

UNIVERSITÉ LILLE 1 – SCIENCES ET TECHNOLOGIES
ECOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA MATIÈRE, DU RAYONNEMENT ET DE L'ENVIRONNEMENT (ED104)

THÈSE DE DOCTORAT

Discipline : Biologie, Médecine, Santé

Sous-discipline : *Physiologie, Biologie des organismes, Population, Interaction*

Thèse effectuée à : Institut Charles Viollette EA 7394
Université de Lille Sciences et Technologies - Polytech'Lille
59650 Villeneuve d'Ascq

Présentée et soutenue le 29 mars 2017

par

Alexandre CEUGNIEZ

Pour l'obtention du grade de DOCTEUR

**Recherche de levures antagonistes, à potentiel probiotique,
dans les produits du Terroir du Nord-Pas-de-Calais**
Étude de *Kluyveromyces marxianus* et *K. lactis*, isolées d'un fromage
artisanal, la Tomme d'Orchies

Numéro d'ordre : N°42339

Composition du jury :

Dr.	Françoise COUCHENEY	Maître de Conférences à l'Université de Lille	<i>Co-encadrante de thèse</i>
Pr.	Djamel DRIDER	Professeur à l'Université de Lille	<i>Directeur de thèse</i>
Pr.	Philippe JACQUES	Professeur à l'Université de Lille	<i>Co-Directeur de thèse</i>
Pr.	Steve LABRIE	Professeur à l'Université Laval à Québec (Canada)	<i>Rapporteur</i>
Dr.	Emmanuelle MAGUIN	Directrice de recherche à l'INRA de Jouy-en-Josas	<i>Rapporteur</i>
Pr.	Gilles SALVAT	Directeur Anses Ploufragan / Plouzané	<i>Examineur</i>

Remerciements

Je tiens à remercier en premier lieu le Pr. Steve Labrie, le Dr. Emmanuelle Maguin et le Pr. Gilles Salvat d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse.

Je voudrais également remercier le Pr. Djamel Drider qui m'a fait confiance dès ma 1^{re} année de Master et qui m'a permis de faire cette thèse. Je n'oublie pas le Pr. Philippe Jacques qui m'a judicieusement aiguillé à plusieurs reprises.

Je souhaite remercier le Dr. Françoise Coucheney, pour m'avoir « supportée » tout au long de ma thèse, malgré mes lubies, mon caractère et mes innombrables fautes d'orthographe« s ».

Je remercie également le Pr. Pascal Dhulster pour avoir permis la mise en place de cette thèse, mais également pour m'avoir donné la possibilité de m'occuper des consommables. Cette responsabilité m'a permis de me changer les idées lors des grands rushs de travail.

Je voudrais également remercier le Dr. Gabrielle Chataigne et Corinne Boistel pour leur grande aide dans la gestion des consommables et également Cathy Oublion pour son travail sur les bons de commande. Je souhaite un bon courage à mon successeur à ce poste, Alexandre Berth.

Je remercie mes collègues du bureau C324 (Alaa, Mégane, Ludivine, Nuria, Mahamed, Florie, Delphine, et bien d'autres), qu'il y soit encore ou non, pour la bonne humeur qu'ils ont contribué à installer dans cette pièce. Cette bonne humeur et cette joyeuseté sont indispensables pour effectuer du travail de qualité, de plus, cela amenuise les moments les plus désagréables et stressant qui sont obligatoirement liés à une thèse.

Je n'oublie pas de remercier mes stagiaires (Pierre, Karine, Sylvain et Mouyadhine), qui m'ont également permis d'avancer, par leurs travaux et leurs réactions à ma « tutelle ». Je les félicite de m'avoir supporté, et leur souhaite le meilleur pour la suite.

Enfin, je souhaite remercier tous les membres de l'Institut Charles Viollette, avec qui j'ai pu interagir au cours de ma thèse, qui m'ont permis d'avancer dans mon travail. Je n'oublie pas l'équipe QSA qui contribue à une ambiance de travail agréable.

Je souhaite également remercier l'équipe du laboratoire des Sciences des Denrées Alimentaires de l'Université de Liège (Véronique, Pedro, Pauline, Gilles et autres...), pour m'avoir accueilli durant 3 mois, pour m'avoir permis d'élargir mon champ de compétences sur des techniques très récentes, mais également, et surtout, pour leurs accueils et leurs bonnes humeurs.

D'une manière plus personnelle, je voudrais remercier ma famille pour son soutien. Ma mère qui m'a permis de poursuivre mes études jusqu'à la thèse. Mes sœurs pour leurs soutiens tout au long de mes études.

Je tiens tout particulièrement à remercier Léonie, ma compagne, pour son soutien tout au long de cette thèse, pour m'avoir remotivé lors de mes moments de doutes et ce malgré ces propres difficultés professionnelles.

Je souhaite également remercier ma fille, Abigaïl, qui m'a donné le coup de boost et de motivation finale nécessaire pour terminer ma thèse, et ce même si elle n'en a pas encore conscience.

À mon père, qui m'a appris que l'on peut toujours faire mieux.

Sans toi, je n'aurais pas été aussi loin.

Résumé

Les fromages au lait cru présentent un écosystème microbien complexe où chaque acteur interagit avec ses voisins et avec le milieu. Parmi ces interactions, l'une d'elles est particulièrement intéressante, l'antagonisme, autrement dit la capacité d'un individu à inhiber la croissance d'un autre. Ces interactions antagonistes sont particulièrement étudiées dans les écosystèmes bactériens fromagers et ont conduit à l'identification de bactéries lactiques productrices de bactériocines. Parmi elles, certaines souches ont révélée des propriétés probiotiques et présentent ainsi un fort potentiel dans la lutte contre les résistances aux antibiotiques. D'un autre côté, l'écosystème fongique des fromages est encore peu étudié. Ce dernier est cependant prometteur, car les compétitions microbiennes au sein du microbiote fromager permettent l'émergence de levures productrices de mycocines et/ou possédant des propriétés probiotiques. Ces levures, et leurs produits, pourraient être utilisées comme conservateurs alimentaire, alternatives aux antibiotiques ou encore comme agents de bioprotection en agronomie. Dans ce cadre, les présents travaux ont porté sur l'étude d'un fromage du terroir des Hauts-de-France, la Tomme d'Orchies. Ils ont permis la mise en évidence de deux levures antagonistes non-*Saccharomyces*, présentant un potentiel probiotique. L'écosystème microbien de la Tomme d'Orchies sera décrit. Puis, la recherche et la caractérisation de levures antagonistes seront effectuées au sein de son écosystème fongique. Deux souches de *Kluyveromyces* (*K. marxianus* S-2-05 et *K. lactis* S-3-05) seront mises en évidence. Ces dernières présentant un pouvoir antagoniste large, contre des bactéries à Gram-positif et négatif et contre une levure pathogène. De plus, un haut potentiel d'utilisation comme agents probiotiques a été observé, complété par une activité anti-oxydante d'intérêt médical, observé chez *K. marxianus* S-2-05.

Mots-clés : Fromage - Écosystèmes – Levures – Antagonisme – Probiotiques

Abstract

Raw milk cheeses show a complex microbial ecosystem, where each actor interacting with its neighbor and with its environment. Among these interactions, one is particularly interesting, the antagonism, in other words the capacity of an individual to inhibit the growth of another. Antagonistic interactions are massively studied in bacterial cheese ecosystems and lead to the identification of bacteriocin-producing lactic acid bacteria. Among these strains, some revealed probiotics properties and a high potential in the fight against antibiotics resistances. Additionally, cheese fungal ecosystems were poorly studied. However, this ecosystem is promising as microbial competitions in cheese microbiota allow the emergence of mycocin-producing yeasts and/or showing probiotic properties. In this frame, our work focused on a local French cheese, the “Tomme d’Orchies”. Two non-*Saccharomyces* antagonistic yeasts, with a probiotic potential, were identified in this cheese. Microbial ecosystems of the “Tomme d’Orchies” will be described before presenting the research and the characterization of antagonistic yeast in the fungal ecosystem. Two strains of *Kluyveromyces* (*K. marxianus* S-2-05 and *K. lactis* S-3-05) will be highlighted, with broad antagonistic properties, against Gram positive and negative bacteria, but also against pathogenic yeast. A high potential to be used as probiotic agents could be observed, in addition to anti-oxidative properties for *K. marxianus* S-2-05, with medical relevance.

Keywords: Cheese – Ecosystems – Yeasts – Antagonism - Probiotics

Valorisation des travaux

Les travaux issus de cette thèse ont fait l'objet de plusieurs publications dans des revues internationales à comité de lecture. Les travaux ont été également valorisés sous formes de posters et de présentations orales dans des congrès nationaux et internationaux.

Liste des publications :

1. A. Ceugniez, D. Drider, P. Jacques et F. Coucheney (2015). Yeast diversity in a traditional French cheese “Tomme d’orchies” reveals infrequent and frequent species with associated benefits. *Food Microbiology*, **52**, 177-184. DOI : 10.1016/j.fm.2015.08.001.
2. A. Ceugniez, B. Taminiau, F. Coucheney, P. Jacques, V. Delcenserie, G. Daube et D. Drider (2016). Use of metagenetic approach to monitor the bacterial microflora of “Tomme d’Orchies” cheese during the ripening process. *International Journal of Food Microbiology*, **247**, 65-69. DOI : 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.10.034.
3. A. Ceugniez, F. Coucheney, P. Jacques, G. Daube, V. Delcenserie et D. Drider (2017). Anti-*Salmonella* activity and probiotic trends of *Kluyveromyces marxianus* S-2-05 and *Kluyveromyces lactis* S-3-05 isolated from a French cheese named “Tomme d’Orchies”. *Research in Microbiology*. DOI : 10.1016/j.resmic.2017.03.004. *Publié en ligne*
4. A. Ceugniez, M. Tourret, E. Dussert, F. Coucheney, B. Deracinois, P. Jacques, C. Flahaut, E. Heuson, D. Drider et J. Behra-Miellet. Interaction between *Kluyveromyces marxianus* from cheese origin and the intestinal symbiont *Bacteroides thetaiotaomicron* : impressive antioxidative effects. *LWT – Food Science and Technology*. DOI : 10.1016/j.lwt.2017.03.056. *Publié en ligne*
5. A. Ceugniez, B. Taminiau, F. Coucheney, P. Jacques, V. Delcenserie, G. Daube et D. Drider. Fungal diversity of “Tomme d’Orchies” cheese during the ripening process as revealed by a metagenomics study. *International Journal of Food Microbiology*. *Article en navette favorable*.

Les valorisations sous forme orale ou écrite présentées lors des congrès sont disponibles dans le Tableau 1.

Tableau 1. Résumé des communications scientifiques inhérentes aux travaux de thèse.

Type	Date	Nom de l'évènement	
		- Titre de la communication –	Ville, Pays
		Auteurs	
Orale	13 au 17 septembre 2015	32 th International Specialized Symposium on Yeasts (ISSY32)	Pérouse, Italie
		- Fungal flora of a traditional French cheese, the “Tomme d’Orchies” showed strains of <i>Kluyveromyces</i> with atypical antagonistic properties – Alexandre Ceugniz, Françoise Coucheney, Philippe Jacques, Djamel Drider	
Écrite	19 et 20 janvier 2017	Journées Jeunes Chercheurs Condorcet (J2C2)	Amiens, France
		- Potentiel probiotique de deux souches de <i>Kluyveromyces</i> antagonistes isolées d'un fromage artisanal des Hauts-de-France, la « Tomme d’Orchies » - Alexandre Ceugniz, Françoise Coucheney, Philippe Jacques, Djamel Drider	
	29 et 30 juin 2016	Young Microbiologist Symposium 2016 (YMS2016)	Dundee, Écosse
		- Probiotic potential of two antagonistic <i>Kluyveromyces</i> strains isolated from a traditional French cheese named the “Tomme d’Orchies” – Alexandre Ceugniz, Françoise Coucheney, Philippe Jacques, Djamel Drider	
	17 au 19 juin 2015	20 ^e colloque du Club des Bactéries Lactiques (CBL2015)	Lille, France
	- Analyse cinétique et quantitative de la flore bactérienne d'un fromage artisanal du Nord-Pas-De-Calais, la “Tomme d’Orchies”, par voie métagénomique – Alexandre Ceugniz, Françoise Coucheney, Philippe Jacques, Véronique Delcenserie, Djamel Drider		
	30 juin au 2 juillet 2014	5 ^e Congrès de Spectrométrie de Masse et d'Analyse Protéomique (SMAP 2014)	Lyon, France
		- Prospective evaluation of various sample preparation methods for MALDI-MS profiling of agro-food yeasts – Mickaël Chevalier, Alexandre Ceugniz, Françoise Coucheney, Pascal Gimeno, Djamel Drider, Christophe Flahaut	
	4 au 6 juin 2014	International Symposium on AntiMicrobial Peptides (AMP2014)	Lorient, France
		- Identification of new antimicrobial components produced by yeast isolated from French cheese – Alexandre Ceugniz, Françoise Coucheney, Philippe Jacques, Djamel Drider	

En plus des publications issues de cette thèse, une collaboration avec un collègue doctorant de l’Université de Bejaia (Algérie) m’a permis d’être co-auteur de la publication suivante (Annexe I) : H. A. Seddik, A. Ceugniz, F. Bendali, B. Cudennec et D. Drider.

Sommaire

REMERCIEMENTS.....	I
RÉSUMÉ	V
ABSTRACT	VII
VALORISATION DES TRAVAUX	IX
SOMMAIRE.....	XIII
GLOSSAIRE DES ABRÉVIATIONS.....	XIX
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	1
1. ÉCOSYSTÈMES FROMAGERS.....	3
1.1. Introduction sur le fromage	3
1.1.1. Historique	3
1.1.2. Production	4
1.1.3. Diversités et variétés	6
1.2. Microbiotes fromagers	8
1.2.1. Microflore naturelles etensemencées	8
1.2.1.1. <i>Culture initiale</i>	9
1.2.1.2. <i>Culture auxiliaire</i>	9
1.2.1.3. <i>Microflore secondaire</i>	10
1.2.1.4. <i>Microflore de surface et du cœur</i>	11
1.2.2. Diversité des microbiotes	11
1.2.3. Dynamique des microflore.....	15

1.3. Microorganismes indésirables	17
1.3.1. Agents pathogènes	18
1.3.1.1. <i>Listeria monocytogenes</i>	18
1.3.1.2. <i>Autres agents pathogènes</i>	19
1.3.2. Agents d'altérations.....	20
1.3.3. Moyens de protection contre les microorganismes indésirables	21
2. ORIGINE ET PRODUCTION DE LA TOMME D'ORCHIES.....	23
3. APPROCHE MÉTAGÉNOMIQUE ET MICROBIOTES FROMAGERS	27
3.1. Technologies NGS.....	28
3.2. Technologie Illumina	30
3.3. Traitement bio-informatique des données	33
4. MICROORGANISMES ANTAGONISTES.....	35
4.1. Mécanismes antagonistes.....	35
4.1.1. Compétition nutritionnelle et spatiale	37
4.1.2. Modifications physicochimiques	38
4.1.3. Composés enzymatiques	39
4.1.4. Inhibition par contact	39
4.1.5. Métabolites antagonistes	39
4.1.5.1. <i>Généralités</i>	39
4.1.5.1. <i>Bactériocines et mycocines</i>	42
4.1.5.1.1. Bactériocines produites par les bactéries à Gram-négatif.....	43
4.1.5.1.2. Bactériocines produites par les bactéries à Gram-positif.....	45
4.1.5.1.3. Mycocines	46
4.1.5.2. <i>NRP et polycétides</i>	48
4.1.5.3. <i>Sophorolipides, enzymes et acides</i>	50
4.2. Applications biotechnologiques	51
4.2.1. Souches antagonistes non-utilisables	51
4.2.2. Utilisation de métabolites antagonistes.....	51

4.3. Levures antagonistes	52
4.3.1. Introduction aux levures.....	52
4.3.1.1. <i>Génétique et nomenclature</i>	52
4.3.1.2. <i>Biotechnologies des levures</i>	53
4.3.2. Levures antagonistes	57
4.3.2.1. <i>Phénomènes «tueur » et mycocines</i>	57
4.3.2.2. <i>Autres capacités antagonistes</i>	58
4.3.3. Biotechnologies et levures antagonistes.....	59
5. MICROORGANISMES PROBIOTIQUES	61
5.1. Probiotiques connus	61
5.2. Caractéristiques probiotiques	63
5.3. Probiotiques et santé de l'hôte	65
5.4. Mécanismes d'action	66
5.4.1. Action sur l'hôte	66
5.4.2. Action sur le microbiote et le métabolisme de l'hôte.....	67
5.4.2.1. <i>Activité antagoniste sur les pathogènes et leurs toxines</i>	67
5.4.2.2. <i>Modulation de l'immunité</i>	68
5.4.2.3. <i>Autres actions sur le métabolisme de l'hôte</i>	71
5.5. Utilisations des probiotiques	72
5.6. Bioprotection des aliments	74
6. KLUYVEROMYCES.....	75
6.1. Espèces du genre <i>Kluyveromyces</i>	75
6.1.1. <i>K. lactis</i>	76
6.1.2. <i>K. marxianus</i>	77
6.2. Impacts biotechnologiques	78
6.2.1. Potentiel biotechnologique de <i>K. lactis</i>	78
6.2.2. Potentiel biotechnologique de <i>K. marxianus</i>	79
6.3. Potentiel antagoniste	80
7. OBJECTIFS DE LA THÈSE	83

RÉSULTATS	85
1. RÉSUMÉ DES TRAVAUX ET DES RÉSULTATS OBTENUS	87
2. CONTENU BACTÉRIEN ET ÉVOLUTION AU COURS DE L’AFFINAGE DE LA TOMME D’ORCHIES	88
3. CONTENU FONGIQUE ET ÉVOLUTION AU COURS DE L’AFFINAGE DE LA TOMME D’ORCHIES	89
4. ISOLEMENT DES LEVURES PAR DES APPROCHES CULTURE-DÉPENDANTES ET CRIBLAGE DES ACTIVITÉS ANTAGONISTES	90
5. ÉVALUATION DE L’EFFET PROBIOTIQUE DE <i>K. MARXIANUS</i> S-2-05 ET <i>K. LACTIS</i> S-3-05.	92
PUBLICATION 1	93
PUBLICATION 2	115
PUBLICATION 3	139
AUTRES RÉSULTATS	163
1. RECHERCHE PAR SPECTROMÉTRIE DE MASSE.....	165
1.1. Méthodologie.....	165
1.2. Résultats	166
1.3. Discussion	167
2. RECHERCHE DE LA LOCALISATION CELLULAIRE DU COMPOSÉ ANTAGONISTE.....	169
2.1. Méthodologie.....	169
2.2. Résultats	170
2.3. Discussion	171
PUBLICATION 4	173
PUBLICATION 5	201
CONCLUSIONS GÉNÉRALES	251
1. ÉTUDES DES ÉCOSYSTÈMES PAR UNE APPROCHE MÉTAGÉNOMIQUE ET UNE APPROCHE CULTURE-DÉPENDANTE.....	253
1.1. Comparaison de méthodes et résultats obtenus.....	253
1.2. Composition et évolution du microbiote de la Tomme d’Orchies.....	254
2. PROPRIÉTÉS ANTAGONISTES	255
3. POTENTIEL PROBIOTIQUE	255

PERSPECTIVES	257
BIBLIOGRAPHIE	I
INDEX DES FIGURES	XIX
INDEX DES TABLEAUX	XXI
ANNEXE I	XXIII

Glossaire des abréviations

Abréviations générales :

A : Adénine

ACE : Angiotensin Converting Enzyme (Enzyme de Conversion de l'Angiotensine)

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ADNr : ADN ribosomal

AMP : Antimicrobial Peptide (Peptide Anti-Microbien)

BAL : Bactérie Lactique

bp : Paire de bases

C : Cytosine

CDI : Contact Dependent Inhibition (Inhibition contact dépendante)

Da : Dalton

dNTP : Désoxynucléoside tri-phosphate

EFSA : European Food Safety Authority (Autorité européenne de sécurité des aliments)

G : Guanine

GOS : Galactose-oligosaccharide

GRAS : Generally Recognized As Safe (Généralement reconnu comme sans danger)

HCCA : Acide α -cyano-4-hydroxycinnamique

Ig : Immunoglobuline

INF : Interféron

IL : Interleukine

ITS : Internal Transcribed Spacer

LPS : LipoPolySaccharide

NaCl : Chlorure de sodium

MALDI : Matrix Assisted Laser Desorption Ionization

NSBAL : Bactérie lactique non issue des cultures initiale et secondaire

NSYM : Non Starter Yeasts and Molds (Levures et moisissures non issues des cultures initiale et secondaire)

NGS : Next Generation Sequencing (Séquençage de nouvelle génération)

NRP : Non Ribosomal Peptide (Peptide non ribosomique)

OGM : Organisme Génétiquement Modifié

OMS/WHO : Organisation Mondiale de la Santé / Worldwide Health Organization

ONUAA/FAO: Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture / Food and Agriculture Organization of the United Nations

OTU : Operational Taxonomic Unit (Unité Taxonomique Opérationnelle)

PAB : Propionic Acid Bacteria (Bactéries propionique)

PAGE : PolyAcrylamid Gel Electrophoresis (Électrophorèse en gel de polyacrylamide)

PCR : Polymerase Chain Reaction

pH : Potentiel Hydrogène

PK : Polycétide (Polyketide)

qPCR : PCR quantitative

QPS : Qualified Presumed Safe (Qualifié Présumé Sûr)

REP : Repetitive Element Palindromic (Élément palindromique répété)

SCP: Single Cell Protein (Protéine d'Origine Unicellulaire)

SDS : Sodium DodécylSulfate

T : Thymine

TEMED : Tétraméthyléthylènediamine

TIAC: Toxi-Infection Alimentaires Collectives

TLR : Toll Like Recepteur (Récepteur de type Toll)

TGF : Transforming growth factor (Facteur de croissance transformant)

TNF : Facteur de nécrose tumorale (Tumor Necrosis Factor)

TOF : Time of Flight

UFC : Unité Formant Colonie

USA : United State of America (États-Unis d'Amérique)

VBNC : Viable But Not Cultivable (Viable mais Non Cultivable)

Abréviations taxonomiques :

C. : Candida

Cl. : Clostridium

Cs. Cladosporium

D. : Debaryomyces

E. : Escherichia

G. : Galactomyces

Kl. : Kloeckera

K. : Kluyveromyces

Y. : Yarrowia

L. : Listeria

Lb. : Lactobacillus

P. : Penicillium

Pi. : Pichia

S. : Saccharomyces

St. : Staphylococcus

spp. : all species of the genus

sp. : one specie of the genus

Revue bibliographique

L'utilisation massive des antibiotiques, dans des secteurs comme l'agriculture et la médecine humaine et vétérinaire, a engendré le développement de phénomènes de résistances, rendant les antibiotiques peu efficaces, voire inefficaces. Il est indispensable, comme rappelé par l'Assemblée Générale des Nations Unies le 21 septembre 2016, de mettre en place des politiques de recherche permettant de juguler la résistance aux antibiotiques. La recherche d'alternatives aux antibiotiques et la potentialisation des antibiotiques actuels constituent des axes de recherche majeurs à travers le monde. Les options alternatives envisagées pourraient prendre la forme de nouvelles molécules, comme les peptides antimicrobiens, ou encore des microorganismes avec un potentiel inhibiteur sur les souches récalcitrantes aux antibiotiques. L'idéal est d'aboutir à des concepts limitant le développement de la résistance bactérienne. Dans ce spectre de solutions, le potentiel des levures antagonistes productrices de substances antimicrobiennes, est faiblement étudié. Le sujet de cette thèse porte sur le criblage de levures antagonistes, à partir d'un fromage artisanal, avec pour perspective leurs utilisations partielle en remplacement des antibiotiques.

Dans de ce manuscrit, nous présenterons l'état de l'art des différentes thématiques abordées. Ainsi, une définition des écosystèmes fromagers sera donnée, puis elle sera suivie par une description des microbiotes. Cette description permettra de mettre en relief, le potentiel antagoniste de certaines souches. Puis, nous détaillerons les différents mécanismes d'action antagonistes connus. Enfin nous aborderons les microorganismes antagonistes des fromages, avec une description particulière des levures. Suite à cet inventaire, nous aborderons le concept et l'importance des probiotiques, avec un point sur leurs mécanismes d'action et leurs intérêts pour la santé humaine et animale. Nous concluons avec des détails sur les levures appartenant au genre *Kluyveromyces*, afin d'introduire et découvrir ces levures non-*Saccharomyces* étudiés dans le cadre de cette thèse.

1. ÉCOSYSTÈMES FROMAGERS

Les écosystèmes fromagers sont définis comme l'ensemble des organismes vivants présents dans cette matrice. Toutefois, il faut tenir compte des différentes interactions, de ces derniers, avec le fromage, mais aussi de leur dynamique d'évolution. Notre étude porte spécifiquement sur le contenu microbien (bactérien et fongique) de la Tomme d'Orchies, qui est un fromage artisanal de la région des Hauts-de-France. Pour bien comprendre le développement de ces microorganismes, une présentation générale de la matrice fromagère est donnée ci-dessous.

1.1. Introduction sur le fromage

1.1.1. Historique

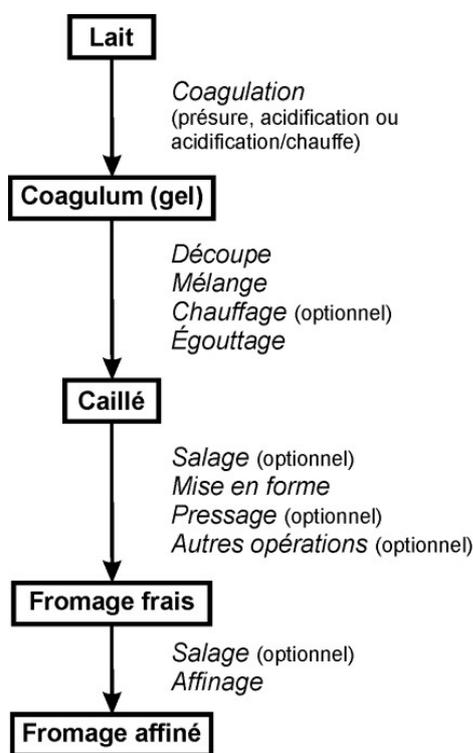
Le fromage est issu de la transformation du lait, qui est une source riche en nutriments. Cette richesse a conduit l'humain, il y a 8 000 à 10 000 ans, à l'utiliser pour son alimentation (Fox, 2011a; Beresford et al., 2001). Depuis, le lait et les produits laitiers sont devenus un composant majeur de l'alimentation humaine, particulièrement en Europe, en Amérique du Nord et du Sud, en Australie et en Nouvelle-Zélande (Fox et al., 2011). Le lait cru a été probablement consommé avant ses produits dérivés. Ce produit est, toutefois, sensible aux altérations et des méthodes permettant sa conservation ont donc été développées. Il s'agit notamment de le conserver sous forme de beurre, de lait fermenté et de fromage (Fox, 2011a; Fox et al., 2011). La conversion du lait en fromage offre plusieurs avantages, comme la stabilité au stockage, la facilité de transport et la diversification de l'alimentation (Fox, 2011b).

Le fromage a été introduit en Europe lors de l'expansion de l'Empire romain. Il a été répandu par les grandes migrations de populations suivant la chute de cet Empire, mais également par les Croisades et les pèlerins du Moyen-Âge (Hill et Kethireddipalli, 2013; Fox, 2011b). C'est d'ailleurs durant la période féodale que se sont développées de nombreuses variétés de fromages, spécifiques à certaines zones géographiques (Fox, 2011b). De nos jours, le processus de fabrication du fromage est globalement similaire à celui utilisé aux origines de sa fabrication (Powell et al., 2011).

1.1.2. Production

Le terme fromage est un nom générique pour un groupe de produits laitiers, caillés et fermentés, produits partout dans le monde. Les fromages possèdent une grande diversité d'arômes, de textures et de goûts (Fox, 2011b). L'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (ONUAA/FAO) et l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS/WHO) en ont donné la définition suivante : « *Le Fromage est un solide, frais ou mûré, ou un produit semi-solide obtenu par coagulation du lait, du lait écrémé, du lait partiellement écrémé, de crème, de crème de lactosérum, de babeurre, ou toutes combinaisons de ces produits, par l'action de présure ou de tout agent coagulant adapté, et par un égouttage partiel du lactosérum résultant de cette coagulation.* » (Traduit à partir de Walstra et al., 2006).

Cette définition permet de définir un fromage, ainsi que les grandes étapes du processus de transformation du lait en fromage (Figure 1).

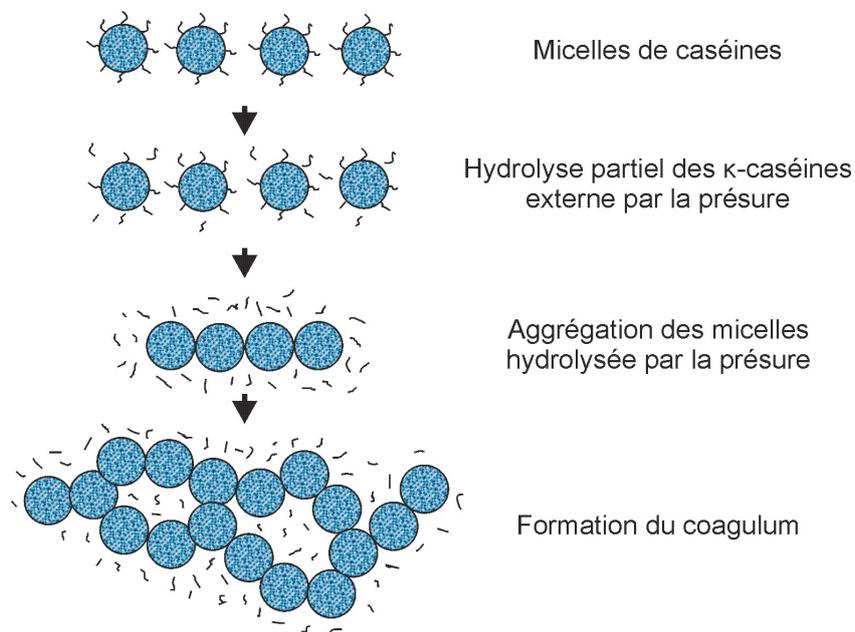


(Traduit et modifié de Fox, 2011b)

Figure 1. Résumé des différentes étapes de fabrication d'un fromage

Avant la production d'un fromage, il est important de sélectionner le lait, son origine animale et sa zone géographique. Le lait peut être traité par pasteurisation ou thermisation (Hill et Kethireddipalli, 2013; Fox, 2011b). Si le lait n'est pas traité thermiquement, la fabrication aboutira à un fromage au lait cru.

La production du fromage débute par une coagulation à l'aide de présure et/ou d'acide lactique, associée éventuellement à une étape de chauffage (Hill et Kethireddipalli, 2013; Fox, 2011b; Powell et al., 2011). Cette coagulation amène à l'agrégation de la caséine (Figure 2), et à la formation d'un gel, ou coagulum, emprisonnant le lactosérum (Hill et Kethireddipalli, 2013; Fox, 2011b; Walstra et al., 2006b). La présure est une substance présente dans l'estomac des jeunes mammifères et est principalement composée de chymosine (Fox, 2011b). L'acide lactique peut être incorporé directement, ou être généré par la culture initiale ajoutée en début de production. La culture initiale est principalement composée de bactéries lactiques (BAL). Celles-ci produisent de l'acide lactique à partir du lactose du lait, c'est la fermentation lactique.



(Traduit et reproduit de Lucey, 2011)

Figure 2. Représentation de la coagulation de la caséine du lait par la présure

Dans le monde, environ 70 % des fromages sont coagulés par utilisation de présure, alors que le reste (30 %) est coagulé par l'acide produit par les bactéries lactiques (Fox, 2011a).

Pour former le caillé, le coagulum est découpé en morceaux, qui seront ensuite mélangés afin d'extraire le lactosérum. Ce dernier est éliminé par égouttage. Parfois, le coagulum est chauffé pour réduire l'humidité davantage. Le caillé est mis en forme, puis des opérations, comme le salage ou le pressage, peuvent être effectuées. Celles-ci dépendent de la variété souhaitée (Hill et Kethireddipalli, 2013; Fox, 2011b; Walstra et al., 2006b). Si le processus de fabrication se termine à cette étape, on obtient un fromage frais. Les fromages frais sont généralement obtenus par coagulation acide (Fox, 2011b; Beresford et al., 2001). En revanche, les fromages coagulés à la présure subissent d'autres opérations, notamment l'affinage (Beresford et al., 2001). Cet affinage est précédé par d'autres opérations comme le salage, voire le pressage. Le produit élaboré est placé en chambre d'affinage pour une durée variable (Fox, 2011b; Walstra et al., 2006b) pouvant aller de 3 semaines (Mozzarella), à 2 ans (Parmesan) (Beresford et al., 2001). Une étape de frottage pourra être effectuée durant l'affinage, à l'aide d'une saumure pouvant contenir des composés spécifiques, et/ou une microflore, la culture secondaire, spécifique à la variété de fromage produit (Hill et Kethireddipalli, 2013; Fox, 2011b). L'affinage est une étape cruciale pour le développement des arômes et de la typicité du fromage.

1.1.3. Diversités et variétés

Actuellement, entre 1 000 et 1 400 variétés de fromages sont décrites à travers le monde, dont environ 400 en France. L'une des variétés les plus populaires est la mozzarella, de par son utilisation dans les pizzas (Cniel, 2015; Hill et Kethireddipalli, 2013; Fox, 2011b). Les différentes variétés de fromages sont classées selon le processus de fabrication et selon leurs diversités microbiennes (Fox, 2011b).

La première étape de classification prend en compte l'origine animale du lait, et la présence ou non d'un traitement du lait, préalable à la fabrication du fromage. La seconde étape porte sur la notion de fabrication traditionnelle (Montel et al., 2014). Selon Montel et al. (2014), la fabrication traditionnelle est définie comme suivant : « *Fromages produits sur le site même de la ferme dont le lait est issu, ou dans des laiteries de petite taille, utilisant du lait cru, thermisé ou pasteurisé et inoculé avec diverses combinaisons de cultures initiales, permettant la croissance et l'expression d'un affinage par le microbiote* ».

La troisième étape de classification concerne la présence d'une étape d'affinage, ou non, et les opérations qui y sont associées. Enfin, le dernier critère diffère selon la classification utilisée.

Selon l'ONUAA/FAO, la classification finale des fromages est basée sur leurs propriétés physicochimiques, notamment la teneur en eau du fromage dégraissé et la teneur en matière grasse de l'extrait sec. En face de cela, la classification européenne (Tableau 2), utilisée de manière plus courante, se base sur la totalité du processus technologique de production (Alim'Agri, 2012; FAO/WHO, 2011). Selon cette dernière classification, les fromages fondus sont issus de mélanges avec d'autres produits laitiers, comme le beurre et la crème, puis associés à des épices et à d'autres condiments.

Tableau 2. Les différentes variétés de fromages selon la classification européenne et française

Variété de fromage	Exemple(s) de produit(s)
Frais	Fromage blanc, Mozzarella...
Pâte molle fleurie	Camembert, Brie...
Pâte molle lavée	Reblochon, Munster...
Pâte persillée	Roquefort, Gorgonzola ...
Pâte pressée non cuite	Saint-Paulin, Tomme...
Pâte pressée cuite	Comté, Gruyère...
Fondu	Cancoillotte, Vache qui rit...

(Réalisé à l'aide de Alim'Agri, 2012)

Les différents processus technologiques ont une influence importante dans les qualités organoleptiques du fromage produit. Cependant, le microbiote associé à ces fromages, particulièrement aux fromages affinés, a une influence tout aussi importante.

1.2. Microbiotes fromagers

La première culture pure, issue d'un fromage, a été obtenue par Lister en 1873. Cette découverte confirma l'implication des bactéries dans l'affinage du fromage et ouvrit la voie à l'étude des microflore issues des fromages (Powell et al., 2011). Par la suite, diverses études ont confirmées l'importance de ces microorganismes, principalement des BAL, dans la fabrication du fromage (Montel et al., 2014; Powell et al., 2011). La prévalence et le potentiel biotechnologique des BAL ont conduit les recherches à s'orienter principalement vers ces microorganismes (Montel et al., 2014; Powell et al., 2011). Cependant, la microflore présente dans les fromages est complexe et contient d'autres microorganismes (Montel et al., 2014; Lavoie et al., 2012; Broome et al., 2011).

Le microbiote a un impact lors de la fabrication même du fromage, par acidification du lait, mais son action intervient particulièrement dans la phase d'affinage. Cette action s'observe par une modification des propriétés physicochimiques conférant les propriétés organoleptiques du fromage. Ces modifications physicochimiques amènent le microbiote à évoluer au cours du temps. (Lavoie et al., 2012; Powell et al., 2011; Arteau et al., 2010; Brennan et al., 2002).

1.2.1. Microflore naturelles etensemencées

Le microbiote peut être divisé selon ses origines et sa localisation dans le fromage. Les différentes origines conduisent à trois catégories, la culture initiale, ou primaire, la culture auxiliaire et la microflore secondaire (Broome et al., 2011). La localisation dans le fromage conduit à 2 catégories, la microflore de surface et la microflore de cœur.

1.2.1.1. Culture initiale

La culture primaire est généralement ajoutée, par le producteur, dans le lait avant la fabrication du fromage. Pour les fromages au lait cru, cette flore est également issue de la flore naturelle du lait (Cogan, 2011a; Vacheyrou et al., 2011; Beresford et al., 2001). La culture initiale est principalement composée de BAL et est indispensable à la production du fromage (Powell et al., 2011; Gardini et al., 2006; Beresford et al., 2001). Cette culture initiale contient généralement les genres *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* ou *Enterococcus* (Cogan, 2011a; Beresford et al., 2001).

Les bactéries initiales produisent suffisamment d'acide lactique pour diminuer le pH du lait en dessous de 5,3, en 6 heures et à une température de 30-37 °C (Beresford et al., 2001). De plus, lors de l'affinage, elles produisent un large panel d'enzymes et de composés métaboliques (Hill et Kethireddipalli, 2013; Broome et al., 2011; Bockelmann et al., 2005; Brennan et al., 2002).

