosynthesis
YALI0F05676g	***RPS1B***				-1,21	Protein biosynthesis
YALI0C11473g	***RPS10B***				-1,20	Protein biosynthesis
YALI0F08569g	***RPS5***				-1,19	Protein biosynthesis
YALI0E13277g	***YEF3***				-1,18	Protein biosynthesis
YALI0E19701g	***RPS26A***				-1,16	Protein biosynthesis
YALI0F24387g	***TUF1***				-1,14	Protein biosynthesis
YALI0A00803g	***FUN12***				-1,14	Protein biosynthesis
YALI0E24475g	***RPL31B***				-1,14	Protein biosynthesis
YALI0D01628g	***PUS7***				-1,12	Protein biosynthesis
YALI0E22352g	***RPL5***				-1,12	Protein biosynthesis
YALI0F25531g	***RPL25***				-1,12	Protein biosynthesis
YALI0B20922g	***TIF2***				-1,12	Protein biosynthesis
YALI0F18766g	***RPS6A***				-1,11	Protein biosynthesis
YALI0E00550g	***RPL14A***				-1,10	Protein biosynthesis
YALI0B12804g	***RPP1B***				-1,10	Protein biosynthesis
YALI0A00132g	***SSB2***				-1,09	Protein biosynthesis
YALI0B05896g	***RPL27A***				-1,05	Protein biosynthesis
YALI0E34573g	***RPL43A***				-1,04	Protein biosynthesis
YALI0B14146g	***RPP0***				-1,04	Protein biosynthesis
YALI0F05544g	***ND***				-1,04	Protein biosynthesis
YALI0D12903g	***RPS4A***				-1,04	Protein biosynthesis
YALI0A17941g	***RLI1***				-1,03	Protein biosynthesis
YALI0E23562g	***RPL30***				-1,03	Protein biosynthesis
YALI0B04334g	***NEW1***				-1,02	Protein biosynthesis
YALI0F14465g	***RPS17B***				-1,01	Protein biosynthesis

YALI0B22125g	***TMA7***				1,06	Protein biosynthesis
YALI0C15323g	***MRPL39***				1,17	Protein biosynthesis
YALI0C06237g	***TMA10***		-1,03	1,28	1,42	Protein biosynthesis
YALI0A09933g	***RPL41B***				1,63	Protein biosynthesis
YALI0A20152g	***EFT1***		1,18	-1,32		Protein biosynthesis
YALI0E04246g	***YNL040W***			-1,23		Protein biosynthesis
YALI0F16137g	***TAN1***			-1,09		Protein biosynthesis
YALI0D23639g	***KRS1***			1,04		Protein biosynthesis
YALI0B01078g	***PWP2***	1,19				Protein biosynthesis-rRNA
YALI0D19118g	***TSR3***	1,60	-1,05			Protein biosynthesis-rRNA
YALI0E29506g	***UTP10***	1,22	-1,23			Protein biosynthesis-rRNA
YALI0F14377g	***UTP6***	1,16				Protein biosynthesis-rRNA
YALI0C04213g	***ENP1***				-1,25	Protein biosynthesis-rRNA
YALI0F21725g	***NUG1***		-1,20			Protein biosynthesis-rRNA
YALI0D15268g	***ND***	1,22				Protein biosynthesis-tRNA
YALI0E06765g	***NCL1***	1,49	-1,17			Protein biosynthesis-tRNA
YALI0A06908g	***POA1***		1,31			Protein biosynthesis-tRNA
Oxidative stress						
YALI0A01485g	***OYE2***	1,48		-1,33		Oxidative stress response
YALI0A19426g	***PRX1***	2,56	-2,73		1,38	Oxidative stress response
YALI0B03916g	***MXR1***	1,48	-2,08			Oxidative stress response
YALI0B06413g	***OYE2***	2,27	-2,22		1,08	Oxidative stress response
YALI0C16621g	***SOD2***	-1,48	1,30			Oxidative stress response
YALI0C16753g	***GAD1***	1,31	-1,63		2,08	Oxidative stress response
YALI0C21043g	***AHP1***	1,84		-1,42		Oxidative stress response
YALI0E12133g	***SOD1***	-1,23		1,09		Oxidative stress response
YALI0E17281g	***PST2***	2,37		-1,68	1,78	Oxidative stress response

YALI0E21560g	***ZTA1***	1,57		-1,78		Oxidative stress response
YALI0E34749g	***CTT1***	3,90	-1,36	-3,02	2,87	Oxidative stress response
YALI0F08195g	***PRX1***	1,36				Oxidative stress response
YALI0F25201g	***YKG9***	1,43		-1,61	1,03	Oxidative stress response
YALI0F26191g	***UGA2***		1,05		-1,07	Oxidative stress response
YALI0C19668g	***PST2***				1,01	Oxidative stress response
YALI0D16247g	***OYE2***				1,15	Oxidative stress response
YALI0D01243g	***OYE3***				1,28	Oxidative stress response
YALI0B15268g	***ND***				1,49	Oxidative stress response
YALI0E02310g	***HYR1***				2,13	Oxidative stress response
YALI0F01496g	***TRX2***				2,44	Oxidative stress response
YALI0C19646g	***PST2***				2,51	Oxidative stress response
YALI0D27126g	***TRR1***				3,00	Oxidative stress response
YALI0C05467g	***GRX2***				3,09	Oxidative stress response
YALI0D16709g	***SRX1***				4,14	Oxidative stress response
YALI0A15906g	***GCY1***	3,02	-1,91	-1,39		Oxidative stress response-Aldo-keto reductase
YALI0A19910g	***ND***	4,12	-1,58	-3,13		Oxidative stress response-Aldo-keto reductase
YALI0B07117g	***GCY1***	1,96	-1,72			Oxidative stress response-Aldo-keto reductase
YALI0B21780g	***GCY1***	2,37	-1,58	-1,17		Oxidative stress response-Aldo-keto reductase
YALI0C00319g	***ND***	2,10	-2,08		2,37	Oxidative stress response-Aldo-keto reductase
YALI0D04092g	***GCY1***	2,97	-2,13	-1,42		Oxidative stress response-Aldo-keto reductase
YALI0E18348g	***GCY1***	3,33	-2,27	-1,38		Oxidative stress response-Aldo-keto reductase
YALI0F18590g	***GCY1***	1,84		-1,05		Oxidative stress response-Aldo-keto reductase
YALI0A00847g	***ND***			-1,05		Oxidative stress response-Aldo-keto reductase
YALI0B20416g	***ECM4***	2,22	-1,07	-1,22		Oxidative stress response-Glutathion
YALI0E18029g	***GLR1***	1,37		-1,01	1,71	Oxidative stress response-Glutathion
YALI0C21021g	***ND***				2,04	Oxidative stress response-Glutathion

YALI0C20669g	***CIS2***	-1,53	1,26		-1,97	Oxidative stress response-Glutathion catabolism
YALI0B15125g	***TSA1***	-1,15		1,04	2,16	Oxidative stress response-Thioredoxin
Amino acid metabolism						
YALI0F23243g	***DAL1***	1,77	-1,31			Allantoin metabolism
YALI0D18337g	***DAL2***			1,00		Allantoin metabolism
YALI0B14619g	***DUR1,2***		1,67			Allantoin metabolism
YALI0A13387g	***ASN2***	1,16			-1,02	Amino acid metabolism
YALI0B01364g	***LEU1***	1,63				Amino acid metabolism
YALI0B07447g	***LEU4***	1,19			-1,20	Amino acid metabolism
YALI0B20020g	***ARO3***	1,45	-1,01			Amino acid metabolism
YALI0C09735g	***MMF1***	-1,33	2,16		-1,05	Amino acid metabolism
YALI0D01265g	***BAT1***	-1,83	2,85		-1,93	Amino acid metabolism
YALI0D06325g	***ALT1***	-1,75	1,76		-1,92	Amino acid metabolism
YALI0E00242g	***GCV3***	-1,21				Amino acid metabolism
YALI0E04939g	***SLM5***	-1,66	1,26		-1,46	Mitochondrial translation
YALI0E05533g	***ND***	-1,08	1,94			Protein modification
YALI0E07051g	***ND***	1,95	-1,36	-1,23		Amino acid metabolism
YALI0E09306g	***LYS5***	1,35				Amino acid metabolism
YALI0E09603g	***GDH2***	-1,88	2,64		-2,13	Amino acid metabolism
YALI0E16368g	***MET10***	2,12	-2,10		1,44	Amino acid metabolism
YALI0E18238g	***UGA1***	-2,30	2,48		-2,09	Amino acid metabolism
YALI0F02849g	***GCV1***	-1,29			-1,04	Amino acid metabolism
YALI0F08415g	***GAD1***	1,48		-1,17		Amino acid catabolism
YALI0F09966g	***SER3***	1,09				Amino acid metabolism
YALI0F17820g	***GDH3***	-1,36	-1,22	2,48		Amino acid metabolism
YALI0F31075g	***LYS20***	1,38				Amino acid metabolism
YALI0F19910g	***BAT2***		1,35	-1,73	-2,14	Amino acid metabolism

YALI0E20977g	***ARO8***		2,18		-2,14	Amino acid metabolism
YALI0F05874g	***CYS3***				-1,68	Amino acid metabolism
YALI0A12177g	***JLP1***				-1,56	Amino acid metabolism
YALI0F11759g	***SAH1***				-1,55	Amino acid metabolism
YALI0D22484g	***SHM1***				-1,55	Amino acid metabolism
YALI0C14718g	***RMT2***			-1,07	-1,48	Amino acid metabolism
YALI0E09108g	***CYS4***				-1,38	Amino acid metabolism
YALI0E12683g	***MET6***				-1,27	Amino acid metabolism
YALI0D06798g	***ORT1***				-1,04	Amino acid metabolism
YALI0C05709g	***ARG8***				1,02	Amino acid metabolism
YALI0E17171g	***PUT1***		-1,76	2,60	2,12	Amino acid metabolism
YALI0E07535g	***CAR1***			1,28	2,26	Amino acid metabolism
YALI0B08140g	***MET16***		-2,43	1,90	2,69	Amino acid metabolism
YALI0E08360g	***ND***		1,42	-1,31		Amino acid metabolism
YALI0E09262g	***ND***		1,84	-1,27		Amino acid metabolism
YALI0A21417g	***GLY1***			-1,04		Amino acid metabolism
YALI0B09625g	***PUT1***		-1,62	1,70		Amino acid metabolism
YALI0B09647g	***PUT2***		-1,52			Amino acid metabolism
YALI0E16643g	***AGX1***		-1,44			Amino acid metabolism
YALI0A01133g	***MET1***		-1,21			Amino acid metabolism
YALI0F28149g	***ND***		-1,07			Amino acid metabolism
YALI0D11704g	***HOM3***		-1,03			Amino acid metabolism
YALI0D20768g	***LPD1***		1,05			Amino acid metabolism

Tableau 7 : Gènes différentiellement exprimés chez Yl1E07 en confrontation avec les bactéries, et qui sont discutés dans ce travail.

- **Voie de la biosynthèse de la thiamine**

Dans la condition TH- vs TH+, l'expression des gènes impliqués dans la voie de biosynthèse et du transport de la thiamine (*THI4*, *THI6*, *THI20*, *THI80* et *THI72*) est fortement induite en carence en thiamine, quand Yl 1E07 pousse sous la forme « yeast-like », comme décrit dans la partie II du chapitre « Résultats et Discussion ».

En revanche, dans la condition TH- vs Ba 171, ces gènes ne sont pas différentiellement exprimés (tableau 6). Tout se passe comme si la levure était carencée en thiamine dans les deux cas, que ce soit sur le milieu TH- mais également lorsqu'elle est confrontée à la bactérie 171. Il faut noter que la quantité accumulée de thiamine par Ba 171 est relativement faible (TMP =1,52 pmol/mg et de la thiamine diphosphate =10,659 pmol/mg) par rapport à la quantité présente dans le milieu MCD TH+, qui est de l'ordre de 3µM. Il convient de rappeler que la thiamine a été dosée dans les culots cellulaires, alors qu'elle n'a pas pu être détectée dans les surnageants. Ces résultats suggèrent que la bactérie Ba 171 pourtant productrice de thiamine ne fournirait pas suffisamment de thiamine dans le milieu extérieur, et/ou que si la thiamine diffuse à l'extérieur des cellules, cela doit être à une concentration en dessous du seuil de détection.

Dans la condition TH+ vs Ba 171, les gènes de biosynthèse et du transport de la thiamine sont différentiellement exprimés, mais leur expression est réprimée au contraire de ce qui était observé dans la condition TH- vs TH+. En effet, dans ce cas on compare le niveau d'expression dans une condition qui contient peu de thiamine (confrontation Ba 171) à une condition qui est riche en thiamine (addition de thiamine exogène TH+).

Enfin, dans la condition Ba 9175 vs Ba 171, la plupart des gènes impliqués dans le métabolisme de la thiamine ne sont pas différentiellement exprimés, de la même façon que ce qui est observé pour la condition TH- vs 171. Dans ce dernier cas, les gènes n'étaient pas différentiellement exprimés car induits dans les deux conditions. De même, dans le cas des deux confrontations avec les souches bactériennes Ba 9175 et Ba 171, l'expression des gènes de la voie de biosynthèse de la thiamine serait induite comme si la levure était carencée en thiamine.

Ces résultats révèlent que sur le milieu pauvre en thiamine (confrontation avec Ba 171) ou carencé en thiamine (TH-), la voie de biosynthèse et du transport de la thiamine sont induites. Ils suggèrent que la transition dimorphique de Yl 1E07 depuis la forme « yeast-like » vers la forme filamenteuse observée dans la conditions TH- vs TH+ ainsi que dans la condition Ba

9175 vs Ba 171, est non seulemement dépendante de la thiamine mais aussi d'un effet des bactéries indépendant de l'effet thiamine. Ceci est conforté par l'analyse des transcriptomes des conditions TH+ vs Ba 171, qui révèle une induction de la voie de la biosynthèse de la thiamine dans le cas de la confrontation de Yl avec Ba 171 (forme filamenteuse) tout comme dans le cas où Yl est cultivée sur le milieu TH- (forme « yeast-like »).

- **La synthèse protéique**

Un résultat particulièrement intéressant dans la condition Ba 9175 vs Ba 171, est le nombre important de gènes (58 gènes) impliqués dans la voie de la biosynthèse des protéines, dont l'expression est inhibée chez Yl 1E07 en présence de la bactérie Ba 9175, alors que ce phénomène n'est pas observé dans les autres conditions. Une hypothèse serait que la souche *B. aurantiacum* 9175 produit des inhibiteurs tels que des antibiotiques ou autres molécules inhibitrices, qui inhibent la synthèse protéique chez *Y. lipolytica* 1E07. Ce phénomène est bien connu chez les *Brevibacteriaceae*, comme nous l'avons évoqué dans la partie « synthèse bibliographique ». *B. auranticaum* 9175 est capable de produire des inhibiteurs et des molécules anti-microbiennes qui inhibent la croissance de nombreuses bactéries potentiellement pathogènes ainsi que certains levures. Cette hypothèse reste à vérifier dans des futurs travaux, et des expériences seront proposées afin de répondre à cette question.

Par conséquent, à l'inhibition de la synthèse protéique observée chez Yl 1E07 en confrontation avec Ba 9175, nous pouvons ainsi interpréter l'inhibition de plusieurs métabolismes de la levure tels que le métabolisme carboné et le métabolisme des acides aminés.