1.2.1.2. Culture auxiliaire

La culture auxiliaire est optionnelle. En cas d'utilisation, elle est ajoutée en même temps que la culture primaire ou à un autre moment lors du processus de fabrication du fromage (Hill et Kethireddipalli, 2013; Rattray et Eppert, 2011). L'action de cette microflore sur l'acidification est négligeable, cependant elle contribue aux propriétés organoleptiques du fromage par production de composés aromatiques ou par la formation de poches de gaz. Les microorganismes de cette culture sont choisis par le producteur pour leurs effets sur les caractéristiques organoleptiques du fromage (Hill et Kethireddipalli, 2013; Powell et al., 2011). La composition des cultures auxiliaires est très variable. Elles sont généralement constituées de BAL autres que celles de la culture initiale (NSBAL), d'autres bactéries comme des entérocoques ou des microcoques, et parfois des moisissures et/ou des levures. On y retrouve *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* ou *Enterococcus*, mais également des moisissures comme *Penicillium camemberti*. De nombreuses préparations pour frotter les fromages à pâte molle lavée contiennent *Geotrichum candidum* (également connu comme *Galactomyces geotrichum*), *Debaryomyces hansenii* ou encore *Kluyveromyces lactis* (Broome et al., 2011; Rattray et Eppert, 2011).

1.2.1.3. Microflore secondaire

La microflore secondaire est non inoculée, c'est-à-dire qu'elle n'a pas été ajoutée par le producteur. Cette flore est composée de BAL non issues des cultures initiale et secondaire, d'autres bactéries et/ou de levures et moisissures non issues des cultures initiales ou secondaires, ou NSYM (Lavoie et al., 2012; Cogan, 2011a; Beresford et al., 2001). Lors de l'affinage, le rôle de la microflore secondaire est reconnu, mais sa composition complexe empêche de définir clairement le rôle de chaque acteur microbien (Lavoie et al., 2012; Gardini et al., 2006). Il est intéressant de noter que plusieurs fromages d'une même variété peuvent montrer une microflore secondaire totalement différente. Cette diversité est dépendante de la localisation géographique du site de fabrication et de la saisonnalité (Lavoie et al., 2012). La microflore secondaire peut être constituée de lactobacilles mésophiles et de pédiocoques, de NSBAL, de bactéries propioniques (PAB) comme *Propionibacterium*, voire d'autres microorganismes comme les microcoques, les coryneformes ou les levures, avec une prédominance de *Debaryomyces* et *Kluyveromyces* (Cogan, 2011a; Beresford et al., 2001; Wyder et Puhon, 1999).

La microflore secondaire peut avoir plusieurs origines. En effet, elle peut provenir de l'environnement, c'est-à-dire des ustensiles ou de la saumure utilisés lors de la fabrication du fromage. Elle peut également provenir de la zone de fabrication ou encore de la chambre d'affinage, notamment lorsque les ustensiles ou les étagères utilisées pour l'affinage sont en bois (Montel et al., 2014; Gardini et al., 2006; Addis et al., 2001). Une autre origine fréquente de la microflore naturelle est le lait, surtout lorsqu'il est utilisé cru. Il est généralement admis que le lait sortant du pis de l'animal est stérile, cependant il peut être contaminé par l'équipement de traite, par l'animal lui-même, voire par la zone de traite (Montel et al., 2014; Lavoie et al., 2012; Vacheyrou et al., 2011). Le personnel humain, participant à la production du fromage est lui-même vecteur de contamination (Lavoie et al., 2012). Cette microflore est donc très dépendante de la localisation, du processus de fabrication et des pratiques d'hygiènes et de stockages mises en place sur le site de production.

1.2.1.4. Microflore de surface et du cœur

La microflore du cœur du fromage est généralement constituée de BAL, car elles se développent plus facilement dans les conditions spécifiques de ce milieu, c'est-à-dire un milieu anaérobie possédant un pH bas et disposant de très peu de sucres fermentescibles, hors lactose (Montel et al., 2014; Cogan, 2011a).

La microflore de surface est très variée, car c'est un milieu en contact de l'environnement. En plus des BAL et des NSBAL, on y retrouve des levures, des moisissures et d'autres microorganismes aérobies. C'est dans cette microflore que l'on retrouve les souches issues de l'environnement d'affinage (Montel et al., 2014; Wolfe et al., 2014; Mounier et al., 2005; Wyder et Puhon, 1999). Dans les fromages à pâte molle fleurie ou lavée, ce sont les moisissures et les levures qui sont prédominantes à la surface. C'est la microflore de surface qui est responsable, en grande partie, de la spécificité organoleptique des fromages (Cogan, 2011a; Wyder et Puhon, 1999).

1.2.2. Diversité des microbiotes

Les Tableau 3 et Tableau 4 présentent les bactéries et *fungi* retrouvés dans les fromages au lait de vache, leurs fréquences et la partie du fromage où ils ont été isolés. Le Tableau 3 contient un biais concernant la microflore bactérienne, car plusieurs des publications cherchent à définir la microflore de surface et non la microflore du cœur du fromage. Les BAL et NSBAL, généralement plus nombreuses dans le cœur du fromage, sont ici très largement sous représentées. Ce tableau est donc plus représentatif des microflores de surfaces.

Un autre biais existe pour la microflore fongique. En effet, la publication de Lavoie et al. (2012) ne prend pas en compte *P. camemberti*, *G. candidum*, *K. lactis* et *D. hansenii* qui sont fréquemment utilisés comme cultures auxiliaires, pour l'affinage. Il est donc impossible de connaître leurs réelles prévalences dans cette étude.

Tableau 3. Genres, espèces, fréquence et zone d'isolement des bactéries retrouvées dans les fromages au lait de vache

Genre	espèce	Fréquence	Zone d'isolement	Genre	espèce	Fréquence	Zone d'isolement
<i>Corynebacterium</i>		Total : 178		<i>Psychrobacter</i>	spp.	16	Totalité
	<i>casei</i>	91	Totalité	<i>Rhodococcus</i>	<i>fascians</i>	15	ND
	<i>ammoniagenes</i>	36	ND	<i>Vibrio</i>		Total : 15	
	<i>variabile</i>	31	Surface		<i>penaeicida</i>	5	Surface
	spp.	20	Surface	spp.	10	Surface	
<i>Glutamicibacter</i> (Anciennement <i>Arthrobacter</i>)		Total : 49		<i>Arcobacter</i>	<i>marinus</i>	11	Surface
	<i>arilaitensis</i>	34	Surface	<i>Lactococcus</i>	<i>lactis</i>	11	Totalité
	<i>nicotianae</i>	14	Surface	<i>Leuconostoc</i>	<i>pseudomesenteroides</i>	11	Totalité
<i>Brevibacterium</i>	<i>mysorens</i>	1	Surface	<i>Marinilactibacillus</i>	<i>psychrotolerans</i>	11	Totalité
		Total : 44		<i>Microbacterium</i>		Total : 11	
	<i>linens</i>	38	Surface	<i>imperiale</i>	5	ND	
	<i>oxydans</i>	1	ND	<i>gubbeenense</i>	4	Surface	
	spp.	5	ND	spp.	2	ND	
<i>Halomonas</i>		Total : 36		<i>Pseudoalteromonas</i>	spp.	Total : 11	Surface
	<i>venusta</i>	30	Surface	<i>Streptococcus</i>	<i>salivarius</i>	Total : 11	Totalité
<i>Staphylococcus</i>	spp.	6	Surface	<i>Enterococcus</i>		Total : 9	
		Total : 31		<i>casseliflavus</i>	5	Surface	
	<i>equorum</i>	14	Totalité	spp.	4	Surface	
	<i>saprophyticus</i>	8	Surface	<i>Lactobacillus</i>	<i>plantarum</i>	Total : 5	Surface
	<i>epidermidis</i>	1	Surface	spp.		Total : 5	Surface
	spp.	8	Surface	<i>Psychroflexus</i>	spp.	Total : 5	Surface
<i>Bacillus</i>	spp.	Total : 30	Surface	<i>Pseudomonas</i>	spp.	Total : 4	Surface
		Total : 28		<i>Cellulomicrobium</i>	<i>cellulans</i>	Total : 3	ND
<i>Arthrobacter</i>	<i>citreus</i>	1	ND	<i>Micrococcus</i>		Total : 2	
	spp.	27	ND	<i>luteus</i>	1	Surface	
<i>Vagococcus</i>		Total : 22		spp.	1	Surface	
	<i>salmoninarum</i>	11	Surface	<i>Agrococcus</i>	spp.	Total : 1	Surface
	<i>fluvialis</i>	11	Totalité				

ND : Non Disponible

(Tableau réalisé à l'aide d'une synthèse de NCBI Taxonomy, 2016a; Delcenserie et al., 2014; Bockelmann et al., 2005; Mounier et al., 2005; Rademaker et al., 2005; Bockelmann et Hoppe-Seyler, 2001; Valdes-Stauber et al., 1997)

Tableau 4. Genres, espèces, fréquence et zone d'isolement des *fungi* retrouvés dans les fromages au lait de vache

Genre	espèce	Fréquence	Zone d'isolement	Genre	espèce	Fréquence	Zone d'isolement
<i>Debaryomyces</i>		Total : 1089		<i>Trichosporon</i>		Total : 101	
	<i>hansenii</i>	1088	Totalité		<i>cutaneum</i>	90	Totalité
	<i>fabryi</i>	1	ND	<i>ovoides</i>	4	Cœur	
<i>Kluyveromyces</i>		Total : 573		<i>asahii</i>	4	Totalité	
	<i>marxianus</i>	533	Totalité	<i>jirovecii</i>	2	Cœur	
	<i>lactis</i>	40	Totalité	<i>aquatile</i>	1	Surface	
<i>Candida</i>		Total : 554		<i>Torulaspora</i>	<i>delbrueckii</i>	Total : 63	Totalité
	<i>intermedia</i>	226	Totalité	<i>Naganishia</i>		Total : 76	
	<i>catenulata</i>	169	Totalité	<i>albida</i>	75	ND	
	<i>zeylanoides</i>	53	Totalité	<i>diffluens</i>	1	Cœur	
	<i>tropicalis</i>	50	Totalité	<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>	Total : 37	Totalité
	<i>parapsilosis</i>	19	Totalité	<i>Clavispora</i>	<i>lusitaniae</i>	Total : 18	Totalité
	<i>pararugosa</i>	10	Totalité	<i>Wickerhamomyces</i>		Total : 26	
	<i>versatilis</i>	8	Totalité	<i>anomalous</i>	25	ND	
	<i>rugosa</i>	5	Totalité	<i>subpelliculosus</i>	1	ND	
	<i>inconspicua</i>	4	Surface	<i>Rhodotorula</i>		Total : 24	
	<i>sake</i>	4	Surface	<i>mucilaginoso</i>	23	Totalité	
	<i>pseudoglebosa</i>	1	ND	<i>glutinis</i>	1	Surface	
	<i>saitona</i>	1	ND	<i>Kazachstania</i>		Total : 11	
	<i>galacta</i>	1	ND	<i>exigua</i>	7	ND	
	<i>humilis</i>	1	ND	<i>unispora</i>	2	ND	
<i>magnoliae</i>	1	ND	<i>servazzii</i>	2	Surface		
<i>spp.</i>	1		<i>Cladosporium</i>		Total : 8		
<i>Pichia</i>		Total : 464		<i>cladosporioides</i>	7	Totalité	
	<i>membranifaciens</i>	430	Surface	<i>spp.</i>	1	Surface	
	<i>kudriavzevii</i>	26	Totalité	<i>Mucor</i>		Total : 8	
	<i>fermentans</i>	7	Totalité	<i>racemosus</i>	7	Totalité	
	<i>norvegensis</i>	1	Surface	<i>circinelloides</i>	1	Cœur	
<i>Yarrowia</i>	<i>lipolytica</i>		Total : 356	<i>Zygosaccharomyces</i>		Total : 6	
<i>Geotrichum</i>		Total : 313		<i>rouxii</i>	3	Surface	
	<i>candidum</i>	307	Surface	<i>mellis</i>	1	Cœur	
	<i>klebahnii</i>	1	ND	<i>spp.</i>	2	Totalité	
	<i>spp.</i>	5	Totalité	<i>Kodamaea</i>	<i>ohmeri</i>	Total : 4	ND
			<i>Lichteimia</i>	<i>corymbifera</i>	Total : 4	Cœur	

Tableau 4 (suite). Genres, espèces, fréquence et zone d'isolement des *fungi* retrouvés dans les fromages au lait de vache

Genre	espèce	Fréquence	Zone d'isolement
<i>Aspergillus</i>		Total : 3	
	<i>fumigatus</i>	1	Cœur
	<i>niveoglaucus</i> spp.	1 1	Cœur Cœur
<i>Lachancea</i>		Total : 3	
	<i>kluveri</i> <i>thermotolerans</i>	2 1	Surface Surface
<i>Apiotrichum</i>	<i>domesticum</i>	Total : 2	Totalité
<i>Coniochaeta</i>	<i>hoffmannii</i>	Total : 2	Cœur
<i>Fusarium</i>	<i>domesticum</i>	Total : 2	Surface
<i>Peyronellaea</i>	<i>gomerata</i>	Total : 2	Totalité
<i>Priceomyces</i>	<i>haplophilus</i>	Total : 2	Surface
<i>Aureobasidium</i>	<i>pullulans</i>	Total : 1	Cœur
<i>Bipolaris</i>	<i>sorokiniana</i>	Total : 1	Cœur
<i>Cutaneotrichosporon</i>	<i>curvatus</i>	Total : 1	Surface
<i>Cyberlindnera</i>	<i>jadinii</i>	Total : 1	Cœur
<i>Cystobasidium</i>	<i>minutum</i>	Total : 1	Surface
<i>Papiliotrema</i>	<i>laurentii</i>	Total : 1	Cœur
<i>Satumispora</i>	<i>silvae</i>	Total : 1	ND
<i>Zygorulasporea</i>	<i>florentina</i>	Total : 1	Cœur

ND : Non Disponible

(Tableau réalisé à l'aide d'une synthèse de NCBI Taxonomy, 2016a; Gkatzionis et al., 2014; Lavoie et al., 2012; Borelli et al., 2006; Mounier et al., 2005; Viljoen et al., 2003; Bockelmann et Hoppe-Seyley, 2001; Wojtatowicz et al., 2001; Tempel et Jakobsen, 1998; Valdes-Stauber et al., 1997; Roostita et Fleet, 1996; Kaminarides et Anifantakis, 1989)

La microflore bactérienne de surface se caractérise par une forte présence de *Corynebacterium*, *Glutamibacter* (également connu comme *Arthrobacter*) et *Brevibacterium*. La présence de *Staphylococcus* en grande fréquence n'est pas étonnante, car c'est un genre ubiquitaire qui est présent dans l'environnement, mais aussi chez l'humain comme germe commensal.

La microflore fongique est constituée en grande majorité de *Debaryomyces*, notamment *D. hansenii*, suivie de *K. marxianus* et d'une grande diversité de *Candida*. On remarque également une forte abondance de *Pichia*, *Yarrowia lipolytica* et *G. candidum*.

Auparavant, les levures étaient décrites comme étant responsables d'altération dans le fromage. De nos jours, les levures sont considérées comme des microorganismes significatifs dans la maturation des fromages car elles jouent un rôle dans la qualité microbienne et les qualités organoleptiques de ces derniers (Fleet, 1990, 2011; Jakobsen et Narvhus, 1996).

1.2.3. Dynamique des microflores

Au cours du processus de fabrication et au cours de l'affinage, les microflores des fromages évoluent. Cette dynamique des microflores est bien connue (Figure 3). Lors de la formation du caillé, on observe une diminution du pH par transformation du lactose en acide lactique par les BAL, jusqu'à un pH compris entre 4,8 et 4,2 (Hill et Kethireddipalli, 2013). On observe également une protéolyse par action de la présure. Lors de cette phase, seuls les BAL montrent une forte croissance, du fait de leur aptitude à consommer directement le lactose (Hill et Kethireddipalli, 2013; Irlinger et Mounier, 2009).

L'acidification du milieu, l'élimination du lactosérum, l'ajout du sel et le passage en chambre d'affinage limitent la croissance de toutes souches autres que celles acido-tolérantes, halotolérantes, psychrotolérantes et tolérantes aux faibles teneurs en eau. De ce fait, au début de l'affinage, on observe essentiellement une croissance des levures, particulièrement celles qui sont adaptées à ce type de milieu (Cogan, 2011a; Gardini et al., 2006; Lopandic et al., 2006; Beresford et al., 2001). Les levures agissent en synergie avec les BAL et métabolisent le lactate, entraînant une hausse du pH. Cette alcalinisation sera amplifiée par le métabolisme protéolytique de ces mêmes levures, produisant des NH₃ par désamination, amenant ainsi le pH du fromage à une valeur proche de la neutralité, c'est-à-dire entre 5,0 et 7,5. Ce processus est défini comme la désacidification (Cogan, 2011a; Arteau et al., 2010; Lopandic et al., 2006; Wyder et Puhon, 1999; Roostita et Fleet, 1996). Après croissance, le nombre de levures semble rester constant, voire diminue légèrement au cours de l'affinage (Beresford et al., 2001). De plus, les levures produisent divers facteurs de croissance comme la riboflavine (vitamine B₂), la biotine (vitamine B₇) et d'autres vitamines et composés (Viljoen et Greyling, 1995).

L'augmentation du pH et la présence de facteurs de croissances induit une nouvelle étape dans le développement des microflores. Cette dernière a lieu au cours et en fin d'affinage, et est caractérisée par la croissance de microorganismes exigeants et sensibles au pH bas, comme *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium* ou *Micrococcus* (Imran et al., 2010; Viljoen et al., 2003; Corsetti et al., 2001; Wyder et Puhon, 1999).

Tous ces microorganismes contribuent aux propriétés organoleptiques du fromage par production de métabolites secondaires aromatiques (Viljoen et al., 2003; Pereira-Dias et al., 2000; Jakobsen et Narvhus, 1996; Viljoen et Greyling, 1995).

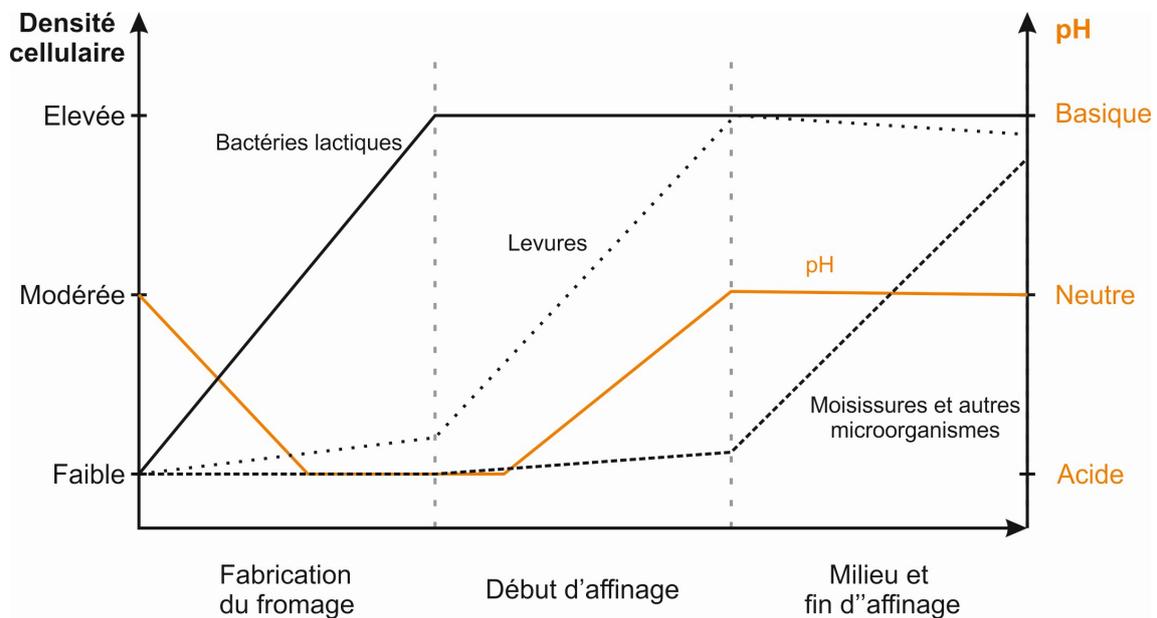


Figure 3. Représentation graphique de l'évolution des microflores du fromage selon le pH et l'étape de production.

Les dynamiques des microflores de la surface et du cœur du fromage présentent quelques différences. Le cœur du fromage est anaérobie et favorise le développement et la prédominance des BAL, des NSBAL et d'autres microorganismes anaérobies, comme *Propionibacterium* (Viljoen et al., 2003). La microflore de surface permet principalement la croissance des bactéries aérobies, des levures et des moisissures. Le contact direct de la surface avec le milieu extérieur l'expose aux microorganismes de l'environnement et conduit à une microflore plus diversifiée. Selon Viljoen et al. (2003), ces compétitions entre les différents microorganismes peuvent avoir un impact sur l'évolution de la microflore de surface.

Dans certaines variétés de fromage, l'évolution des microflores est influencée par l'action du producteur. C'est le cas des fromages persillés, où le développement des moisissures est attribué à l'aération du cœur du fromage par le producteur. De même, la microflore de surface spécifique des fromages à pâte molle fleurie et lavée est due au frottage de la surface à l'aide d'une saumure. Ce frottage amène de nouveaux microorganismes et influence la dynamique du microbiote déjà présent. Les fromages à pâte molle fleurie sont riches en moisissures, alors que les fromages à pâte lavés sont riches en microorganismes pigmentés, comme *Brevibacterium linens* (Büchl et Seiler, 2011; Mounier et al., 2005; Valdes-Stauber et al., 1997).

Les microorganismes présentés ci-dessus sont bénéfiques et participent à la production des fromages. Cependant d'autres espèces sont défavorables pour les qualités organoleptiques du fromage, voire délétères pour le consommateur. La croissance de ces microorganismes indésirables peut être limitée par le microbiote déjà présent dans le fromage (Imran et al., 2010).

1.3. Microorganismes indésirables

D'une manière générale, le fromage est un produit de consommation sûr. Entre 1970 et 1997, seul 30 cas d'empoisonnements ont été déclarés, et ce malgré une consommation d'environ 235 millions de tonnes de fromage en Europe de l'Ouest, au Canada et aux USA. Bien que les fromages au lait cru soient souvent mis en cause, ils ne représentent qu'un tiers des cas d'empoisonnement alimentaire ayant les fromages comme origine. Les deux autres tiers sont due aux fromages au lait pasteurisé ou thermisé (Callon et al., 2014; Cogan, 2011b). Même, s'il demeure un produit sûr d'un point de vue hygiénique, il doit rester sous surveillance permanente, car les conséquences liées à la consommation des fromages contaminés sont souvent dramatiques (Montel et al., 2014).

Des altérations organoleptiques du produit sont également possibles, sans pour autant entraîner de pathologies. Les microorganismes responsables de cette altération peuvent entraîner une grande perte économique et ils doivent donc être logiquement surveillés (Panelli et al., 2013; Fleet, 1990).

1.3.1. Agents pathogènes

La plupart des agents pathogènes présents dans les fromages sont des bactéries. Les levures décrites comme étant pathogènes pour l'humain, telles *Candida albicans* et *C. neoformans* n'ont pas été retrouvées dans la nourriture. De ce fait, les risques liés à ces levures sont faibles, voire inexistantes (Cooper, 2011; Fleet, 1990). Les moisissures peuvent avoir un impact sur les matrices alimentaires. En effet, certaines moisissures peuvent produire des métabolites secondaires, appelés mycotoxines, avec des conséquences graves sur la santé humaine et aussi sur la santé animale. Les conditions nécessaires à la production de mycotoxines ne sont pas réunies dans les matrices fromagères (Panelli et al., 2013).

1.3.1.1. Listeria monocytogenes

Listeria monocytogenes est responsable de la listériose, une grave infection pour les femmes enceintes, les personnes immunodéprimées et les personnes âgées. Le taux de mortalité associé à cette pathologie est de 30 %. Chez la femme enceinte, cette infection peut conduire à des avortements (InVS, 2015a; Hill et Kethireddipalli, 2013; Cogan, 2011b). En France, la prévalence de la listériose, associée à tout type d'aliment, est d'environ 300 cas par an (InVS, 2015a).

Selon l'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments (EFSA), les contaminations dues à *L. monocytogenes* sont plus fréquentes, à proportion égale, pour les fromages pasteurisés, que pour les fromages au lait cru (InVS, 2015a; Callon et al., 2014; Imran et al., 2010).

L'origine des contaminations par *L. monocytogenes* est généralement liée à un manque de respect des normes d'hygiène-sécurité ou d'une pasteurisation non maîtrisée et donc inefficace. En effet, cette bactérie possède un taux de résistance thermique élevé, de 72° durant 16 secondes, proche des conditions de pasteurisation. Dans le cas d'une survie à la pasteurisation ou d'une contamination post-pasteurisation, cette bactérie est capable de croître à de basses températures - 2 à 4 °C, à un pH bas 5, et à une concentration en NaCl supérieure à 10 %. (Montel et al., 2014; Hill et Kethireddipalli, 2013; Imran et al., 2010).

La dose infectieuse pour ce microorganisme reste à définir, mais elle est considérée comme basse, quelques centaines de cellules pouvant induire la pathologie (Cogan, 2011b).

1.3.1.2. Autres agents pathogènes

En sus de *L. monocytogenes*, plusieurs autres espèces bactériennes sont impliquées dans les intoxications alimentaires liées à la consommation de fromages. On pourra citer *Salmonella* spp. et *Escherichia coli*, particulièrement le sérotype O157:H7. Ces contaminants du lait seraient originaires des matières fécales animales. Cependant des recherches récentes ont montré que les matières fécales constituent une source de contamination mineure, et la source principale reste à identifier (Hill et Kethireddipalli, 2013; Cogan, 2011b).

L'incrimination de *Salmonella*, dans les cas d'intoxications alimentaires par les fromages, est devenue un événement rare. Toutefois, l'espèce la plus fréquemment impliquée dans les toxi-infections est *Salmonella enterica*, quel que soit son serovar (Montel et al., 2014; Hill et Kethireddipalli, 2013; Cogan, 2011b; InVS, 2006a). La préoccupation majeure n'est pas la salmonellose elle-même, mais l'émergence de *Salmonella* multirésistantes aux antibiotiques (Cogan, 2011b). L'origine des contaminations par *Salmonella* reste indéterminée. La dose infectieuse de *Salmonella* est relativement faible. Ainsi, pour *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Heidelberg, 100 à 500 cellules suffisent pour causer une intoxication (Hill et Kethireddipalli, 2013; Cogan, 2011b).

Par ailleurs, des études récentes ont montré que les contaminations à *E. coli* seraient dues à des failles lors de la pasteurisation ou des contaminations post-pasteurisation. Le sérovar O157:H7 reste le plus préoccupant, du fait de la production de toxines, très actives, appelées shigatoxines (Montel et al., 2014; Hill et Kethireddipalli, 2013; Cogan, 2011b). Celles-ci sont potentiellement dangereuses pour les enfants. En effet, elles provoquent d'importantes diarrhées, potentiellement sanglantes, ou des syndromes urémiques pouvant être fatals. La dose infectieuse dans les aliments est très basse, avec seulement 10 cellules (InVS, 2015b; Cogan, 2011b).

D'autres microorganismes peuvent être inquiétants, mais leurs capacités de survie dans le fromage sont limitées. Le problème reste toutefois la production de toxines, et dans une moindre mesure, la production d'amines biogènes. Ces toxines conduisent à des toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) de faible gravité, entraînant des diarrhées aiguës. Les microorganismes impliqués sont *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, ou d'autres entérobactéries, nécessitant une dose infectieuse très élevée avant de pouvoir induire une intoxication (Hill et Kethireddipalli, 2013; Cogan, 2011b; InVS, 2006b).

1.3.2. Agents d'altérations

Contrairement aux agents pathogènes, les agents d'altération sont principalement des *fungi*, particulièrement des levures (Gardini et al., 2006). Ces dernières ont été longtemps considérées comme des microorganismes indésirables dans les matrices fromagères (Tempel et Jakobsen, 1998; Jakobsen et Narvhus, 1996; Viljoen et Greyling, 1995). Chez les moisissures, quelques espèces sont clairement décrites comme indésirables, il s'agit de *Cladosporium cladosporoides*, *Penicillium commune* ou encore *Mucor ramosus* (Lavoie et al., 2012).

De manière générale, une concentration très élevée de levures conduit à l'altération du fromage. Ce constat est valable pour toutes les espèces de levures, même celles normalement impliquées dans le processus d'affinage du fromage, à l'instar de *D. hansenii* ou *K. marxianus* (Fleet, 2011; Borelli et al., 2006; Fadda et al., 2004; Viljoen et al., 2003).

Un fromage est considéré comme altéré lorsque l'on observe une décoloration, un brunissement, une production de gaz, une modification de la texture ou une modification de ses saveurs (Borelli et al., 2006; Gardini et al., 2006; Pereira-Dias et al., 2000; Viljoen et Greyling, 1995). Une forte croissance de levures peut induire des modifications physicochimiques, comme une hausse du pH ou la production de composés métaboliques secondaires, permettant alors la croissance d'espèces pathogènes déjà présentes, pouvant atteindre la dose infectieuse (El-Sharoud et al., 2009). Il existe cependant des moyens pour éviter le développement de ces agents pathogènes et d'altération.

1.3.3. Moyens de protection contre les microorganismes indésirables

Des moyens simples d'élimination des contaminations existent, comme la pasteurisation du lait et le respect des règles d'hygiène et sécurité.

Le microbiote du fromage lui-même est un moyen de contrôle efficace. En effet, il a été établi que les contaminations sont moins courantes dans les fromages au lait cru, à proportion égale, par rapport aux fromages au lait pasteurisé, du fait d'un microbiote plus équilibré (Wolfe et al., 2014; Irlinger et Mounier, 2009; Viljoen et al., 2003). La diversité du microbiote est généralement influencée par l'ajout d'une culture initiale en grande concentration, permettant de saturer le microbiote fromager et de contrôler son évolution dans le temps. L'ajout de cette culture initiale a un impact plus grand sur les fromages au lait pasteurisé, dans lequel les microorganismes naturels sont supposés être absents (Wolfe et al., 2014; Irlinger et Mounier, 2009; Viljoen et al., 2003). Il faut également considérer les interactions des microorganismes dans cet écosystème. En effet, on pourra observer l'inhibition d'espèces comme *L. monocytogenes* ou *Clostridium tyrobutyricum* par certaines BAL bactériocinogènes (Callon et al., 2014; Irlinger et Mounier, 2009; Tornadijo et al., 1998).

2. ORIGINE ET PRODUCTION DE LA TOMME D'ORCHIES

Comme précédemment indiqué, plus de 1 000 variétés de fromages sont produites dans le monde, dont plus de 400 variétés en France. Dans le cadre de ces travaux, nous nous sommes donc intéressés aux fromages de la région des Hauts-de-France, et dans un premier temps, à la Tomme d'Orchies. Une liste non-exhaustive des fromages produits dans la région est disponible dans le Tableau 5.

Tableau 5. Présentation de plusieurs fromages, et de leur type, produit dans le Nord-Pas-de-Calais

Nom	Variété	Nom	Variété
<i>Bastitin</i>	Pâte pressée non cuite	Gourguechon	Pâte molle fleurie
<i>Belval</i>	Pâte pressée non cuite	Le petit César	Pâte pressée non cuite
<i>Bergues</i>	Pâte pressée non cuite	Maloine	Pâte pressée non cuite
<i>Boule de Lille</i>	Pâte pressée non cuite	Maroilles	Pâte molle lavée
<i>Boulet de Cassel</i>	Pâte pressée non cuite	Mignon	Pâte molle lavée
<i>Boulette d'Avesnes</i>	Pâte molle lavée	Mont-des-Cats	Pâte pressée non cuite
<i>Boulette de Cambrai</i>	Frais	Pas de L'ayau	Pâte molle lavée
<i>Butte des Dunes</i>	Pâte molle lavée	Pavé du Nord	Pâte pressée cuite
<i>Ch'ti crémeux</i>	Pâte molle fleurie	Sablé de Wissant	Pâte pressée non cuite
<i>Cœur d'Arras</i>	Pâte molle lavée	Saint-Winoc	Pâte molle lavée
<i>Cœur de Wirwignes</i>	Pâte molle fleurie	Sire de Créquy	Pâte pressée cuite
<i>Crayeux de Roncq</i>	Pâte molle lavée	Sorbais	Pâte molle lavée
<i>Dauphin</i>	Pâte molle lavée	Tome de Cambrai	Pâte pressée non cuite
<i>Flamay</i>	Pâte pressée cuite	Tomme d'Opale	Pâte pressée non cuite
<i>Fleuron d'Artois</i>	Pâte molle fleurie	Tomme d'Orchies	Pâte pressée non cuite
<i>Flocon de Lait</i>	Frais	Vieux Boulogne	Pâte molle lavée
<i>Géant des Flandres</i>	Pâte pressée non cuite	Vieux Bouve	Pâte molle lavée

(Réalisé à l'aide de Bienvenue à la Ferme, 2016; Produits laitiers, 2016; Saveur en Or, 2016)

Nous pouvons remarquer une abondance des fromages pressés, à pâte non cuite, (13 fromages) et des fromages à pâte molle lavée (12 fromages). Il faut noter que ces derniers font partie de la famille du maroilles, l'emblématique fromage du Nord. Parmi tous ces fromages artisanaux, la Tomme d'Orchies présente un intérêt particulier, notamment par son processus de fabrication impliquant l'utilisation de rocou, de bière brune non filtrée et de chicorée.

La Tomme d'Orchies est un fromage fabriqué à Nomain, une agglomération située à environ 25 km de Lille (Figure 4), le chef-lieu de la région. C'est un fromage à pâte pressée non cuite, au lait de vache cru. Le lait provient de vache de race Flamande croisée avec des Brunes des Alpes, élevées sur le site de production. La ferme qui produit ce fromage n'utilise aucun organisme génétiquement modifié (OGM). La recette de la Tomme d'Orchies est basée sur celle du Saint-Paulin (Figure 5).

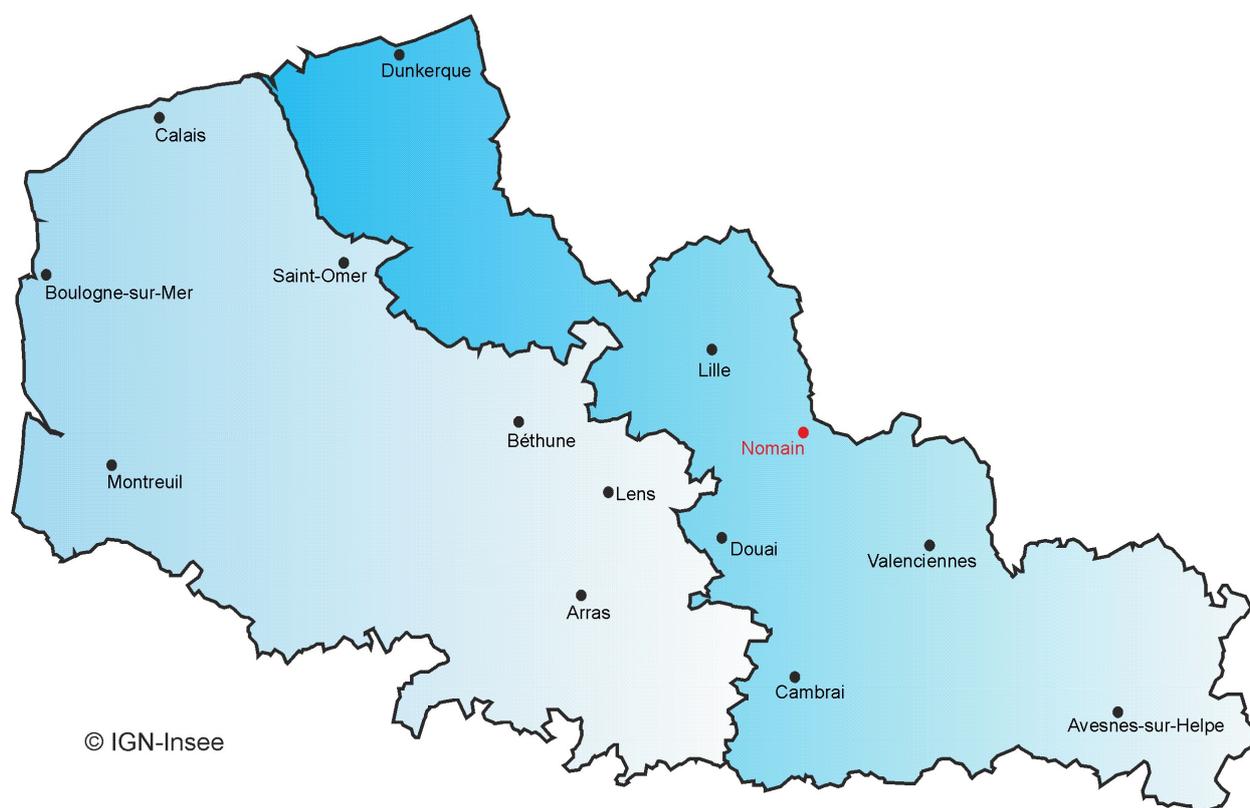


Figure 4. Localisation de la commune de Nomain par rapport aux départements Nord et Pas-de-Calais.

Les cultures initiales utilisées proviennent des laboratoires Standa (Caen, France) et sont constituées d'une souche de levure, *D. hansenii* et de plusieurs souches bactériennes, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Lb. helveticus*, *Lb. lactis* et *Propionibacterium freudenreichii*.

La chambre d'affinage contient majoritairement des Tommes d'Orchies, cependant on retrouve également des camemberts au lait de vache et des Tommes au lait de chèvre. Le Rocou utilisé dans la saumure de frottage au cours de l'affinage confère, en partie, la couleur orange caractéristique de la Tomme d'Orchies (Figure 6).

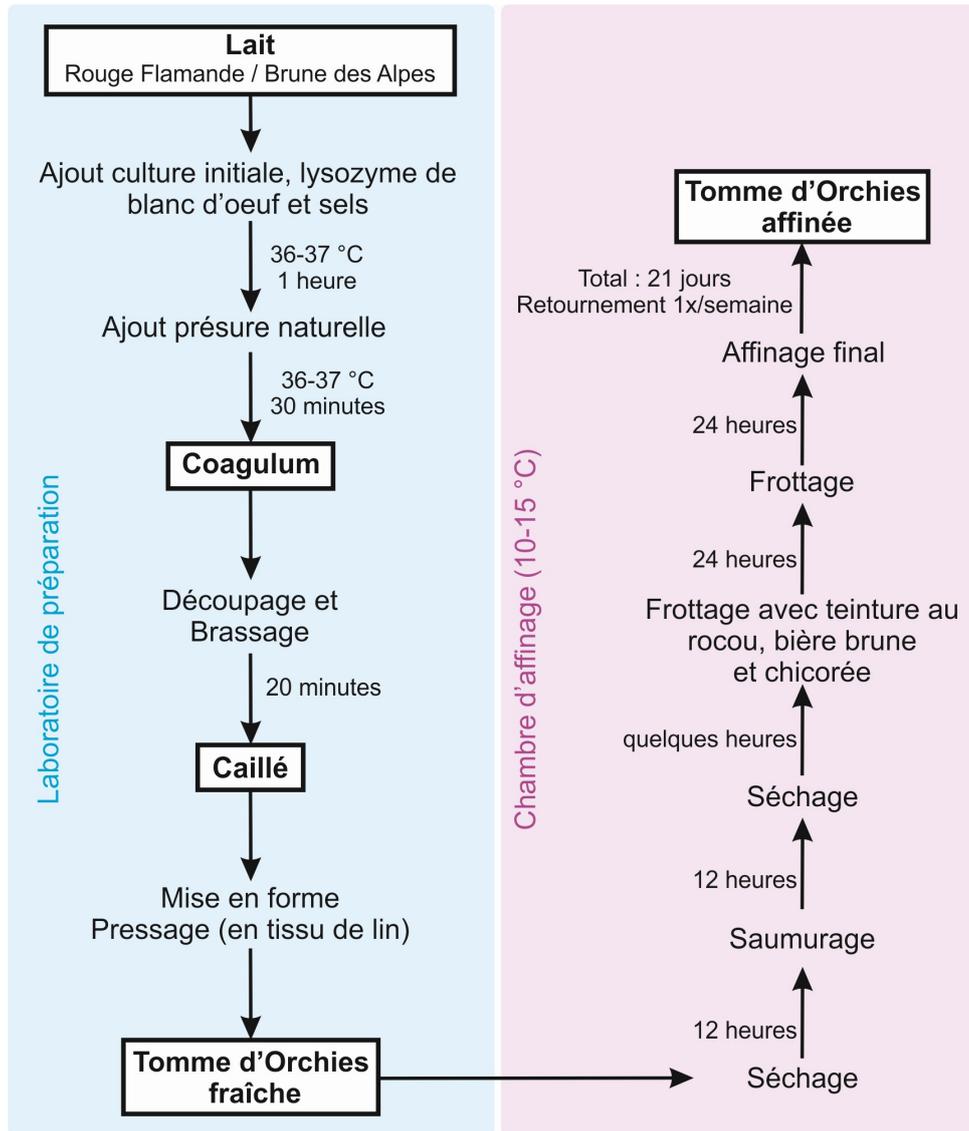


Figure 5. Résumé des différentes étapes de fabrication de la Tomme d'Orchies



Figure 6. Aspect final de la Tomme d'Orchies

3. APPROCHE MÉTAGÉNOMIQUE ET MICROBIOTES FROMAGERS

Le principe des techniques d'études des microflores (bactérienne ou fongique) est similaire pour tous les écosystèmes. Initialement, le terme métagénomique désigne l'étude d'échantillons d'ADN environnementaux (air, sol, ou eau) dans le but d'accéder aux génomes des microorganismes cultivables et viables, mais également à ceux viables mais non-cultivables (VBNC). Cette approche avait pour objectif d'identifier et de caractériser les fonctions biochimiques les plus importantes, et permettre le séquençage des génomes complets de ces microorganismes (Taberlet et al., 2012; Handelsman et al., 1998).

De nos jours, le terme métagénomique désigne l'ensemble des techniques permettant l'identification des communautés microbiennes présentes dans un échantillon, par séquençage direct de leurs ADN. L'identification des fonctions biochimiques de ces microorganismes est désormais nommée « métatranscriptomique » et cible les ARN transcrits, miroir de leurs activités métaboliques (Coughlan et al., 2015; Culligan et al., 2014; Lessard, 2014). Cette technologie ne nécessite pas de microorganismes de référence et permet donc d'identifier *de novo* toutes espèces présentes dans l'échantillon. Elle nécessite cependant le choix d'une technologie spécifique, associé à un choix d'amorces précises, sous peine de ne pas obtenir toute la microflore (Dugat-Bony et al., 2015; Delcenserie et al., 2014; Wolfe et al., 2014).

Dans le cas de l'étude d'un fromage, on sépare généralement la croûte du cœur du fromage (Figure 7), voire la partie blanche de la partie bleue dans le cas d'un fromage persillé (Delcenserie et al., 2014; Gkatzionis et al., 2014; Rademaker et al., 2005; Kaminarides et Anifantakis, 1989). Dans le cadre de notre projet, nous traiterons des microflores présentes sur la surface et dans le cœur du fromage.

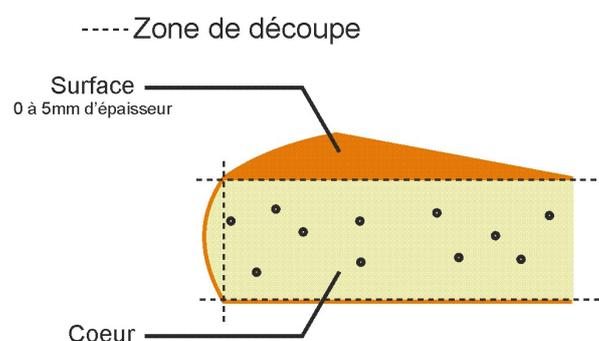


Figure 7. Schéma de coupe pour l'analyse séparée de la croûte et du cœur d'un fromage

3.1. Technologies NGS

Actuellement, quatre technologies de séquençages de nouvelle génération (NGS) sont disponibles. Ces dernières sont basées sur des techniques différentes, résumées dans le Tableau 6 (Lindahl et al., 2013; Bik et al., 2012; O'Flaherty et Klaenhammer, 2011). Le séquençage conduit à l'obtention de fragments de tailles différentes, nommées « *reads* ». Plus un « *read* » est court, moins il donne d'informations taxonomiques. D'un autre côté, plus le nombre de séquences générées est grand, plus la technologie est sensible pour détecter les organismes minoritaires (Nilsson et al., 2009). De fait, le choix de la technologie à utiliser est directement lié aux paramètres voulus par le manipulateur (Lindahl et al., 2013; Nilsson et al., 2009). Chez les levures, une longueur de séquençage supérieure à 250 bp permet une réelle identification des espèces (Bazzicalupo et al., 2013; Lindahl et al., 2013; Xu et al., 2012; Nilsson et al., 2009).

Tableau 6. Résumé des technologies NGS actuellement disponibles

Technologie	Méthodologie	Longueur des <i>reads</i>	Nombre de séquences générées
454	Pyroséquençage (Fluorescence)	~400-500 bp	~1,2 million
<i>Illumina</i>	Chimie terminale réversible	~35-150 bp	~1,6 billion
<i>SOLiD</i>	Ligation chimique	~35-75 bp	~4 billions
<i>Ion Torrent</i>	Pyroséquençage (Mesure du courant électrique)	~200 bp	~70 millions

Afin de traiter un grand nombre de cibles, ces technologies utilisent des marqueurs génétiques, ou amorces universelles, que l'on nomme codes-barres ADN (Bazzicalupo et al., 2013; Begerow et al., 2010; Hebert et al., 2003). Ces codes-barres ciblent 1 à 3 gènes permettant d'obtenir des informations sur le groupe taxonomique des ADN analysés. Aucun marqueur génétique parfait n'ayant été créé, un choix doit être fait afin de déterminer les amorces les plus aptes à l'analyse des microflores visées. L'utilisation de ces codes-barres ADN pour l'identification des microorganismes présents dans un échantillon complexe, est nommée « *métabarcoding* » (Staats et al., 2016).

Un code-barre ADN doit, dans l'idéal, posséder les caractéristiques suivantes (Lindahl et al., 2013) :

- Compatibilité avec tous les taxons du règne étudié
- Longueur appropriée pour l'amplification et le séquençage, dépendamment de la technologie NGS utilisée
- Haute inter-spécificité, pour différencier les espèces
- Basse intra-spécificité, pour ne pas différencier des souches d'une même espèce
- Amplification d'ordre similaire quelque soit la quantité d'ADN de chaque espèce présente dans l'échantillon

Cependant, aucun marqueur génétique parfait n'existe et un choix devra être fait parmi plusieurs possibilités. Il est dorénavant communément acquis que le code-barres bactérien cible l'ADNr 16 S, situé dans la petite sous-unité ribosomique (O'Flaherty et Klaenhammer, 2011; Bockelmann et al., 2005; Mounier et al., 2005). D'autre part, le code-barres pour les eucaryotes, dont font partie les *Fungi*, cible la région ITS1-5,8 S-ITS2 (Lavoie et al., 2012; Schoch et al., 2012).

La région ITS1-5,8 S-ITS2 (Figure 8) est trop longue pour être séquencée à l'aide des NGS, cependant le séquençage de la région ITS1 ou ITS2 seule est possible (Jumpponen et al., 2010; Nilsson et al., 2009). Ainsi, la région ITS2 est préférable car elle permet une meilleure identification de l'espèce, grâce à sa proximité avec la grande sous-unité ribosomique, à sa haute variabilité et à la présence d'un plus grand nombre de ressources la concernant dans les bases de données. De plus, la région ITS2 est de taille plus réduite que la région ITS1, point appréciable pour les NGS et notamment pour la technologie Illumina (Bazzicalupo et al., 2013; Lindahl et al., 2013; Nilsson et al., 2009), c'est cette dernière qui sera utilisée dans le cadre de notre projet.



(Adapté de Ihrmark et al., 2012; Toju et al., 2012)

Figure 8. Représentation schématique de la région ITS1-5,8 S-ITS2 chez les *fungi*

3.2. Technologie Illumina

Avant l'utilisation d'un séquenceur Illumina, l'amplification des échantillons d'ADN est requise. Cette amplification se fait à l'aide d'une PCR utilisant les amorces préalablement choisies par l'utilisateur, additionnées d'adaptateurs, ou queues flottantes, spécifiques à la technologie Illumina (Figure 9). Les amplicons seront fixés à une puce à ADN par l'adaptateur Illumina. La puce à ADN sera alors soumise à un flux de liquide afin de permettre les étapes suivantes.

Une amplification en phase solide est effectuée suite à la fixation (Figure 10), permettant la création de plusieurs centaines de copies identiques aux ADN de l'échantillon. Il peut alors y avoir jusqu'à 1 000 copies dans une zone de 1 μm ou moins, autour de la molécule d'ADN initial. Cette méthodologie spécifique permet l'analyse simultanée d'environ 10 millions de molécules d'ADN par cm^2 .

Une fois la fixation et l'amplification terminées, la phase de séquençage proprement dite peut avoir lieu. Un nouveau cycle d'amplification est amorcé, à chaque cycle d'amplification un seul type de nucléotide – A, T, G ou C, additionné d'un radical fluorescent, est incorporé. Une fois le nucléotide incorporé, un laser excite le composé fluorescent et une image de très haute résolution de la puce est prise afin de déterminer quels sont les échantillons ayant incorporé le nucléotide. Le radical fluorescent est clivé par voie enzymatique puis un autre type de nucléotide fluorescent est incorporé. Une nouvelle image de la puce est prise, et l'on peut alors déterminer quels sont les échantillons ayant incorporé le nouveau nucléotide. Ainsi, cycle par cycle, nucléotide par nucléotide, image par image, la séquence des échantillons analysés pourra être déterminée.

Les adaptateurs spécifiques à cette technologie étant multiples, plusieurs échantillons d'ADN, d'origines différentes peuvent être analysés en même temps, les différentes séquences des adaptateurs, permettront de différencier les échantillons entre eux. De même, un échantillon d'ADN total, comprenant plusieurs séquences différentes, peut être analysé une seule fois. Chaque molécule se fixant sur une zone précise de la puce, et étant amplifiée spécifiquement avant le séquençage. Il est théoriquement possible de déterminer les séquences de tous les ADN présents dans un échantillon.

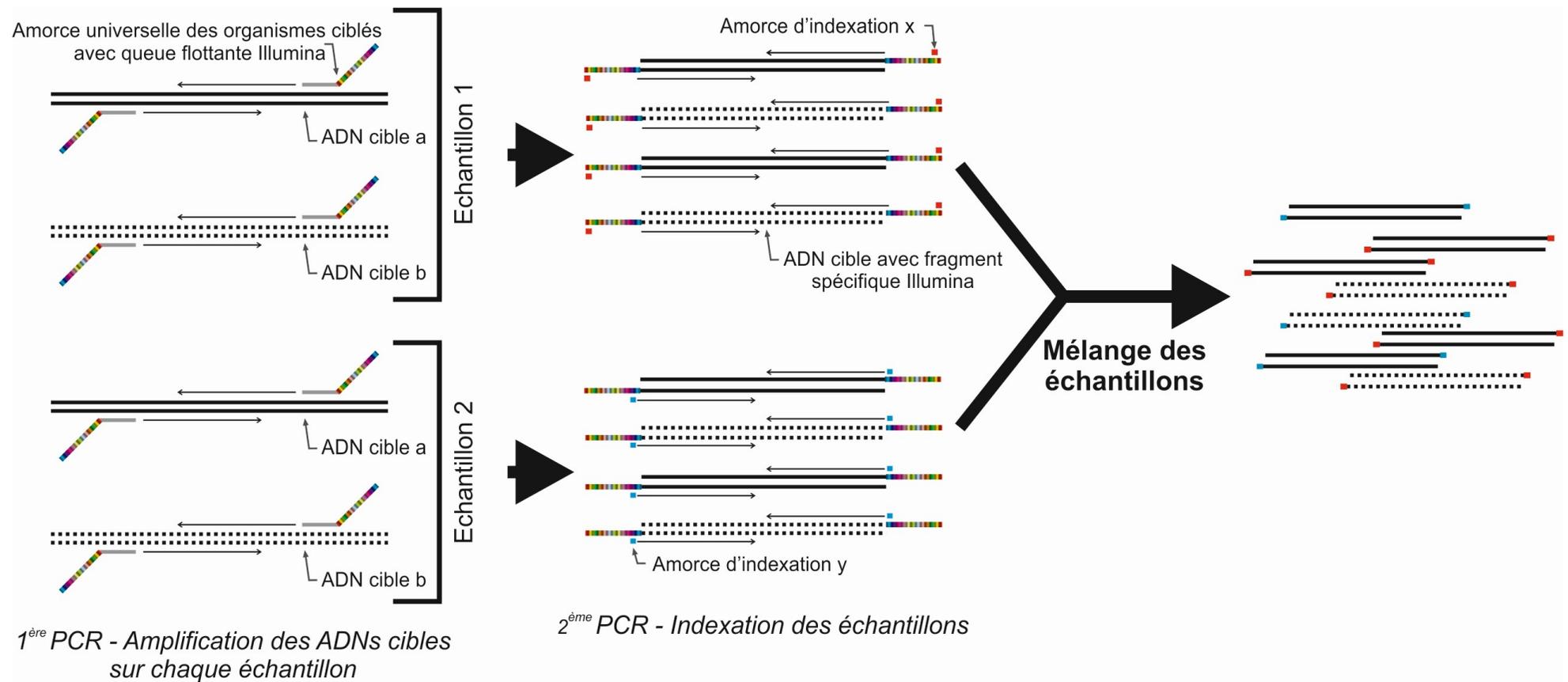
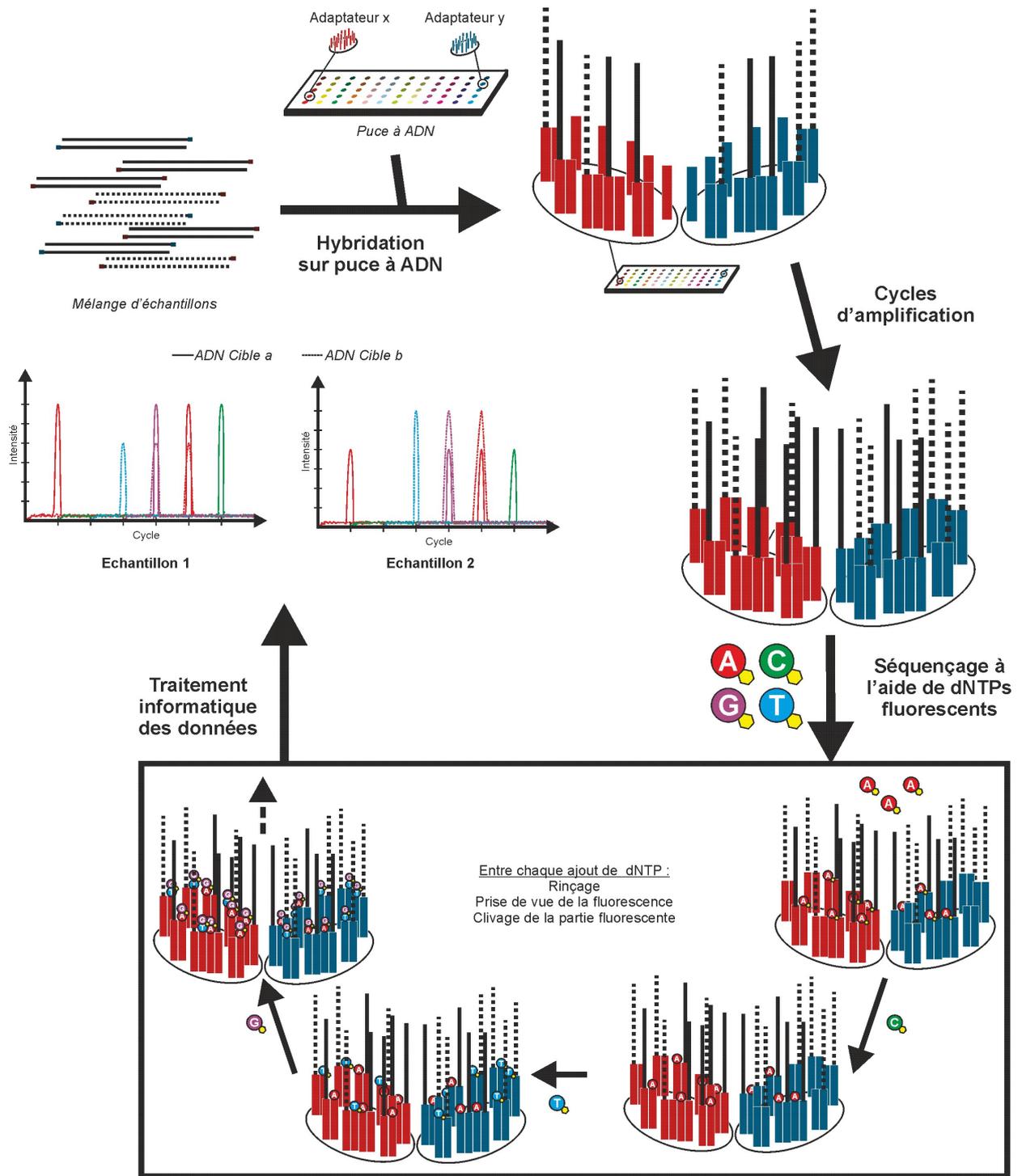


Figure 9. Étape préliminaire du séquençage Illumina

Les différents échantillons sont préalablement traités séparément, à l'aide d'une amorce universelle pour les organismes recherchés. Cette amorce est elle-même additionnée d'une queue flottante spécifique de la technologie Illumina. Une fois la 1^{ère} PCR effectuée, permettant l'amplification des ADN cibles, une 2^{ème} PCR d'indexation est effectuée. Pour chaque échantillon, une amorce unique sera utilisée afin d'obtenir les ADN d'intérêt, additionnés d'un fragment spécifique à la technologie Illumina. Les différents échantillons seront mélangés dans une même solution après ces deux PCR.



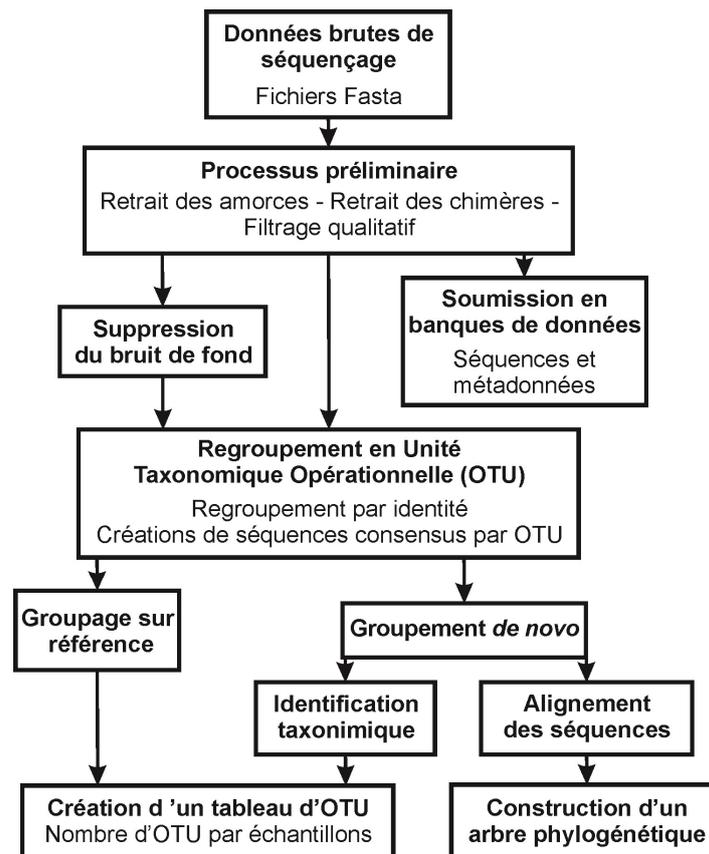
(Réalisé à l'aide de Diaz-Sanchez et al., 2013)

Figure 10. Schématisation du séquençage Illumina

Les ADNs à analyser sont fixés à la puce à ADN par hybridation aux adaptateurs Illumina présents sur la puce. Des cycles d'amplification permettent d'augmenter le nombre de fragments d'ADN cibles présents par spot. Cette étape améliore la sensibilité du séquençage. L'ajout de dNTPs comportant un groupement fluorescent suit l'amplification. Après chaque ajout de dNTP, type par type, un rinçage, une photographie de la fluorescence pour analyse de la séquence, et une lyse du groupement fluorescent sont effectués. Le processus se répète jusqu'à la fin du séquençage. Les séquences des différents ADN présents dans les échantillons pourront alors être déterminées. Les différents ADN seront différenciés grâce à leur séquence, et les échantillons grâce aux adaptateurs spécifiques Illumina.

3.3. Traitement bio-informatique des données

Quels que soient les règnes microbiens étudiés, la génération d'un grand nombre de données nécessite l'utilisation d'algorithmes et de processus permettant leur traitement. On pense notamment aux processus permettant l'analyse des données de séquençage qui nécessitent de nombreuses étapes de traitement. Le déroulement général de ce processus est visible dans la Figure 11 (Bik et al., 2012; O'Flaherty et Klaenhammer, 2011).



(adaptée de Bik et al., 2012)

Figure 11. Processus de traitement bio-informatique des données issues d'analyses métagénomiques

Toutes ces analyses peuvent être effectuées automatiquement grâce à des « pipelines » préprogrammés disponibles sur internet (Xu et al., 2012; Tedersoo et al., 2010).

La quantification est possible en rapportant le nombre de séquences par unité taxonomique opérationnelle (OTU), sur le nombre total de séquences présentes dans les OTUs. Plusieurs copies du gène séquencé pouvant se trouver dans une même cellule et l'amplification n'étant jamais parfaite, la quantification sera relative et non absolue. Par conséquent, les pourcentages obtenus ne pourront être mis en relation avec la biomasse qu'avec précaution (Lindahl et al., 2013).

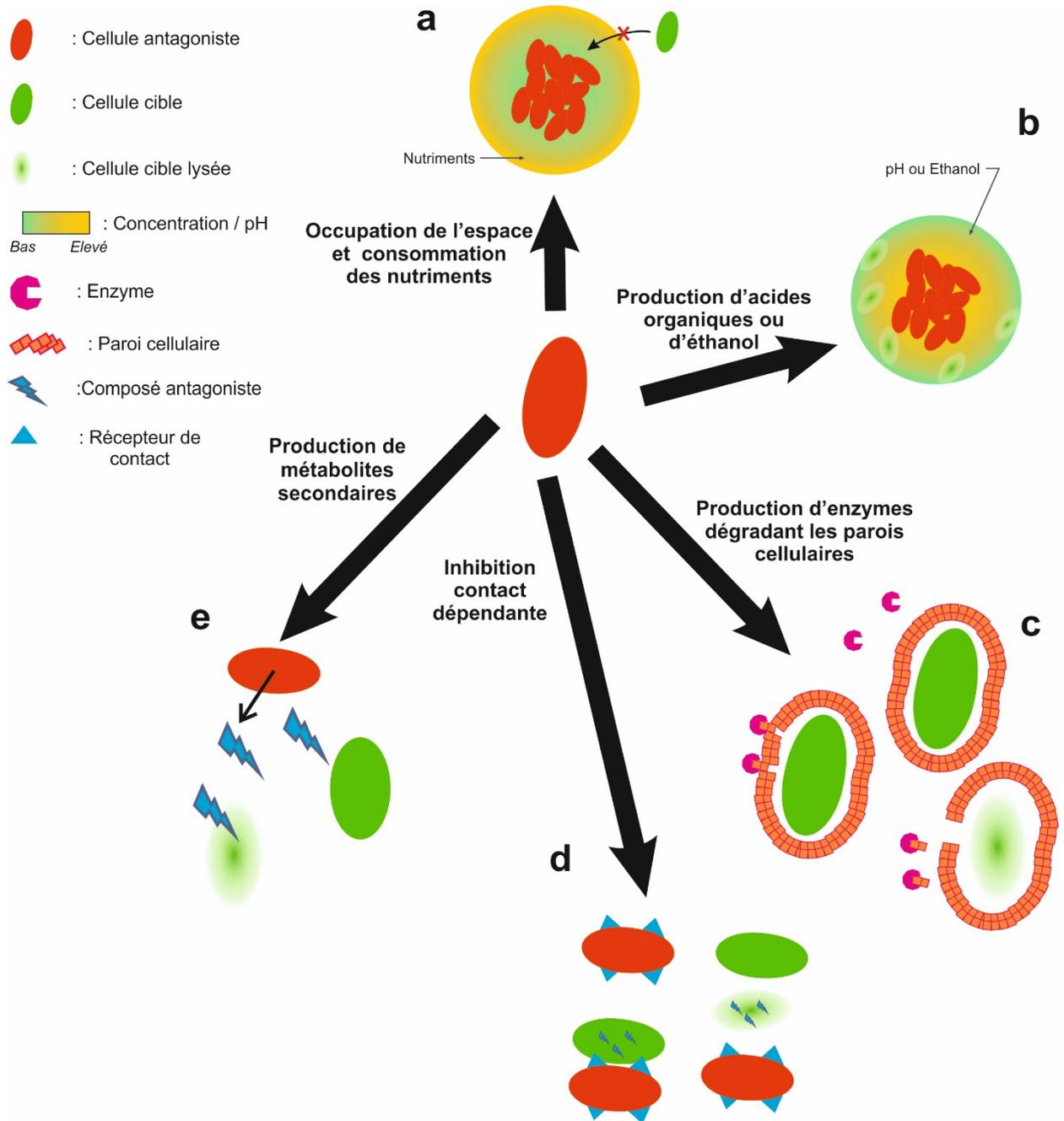
4. MICROORGANISMES ANTAGONISTES

D'un point de vue étymologique, le terme antagonisme définit une opposition entre deux éléments distincts. Transposé dans un contexte biologique, l'antagonisme est défini comme une opposition entre deux organismes, organes ou substances, l'un des opposants pouvant induire l'inhibition de l'autre. L'élément montrant le pouvoir inhibiteur est alors défini comme étant l'élément antagoniste (Larousse, 2016).

Dans la nature, les microorganismes d'un même écosystème coexistent et présentent des interactions (Bianchini, 2015), qui peuvent avoir un impact sur la composition et l'évolution de l'écosystème ou sur leurs hôtes (Willett et al., 2015; Korres et al., 2011). Les microorganismes antagonistes ont la capacité d'inhiber, un ou plusieurs autres microorganismes qui ne sont pas nécessairement phylogénétiquement proches (Willett et al., 2015). Cette inhibition peut être biostatique et entraîner l'arrêt ou la diminution de la vitesse de croissance du microorganisme adverse ou être biocide, c'est-à-dire, éliminant l'organisme adverse. La compréhension des activités antagonistes est très importante pour permettre le contrôle des souches indésirables (d'altération ou pathogènes) au sein d'un écosystème microbien (Winkelströter et al., 2015; Korres et al., 2011; Cocolin et al., 2009).

4.1. Mécanismes antagonistes

Il existe plusieurs mécanismes d'antagonisme impliquant la production de molécules dotées d'activités antimicrobiennes, la compétition nutritionnelle, et l'exclusion compétitive (Figure 12). Les mécanismes d'antagonismes ont été largement étudiés chez les bactéries (Cavera et al., 2015; Willett et al., 2015; Hatoum et al., 2013) alors que les études concernant l'antagonisme des levures restent limitées (Morse et al., 2015; Hatoum et al., 2012).



(Basé sur Cavera et al., 2015; Willett et al., 2015; Hatoum et al., 2013)

Figure 12. Schéma des différents mécanismes d'antagonisme

a : Compétition nutritionnelle et spatiale. **b** : Inhibition par modification des paramètres physicochimiques du milieu. **c** : Dégradation enzymatique des parois cellulaires. **d** : Inhibition contact dépendante, ou CDI. **e** : Production de métabolites secondaires à activité antagoniste.

4.1.1. Compétition nutritionnelle et spatiale

Dans ce mécanisme, l'organisme antagoniste consomme les nutriments du milieu (Figure 12a). La consommation d'un (ou plusieurs) nutriment(s) pourra être plus rapide que chez les autres acteurs de la microflore, conférant un avantage. Le microorganisme antagoniste pourra également consommer un nutriment non utilisable par les autres acteurs de l'écosystème (Bianchini, 2015; Hatoum et al., 2012, 2013). Cette consommation permet une croissance plus rapide du microorganisme antagoniste, voire une réduction de la croissance des autres microorganismes, par limitation des nutriments disponibles. De plus, une croissance rapide permet à l'organisme antagoniste de mieux occuper, physiquement, la niche écologique (Figure 13), empêchant ainsi la colonisation de l'espace par un autre microorganisme (El-Tarabily et Sivasithamparam, 2006).

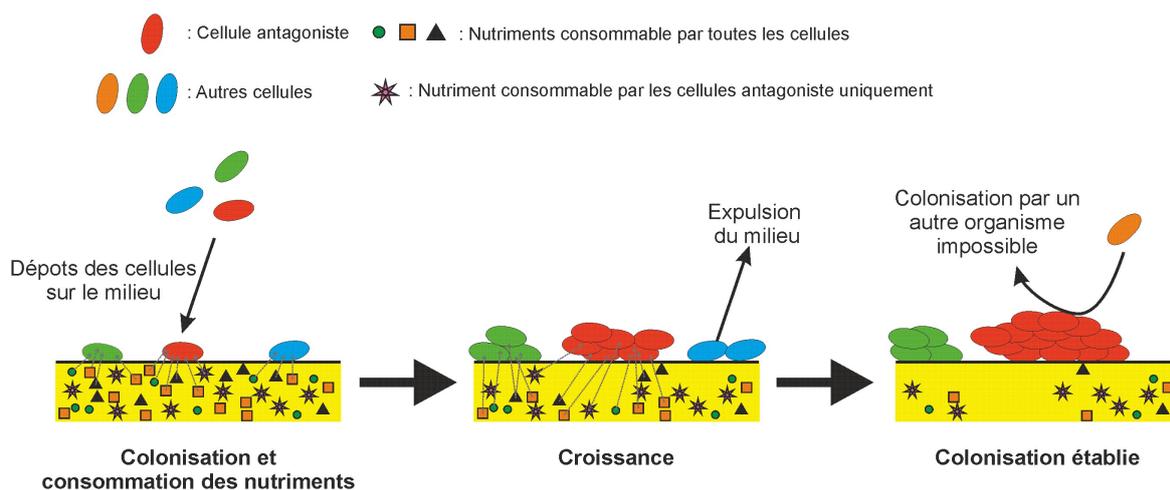


Figure 13. Représentation du mécanisme d'antagonisme par compétition pour les nutriments et l'espace.

Lors de la phase de colonisation, le microorganisme antagoniste en forme d'ovale rouge pourra consommer un nutriment donné plus rapidement, illustré en carré orange, que les autres microorganismes décrits en formes ovales de couleurs vertes et bleues. Il sera éventuellement capable de consommer un nutriment non consommé par les autres microorganismes (étoiles violettes). Il pourra ainsi présenter une croissance plus rapide que les autres organismes (ovales verts), voire les expulser du milieu (ovales bleus). La consommation continue des nutriments lui permettra de coloniser le milieu de façon plus efficace et plus étendue, tout en limitant la disponibilité des nutriments pour les autres microorganismes. Cette colonisation pourra ainsi prévenir la colonisation par des microorganismes extérieurs déclinés en forme ovale et de couleur orange.

Il est nécessaire de noter que tous les microorganismes sont capables de dégrader des composés et nutriments non utilisables par d'autres, avec des vitesses d'assimilation variables.

4.1.2. Modifications physicochimiques

Ce mécanisme est relié à la production de métabolites secondaires, généralement des acides organiques ou de l'éthanol (Figure 12b). Selon les composés produits, les organismes acido-sensibles ou sensibles à l'éthanol seront inhibés (Figure 14). La souche responsable de cet antagonisme est elle-même tolérante aux changements qu'elle induit (Hatoum et al., 2012, 2013).

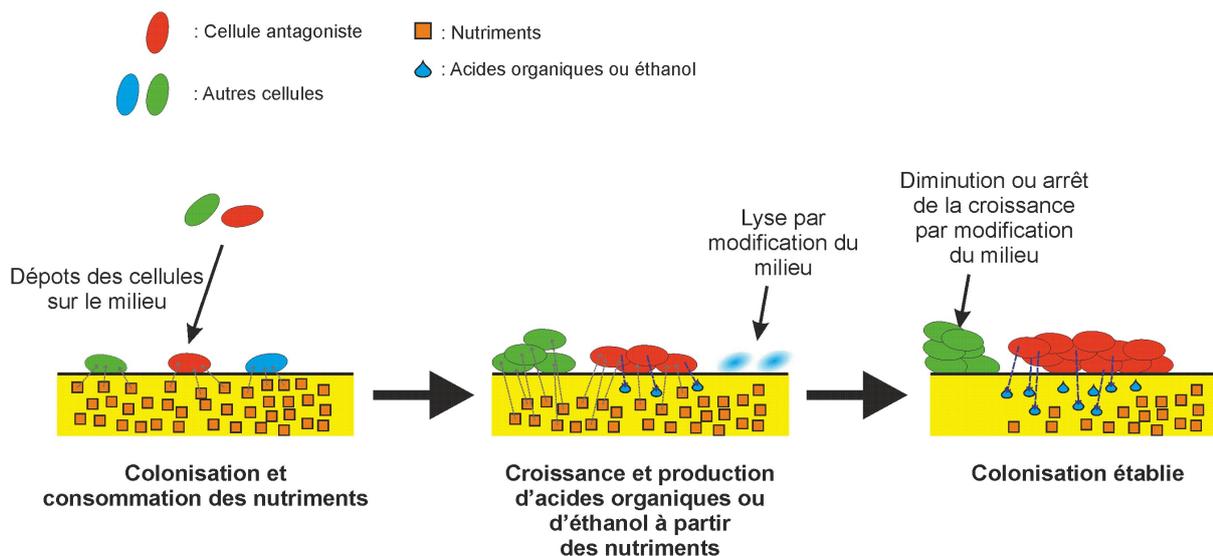


Figure 14. Représentation schématique du mécanisme d'antagonisme par modification physicochimique du milieu via la production de métabolites secondaires.

Lors de la phase de colonisation, les microorganismes consommeront des nutriments en forme carrée et de couleur orange. Les microorganismes antagonistes en forme ovale et de couleur rouge produiront, lors de la consommation des nutriments, des acides organiques et/ou de l'éthanol (gouttes bleues). Ces métabolites viendront modifier les propriétés physicochimiques du milieu, soit le pH, via les acides organiques, ou la concentration en éthanol. Les modifications pourront induire la lyse de certains microorganismes (ovales bleus), ou pourront ralentir ou arrêter la croissance d'autres organismes (ovales verts).

La production de ces métabolites est directement reliée au métabolisme fermentatif des microorganismes producteurs (Goldberg et Rokem, 2009).

D'une manière générale, les deux mécanismes d'antagonisme cités ci-dessus (points 4.1.1 et 4.1.2), ont un champ d'action peu spécifique. Ils peuvent théoriquement agir sur tous microorganismes, dès que la consommation des nutriments ou que la concentration en métabolites secondaires nécessaire est atteinte. Les autres mécanismes d'actions présentées ci-dessous présentent un champ d'action plus spécifique.

4.1.3. Composés enzymatiques

La production d'enzymes agissant directement sur d'autres microorganismes est également décrite comme un mécanisme d'antagonisme (Figure 12c). Ce type d'antagonisme est plus fréquemment dirigé contre les microorganismes fongiques. À titre d'exemples, nous pouvons citer la production de chitinase ou de β -1-3-glucanase, induisant la lyse de la paroi cellulaire *et in fine* la mort de la cellule cible (El-Tarabily et Sivasithamparam, 2006; İzgü et al., 2006).