- **Le métabolisme des acides aminés**

L'analyse des données trancriptomiques obtenues pour la condition Ba 9175 vs Ba 171, met en évidence 24 gènes différentiellement exprimés impliqués dans le métabolisme des acides aminés. Parmi ces gènes, 19 sont inhibés et 5 sont induits chez Yl 1E07 en confrontation avec Ba 9175. La majorité de ces gènes inhibés sont impliqués dans la biosynthèse des acides aminés. Nous pouvons citer à titre d'exemple, *ASN2*, *LEU4*, *CYS4*, *MET6*, *SHM1* et *ORT1* qui sont inhibés chez Yl 1E07 en présence de Ba 9175. Ces résultats vont dans le même sens que ceux obtenus pour la synthèse protéique qui est elle aussi inhibée dans la comparaison Ba 9175 vs Ba 171.

Dans la condition TH- vs TH+, nous observons une activation de la voie de la biosynthèse des

acides aminés contrairement à ce qui est observé dans Ba 9175 vs Ba 171. Cette première observation nous permet d'émettre l'hypothèse selon laquelle l'inhibition de la voie de biosynthèse des acides aminés chez la levure, ne serait pas dûe à la carence de la thiamine dans le milieu, mais serait plutôt liée à la présence de la bactérie Ba 9175. Parmi les gènes de la biosynthèse des acides aminés induits chez Yl TH-, nous pouvons citer à titre d'exemple les gènes *ASN2*, *LEU1*, *LEU4*, *ARO3*, *LYS5*, *SER3* et *LYS20*. Par ailleurs, nos résultats observés suggèrent une inhibition de la voie de dégradation de certains acides aminés et ceci par l'inhibition de l'expression des gènes tels que *GDH2*, *UGA1* et *GCV1*.

Finalement, les comparaisons de l'expression des gènes du métabolisme des acides aminés dans les conditions TH- vs Ba 171 et TH+ vs Ba 171 ne sont pas concluantes, nous observons autant de gènes induits que de gènes inhibés dans les deux cas (tableau 5 et 6).

- **Le métabolisme du carbone**

Le métabolisme carboné est affecté pendant le changement morphologique de Yl 1E07, depuis la forme unicellulaire « yeast-like » vers la forme filamenteuse.

Il convient de rappeler que dans la condition TH- vs TH+, l'expression des gènes codant les enzymes dépendantes de la thiamine (*PDC6*, *PDA1*, *PDB1*, *KGD2*), est réprimée en réponse à la carence en thiamine (tableau 6). De plus, les gènes qui codent pour les alcools déshydrogénases *ADH1* et *ADH3*, sont eux-aussi réprimés sur le milieu MCD TH-, où Yl 1E07 est présente sous la forme cellulaire « yeast-like ».

Des résultats similaires sont obtenus dans la condition Ba 9175 vs Ba 171, où Yl 1E07 change morphologiquement depuis la forme « yeast-like » vers la forme filamenteuse. Les gènes qui codent les enzymes dépendantes de la thiamine sont aussi eux réprimés, parmi lesquels *PDC6*, *PDB1*, *PDA1* et *KGD2*. Il convient de rappeler que *PDA1* et *PDB1* codent pour des sous-unités de la pyruvate déshydrogénase, qui alimente le cycle du TCA par l'acétyl coenzyme A. *KGD2* code pour l'enzyme alpha kétoglutarate déshydrogénase et transforme l'alpha kétoglutarate en succinyl-coenzyme A dans le cycle du TCA.

Nous avons observé que d'autres gènes qui codent pour des enzymes impliquées dans le cycle du TCA sont réprimés dans la condition Ba 9175 vs Ba 171. A titre d'exemple, les gènes *CIT1*, *IDP2*, *FUM1* et *MDH1* (tableau 7*). CIT1* code pour la citrate synthase, qui catalyse la condensation de l'acétyl coenzyme A et de l'oxaloacétate pour former le citrate. *IDP2* code pour une isocitrate déshydrogénase qui catalyse l'oxydation de l'isocitrate en

alphakétoglutarate. *FUM1* code pour la fumarase, une enzyme qui convertit l'acide fumarique en acide L-malique dans le cycle du TCA. *MDH1* code pour la malate déshydrogénase mitochondriale qui catalyse l'interconversion du malate et de l'oxaloacétate.

La répression de la majorité des enzymes impliquées dans le cycle du TCA, indique que les fonctions de ce cycle sont perturbées dans la condition Ba 9175 vs Ba 171 (similairement à la condition TH- vs TH+), condition où Yl 1E07 se présente sous la forme « yeast-like ».

Par ailleurs, les gènes qui sont impliqués dans la voie fermentaire sont réprimés dans la condition Ba 9175 vs Ba 171. Nous pouvons citer les gènes *PDC6, ADH1* et *ADH3*. *PDC6* code pour la pyruvate décarboxylase, qui transforme le pyruvate en acétaldéhyde. *ADH1* code pour l'alcool déshydrogénase et le gène *ADH3* code une alcool déshydrogénase mitochondriale. Ces deux enzymes sont impliquées dans la production d'éthanol à partir de l'acétaldhéyde. Nous pouvons noter que quand Yl 1E07 pousse sous la forme « yeast-like » (sur le milieu MCD TH- ou en présence de la bactérie non productrice de la thiamine Ba 9175), elle présente une perturbation dans son cycle du TCA et elle ne fermente pas. Des résultats similaires sont décrits dans la littérature. Meyer et coll. (2009) ont pu montrer que le métabolisme énergétique représenté par les enzymes telles que *PDC6* et *ADH1* est induit chez le mutant *ramosa-1* d'*A. niger*, qui est capable de pousser en produisant des ramifications et des branchements apicaux. Nous faisons l'hypothèse que les ramifications du mutant *ramosa-1* correspondent à l'état filamenteux de Yl 1E07 observé dans notre cas. Ainsi, nous pouvons comparer une induction du métabolisme carboné chez *ramosa-1* soit à une induction de ce métabolisme chez Yl sur TH+ ou en confrontation avec la bactérie Ba 171, soit à une répression dans le cas Yl sur TH- ou en confrontation avec la bactérie Ba 9175.

Nous n'avons pas pu interpréter facilement les résultats inattendus pour le métabolisme carboné dans les 2 autres conditions TH- vs Ba 171 et TH+ vs Ba 171. En effet, dans la condition TH- vs Ba 171, l'expression des gènes codant les enzymes dépendantes de la thiamine est induite, alors que dans la condition TH+ vs Ba 171, leur expression est réprimée.

- **La morphologie**

Le changement morphologique de Yl 1E07 observé sur le milieu MCD carencé ou supplémenté en thiamine, et en présence des deux bactéries Ba 171 et Ba 9175, induit l'expression de plusieurs groupes de gènes appartenant aux catégories fonctionnelles : paroi cellulaire, transition dimorphique et filamentation.

Dans la condition TH- vs TH+, décrite en détail dans la partie II du chapitre « Résultats et Discussion », l'expression de 62 gènes est inhibée en absence de thiamine. Ces gènes se répartissent entre la paroi cellulaire (38 gènes inhibés parmi 56), la transition dimorphique (11 gènes inhibés parmi 15) et la signalisation (13 gènes inhibés parmi 16).

Dans la condition TH+ vs Ba 171, Yl est présente sous la forme hyphale dans les 2 cas, ie que ce soit sur le milieu MCD supplémenté en thiamine TH+ ou en confrontation avec la bactérie Ba 171. Nous nous attendons donc à n'observer qu'un petit nombre de gènes différentiellement exprimés dans cette condition. Nous avons mis en évidence que l'expression de 14 gènes est inhibée et celle de 21 gènes est induite. Ces gènes se répartissent dans les 3 catégories fonctionnelles : paroi cellulaire, transition dimorphique et signalisation (tableau 6). Parmi les gènes induits nous pouvons citer *MUC1*, *CWP1* qui codent des protéines de la paroi cellulaire, et sont spécifiques de la forme hyphale. L'induction de l'expression de ces gènes dans la condition TH+ vs Ba 171 est cohérente avec l'aspect morphologique ridé de la colonie Yl 1E07. Dans la classe des gènes appartenant à la catégorie transition dimorphique, nous pouvons citer à titre d'exemple le gène *MHY1* qui code un facteur de transcription dont l'expression est induite au cours de la transition dimorphique depuis la forme levure vers la forme hyphale (Hurtado and Rachubinski, 2000). L'expression de *MHY1* est induite en présence de thiamine (TH+), condition dans laquelle Yl se présente sous forme hyphale. Pour ce qui concerne la signalisation, nous observons l'induction de l'expression des gènes *RAS1* et *RDI1* qui sont décrits comme étant spécifiques de la forme hyphale chez la levure *C. albicans* (Court and Sudbery, 2007; Feng *et al.*, 1999), ce qui est cohérent avec la forme hyphale de Yl 1E07 en présence de thiamine TH+.

Dans les conditions Ba 9175 vs Ba 171 et TH- vs TH+, qui sont équivalentes en terme de morphologie cellulaire (forme levure « yeast-like » vs forme hyphale), on retrouve, pour la grande majorité, les même gènes différentiellement exprimés. Nous pouvons citer les gènes *PUN1*, *CRH1*, *DCW1*, *UTR2*, *CWP1*, *MHY1*, *MF(ALPHA)1*, *STE18*, *STE4*, *STE3*, *GPA1*, *RAS1* et *GPA2*, dont l'expression est inhibée dans les conditions où Yl 1E07 présente une morphologie cellulaire de type levure.

Enfin, dans la condition TH- versus Ba 171 (forme levure « yeast-like » versus forme hyphale), nous observons que la majorité des gènes de la catégorie fonctionnelle morphologie est différentiellement exprimée. Mais leur expression est induite en absence de thiamine, où la levure présente une morphologie de type levure ce qui semble être en contradiction avec les autres conditions testées. Nous n'avons pas pu interpréter ce résultat, puisqu'un certain

nombre de gènes sont décrits pour leur spécificité de la forme hyphale comme les gènes (*MHY1*, *CWP1* et ceux de la voie de conjugaison ou « mating »).

- **Le stress oxydatif**

Dans la comparaison TH- vs TH+, 25 gènes sont différentiellement exprimés appartiennent à la catégorie fonctionnelle réponse au stress oxydatif. Parmi ces gènes, 4 gènes sont inhibés tandis que 21 gènes sont induits chez Yl TH-. Ce résultat suggère qu'en absence de thiamine (où la levure pousse sous forme levure « yeast-like »), la levure pourrait être soumise à un stress oxydatif.

Dans la comparaison TH- vs Ba 171, 16 gènes sont différentiellement exprimés. 13 gènes sont inhibés et 3 gènes qui sont induits chez Yl TH-. Ces résultats indiquent que la présence de la bactérie Ba 171, génère un stress oxydatif chez la levure et que cet effet est indépendant de celui induit par l'absence de thiamine.

Dans la comparaison TH+ vs Ba 171, 17 gènes sont différentiellement exprimés, dont 15 sont inhibés et 2 sont induits chez Yl TH+. Ce résultat conforte les observations de la condition précédente et suggère fortement que la présence de la bactérie Ba 171 induit un stress oxydatif chez Yl.

Dans la dernière condition Ba 9175 vs Ba 171, nous observons qu'il y a au total 22 gènes qui sont différentiellement exprimés, dont 2 ont réprimés et 20 sont induits chez Yl 1E07 confrontée à la bactérie Ba 9175.

Nous pouvons conclure, que l'absence de la thiamine dans le milieu MCD, induit un stress oxydatif chez la levure. Par ailleurs, la levure subit également un stress oxydatif lorsqu'elle est en présence de chacune des deux souches bactériennes Ba 171 et Ba 9175.

E. Validation des données transcriptomiques par RT qPCR

Afin de valider les données de transcriptomique obtenues, 5 gènes ont été selectionnés pour mesurer leur niveau d'expression par RT qPCR. Il s'agit de gènes qui sont différentiellement exprimés dans la condition TH- vs TH+ ainsi que dans la condition Ba 9175 vs Ba 171 (sauf *THI4* qui n'est pas différentiellement exprimé dans la condition Ba 9175 vs Ba 171). Le détail des amorces utilisées est présenté dans la publication n°2, tableau 1, p 122 du manuscrit.

Les résultats de RT qPCR confirment les résultats obtenus par les puces à ADN, à savoir que

les gènes étudiés sont différentiellement exprimés dans les conditions testées et avec des facteurs de régulation du même ordre (tableau 8): *THI20* (voie de la biosynthèse de thiamine), *CTT1* (stress oxydatif), *PDC6* (métabolisme carboné), *STE3* (morphologie). Le gène *THI4* qui ne présentait pas d'expression différentielle dans la condition Ba 9175 vs Ba 171 via l'analyse transcriptomique, présente une expression légèrement reprimée via la technique de RT qPCR. Ce résulat est cohérent avec ceux obtenus pour la voie de biosynthèse de la thiamine dans la condition Ba 9175 vs Ba 171.

	Niveau d'expression	
Gènes	**Microarray**	**RT qPCR**
THI4	ND	-1,17 ± 0,36
THI20	-1,73	-2,13 ± 0,20
CTT1	2,87	2,16 ± 0,20
PDC6	-2,57	-3,91 ± 0,25
STE3	-2,49	-7,03 ± 0,31

ND : non défini

Tableau 8 : Comparaison du niveau d'expression des gènes sélectionnés chez Yl 1E07 en confrontation avec les bactéries (condition Ba 9175 vs Ba 171), entre les deux techniques de transcriptome et la RT qPCR.

F. Conclusions

Il s'agissait d'étudier l'effet de différentes souches bactériennes isolées de deux écosystèmes différents, le fromage et le sol, et l'effet de la thiamine qui pourrait être produite par certaines de ces souches, sur la croissance et sur la morphologie de la levure *Yarrowia lipolytica* 1E07. Pour l'analyse des déterminants génétiques, nous avons retenu deux souches bactériennes fromagères *Brevibacterium aurantiacum* 171 et *B. aurantiacum* 9175 capables d'induire un effet sur la croissance et la morphologie de *Y. lipolytica* 1E07, comparable à celui qui avait pu être observé quand Yl1E07 était cultivée sur le milieu MCD carencé ou supplémenté en thiamine (TH- et TH+) : forme ridée de la colonie et forme cellulaire hyphale avec la souche Ba 171 et sur milieu MCD TH+, forme lisse de la colonie et forme cellulaire « yeast-like » avec la souche Ba 9175 et sur milieu MCD TH-.

Pour cette analyse transcriptomique, quatre conditions ont été testées, TH- versus TH+, TH- versus Ba 171, TH+ versus Ba 171 et Ba 9175 versus Ba 171, dans l'objectif de pouvoir séparer l'effet thiamine, d'un éventuel effet bactérie.

Cette étude nous a permis d'identifier des classes fonctionnelles de gènes différentiellement exprimés telles que la synthèse protéique, les métabolismes des acides aminés et du carbone, la voie de biosynthèse de thiamine, la morphologie et le stress oxydatif, qui nous paraissent pertinentes et pourraient être impliquées dans les changements morphologiques observés chez *Y. lipolytica* 1E07 en présence des deux souches bactériennes Ba1 71 et Ba 9175.

En effet, la synthèse protéique est inhibée chez *Y. lipolytica* en présence de Ba 9175 (forme levure « yeast-like ») alors que ce phénomène n'est pas observé dans les autres conditions. Nous proposons l'hypothèse que la souche *B. aurantiacum* 9175 produit des inhibiteurs tels que des antibiotiques qui inhiberait la synthèse protéique chez *Y. lipolytica* 1E07.

La voie de biosynthèse des acides aminés est inhibée dans la condition Ba 9175 versus Ba 171 (forme levure « yeast-like » versus forme hyphale), tandis que cette voie est activée dans la condition TH- versus TH+ (forme levure « yeast-like » versus forme hyphale), ceci nous a conduit à émettre l'hypothèse que l'inhibition de la voie de biosynthèse des acides aminés chez la levure, ne serait pas dûe à la carence de la thiamine dans le milieu, mais serait plutôt liée à l'effet de la souche bactérienne Ba 9175.

Les enzymes du cycle du TCA qui sont dépendantes de la thiamine et la voie fermentaire sont perturbées dans la condition Ba 9175 versus Ba 171, de même que dans la condition TH-

versus TH+, conditions dans lesquelles *Y. lipolytica* 1E07 se présente sous la forme « yeast-like ». Ces résultats sont cohérents avec ceux de Meyer et coll. (2009). Ces auteurs ont en effet constaté que la voie fermentaire est activée dans le cas de la croissance sous forme hyphale, ce qui est cohérent avec nos résultats.

La voie de biosynthèse de la thiamine qui est induite chez Yl 1E07 en présence de Ba171 (forme hyphale), ainsi que chez Yl 1E07 cultivée sur TH- (forme levure « yeast-like), suggère que la transition dimorphique de Yl 1E07 (depuis la forme « yeast-like » vers la forme filamenteuse) observée dans les conditions TH- vs TH+, ainsi que dans les autres conditions Ba 9175 vs Ba 171, est non seulemement dépendante de la thiamine mais aussi d'un effet des bactéries indépendant de l'effet thiamine. Ceci est conforté par les résultats obtenus pour la condition TH+ vs Ba 171, dans laquelle il y a une induction de la voie de la biosynthèse de la thiamine dans les confrontations avec Ba 171 (forme filamenteuse) tout comme dans les conditions de culture sur milieu TH- (forme « yeast-like »).

Pour ce qui concerne la catégorie fonctionnelle morphologie (paroi cellulaire, transition dimorphique, signalisation), les conditions Ba 9175 vs Ba 171 et TH- vs TH+ qui sont équivalentes en terme de morphologie cellulaire (forme levure « yeast-like » vs forme hyphale), regroupent pour leur grande majorité les mêmes gènes différentiellement exprimés. Ces derniers sont inhibés lorsque Yl 1E07 se présente sous forme levure « yeast-like ».

L'absence de la thiamine dans le milieu MCD, semble induire un stress oxydatif chez la levure. Par ailleurs, la levure semble également être soumise à un stress oxydatif lorsqu'elle est en présence de chacune de deux souches bactériennes Ba 171 et Ba 9175.

Nous pouvons donc conclure, après l'observation de tous ces résultats que la transition dimorphique observée chez Yl 1E07 depuis la forme levure « yeast-like » vers la forme hyphale, n'est pas dépendante uniquement de la thiamine, mais aussi de la présence de certaines souches bactériennes.

CONCLUSION-PERSPECTIVES

CONCLUSION-PERSPECTIVES

Nous nous sommes intéressés dans cette étude à la mise en évidence des interactions microbiennes qui peuvent exister entre la levure *Yarrowia lipolytica* et les autres micro-organismes de son environnement biotique. Une fois ces interactions caractérisées et validées, plusieurs techniques ont été utilisées, depuis des analyses chimiques jusqu'aux analyses transcriptomiques, afin de mieux comprendre les facteurs et les mécanismes qui régulent et qui contrôlent ces interactions.

La levure *Y. lipolytica* est un modèle d'étude d'importance du fait de ses nombreuses applications en biotechnologie. En effet, cette levure présente un certain nombre de propriétés intéressantes, parmi lesquelles sa capacité à dégrader les acides gras et les hydrocarbones, sa capacité à exprimer des protéines hétérologues et homologues, sa capacité à produire des acides organiques ainsi que des molécules intéressantes pour l'industrie arômatique.

Dans la première partie du travail, nous avons étudié l'interaction entre deux levures fromagères *Y. lipolytica* 1E07 et *Debaryomyces hansenii* 1L25. Nous avons pu mettre en évidence une inhibition de la croissance de la levure *D. hansenii* 1L25 lorsqu'elle est cultivée en présence de la levure *Y. lipolytica* 1E07, sur un milieu chimiquement défini liquide riche en acide aminés (MCD 2XAA). Nous avons pu montrer que cette inhibition n'est pas due à la production d'ammoniaque par *Y. lipolytica* 1E07, ni à une compétition nutritionnelle pour les sources de carbones et pour la source azotée. L'étude transcriptomique réalisée chez la levure *D. hansenii* 1L25, en comparant la croissance en culture mixte avec *Y. lipolytica* 1E07 à la croissance en culture pure, a permis de mettre en évidence que la levure *D. hansenii* 1L25 présente une transition de son métabolisme respiratoire vers un métabolisme fermentaire, indiquant qu'elle était confrontée à une carence en oxygène lorsqu'elle est cultivée en présence de *Y. lipolytica* 1E07. Pour confirmer cette hypothèse, une approche possible serait de réaliser une culture mixte de *D. hansenii* 1L25 avec *Y. lipolytica* 1E07 dans un bioréacteur à membrane, afin de pouvoir maîtriser l'apport d'oxygène dans la culture, et de tester si l'inhibition de *D. hansenii* 1L25 est levée par un apport suffisant d'oxygène. De plus, il serait intéressant de suivre par transcriptomique le comportement de *Y. lipolytica* dans cette culture mixte, et ceci dans les mêmes conditions que celles où on a observé l'inhibition de *D. hansenii* 1L25, afin d'obtenir des pistes qui pourraient expliquer l'inhibition observée chez *D. hansenii* 1L25.

Dans la deuxième partie du travail, nous avons étudié l'effet de la thiamine sur la morphologie et la croissance de *Y. lipolytica* 1E07, cette vitamine est connue dans la littérature pour jouer un rôle dans l'amélioration de la croissance de certains micro-organismes. Nous avons observé des changements morphologiques de *Y. lipolytica* sur le milieu de croissance MCD en fonction de la présence de la thiamine. Ces changements ont lieu tant au niveau macroscopique de la colonie de *Y. lipolytica* 1E07 qu'au niveau microscopique des cellules. Cette levure se présente sous la forme d'une colonie avec un aspect lisse et une forme unicellulaire type levure connue par « yeast-like » quand elle est cultivée sur le milieu MCD en absence de thiamine, tandis que la colonie présente un aspect ridé et une forme hyphale sur le milieu MCD en présence de thiamine.

L'étude transcriptomique de *Y. lipolytica* 1E07 effectuée, en comparant la condition où *Y. lipolytica* croît sur le milieu sans thiamine, à la condition où elle pousse sur le milieu avec thiamine, a permis de mettre en évidence des groupes de gènes qui pourraient être impliqués dans le changement morphologique de la levure sous l'effet de la thiamine. Nous avons ainsi observé des modifications profondes au niveau de l'organisation de la paroi cellulaire ainsi qu'au niveau du métabolisme de la levure. Des gènes qui sont impliqués dans la transition dimorphique chez *Y. lipolytica* tels que *MHY1*, *HOY1* sont inhibés chez *Y. lipolytica* sur le milieu MCD sans thiamine, où elle croit sous la forme unicellulaire type levure « yeast-like », et des gènes impliqués dans la conjugaison ou « mating » connus aussi pour contrôler le dimorphisme sont eux-aussi inhibés. Sur le milieu carencé en thiamine, *Y. lipolytica* active la voie de biosynthèse de la thiamine, tandis que les gènes codant des enzymes dépendantes de la thiamine telle que les gènes *PDC6*, *PDB1*, *PDA1*, *KGD2* sont inhibés. De plus le métabolisme fermentaire de la levure est inhibé (*PDC6*, *ADH1*, *ADH3*) quand elle pousse sur le milieu MCD sans thiamine sous la forme « yeast-like », mettant en évidence l'importance de la voie fermentaire dans le changement morphologique de la levure sous l'effet de la thiamine. Pour tester la réelle implication de ces gènes dans la transition dimorphique, il est possible à l'avenir de construire des mutants de *Y. lipolytica* qui sont affectés dans les gènes concernés, le gène *PDC6* par exemple, afin de voir les conséquences que peut avoir cette mutation sur la transition dimorphique de la levure.

Dans la dernière partie du travail, nous avons essayé de comprendre le rôle que peuvent avoir les bactéries et la thiamine qui pourrait être produite par ces dernières sur la croissance et la morphologie de la levure *Y. lipolytica* 1E07. Plusieurs souches bactériennes qui ont été isolées de différents écosystèmes tel que le fromage et le sol, ont été confrontées à la levure *Y.*

lipolytica 1E07, afin d'observer l'effet qu'elles pouvaient engendrer. Nous avons observé que chacune des bactéries n'induit pas les mêmes changements morphologiques chez *Y. lipolytica*, ce qui indique la présence d'une diversité entre les micro-organismes. Deux souches bactériennes ont été choisies pour conduire l'étude transcriptomique: *Brevibacterium aurantiacum* 9175 (non productrice de thiamine) et *B. aurantiacum* 171 (productrice de thiamine). Ces deux souches induisent chez Yl 1E07 un effet similaire à celui produit sur le milieu MCD carencé ou supplémenté en thiamine. En effet, la levure *Y. lipolytica* 1E07 se présente sous la forme de colonie ridée et une forme cellulaire hyphale en présence de la souche Ba 171, de la même façon que sur le milieu MCD avec thiamine. En revanche, elle se présente sous la forme d'une colonie lisse et sous une forme cellulaire « yeast-like » en présence de la souche Ba 9175, de la même façon que sur le milieu MCD sans thiamine. Une étude transcriptomique a été effectuée chez *Y. lipolytica* 1E07 en présence des deux souches bactériennes choisies Ba 171 et Ba 9175. Quatre conditions ont été testées, TH- versus TH+, TH- versus 171, TH+ versus 171 et 9175 versus 171, qui avaient pour but de pouvoir séparer l'effet thiamine de l'effet bactérie.

Les résultats transcriptomiques ont mis en évidence que la synthèse protéique est inhibée chez *Y. lipolytica* en présence de la bactérie Ba 9175 (forme levure « yeast-like »). Nous avons émis l'hypothèse que la souche *B. aurantiacum* 9175, pourrait produire des inhibiteurs tels que des antibiotiques qui inhiberait la synthèse protéique chez *Y. lipolytica* 1E07. Afin de vérifier cet hypothèse, nous proposons d'utiliser le surnageant d'une culture de Ba 9175 effectuée sur un milieu MCD liquide carencé en thiamine, et de faire pousser *Y. lipolytica* 1E07 sur ce surnageant afin de tester si sa croissance est inhibée par d'éventuelles molécules inhibitrices qui pourraient être produites par Ba 9175.

Nos résultats suggèrent aussi que la présence de la souche bactérienne Ba 9175 induit des modifications importantes au niveau de la paroi cellulaire de Yl1E07, comme le laisse penser l'inhibition des gènes impliqués dans la transition dimorphique et la biosynthèse de la paroi cellulaire ansi que la voie de la conjugaison ou mating. De plus le métabolisme fermentaire et le cycle du TCA sont aussi inhibés en présence de Ba 9175.

L'absence de la thiamine dans le milieu MCD, induit un stress oxydatif chez la levure. Par ailleurs, la levure subit également un stress oxydatif lorsqu'elle est en présence de chacune de deux bactéries Ba 171 et Ba 9175.

Nous pouvons donc conclure, après l'observation de tous ces résultats que la transition

dimorphique observée chez Yl 1E07 depuis la forme levure « yeast-like » vers la forme hyphale, n'est pas dépendante uniquement de la thiamine, mais aussi de la présence des bactéries indépendamment de l'effet thiamine.

Ces résultats nous ont apportés de pistes réelles et encourageantes dans la compréhension des interactions microbiennes et des mécanismes qui en sont responsables, des étapes nécessaires pour la compréhension du fonctionnement des divers écosystèmes.

FICHES TECHNIQUES

FICHES TECHNIQUES

Fiche technique n°1 : Milieux gélosés utilisés

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

- **Composition du milieu gélosé BHI (Brain Heart Agar) pour les bactéries**

Ce milieu, de pH final de 7,4 ± 0,2, est autoclavé 15 minutes à 120°C.

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

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

- **Composition du milieu gélosé YEGC (Yeast Extract Glucose Chloramphenicol) pour les levures**

Ce milieu, de pH final de 6,6 ± 0,2, est autoclavé 15 minutes à 120 °C. Le chloramphénicol inhibe la flore bactérienne.

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

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

- **Objectif**

L'utilisation d'un milieu chimiquement défini permet la maîtrise de la composition du milieu ainsi que la concentration des différents composés.

- **Méthode**

Les solutions sont préparées avec de l'eau osmosée et les quantités sont données pour la préparation d'un litre de milieu. Le milieu MCD est constitué de 8 solutions et possède un pH final de 6,5 ±0.3.

- **Composition du milieu**

  - **Solution 1 : sucre et sels 1**

Solution à 10X

Composé	Concentration 1X (g/l)	Référence
lactose*	20	Prolabo 24379.294
Lactate de sodium 60 %*	18	Prolabo 27925.922
Acétate de sodium	1	Sigma S 2889
Citrate d'ammonium	0,6	Aldrich 247561
KH_2PO_4	9	VWR 104873
K_2HPO_4	7,5	VWR 105104

*La source de carbone peut varier selon la condition de culture

  - **Solution 2 : sels 2**

Solution à 50 X

Composé	Concentration 1X (g/l)	Référence
$MgCl_2$, $6H_2O$	0,2	Sigma M 0250
$FeCl_2$, 4 H_2O	0,011	Merck 1038610250
$CaCl_2$, $2H_2O$	0,050	Prolabo 22317.231
$ZnCl_2$,	0,005	Merck 1088160250
$CoCl_2$, $6H_2O$	0,0025	Sigma C8661

- **Solution 3 : acides aminés**

Solution à 20X

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

- **Solution 4 : Phénylalanine**

Solution à 20X. Ajouter quelques gouttes d'HCl 37% pour dissoudre

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

- **Solution 5 : Tyrosine**

Solution à 20X. Ajouter quelques gouttes de KOH 10N pour dissoudre

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

- **Solution 6 : Bases**

Solution à 50X. Ajouter quelques gouttes de KOH 10N pour dissoudre

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

- **Solution 7 : Vitamines**

Solution à 20X

Composé	Concentration (g/l)	Référence
Acide P-aminobenzoïque	0,010	Sigma A9878
Biotine	0,010	Sigma B4501
Cyano-cobalamine	0,001	Sigma V2876
Acide folique	0,001	Interchim 47620
Inosine	0,005	Sigma I4125
Acide nicotinique	0,001	Sigma N4126
Acide orotique	0,005	Sigma O2750
Pantothénate de calcium	0,001	Labosi
Pyridoxamine	0,005	Sigma P9380
Pyridoxine	0,002	Sigma P9755
Riboflavine	0,001	Sigma R4500
Thiamine	0,001	Sigma T4625
Acide D,L 6-8 thioctique	0,0025	Sigma T5625
Thymidine	0,005	Sigma T9250
Pyridoxal-5-phosphate	0,0006	Sigma P9255

- **Solution 8: Cystéine**

Solution à 20X

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

- **Préparation du milieu**

Les solutions sont stérilisées par filtration membranaire de 0,22 µm (TPP, vacuum filtration-system) ou par autoclavage (solution 2) et mélangées dans l'ordre indiqué. De l'eau osmosée ou de l'agar bactériologique type E (30 g/l) (Biokar Diagnostics) sont ajoutés selon le milieu souhaité (liquide ou gélosé), afin de compléter le volume final.