4.1.4. Inhibition par contact

Au cours de la dernière décennie, un autre type d'antagonisme a été décrit chez *Escherichia coli*. Cet antagonisme est nommé inhibition contact dépendant, ou CDI (Willett et al., 2015; Aoki et al., 2010). La compréhension de ce mécanisme d'inhibition reste à établir (Aoki et al., 2010), même si certaines études lui ont attribué un rôle significatif dans les communautés microbiennes (Ruhe et al., 2013). Les cellules dotées d'une activité CDI peuvent inhiber les cellules sensibles voisines, de la même espèce, par contact direct associé au transfert d'éléments toxiques (Figure 12d). Les cellules montrant un pouvoir CDI sont elles-mêmes immunisées contre leur propre pouvoir CDI (Morse et al., 2015; Willett et al., 2015; Ruhe et al., 2013).

4.1.5. Métabolites antagonistes

4.1.5.1. Généralités

Les métabolites antagonistes sont généralement solubles et diffusibles, permettant une interaction avec les cellules sensibles à distance de la cellule productrice. Il existe également des composés antagonistes volatils identifiés comme des naphthalènes, des terpénoïdes ou divers esters (Faith et al., 2015). Plusieurs types de métabolites antagonistes sont connus :

- Les bactériocines et les mycocines
- Les protéines non-ribosomales et les polycétides
- Les sophorolipides
- Les acides et les enzymes à activités spécifiques

Les métabolites antagonistes de nature peptidiques sont nommés peptides antimicrobiens, ou AMP. Les AMPs sont produits par une large variété de cellules vivantes, voire toutes les cellules vivantes incluant bactéries, cellules eucaryotes mammifères, insectes, invertébrés, et cellules végétales (Reddy et al., 2004). Pour cela, des bases de données sont consacrées aux AMPs. Ainsi, à la fin de l'année 2016, la base de données ADP (Antimicrobial Peptide Database) comptabilisait plus de 2 742 AMPs avec des activités antagonistes et d'autres fonctions biologiques incluant des activités antimicrobiennes, antiparasitaires, anti-oxydantes, anti-biofilm, etc. Par ailleurs, la base de données CAMP (Collection of Anti-Microbial Peptides) comptabilisait, à la même période de l'année, 1 386 peptides à activité antimicrobiennes uniquement (Waghu et al., 2016; Wang et al., 2016).

Tous ces métabolites antagonistes présentent des mécanismes d'actions différents (Figure 15 et Figure 17) aboutissant à la mort cellulaire (Hatoum et al., 2013; Belguesmia et al., 2011; Naghmouchi et al., 2011b).

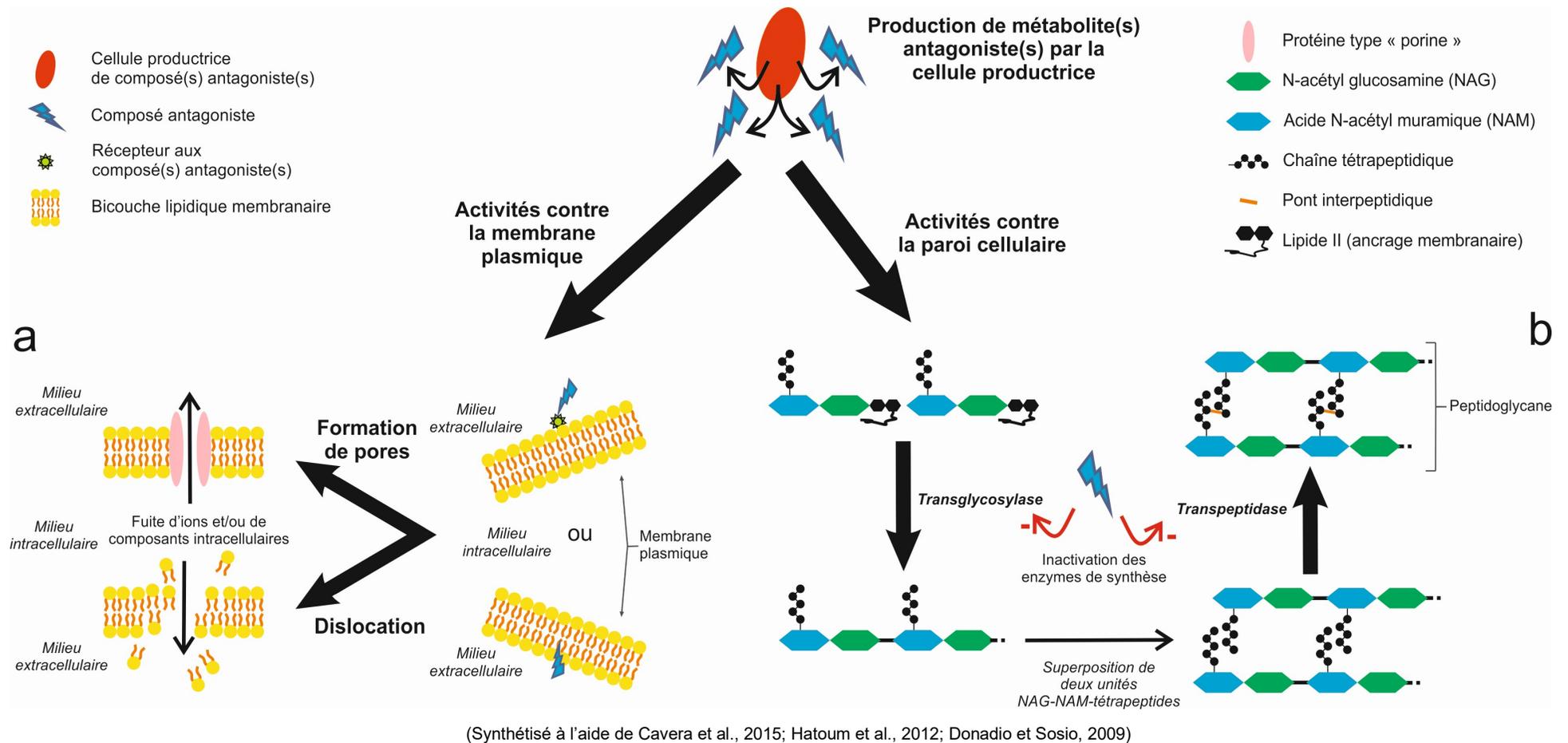
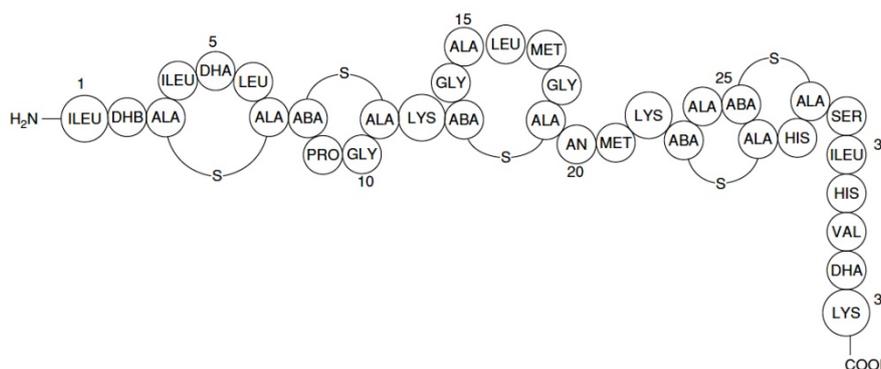


Figure 15. Représentation schématique des mécanismes d'action des composés antagonistes agissant sur la membrane plasmique ou la paroi bactérienne.

Les mécanismes d'action présentés ici ont généralement un effet inhibiteur immédiat, par lyse de la cellule cible. **a** : Les composés antagonistes peuvent interagir directement avec la bicouche lipidique, ou avec un récepteur membranaire. L'interaction conduit, soit à la formation de pores membranaires, soit à la dislocation de cette dernière par polarisation ou désorganisation des phospholipides de la membrane. Dans les deux cas, ces perturbations conduisent à la fuite d'ions et/ou d'éléments intracellulaires. **b** : Les composés antagonistes peuvent inactiver les enzymes responsables de la synthèse du peptidoglycane, notamment la transglycosylase permettant la liaison β 1-4 entre le N-acétyl glucosamine (NAG) et l'acide N-acétyl muramique (NAM) ou la transpeptidase permettant la liaison interpeptidique entre les chaînes tétrapeptidiques.

4.1.5.1. Bactériocines et mycocines

Les bactériocines sont des peptides antimicrobiens, ou AMP, synthétisés par voie ribosomique. A l'instar des antibiotiques, les bactériocines peuvent être bactéricides ou bactériostatiques (Riley, 2009). Les bactériocines peuvent avoir des activités dirigées contre des souches phylogénétiquement proches de la souche productrice (spectre étroit) ou contre des souches taxonomiquement éloignées de la souche bactériocinogène (spectre large), comme la nisine A (Figure 16) (Ahmad et al., 2016; Cavera et al., 2015; Perin et al., 2015; Riley, 2009). Il faut noter que la nisine est la bactériocine la plus connue et la seule autorisée comme additif alimentaire sous le code E234. Il existe plusieurs variants de la nisine : variants A, Z, Q produits par des souches de *Lactococcus lactis*, et un variant U produit par *Streptococcus uberis* (Naghmouchi et al., 2011a).



(Issue de Williams et Delves-Broughton, 2003)

Figure 16. Représentation de la composition en acides aminés de la nisine A.

Abréviation utilisée pour les acides aminés non usuels. ABA : Acide aminobutyrique ; DHA : Dehydroalanine ; DHB : Dehydrobutyryne ; ALA-S-ALA : Lanthionine ; ABA-S-ALA : β -methyllanthionine.

Les bactériocines sont produites par les bactéries à Gram-positif et à Gram-négatif (Ahmad et al., 2016; Drider et Rebuffat, 2011; Riley, 2009). Actuellement, les informations générées sur les bactériocines sont contenues dans la base de données BACTIBASE (Hammami et al., 2007).

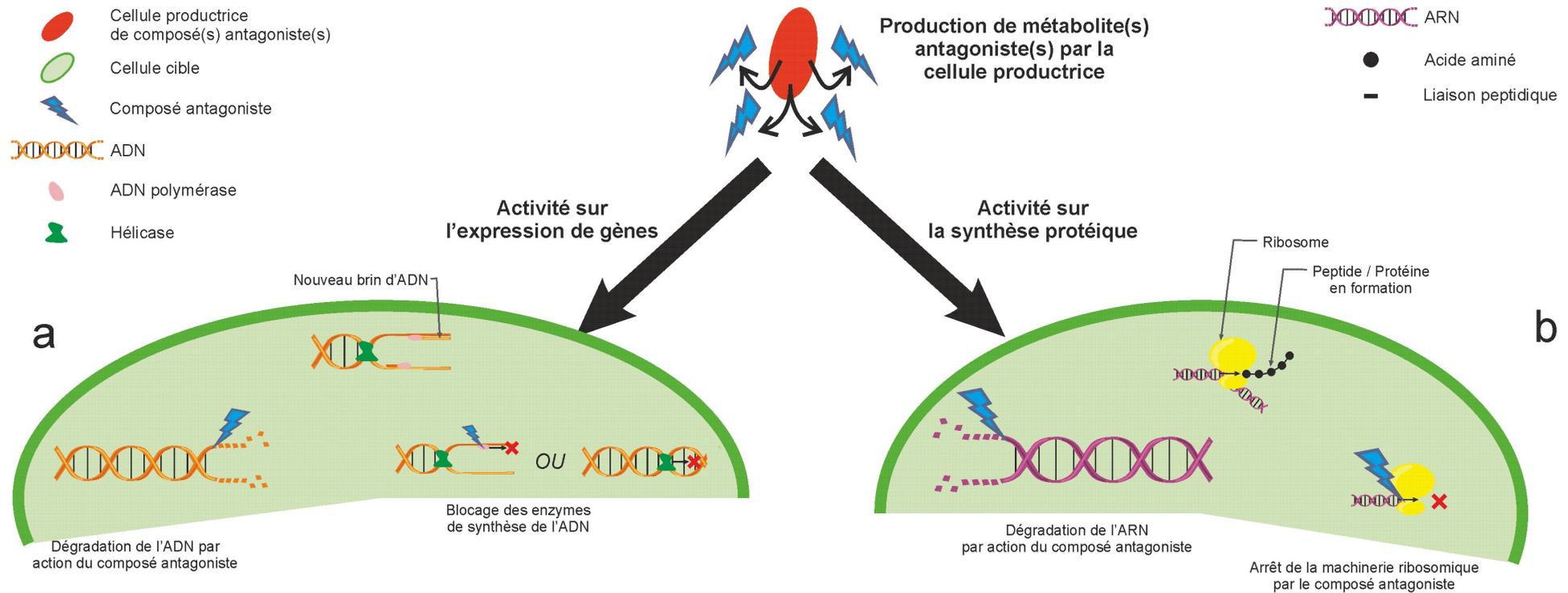
4.1.5.1.1. Bactériocines produites par les bactéries à Gram-négatif

Les bactériocines représentatives des bactéries à Gram-négatif sont les colicines et les microcines, produites par les entérobactéries. Ces bactériocines, dont les colicines, sont des protéines inhibant les souches cibles par différents mécanismes incluant selon Riley (2009) :

- La dislocation ou formation de pores dans la membrane cytoplasmique (Figure 15a).
- Le blocage de la synthèse du peptidoglycane ou de la membrane externe (Figure 15b).
- La dégradation ou blocage des enzymes de synthèse de l'ADN (Figure 17a).
- Le blocage de la synthèse protéique par action sur l'ARN ou sur les ribosomes (Figure 17b).
- Le blocage de la synthèse macromoléculaire via un arrêt de la respiration.

Ce modèle de bactériocines peut agir par translocation du milieu extracellulaire vers le milieu intracellulaire. En effet, cette translocation peut s'effectuer via la fixation à des récepteurs de surface spécifiques, comme les récepteurs Toll ou TonB qui reconnaissent les colicines (Riley, 2009).

La production des bactériocines par les bactéries à Gram-négatif est particulière. Dans des conditions de stress, seulement une faible proportion de cellules productrices est capable de synthétiser ces molécules. Les cellules devront alors s'autolyser afin de libérer leurs toxines et inhiber les cellules voisines sensibles. Les autres cellules capables de produire ces bactériocines, mais non lysées, sont elles-mêmes résistantes aux toxines libérées (Riley, 2009). D'un point de vue structurel, les bactériocines produites par les bactéries à Gram-négatif sont similaires entre-elles et sont proches des colicines. Ce sont des protéines comprenant trois domaines fonctionnels distincts, l'une pour la reconnaissance du récepteur, un autre pour la translocation de la protéine et le dernier dédié à l'activité toxique (Riley, 2009).



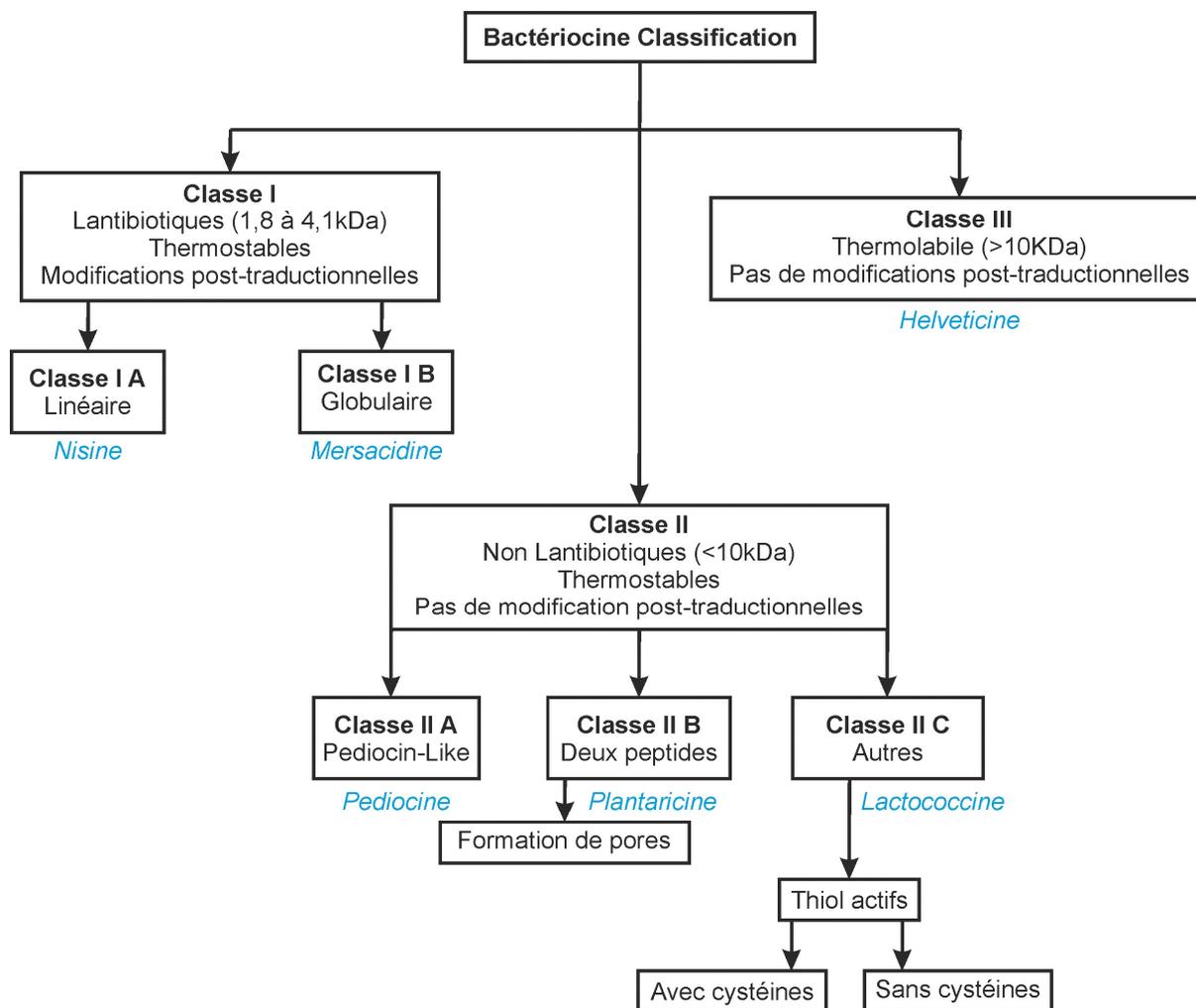
(Synthétisé à l'aide de Cavera et al., 2015; Hatoum et al., 2012)

Figure 17. Représentation schématique des mécanismes d'actions des composés antagonistes agissant sur l'ADN et sur la synthèse protéique

Les mécanismes d'action ci-dessus ont un effet rapide, mais non immédiat, par disparition progressive de composés indispensables à la survie et/ou à la duplication des cellules cibles. **a** : Les composés antagonistes peuvent interagir sur l'expression génétique par divers processus. La dégradation de l'ADN empêche la transcription des gènes. Le blocage des enzymes de réplication de l'ADN, par action sur les ADN polymérases ou sur l'hélicase, induit le blocage de la division cellulaire, mais également la transcription de certains gènes. **b** : La dégradation de l'ARN inhibe également l'expression de gènes, cependant cette inhibition intervient plus fortement sur la synthèse protéique. La synthèse protéique peut également être inhibée par un composé antagoniste lorsque ce dernier bloque la traduction des ARNm en protéines, effectuée par les ribosomes.

4.1.5.1.2. Bactériocines produites par les bactéries à Gram-positif

Les bactériocines produites par les bactéries à Gram-positif sont classées en 3 groupes, selon certains paramètres physico-chimiques comme le poids moléculaire, la thermostabilité et la présence ou non de modifications post-traductionnelles (Figure 18). Une quatrième classe est parfois proposée dans certaines classifications, celle-ci comprend des bactériocines complexes contenant des lipides et des glucides (Ahmad et al., 2016; Cavera et al., 2015; Balciunas et al., 2013; Drider et Prévost, 2009).



(Adapté de Ahmad et al., 2016; Balciunas et al., 2013; Drider et Prévost, 2009)

Figure 18. Classification des bactériocines

Les indications bleues sont des exemples de bactériocines présentes dans les classes indiquées dans la case au-dessus

Les bactériocines produites par les bactéries à Gram-positif sont plus variées et abondantes que celles produites par les bactéries à Gram-négatif. Les bactériocines issues de bactéries à Gram-positif ressemblent aux AMP produits par les cellules eucaryotes, qui possèdent une structure cationique. Elles agissent essentiellement par perméabilisation membranaire suivant une interaction électrostatique, libérant les éléments vitaux de la cellule et entraînant la lyse de celle-ci, sauf pour la classe III qui présente des modes d'action plus variés (Riley, 2009).

La sécrétion des bactériocines issues de bactéries à Gram-positif n'implique pas la lyse de la cellule productrice. En effet, ces dernières sont synthétisées puis sécrétées via des mécanismes de transports spécifiques. La production de ces bactériocines est associée à la transition entre la phase exponentielle de croissance et la phase stationnaire. Cette production n'est pas dépendante du cycle cellulaire, mais plutôt de la densité cellulaire (Riley, 2009).

4.1.5.1.3. Mycocines

De manière hative, les mycocines pourraient être assimilées aux bactériocines. Elles sont reconnues comme communes chez la levure, spécialement dans les populations à haute densité (Golubev et al., 2002). Ces mycocines, appelées toxines K ou encore « Killer Toxin », sont des protéines ou glycoprotéines sécrétées, composées de deux ou trois sous-unités (Hatoum et al., 2013; Arzumanian et al., 2009; Guyard et al., 2002a; Golubev, 1998). Leurs poids moléculaires sont compris entre 10 et 20 kDa. Certaines mycocines glycoprotéiques peuvent avoir un poids moléculaire beaucoup plus élevé, comme celles de *Kluyveromyces lactis* et *Pichia anomala*, dont le poids moléculaire est supérieur à 100 kDa (Guyard et al., 2002b; Golubev, 1998). Ces mycocines présentent une instabilité aux variations thermiques et de pH, ce qui les éloigne des bactériocines (Lowe et al., 2000).

Le mode d'action des mycocines s'observe par une augmentation de la perméabilité aux protons chez les cellules sensibles et par la formation de canaux ioniques perméables dans la membrane cytoplasmique (Figure 15a). La formation de ce type pore induit une modification du potentiel électrochimique des cellules, conduisant à leur lyse (Golubev, 1998).

Le spectre d'activité des mycocines est restreint aux souches phylogénétiquement proches de la souche productrice (Hatoum et al., 2013; Lowes et al., 2000), rappelant le spectre de certaines bactériocines produites par les bactéries à Gram-positif. Toutefois des études ont montrées que certaines mycocines peuvent être actives contre d'autres *fungi* (Starmer et Lachance, 2011; Guyard et al., 2002a), voire même être antibactériennes. Toutefois, pour être considérée comme une mycocine, la molécule doit impérativement présenter une activité antifongique (Perin et al., 2015; Hatoum et al., 2013).

La bibliométrie montre que les mycocines sont moins étudiées que les bactériocines (Bajaj et al., 2013). Une recherche simple sur la base de données NCBI en utilisant le mot-clef « mycocin » conduit à 26 publications à partir de 1997 (NCBI, 2016a), alors que la combinaison des mots clefs « (Yeast AND (mycocin OR "Killer toxin")) NOT NK » conduit à 257 publications. En revanche, l'utilisation de « bacteriocin » comme mot-clef dans cette base de données se traduit par au moins 8507 publications, à partir de 1945 (NCBI, 2016b). Au cours des années, l'intérêt porté aux bactériocines, tant sur le plan fondamental que sur les applications agro-alimentaires et médicales, a augmenté de manière très significative (Figure 19), alors que le nombre d'études afférentes aux mycocines est restée stable (Figure 20).

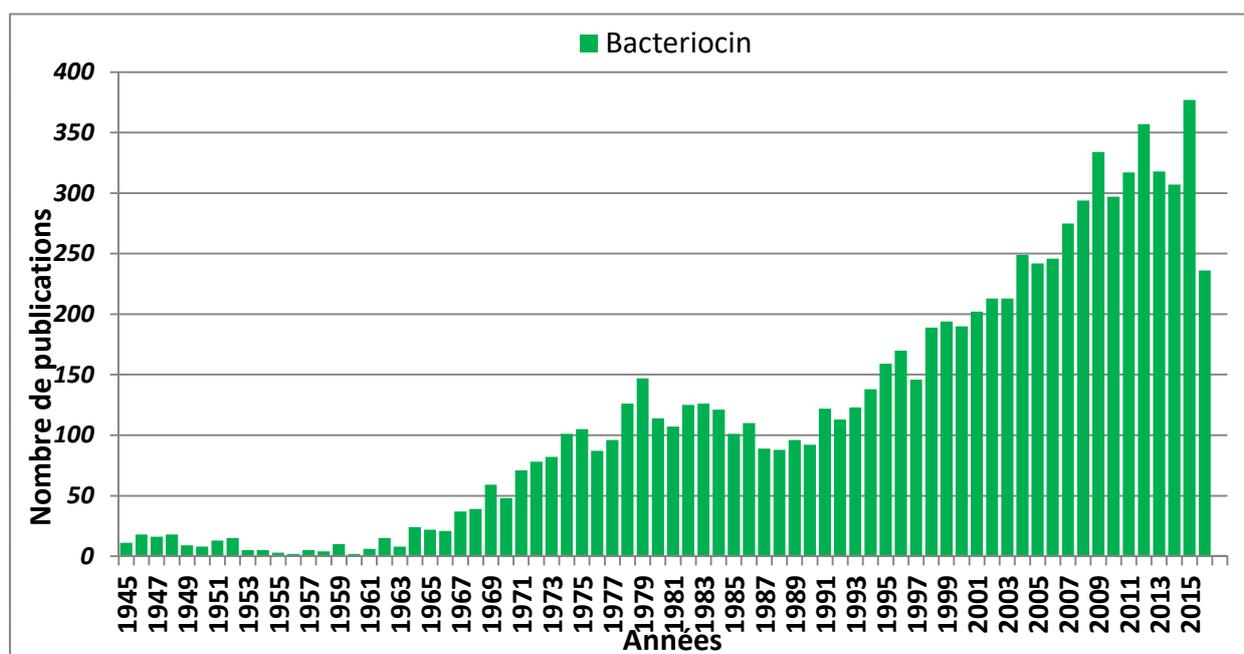


Figure 19. Nombre de publications sur NCBI concernant les bactériocines au cours du temps

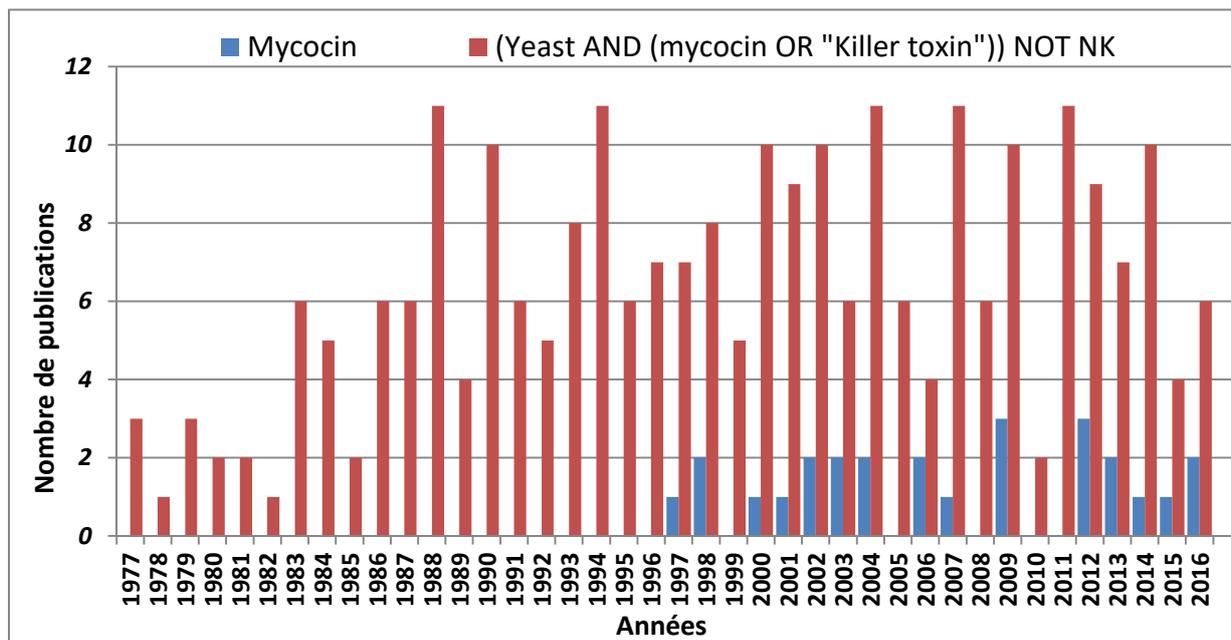
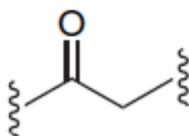


Figure 20. Nombre de publications sur NCBI concernant les mycocines au cours du temps

4.1.5.2. NRP et polycétides

Certains composés antagonistes sont synthétisés par voie non ribosomique, les peptides non-ribosomiques (NRP) et les polycétides (PK) sont constitués d'unités cétides (Figure 21).



(Extrait Ridley et Khosla, 2009)

Figure 21. Représentation semi-développée d'une unité cétide

C'est dans cette famille que l'on retrouve la majorité des antibiotiques utilisés actuellement en thérapeutique. Les NRP sont de nature peptidique et possèdent parfois des modifications post-traductionnelles, comme des glycosylations. On retrouve dans ce répertoire, la vancomycine ou la daptomycine. Les PK sont constitués de condensation de précurseurs d'acyle-thioester, à l'instar de l'érythromycine (Figure 22), de la tétracycline ou encore de la lovastatine (Gulick, 2016; Donadio et Sosio, 2009; Ridley et Khosla, 2009).

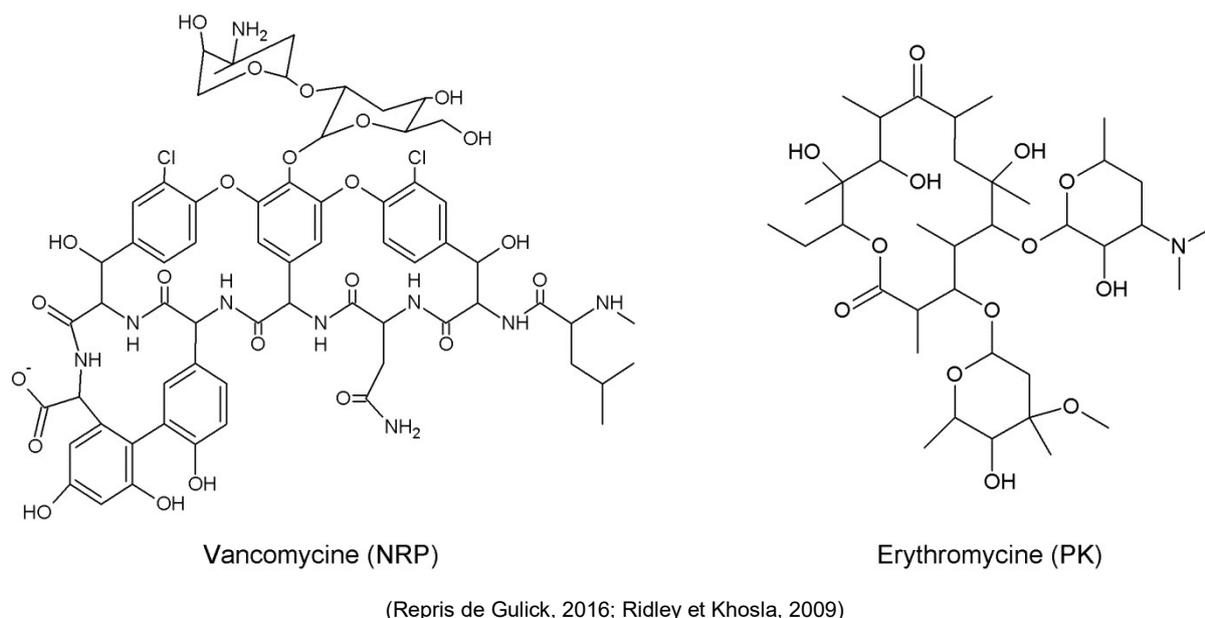


Figure 22. Représentation moléculaire de la vancomycine et de l'érythromycine

Les mécanismes d'actions sont similaires à ceux précédemment décrits. On observe des inhibitions de la synthèse du peptidoglycane chez les NRP comme la vancomycine ou la teixobactine (Ling et al., 2015; Donadio et Sosio, 2009). On retrouve également la formation de pores (Figure 15a), pour des NRP comme la daptomycine ou des PK comme l'amphotéricine B (Pogliano et al., 2012; Ridley et Khosla, 2009). Enfin, une partie des PK présentent un effet inhibiteur des ribosomes bactériens (Figure 17b), comme l'érythromycine ou la tétracycline (Ridley et Khosla, 2009).

Ces molécules antagonistes ont un champ d'action large et sont actives contre les bactéries à Gram-positif, comme la vancomycine, et sur les bactéries à Gram-négatif, comme la tétracycline ou encore contre les *fungi* comme l'amphotéricine B. Actuellement, plus de 1 184 NRP sont recensés dans la base de données Norine, consacrée à ces molécules (Flissi et al., 2016).

4.1.5.3. *Sophorolipides, enzymes et acides*

Il existe des glycolipides présentant une activité antagoniste, peu étudiés, nommés sophorolipides (Solaiman et al., 2015; Hatoum et al., 2013). Ces peptides antimicrobiens sont de masse moléculaire inférieure à 1 kDa, mais dotés d'un large spectre d'activité et d'une thermostabilité (Hatoum et al., 2013; Arzumanian et al., 2009). Les sophorolipides possèdent des propriétés surfactante, et seraient produits par certaines espèces de levures, comme *Candida bombicola*. Leurs activités antagonistes sont dirigées contre d'autres espèces de *fungi*, contre des algues unicellulaires et contre des bactéries à Gram-positif (Van Bogaert et al., 2007). Ces composés agissent par perméabilisation membranaire (Figure 15a), à l'instar de nombreux autres composés inhibiteurs (Joshi-Navare et Prabhune, 2013).

De plus, d'autres composés plus classiques présentant des activités antagonistes comme certains acides organiques ont été étudiés. C'est le cas de l'acide δ -3-phenyllactique ou de l'acide δ -3-indollactique, produits par *Galactomyces geotrichum* et actifs sur *L. monocytogenes* (Hatoum et al., 2013).

Ces métabolites antagonistes se distinguent par un spectre d'activité plus restreint, mais plus efficace que les inhibitions par compétition nutritionnelle ou modification physicochimique du milieu présenté précédemment (Cavera et al., 2015; Winkelströter et al., 2015; Hatoum et al., 2013). Le principal mécanisme d'action de ces composés antagonistes semble être la lyse par modification de la membrane plasmique ou de la paroi.

L'activité d'un microorganisme antagoniste peut être issue de la combinaison de plusieurs mécanismes d'antagonismes (Bianchini, 2015).

4.2. Applications biotechnologiques

Les microorganismes antagonistes sont déjà utilisés comme agents de protection et de contrôle contre des souches pathogènes, notamment dans les domaines agronomiques, pour éliminer les moisissures indésirables des fruits et des céréales (Jung et al., 2014; Starmer et Lachance, 2011). Toutefois, de plus en plus d'études proposent les microorganismes antagonistes comme moyens de lutte contre les microorganismes pathogènes ou pour le traitement des bactéries multi-résistantes, et ce dans des domaines de la santé animale et vétérinaire (Cavera et al., 2015; Belguesmia et al., 2011), offrant ainsi des possibilités d'application en santé animale (Naghmouchi et al., 2011b).

4.2.1. Souches antagonistes non-utilisables

Les organismes antagonistes ayant un effet inhibiteur par compétition nutritionnelle et spatiale, ainsi que par modifications physicochimiques du milieu (Figure 12a et Figure 12b) sont difficilement utilisables dans les biotechnologies agroalimentaires et médicales. En effet, ils induisent des modifications du milieu, pouvant alors conduire à une altération du support plutôt qu'à un effet bénéfique. Par ailleurs, les enzymes nécessitent un milieu spécifique et des conditions bien définies pour être actives.

L'antagonisme par CDI pourrait être adapté à une utilisation biotechnologique, de par son rôle significatif sur les communautés microbiennes (Morse et al., 2015; Ruhe et al., 2013). Cette utilisation n'est cependant pas encore d'actualité, car son mécanisme d'action reste à élucider, ce qui entrainerait une utilisation empirique (Morse et al., 2015; Willett et al., 2015).

4.2.2. Utilisation de métabolites antagonistes

L'utilisation biotechnologique des microorganismes antagonistes est essentiellement axée sur l'utilisation de microorganismes producteurs de peptides antimicrobiens. Comme précédemment indiqué, la nisine une bactériocine de classe I, est largement utilisée comme additif alimentaire pour la conservation des aliments. En plus de cette application alimentaire, il a été proposé d'utiliser la nisine pour le traitement de certaines infections (Naghmouchi et al., 2013)

4.3. Levures antagonistes

4.3.1. Introduction aux levures

Le terme « levure » provient de mots ayant pour signification « lever », « élever », ou « mousse ». Cette origine étymologique fait référence directement au processus de fermentation observé dans la bière et le pain (Hatoum et al., 2012; Kurtzman et al., 2011). Les levures sont des organismes eucaryotes unicellulaires (Figure 23a), faisant partie du règne des *fungi*, plus communément appelé champignons. Le livre de Kurtzman édité en 2011 recense, au moins, 320 genres et 3 426 espèces de levures. Toutefois, on estime que ce nombre ne représente que 1 % des espèces existantes dans la nature (Prescott, 2013; Kutty et Philip, 2008). Ces microorganismes montrent une reproduction soit asexuée, soit sexuée, par bourgeonnement et division transversale ou par formation de fructifications contenant des spores. Cette double possibilité de reproduction induit quelques particularités dans leur nomenclature (Toju et al., 2012; Kurtzman et al., 2011; Walstra et al., 2005).

4.3.1.1. Génétique et nomenclature

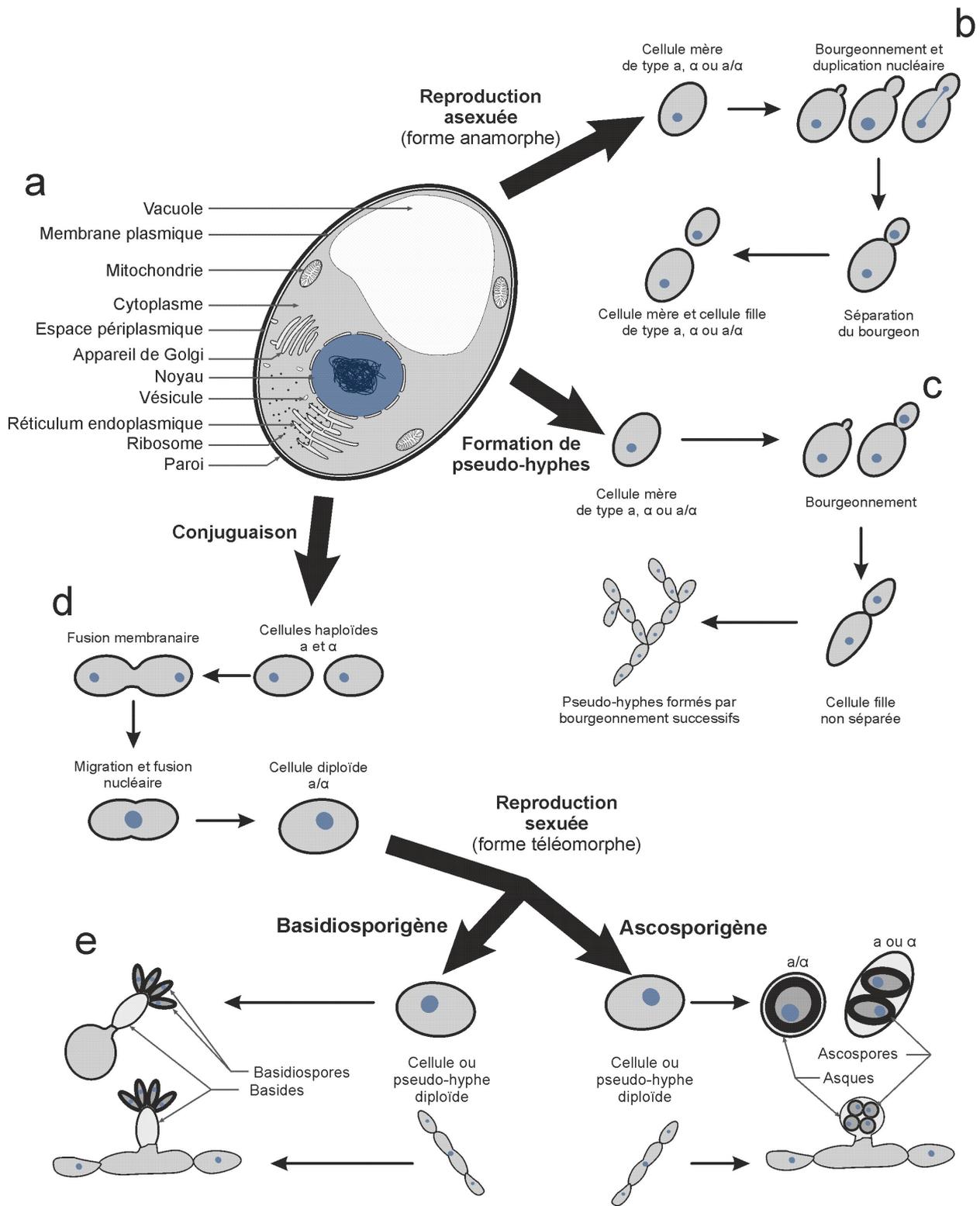
Il existe des cellules haploïdes, ne contenant qu'une seule copie de chaque chromosome. Elles sont alors de type « a » ou « α ». Il existe des cellules diploïdes, de type « a/ α », qui contiennent deux copies de chaque chromosome. Ainsi, deux modes de reproduction sont définis. La reproduction asexuée, par bourgeonnement et fissions transversales conduisant à la production d'une cellule fille identique à la cellule mère (Figure 23a). Cette reproduction est possible pour tous les types de cellules, « a », « α » et « a/ α ». La reproduction sexuée est possible par conjugaison de deux cellules haploïdes de type « a » et « α », pour former une cellule diploïde « a/ α » (Figure 23d). Les cellules diploïdes sont capables de reproduction par formation de fructifications. Ces fructifications peuvent être des basides ou des asques contenant une ou plusieurs spores haploïde(s) (Figure 23e), de type « a » ou « α » (Kurtzman et al., 2011; Madhani, 2007). Les levures sont représentées, pour la majorité, par des ascomycètes, formant des asques contenant des ascospores. Un moindre nombre de levures sont des basidiomycète, formant des basides contenant des basidiospores (Prescott, 2013; Kutty et Philip, 2008).

Les levures se reproduisant de manière asexuée sont dites sous forme anamorphe. Les levures anamorphes sont visibles dans des milieux riches en nutriments. Les levures montrant une reproduction sexuée sont dites sous forme téléomorphe. Cette forme, de même que les fructifications, sont généralement visibles lorsque le milieu devient pauvre en nutriments. Il faut noter que certaines espèces de levures sont capables de former des pseudo-hyphes (Figure 23c), c'est-à-dire des ramifications constituées de plusieurs cellules accolées, permettant un étalement des cellules afin de trouver de nouveaux nutriments. Ces pseudo-hyphes peuvent également se conjuguer et être le support de fructifications (Prescott, 2013; Madhani, 2007).

Du fait de ces deux reproductions, les *fungi* sont les seuls organismes vivants qui ont deux noms valides. Chaque levure a donc un nom, basé sur la forme anamorphe, et un nom basé sur la forme téléomorphe, lorsque cette dernière est connue. Il est communément acquis que le nom usuel des *fungi* correspond au nom téléomorphe, s'il existe (Tableau 7). Si ce dernier nom n'est pas défini, on utilise le nom anamorphe de la levure désignée (Kurtzman et al., 2011; Barnett et al., 2007).

4.3.1.2. *Biotechnologies des levures*

Les levures ont une influence bénéfique ou délétère dans de nombreux domaines de la technologie (Figure 24), notamment en agriculture, pharmacologie, production agroalimentaire et biotechnologies environnementales (Toju et al., 2012; Begerow et al., 2010). Toutefois, il existe des levures qui sont pathogènes pour l'humain, les animaux et les plantes, comme *C. albicans* responsable de candidose chez l'humain. *C. albicans* est une souche commensale naturelle du tractus intestinal et contribuant dans des circonstances normales à la digestion et à la protection de la microflore gastro-intestinale (Gulati et Nobile, 2016).



(Réalisé à l'aide de Kurtzman, 2011; Madhani, 2007; Gadanho et Sampaio, 2002)

Figure 23. Représentation schématique d'une levure et des types de reproduction

a : Représentation d'une cellule de levure et de ses organites ; **b** : Reproduction asexuée par bourgeoisement et fission transversale ; **c** : reproduction par formation de pseudo-hyphes ; **d** : conjugaison permettant la formation de cellules diploïdes ; **e** : reproduction par formation de fructifications, de types basides ou asques.

Tableau 7. Exemples de nomenclatures possibles chez les levures

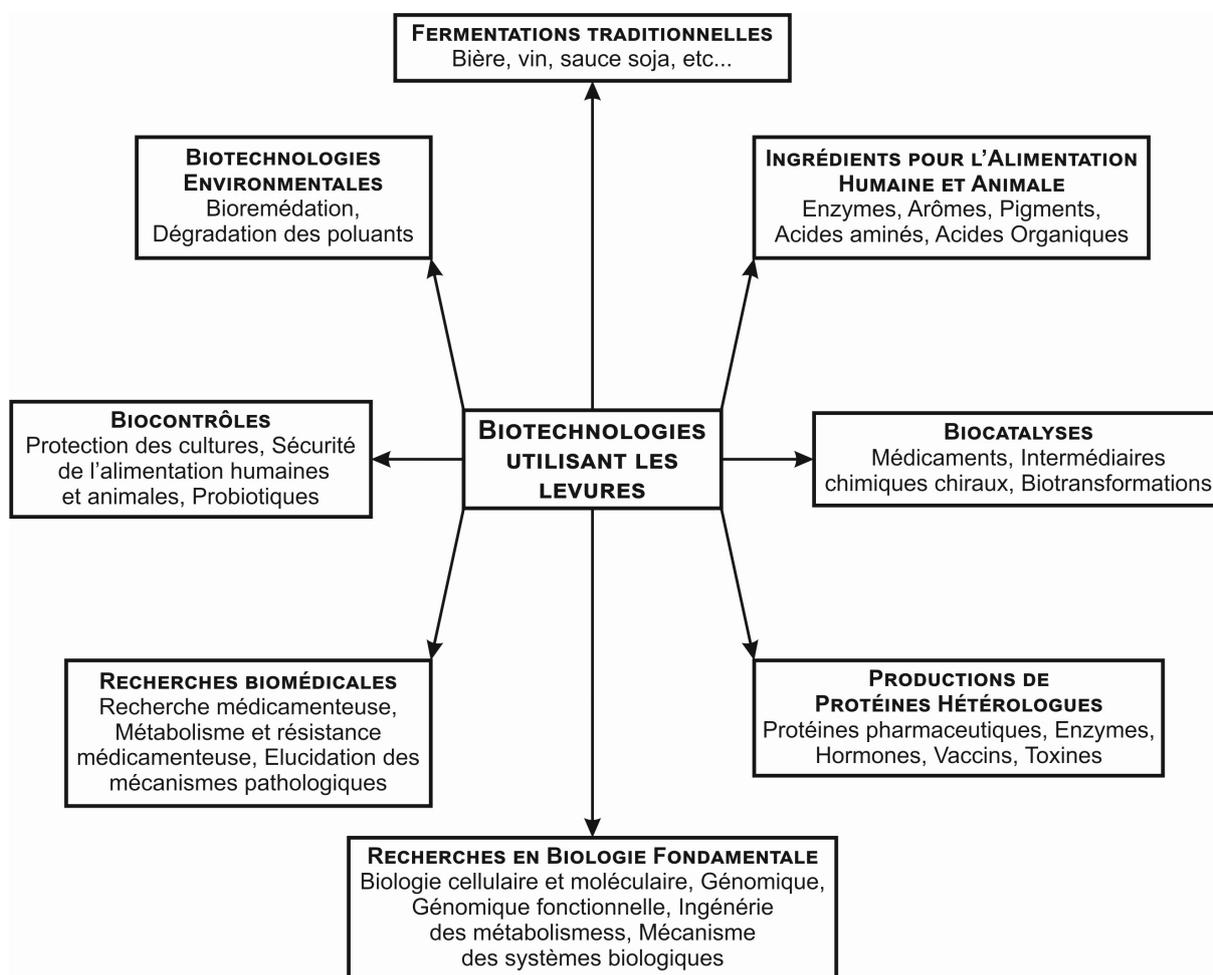
Forme Téléomorphe Nomenclature usuelle	Forme Anamorphe Nomenclature spécifique	Synonymes Nomenclature non valide
<i>Debaryomyces hansenii</i>	<i>Candida famata</i>	<i>Saccharomyces hansenii</i> <i>Pichia hansenii</i> <i>Debaryozyma hansenii</i> <i>Debaryomyces tyrocola</i> etc...
Non existant	<i>Candida albicans</i>	<i>Oidium albicans</i> <i>Saccharomyces albicans</i> <i>Procandida albicans</i> <i>Actonia tropicalis</i> etc...
Non existant	<i>Kazachstania viticola</i>	Non existant

(adapté de Kurtzman, 2011)

Dans le secteur agroalimentaire, les levures sont impliquées dans de nombreux processus de fermentation, comme le brassage, la panification, la vinification ou encore la production de produits laitiers. Elles contribuent aux qualités organoleptiques des aliments, et empêchent parfois la colonisation par des organismes indésirables (Prescott, 2013; El-Sharoud et al., 2009; Senses-Ergul et al., 2006; Viljoen et al., 2003; Jakobsen et Narvhus, 1996). Les levures sont également impliquées dans l'altération des aliments cités ci-dessus, souvent suite à une faille dans le processus de fermentation ou par une contamination post-production (El-Sharoud et al., 2009; Senses-Ergul et al., 2006; Viljoen et al., 2003; Jakobsen et Narvhus, 1996).

L'utilisation des levures en alimentation animale et aquacole est également possible, à cause de leur richesse en protéines, lipides et vitamines. Elles seront alors produites via la biotransformation de matériaux bruts en biomasse de levures, à qualité nutritionnelle hautement significative (Silva et al., 2011; Kutty et Philip, 2008).

Pour des applications biotechnologiques, les levures peuvent produire de nombreux composés de façon économique grâce à leurs temps de génération courts et l'utilisation de milieux de culture peu coûteux. Ces composés peuvent être des anti-oxydants, des vitamines, des lipides, des enzymes et d'autres métabolites extracellulaires. De par leurs qualités d'eucaryotes, il est possible d'effectuer des transformations génétiques pour obtenir des composés difficiles à produire par les bactéries, comme certains antibiotiques, des cyclosporines ou des immunodépresseurs (Prescott, 2013; Silva et al., 2011; Kutty et Philip, 2008).



(Traduit de Johnson et Echavarri-Erasun, 2011)

Figure 24. Différents domaines biotechnologiques utilisant les levures.

4.3.2. Levures antagonistes

La première référence à des levures antagonistes date de 1909 par Hayduck et Fernbach. Cette première référence a mis en avant des toxines volatiles thermolabiles ayant une activité sur la croissance d'*E. coli* et de staphylocoques. Malgré cette découverte, l'activité antimicrobienne des levures n'a jamais fait l'objet de recherches intensives. On considère que la compétition spatiale et nutritionnelle est le mécanisme d'antagonisme essentiel des levures (Figure 12a et Figure 13), suivie de la production d'éthanol et d'acides organiques (Figure 12b et Figure 14). La production d'enzymes et d'autres composés antimicrobiens est très peu prise en compte dans l'étude des mécanismes antagonistes chez la levure (Núñez et al., 2015; Hatoum et al., 2012, 2013; Spadaro et al., 2002).

4.3.2.1. Phénomènes « tueur » et mycocines

Les levures aptes à produire des mycocines sont dites mycocinogènes. On les nomme alors levures « tueuses » (Golubev et Nakase, 1997). La première levure « tueuse » isolée est une souche de *Saccharomyces cerevisiae* issue de brassins de bières (Keszthelyi et al., 2008; Santos et al., 2004; Golubev, 1998). De nos jours, les levures mycocinogènes sont reconnues comme communes et particulièrement présentes dans les communautés microbiennes à densité très élevée (Starmer et Lachance, 2011; Golubev et al., 2002).

Les mycocines peuvent être codées par de l'ADN chromosomique, mais également par des éléments extra-chromosomiques. Ces origines exogènes peuvent être de l'ARN double brin issu de particules virales ou de plasmides (Starmer et Lachance, 2011; Keszthelyi et al., 2008; İzgü et al., 2006).

La production de mycocines est souche-dépendante et non espèce-dépendante. Ainsi, deux souches d'une même espèce peuvent produire deux mycocines différentes (Keszthelyi et al., 2008). La production de mycocines a souvent lieu juste après la colonisation de nouveaux milieux, afin d'obtenir un avantage dans la compétition nutritionnelle. Cette production est dépendante de la composition du milieu de culture, et des conditions de croissance (Starmer et

Lachance, 2011). La production des mycocines semble être facilitée par l'acidité du milieu (Arzumanian et al., 2009; Golubev, 1998).

Actuellement de nombreuses souches mycocinogènes ont été décrites, notamment chez les levures du genre *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Torulopsis*, *Saccharomyces* et *Williopsis* (İzgü et al., 2006; Buzzini et al., 2004; Lowes et al., 2000).

4.3.2.2. Autres capacités antagonistes

D'autres types de composés protéiques antagonistes, autres que les mycocines, ont été trouvés chez *S. cerevisiae*. Ils seraient actifs sur les bactéries malolactiques, mais leur structure n'a pas été élucidée. D'autres composés peptidiques, d'une masse moléculaire 10 kDa ont été retrouvés chez la même espèce, avec une activité contre plusieurs genres de levures (Branco et al., 2014).

Certaines souches de levures sont capables de produire des enzymes dégradant les parois d'autres *fungi* (Figure 12c), on pourra citer *Williopsis saturnus*, également nommé *Pichia anomala*, produisant des β -1-3-glucanases (İzgü et al., 2006). Des composés volatils antifongiques peuvent être produits par certaines levures comme *C. valida* et *Rhodotorula glutinis* (Schisler et al., 2011).

Enfin, des activités antagonistes par modifications physicochimiques du milieu sont également possibles (Figure 12b). On peut noter la production d'acides organiques comme l'acide pulcherrimique de *Metschnikowia pulcherrima*, permettant l'agrégation et le piégeage du fer, le rendant limitant pour les autres organismes (Golubev, 1998).

Tous ces composés antagonistes d'origines fongiques ou bactériennes peuvent trouver des applications biotechnologiques.

4.3.3. Biotechnologies et levures antagonistes

Les levures antagonistes sont utilisées comme agents de biocontrôle pour lutter contre ou pour contrôler des levures alimentaires indésirables, mais également d'autres *fungi* (Santos et al., 2004). Ainsi, des souches antagonistes de *K. lactis* ou *S. cerevisiae* peuvent être utilisées pour lutter contre les altérations fongiques des céréales stockées dans les ensilages (Lowe et al., 2000; Kitamoto et al., 1993).

D'autres souches sont utilisées contre les altérations alimentaires des produits finis, ou sont simplement incorporées dans les cultures initiales (Goretti et al., 2009; İzgü et al., 2006; Santos et al., 2004). C'est le cas de la levure *Debaryomyces hansenii*, qui est capable d'inhiber les moisissures pathogènes dans les produits laitiers, les fruits et la viande séchée (Núñez et al., 2015). En dépit de ces résultats probants, l'utilisation de ces souches dans le domaine alimentaire nécessite qu'elles aient les statuts « *Generally Recognize As Safe* » (GRAS), et « *Qualified Presumed Safe* » (QPS). Ces deux statuts sont attribués en Europe, et USA, respectivement. Il est préférable que la souche utilisée n'ait pas d'impact sur les propriétés organoleptiques du produit (Núñez et al., 2015).

Les levures antagonistes sont également proposées pour un usage en médecine vétérinaire et médecine humaine pour le traitement des plaies superficielles (Buzzini et al., 2004). C'est le cas de *Pi. anomala* qui est active contre d'autres souches de *Pi. anomala*, mais également contre des souches de *C. albicans*, *Pi. carinii* et *S. cerevisiae* (İzgü et al., 2006; Buzzini et al., 2004; Guyard et al., 2002a).

Plus récemment, les propriétés immunostimulantes de certaines levures ont été rapportées dans la littérature. Elles sont attribuées aux sucres complexes et aux acides nucléiques. Avec l'accumulation de données sur la biologie des levures, sur leurs effets bénéfiques et en sus des activités antagonistes, les levures, particulièrement les levures non-*Saccharomyces*, sont maintenant vues comme des probiotiques potentiels. La seule levure bénéficiant du statut probiotique reste *S. cerevisiae* var *boulardii* (Gulati et Nobile, 2016; Hatoum et al., 2012; Kutty et Philip, 2008).

5. MICROORGANISMES PROBIOTIQUES

Les premières notions sur les organismes probiotiques datent du début du 20^e siècle, lorsque Elie Metchnikoff, prix Nobel de physiologie 1908, déclara que la consommation de bactéries vivantes, issues du yaourt, améliore la fonction intestinale (Alexandre et al., 2014; Tanriover et al., 2012). Le terme probiotique est utilisé pour la première fois en 1965 par Lilly et Stillwell, pour décrire des substances sécrétées par un microorganisme, stimulant la croissance d'un autre microorganisme. Ce terme vient du Grec « *Pro bios* » qui signifie pour la vie (*Bios*). Le terme probiotique est ensuite repris par les organisations internationales (FAO/WHO, 2002) pour aboutir à la définition suivante : « Les probiotiques sont des microorganismes vivants qui, lorsqu'ils ingérées en quantité suffisante, apporte des effets bénéfiques, à la santé de l'hôte ». Ainsi, les souches prétendantes au grade probiotique doivent satisfaire aux recommandations de l'OMS et montrer une activité biologique. Le marché des ingrédients probiotiques a atteint 19,6 milliards d'euros en 2013, soit 4,3 % de plus qu'en 2008, où il avait atteint 15,9 milliards d'euros (Soccol et al., 2010).

De nombreuses souches microbiennes, incluant des bactéries lactiques et à un degré moins important des levures sont considérées comme des probiotiques potentiels.

5.1. Probiotiques connus

La plupart des souches de probiotiques reconnues sont d'origines bactériennes. Comme indiqué, ce sont essentiellement des BAL, incluant *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* et *Streptococcus*. D'autres bactéries appartenant aux genres *Bacillus* et *Pediococcus* ont été proposées pour des applications probiotiques (Chelliah et al., 2016; Binetti et al., 2013; Soccol et al., 2010). Les applications probiotiques afférentes aux levures non-*Saccharomyces* méritent plus d'attention et d'investigation. Dans le cadre de ce travail, nous avons apporté des évidences sur le potentiel probiotique des souches du genre *Kluyveromyces*, en l'occurrence *K. marxianus* et *K. lactis*. Nos études sont consolidées par les travaux de Fadda et al. (2017) Soccol et al. (2010) et Kumura et al. (2004) sur le potentiel de *K. marxianus* pour être considéré comme une levure probiotique. Pour information, le Tableau 8, contient la liste non exhaustive des souches probiotiques ou commercialisées comme telles, actuellement.

Tableau 8. Liste des probiotiques utilisés chez l'homme et l'animal

Genre	espèces	Utilisation
<i>Bacillus</i>	<i>coagulans</i>	Thérapeutique humaine (Arthrite rhumatoïde)
	<i>subtilis</i>	Alimentation humaine (Additif alimentaire) Alimentation animale (Crevettes)
	<i>licheniformis</i>	Alimentation animale (Crevettes)
	spp.	Alimentation animale (Mollusques, Aquaculture générale, Volailles)
<i>Bifidobacterium</i>	<i>animalis</i> spp. <i>animalis</i>	
	<i>animalis</i> spp. <i>lactis</i>	Alimentation humaine (Produits laitiers)
	<i>bifidum</i>	
	<i>longum</i>	Alimentation humaine (Produits laitiers)
	<i>plantarum</i>	Alimentation animale (Volailles)
<i>Clostridium</i>	spp.	Alimentation animale (Volailles)
	<i>faecalis</i>	Alimentation animale (Poissons)
<i>Enterococcus</i>	<i>faecium</i>	Alimentation animale (Canins)
	<i>faecium</i>	Thérapeutique humaine (Contre le cholestérol) Alimentation animale (Porcs, Canins, Félines)
	spp.	Alimentation animale (Volailles)
<i>Lactobacillus</i>	<i>acidophilus</i>	Alimentation humaine (Produits laitiers)
	<i>casei</i>	Alimentation humaine (Produits laitiers) Alimentation animale (Porcs)
	<i>fortis</i>	
	<i>johnsonii</i>	Alimentation humaine (Produits laitiers)
	<i>lactis</i> spp. <i>lactis</i>	
	<i>reuteri</i>	Alimentation humaine (Produits laitiers) Alimentation animale (Porcs)
	<i>rhamnosus</i>	Alimentation humaine (Produits laitiers)
	<i>sporogenes</i>	Alimentation animale (Volailles)
	spp.	
	<i>Lactococcus</i>	<i>lactis</i> spp. <i>lactis</i>
Levures	ND	Alimentation animale (Mollusques)
<i>Pediococcus</i>	<i>acidilactici</i>	Alimentation animale (Porcs, Volailles.)
	<i>cerevisiae</i>	Alimentation animale (Aquaculture générale, Mammifères allaitants, Buffle, Chameau)
<i>Saccharomyces</i>	<i>boulardii</i>	Thérapeutique humaine (Diarrhées) Alimentation animale (Poissons)
	<i>thermophilus</i>	Alimentation humaine (Produits laitiers)
<i>Streptococcus</i>	<i>thermophilus</i>	Thérapeutique humaine (Contre le cholestérol)
	spp.	Alimentation animale (Volailles)

ND : Non Disponible - (Tableau retravaillé et traduit de Serce et al., 2013; Johnson et Echavarri-Erasun, 2011; Soccol et al., 2010)

En addition à ces souches commerciales, la recherche de nouvelles souches probiotiques, à partir de différents écosystèmes, se poursuit dans différents laboratoires, comme l'indique le nombre impressionnant de publications dédiées à la recherche de ces nouvelles souches.

5.2. Caractéristiques probiotiques

La notion de quantité adéquate, indiquée dans la définition des probiotiques, est un élément critique pour l'utilisation des probiotiques. En effet, les microorganismes ingérés doivent apporter une plus-value et se développer malgré la microflore intestinale. Cette microflore est un mélange complexe de microorganismes, comportant plus de 500 espèces différentes (Lee, 2014; Gill, 2003). Selon Arslan et al. (2015) et Foligné et al., (2016), la quantité nécessaire pour observer un effet avec des souches probiotiques est de l'ordre de 10^6 à 10^8 UFC (unités formant colonies) par gramme ingéré.

Les probiotiques ingérés doivent résister à l'environnement intestinal et particulièrement au processus de digestion gastro-intestinale. Cette résistance dépend de plusieurs facteurs comme la résistance aux acides gastriques et aux sécrétions gastriques (Fadda et al., 2017; Binetti et al., 2013; Xie et al., 2012; Soccol et al., 2010). Une fois le passage de la digestion gastro-intestinale assurée, les probiotiques doivent être en mesure d'adhérer aux cellules intestinales afin de s'y installer. Généralement, cette fonction est déterminée en amont par des analyses *in vitro*, en mesurant le taux d'adhésion des microorganismes candidats aux cellules humaines Caco-2, issues d'adénocarcinome du côlon (Fadda et al., 2017; Xie et al., 2012; Soccol et al., 2010). Les tests d'adhésion peuvent être établis sur d'autres lignées cellulaires comme HT29, T84 voire des cellules sécrétrices de mucus HT29MX (Messaoudi et al., 2013; van der Aa Kühle et al., 2005). Les capacités d'adhésion aux cellules intestinales semblent être reliées au profil d'hydrophobicité des cellules, mais également aux capacités d'auto-agrégation de ces dernières (Fadda et al., 2017; Binetti et al., 2013).

Les souches candidates doivent aussi être évaluées pour leur innocuité (absence de gènes de résistance aux antibiotiques, absence d'activité hémolytique,... (Fadda et al., 2017; Xie et al., 2012; Soccol et al., 2010). Les capacités antagonistes de ces souches constituent un critère de majeur pour la sélection d'une souche probiotique (Fadda et al., 2017). En effet, cet antagonisme peut empêcher la colonisation par des microorganismes pathogènes. Toujours en relation avec l'antagonisme, les capacités de co-agrégation avec des souches pathogènes constituent des indices sur les capacités d'élimination et séquestration des souches pathogènes (Xie et al., 2012; Soccol et al., 2010).

En conclusion, la sélection des souches probiotiques doit s'établir sur la base de critères clairs et de fonction(s) biologique(s) bien déterminée(s). Les critères en question sont les suivants :

- Résistance à la digestion gastro-intestinale
- Capacité à coloniser la muqueuse intestinale
- Absence de pathogénicité pour l'hôte
- Activité(s) contre les pathogènes intestinaux

Selon Soccol et al. (2010), les probiotiques utilisés aujourd'hui ne sont cependant pas sélectionnés sur la totalité de ces critères.

5.3. Probiotiques et santé de l'hôte

Les effets bénéfiques des probiotiques pour l'humain sont divers, ils peuvent cependant être divisés en trois catégories (Likotrafiti et Rhoades, 2016; Socol et al., 2010; Gilliland, 2003) :

- Effet sur les microorganismes pathogènes ou commensaux de l'intestin. Les probiotiques présentant ces propriétés sont utilisés dans le traitement préventif et thérapeutique des infections, ou alors pour restaurer l'équilibre du microbiote intestinal. Ils sont généralement consommés après une antibiothérapie, ou tout simplement consommés pour conserver et maintenir l'équilibre de ce microbiote.
- Modulation des défenses de l'hôte, comme son immunité innée et son immunité acquise. Ces probiotiques sont utilisés pour le traitement préventif et thérapeutique des maladies infectieuses, des inflammations intestinales ou encore l'élimination des cellules néoplasiques chez l'hôte.
- Activité sur les composés microbiens et les composés issus de l'hôte. Ces probiotiques sont capables d'inactiver des toxines microbiennes et d'induire une détoxification de l'hôte et des composés alimentaires présents dans l'intestin.

Ces trois catégories d'effets peuvent conduire à des effets bénéfiques divers. On pourra ainsi observer la modulation et l'amélioration du système immunitaire (Alexandre et al., 2014; Kumura et al., 2004; Gill, 2003; Gilliland, 2003). Ces effets pourront se traduire par des effets anti-inflammatoires (Foligné et al., 2016; Tanriover et al., 2012). Les probiotiques montrant ces effets pourront être utilisés pour traiter la constipation et les diarrhées ou encore les maladies inflammatoires de l'intestin (Socol et al., 2010).

Certains probiotiques semblent montrer des effets plus généraux et non limités au système digestif (Alexandre et al., 2014). Pourront être cités les effets anticancéreux et antimutagènes (Socol et al., 2010; Gill, 2003; Gilliland, 2003) et les capacités à diminuer les allergies alimentaires (Socol et al., 2010), voire à diminuer l'intolérance au lactose (Gill, 2003; Gilliland, 2003).

D'autres études suggèrent que la consommation de probiotiques pourrait avoir des effets bénéfiques sur le système cardiovasculaire par effet anti-cholestérolémie ou sur le contrôle de la pression sanguine (Costanza et al., 2015; Soccol et al., 2010; Kumura et al., 2004; Gilliland, 2003). Enfin selon certaines études, l'utilisation de probiotiques pour moduler le microbiote intestinal pourrait avoir un impact sur l'obésité (Rastall et Gibson, 2015; Soccol et al., 2010).

Afin de tirer avantage de ces bénéfices, il est recommandé d'utiliser un mélange de probiotiques pour apporter des complémentarités et des effets synergiques entre les souches. En effet, ces mélanges semblent donner des résultats plus probants que l'utilisation d'une seule souche (Likotrafiti et Rhoades, 2016; Tanriover et al., 2012).

Les mécanismes d'actions des probiotiques sont généralement peu connus (Johnson et Echavarri-Erasun, 2011; Soccol et al., 2010; Gill, 2003).

5.4. Mécanismes d'action

Les mécanismes d'action des probiotiques peuvent être séparés en deux catégories : ceux agissant directement sur l'hôte et ceux agissant sur le microbiote intestinal de l'hôte. Ainsi, l'action des probiotiques peut s'observer sur : la barrière constituée par l'épithélium intestinal, l'inhibition de l'adhésion des microorganismes pathogènes, la production de substances antimicrobiennes ou la modulation du système immunitaire (Giacchi et al., 2016; Gilliland, 2003).

5.4.1. Action sur l'hôte

Les effets directs sur l'hôte sont peu nombreux et peu définis. Il semble que l'un des mécanismes d'action anti-diarrhéique serait dû à une digestion partielle du lactose par des lactases issues des probiotiques, notamment dans le cas des diarrhées dues à l'intolérance au lactose. De plus, les probiotiques pourraient stimuler l'activité des lactases intestinales (Giacchi et al., 2016; Gilliland, 2003). *S. boulardii* a un effet direct sur la muqueuse intestinale, par action sur son contenu enzymatique et sa capacité à capter des nutriments pour l'hôte (Giacchi et al., 2016). La trophicité pourrait être améliorée grâce à l'action des enzymes microbiennes, comme les

amylases, rendant les composés moins complexes et plus accessibles aux cellules intestinales (Gilliland, 2003).

5.4.2. Action sur le microbiote et le métabolisme de l'hôte

Les mécanismes d'actions indirectes sur l'hôte sont beaucoup plus variés. Ces mécanismes peuvent être divisés en plusieurs sous-parties :

- Activité antagoniste sur les pathogènes et leurs toxines
- Modulation de l'immunité
- Autres actions sur le métabolisme de l'hôte

5.4.2.1. Activité antagoniste sur les pathogènes et leurs toxines

On peut remarquer des inhibitions par production de métabolites antagonistes, comme les acides organiques, les bactériocines, etc. Ces composés devront cependant être actifs dans les conditions intestinales, et leurs activités réelles dans le cadre des applications probiotiques, restent à discuter (Giacchi et al., 2016; Alexandre et al., 2014; Gilliland, 2003). L'inhibition par le mécanisme de captation des nutriments reste également à discuter, excepté pour le chélation et privation de certains micronutriments, comme le fer (Likotrafiti et Rhoades, 2016). Paradoxalement, l'inhibition par compétition spatiale semble être plus importante (Gilliland, 2003).

Dans le cas d'activité antagoniste, les souches probiotiques colonisent la paroi intestinale, et empêchent ainsi l'adhésion des microorganismes pathogènes sur la muqueuse intestinale. Il faut remarquer que des virus responsables de diarrhée, comme le rotavirus, pourraient être inhibés par ce mécanisme. En effet, certains probiotiques peuvent agir sur les récepteurs des cellules épithéliales, par modification de la glycosylation, et empêcher ainsi la reconnaissance et la fixation du virus (Socol et al., 2010; Saxelin et al., 2005; Gilliland, 2003).

Enfin, les probiotiques peuvent également avoir un effet indirect sur les pathogènes, par inactivation des toxines voire par modification des récepteurs de ces toxines sur les cellules intestinales. On pourra citer l'utilisation de certaines BAL probiotiques ayant une activité

contre les mycotoxines et plus spécifiquement les aflatoxines (Giacchi et al., 2016; Likotrafiti et Rhoades, 2016; Mohd Redzwan et al., 2016).

Tous ces exemples dénotent comment les probiotiques peuvent augmenter la capacité de l'effet barrière de la paroi intestinale (Candela et al., 2005). Dans tous les cas de figure, la fixation des probiotiques à la muqueuse intestinale est une étape majeure, qui pourra avoir une influence sur la modulation de l'immunité de l'hôte (Xie et al., 2012).

5.4.2.2. Modulation de l'immunité

La modulation de l'immunité par les probiotiques peut avoir plusieurs aspects, le plus simple est la stimulation de la sécrétion de substances antimicrobiennes par les cellules intestinales, comme les β -défensines-2 (Likotrafiti et Rhoades, 2016; Alexandre et al., 2014; Messaoudi et al., 2013; Gilliland, 2003).

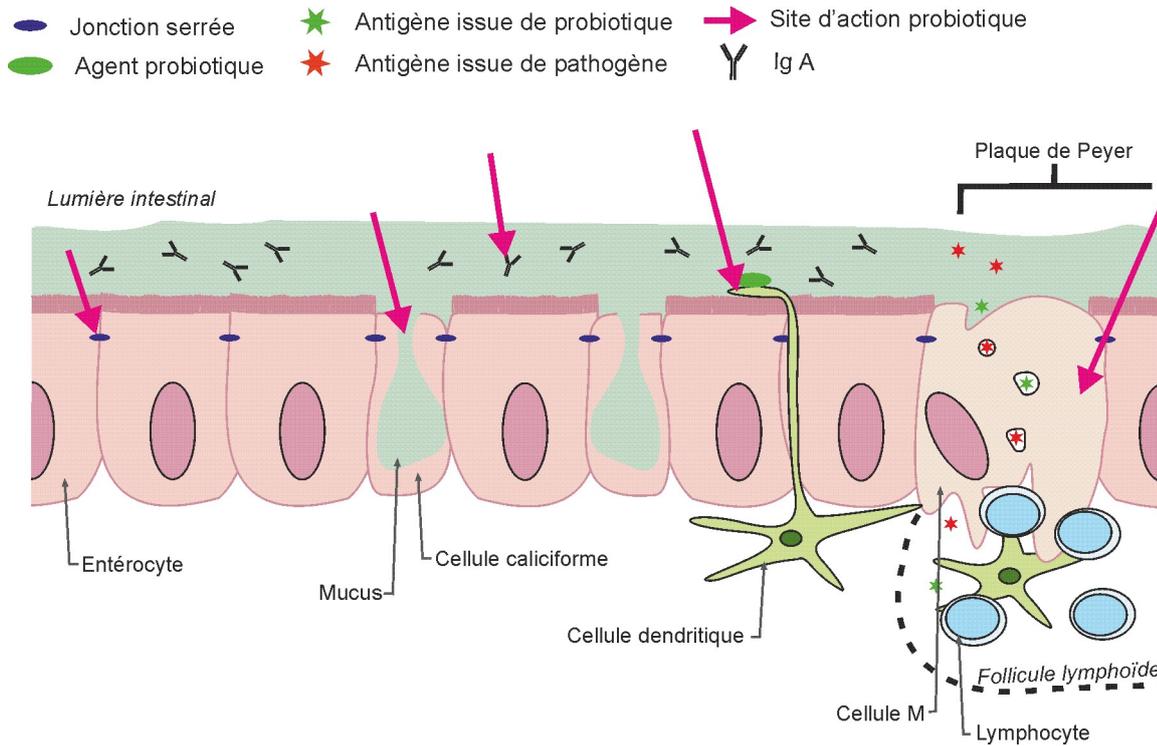
Les probiotiques peuvent améliorer la fonction de barrière de la paroi intestinale, tous en participant à la modulation de l'immunité, par resserrement ou restauration des jonctions serrées entre les entérocytes (Figure 25), qui peuvent être dégradés par les pathogènes, les aliments ou les composés pharmaceutiques (Giacchi et al., 2016; Messaoudi et al., 2013; Saxelin et al., 2005). Cet effet s'observe par une stimulation de l'expression des gènes codant pour les protéines des jonctions, comme la cadhérine E ou la caténine dans les cellules T84, un modèle de la barrière intestinale. La stimulation peut également s'effectuer sur la protéine kinase C, intervenant dans la constitution de ces mêmes jonctions (Giacchi et al., 2016).

Enfin, cette fonction de barrière peut également être augmentée par la stimulation de production de mucines (Figure 25), des glycoprotéines produites par les cellules caliciformes de la paroi intestinale, composant une grande partie du mucus intestinal. Ce mucus intervient dans la protection contre les pathogènes en limitant leurs adhésions aux cellules intestinales. Il intervient également dans l'immunité, car il contient des Immunoglobulines A – ou IgA (Messaoudi et al., 2013; Johansson et al., 2011).