Solution	**Concentration**	**Volume (mL)**
Solution 1	10x	100
Solution 2	50x	20
Solution 3	20x	50
Solution 4	20x	50
Solution 5	20x	50
Solution 6	50x	20
Solution 7	20x	50
Solution 8	20x	50
Eau osmosée ou agar		610
Volume final		1000 Ml

Fiche technique n°3 : Suivi de la croissance microbienne

- **Principe**

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

- **Méthode**

➢ Traitement des échantillons

Pour les cultures en milieu chimiquement défini, un volume de 1 ml est prélevé stérilement de l'erlenmeyer et dilué au 1/10 dans de l'eau physiologique stérile (9 ‰ de NaCl). Des dilutions décimales de cette suspension sont ensuite effectuées dans de l'eau physiologique. La plage de dilution varie de 10^{-1} à 10^{-7} en fonction de l'avancement de la croissance des micro-organismes dénombrés.

➢ Dénombrement des cellules viables

Pour un échantillon et une dilution donnés, trois boîtes de Petri sont ensemencées en surface avec 100 µl de suspension. L'ensemencement se fait sur des boîtes de 140 mm de diamètre à l'aide de billes de verre stériles. Les milieux de culture utilisés sont YEGC pour les levures et BHI pour les bactéries. Une solution de Triphényl Tétrazolium Chloride (TTC) préparée à 1g/l est ajoutée au milieu YEGC à une concentration finale de 0,01 g/l. L'ajout du TTC dans le milieu YEGC permet de différencier phénotypiquement les deux levures utilisées dans notre étude, *Yarrowia lipolytica* 1E07 et *Debaryomyces hansenii* 1L25, quand elles sont inoculées ensemble dans le milieu.

L'incubation des boîtes se fait à 25 °C pendant 2 à 3 jours selon les micro-organismes. Cette méthode permet de dénombrer le nombre d'Unités Formant Colonies (UFC) sur la totalité de la boîte. Ce nombre d'unités formant colonies doit être compris entre 30 et 300 UFC pour chaque micro-organisme. De plus, l'ensemencement en surface permet de distinguer les colonies en fonction de leur taille, de leur pigmentation, de leur aspect, et de constater immédiatement l'existence d'une éventuelle contamination. La concentration en cellules viables est donnée par la relation :

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

Avec :

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

d : Dilution par rapport à la suspension de départ,

Cx : Nombre de colonie compté pour la boite x,

V : Volume de solution ensemencée (ml),

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

Fiche technique n°4 : Dosages par HPLC

- **Principe**

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

- **Méthode**

  - **Traitement des échantillons issus des cultures en milieu synthétique**

Lors des prélèvements pour les dosages du lactose, du lactate et des acides aminés, les échantillons qui sont prélevés du milieu MCD liquide, sont filtrés à l'aide d'une seringue équipée à son extrémité d'un filtre en polyethersulfone (PES) d'une porosité de 0,20 µm (whatman). Cette opération permet d'éliminer les particules insolubles susceptibles de gêner l'analyse.

Lors du prélèvement pour le dosage de la thiamine, les échantillons qui sont collectés à partir du milieu MCD agar (culot environ entre 25 et 50 mg), sont traités avec 500 µL du TCA 12 % afin de dénaturer et de précipiter les protéines. On laisse les protéines précipiter pendant 30 min sur la glace, puis on centrifuge à 10 000 rpm pendant 5 min et on transfère le surnageant dans des flacons stériles de 15 ml. Afin d'éliminer le TCA avant l'analyse par HPLC, on ajoute 5 ml d'éther éthylique (Sigma Aldrich) et on mélange bien, puis on élimine la phase supérieure formée et on recommence deux fois. Une fois la phase supérieure bien éliminée, on congèle les échantillons traités à -20°C pour passage en HPLC.

  - **Dosage du lactose et du lactate**

Un appareil HPLC Waters TCM (Millipore, France) équipé d'une pompe LC-6A (Shimadzu, Japon), d'un injecteur automatique (Waters), d'un intégrateur CR-3A (Shimadzu) et d'une colonne échangeuse de cations, Aminex HPX 87H (Biorad Hercules, CA 94547, USA) est utilisé. La solution éluée est analysée par un détecteur à longueur d'onde variable Waters 490

(programmable multiwave detector) et un réfractomètre différentiel RID-6A (Shimadzu), tous les deux connectés en série. Un volume de 20 µl est injecté par un injecteur automatique d'échantillons (717 plus Waters). Les analyses sont réalisées à 35 °C, avec une vitesse de débit de la phase mobile de 0,6 ml/min. La colonne de 7,8 mm de diamètre et de 300 mm de longueur est couplée à une pré-colonne Aminex HPX-87H de 50 mm (Biorad). Cette colonne permet de séparer les acides organiques, les sucres et l'éthanol. L'identification du lactate se fait à l'aide du détecteur UV Waters 486, dont la longueur d'onde est ajustée à 210 nm.

- **Dosage des acides aminés**

Les acides aminés sont séparés par HPLC (Agilent 1200) après dérivation à l'orthophtalaldéhyde (OPA) pour les acides aminés primaires ou au fluorénylméthyl-chloroformiate (FMOC) pour les acides aminés secondaires. Les derivés sont séparés sur une colonne Hypersil C18 (Agilent) (200 x 2.1 mm, 5 µm) à 40°C par un gradient d'acétate (pH 7.2) et d'acétonitrile. Un détecteur à barrettes de diodes a été utilsé pour mesurer les derivés d'acides aminés, à 338 nm pour les dérivés primaires et à 262 nm pour les dérivés secondaires.

- **Dosage de la thiamine**

La méthode de détection des dérivés de la thiamine repose sur leur oxydation en thiochromes fluorescents par le ferricyanure de potassium en milieu alcalin préalablement à l'injection sur la colonne. L'oxydant est obtenu en dissolvant 100 mg de ferricyanure de potassium dans 10 ml d'eau; on prélève 500 µl de cette solution à laquelle on ajoute 2.5 ml de NaOH 15%. Avant l'injection, on prélève 40 µl de l'échantillon qu'on mélange avec 25 µl de l'oxydant et on injecte 20 µl de ce mélange sur la colonne. Avant l'injection de chaque série d'échantillons, un standard externe de concentration connue (0.25 µM) en chacun des quatre dérivés de la thiamine (le monophosphate de thiamine, le diphosphate de thiamine, le triphosphate de thiamine et la thiamine) est injecté. Ceci nous a permis de calculer la concentration en chaque dérivé de la thiamine dans chaque échantillon.

Les dérivés de la thiamine sont séparés selon le principe de la formation de paires d'ions lors du passage des dérivés thiochromes sur la colonne analytique PRP-1 de type phase inverse (150 x 4.1 mm Æ, 5 µm, Hamilton, Reno, USA) composée de poly (styrène-divinylbenzène). Cette colonne analytique est protégée par une colonne de garde (25 x 2.3 mm Æ) de même nature. La phase mobile est constituée d'un tampon phosphate (Na2HPO4, 50 mM), additionné de tétrabutylammonium (TBA, 25 mM) et amené à pH 9.5 avec du NaOH 15%.

Avant d'utiliser ce tampon, on ajoute 4% de tétrahydrofurane (THF). Le débit de la phase mobile est de 0.5 ml/min. La colonne est reliée à un spectrofluorimètre (PERKIN-ELMER, LS-4 ou KONTRON, SFM 25). La longueur d'onde d'excitation est de 365 nm et celle de l'émission est de 433 nm.

Fiche technique n°5 : Dosage de l'ammoniaque par le test de Nessler

- **Principe**

Le réactif de Nessler (iodo mercurate de potassium alcalin) en présence de l'ammoniaque, se décompose et entraîne la formation d'iodure de dimercuriammonium. Ce dernier permet le dosage colorimétrique des ions ammonium (NH_4^+).

- **Méthode**

  - **Traitement des échantillons**

Les prélèvements pour le dosage de l'ammoniaque effectués à partir du milieu MCD liquide, sont filtrés à l'aide d'une seringue équipée à son extrémité d'un filtre en polyethersulfone (PES) d'une porosité de 0,20 µm (whatman). Cette opération permet d'éliminer les particules insolubles susceptibles de gêner l'analyse.

  - **Préparation de la gamme d'étalons**

Après avoir séché le chlorure d'ammonium (NH_4Cl) environ 24 h à 105°C, on le laisse pendant 30 min dans un dessicateur. Une solution mère (SM) à 5g/l de NH_4Cl est préparée dans une fiole jaugée de 200 ml, le volume est complété par de l'eau milliQ.

Dans des fioles jaugées de 50 ml, rincées à l'avance à l'eau milliQ, on prépare une:

Solution à 0.1 g/l	Pipeter 1 ml de SM (ajuster le volume avec de l'eau milliQ)
Solution à 0.2 g/l	Pipeter 2 ml de SM (ajuster le volume avec de l'eau milliQ)
Solution à 0.3 g/l	Pipeter 3 ml de SM (ajuster le volume avec de l'eau milliQ)
Solution à 0.4 g/l	Pipeter 4 ml de SM (ajuster le volume avec de l'eau milliQ)
Solution à 0.5 g/l	Pipeter 5 ml de SM (ajuster le volume avec de l'eau milliQ)
Solution à 0.6 g/l	Pipeter 6 ml de SM (ajuster le volume avec de l'eau milliQ)
Solution à 0.7 g/l	Pipeter 7 ml de SM (ajuster le volume avec de l'eau milliQ)
Solution à 0.8 g/l	Pipeter 8 ml de SM (ajuster le volume avec de l'eau milliQ)
Solution à 0.9 g/l	Pipeter 9 ml de SM (ajuster le volume avec de l'eau milliQ)
Solution à 1 g/l	Pipeter 10 ml de SM (ajuster le volume avec de l'eau milliQ)

Solution à 2 g/l Pipeter 20 ml de SM (ajuster le volume avec de l'eau milliQ)

On prélève 100 µl de chaque solution dans une fiole jaugée de 50 ml, et le volume est complété avec de l'eau milliQ. La procédure de Nessler est appliquée, c-à-d, 10 ml de chaque solution sont prélevés et 1 ml du réactif de Nessler est ajouté dans un nouveau tube. On agite bien et le mélange est incubé pendant 10 minutes dans un bain-marie à 25°C, puis l'absorbance est mesurée à 430 nm. L'eau milliQ sert comme un témoin. Les résultats sont présentés sur une courbe d'étalon, qui exprime la variation de l'absorbance en fonction de la concentration en NH_4^+ (g/l).

- **Dosage de l'ammoniaque dans les échantillons**

Pour mesurer l'azote ammoniacal dans les échantillons, 100 µl de l'échantillon sont prélevés dans une fiole jaugée de 50 ml et le volume est complété avec de l'eau milliQ. La procédure de Nessler est appliquée comme pour la gamme d'étalon. Les résultats d'absorbance obtenus pour les échantillons en fonction du temps, sont comparés à la gamme d'étalon. D'où une concentration en NH_4^+ (g/l) pourrait être associée aux échantillons en fonction du temps. Pour obtenir la concentration réelle de NH_4^+ en mM dans le milieu MCD, on applique la formule suivante :

Concentration de NH_4^+ (mM) = concentration NH_4^+ (g/l) / Masse molaire de NH_4Cl

Fiche technique n°6 : Dosage de l'éthanol par la méthode enzymatique (test ethanol, Boehringer Mannheim)

- **Principe**

En présence de l'alcool déshydrogénase (ADH), l'éthanol est oxydé en acétaldéhyde par le nicotinamide adénine dinucléotide (NAD) (1).

(1) Ethanol + NAD^+ $\overset{ADH}{\rightleftharpoons}$ acétaldéhyde + NADH + H^+

L'acétaldéhyde est oxydé quantitativement en acide acétique en présence de l'aldéhyde désydrogénase (AL-DH) (2).

(2) Acétaldéhyde + NAD^+ $\overset{AL\text{-}DH}{\longrightarrow}$ acide acétique + NADH + H^+

Au cours des réactions (1) et (2), 2 moles de NAD sont réduites pour une mole d'éthanol. La quantité de NADH formée est proportionnelle à la quantité d'éthanol présente dans les échantillons et est déterminée par son absorption à 340 nm.

- **Méthode**

  - **Traitement des échantillons**

Les prélèvements pour le dosage de l'éthanol effectués à partir du milieu MCD liquide, sont filtrés à l'aide d'une seringue équipée à son extrémité d'un filtre en polyethersulfone (PES) d'une porosité de 0.20 µm (Whatman). Cette opération permet d'éliminer les particules insolubles susceptibles de gêner l'analyse.

  - **Compositions des réactifs**

1. Flacon 1 contenant 100 ml d'une solution composée de tampon diphosphate de potassium 0.30 mol/l, pH 9 et stabilisateur.
2. Flacon 2 renfermant 30 comprimés. Chaque comprimé contient : i) 4 mg de NAD ii) 0,8 u. d'aldéhyde désyhdrogénase
3. Flacon 3 contenant environ 1,6 ml de solution d'alcool déshydrogénase 1200 u.

  - **Mode opératoire**

Pour l'essai (c-à-d l'échantillon) et le témoin, dissoudre un comprimé du flacon 2 avec 3 ml du flacon 1, dans un bécher. Utiliser des pinces pour saisir les comprimés. Cette solution constituera le mélange réactionnel 2.

Dans 2 cuves de verre à part : pour le témoin, on introduit 1.5 ml du mélange réactionnel 2 avec 0.05 ml d'acide perchlorique 0.33 mol/l. Pour l'essai on introduit 1.5 ml du mélange réactionnel 2 avec 0.05 ml de surnageant de déprotéinisation. On mélange bien et après 3 min, on lit les absorbances de l'essai et du témoin à 340 nm et on les note A1e (essai) et A1t (témoin).

On déclenche la réaction par addition, dans chacune des 2 cuves, 0.05 ml de la solution 3. On mélange bien et après 10 min, on lit les absorbances et on les note A2e (essai) et A2t (témoin). Il est nécessaire de recouvrir les cuves de parafilm durant le temps de la mesure.

- **Calcul de la concentration d'éthanol dans les échantillons**

On détermine les différences d'absorbance (A2 –A1) du témoin et de l'essai. Après, on déduit la différence d'absorbance du témoin (ΔAt) de celle de l'essai (ΔAe), ce qui donnera ΔA = ΔAe – Δat. La concentration de l'éthanol (g/l) sera donnée par la formule suivante C (g/l) = 340nm x ΔA

Fiche technique n°7 : Test de confrontations des micro-organismes sur milieu agar

- **Principe**

Ce test a pour objectif de visualiser les interactions microbiennes qui peuvent exister entre les différents micro-organismes sur un milieu solide tel que le fromage et le sol. Il permet aussi d'étudier les mécanismes responsables de ces interactions par une approche transcriptomique. Dans notre étude, le but des confrontations est de comprendre l'effet des différentes bactéries sur la morphologie et la croissance de la levure *Yarrowia lipolytica* 1E07. De plus, on a suggéré que la thiamine produite par certaines bactéries et non pas par la levure peut avoir un rôle dans ces interactions levures – bactéries. Dans le but d'étudier le rôle des bactéries et de la thiamine sur la morphologie et la croissance de la levure, un milieu MCD agar supplémenté ou carencé en thiamine a été utilisé.

- **Méthode**

  - **Les précultures**

Les précultures de la levure et des bactéries utilisées dans cette étude (*Yarrowia lipolytica* 1E07, *Brevibacterium aurantiacum* ATCC 9175, *Brevibacterium aurantiacum* 171, *Pseudomonas fluorescens* BB6CR8, *Pseudomonas fluorescens* NZI7, le mutant *Pseudomonas fluorescens* NZI7 (ΔNZI7)), sont effectuées dans le milieu MCD liquide, en présence ou en absence de la thiamine. Les précultures sont incubées à 25°C à 150 rpm pour la levure et pour *P. fluorescens* BB6CR8, NZI7 et ΔNZI7 et à 250 rpm pour *B. aurantiacum* ATCC 9175 et 171, et ceci pendant 48 heures de culture.

  - **Préparation des boîtes de Pétri pour l'inoculation**

Des systèmes à 2 spots ou à 5 spots ont été utilisés pour l'inoculation des micro-organismes. Les spots sont matérialisés par des disques de papier filtre, de diamètre de 6mm (Dominique Dutscher, papier essai antibiotiques). La distance qui sépare les spots est de 1,5 cm. Le système à 2 spots a pour but de visualiser l'effet des bactéries sur la morphologie et la croissance de la levure, et de voir nettement la différence entre le côté de la levure en face de la bactérie et le coté opposé à la bactérie. Le système à 5 spots, consiste à placer la levure au milieu de la boîte entourée par les 4 spots bactériens (la même bactérie à chaque fois). Ce système a comme but d'avoir suffisamment du matériel génétique pour une analyse

transcriptomique ultérieure. La présence de la levure avec la bactérie dans le système à 5 spots (avec certaines bactéries), montre une meilleure croissance de la levure sur tout le contour, au contraire de sa présence avec la même bactérie mais dans un système à 2 spots. Les spots sont inoculés à une concentration de 1×10^7 cfu dans une goutte de 25 µL.

Fiche technique n°8 : Extraction d'ARN totaux dans des cultures liquides

- **Objectif**

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

- **Méthode**

  - **Préparation des réactifs et du matériel**

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

  - **Préparation des échantillons**

Les extractions d'ARN étaient effectuées à 12, 27 et à 30 heures, dans la monoculture de *D. hansenii* 1L25 et dans la co-culture de *D. hansenii* 1L25 et de *Y. lipolytica* 1E07. La quantité de cellules à 12 heures de culture est inférieure de celle à 27 et à 30 heures de culture, d'où une différence dans la masse de culot cellulaire obtenue après centrifugation. Le même protocole est utilisé pour traiter les échantillons, avec des petites modifications au niveau du volume des réactifs utilisés pour extraire l'ARN. Pour un culot de 125 mg, dans des tubes à vis de 2 ml, 800 mg de billes de zirconium (mélange de billes de 100µm et 500 µm, BioSpec Products) et 1,25 ml de Trizol sont ajoutés. Pour un culot de 500 mg, dans des tubes à vis de 7 mL, 3.2 g de billes de zirconium (mélange de billes de 100µm et 500 µm, BioSpec Products) et 5 ml de Trizol sont ajoutés. Les tubes sont vigoureusement agités au broyeur MP-FastPrep-24, 3 fois pendant 60 secondes et 2 fois pendant 20 secondes respectivement pour 125 et 500 mg de culot, à 6,5 m/s puis incubés 5 minutes avant et après traitement. Après refroidissement les tubes sont centrifugés 10 min à 12 000 g à 4°C. Le surnageant limpide est transféré par

pipetage dans des tubes Phase Log Gel de 2 ml ou de 15 mL à température ambiante, selon la masse de culot. Les tubes sont incubés 5 minutes à température ambiante permettant ainsi une meilleure dissociation des complexes nucléoprotéiques. Après incubation, 230 µl ou 1840 µL (selon la masse de culot) de chloroforme sont ajoutés à chaque tube. Ces derniers, une fois fermés, sont agités à la main pendant 15 secondes (sans dissocier le gel) puis incubés 3 minutes à température ambiante puis 2 minutes dans la glace. Les tubes sont alors centrifugés 15 minutes à 12 000 g et à 3°C (la température doit être basse afin d'éviter que l'ADN reste en phase aqueuse). La solution se sépare alors en 3 phases : La phase organique inférieure rose contenant les protéines et contaminants dans le phénol-chloroforme, la barrière de gel et une phase limpide aqueuse supérieure contenant l'ARN. La phase aqueuse est récupérée dans un tube à vis pré-refroidi dans lequel un volume équivalent du phénol/chloroforme/alcool isoamyl à pH 4,7 (125/24/1) est ajouté. Les tubes sont agités manuellement pendant 15 secondes, puis centrifugés pendant 10 minutes à 12 000 g et à 4°C.

La phase aqueuse est récupérée et un volume èquivalent d'éthanol à 100% est ajouté. Les échantillons sont ensuite purifiés sur colonne avec le kit RNeasy®Mini kit.

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

-Déposer l'échantillon (volume maximum 700 µl) sur une colonne RNeasy Mini, placée sur un tube à Eppendorf. Fermer le tube et centrifuger 30 secondes à 3000g à 15°C. L'éluat est ensuite éliminé. Répéter cette étape pour le reste de l'échantillon. La colonne est ensuite lavée avec 500 µl de tampon RW1. Les tubes sont ensuite centrifugés 30 secondes à 3000g et à 15°C. L'éluat est éliminé, puis 500 µl de tampon RPE sont ajoutés. Les échantillons sont centrifugés 30 secondes à 3000g à 15°C. Cette étape est répétée 2 fois. Une fois l'éluat éliminé, les échantillons sont centrifugés à vide 30 secondes à 3000 g à 15 °C afin d'éliminer le reste du tampon. Par la suite, la colonne est transférée dans un tube Eppendorf propre. L'ARN est alors élué en ajoutant 30 µl d'eau RNase-free au centre de la colonne. Dans le but de récupérer le maximum d'ARN, il est indispensable d'attendre au moins 2 min avant de centrifuger l'échantillon. 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.

Fiche technique n°9 : Extraction d'ARN totaux sur des colonies microbiennes sur un milieu agar

- **Principe**

L'extraction d'ARN sur des colonies microbiennes, sur le milieu MCD agar consiste à racler avec un scalpel stérile les colonies microbiennes ou à couper de l'agar avec les colonies dans le cas où c'est impossible de les racler.

- **Préparation des réactifs et du matériel**

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

Le matériel utilisé dans cette expérience est le suivant: des scalpels stériles pour racler les colonies ou pour couper l'agar avec les colonies, des emporte-pièces de diamètres différents pour couper le centre des différentes colonies microbiennes qui est à éliminer, un bec bunsen et de l'éthanol 70% pour nettoyer à chaque utilisation les emporte-pièces et des tubes à vis de 2 et 7 mL contenant des billes de zirconium (800 mg et 3.2 g respectivement, de billes de zirconium de 100µm et 500 µm).

- **Préparation des échantillons**

Le nombre de boîtes à utiliser pour avoir suffisamment du matériel génétique, diffère d'une condition à l'autre selon la croissance du micro-organisme utilisé. Dans notre étude, *Yarrowia lipolytica* 1E07 est cultivée seule sur le milieu MCD en présence ou en absence de la thiamine d'une part, ou cultivée sur le milieu MCD sans thiamine, en présence des bactéries d'affinage du fromage comme *Brevibacterium aurantiacum* ATCC 9175 et 171. La croissance de la levure *Y. lipolytica* 1E07 diffère d'une condition à l'autre. La figure 1 montre la croissance de la levure dans les différentes conditions. Le contour de la colonie est la zone qui est prélevée pour l'extraction de l'ARN. Cette partie est choisie en raison de son changement morphologique en fonction du milieu et des bactéries utilisées en face de la levure.

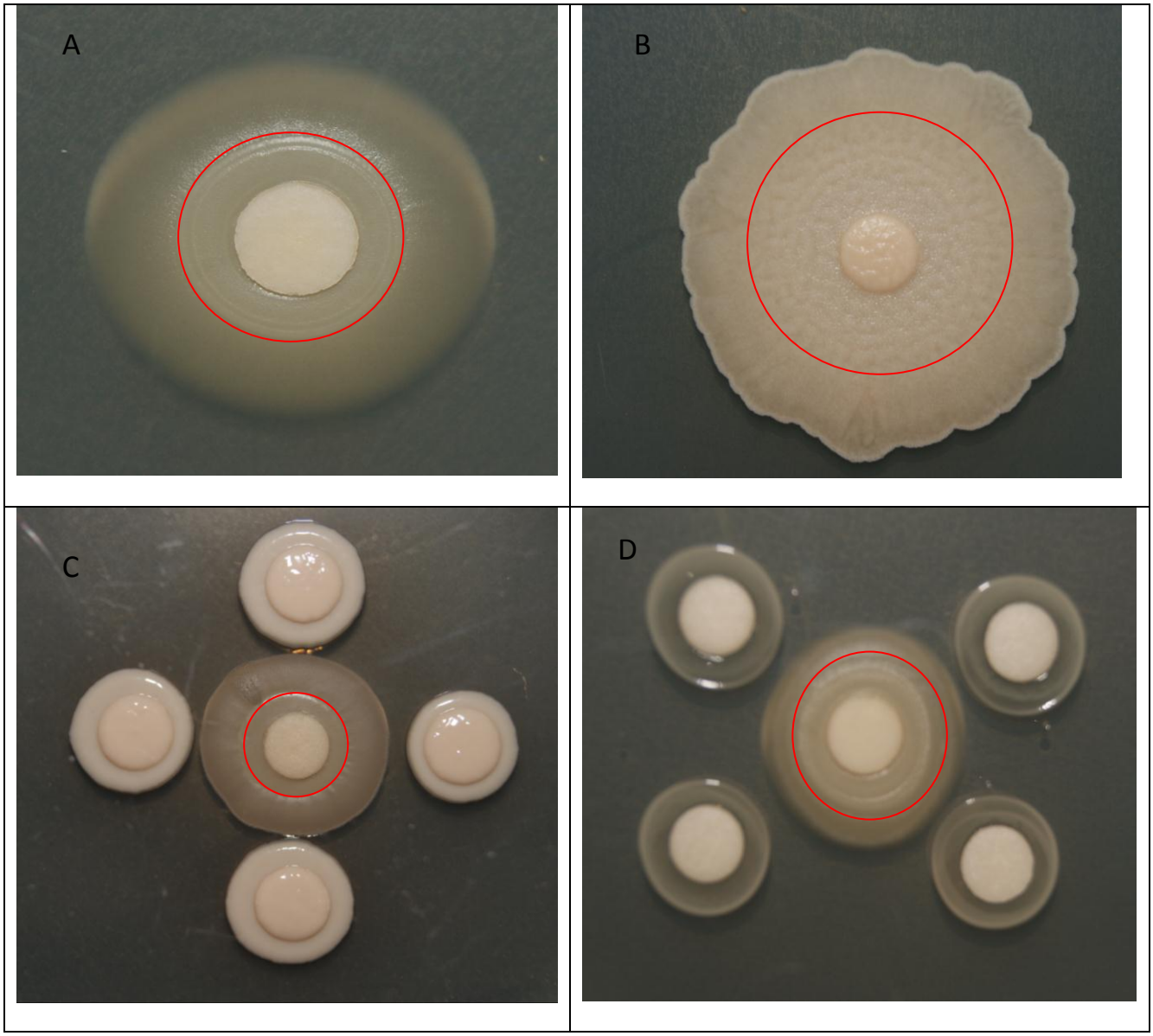


Figure 1 : Croissance de *Y. lipolytica* 1E07 (YL) sur le milieu MCD. A : YL cultivée seule sur le milieu MCD sans thiamine, B : YL cultivée seule sur le milieu MCD avec thiamine, C : YL entourée par la bacterie *B. aurantiacum* 171 sur le milieu MCD sans thiamine, D : YL entourée par la bactérie *B. aurantiacum* 9175 sur le milieu MCD sans thiamine. Ces photos sont prises au jour 8.

Il faut se situer entre 2 x 10^6 et 5 x 10^7 de cellules, pour avoir suffisamment de matériel génétique et pour ne pas dépasser la capacité des colonnes du RNeasy Mini Kit (Qiagen). Dans notre cas, nous avons utilisé 5 x 10^6 cellules pour chacune des 4 conditions. Ce nombre de cellules correspond au nombre de boîtes suivant: condition A: 6 boîtes, condition B: 1 boîte, condition C: 1 boîte et condition D: 5 boîtes.

- **Extraction d'ARN**

Pour les conditions A et D, nous avons eu de difficultés de racler les colonies sans avoir besoin de couper de l'agar. Le Mini kit RNeasy (Qiagen) a été adapté pour extraire l'ARN à partir de ces 2 conditions. Les prélèvements sont ajoutés dans les tubes à vis de 2 ml pré-remplis avec les billes de zirconium, et 600 µl de RLT avec du ß- mercaptoéthanol à 1% sont ajoutés dans chaque tube. Chaque tube est ensuite agité au broyeur MP-FastPrep-24, 3 fois pendant 60 secondes à 6,5 m/s puis incubé 5 minutes entre chaque cycle et à la fin du traitement. Après refroidissement, les tubes sont centrifugés 2 fois de suite, la 1ère fois pendant 10 s, la 2ème fois pendant 2 min et à chaque fois le lysat est transféré dans un nouveau tube Eppendorf de 1,5 ml RNase free. Un volume égal d'éthanol 70 % est ajouté, et les tubes sont mélangés par pipetage. Déposer l'échantillon (volume maximum 700 µl) sur une colonne RNeasy Mini, placée sur un tube à Eppendorf. Fermer le tube et centrifuger 15 secondes à 8000g à 15°C. L'éluat est ensuite éliminé. Répéter cette étape pour le reste de l'échantillon. La colonne est ensuite lavée avec 700 µl de tampon RW1. Les tubes sont ensuite centrifugés 15 secondes à 8000g et à 15°C. L'éluat est éliminé, puis 500 µl de tampon RPE sont ajoutés. Les échantillons sont centrifugés 15 secondes à 8000g à 15°C. Cette étape est répétée 2 fois. Une fois l'éluat éliminé, les échantillons sont centrifugés à vide 1 min à 8000 g et à 15 °C afin d'éliminer le reste du tampon. Par la suite, la colonne est transférée dans un tube Eppendorf propre. L'ARN est alors élué en ajoutant 30 µl d'eau RNase-free au centre de la colonne et en centrifugeant l'échantillon pendant 1 min à 8000 g.

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.