L'impact le plus important dans la modulation de l'immunité par les microorganismes probiotiques se situe dans l'interaction avec les cellules immunitaires. On observe notamment des interactions avec les cellules M des plaques de Peyer ou avec les cellules dendritiques présentes au niveau de l'épithélium intestinal (Figure 25). L'interaction avec ces cellules peut être due à plusieurs composés présents sur la surface des probiotiques, notamment les lipopolysaccharides, ou LPS (Giacchi et al., 2016; Saxelin et al., 2005). Une fois l'interaction effectuée, divers mécanismes de sécrétions et d'endocytose sont alors observables.

L'activité phagocytaire des macrophages sera augmentée, tout comme le nombre de cellules immunocompétentes ou le nombre de plasmocytes producteurs d'IgA (Figure 25), induisant donc une hausse de concentration en IgA spécifique dans la muqueuse intestinale (Giacchi et al., 2016; Likotrafiti et Rhoades, 2016; Messaoudi et al., 2013).

La stimulation de récepteurs types Toll (TLR), comme les TLR 2 et 5, conduit à la production de cytokines, des composés de signalisation cellulaire ayant un rôle majeur dans les systèmes immunitaires et inflammatoires. On observe une augmentation de la sécrétion d'interleukines (IL), notamment les IL-6, 8, 10 et 12, du facteur de nécrose tumorale α (TNF α), l'interféron γ (INF γ), ou le facteur de croissance transformant β , ou TGF β (Giacchi et al., 2016; Likotrafiti et Rhoades, 2016; Messaoudi et al., 2012, 2013).



(Réalisé à l'aide de Giacchi et al., 2016; Messaoudi et al., 2013; Espinosa et Chillet, 2010)

Figure 25. Représentation des sites d'actions probiotiques dans la modulation de l'immunité sur l'épithélium intestinal

La représentation de l'épithélium intestinal prend en compte les entérocytes permettant l'absorption des nutriments, les cellules caliciformes, responsables de la production du mucus intestinal et les plaques de Peyer, principal support de l'immunité intestinale. Les flèches roses représentent les parties de l'épithélium montrant une réaction à l'action de microorganismes probiotiques (ovale vert. De gauche à droite ; Resserrement des jonctions serrées, améliorant l'intégrité de l'épithélium intestinal. Stimulation de la production de mucus par les cellules caliciformes. Hausse de la concentration en IgA, produit par les plasmocytes, issue des lymphocytes. Stimulation des cellules immunitaires et de la production de cytokines par contact des microorganismes probiotiques avec les récepteurs types Toll présents sur les cellules dendritiques. Stimulation des cellules immunitaires et de la production de cytokines par contact des antigènes issus des probiotiques avec les récepteurs types Toll présents sur les cellules dendritiques.

Le $TNF\alpha$, l' $INF\gamma$, le $TGF\beta$, l' $IL-6$, l' $IL-8$ et l' $IL-12$ sont des cytokines pro-inflammatoires, capables de stimuler les défenses immunitaires, par recrutement des acteurs de l'immunité afin rendre la réponse inflammatoire plus efficace dans l'élimination des pathogènes. L' $IL10$ et le $TGF\beta$ sont des anti-inflammatoires, c'est-à-dire qu'ils vont aider à diminuer l'inflammation des tissus (Giacchi et al., 2016; Miller et Hill, 2016; Espinosa et Chillet, 2010; Walter, 2006).

Chaque probiotique aura cependant son propre profil d'activité sur le système immunitaire, qui sera alors lui-même modulé par l'état physiologique du probiotique et de l'hôte (Giacchi et al., 2016; Likotrafiti et Rhoades, 2016).

D'autres activités indirectement liées (activité anticancéreuse) ou non liées (activité anti-hypertensive) au système immunitaire peuvent être observées suite à l'action des probiotiques (Soccol et al., 2010).

5.4.2.3. Autres actions sur le métabolisme de l'hôte

Certains probiotiques, comme *Lactobacillus acidophilus* ou *Bifidobacterium longum*, semblent avoir une activité hypocholestérolémique sur le sérum sanguin, associée à une assimilation du cholestérol et des composés précurseurs du cholestérol, présents dans l'intestin lors de la digestion par le probiotique. D'autres études suggèrent l'interférence entre les probiotiques et la circulation des acides biliaires entéro-hépatiques, facteurs importants dans la réduction du cholestérol sérique (Gilliland, 2003).

L'effet hypotenseur est dû à la transformation des protéines du lait en peptides bioactifs possédant une activité hypotensive, probablement due à l'inhibition d'endothéline-1 ou d'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE), voire à l'augmentation de l'activité de la bradykinine (Costanza et al., 2015; Soccol et al., 2010).

D'autres probiotiques sont connus pour être capables de diminuer l'expression de gène de virulence de certains pathogène. Le mécanisme réel est méconnu, mais pourrait reposer sur la production de composés pénétrant dans le pathogène et bloquant l'expression du gène en question (Likotrafiti et Rhoades, 2016).

L'effet anticancéreux, quant à lieu, serait dû à la combinaison de plusieurs mécanismes d'action en lien avec la modulation de l'immunité, comme l'induction de composé pro- et anti-inflammatoire, la synthèse de composés inhibant la carcinogénèse ou encore la métabolisation de composés mutagènes (Soccol et al., 2010).

D'autres effets probables des probiotiques ont été observés, mais le mécanisme d'action et la reproductibilité de ces effets ne sont pas certains. On peut citer notamment les effets sur les allergies, les problèmes atopiques, les états mentaux et la mémoire ou encore les pathologies respiratoires, l'ostéoporose et les maladies urogénitales (Lee, 2014; Soccol et al., 2010; Saxelin et al., 2005; Reid et al., 2003).

D'un point de vue vétérinaire et industriel, les probiotiques ont montré leurs efficacités comme facteurs de croissance, contribuant à la prise de poids des animaux destinés à la consommation humaine. Cet effet serait lié aux enzymes microbiennes, lysant les constituants du bol alimentaire et permettant ainsi une meilleure assimilation des nutriments, et donc une meilleure prise de poids. Les probiotiques sont utilisés dans de nombreux élevages, de la vache au homard, afin d'améliorer la santé des animaux (Likotrafiti et Rhoades, 2016; Messaoudi et al., 2012; Gilliland, 2003).

Il est important de prendre en compte les effets « indésirables » des probiotiques qui demeurent, toutefois, rares. Ces effets non-désirés comprennent des bactériémies et des endocardites, principalement chez des immunodéprimés, des diabétiques et des patients ayant subi une chirurgie récente. On pourra également observer le transfert d'un gène de résistance aux antibiotiques du probiotique vers une bactérie commensale de l'hôte (Alexandre et al., 2014).

5.5. Utilisations des probiotiques

L'utilisation des probiotiques repose sur l'ingestion de ces microorganismes en quantités suffisantes. Cette ingestion peut s'effectuer de deux manières et avec deux buts différents.

Le premier mode d'administration concerne l'ingestion des probiotiques directement. Chez l'humain, le mode d'administration habituel correspond à une prise de probiotiques lyophilisés, encapsulés dans des gélules pharmaceutiques, à des fins préventives. Chez l'animal, la prise de probiotiques lyophilisés est directement ajoutée dans les aliments. L'utilisation préventive permet de limiter le transport et la colonisation de pathogènes et donc de prévenir les maladies entériques. Dans l'alimentation animale, les probiotiques permettent de réduire le nombre de pathogènes se développant dans la matrice alimentaire (Likotrafiti et

Rhoades, 2016; Arslan et al., 2015; van der Aa Kühle et al., 2005). Les probiotiques peuvent être utilisés en association avec des antibiotiques pour prévenir et/ou réduire les diarrhées résultantes d'un traitement antibiotique (Tanriover et al., 2012).

L'encapsulation des probiotiques permet de limiter les dommages dus au passage dans le système digestif. De plus, en pharmaceutique, cela permet de faciliter le stockage de probiotiques, qui peut être difficile car ce sont des organismes vivants (Martín et al., 2015; Gilliland, 2003). Dans cette optique, les levures offrent des avantages certains de par leurs aptitudes à résister à la chaleur et leurs insensibilités aux antibiotiques classiques (Chelliah et al., 2016; Tanriover et al., 2012).

La deuxième utilisation des probiotiques est thérapeutique, mais demeure moins courante que l'utilisation préventive. Les utilisations thérapeutiques correspondent aux traitements visant à réduire ou stopper divers troubles gastro-intestinaux, comme les coliques ou diarrhées associées à un rotavirus (Likotrafiti et Rhoades, 2016; van der Aa Kühle et al., 2005). L'utilisation des probiotiques à des fins thérapeutiques, comme alternatives aux antibiotiques, fait actuellement l'objet de débat et d'études plus approfondies (Likotrafiti et Rhoades, 2016). Les probiotiques sont aussi étudiés pour leurs propriétés anti-inflammatoires, pour le traitement des pathologies cardiaques ou des inflammations chroniques de l'intestin, comme la maladie de Crohn (Foligné et al., 2016; Costanza et al., 2015)

Le second mode d'administration correspond à l'ingestion des probiotiques en association avec l'alimentation. Cela consiste en l'ingestion d'aliments, frais ou fermentés, contenant des microorganismes potentiellement probiotiques, donnant lieu au concept des aliments fonctionnels (Likotrafiti et Rhoades, 2016; Zanirati et al., 2015; Socol et al., 2010). Un aliment fonctionnel, ou aliment-médicament, est issu d'un concept très ancien, puisque Hippocrate annonçait déjà « Que ta nourriture soit ton médicament et que ton médicament soit ta nourriture » (Socol et al., 2010). De nos jours, le concept d'aliment-médicament est utilisé avec les végétaux crus fermentés et avec certains yaourts commerciaux, mais tend à se développer de manière plus importante (Binetti et al., 2013; van der Aa Kühle et al., 2005). L'utilisation de probiotiques dans l'alimentation pourrait conduire systématiquement à des aliments fonctionnels, mais il faudra vérifier que les qualités organoleptiques de l'aliment ne soient pas modifiées par les probiotiques (Likotrafiti et Rhoades, 2016; Socol et al., 2010).

Les aliments fermentés, principalement les produits laitiers, semblent être les mieux adaptés pour être des aliments fonctionnels. En effet, ils sont conservés à basse température, assurant une meilleure conservation des probiotiques (Soccol et al., 2010). Ce double rôle peut être exploité, comme dans le cas des yaourts pour utiliser les probiotiques, *Lactobacillus acidophilus* comme culture initiale (Gilliland, 2003). Il convient de signaler que le choix des matrices alimentaires est un élément clef, car certaines ne sont pas appropriées pour la croissance des probiotiques (Soccol et al., 2010).

Les probiotiques offrent de nombreuses possibilités d'utilisations, toutefois la recherche et l'étude de nouvelles souches restent utiles. Comme indiqué précédemment, l'orientation de ces recherches vers des levures est une stratégie importante à mener dans les années à venir car ces microorganismes sont pertinents à plusieurs égards. Les matrices hébergeant les levures sont essentiellement des matrices fromagères et les souches isolées peuvent, facilement, acquérir le grade GRAS et QPS.

5.6. Bioprotection des aliments

Les produits fermentés, comme les fromages, ont un microbiote complexe, susceptibles de contenir des microorganismes antagonistes aptes à offrir des applications notamment de conservation des aliments fermentés en empêchant le développement des germes pathogènes ou d'altération (Núñez et al., 2015; Akabanda et al., 2013; Abriouel et al., 2011; Ouoba et al., 2010). Ce concept de conservation des aliments peut s'étendre à d'autres matrices alimentaires, comme les fruits, les légumes et les produits céréaliers. L'avantage de cette technologie est d'allonger la date limite de conservation des aliments protégés tout en conservant leurs propriétés organoleptiques (H-Kittikun et al., 2015; Hatoum et al., 2012, 2013; Todorov et al., 2010).

Comme indiqué à plusieurs reprises dans ce document, la disparité entre les molécules antagonistes produites par les bactéries et celles qui sont produites par les levures, reste abyssale. Dans le cadre du concept de la bioconservation, ce sont les bactériocines qui sont le plus fortement mises en relief (Cavera et al., 2015; Perin et al., 2015; Hatoum et al., 2013; Messaoudi et al., 2013; Belguesmia et al., 2011).

6. KLUYVEROMYCES

Parmi les levures, le genre *Kluyveromyces* est de plus étudié. Le genre *Kluyveromyces* a été décrit en 1956 par Van der Walt, et a été nommé en l'honneur du microbiologiste Hollandais Albert Jan Kluyver (1888-1956) (Johnson et Echavarri-Erasun, 2011; Fonseca et al., 2008). D'un point de vue cytologique, les cellules sont en formes ovoïdes, elliptiques, cylindriques ou allongées. Les levures du genre *Kluyveromyces* peuvent former des pseudohyphes (Lachance, 2011). Par ailleurs, d'un point de vue taxonomique, *Kluyveromyces* appartient au phylum des *Ascomycota*. Leurs ascospores sont évanescents et contiendront 4 ascospores lisses sphériques, elliptiques, cylindriques ou réniformes. Une fois libérées, les spores auront tendance à s'agglutiner avant de germer (Belloch et al., 2011; Lachance, 2011; Barnett et al., 2007). La reproduction asexuée s'effectue par bourgeonnement multiple à partir de la base étroite de la cellule (Lachance, 2011; Barnett et al., 2007).

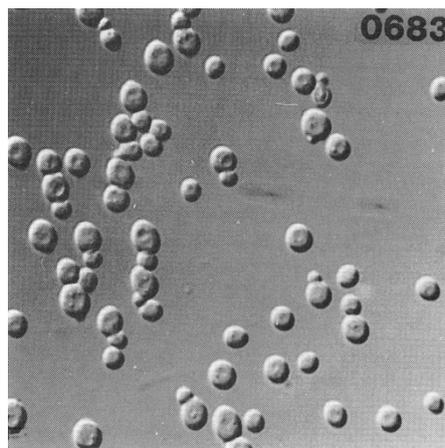
6.1. Espèces du genre *Kluyveromyces*

Ce genre comporte 6 espèces. L'espèce type est *Kluyveromyces marxianus*, et les autres espèces sont *K. aestuarii*, *K. dobzhanskii*, *K. lactis*, *K. nonfermentans* et *K. wickerhamii* (Lachance, 2011; Fonseca et al., 2008). Il est intéressant de noter que l'espèce type initiale, *K. thermotolerans*, ne fait aujourd'hui plus partie du genre *Kluyveromyces*, et elle a été reclassée dans le genre *Vanderwaltzyma* (Spohner et al., 2016; Lane et Morrissey, 2010; Fonseca et al., 2008).

Les détails donnés ci-dessous pour les espèces *K. lactis* et *K. marxianus* ont été obtenus sur la base de revues bibliographiques et articles scientifiques (Spohner et al., 2016; Zhou et al., 2013; Johnson et Echavarri-Erasun, 2011; Lachance, 2011; Lane et Morrissey, 2010; Fonseca et al., 2008; Nonklang et al., 2008; Barnett et al., 2007). Il faut noter que ces deux espèces ont déjà obtenu les grades GRAS et QPS, dans l'Union européenne et USA, respectivement.

6.1.1. *K. lactis*

Dans le genre *Kluyveromyces*, l'espèce la plus connue et étudiée reste *K. lactis*. Cette espèce possède deux formes. La forme utilisée par l'homme, *K. lactis* var *lactis*, et la forme sauvage *K. lactis* var *drosophilarum*. La forme anamorphe de cette espèce se nomme *Candida sphaerica*. Les cellules de *K. lactis* sont de forme elliptique et sont isolées, ou associées en paires ou en chaînettes (Figure 26).



(Issue de Barnett et al., 2007)

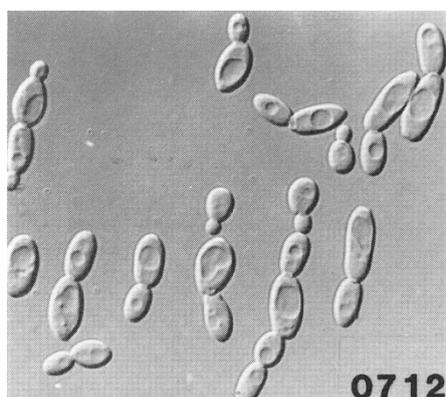
Figure 26. Photographie de *Kluyveromyces lactis* au microscope à contraste interférentiel

Sur milieu gélosé, les thalles sont brillants, de couleur crème, voire rose, en cas de pigmentation par la pulcherrimine. En bouillon liquide, sans agitation, un anneau est visible à la surface de la culture et un léger biofilm peut se former. Le temps de doublement optimal de cette espèce est de 139 minutes. Sur le plan génétique, le GC% est de 39,9 à 40,8 %, avec un génome réparti en 5 à 6 chromosomes.

K. lactis est capable de fermenter le glucose et le galactose. Seule la variété *K. lactis* est capable de fermenter le lactose. Les souches aptes à fermenter le lactose, c'est-à-dire *K. lactis* var *lactis*, sont exclusivement isolées de produits laitiers.

6.1.2. *K. marxianus*

L'espèce *K. marxianus* a été décrite pour la première fois en 1988 par Hansen. Le nom anamorphe de cette espèce est *C. kefir*. Sur le plan cytologique, les cellules sont rondes, elliptiques ou cylindriques. Elles sont isolées, en paires ou en chaînettes (Figure 27).



(Issue de Barnett et al., 2007)

Figure 27. Photographie de *Kluyveromyces marxianus* au microscope à contraste interférentiel

Sur milieu gélosé, les thalles sont brillants, de couleur crème à marron. En bouillon liquide, sans agitation, un anneau est visible à la surface de la culture et un léger biofilm peut se former. Le temps de doublement optimal de cette espèce est de 70 minutes, voire de 50 minutes pour certains variants.

K. marxianus fermente le glucose, le galactose, le sucrose, le raffinose et l'inuline, mais ne fermente pas le tréhalose et le maltose. C'est la seule espèce du genre *Kluyveromyces* capable d'assimiler l'inuline. Par ailleurs, le GC% est de 40,8 à 41,5 %, selon les souches, avec un génome réparti en 5 à 7 chromosomes. Cette espèce est généralement retrouvée dans les aliments et les boissons, avec une prédominance dans les produits laitiers. Elle est également présente dans des tissus végétaux en décomposition et chez les insectes.

K. marxianus se distingue par son potentiel de production d'enzymes et d'autres composés d'intérêts. Cette levure peut se développer sur une plus grande diversité de substrats et résiste à de fortes concentrations en éthanol, et aux sels. Par ailleurs, cette levure est aussi en mesure de croître à températures élevée, jusqu'à 52 °C pour certaines souches.

6.2. Impacts biotechnologiques

Les levures sont des organismes pouvant jouer un rôle majeur dans le domaine de la biotechnologie. En plus des aspects fermentaires, les levures sont dotées d'enzymes permettant des applications industrielles, pharmaceutiques et alimentaires. Elles sont connues, par exemple pour produire des enzymes appelées β -glucosidases qui peuvent être utilisées dans l'hydrolyse des composés aromatiques (amélioration et clarification des vins), ou encore dans la synthèse de détergents biologiques non ioniques par réaction de transglycosylation (Johnson et Echavarri-Erasun, 2011).

Les espèces appartenant au genre *Kluyveromyces* produisent une β -galactosidase et parfois une lactase, leurs permettant de dégrader le lactose, expliquant leur rôle dans l'industrie laitière. Elles peuvent aussi tirer profit de cette fonction pour valoriser un déchet de l'industrie fromagère, le lactosérum, comme substrat de croissance à faible coût (Spohner et al., 2016; Johnson et Echavarri-Erasun, 2011).

K. marxianus et *K. lactis* sont particulièrement intéressantes pour les biotechnologies. Elles sont d'ailleurs utilisées depuis environ deux décennies dans les biotechnologies alimentaires et animales (Spohner et al., 2016).

6.2.1. Potentiel biotechnologique de *K. lactis*

K. lactis (var *lactis*) est utilisée dans l'industrie laitière pour sa capacité à fermenter le lactose (Spohner et al., 2016; Johnson et Echavarri-Erasun, 2011; Snoek et Steensma, 2006). Elle peut être utilisée pour produire la β -galactosidase native, afin de produire des produits laitiers exempts de lactose, destinés à la population intolérante au lactose – c'est-à-dire les 2/3 de la population mondiale (Spohner et al., 2016; Johnson et Echavarri-Erasun, 2011; Snoek et Steensma, 2006). Cette enzyme peut également être utilisée pour produire des prébiotiques, de type galactose-oligosaccharide, ou GOS (Spohner et al., 2016; Johnson et Echavarri-Erasun, 2011; Snoek et Steensma, 2006).

Cette espèce a été utilisée, dans les années 60, comme complément alimentaire, sous forme de protéine d'origine unicellulaire, ou SCP (Spohner et al., 2016; Johnson et Echavarri-Erasun, 2011).

K. lactis est considérée comme la « boîte à outils » pour différentes recherches scientifiques, et est idéale pour la production de protéines recombinantes. Durant ces 25 dernières années, près de 100 protéines recombinantes ont été produites avec succès par *K. lactis*. Les protéines issues de *K. lactis* sont d'ailleurs autorisées par la Food and Drug Administration, aux USA, pour une utilisation en agroalimentaire (Spohner et al., 2016; Ercan et Demirci, 2014, 2015; Johnson et Echavarri-Erasun, 2011).

6.2.2. Potentiel biotechnologique de *K. marxianus*

Le potentiel biotechnologique de *K. marxianus* n'a été étudié que récemment, mais il semble être plus prometteur que celui de *K. lactis* (Fonseca et al., 2008).

K. marxianus est utilisée pour produire la β -galactosidase et la lactase. D'ailleurs, la β -galactosidase produite par *K. marxianus* est utilisée à grande échelle en Chine. Cette espèce produit également de l'inulinase (Lane et Morrissey, 2010; Singh et al., 2007). L'inulase permet la dégradation de l'inuline en fructose, un sucre qui possède un pouvoir sucrant plus élevé que celui du saccharose et pose moins de problèmes de type caries, athérosclérose, diabète et d'obésité (Johnson et Echavarri-Erasun, 2011; Lane et Morrissey, 2010; Singh et al., 2007). De plus, le fructose améliore l'absorption du fer, par formation de complexes de chélation fer-fructose (Johnson et Echavarri-Erasun, 2011; Lane et Morrissey, 2010; Singh et al., 2007).

Cette espèce produit d'autres métabolites, naturels ou recombinants comme les composés aromatiques, les esters de fruits, les acides carboxyliques, les cétones, les furannes et les alcools aromatiques divers. Parmi les acides carboxyliques produits, on retrouve l'acide hexanoïque qui a des applications industrielles très variées, notamment en parfumerie, médecine, agroalimentaire (additifs alimentaires), en industrie chimique (lubrifiants, caoutchouc ou les colorants) (Cheon et al., 2014; Yadav et al., 2014; Øverland et al., 2013; Belloch et al., 2011; Fonseca et al., 2008).

K. marxianus est utilisée comme SCP dans l'alimentation humaine et animale (Cheon et al., 2014; Yadav et al., 2014; Øverland et al., 2013; Belloch et al., 2011; Fonseca et al., 2008). L'utilisation de composés produits par *K. marxianus*, dans le domaine médical, porte actuellement sur les produits ayant des propriétés anti-cholestérolémique, ou les peptides inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I (ACE) permettant le traitement de pathologies cardiaques (Li et al., 2015; Belloch et al., 2011; Fonseca et al., 2008).

De plus en plus de composés d'intérêt sont susceptibles d'être produits en utilisant un *K. marxianus* génétiquement modifiée. Ces modifications génétiques peuvent être réalisées par les approches récentes de la technologie CRISPR/Cas9. Des études ont montré, l'existence de promoteurs forts chez *K. marxianus* facilement utilisables lors de l'insertion de gènes (Spohner et al., 2016; Heo et al., 2013; Lane et Morrissey, 2010).

6.3. Potentiel antagoniste

La littérature afférente à l'antagonisme des levures reste peu élaborée, quel que soit le mécanisme d'inhibition. Des études ont fait mention d'une production de mycocine chez *K. wickerhamii*. D'autres études font référence à une activité de type toxine « tueuse » chez *K. lactis* ou *K. marxianus*. Ces toxines agissent sur divers genres de levure. Elles présentent des caractéristiques chimiques proches de celles des mycocines, c'est-à-dire des protéines de faible poids moléculaire (Mehlomakulu et al., 2014; Golubev, 2013; Hernández et al., 2008; Kitamoto et al., 1993). Une activité anti-*Penicillium* est observée chez *K. marxianus*, en association avec du bicarbonate du sodium, selon un mécanisme attribué à une compétition spatiale et nutritionnelle (Geng et al., 2011). Par ailleurs, une activité antibactérienne retrouvée chez des souches de *K. lactis* et de *K. marxianus* isolées de fromages, a été mise en évidence très récemment. Cette activité cible notamment *Staphylococcus*, *Escherichia coli* et *Salmonella* sp., mais les composés responsables de cette inhibition restent à être caractérisés (Fadda et al., 2017).

Le genre *Kluyveromyces* contient des souches produisant des toxines K, bien que ces dernières soient peu étudiées. La présence d'activité antibactérienne attribuée à ces levures est une perspective prometteuse. En effet des besoins en substances antimicrobiennes sont utiles dans le domaine médical pour faire face au tarissement du pipeline des antibiotiques classiques, ou encore dans le domaine alimentaire pour une meilleure conservation des aliments.

7. OBJECTIFS DE LA THÈSE

Ce projet de thèse est basé sur la possible présence de levures antagonistes dans un milieu riche mais compétitif, comme celui observé dans les fromages artisanaux. C'est la compétition entre les acteurs du microbiote qui devrait permettre l'émergence de ces levures d'intérêts

Ainsi, les présents travaux portent sur la recherche et la caractérisation de levures antagonistes, à potentiel probiotique, à partir des produits du terroir de la région des Hauts-de-France. Outre la valorisation des produits du terroir, à plusieurs échelles (régionale, nationale et internationale), le projet avait les objectifs scientifiques suivant :

- L'étude et le décryptage des écosystèmes microbiens issus de fromages artisanaux. Dans le cadre de ce projet exploratoire, nous avons utilisé la « Tomme d'Orchies » qui est un fromage dont les caractéristiques sont proches de celles du Saint-Paulin, mais qui a la particularité d'être frotté avec de la bière, un produit alimentaire emblématique de la région. Le contenu et l'évolution des communautés microbiennes (microflores fongiques et lactiques) ont été réalisées par des approches métagénomiques, basée sur la technologie Illumina.
- Le criblage des levures antagonistes. Comme indiqué à plusieurs reprises, dans la revue bibliographique, la recherche de levures antagonistes, contrairement aux bactéries antagonistes, reste au stade du balbutiement. Ainsi, la découverte de molécules antagonistes produites par les levures est un enjeu scientifique majeur pour une meilleure compréhension des mécanismes de défense de ces eucaryotes unicellulaires. Dans le cas d'activité à spectre large, nous pourrions envisager des applications industrielles orientées vers le remplacement voire la potentialisation des antibiotiques classiques.
- L'utilisation des levures antagonistes comme souches probiotiques. La recherche est particulièrement dirigée vers les levures dites non-*Saccharomyces*. Il y a peu d'études mettant en valeur le potentiel d'application de ces levures, contrairement aux levures du genre *Saccharomyces* (*S. cerevisiae*, *S. boulardii*). Comme indiqué précédemment, les levures offrent de nombreux avantages par rapport aux bactéries probiotiques. Nous mettrons donc en relief les aptitudes probiotiques des levures dans des systèmes *in vitro* (résistance aux conditions gastro-intestinales, innocuité des souches...)

Résultats

Les différents résultats seront rapidement résumés dans une première partie. Les publications en elles-mêmes seront précédées d'une présentation ayant pour but de faire ressortir les résultats et les hypothèses principales. Les résultats non publiés seront précédés d'une description des méthodologies utilisées, des résultats proprement dits et d'une discussion les commentant.

La première partie des résultats concernera l'étude des écosystèmes fongiques et bactériens de la Tomme d'Orchies. On retrouvera une présentation rapide des fromages de la région Nord-Pas-de-Calais et plus précisément de la Tomme d'Orchies. Suivra une présentation de la technique et de la technologie métagénomique utilisée pour analyser ces microflores. Une étude culture-dépendante de la microflore fongique permettra de comparer les deux technologies et d'obtenir des isolats pour la recherche d'un pouvoir antagoniste provenant de l'écosystème fongique de la Tomme d'Orchies. Deux souches antagonistes seront mises en avant *K. marxianus* S-2-05 et *K. lactis* S-3-05. Ces souches seront étudiées vis-à-vis de leurs potentiels probiotiques, mais également sur les capacités anti-oxydantes de *K. marxianus*. Enfin, les recherches sur la nature et sur la localisation de la capacité antagoniste, provenant de ces levures, seront présentées.

1. RÉSUMÉ DES TRAVAUX ET DES RÉSULTATS OBTENUS

Dans le cadre de l'étude de la Tomme d'Orchies et de la recherche de levures antagonistes à potentiel probiotique, diverses expérimentations ont été menées. Un schéma résume le plan d'expérimentation en Figure 28.

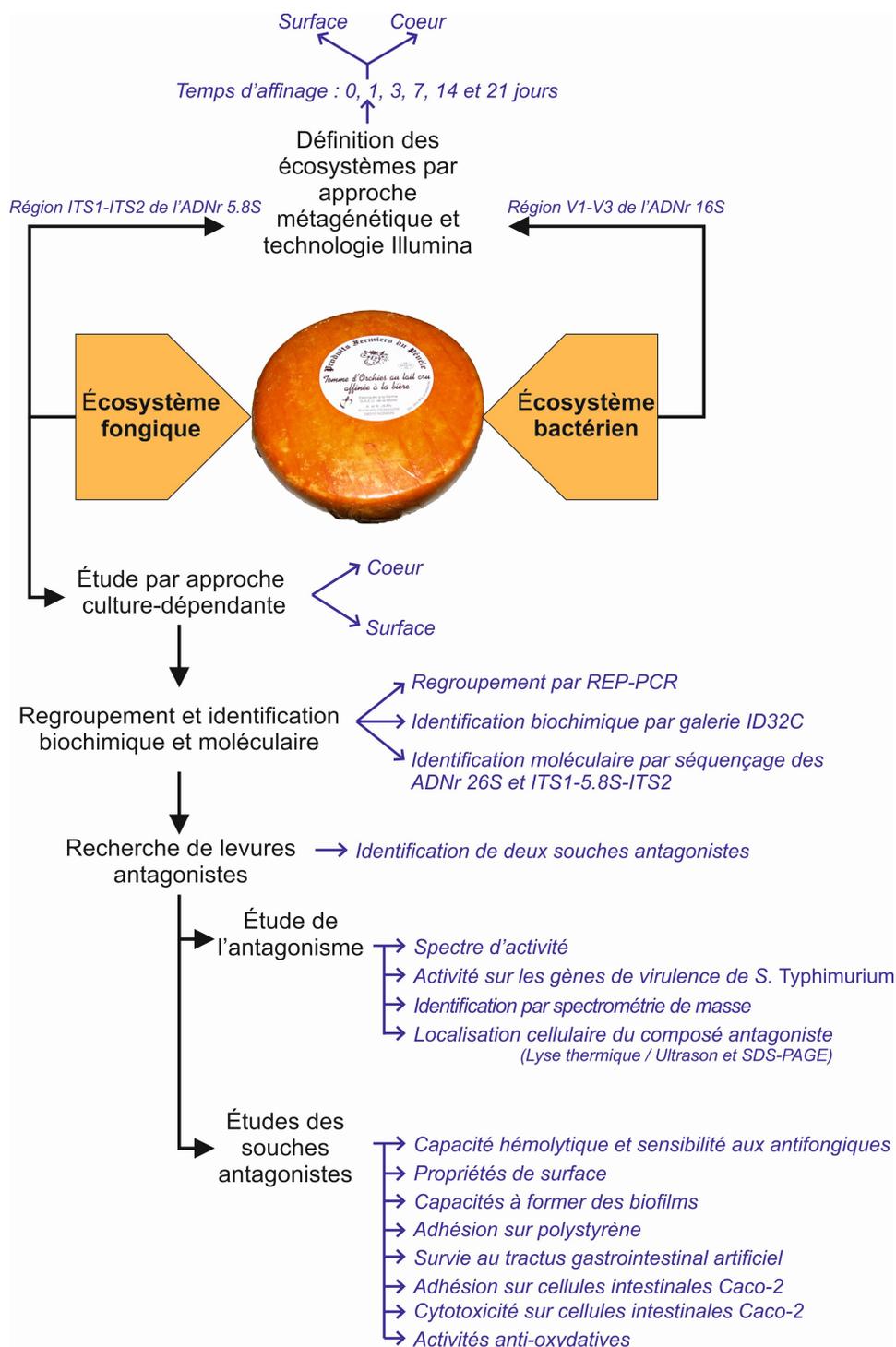


Figure 28. Représentation du plan d'expérimentation suivi au cours des travaux de recherches

2. CONTENU BACTÉRIEN ET ÉVOLUTION AU COURS DE L’AFFINAGE DE LA TOMME D’ORCHIES

L'écosystème bactérien de la Tomme d'Orchies et son évolution durant l'affinage a été décrit en différenciant le cœur et la surface du fromage (**Publication 1**). Le cœur du fromage présente une faible diversité, avec 15 unités taxonomiques opérationnelles, chacun contenant au moins 0,02 % des séquences totales obtenues. Le cœur de la Tomme d'Orchies est composé essentiellement des souches initiales, il s'agit notamment de *Lactococcus lactis* jusqu'au 3^{ème} jour d'affinage, suivi d'une prévalence de *Streptococcus thermophilus* (Figure 29a). L'écosystème bactérien de la surface du fromage contient 34 OTUs, chacun représentant au moins 0,02 % des séquences totales. Les souches issues de la culture initiale (*L. lactis*, *Lactobacillus helveticus* et *Streptococcus thermophilus*) sont dominantes lors des 3 premiers jours d'affinage. S'en suit une prévalence des bactéries du genre *Psychrobacter* et diverses Micrococcales, jusqu'au 21^{ème} jour d'affinage. Une co-dominance, avec *Corynebacterium variabile*, est observée tout au long de l'affinage. La diversité bactérienne de la surface de ce fromage reste globalement élevée, avec plus de 20 % de la microflore totale constituée d'OTUs représentant, unitairement, moins de 0,2 % des séquences totales (Figure 29b). Parmi les OTUs représentant plus de 0,02 % des séquences totales, 17 OTUs semblent être communes au cours de l'affinage, pour la partie cœur et la partie surface du fromage.

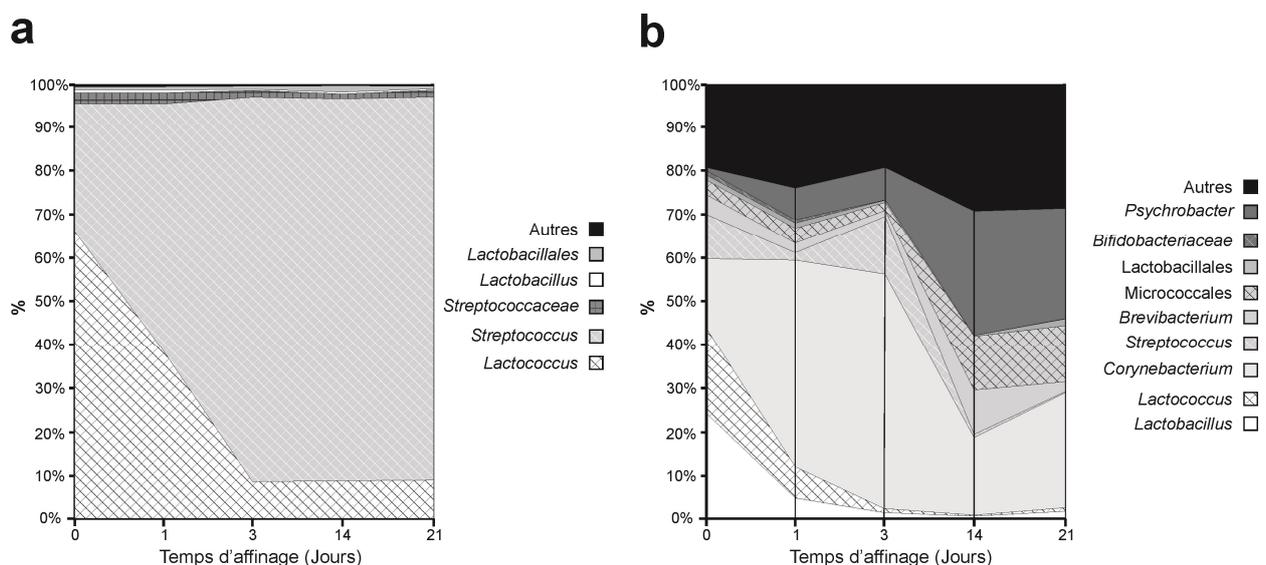


Figure 29. Analyse métagénomique du microbiote bactérien de la Tomme d'Orchies selon la durée d'affinage.

a : Microbiote du cœur du fromage ; **b** : Microbiote de la surface du fromage

3. CONTENU FONGIQUE ET ÉVOLUTION AU COURS DE L’AFFINAGE DE LA TOMME D’ORCHIES

L'écosystème fongique est composé de levures et de moisissures, mais la diversité reste moins importante comparativement à la flore bactérienne (**Publication 2**). Les analyses métagénomiques nous ont permis de mettre en évidence au moins 22 OTUs, contenant plus de 0,02 % des séquences totales dans le cœur du fromage (Figure 30a). En revanche, la surface du fromage présente 28 OTUs (Figure 30b). Lors de l'affinage et indépendamment de la localisation dans le fromage (cœur, surface), les *fungi* dominants sont *Yarrowia lipolytica* et *Galactomyces geotrichum*. L'espèce *Debaryomyces hansenii* est minoritaire malgré son utilisation dans la culture initiale. Parmi les OTUs citées ci-dessus, 19 OTUs sont communes au cœur et à la surface du fromage.