Pour les conditions B et C, il suffit de racler les colonies, sans préléver de l'agar, pour collecter les échantillons. Le protocole d'extraction de l'ARN au Trizol était le mieux adapté à ces 2 conditions. Un culot de 500 mg est ajouté dans les tubes à vis de 7 ml, pré-remplis avec 3.2 g de billes de zirconium (mélange de billes de 100µm et 500 µm, BioSpec Products), et 5 ml de Trizol sont ajoutés. Les tubes sont vigoureusement agités au broyeur MP-FastPrep-24, 2 fois pendant 20 secondes à 6,5 m/s puis incubés 5 minutes avant et après traitement. Après refroidissement les tubes sont centrifugés 10 min à 12 000 g à 4°C. Le surnageant

limpide est transféré par pipetage dans des tubes Phase Log Gel de 15 ml à température ambiante. Les tubes sont incubés 5 minutes à température ambiante permettant ainsi une meilleure dissociation des complexes nucléoprotéiques. Après incubation, 1840 µL de chloroforme sont ajoutés à chaque tube. Ces derniers, une fois fermés, sont agités à la main pendant 15 secondes (sans dissocier le gel) puis incuber 3 minutes à température ambiante puis 2 minutes dans la glace. Les tubes sont alors centrifugés 15 minutes à 12 000 g et à 3°C (la température doit être basse afin d'éviter que l'ADN reste en phase aqueuse). La solution se sépare alors en 3 phases: La phase organique inférieure rose contenant les protéines et contaminants dans le phénol-chloroforme, la barrière de gel et une phase limpide aqueuse supérieure contenant l'ARN. La phase aqueuse est récupérée dans un tube à vis pré-refroidi dans lequel un volume équivalent du phénol/chloroforme/alcool isoamyl à pH 4,7 (125/24/1) est ajouté. Les tubes sont agités manuellement pendant 15 secondes, puis centrifuger pendant 10 minutes à 12 000 g et à 4°C.

La phase aqueuse est récupérée et un volume èquivalent d'éthanol à 100% est ajouté. Les échantillons sont ensuite purifiés sur colonne avec le kit RNeasy®Mini kit (la même démarche que pour les conditions A et D pour la purification avec le Mini Kit RNeasy de Qiagen).

Fiche technique n°10 : Etude transcriptomique par puce à ADN

- **Principe**

La synthèse et le marquage d'ARNc à partir de l'ARN total se fait par l'utilisation du protocole « Two-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis, version 6.5, May 2010 » par Agilent. L'étape de marquage a lieu directement au cours de la synthèse d'ARNc par l'incorporation d'un nucléotide couplé à un fluorochrome. Les fluorochromes utilisés dans notre cas sont la cyanine 3 (Cy3) et la cyanine 5 (Cy5).

- **Méthode**

La synthèse d'ARNc est faite à partir de 200 ng d'ARN totaux. Ils sont ensuite marqués soit avec la cyanine 3 ou la cyanine 5 en suivant le protocole Agilent.

L'incorporation des cyanines et la qualité des ARNc marqués ont été dosées au NanoDrop® ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA) et au Bioanalyser Agilent 2100 (Agilent, Palo Alto, CA, USA). Les ARNc qui présentent une concentration > 6 pmol/µg (la mesure qui présente la bonne incorporation des cyanines) sont seulement utilisés pour l'hybridation sur les puces à ADN. Nous avons comparé des conditions 2 à 2 (A et B) et pour chaque comparaison, 300 ng de A marqué à la Cy3 et 300 ng de B marqué à la Cy5 sont mélangés. Nous avons effectué des dye-switch (4 répétitions biologiques). Les cibles marquées sont ensuite hybridées sur les puces à ADN, par incubation dans un four rotatif Agilent (10rpm, 17h à 65°C) puis lavées selon les recommandations du fabricant (Agilent). Les lames ont ensuite été scannées par un scanner Agilent, en utilisant la fonction XDR (extended dynamic range) avec une précision de 5µm.

Fiche technique n°11 : 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 800 ng d'ARN

- Le mélange pour la reverse transcription est préparé dans un tube Eppendorf de 200 µl comme suit :

800 ng d'ARN	***nµl***
Amorce*	1 µl
*50 µM oligo (dT)20 ou 2 µM de l'amorce spécifique du géne ou 50 ng/ µl d'amorces aléatoire	
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 5 min dans la glace

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

Composants	**Une Réaction**
10X RT buffer	2 µl
25 mM $MgCl_2$	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 doucement et centrifuger. Incuber comme suit :

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

- Les réactions se terminent en mettant 5 min les échantillons à 85 °C
- Centrifuger brièvement les tubes, y ajouter 1 µl de RNase H et les incuber à 37 °C pendant 20 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 :

Composants	**Une Réaction**
H_2O, PCR grade	3,3 µl
$MgCl_2$	1.2 µl
PCR primer mix	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 commander 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 effectuer, en mettant 10 µl de l'enzyme (1a) dans le tube (1b).

- Chaque capillaire contient un volume total de 10 µl : 2.5 µl de l'échantillon à amplifier + 7.5 µl du mix de 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 8 min à 95 °C.

• 45 cycles comportant (i) une étape de dénaturation de 10 sec à 95 °C, (ii) une étape d'hybridation des amorces de 7 sec à 60 °C, (iii) une étape d'élongation de 6 sec à 72 °C et (iv) une acquisition de la fluorescence (530 nm) à la fin de chaque étape d'élongation.

- **Contrôles indispensables requis**

- Un gène calibrateur est utilisé en parallèle ; ce gène dont l'expression n'est pas modifiée dans les différentes conditions biologiques permet d'éviter que des modifications de quantités d'ADN dans l'essai soient analysées comme des différences d'expression.

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

- Il est indispensable de contrôler l'efficacité des amorces choisies; pour cela 5 dilutions successives de l'ADN du micro-organisme d'intérêt allant de 20 ng/µl à 200 pg/µl sont réalisées. Une PCR quantitative est réalisée en utilisant le couple d'amorce choisi (sens + antisens). Pour une efficacité de PCR à 100 %, la pente de la droite Ct en fonction du log de la concentration en ADN matrice doit être égale à -3.33. Lorsque toutes ces manipulations préliminaires sont réalisées, on analyse les échantillons d'intérêt.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

Abu-Tarboush, H. M. 1996. Comparison of Associative Growth and Proteolytic Activity of Yogurt Starters in Whole Milk from Camels and Cows. Journal of Dairy Science. 79:366-371.

Adams, M. R. 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.

Adan Topiltzin, M.-V., Dominguez, A. et Ruiz-Herrera, J. 2012. Identification of dimorphism-involved genes of *Yarrowia lipolytica* by means of microarray analysis. Research in Microbiology.

Addis, E., G. H. Fleet, J. M. Cox, D. Kolak et T. Leung. 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 35oC in tryptose broth acidified with acetic, citric, or lactic acid. *Journal of food protection* **52**: 688-695.

Amoroso, M. J., M. C. Manca de Nadra et G. Olivier. 1989. The growth and sugar utilization by *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* and *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* isolated from market yoghurt. Lait 69:519-528.

Ascon-Reyes, D. B., M. A. Ascon-Cabrera, N. Cochet, and J. M. Lebeault. 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.

Bamford, C. V., A. d'Mello, A. H. Nobbs, L. C. Dutton, M. M. Vickerman, and H. F. Jenkinson. 2009. *Streptococcus gordonii* Modulates Candida albicans Biofilm Formation through Intergeneric Communication. Infection and Immunity 77:3696-3704.

Barnett, J. A., R. W. Payne, and D. Yarrow. 2000. Yeasts: Characteristics and Identification. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.

Baroiller, C., and J. L. Schmidt. 1990. Contribution à l'étude de l'origine des levures du fromage de camembert. Le lait 70:67-84.

Barth, G., and C. Gaillardin. 1997. Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. FEMS Microbiol Rev 19:219-37.

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.

Bernalier, A., G. Fonty, F. Bonnemoy, and P. Gouet. 1992. Degradation and fermentation of cellulose by the rumen anaerobic fungi in axenic cultures or in association with cellulolytic bacteria. Current Microbiology 25:143-148.

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

Bianciotto, V., S. Andreotti, R. Balestrini, P. Bonfante, and S. Perotto. 2009. Extracellular polysaccharides are involved in the attachment of *Azospirillum brasilense* and *Rhizobium leguminosarum* to arbuscular mycorrhizal structures. European Journal of Histochemistry 45:39-49.

Biswas, S., Van Dijck, P., and Datta, A. 2007. Environmental Sensing and Signal Transduction Pathways Regulating Morphopathogenic Determinants of *Candida albicans*. Microbiology and Molecular Biology Reviews 71: 348-376.

Blanchin-Roland, S., G. g. D. Costa, and C. Gaillardin. 2005. ESCRT-I components of the endocytic machinery are required for Rim101-dependent ambient pH regulation in the yeast *Yarrowia lipolytica*. Microbiology 151:3627-3637.

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

Bonnarme, Pascal, Lapadatescu, Carmen, Yvon, Mireille, Spinnler, and E. Henry. 2001. L-methionine degradation potentialities of cheese-ripening microorganisms, vol. 68. Cambridge University Press, Cambridge, ROYAUME-UNI.

Boucabeille, C., D. Mengin-Lecreulx, G. Henckes, J.-M. Simonet, and J. van Heijenoort. 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., D. Le Bars, M. Yvon, and M. P. Chapot-Chartier. 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.

Brennan, N. M., R. Brown, M. Goodfellow, A. C. Ward, T. P. Beresford, P. J. Simpson, P. F. Fox, and T. M. Cogan. 2001a. *Corynebacterium mooreparkense* sp. nov. and *Corynebacterium casei* sp. nov., isolated from the surface of a smear-ripened cheese. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 51:843-52.

Brennan, N. M., R. Brown, M. Goodfellow, A. C. Ward, T. P. Beresford, M. Vancanneyt, T. M. Cogan, and P. F. Fox. 2001b. *Microbacterium gubbeenense* sp. nov., from the surface of a smear-ripened cheese. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 51:1969-76.

Brennan, N. M., A. C. Ward, T. P. Beresford, P. F. Fox, M. Goodfellow, and T. M. Cogan. 2002. Biodiversity of the Bacterial Flora on the Surface of a Smear Cheese. Applied and Environmental Microbiology 68:820-830.

Brown, J. S. and Holden, D. W. 2002. Iron acquisition by Gram-positive bacterial pathogens. *Microbes and Infection* **4**: 1149-1156.
Brown, A.J.P., and Gow, N.A.R. 1999. Regulatory networks controlling *Candida albicans* morphogenesis. Trends in Microbiology *7*, 333-338.

Cantéri, G. 1997. Les levains lactiques. Lavoisier, Technique et Documentation, Paris.
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.

Casaregola, S., C. Neuveglise, A. Lepingle, E. Bon, C. Feynerol, F. Artiguenave, P. Wincker, and C. Gaillardin. 2000. Genomic Exploration of the Hemiascomycetous Yeasts: 17. *Yarrowia lipolytica*. FEBS Letters 487:95-100.

Cervantes-Chávez, J.A., and Ruiz-Herrera, J. 2006. STE11 disruption reveals the central role of a MAPK pathway in dimorphism and mating in *Yarrowia lipolytica*. FEMS Yeast Research 6: 801-815.

Cervantes-Chavez, J.A., Kronberg, F., Passeron, S., and Ruiz-Herrera, J. 2009. Regulatory role of the PKA pathway in dimorphism and mating in *Yarrowia lipolytica*. Fungal Genetics and Biology 46: 390-399.

Chen, H., and G. Fink. 2006. Feedback control of morphogenesis in fungi by aromatic alcohols. Genes & development 20:1150-1161.

Chen, H., M. Fujita, Q. Feng, and G. Fink. 2004. Tyrosol is a quorum-sensing molecule in Candida albicans. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 101:5048-5052.

Choisy, C., M. Desmazeaud, M. Gueguen, J. Lenoir, J.-L. Schmidt, and C. Tourneur. 1997b. Les phénomènes microbiens, Le fromage. Lavoisier Tec & Doc ed, Paris.

Cholet, O., A. Hénaut, S. Casaregola, and P. Bonnarme. 2007. Gene Expression and Biochemical Analysis of Cheese-Ripening Yeasts: Focus on Catabolism of L-Methionine, Lactate and Lactose. Applied and Environmental Microbiology 73:2561-2570.

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

Court, H., and Sudbery, P. 2007. Regulation of Cdc42 GTPase Activity in the Formation of Hyphae in *Candida albicans*. Molecular Biology of the Cell *18*, 265-281.

Cowan, Stacie, E., Gilbert, Eric, Liepmann, Dorian, Keasling, and J, D. 2000. Commensal interactions in a dual-species biofilm exposed to mixed organic compounds, Vol 66 (Washington, DC, ETATS-UNIS, American Society for Microbiology).

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

Dahl, S., F. K. Tavaria, and F. Xavier Malcata. 2000. Relationships between flavour and microbiological profiles in Serra da Estrela cheese throughout ripening. International Dairy Journal 10:255-262.

de Sordi, L. and F. A. Mühlschlegel. 2009. Quorum sensing and fungal-bacterial interactions in *Candida albicans*: acommunicative network regulating microbial coexistence and virulence. FEMS Yeast Research 9: 990-999.

de Weert, S., I. Kuiper, E. L. Lagendijk, G. E. Lamers, and B. J. Lugtenberg. 2004. Role of chemotaxis toward fusaric acid in colonization of hyphae of *Fusarium oxysporum* f. sp. radicis-lycopersici by *Pseudomonas fluorescens* WCS365. Molecular Plant-Microbe Interactions 17:1185-1191.

Deetae, P., P. Bonnarme, H. E. Spinnler, and S. Helinck. 2007. Production of volatile aroma compounds by bacterial strains isolated from different surface-ripened French cheeses. Applied Microbiology and Biotechnology 76:1161-1171.

Deetae, P., H. E. Spinnler, P. Bonnarme, and S. Helinck. 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.

Deveau, A., B. Palin, C. Delaruelle, M. Peter, A. Kohler, J. C. Pierret, A. Sarniguet, J. Garbaye, F. Martin, P. Frey-Klett. 2007. The mycorrhizal helper *Pseudomonas fluorescens* BBc6R8 has a specific priming effect on the growth, morphology and gene expression of the ectomycorrhizal, fungus *Laccaria bicolor* S238N. New Phytologist 175: 743-755.

Deveau, A., C. Brulé, B. Palin, D. Champmartin, P. Rubini, J. Garbaye, A. Sarniguet, and P. Frey-Klett. 2010. Role of fungal trehalose and bacterial thiamine in the improved survival and growth of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* S238N and the helper bacterium *Pseudomonas fluorescens* BBc6R8. Environmental Microbiology Reports 2:560-568.

Dingding, A.N., Danhorn, Thomas, Fuqua, Clay, Parsek, and Matthew, R. 2006. Quorum sensing and motility mediate interactions between *Pseudomonas Aeruginosa* and *Agrobacterium tumefaciens* in biofilm cocultures, Vol 103 (Washington, DC, ETATS-UNIS, National Academy of Sciences).

Dufossé, L., P. Mabon, and A. Binet. 2001. Assessment of the Coloring Strength of *Brevibacterium linens* Strains: Spectrocolorimetry Versus Total Carotenoid Extraction/Quantification. Journal of Dairy Science 84:354-360.

Dujon, B., D. Sherman, G. Fischer, P. Durrens, S. Casaregola, I. Lafontaine, J. de Montigny, C. Marck, C. Neuveglise, E. Talla, N. Goffard, L. Frangeul, M. Aigle, V. Anthouard, A. Babour, V. Barbe, S. Barnay, S. Blanchin, J.-M. Beckerich, E. Beyne, C. Bleykasten, A. Boisrame, J. Boyer, L. Cattolico, F. Confanioleri, A. de Daruvar, L. Despons, E. Fabre, C. Fairhead, H. Ferry-Dumazet, A. Groppi, F. Hantraye, C. Hennequin, N. Jauniaux, P. Joyet, R. Kachouri, A. Kerrest, R. Koszul, M. Lemaire, I. Lesur, L. Ma, H. Muller, J.-M. Nicaud, M. Nikolski, S. Oztas, O. Ozier-Kalogeropoulos, S. Pellenz, S. Potier, G.-F. Richard, M.-L. Straub, A. Suleau, D. Swennen, F. Tekaia, M. Wesolowski-Louvel, E. Westhof, B. Wirth, M. Zeniou-Meyer, I. Zivanovic, M. Bolotin-Fukuhara, A. Thierry, C. Bouchier, B. Caudron, C. Scarpelli, C. Gaillardin, J. Weissenbach, P. Wincker, and J.-L. Souciet. 2004. Genome evolution in yeasts. Nature 430:35-44.

Duponnois, R., and J. Garbaye. 1990. Some mechanisms involved in growth stimulation of ectomycorrhizal fungi by bacteria. Canadian Journal of Botany 68:2148-2152.

Eisenhaber, B., G. Schneider, M. Wildpaner and F. Eisenhaber. 2004. A sensitive predictor for potential GPI lipid modification sites in fungal protein sequences and its application to genome-wide studies for *Aspergillus nidulans*, *Candida albicans*, *Neurospora crassa*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. Journal of Molecular Biology 337:243-253

Elad, Y., and R. Baker. 1985. The role of competition for iron and carbon in suppression of Chlamydospore germination of *Fusarium* spp. by *Pseudomonas* spp. . Phytopathology 75:1053-1059.

Eliskases-Lechner, F., and W. Ginzinger. 1995. The Yeast Flora of Surface-Ripened Cheeses. Milchwissenschaft-Milk Science International 50:458-462.

Eppert, I., N. Valdes-Stauber, H. Gotz, M. Busse, and S. Scherer. 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.

Famelart, M.-H., A. Kobilinsky, C. Bouillanne, and M. J. Desmazeaud. 1987. Influence of temperature, pH and dissolved oxygen on growth of *Brevibacterium linens*; in a fermentor. Applied Microbiology and Biotechnology 25:442-448.

Feng, Q., Summers, E., Guo, B., and Fink, G. 1999. Ras Signaling Is Required for Serum-Induced Hyphal Differentiation in *Candida albicans*. Journal of Bacteriology *181*, 6339-6346.

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

Fickers, P., Benetti, P.H., Waché, Y., Marty, A., Mauersberger, S., Smit, M.S., and Nicaud, J.M. 2005. Hydrophobic substrate utilisation by the yeast *Yarrowia lipolytica*, and its potential applications. FEMS Yeast Research *5*, 527-543.

Fickers, P., M. T. Le Dall, C. Gaillardin, P. Thonart, and J. M. Nicaud. 2003. New disruption cassettes for rapid gene disruption and marker rescue in the yeast *Yarrowia lipolytica*. J Microbiol Methods 55:727-37.

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

Fleet, G. H. 1990. Yeasts in dairy products. Journal of Applied Microbiology 68:199-211.

Fournier, P., L. Guyaneux, M. Chasles, and C. Gaillardin. 1991. Scarcity of *ars* sequences isolated in a morphogenesis mutant of the yeast *Yarrowia lipolytica*. Yeast 7:25-36.

Frases, S., S. Chaskes, E. Dadachova, and A. Casadevall. 2006. Induction by *Klebsiella aerogenes* of a Melanin-Like Pigment in *Cryptococcus neoformans*. Applied and Environmental Microbiology 72:1542-1550.

Frases, S., A. Salazar, E. Dadachova, and A. Casadevall. 2007. *Cryptococcus neoformans* Can Utilize the Bacterial Melanin Precursor Homogentisic Acid for Fungal Melanogenesis. Applied and Environmental Microbiology 73:615-621.

Frey-Klett, P., P. Burlinson, A. Deveau, M. Barret, M. Tarkka, and A. Sarniguet. 2011. Bacterial-Fungal Interactions: Hyphens between Agricultural, Clinical, Environmental, and Food Microbiologists. Microbiology and Molecular Biology Reviews 75:583-609.

Frey, P., P. Frey-Klett, J. Garbaye, O. Berge, and T. Heulin. 1997. Metabolic and genotypic Fingerprinting of fluorescent *Pseudomonads* associated with the Douglas Fir-*Laccaria biocolor* mycorrhizosphere. Applied and Environmental Microbiology 63:1852-1860.

Gaddy, J. A., A. P. Tomaras, and L. A. Actis. 2009. The *Acinetobacter baumannii* 19606 OmpA Protein Plays a Role in Biofilm Formation on Abiotic Surfaces and in the Interaction of This Pathogen with Eukaryotic Cells. Infection and Immunity 77:3150-3160.

Gaillardin, C., and A. M. Ribet. 1987. LEU2 directed expression of beta-galactosidase activity and phleomycin resistance in *Yarrowia lipolytica*. Current Genetics 11:369-375.

Gaillardin, C., A. M. Ribet, and H. Heslot. 1985. Integrative transformation of the yeast *Yarrowia lipolytica* Current Genetics:49-58.

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

Gavrish, E. Y., 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. Microbiology 73:176-183.

Gimeno, C., J., Ljungdahl, P., O., Styles, C., A., and Fink, G., R. 1991. Unipolar cell divisions in the yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth : regulation by starvation and RAS, Vol 68 (Cambridge, MA, ETATS-UNIS, Cell Press).

Goerges, S., J. Mounier, M. C. Rea, R. Gelsomino, V. Heise, R. Beduhn, T. M. Cogan, M. Vancanneyt, and S. Scherer. 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. Appl. Environ. Microbiol. 74:2210-2217.

Goerges, S., U. Aigner, B. Silakowski and S. Scherer. 2008. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by food-borne yeasts. Applied and Environmental Microbiology 72: 313-318.

Gori, K., H. D. Mortensen, N. Arneborg, and L. Jespersen. 2007. Ammonia production and its possible role as a mediator of communication for *Debaryomyces hansenii* and other cheese-relevant yeast species. Journal of Dairy Science 90:5032-5041.

Grecz, N., R. O. Wagenaar, G. M. Dack. 1959. Inhibition of *Clostridium botulinum* by culture filtrates of *Brevivacterium linens*. Journal of Bacteriology 78: 506-510.

Guéguen, M. 1995. Les levures, agents indispensables en industries agro-alimentaires Bulletin de la Société Française de Microbiologie 10:273-278.

Guéguen, M., and J. L. Schmidt. 1992. Les levures et *Geotricum candidum*, Paris.

Harriott, M. M., and M. C. Noverr. 2010. Ability of *Candida albicans* Mutants To Induce *Staphylococcus aureus* Vancomycin Resistance during Polymicrobial Biofilm Formation. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 54:3746-3755.

Harriott, M. M., and M. C. Noverr. 2009. *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* Form Polymicrobial Biofilms: Effects on Antimicrobial Resistance. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 53:3914-3922.

Herve-Jimenez, L., Guillouard, I., Guedon, E., Gautier, C., Boudebbouze, S., Hols, P., Monnet, V., Rul, F. and 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., Boudebbouze, S., Hols, P., Monnet, V., Maguin, E. and 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., Å. Vik, and R. Kolter. 2004. A *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule influences *Candida albicans* morphology. Molecular Microbiology 54:1212-1223.

Hogan, D. A., M. J. Wargo, and N. Beck. 2007. Bacterial biofilms on fungal surfaces. Horizon Scientific Press.

Holzapfel, W. H., Geisen, R. and 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., B. Jaeger, W. Bockelmann, W. H. Noordman, A. Geis, and K. J. Heller. 2004. Molecular Identification and Differentiation of *Staphylococcus* Species and Strains of Cheese Origin. Systematic and Applied Microbiology 27:211-218.

Hornby, J., E. Jensen, A. Lisec, and K. Nickerson. 2001. Quorum Sensing in the Dimorphic Fungus *Candida albicans* Is Mediated by Farnesol. Applied and Environmental Microbiology 67:2982-2992.

Hurtado, C.A.R., Beckerich, J.-M., Gaillardin, C., and Rachubinski, R.A. 2000. A Rac Homolog Is Required for Induction of Hyphal Growth in the Dimorphic Yeast Y*arrowia lipolytica*. Journal of Bacteriology *182*, 2376-2386.

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

Irlinger, F., F. Bimet, J. Delettre, M. Lefevre, and P. A. D. Grimont. 2005. *Arthrobacter bergerei* sp. nov. and *Arthrobacter arilaitensis* sp. nov., novel coryneform species isolated

from the surfaces of cheeses. International Journal of Systeme Evolution and Microbiology 55:457-462.

Irlinger, F., A. Morvan, N. EL Solh, and J. L. Bergere. 1997. Taxonomic characterization of coagulase-negative staphylococci in ripening flora from traditional French cheeses. Systematic and Applied Microbiology 20:319-328.

Irlinger, F., and J. Mounier. 2009. Microbial interactions in cheese: implications for cheese quality and safety. Current Opinion in Biotechnology 20:142-148.

Jacobsen, T., and O. M. Poulsen. 1995. Comparison of lipases from different strains of the fungus *Geotrichum candidum*.Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism 1257:96-102.

Jones, D., J. Watkins, and S. K. Erickson. 1973. Taxonomically Significant Colour Changes in *Brevibacterium linens* Probably Associated with a Carotenoid-like Pigment. Journal of General Microbiology 77:145-150.

Juillard, V., Le Bars, D., Kunji, E. R., Konings, W. N., Gripon, J. C. and 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. and Richard, J. 1996. Utilization of nitrogen sources during growth of *Lactococcus lactis* in milk. *Le Lait* **76**, 13-24.

Kato, F., Y. Eguchi, M. Nakano, T. Oshima, and A. Murata. 1991. Purification and characterization of linecin A, a bacteriocin of *Brevibacterium linens*. Agriculture and Biological Chemistry 55:161-166.

Kim, J., Cheon, S.A., Park, S., Song, Y., and Kim, J.Y. 2000. Serum-induced hypha formation in the dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica*. Anglais *190*, 9-12.

Kohlwein, S. D., and F. Paltauf. 1984. Uptake of fatty acids by the yeasts, *Saccharomyces uvarum* and *Saccharomyces lipolytica*. Biochimica and Biophysica Acta 792:310-317.
Kreger van Rij, N. 1984. The yeasts, a taxonomic study

Lanciotti, R., L. Vannini, C. C. Lopez, M. Gobbetti, and M. E. Guerzoni. 2005. Evaluation of the ability of *Yarrowia lipolytica* to impart strain-dependent characteristics to cheese when used as a ripening adjunct. International Journal of Dairy Technology 58:89-99.

Le Dall, M. T., J. M. Nicaud, and C. Gaillardin. 1994. Multiple-copy integration in the yeast *Yarrowia lipolytica*. 1:38-44.

Le Graët, Y., G. Brûlé, J. L. Maubois, and G. Oeuvrard. 1986. Répartition et évolution des éléments minéraux au cours de l'affinage des fromages à pâte cuite type Beaufort. Le Lait 66:391-404.

Leclercq-Perlat, M.-N., A. Oumer, J.-L. Bergere, H.-E. Spinnler, and G. Corrieu. 1999. Growth of *Debryomyces hansenii* on a bacterial surface-ripened soft cheese. Journal of Dairy Research 66:271-281.

Leclercq-Perlat, M. N., F. Buono, D. Lambert, H. E. Spinnler, and G. Corrieu. 2004. Controlled production of Camembert-type cheeses: Part I. Microbiological and physicochemical evolutions. Journal of Dairy Research 71:346-354.

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

Lengeler, K.B., Davidson, R.C., D'Souza, C., Harashima, T., Shen, W.-C., Wang, P., Pan, X., Waugh, M., and Heitman, J. 2000. Signal Transduction Cascades Regulating Fungal Development and Virulence. Microbiology and Molecular Biology Reviews *64*, 746-785.

Lenoir, J., G. Lambert, J. L. Schmidt, and C. Tourneur. 1985. La maîtrise du bioréacteur fromage. Biofutur 41:23-50.

Lorenz, M.C., and Heitman, J. 1997. Yeast pseudohyphal growth is regulated by GPA2, a G protein [alpha] homolog. EMBO J 16, 7008-7018.

Maisnier-Patin, S., and J. Richard. 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.

Mansour, S., J. Bailly, S. Landaud, C. Monnet, A. S. Sarthou, M. Cocaign-Bousquet, S. Leroy, F. Irlinger, and P. Bonnarme. 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.

Mansour, S., J. M. Beckerich, and P. Bonnarme. 2008. Lactate and amino acid catabolism in the cheese-ripening yeast *Yarrowia lipolytica*. Applied and Environmental Microbiology 74:6505-12.

Marcellino, N., and D. R. Benson. 1992. Scanning Electron and Light Microscopic Study of Microbial Succession on Bethlehem St. Nectaire Cheese. Appl. Environ. Microbiol. 58:3448-3454.

Marck, C., Kachouri-Lafond, R., Lafontaine, I., Westhof, E., Dujon, B., and Grosjean, H. 2006. The RNA polymerase III-dependent family of genes in hemiascomycetes: comparative RNomics, decoding strategies, transcription and evolutionary implications. Nucleic Acids Research *34*, 1816-1835.

Martínez-Espinoza, A.D., Ruiz-Herrera, J., León-Ramírez, C.G., and Gold, S.E. 2004. MAP Kinase and cAMP Signaling Pathways Modulate the pH-Induced Yeast-to-Mycelium Dimorphic Transition in the Corn Smut Fungus *Ustilago maydis*. Current Microbiology *49*, 274-281.

Meyer, V. M. Arentshorst, S. J. Flitter, B. M. Nitsche, M. J. Kwon, C. G. Reynaga-Peña, S. Bartnicki-Garcia, C. A. M. J. J. Van den Hondel and A. F. J. Ram. 2009. Reconstruction of signaling networks regulating fungal morphogenesis by transcriptomics. Eukaryotic Cell 8:1677

Monds, R. D., and G. A. O'Toole. 2009. The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review. Trends in Microbiology 17:73-87

Monnet, C., V. Loux, J. F. Gibrat, E. Spinnler, V. Barbe, B. Vacherie, F. Gavory, E. Gourbeyre, P. Siguier, M. Chandler, R. Elleuch, F. Irlinger and T. Vallaeys. 2010. The *Arthrobacter arilaitensis* Re117 Genome Sequence Reveals Its Genetic Adaptation to the Surface of cheese. PlosS One 5: e15489.

Moreau, A., M. Filion, T.-M. X. M., H. Pingaud, and P. Strehaiano. 1998. Study of lactic acid and amino acid catabolism of *Brevibacterium linens*. Microbiologie, Aliments, Nutrition 16:251-258.

Morín, M., Monteoliva, L., Insenser, M., Gil, C., and Domínguez, Á. 2007. Proteomic analysis reveals metabolic changes during yeast to hypha transition in *Yarrowia lipolytica*. Journal of Mass Spectrometry *42* : 1453-1462.