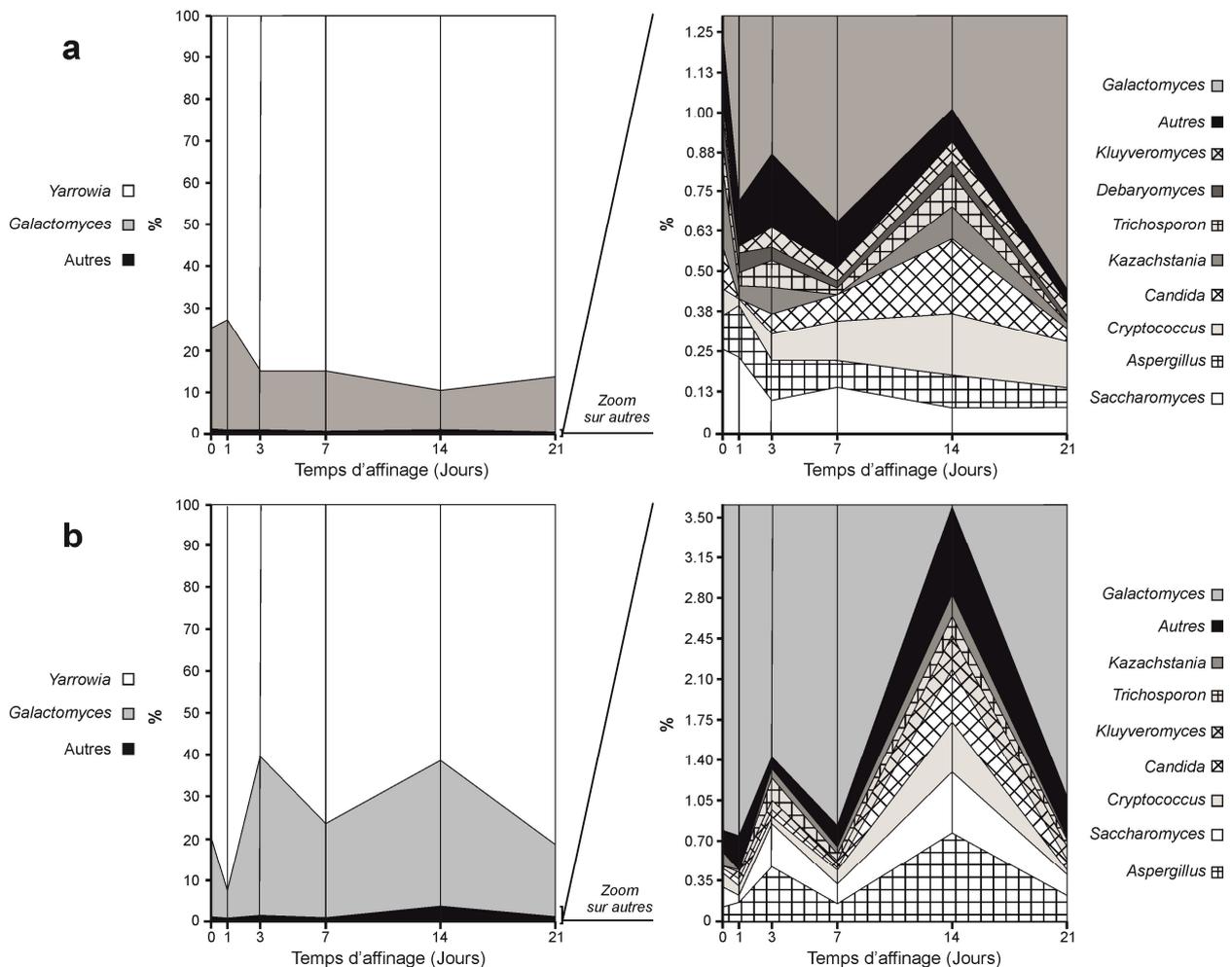


Figure 30. Analyse métagénomique du microbiote fongique de la Tomme d'Orchies selon la durée d'affinage.

a : Microbiote du cœur du fromage ; b : Microbiote de la surface du fromage

4. ISOLEMENT DES LEVURES PAR DES APPROCHES CULTURE-DÉPENDANTES ET CRIBLAGE DES ACTIVITÉS ANTAGONISTES

Cette approche nous a permis d'obtenir des levures à partir de la surface et du cœur de la « Tomme d'Orchies » (**Publication 3**). Ainsi, un total de 185 isolats a été obtenu, dont 76 à partir de la surface et 109 à partir du cœur du fromage. Pour les besoins de cette étude, nous avons utilisé 80 levures, en prenant en compte, les différentes morphologies des colonies. Ces levures (80 isolats) ont été analysées par des approches de biologie moléculaire afin de créer des groupes. Pour cela, nous avons utilisé la technique de REP-PCR (*Repetitive Element Palindromic –PCR*) qui utilise de l'amorce GTG₅, universelle des règnes du vivant. Cette approche a été utilisée avec succès pour générer des groupes de levures, mais aussi de bactéries lactiques (Ouoba et al., 2010, 2012). Les résultats de notre analyse par REP-PCR ont permis d'obtenir 6 groupes avec des profils moléculaires distincts (Figure 31). Dans ces 6 groupes, nous avons choisi de manière aléatoire 30 isolats pour la suite du projet. Ainsi, ces 30 isolats ont été identifiés par des méthodes biochimiques (Galerie ID 32C de Biomérieux) et moléculaires (Séquençage de l'ADNr 26 S et de l'ADNr ITS1-5,8 S-ITS2). En résumé, nous avons identifié les espèces suivantes : *Y. lipolytica*, *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces marxianus*, *K. lactis*, *Clavispora lusitaniae* et *Saturnispora* sp. Le criblage de l'activité antagoniste, notamment la production de molécules actives susceptibles d'être secrétées dans le milieu de culture de ces levures, a été effectué sur les 30 isolats, en utilisant comme souches cibles *Kocuria rhizophila* CIP 53.45 (également connu comme *Micrococcus luteus*) et *Candida albicans* ATCC 10231, un pathogène humain. Ce criblage a permis de mettre en évidence les capacités de *K. marxianus* S-2-05 et *K. lactis* S-3-05, à inhiber la croissance des souches cibles, *Kocuria rhizophila* CIP 53.45 (Figure 32a) et *Candida albicans* ATCC 10231 (Figure 32b), mais aussi d'autres microorganismes comme *Bacillus subtilis*, *B. thuringiensis*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Enteritidis, *S. Paratyphi* B et *S. Typhimurium*. Cette inhibition semble s'effectuer à travers un contact cellulaire, uniquement visible en milieu gélosé. L'utilisation de plusieurs méthodes de criblage de l'activité antagoniste, mais aussi l'utilisation d'un surnageant frais, ou concentré, n'a pas permis d'observer d'inhibition (**Autres résultats**). Le mécanisme exact d'inhibition reste donc à déterminer.

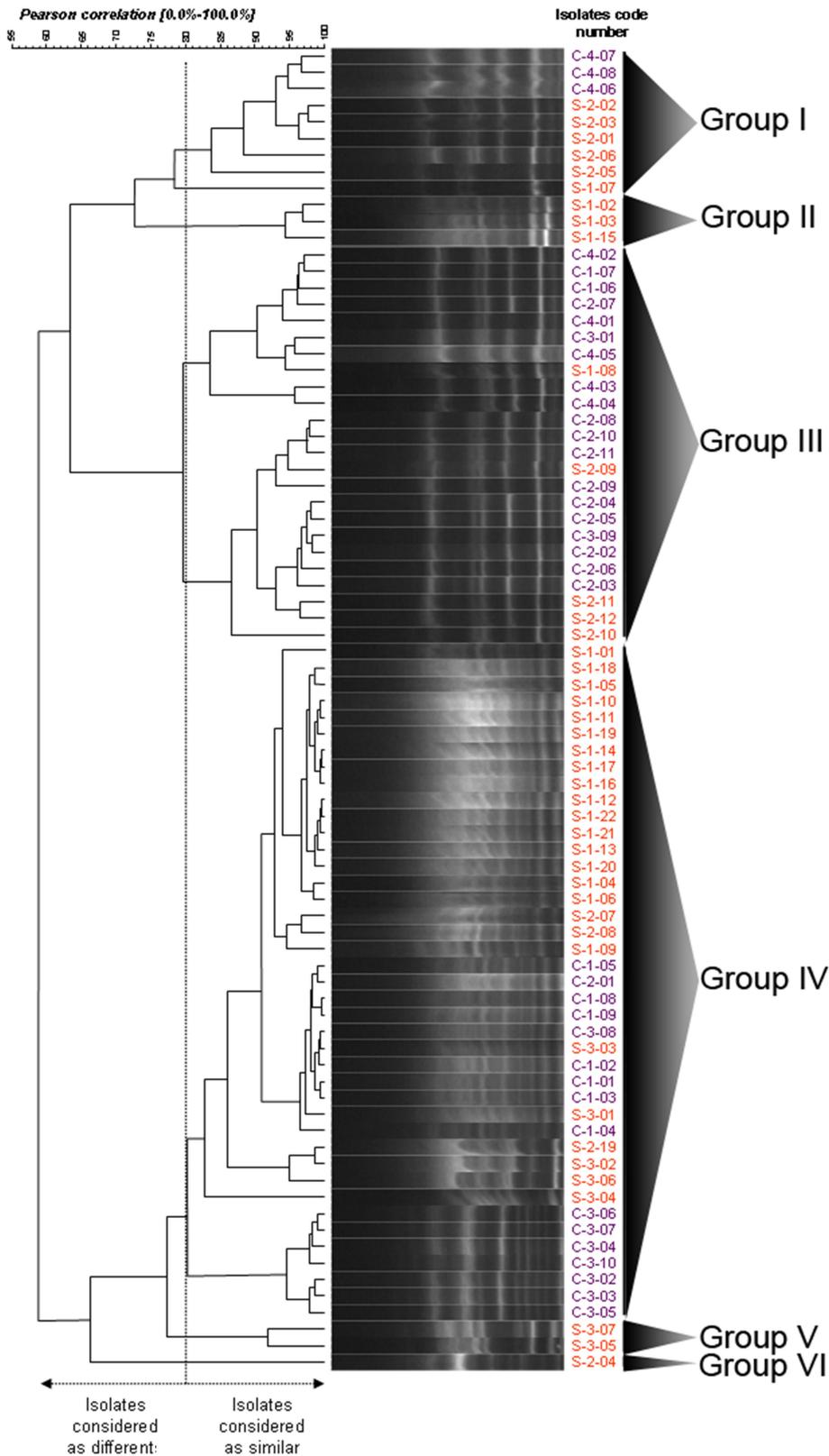


Figure 31. Regroupements phylogénétiques des isolats de levures issues de la Tomme d’Orchies à l’aide de la technique de REP-PCR

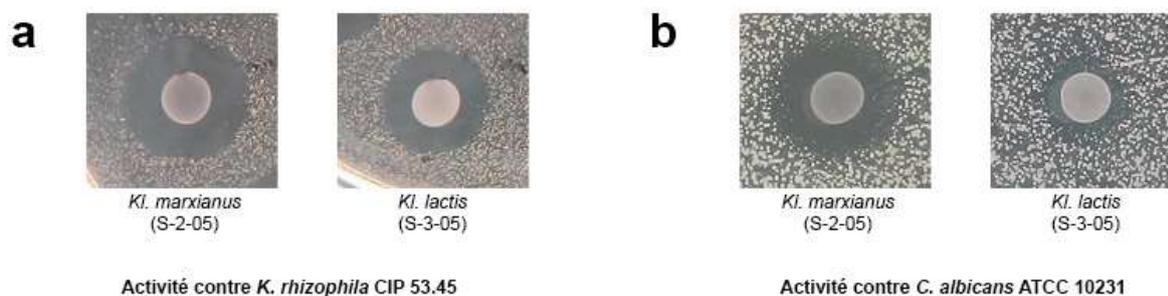


Figure 32. Zone d'inhibition observée autour des deux souches de *Kluyveromyces* antagonistes

a : Activité face à *K. rhizophila* CIP 53.45 ; **b :** Activité face à *C. albicans* ATCC 10231

5. ÉVALUATION DE L'EFFET PROBIOTIQUE DE *K. MARXIANUS* S-2-05 ET *K. LACTIS* S-3-05.

Les souches antagonistes, *K. marxianus* S-2-05 et *K. lactis* S-3-05, ont été étudiées pour d'autres effets bénéfiques (**Publication 4**), comme leurs propriétés anti-oxydantes (**Publication 5**). Ainsi, nous avons commencé par la caractérisation de ces souches. Pour leur innocuité, des tests d'activité hémolytique et de résistance aux fongicides, ont été réalisés. Il en résulte une absence d'activité hémolytique et une sensibilité à tous les antifongiques testés. Ces souches ne forment pas de biofilm sur les surfaces en polystyrène. De plus, les souches ont donné des résultats remarquables en ce qui concerne leurs résistances aux conditions du tractus gastro-intestinal. Elles adhèrent moyennement aux cellules intestinales Caco-2 et se distinguent par une absence de cytotoxicité sur la même lignée cellulaire. Par ailleurs, leurs propriétés de surface montrent un caractère hydrophile et basique, compatibles avec le mucus intestinal, sur lequel se situe la majorité du microbiote intestinal. Ces souches sont par ailleurs dotées d'une activité anti-*Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, avec une activité de sous-expression du gène de virulence *sopD*. Il convient de noter que la souche *K. marxianus* S-2-05 a montré une remarquable activité anti-oxydante (**Publication 5**).

En résumé, nos travaux sur l'exploration de l'écosystème de la « Tomme d'Orchies », un fromage artisanal de la région des Hauts-de-France, ont permis de caractériser l'évolution du contenu bactérien et fongique au cours de son affinage. L'isolement des levures a été réalisé par une approche culture dépendante qui a permis, *in fine*, la caractérisation de deux levures non-*Saccharomyces* antagonistes à potentiel probiotique, en l'occurrence, *K. marxianus* S-2-05 et *K. lactis* S-3-05.

Publication 1

Étude de la flore bactérienne de la Tomme d'Orchies par approche
métagénomique et son évolution lors de l'affinage

Résumé de la publication

Cet écosystème a été étudié par approche métagénomique, à l'aide de la technologie NGS Illumina MiSeq. Les amorces utilisées sont universelles chez les procaryotes, c'est-à-dire ayant pour cible l'ADNr 16 S, soit 490 bp environ. L'analyse est effectuée, d'une manière indépendante, sur la surface et sur le cœur du fromage. De plus, l'évolution de la microflore est évaluée lors de l'affinage en faisant des prélèvements à 0, 1, 3, 14 et 21 jours. Une étude bio-informatique est nécessaire pour assembler, grouper et identifier les séquences. Les différentes OTUs seront groupées suivant une distance taxonomique de 0,03 puis seront identifiées à l'aide de la base de données SILVA (Quast et al., 2013). Les résultats sont étudiés selon la proportion de séquences de chaque OTU, leurs identifications et leurs évolutions au cours de l'affinage. Une attention particulière est donnée aux OTUs correspondant aux espèces utilisées en tant que culture initiale. Enfin, la diversité, l'originalité, l'origine et le rôle possible des espèces identifiées ont été discutés.

Dans le cœur du fromage, l'étude a mis en évidence la dominance des espèces utilisées dans la culture initiale, comme *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris* et *Streptococcus thermophilus*. *Lb. helveticus* et *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii*. Une inversion des proportions de *Lactococcus* sp. et *Streptococcus* sp. est visible à partir du 3^{ème} jour d'affinage. À la surface du fromage, toutes les espèces initiales sont présentes dans des proportions intermédiaires. La microflore secondaire, notamment les NSLAB, proviennent principalement du lait. On retrouve dans le cœur de fromage *Lactobacillus* sp., *Leuconostoc* sp., *Streptococcus* sp., *Corynebacterium* sp. et *Brevibacterium* sp. Ces genres pourraient provenir de l'environnement d'affinage et/ou des manipulations liées au processus de fabrication du fromage. Les espèces citées ci-dessus sont fréquentes dans les fromages pressés non-cuit, au lait cru de vache. D'autres espèces présentent sur la surface du fromage sont plus proches des fromages à pâte lavée que des fromages à pâte pressée non-cuite. C'est le cas notamment des bactéries du genre *Psychrobacter* sp. et *Corynebacterium* sp. La surface de la Tomme d'Orchies montre une diversité bactérienne beaucoup plus forte que celle du cœur du fromage, avec respectivement 34 OTUs et 19 OTUs identifiées.

En conclusion, la microflore bactérienne de la Tomme d'Orchies, un fromage à pâte pressé non-cuite, est classique, mais n'est pas exclusivement spécifique à la variété utilisée. Globalement, il montre de fortes similarités avec les écosystèmes bactériens des fromages à pâte lavée. L'évolution de la microflore bactérienne, ainsi que les espèces présentes, ne constituent qu'une part de la microflore totale de la Tomme d'Orchies. L'étude de la microflore fongique est nécessaire pour déterminer la dynamique de microflore globale, et tenter de comprendre les interactions entre ces deux microflores.

1 **Use of a metagenetic approach to monitor the bacterial microbiota of**
2 **“Tomme d'Orchies” cheese during the ripening process**

3

4 Alexandre Ceugniet^a, Bernard Taminiau^b, Françoise Coucheney^{a,*}, Philippe Jacques^a,
5 Véronique Delcenserie^b, Georges Daube^b, Djamel Drider^a

6

7 ^a Univ. Lille, INRA, Univ. Artois, Univ. Littoral Côte d'Opale, EA 7394 – ICV - Institut
8 Charles Viollette, F-59000 Lille, France

9 ^b Fundamental and Applied Research for Animal & Health (FARAH), Food Science
10 Department, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, Liège, B-4000 Belgium

11

12 **Corresponding author:** francoise.coucheney@univ-lille1.fr

13

14 **Highlights:**

- 15 • Metagenetic analysis on artisanal cheese
- 16 • High number of non-inoculated species within the ripening microbiota of raw milk
- 17 cheese
- 18 • Bacterial diversity originates from the environment and ripening process

19

Abstract

The study of microbial ecosystems in artisanal foodstuffs is important to complete in order to unveil its diversity. The number of studies performed on dairy products has increased during the last decade, particularly those performed on milk and cheese derivative products. In this work, we investigated the bacterial content of “Tomme d'Orchies” cheese, an artisanal pressed and uncooked French cheese. To this end, a metagenetic analysis, using Illumina technology, was utilized on samples taken from the surface and core of the cheese at 0, 1, 3, 14 and 21 days of ripening process. In addition to the classical microbiota found in cheese, various strains likely from environmental origin were identified. A large difference between the surface and the core content was observed within samples withdrawn during the ripening process. The main species encountered in the core of the cheese were *Lactococcus* spp. and *Streptococcus* spp., with an inversion of this ratio during the ripening process. Less than 2.5% of the whole population was composed of strains issued from environmental origin, as *Lactobacillales*, *Corynebacterium* and *Brevibacterium*. In the core, about 85% of the microbiota was attributed to the starters used for the cheese making. In turn, the microbiota of the surface contained less than 30% of these starters and interestingly displayed more diversity. The predominant genus was *Corynebacterium* sp., likely originating from the environment. The less abundant microbiota of the surface was composed of *Bifidobacteria*, *Brevibacterium* and *Micrococcales*. To summarize, the “Tomme d'Orchies” cheese displayed a high diversity of bacterial species, especially on the surface, and this diversity is assumed to arise from the production environment and subsequent ripening process.

Keywords: Artisanal cheese, Illumina, 16S rDNA, Dynamic microbiota, Environmental strains, Operational taxonomic units

44
45 .

46 1. Introduction

47 France is a country with a rich cheese history and according to a recent report from
48 CNIEL, there are more than 1200 varieties, among which 400 are commonly consumed by
49 people (CNIEL, 2016). The different varieties of traditional and industrial cheeses are
50 known to be endowed with specific microbiota (Beresford et al., 2001; Irlinger and
51 Mounier, 2009). Cheeses are nowadays inoculated with standard and marketed starter
52 cultures such as *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Debaryomyces hansenii*
53 and other strains (Irlinger and Mounier, 2009). However, a secondary microbiota
54 composed of bacteria, yeasts and moulds, originated from milk and the environment that is
55 usually recovered from the cheese's surface and core. The starters and autochthonous
56 microbiota could interact during the milk fermentation, curd maturation and storage,
57 leading therefore to some cheese specificities such as biochemical changes and typical
58 sensory properties (Irlinger and Mounier, 2009; Lavoie et al., 2012; Mei et al., 2014;
59 Monnet et al., 2015). Cheeses microbial ecosystems are complex and novel insights on
60 their ecosystems are anticipated to help in improving the control of ripening, extending the
61 shelf-life and providing a better safety policy (Beresford et al., 2001; Bockelmann et al.,
62 2005; Dugat-Bony et al., 2015; Montel et al., 2014).

63 The bacterial population in the microbiota can be identified using the prokaryotic
64 universal primer, or 16S ribosomal DNA (Bokulich and Mills, 2012; O'Flaherty and
65 Klaenhammer, 2011; Quigley et al., 2012; Wolfe et al., 2014). The next generation
66 sequencing, or NGS, such as Illumina sequencing, allows high throughput sequencing of
67 total DNA of a sample without prior cultures and available data on viablebut-not-cultivable
68 strains (Bokulich and Mills, 2012). The Illumina method consists in the amplification of a
69 fragment of interest, for all samples using primerswith indexing adapters specific to
70 Illumina technology. A DNA library is then made by mixing of each sample, previously
71 tagged by short PCR primers with indexing tails and specific to each sample. The library is
72 sequenced by using terminator nucleotides with fluorescent dye, during the sequencing

73 PCR (O'Flaherty and Klaenhammer, 2011). The use of a metagenomic approach to
74 decipher the microbial communities is becoming a routine, due to its swiftness and ease of
75 utilisation (Delcenserie et al., 2014; Franzosa et al., 2015).

76 The “Tomme d'Orchies” is an uncooked pressed cheese using local raw milk of
77 Holstein cows. It is produced and marketed in the north of France for less than 50 years. A
78 recent culture-dependent study performed in our laboratory, permitted us to unveil the yeasts
79 content of this cheese (Ceugniez et al., 2015). This work aimed at studying the bacterial
80 content of “Tomme d'Orchies” cheese using the metagenetic approach on the samples taken
81 at different periods of the ripening process. Consequently, this study enabled us to establish a
82 signature of the “Tomme d'Orchies” bacterial content during the ripening process.

83

84 **2. Materials and methods**

85 *2.1 Cheese manufacturing and sampling*

86 The “Tomme d'Orchies” is a cheese coming from the “G.A.E.C de la Motte” farm located in
87 Nomain (North of France). Starter cultures are PAL114D (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*,
88 *L. lactis* subsp. *cremoris*, *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*, *S. thermophilus*, *Lactobacillus*
89 *helveticus* and *Lb. lactis*), *Propionibacterium* PAL25-2 (*P. freudenreichii* subsp. *shermanii*) and *D.*
90 *hansenii* (PAL DH10), were purchased from Standa laboratory (Caen, France). The ripening is
91 carried out at 12 °C for 3weeks. After three days of ripening, the “Tomme d'Orchies” cheese is
92 rubbed with a mix of brown beer, rocou and chicory (Ceugniez et al., 2015).

93 For the dynamic microbiota analysis, five samples of “Tomme d'Orchies” in different
94 cheeses were harvested at 0, 1, 3, 14 and 21 days of ripening process. The selling of cheese takes
95 place after 21 days of ripening. For each time of ripening, samples were cut in two parts, with a
96 sterile knife, to have surface and core separately. The surface corresponded to the first 2 mm
97 starting from the upper part of the cheese. Each sample was suspended in 9 g.L⁻¹ NaCl leading to
98 a concentration of 100 g.L⁻¹ with a Dilumat (BioMérieux, Craponne, France), and homogenized
99 for 90 s using a Stomacher BagMixer® (Interscience, St-Nom, France).

100 *2.2 DNA extraction and purification*

101 To extract total DNA, samples were centrifuged for 10 min at $5000 \times g$ and the
102 resulting pellets were treated for 1 h at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ with an enzymatic lysis buffer containing
103 Tris-HCl 20 mM, EDTA 2 mM, Triton X-100 1.2%, and Lysozyme $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Total DNA
104 was isolated from each primary suspension with the DNeasy Blood & Tissue DNA
105 extraction kit (Qiagen, Venlo, the Netherlands), following the manufacturer's
106 recommendations. The DNA was eluted into DNase/RNase-free water and its
107 concentration and purity were evaluated by optical density using the NanoDrop ND-1000
108 spectrophotometer (Isogen, St-Pieters- Leeuw - Belgium). DNA samples were stored at
109 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until used for 16S rDNA amplicon sequencing analysis.

110

111 *2.3 16S rDNA gene library construction and sequencing*

112 16S rDNA PCR libraries were generated for each cheese sample using 16S rDNA universal
113 primers with Illumina overhand adapters targeting V1–V3 hypervariable regions, forward (5'<!--
114 [INS]-TCGTCGGCAGCGTC AGATGTGTATAAGAGACAG-3') and reverse (5'
115 GTVTVGTGGGCTCGGA GATGTGTATAAGAGACAG-3'). Each PCR product was purified
116 with the Agencourt AMPure XP beads kit (Beckman Coulter, Pasadena, USA). A second PCR,
117 for indexing, was performed using the Nextera XT index primers 1 and 2, specific to the Illumina
118 technology. The PCR products were then purified as indicated above. Quantifications were made
119 using the Quant-IT PicoGreen (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA). To constitute a library,
120 each PCR product, after quantification, was diluted to $10\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ with Tris-HCl 10 mM Tween
121 20 0.05% and all PCR products were mixed together. An agarose gel (1%) was used to check if
122 the library was free of unwanted bands, if not, a new purification with AMPure XP beads was
123 made. A precise quantification, by qPCR, of each sample in the library was performed using the
124 KAPA SYBR® FAST qPCR Kit (KapaBiosystems, Wilmington, USA) before normalization,
125 pooling and sequencing on a MiSeq sequencer using v3 reagents (ILLUMINA, USA).

126

127 2.4 Bioinformatic analysis

128 Sequence reads processing were used as previously described by [Rodriguez et al.](#)
129 [\(2015\)](#) using respectively MOTHUR software package v1.35, Pyronoise algorithm and
130 UCHIME algorithm for alignment and clustering, denoising and chimera detection. The
131 clustering distance for operational taxonomic unit (OTU) is 0.03. 16S rDNA reference
132 alignment and taxonomical assignation were based upon the SILVA database (v1.15) of
133 full-length 16S rDNA sequences, with an average length of 490 bp. All the biosample raw
134 reads have been deposited at the National Center for Biotechnology Information (NCBI)
135 and are available under the Bioproject ID PRJNA300927.

136

137 3. Results

138 Next generation sequencing allows identification of OTUs at various taxonomic levels.
139 OTUs could be identified from the species, genus, family or sometimes only at order level.
140 Regarding the data given below, *species pluralis* (or spp.) was used to present strains belonging
141 to the same genus without species identifications. In addition, each dual value given below is
142 expressing a proportion of a strain from the beginning (0 day) to the end (21 days) of the
143 ripening process.

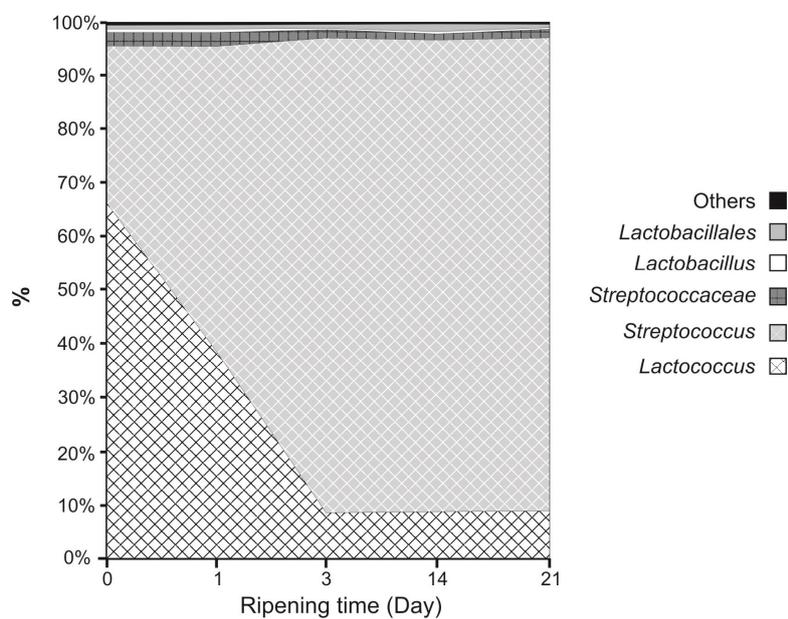
144 The following study allowed the identification of 10 species, 5 genera, 1 family and 2 orders
145 in the core of the cheese. About 0.40% of the core microbiota remained unidentified or at a too low
146 level in order to be placed taxonomically. Moreover, 21 species, 8 genera, 3 families and 2 orders
147 were found on the surface. The unidentified and uncited strains were in higher proportion on the
148 surface compared to the core, with relative proportions of 18 to 24% ([Table 1](#) and [Table 2](#)).

149

150 3.1 Analysis of the cheese core bacterial content

151 As shown in [Fig. 1](#), *Lactococcus* spp. and *Streptococcus* spp. were the main genera found in
152 the core of the cheese. During the first period of ripening, 66.09% of the sequences were allocated
153 to *Lactococcus* spp., and then a drastic drop occurred reaching 8.80% from the third day of

154 ripening. On the other hand, sequences of *Streptococcus* spp. were 29.47% at the beginning and
 155 88% at the end of ripening process. This increase started to occur from the third day of the ripening
 156 process. The other bacterial sequences were composed of *Streptococcaceae* (2.52% to 1.60%),
 157 *Lactobacillales* (0.70%) and *Lactobacillus* (0.63% to 0.30%). Other genera, including
 158 *Leuconostoc*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, representing 0.58% to 0.41% of the core
 159 microbiota were also found (Table 1). It should be underlined that between the beginning (day 0)
 160 and the end (day 21) of the ripening process, the sequences corresponding to the starter PAL 114D
 161 strains were fluctuating from 30.97% to 6.28% (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*), 24.96% to 1.96%
 162 (*L. lactis* subsp. *cremoris*) and 25.17% to 78.71% (*S. thermophilus*). The starter population has
 163 reached 81.11% even 86.95% of the core microbiota. Unidentified *Lactococcus* sp. (10.16% to
 164 0.57%) decreased during the ripening process from day 0 to day 3, while *Streptococcus* sp.
 165 population has increased from 4.30% to 10.07%. The 1.92% to 1.31% remaining part of the
 166 microbiota was represented by some *Lactobacilli*, especially *Lactobacillus rhamnosus*
 167 (*Lb. rhamnosus*), *Lb. sakei* and *Lb. malefermentans*, and by *Corynebacterium* sp., *Leuconostoc* sp.,
 168 unidentified *Micrococcales*, *Brevibacterium* sp. and other unspecified species (Table 1).
 169



170

171 **Fig. 1.** Bacterial genus distribution in the core of “Tomme d’Orchies” cheese, during the
 172 ripening process.

7

173 **Table 1**

174 Bacterial microbiota distribution, at the species level, in the core of the “Tomme d’Orchies”
 175 cheese, according to the period of ripening. Grey shading correspond to strains added in the starter.

Strains		Ripening (Day)				
		0	1	3	14	21
<i>Lactococcus</i>	<i>lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	30.97%	30.26%	7.12%	7.67%	6.28%
	<i>lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	24.96%	4.01%	0.74%	0.45%	1.96%
	sp.	10.16%	4.24%	0.57%	0.52%	0.56%
<i>Streptococcus</i>	<i>thermophilus</i>	25.17%	48.62%	78.54%	80.25%	78.71%
	sp.	4.30%	8.38%	10.07%	7.78%	9.58%
<i>Streptococcaceae</i>		2.52%	2.57%	1.55%	1.13%	1.60%
<i>Lactobacillus</i>	<i>rhamnosus</i>	0.42%	0.21%	0.09%	0.16%	0.09%
	<i>sakei</i>	-	-	0.02%	-	-
	<i>malefermentans</i>	-	-	-	-	0.02%
	sp.	0.21%	0.44%	0.15%	0.27%	0.19%
	<i>Lactobacillales</i>		0.71%	0.74%	0.72%	1.42%
<i>Corynebacterium</i>	<i>flavescens</i>	-	0.02%	-	-	-
	sp.	0.08%	0.02%	-	0.02%	0.02%
<i>Leuconostoc</i>	<i>gelidium</i>	0.02%	-	-	-	-
	<i>carnosum</i>	-	-	0.07%	-	-
<i>Micrococcales</i>		0.06%	0.02%	0.02%	-	-
<i>Brevibacterium</i>	<i>linens</i>	-	0.02%	-	-	0.02%
	sp.	0.02%	-	0.04%	0.05%	-
Others		0.40%	0.44%	0.28%	0.29%	0.37%

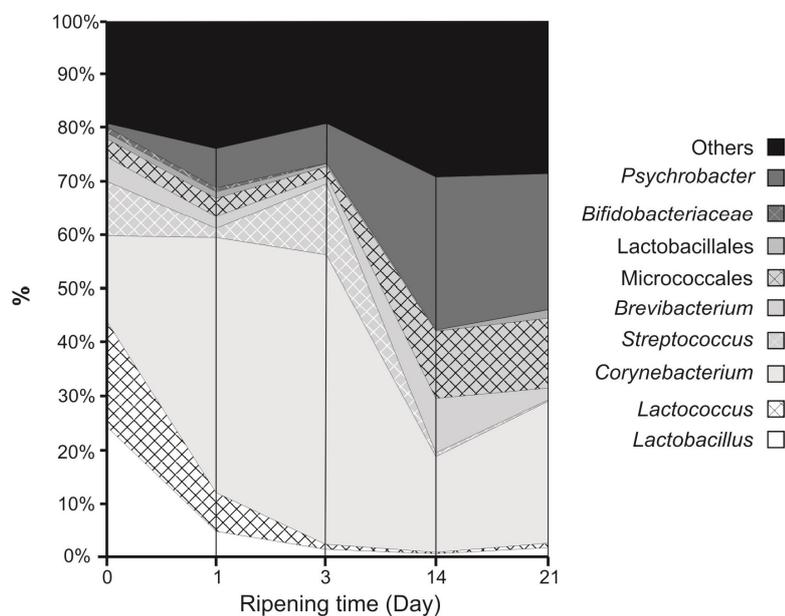
176

177 *3.2 The bacterial diversity of cheese surface*

178 As indicated in Fig. 2, the surface diversity as investigated here revealed that 18.38% to
 179 23.54% of the sequences correspond to an unassigned OTU and low proportion of genera, with less
 180 than 5% of sequences. The major part of the microbiota was composed of *Lactobacillus* spp.
 181 (24.13% to 1.70%), *Lactococcus* spp. (19.72% to 0.84%), *Corynebacterium* spp. (15.96% to
 182 26.42%), *Micrococcales* (3.36% to 13.01%), and *Psychrobacter* spp. (0.68% to 25.44%). Besides
 183 these major species, we detected, to a less extent, the presence of *Brevibacterium* spp. (4.54% to
 184 2.30%), *Lactobacillales* (around 1.25%), and *Bifidobacteriaceae* (1.02% to 0.07%).
 185 *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Brevibacterium* spp. and
 186 *Bifidobacteriaceae* had a trend to decrease during the ripening and were replaced by populations of
 187 *Corynebacterium*, *Micrococcales* and *Psychrobacter*. Populations of *Lactobacillales* and other
 188 species were stable during the ripening. Starter strains sequences on cheese surface represented

8

189 34.00% at the beginning, and only 0.79% at the end of the ripening process. They were composed of
 190 the species as those found in the core, with the addition of *Lb. helveticus* and some
 191 *Propionibacteriaceae*. As indicated in Table 2, the microbiota also contained *Lactococcus* sp.
 192 (4.83% to 0.36%), *Corynebacterium* sp. (2.84% to 3.93%), *Corynebacterium variabile* (*C. variabile*)
 193 (8.74% to 19.76%), *C. flavescens* (4.36% to 1.32%), *C. casei* (0.03% to 1.41%), *Micrococcales*
 194 (3.15% to 7.54%), *Psychrobacter celer* (0.05% to 12.98%), *Psychrobacter* sp. (0.63% to 12.46%),
 195 *Lb. capillatus* (3.54% to 0.02%), *Lb. rhamnosus* (1.23% to 0.00%), and other *Lactobacillales* (9.71%
 196 to 2.79%). Microbiota in lower proportion was composed of *Brevibacterium linens* (3.68% to
 197 1.56%), *Brevibacterium* sp. (0.87% to 0.74%), *Micrococcales* (3.15% to 7.54%). Microbiota in the
 198 lowest proportion was composed of *Leucobacter chromiireducens* (0.18% to 5.46%),
 199 *Leuconostoc gelidum* (around 0.03%), *Peptostreptococcus russelli* (0.00% to 4.02%),
 200 *Bifidobacterium psychraerophilum* and other *Bifidobacteriaceae* (1.03% to 0.07%),
 201 *Streptococcaceae* (0.29% to 0.00%), *Staphylococcus* sp. (0.21% to 0.00%), and *Serratia* sp. (0.00%
 202 to 0.46%). The last portion was composed of *Acetobacteriaceae* (0.13% to 0.00%),
 203 *Propionibacteriaceae* (0.11% to 0.00%), *Brachybacterium tyrofermentans* (0.11% to 0.07%),
 204 *Carnobacteriaceae* (0.03% to 0.41%) and *Hafnia alvei* (0.00% to 0.07%; Table 2).
 205



207 **Fig. 2.** Bacterial genus distribution on the surface of “Tomme d’Orchies” cheese, during
 208 the ripening process.

209 **Table 2**
 210 Bacterial microbiota distribution, at the species level, on the surface of the “Tomme d’Orchies”
 211 cheese, according to the period of ripening. Grey shading correspond to strains added in the starter.