Motta, A. S., and A. Brandelli. 2002. Characterization of an antibacterial peptide produced by *Brevibacterium linens*. Journal of Applied Microbiology 92:63-70.

Mounier, J., R. Gelsomino, S. Goerges, M. Vancanneyt, K. Vandemeulebroecke, B. Hoste, S. Scherer, J. Swings, G. F. Fitzgerald, and T. M. Cogan. 2005. Surface Microflora of Four Smear-Ripened Cheeses. Appl. Environ. Microbiol. 71:6489-6500.

Mounier, J., S. Goerges, R. Gelsomino, M. Vancanneyt, K. Vandemeulebroecke, B. Hoste, N. M. Brennan, S. Scherer, J. Swings, G. F. Fitzgerald, and T. M. Cogan. 2006. Sources of the adventitious microflora of a smear-ripened cheese. J. Appl. Microbiol. 101:668-681.

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.

Mounier, J., C. Monnet, T. Vallaeys, R. Arditi, A.-S. Sarthou, A. Helias, and F. Irlinger. 2008. Microbial Interactions within a Cheese Microbial Community. Applied And Environmental Microbiology 74:172-181.

Mounier, J., M. C. Rea, P. M. O'Connor, G. F. Fitzgerald, and T. M. Cogan. 2007. Growth Characteristics of *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Microbacterium*, and *Staphylococcus* spp. Isolated from Surface-Ripened Cheese. Applied Environmental Microbiology 73:7732-7739.

Mustroph, A., S. C. Lee, T. Oosumi, M. E. Zanetti, H. Yang, K. Ma, A. Yaghoubi-Masihi, T. Fukao, and J. Bailey-Serres. 2010. Cross-kingdom comparison of transcriptomic adjustments to low-oxygen stress highlights conserved and plant-specific responses. plant physiology **152:**1484-1500.

Nealson, K. H., and J. W. Hastings. 1979. Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. Microbiological Reviews 43:496-518.

Nickerson, K. W., A. L. Atkin, and J. M. Hornby. 2006. Quorum Sensing in Dimorphic Fungi: Farnesol and Beyond. Applied and Environmental Microbiology 72:3805-3813.

Noordman, W. H., Reissbrodt, R., Bongers, R. S., Rademaker, J. L. W., Bockelmann, W. and 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., Cocaign-Bousquet, M. and 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. and Marshall, D. L. 1993. Antimicrobial activity of ethanol, glycerol monolaurate or lactic acid against *Listeria monocytogenes*. International Journal of Food Microbiology 20: 239-246.

Olson, N. F. 1990. The impact of lactic acid bacteria on cheese flavor. FEMS Microbiology Letters 87:131-147.

Olsson, P. A., and H. Wallander. 1998. Interactions between ectomycorrhizal fungi and the bacterial community in soils amended with various primary minerals. FEMS Microbiology Ecology 27:195-205.

Palková, Z., and J. Forstová. 2000. Yeast colonies synchronise their growth and development. Journal of Cell Science 113:1923-1928.

Palková, Z., and L. Váchová. 2006. Life within a community : benefit to yeast long-term survival. FEMS Microbiology Reviews 30:806-824.

Palková, Z., L. Váchová, and W. J. Kwang. 2003. Ammonia signaling in yeast colony formation, p. 229-272, International Review of Cytology, vol. Volume 225. Academic Press.

Palleroni, N. J. 1984. *Pseudomonadaceae*. Baltimore: The Williams and Wilkins Co.

Palmer, Robert, J., Kazmerzak, Karen, Hansen, Martin, C., Kolenbrander, and Paul, E. 2001. Mutualism versus independence : Strategies of mixed-species oral biofilms in vitro using saliva as the sole nutrient source, Vol 69 (Washington, DC, ETATS-UNIS, American Society for Microbiology).

Papanikolaou, S., and G. Aggelis. 2003. Modeling lipid accumulation and degradation in *Yarrowia lipolytica* cultivated on industrial fats. Current Microbiology 46:398-402.

Pérez-Campo, F.M., and Domínguez, A. 2001. Factors Affecting the Morphogenetic Switch in *Yarrowia lipolytica*. Current Microbiology *43*, 429-433.

Rainey, P. B. 1991. Phenotypic variation of Pseudomonas putida and P. tolaasii affects attachment to Agaricus bisporus mycelium. Journal of General Microbiology 137:2769-2779.

Rattray, F. P., and P. F. Fox. 1999. Aspects of Enzymology and Biochemical Properties of Brevibacterium linens Relevant to Cheese Ripening: A Review. Journal of Dairy Science 82:891-909.

Rea, M. C., S. Gorges, R. Gelsomino, N. M. Brennan, J. Mounier, M. Vancanneyt, S. Scherer, J. Swings, and T. M. Cogan. 2007. Stability of the biodiversity of the surface consortia of Gubbeen, a red-smear cheese. Journal of Dairy science 90:2200-2210.

Rikhvanov, E. G., N. N. Varakina, D. Y. Sozinov, and V. K. Voinikov. 1999. Association of Bacteria and Yeasts in Hot Springs. Applied and Environmental Microbiology 65:4292-4293.

Rodriguez, C., and Dominguez, A. 1984. The growth characteristics of *Saccharomycopsis lipolytica*: morphology and induction of mycelium formation. Canadian Journal of Microbiology 30, 605-612.

Romano, J. D., and R. Kolter. 2005. *Pseudomonas-Saccharomyces* Interactions: Influence of Fungal Metabolism on Bacterial Physiology and Survival. Journal of Bacteriology 187:940-948.

Roostita, R. and Fleet, G. H. 1996. Growth of yeasts in milk and associated changes to milk composition. International Journal of Food Microbiology 31, 205-219.

Roostita, R., and G. H. Fleet. 1996a. The occurrence and growth of yeasts in Camembert and Blue-veined cheeses. International Journal of Food Microbiology 28:393-404.

Ruiz-Herrera, J., Leon, C.G., Guevara-Olvera, L., and Carabez-Trejo, A. 1995. Yeast-mycelial dimorphism of haploid and diploid strains of *Ustilago maydis*. Microbiology *141*, 695-703.

Ruiz-Herrera, J., and R. Sentandreu. 2002. Different effectors of dimorphism in *Yarrowia lipolytica*. Archives of Microbiology 178: 477-483.

Sabie, F.T., and Gadd, G.M. 1992. Effect of nucleosides and nucleotides and the relationship between cellular adenosine 3′:5′-cyclic monophosphate (cyclic AMP) and germ tube formation in *Candida albicans*. Mycopathologia 119: 147-156.

Sheetal, R., D. De Vizio, M. Odell, M. Clements, S. Vanhulle, and T. Keshavarz. 2009. Microbial quorum sensing: a tool or a target for antimicrobial therapy. Biotechnology and Applied Biochemistry 54:65-84.

Sieuwerts, S., F. A. M. De Bok, J. Hugenholtz, and J. E. T. V. H. Vlieg. 2008. Unraveling microbial interactions in food fermentations: from classical to genomics approaches. Applied and Environmental Microbiology 74:4997-5007.

Silby, M., A. Cerdeno-Tarraga, G. Vernikos, S. Giddens, R. Jackson, G. M. Preston, X.-X. Zhang, C. Moon, S. Gehrig, S. Godfrey, C. Knight, J. Malone, Z. Robinson, A. Spiers, S. Harris, G. Challis, A. Yaxley, D. Harris, K. Seeger, L. Murphy, S. Rutter, R. Squares, M. Quail, E. Saunders, K. Mavromatis, T. Brettin, S. Bentley, J. Hothersall, E. Stephens, C. Thomas, J. Parkhill, S. Levy, P. Rainey, and N. Thomson. 2009. Genomic and genetic analyses of diversity and plant interactions of *Pseudomonas fluorescens*. Genome Biology 10:R51.

Silverman, R. J., A. H. Nobbs, M. M. Vickerman, M. E. Barbour, and H. F. Jenkinson. 2010. Interaction of *Candida albicans* Cell Wall Als3 Protein with *Streptococcus gordonii*

SspB Adhesin Promotes Development of Mixed-Species Communities. Infection and Immunity 78:4644-4652.

Sivan, A., and I. Chet. 1989. The possible role of competition between *Trichoderma harzianum* and *Fusarium oxysporum* on rhizosphere colonization. Phytopathology 79:198-203.

Soulignac, L. 1995. Propriétés des levures fromagères: influence des sources de carbone utilisées sur leur aptitudes à désacidifier les caillés et à former des composés d'arôme, Paris.

Spinnler, H. E., and G. Corrieu. 1989. Automatic method to quantify starter activity based on pH measurement. Journal of Dairy Research 56:755-764.

Sprague, G. F., and S. C. Winans. 2006. Eukaryotes learn how to count: quorum sensing by yeast. Genes & Development 20:1045-1049.

Stackebrandt, E., F. A. Rainey, and N. L. WardRainey. 1997. Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. International Journal of Systematic Bacteriology 47:479-491.

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

Toda, T., Cameron, S., Sass, P., Zoller, M., and Wigler, M. 1987. Three different genes in S. cerevisiae encode the catalytic subunits of the cAMP-dependent protein kinase. Cell 50, 277-287.

Toelstede, S. and Hofmann, T. 2009. Kokumi-active glutamyl peptides in cheeses and their biogeneration 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.

Urbach, G. 1995. Contribution of lactic acid bacteria to flavour compound formation in dairy products. International Dairy Journal 5:877-903.

Valdes-Stauber, N., and S. Scherer. 1994. Isolation and characterization of linocin M18, a bacteriocin produced by Brevibacterium linens. Applied and Environmental Microbiology 60:3809-3814.

Valdes-Stauber, N., and S. Scherer. 1996. Nucleotide sequence and taxonomical distribution of the bacteriocin gene lin cloned from *Brevibacterium linens* M18. Applied and Environmental Microbiology 62:1283-1286.

Valdes-Stauber, N., S. Scherer, and H. Seiler. 1997. Identification of yeasts and coryneform bacteria from the surface microflora of brick cheeses. Int. J. Food. Microbiol 34:115-129.

van de Guchte, M., Ehrlich, S. D. and Maguin, E. 2001. Production of growth-inhibiting factors by *Lactobacillus delbrueckii*. Journal of Applied Microbiology **91**: 147-153.

Van den Tempel, T., and M. Jakobsen. 2000. The technological characteristics of *Debaryomyces hansenii* and *Yarrowia lipolytica* and their potential as starter cultures for production of Danablu. International Dairy Journal 10:263-270.
van der Walt. J, and v. A. J. 1980. The yeast genus Yarrowia gen. nov. Antonie Van Leeuwenhoek 46:517-521

Vassal, L., V. Monnet, D. Le Bars, C. Roux, and J.-C. Gripon. 1986. Relation entre le pH, la composition chimique et texture des fromages de type Camembert. Le Lait 64.

Wade, W. N., R. Vasdinnyei, T. Deak, and L. R. Beuchat. 2003. Proteolytic yeasts isolated from raw, ripe tomatoes and metabiotic association of Geotrichum candidum with Salmonella. International Journal of Food Microbiology 86:101-111.

Waters, C. M., and B. L. Bassler. 2005. QUORUM SENSING: cell-to-cell communication in bacteria. Annual Review of Cell and development Biology 21:319-346.

Weinbauer, M. G. and 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.

Whipps, J. M. 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. Journal of Experimental Botany 52:487-511.

Wickerham, L. J., C. P. Kurtzman, and A. I. Herman. 1970. Sexual reproduction in *Candida lipolytica*. Science 167:1141.

Yarwood, J., and P. Schlievert. 2003. Quorum sensing in *Staphylococcus* infections. The Journal of Clinical Investigation 112:1620-1625.

ABSTRACT

Microbial ecosystems consist of a wide variety of microorganisms in which interactions between species have been occured. The understanding and control of these ecosystems represent a scientific, health and economic challenge and pass through the identification and understanding of the interactions that control their functioning.

The study of the interaction between the two cheese yeasts *Yarrowia lipolytica* and *Debaryomyces hansenii*, showed a decrease in the growth of *D. hansenii* in the presence of *Y. lipolytica*. Transcriptomic study has showed a dysfuncyion of the mitochondrial respiratory chain of *D. hansenii* in association with *Y. lipolytica*.

Thiamin (vitamin B1) which has a beneficial role in the interaction model bacteria-yeast, was tested for its effect on growth and morphology of *Y. lipolytica*. We found that thiamin induced the dimorphic transition of *Y. lipolytica*, from the "yeast-like" form to the hyphal form. The transcriptomic analysis has shown that these morphological changes are accompanied by profound changes in the constituents of the cell wall and carbon metabolism of the yeast.

We have shown that the presence of two bacterial strains of *Brevibacterium aurantiacum*, one producer of thiamine and the other does not produce, induce morphological changes in *Y. lipolytica*. Transcriptomic studies allowed us to conclude that the dimorphic transition observed in *Y. lipolytica* in presence of bacteria, from the "yeast-like" form to the hyphal form is not solely dependent on thiamin but also on the presence of bacteria.

Keywords: Yeast-Yeast interaction, *Yarrowia lipolytica*, *Debaryomyces hansenii*, Respiration, Yeast-Bacteria interaction, Thiamin, Transcriptome, Fermentation, Hyphal transition, Cell wall.

RESUME

Les écosystèmes microbiens sont composés d'une grande diversité de micro-organismes dans lesquels des interactions inter-espèces et intra-espèces se mettent en place. La compréhension et la maîtrise de ces écosystèmes représentent un enjeu scientifique, sanitaire et économique et passent par l'identification et la compréhension des interactions qui régissent leur fonctionnement.

L'étude de l'interaction entre deux levures fromagères *Yarrowia lipolytica* et *Debaryomyces hansenii*, a montré une inhibition de la croissance de *D. hansenii* en présence de *Y. lipolytica*. L'étude transcriptomique nous a permis de mettre en évidence un dysfonctionnement dans la chaîne repiratoire de *D. hansenii* en association avec *Y. lipolytica*.

La thiamine (vitamine B1) qui possède un rôle bénéfique dans le modèle d'interaction bactérie-levure, a été testée pour son effet sur la croissance et la morphologie de *Y. lipolytica*. Nous avons observé que la thiamine induit la transition dimorphique de *Y. lipolytica*, depuis la forme unicellulaire « yeast-like » vers la forme hyphale. L'étude transcriptomique nous a permis de montrer que ces changements morphologiques sont accompagnés par des modifications profondes tant au niveau des constituants de la paroi cellulaire que du métabolisme carboné de la levure.

Nous avons pu montrer que la présence de deux souches bactériennes de *Brevibacterium aurantiacum*, l'une productrice de la thiamine et l'autre n'en produisant pas, induisent elles-aussi des changements morphologiques chez la levure *Y. lipolityca*. Les études transcriptomiques nous ont permis d'en conclure que la transition dimorphique observée chez *Y. lipolytica* en confrontation avec les bactéries depuis la forme « yeast-like » vers la forme hyphale n'est pas dépendante uniquement de la production de thiamine mais aussi de la présence des bactéries.

Mots clefs : Interactions levures-levures, *Yarrowia lipolytica*, *Debaryomyces hansenii*, Respiration, Interactions levures-bactéries, Thiamine, Transcriptome, Fermentation, Transition dimorphique, Paroi cellulaire.