Strains		Ripening (Day)				
		0	1	3	14	21
<i>Lactococcus</i>	<i>lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	12.29%	4.99%	0.51%	0.08%	0.46%
	<i>lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	2.60%	0.10%	0.02%	0.03%	0.02%
<i>Corynebacterium</i>	sp.	4.83%	2.09%	0.41%	0.16%	0.36%
	<i>variabile</i>	83.74%	23.45%	35.75%	12.01%	19.76%
	<i>flavescens</i>	4.36%	13.57%	10.35%	1.40%	1.32%
	<i>casei</i>	0.03%	1.58%	0.22%	2.08%	1.41%
<i>Lactobacillus</i>	sp.	2.84%	9.01%	7.67%	2.34%	3.93%
	<i>helveticus</i>	10.76%	2.12%	0.43%	-	0.02%
	<i>capillatus</i>	3.54%	0.29%	0.05%	-	0.02%
	<i>rhamnosus</i>	1.23%	0.12%	0.02%	-	-
	<i>malefermentans</i>	0.08%	0.10%	0.02%	-	0.02%
	<i>sakei</i>	-	-	-	-	0.02%
<i>Lactobacillales</i>	sp.	8.51%	2.05%	0.80%	0.49%	1.60%
		1.13%	1.07%	0.46%	0.39%	1.15%
<i>Streptococcus</i>	<i>thermophiles</i>	8.24%	1.41%	10.04%	0.49%	0.31%
	sp.	1.97%	0.29%	3.26%	0.21%	0.19%
<i>Streptococcaceae</i>		0.29%	0.05%	0.02%	-	-
<i>Brevibacterium</i>	<i>linens</i>	3.68%	1.73%	1.18%	7.21%	1.56%
	sp.	0.87%	0.51%	0.19%	3.01%	0.74%
<i>Leucobacter</i>	<i>chromiireducens</i>	0.18%	0.56%	0.31%	4.33%	5.46%
<i>Leuconostoc</i>	<i>gelidum</i>	0.03%	0.02%	-	-	-
<i>Peptostreptococcus</i>	<i>russelli</i>	-	-	0.02%	0.80%	4.02%
<i>Micrococcales</i>		3.15%	2.83%	1.54%	8.17%	7.54%
<i>Bifidobacterium</i>	<i>psychraerophilum</i>	0.11%	0.10%	-	-	-
<i>Bifidobacteriaceae</i>		0.92%	0.63%	0.05%	0.03%	0.07%
<i>Psychrobacter</i>	<i>celer</i>	0.05%	3.56%	0.70%	2.62%	12.98%
	sp.	0.63%	3.73%	6.73%	25.95%	12.46%
<i>Staphylococcus</i>	sp.	0.21%	0.22%	-	-	-
<i>Acetobacteraceae</i>		0.13%	-	-	-	-
<i>Propionibacteriaceae</i>		0.11%	0.07%	-	-	-
<i>Brachybacterium</i>	<i>tyrofermentans</i>	0.11%	0.07%	0.07%	0.29%	0.07%
<i>Carnobacteriaceae</i>		0.03%	0.17%	0.07%	0.03%	0.41%
<i>Hafnia</i>	<i>alvei</i>	-	0.37%	0.05%	0.03%	0.07%
<i>Serratia</i>	sp.	-	0.22%	-	1.79%	0.46%
Others		18.38%	22.92%	19.03%	26.08%	23.54%

212

213

214 4. Discussion

215 This metagenomic study permitted us to provide insightful information on the bacterial
216 content of a typical, local cheese named “Tomme d'Orchies”, which is produced and marketed in
217 the north of France. This first metagenomic analysis underpinned the dominance of the starter
218 strains as *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris* and
219 *Streptococcus thermophilus* in the core section of the cheese during the ripening process. Indeed,
220 percentages ranging from 81.10% to 86.95% were detected at the beginning and the end of the
221 ripening period. Besides the absence of *Lb. helveticus* in the core of the cheese, we observed that
222 *Lactococcus* and *Streptococcus* contents progressed differently along the ripening process.
223 Indeed, the inversion of ratios observed at the end of ripening could be partly attributed to the
224 salt concentration, which can inhibit the growth of *Lactococcus*. [Holt et al. \(1994\)](#) reported the
225 inabilities of *Lactococcus* strains to grow at NaCl concentration higher than 0.5%, leading
226 therefore to a decrease of its population within the total cheese microbiota. Moreover, lactic acid
227 produced during the first three days of ripening process could also explain this decrease, as yet
228 observed for acid sensitive strains ([Beresford et al., 2001](#)). Thus, the conditions encountered in
229 the core of the cheese appeared to offer a clear advantage to *Streptococcus* that could reach the
230 highest percentage of the bacterial population (89.89%). On the other hand, “eyes” formation
231 observed in the core of the Swiss cheeses ([Beresford et al., 2001](#); [Dalmasso et al., 2011](#)) was
232 associated with the development of bacteria belonging to *Propionibacterium* genus. Surprisingly,
233 *Propionibacterium*, especially *P. freudenreichi* subsp. *shermanii*, was almost non-existent in the
234 core of the “Tomme d'Orchies” cheese, although it was incorporated as starter. The metagenetic
235 approach used here did not permit detection of this species, in spite of its use as starter.
236 Independently of the amount of starter and technology used, this genus is known to preferentially
237 grow under anaerobic conditions. In our opinion, further analyses are required to determine
238 whether this starter culture, has any prominent role during the manufacturing process.

239 Regarding the surface section of the cheese, we noticed that almost all the starter strains
240 were present, mainly at the beginning of the ripening as an average level of 33.4%, conversely at

241 the end of the process only less than 1% was detected. This decrease could be explained by
242 different factors including a plausible competition with the secondary microbiota, and antagonism
243 resulting from the rubbing with the brine, brown beer (ethanol) and rocou, which is known to
244 exert inhibitory activities against both Gram-negative and Gram-positive bacteria and also
245 antibiotic-resistant strains (Fleischer et al., 2003; Yasunaka et al., 2005). It should be noted that in
246 the core of the cheese, the secondary microbiota was represented about 1.84% to 1.31% of the
247 microbiota along the ripening process. The secondary microbiota, designated also as the
248 non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) contained in the present analysis the following species:
249 *Lactobacillus* sp., *Leuconostoc* sp., and *Streptococcus* sp. *Corynebacterium* strains. The NSLAB
250 found in the core could have originated from milk (Vacheyrou et al., 2011). According to Irlinger
251 and Mounier (2009), the decrease of the strains from raw milk observed progressively along the
252 ripening process could be attributed to the nutritional competition or bacteriocins production.

253 Moreover, the *Corynebacterium* sp. and *Brevibacterium* strains found in the core of cheese
254 were likely due to cross contaminations occurring during the manipulation, cutting and
255 packaging of cheese samples. It should be noted that within the remaining strains, those
256 displaying stable levels during the ripening period were, for most of them, not identified strains,
257 whereas the other ones were anticipated to be from the environment.

258 The low proportion of NSLAB and other strains can possibly be explained by their low
259 levels in the raw milk initially used to produce the cheese, and/or to the unfavourable conditions
260 faced for their growth. Moreover, the compression of the curd during the process increases the
261 density of the product. This high density would limit therefore the microbial dispersion of
262 environmental NSLAB strains in the core during the ripening. Furthermore, the secondary
263 microbiota diversity observed on the surface cheese could be from the environment during
264 ripening and from the manufacturing process, such as a contact with tools and ripening shelves.
265 It should be pointed out that the dominant genera highlighted in this study was also revealed in
266 previous studies by Quigley et al. (2012) and Wolfe et al. (2014). However, in the above-cited
267 studies, *Pseudoalteromonas* and *Vibrio* but not *Bifidobacterium* and *Pediococcus* were present in

268 the rind of cow cheese, therefore differing from our study. This difference could potentially be
269 explained by the raw cow milk and the cheese process. It was reported that indigenous milk
270 bacteria found in low quantity including NSLAB such as *Leuconostoc*, *Streptococcus* sp.,
271 *Lactobacillus*, have a particular fate since their number started to decrease rapidly from the first
272 day of ripening to almost non-detectable limits at the end of the ripening (Vacheyrou et al.,
273 2011). Nevertheless, *Leucobacter chromiireducens* increased to 5.46%. *Psychrobacter* sp. was
274 present in the raw cow milk and was highly favoured by the low temperature in the ripening
275 chamber (Montel et al., 2014; Vacheyrou et al., 2011). Analysis on the ripening shelf, or the
276 brine used for rubbing, could be interesting to determine if *Psychrobacter* are present or not.
277 Indeed, it was reported that *Psychrobacter celer* was isolated in seawater (Yoon et al., 2005).
278 This OUT would be able to grow in the cheese with high salt concentration possibly provided by
279 the brine. The high proportion of this OUT could contribute to the aromatic properties of the
280 cheese, as demonstrated in Herve Belgian cheese (Delcenserie et al., 2014; Irlinger et al., 2012).

281 The orange coloration of the cheese is usually attributed to the presence of *Brevibacterium*
282 *linens* associated with yeast strains and some *Micrococcales* pigment producers as *Staphylococcus* or
283 *Micrococcus* (Bockelmann et al., 2005; Bockelmann and Hoopse-Seyler, 2001; Irlinger and Mounier,
284 2009). In the case of “Tomme d’Orchies” cheese, most of the orange coloration was attributed to
285 rubbing with rocou, a food dye coming from *Bixa orellana* (Barrozo et al., 2013). *Bifidobacteriaceae*
286 were present in low proportion (about 1%) at the beginning of the ripening period and then decreased
287 to almost non-detectable presence by the end of the ripening. These strains can be considered native
288 as recently reported Montel et al. (2014), or could originate from the annual treatment of the farm by
289 spraying of probiotic strains (species not communicated by the producer) to avoid contaminations of
290 the environment by pathogens such as *Salmonella* or *Listeria*. However, *Bifidobacteriaceae* could
291 not grow in those cheeses, and remained at “trace” level from the third day of ripening. Other OTUs
292 found in low proportion such as *Brachybacterium tyrofermentans*, *Carnobacteriaceae*, *Hafnia alvei*
293 and *Serratia* sp. remained in stable proportions during the ripening. The origin of these OTUs was
294 likely the raw cow milk, according to similar analysis (Montel et al., 2014).

295 Physico-chemical analyses of the cheese, such as determination of salt concentration, pH
296 and aw, could help to better understand the bacterial population dynamics. As this cheese was
297 not involved in any public health case, its natural microbiota can be investigated to help in
298 preventing food-borne pathogens despite the use of raw milk. The culture-dependent analysis of
299 each strain will clearly highlight these species of interest according to their identification and
300 their positive properties such as use as potential probiotics. In the core of “Tomme d'Orchies”
301 cheese, the dominant presence of starter strains and the physicochemical conditions of the core
302 have probably hampered the development of autochthonous strains from milk. Therefore,
303 isolation and characterization of potential probiotics derived from *Corynebacterium variabile*,
304 *Leucobacter chromiireducens*, *Peptostreptococcus russeli*, *Psychrobacter celer*,
305 *Psychrobacter* sp., some *Micrococcales* and other unidentified strains using culture-independent
306 methods, constitute our next research focus.

307 The bacterial microbiota of the “Tomme d'Orchies”, a washed, pressed, uncooked cheese,
308 and revealed similarities with washed and smear cheeses such as the presence of *Psychrobacter*
309 and *Corynebacterium* (Delcenserie et al., 2014). The presence of *C. variabile* and *C. casei* in
310 high proportion showed similarity with acid curd cheeses (Bockelmann et al., 2005; Bockelmann
311 and Hoop-Seyler, 2001). In conclusion, we determined that Tomme d'Orchies cheese contains
312 the usual bacterial microbiota for cheeses. However, the bacterial content was not totally specific
313 for its variety, pressed uncooked cheese, and showed high similarities with smear cheeses. No
314 statistical analysis was undertaken in this study to detect the variability of bacterial content, but it
315 would be interesting to study it at each time of ripening. Yeasts with antagonistic activity were
316 identified in a previous study on this cheese and could influence the bacterial microbiota
317 (Ceugniz et al., 2015). Further investigations are required to provide insightful data on the
318 indigenous bacterial strains and their beneficial properties.

319

320

321 Acknowledgements

322 This work was supported by Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche
323 (France). The authors would like to thank Mr. Antoine Jean, from the G.A.E.C de la Motte at
324 Nomain (North, France), producer of the “Tomme d'Orchies” cheese. The authors are indebted to
325 Dr. Bruce Seal for critical reading and English improvement of the manuscript.

326

327 References

- 328 Barrozo, M.A.S., Santos, K.G., Cunha, F.G., 2013. Mechanical extraction of natural dye
329 extracts from *Bixa orellana* seeds in spouted bed. *Ind. Crop. Prod.* 45, 279–282.
- 330 Beresford, T.P., Fitzsimons, N.A., Brennan, N.L., Cogan, T.M., 2001. Recent advances in
331 cheese microbiology. *Int. Dairy J.* 11, 259–274.
- 332 Bockelmann, W., Hoopse-Seyler, T., 2001. The surface flora of bacterial smear-ripened
333 cheeses from cow's and goat's milk. *Int. Dairy J.* 11, 307–314.
- 334 Bockelmann, W., Willems, K.P., NEve, H., Heller, K.H., 2005. Cultures for the ripening of
335 smear cheeses. *Int. Dairy J.* 15, 719–732.
- 336 Bokulich, N.A., Mills, D.A., 2012. Next-generation approaches to the microbial ecology of
337 food fermentations. *BMB Rep.* 45 (7), 377–389.
- 338 Ceugniet, A., Drider, D., Jacques, P., Coucheney, F., 2015. Yeast diversity in a traditional
339 French cheese “Tomme d'orchies” reveals infrequent and frequent species with associated
340 benefits. *Food Microbiol.* 52, 177–184.
- 341 CNIEL, 2016. L'économie laitière en chiffres. Caroline P. (dir.) 181 p.
- 342 Dalmaso, M., Nicolas, P., Falentin, H., Valence, F., Tanskanen, J., Jatila, H., Slusjärvi, T.,
343 Thierry, A., 2011. Multilocus sequence typing of *Propionibacterium freudenreichii*. *Int.*
344 *J. Food Microbiol.* 145, 113–120.
- 345 Delcenserie, V., Taminiiau, B., Delhalle, L., Nezer, C., Doyen, P., Crevecoeur, S., Roussey, D.,
346 Korsak, N., Daube, G., 2014. Microbiota characterization of a Belgian protected designation
347 of origin cheese, Herve cheese, using metagenomic analysis. *J. Dairy Sci.* 97, 6046–6056.

- 348 Dugat-Bony, E., Straub, C., Teissandier, A., Onésime, D., Loux, V., Monnet, C., Irlinger, F.,
349 Landaud, S., Leclercq-Perlat, M.-N., Bento, P., Fraud, S., Gibrat, J.-F., Aubert, J., Fer, F.,
350 Guédon, E., Pons, N., Kennedy, S., Beckerich, J.-M., Swennen, D., Bonnarme, P., 2015.
351 Overview of a surface-ripened cheese community functioning by meta-omics analyses.
352 PLoS One <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0124360>.
- 353 Fleischer, T.C., Ameade, E.P.K., Mensah, M.L.K., Sawyer, I.K., 2003. Antimicrobial activity
354 of the leaves and seeds of *Bixa orellana*. *Fitoterapia* 74, 136–138.
- 355 Franzosa, E.A., Hsu, T., Sirota-Madi, A., Shafquat, A., Abu-Ali, G., Morgan, X.C.,
356 Huttenhower, C., 2015. Sequencing and beyond: integrating molecular ‘omics’ for
357 microbial community profiling. *Nat. Rev. Microbiol.* 13, 360–372.
- 358 Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., Williams, S.T., 1994. *Bergey's Manual of*
359 *Determinative Bacteriology*. Ninth ed. Ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA.
- 360 Irlinger, F., Mounier, J., 2009. Microbial interactions in cheese: implications for cheese
361 quality and safety. *Curr. Opin. Biotechnol.* 20 (2), 142–148.
- 362 Irlinger, F., Yung, S.A.Y.I., Sarthou, A.-S., Delbès-Paus, C., Montel, M.-C., Coton, E.,
363 Coton, M., Helinck, S., 2012. Ecological and aromatic impact of two Gram-negative
364 bacteria (*Psychrobacter celer* and *Hafnia alvei*) inoculated as part of the whole microbial
365 community of an experimental smear soft cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 153, 332–338.
- 366 Lavoie, K., Touchette, M., St-Gelais, D., Labrie, S., 2012. Characterization of the fungal
367 microflora in raw milk and speciality cheeses of the province of Québec. *Dairy Sci.*
368 *Technol.* 92, 455–468.
- 369 Mei, J., Guo, Q., Wu, Y., Li, Y., 2014. Microbial diversity of a Camembert-type cheese using
370 freeze-dried Tibetan kefir coculture as starter culture by culture dependent and culture-
371 independent methods. *PLoS One* 9, e111648.
- 372 Monnet, C., Landaud, S., Bonnarme, P., Swennen, D., 2015. Growth and adaptation of
373 microorganisms on the cheese surface. *FEMS Microbiol. Lett.* 362, 1–9.

- 374 Montel, M.-C., Buchin, S., Maller, A., Delbes-Paus, C., Vuitton, D.A., Desmasures, N.,
375 Berthier, F., 2014. Traditional cheeses: rich and diverse microbiota with associated
376 benefits. *Int. J. Food Microbiol.* 177, 136–154.
- 377 O'Flaherty, S., Klaenhammer, T.R., 2011. The impact of omic technologies on the study of
378 food microbes. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 2, 353–371.
- 379 Quigley, L., O'Sullivan, O., Beresford, T.P., Ross, P.R., Fitzgerald, G.F., Cotter, P.D., 2012.
380 High-throughput sequencing for detection of subpopulations of bacteria not previously
381 associated with artisanal cheeses. *Appl. Environ. Microbiol.* 78 (16), 5717–5723.
- 382 Rodriguez, C., Taminiau, B., Brévers, B., Avesani, V., Van Broeck, J., Leroux, A., Gallot,
383 M., Bruwier, A., Amory, H., Delmée, M., Daube, G., 2015. Faecal microbiota
384 characterization of horses using 16S rDNA barcoded pyrosequencing, and carriage rate of
385 *Clostridium difficile* at hospital admission. *BMC Microbiol.* 15 (1):181.
386 <http://dx.doi.org/10.1186/s12866-015-0514-5>.
- 387 Vacheyrou, M., Normand, A.-C., Guyot, P., Cassagne, C., Piarroux, R., Bouton, Y., 2011.
388 Cultivable microbial communities in raw cow milk and potential transfers from stables of
389 sixteen French farms. *Int. J. Food Microbiol.* 146, 253–262.
- 390 Wolfe, B.E., Button, J.E., Santarelli, M., Dutton, J.R., 2014. Cheese rind communities
391 provides tractable systems for in situ and in vitro studies of microbial diversity. *Cell*
392 158 (2), 422–433.
- 393 Yasunaka, K., Abe, F., Nagayama, A., Okabe, H., Lozada-Pérez, L., López-Villafranco, E.,
394 Muñiz, E.E., Aguila, A., Reyes-Chilpa, R., 2005. Antibacterial activity of crude extracts
395 from Mexican medicinal plants and purified coumarins and xanthenes. *J.*
396 *Ethnopharmacol.* 97, 293–299.
- 397 Yoon, J.-H., Lee, C.-H., Kang, S.-J., Oh, T.-K., 2005. *Psychrobacter celer* sp. nov., isolated
398 from sea water of the South Sea in Korea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55, 1885–1890.

Publication 2

Étude de la flore fongique de la Tomme d'Orchies par approche
métagénomique et son évolution lors de l'affinage

Résumé de la publication

L'influence des champignons sur les propriétés organoleptiques des fromages est connue, cependant l'identification de la microflore fongique reste moins étudiée. Dans ce travail et comme énoncé dans les objectifs de la thèse, nous avons utilisé la technologie Illumina pour établir la flore fongique de la Tomme d'Orchies. La technologie NGS type Illumina MiSeq permet de séquencer des fragments de petites tailles, les domaines ITS1-ITS2 de l'ADNr 5,8 S ne sont donc pas utilisables sur l'ensemble de la séquence. Afin de pallier à ce problème, seul l'ITS2 est utilisé pour l'analyse métagénomique de la flore fongique de la Tomme d'Orchies. L'ITS2 est plus variable que l'ITS1 et permet d'obtenir plus d'informations sur les espèces, c'est pour cette raison qu'il a été sélectionné. Pour cela, les amorces ITS3_KYO2 et ITS4 ont été utilisées. Elles ont été créées pour les analyses métagénomiques des champignons environnementaux, mais sont compatibles avec l'analyse des produits alimentaires d'origine animale. Comme pour l'écosystème bactérien, les analyses ont été effectuées sur la surface et le cœur du fromage, et sur différents temps d'affinage, à l'instar des analyses faites pour la flore bactérienne. Le traitement bio-informatique des données a été conçu afin de constituer des OTUs contenant des séquences ayant une distance taxonomique de 0,03 maximum. Ces OTUs ont été identifiées à l'aide de la base de données UNITE (Kõljalg et al., 2013). Les résultats sont étudiés de manière similaire à la microflore bactérienne.

L'analyse de la microflore fongique a permis de mettre en évidence de nombreuses espèces de levures et quelques moisissures. La diversité est élevée dans les deux parties du fromage, avec 22 OTUs identifiées dans le cœur du fromage et 28 OTUs identifiées à sa surface. Les espèces retrouvées dans la Tomme d'Orchies ne sont pas des espèces rares, cependant les proportions retrouvées dans nos analyses ont montré un caractère particulier à ce fromage. À notre connaissance c'est la première étude qui met en relief l'espèce *Malassezia restricta* dans un fromage. Par ailleurs, l'espèce majoritaire du fromage est *Y. lipolytica*, alors qu'elle a été décrite comme sous-dominante, voire minoritaire dans d'autres fromages. *K. marxianus* est plus abondante que *K. lactis* dans la Tomme d'Orchies, alors que *K. lactis* est habituellement en plus fortes proportions. L'espèce *D. hansenii* est très minoritaire dans le fromage, malgré son utilisation comme culture initiale, son rôle, voire son utilisation dans la fabrication de ce fromage reste énigmatique. La levure *S. cerevisiae* est peu fréquente dans les fromages,

cependant sa présence dans la Tomme d'Orchies peut s'expliquer par le frottage du fromage avec un mélange contenant de la bière brune non filtrée. Les autres espèces rencontrées sont des espèces fréquemment retrouvées dans les fromages au lait de vache cru, sauf *Kazacshtania unispora* qui est normalement retrouvée dans le lait de jument fermenté.

En conclusion, la composition de l'écosystème fongique de la Tomme d'Orchies est classique, cependant les proportions et les dynamiques d'évolution, durant l'affinage, de certaines espèces sont particulières. Nous avons aussi mis en évidence la présence de levures non usuelles, comme *K. unispora* et *M. restricta*.

1 **Fungal diversity of “Tomme d’Orchies” cheese during the ripening**
2 **process as revealed by a metagenomic study**

3

4 Alexandre Ceugniet¹, Bernard Taminau², Françoise Coucheney¹, Philippe Jacques¹,
5 Véronique Delcenserie², Georges Daube², Djamel Drider^{1*}

6

7 ¹ Univ. Lille, INRA, Univ. Artois, Univ. Littoral Côte d’Opale, EA 7394 – ICV - Institut
8 Charles Viollette, F-59000 Lille, France

9 ² Fundamental and Applied Research for Animal & Health (FARAH), Food Science
10 Department, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, Liège, B-4000 Belgium

11

12 **Corresponding author:** djamel.drider@univ-lille1.fr

13

14 **Highlights:**

- 15 • Unusual proportion of fungal microbiota during cheese ripening
16 • High proportion of environmental strains in a fungal population
17 • *Yarrowia lipolytica* dominance

18

19 **Abstract**

20 The number of studies aimed at understanding the microbial ecosystems in fermented
21 foods, with particular emphasis on the bacterial diversity, is escalating. A metagenetic
22 approach based on the use of Illumina, which is a new generation of sequencing
23 technology, targeting ITS2 domain of the 5.8S fungal rDNA, was used here to perform the
24 fungal content (yeast, mold) of "Tomme d'Orchies"; an artisanal pressed and uncooked
25 French cheese. To this end, samples were taken from the rind and the core of different
26 cheeses after 0, 1, 3, 7, 14 and 21 days of ripening. The data analyses unveiled the
27 prevalence of *Yarrowia lipolytica* and *Galactomyces geotrichum*, in the rind and the core
28 of this cheese. The presence of unusual species such as *Clavispora lusitaniae*,
29 *Kazachstania unispora* and *Cladosporium cladosporioides* was also revealed. On the other
30 hand, the development of *Kluyveromyces* and *Debaryomyces* species was less important.

31
32 **Keywords:** Artisanal cheese, Illumina, 5.8S-ITS2 rDNA, dynamic microbiota,
33 environmental strains

34
35 .

36 1. Introduction

37 Advances in genomic and metagenomic sequencing are providing researchers and
38 industrialists with insightful information on the bacterial, fungal and viral diversity in
39 many traditionally produced foods. These studies concluded to the prevalence of bacterial
40 species, or fungal species and also co-existence of both bacteria and fungi. These microbial
41 communities of fermented foods, abbreviated as “MCoFFs” may form multispecies
42 biofilms associated with surfaces (rind cheese), suspended biofilm in liquid, as Kefir,
43 dispersed growth in liquid, as yogurt or wine, or in semi-solid substrates, as kimchi (Wolfe
44 and Dutton, 2015).

45 Lactic acid bacteria (LAB), acetic acid bacteria (AAB) and the yeast *Saccharomyces*
46 *cerevisiae* have well-established functions in fermentations. The cheese microbiota has
47 long been reported as the major contributor of cheese flavor, aroma, texture, and
48 appearance (Beresford et al., 2001; Irlinger and Mounier, 2009; Ogier et al., 2002). DNA
49 sequencing based technologies have been applied for different habitats and provided a
50 snapshot of the microbial diversity within and across environments (Lozupone and Knight,
51 2007). Large differences from one environment to another one have been reported, and the
52 number of species occupying such niches can reach hundreds or thousands (Lozupone and
53 Knight, 2007). Nevertheless, this complex ecosystem is not easy to rebuild *in vitro* because
54 of the non-cultivable aspect of some species (Wolfe and Dutton, 2015), hampering
55 therefore the understanding of the role of each species. Like yeasts, molds are usually
56 incorporated to certain varieties of cheese in order to generate a characteristic appearance,
57 consistency, and flavor, and extend shelf-life (Haasum and Nielsen, 1998). Yeasts are able
58 to defy harsh conditions such as high salt concentration, low pH and low a_w encountered in
59 cheeses (Álvarez-Martín et al., 2008; Lopandic et al., 2006).

60

61

62 The fungal microbiota is foreseen to originate from different environmental sources as
63 raw milk and environment of production and ripening (Atanassova et al., 2016; Wojtatowicz
64 et al., 2001). Related to that, Wolfe et al., (2014) carried out exhaustive sequencing study on
65 137 different rind communities from 10 countries, and concluded among other things that at
66 least 60% of the bacteria and 25% of the fungi present are not starter cultures.

67 Studies of fungal communities through the amplification and sequencing of the ITS1-5.8S-
68 ITS2 regions are suitable and adequate for the next generation sequencing methods, or
69 NGS (Ihrmark et al., 2012; Schoch et al., 2012). Indeed, the 5.8S rDNA is highly
70 conserved, and could therefore gather accurate taxonomic informations. On the other hand,
71 the ITS1 and ITS2 regions were reported to be highly variable allowing information on the
72 species (Lindahl et al., 2013; Martin and Rygiewicz, 2005). The NGS Illumina sequencing
73 allowed high throughput sequencing of total DNA without prior cultures and permitted
74 data on viable-but-not-cultivable strains (Bokulich and Mills, 2012). The NGS Illumina
75 technology is anticipated to evolve and become likely a routinely used method, because of
76 its swiftness and ease of utilization (Delcenserie et al., 2014; Franzosa et al., 2015).

77 Nevertheless, it should be noted that DNA fragments and therefore DNA sequences
78 obtained with Illumina technology are about 35 to 150 bp. These sizes make a clear
79 difference with the 600 bp of the ITS1-5.8S-ITS2 rDNA (Ihrmark et al., 2012), which
80 could be incompatible with the Illumina technology. However, ITS1-5.8S-ITS2 rDNA is
81 recommended for identification of yeasts and fungi (Schoch et al., 2012).

82 Lindahl et al., (2013) and Nilsson et al., (2009) suggested the sequencing of the ITS2 domain
83 for fungal communities identification, by using the forward primer ITS3_KYO2 (Toju et al.,
84 2012), and the reverse primer ITS4 (White et al., 1990). Notably, primers ITS3_KYO2 and
85 ITS4 could be used for sequencing ITS1-5.8S-ITS2 region. The ITS2 region is smaller than
86 ITS1 one, increasing therefore its compatibility with Illumina Technology. Moreover, its
87 region provide insightful information on the species and is better represented in the database
88 than the ITS1 regions (Bazzicalupo et al., 2013; Lindahl et al., 2013; Nilsson et al., 2009).

89 The “Tomme d’Orchies” is a traditional cheese manufactured and marketed, in the North
90 of France, for less than 50 years. This uncooked pressed cheese, is made with local raw
91 milk of Holstein cows. Previous works using a culture-dependent approach or a
92 metagenomic one provided a first view on its yeasts (Ceugniez et al., 2015), and bacterial
93 content (Ceugniez et al., 2016). The present work aimed at generating a comprehensive
94 yeast and mold diversity of “Tomme d’Orchies” cheese using the metagenetic approach on
95 samples prepared from different cheeses and harvested at different periods of time during
96 ripening process.

97

98 **2. Materials and methods**

99 *2.1 Cheese manufacturing and sampling*

100 Tomme d’Orchies samples used in this study were exactly the same as those used for
101 metagenomic analysis targeting the bacterial content (Ceugniez et al., 2016). As recently
102 described, “Tomme d’Orchies” cheese, is obtained from French farm named “G.A.E.C de
103 la Motte”, which is located in Nomain (north of the country). Before addition of the starter
104 cultures and natural rennet, milk was first salted and treated with egg-white lysozyme.
105 *Debaryomyces hansenii*, purchased from PAL DH D (Standa laboratory, Caen, France)
106 was the only yeast to be used as a starter. The ripening process was realized for 3 weeks at
107 12°C, and then cheese is rubbed with a mix of brown beer, rocou and chicory. Studies
108 showing the fungal diversity evolution were carried out on different cheeses that were
109 harvested after 0, 1, 3, 7, 14 and 21 days of ripening. For each harvesting time, samples
110 were cut into rind and core using a sterile knife. The rind corresponds to the first 2 mm
111 starting from the upper part of the cheese. Each sample was re-suspended into 9 g.L⁻¹ NaCl
112 leading to a concentration of 100 g.L⁻¹ with a Dilumat (BioMérieux, Craponne, France),
113 and homogenized for 90s using a Stomacher BagMixer® (Interscience, St-Nom, France).

114

115

116 *2.2 DNA extraction and purification*

117 Cheese samples were centrifuged (5,000×g, 10 min, 4°C), and the resulting pellets
118 were treated for 1 h at 37°C with a lysis buffer containing Tris-HCl (20 mM), EDTA (2
119 mM), Triton X-100 (1.2%) and lysozyme (20 g.L⁻¹). Total DNA was isolated from each
120 primary suspension with the DNeasy Blood & Tissue DNA extraction kit (Qiagen, Venlo,
121 the Netherlands), following the manufacturer's recommendations. Total DNA was eluted
122 into DNase/RNase-free water and quantified with a NanoDrop ND-1000
123 spectrophotometer (Isogen, St-Pieters-Leeuw, Belgium). Pure DNA samples were stored at
124 -20°C until used for 5.8S-ITS2 rDNA amplicon sequencing analysis.

125

126 *2.3 5.8S-ITS2 rDNA gene library construction and sequencing*

127 The 5.8S-ITS2 rDNA PCR libraries were prepared for each cheese sample using
128 universal primers with Illumina overhand adapters targeting the ITS2 region. The forward
129 primer ITS3KYO2 (5'-GATGAAGAACGYAGYRAA-3'), and reverse primer ITS4 (5'-
130 TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') were used for their high coverage of fungi taxon (Toju
131 et al., 2012). Each PCR product was then purified with the Agencourt AMPure XP beads kit
132 (Beckman Coulter, Pasadena, USA). A second indexing PCR was performed using the
133 Nextera XT index primers 1 and 2 (Illumina, San Diego, USA). The PCR products were
134 purified as indicated above. Quantifications were made with the Quant-IT PicoGreen
135 (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA). To constitute a library, each PCR product, after
136 quantification, was diluted to 10 ng.µL⁻¹ with Tris 10 mM Tween 20 0.05% and all PCR
137 products were mixed together. A 1% agarose gel permitted to check if the library was free
138 of unwanted bands, if not, a new purification with AMPure XP beads was made. A precise
139 quantification, by qPCR, of each sample in the library was performed using the KAPA
140 SYBR[®] FAST qPCR Kit (KapaBiosystems, Wilmington, USA) before normalization,
141 pooling and sequencing on a MiSeq sequencer using v3 reagents (Illumina, USA).

142

143 2.4 Bioinformatic analysis

144 Sequence reads processing were used as previously described (Rodriguez et al.,
145 2015) using respectively MOTHUR software package v1.35 (Schloss et al., 2009) and
146 UCHIME algorithm (http://drive5.com/usearch/manual/uchime_algo.html). The clustering
147 distance for OTU is 0.03. ITS2-5.8S rDNA reference alignment and taxonomical
148 assignment were based upon the UNITE database v6 (Kõljalg et al., 2013) of full-length
149 ITS1-5.8S-ITS2 rDNA sequences, with an average length of 351 bp. All the biosample raw
150 reads have been deposited at the National Center for Biotechnology Information (NCBI)
151 and are available under the Bioproject ID PRJNA355071.

152

153 3. Results

154 The metagenetic study performed here underpinned fungal OTUs encompassing
155 family, genera and species taxonomic levels. A total of 30 OTUs containing 4 genera and
156 26 species were observed for this cheese. Molds were composed of 2 genera and 4 species.
157 Notably, 0.05 % of the sequences obtained from the core and 0.12% obtained from the rind
158 were not identified (Tables 1 and 2). Two OTUs which include *C. parapsilosis* and
159 *Myrothecium* sp., were found in the core, while eight OTUs including *C. zeylanoides*,
160 *Exophiala phaeomuriformis*, *K. lactis*, *M. restricta*, *Trichosporon asahii*, *T. gracile*,
161 *T. guehoae* and *Mucor circinelloides* resulted to be specific for the rind microbiota.

162

163 3.1 Core content

164 The core of cheese is dominated by *Y. lipolytica* and *G. geotrichum*. Indeed, at the
165 beginning of the ripening process (0 day), 74.75% of the sequences were allocated to
166 *Y. lipolytica* in the core, before reaching 86.42%, after 21 days of the ripening process (Fig.
167 1a). *G. geotrichum* was present at 24.04% at the beginning of the ripening process, and
168 decreased to 13.12%, at the end of the ripening process. These two species represent 98.79 to
169 99.55% of the total sequences of the fungal content. The remaining fungal population was
170 composed of genera and species that are listed in Table 1. The specific OTUs found in the core

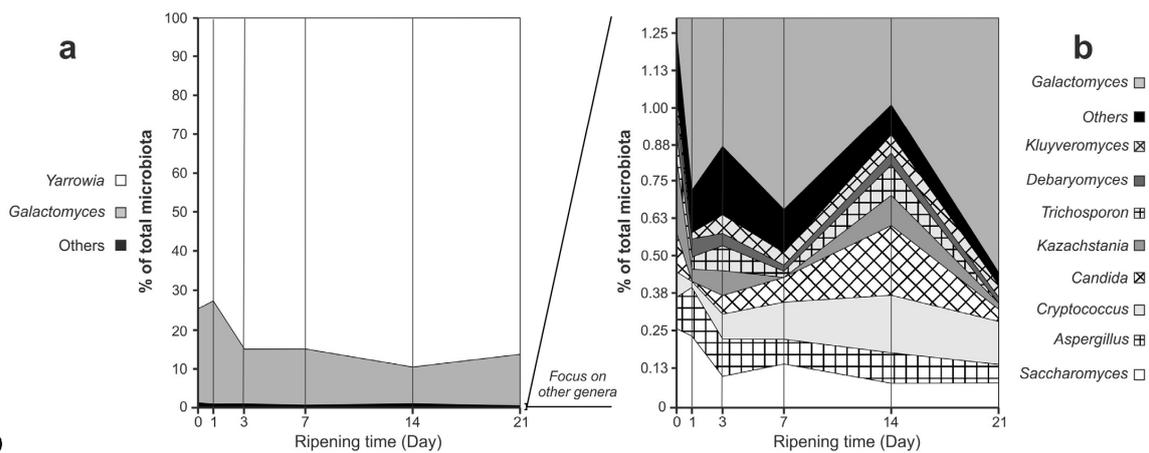
171 were *C. parapsilosis* and *Myrothecium* sp. The sequences allocated to the starter *D. hansenii*
 172 ranged from 0.08% (at the beginning) to 0.02% (at the end) of the ripening process.
 173 The mold content of “Tomme d’Orchies” based on this study contained 5 genera, including
 174 *Aspergillus*, *Lewia* (also known as *Alternaria*), *Cladosporium*, *Myrothecium* and *Nectria*.
 175 The most abundant mold species was *A. niger*. The unidentified sequences were present at
 176 0.08% at the beginning of the ripening and disappeared at the end of the ripening process
 177 (Fig. 1b and Table 1).
 178

Table 1

Fungal microbiota distribution, at the species level, in the core of the “Tomme d’Orchies” cheese, according to the period of ripening. Grey shading correspond to strain added as starter. Bold writing were molds, fine writing were yeasts

Strains		Ripening (Day)						Average
		0	1	3	7	14	21	
<i>Yarrowia</i>	<i>lipolytica</i>	74.75%	72.92%	85.18%	85.03%	89.67%	86.42%	83.33%
<i>Galactomyces</i>	<i>geotrichum</i>	24.04%	26.36%	13.96%	14.31%	9.32%	13.12%	16.85%
<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>	0.25%	0.23%	0.10%	0.14%	0.08%	0.08%	0.15%
<i>Aspergillus</i>	<i>niger</i>	0.10%	0.16%	0.12%	0.08%	0.10%	0.06%	0.11%
<i>Cryptococcus</i>	sp.	0.08%	0.02%	0.08%	0.12%	0.17%	0.12%	0.10%
	<i>curvatus</i>	-	-	-	-	0.02%	0.02%	0.01%
<i>Kazachstania</i>	<i>unispora</i>	0.23%	0.04%	0.08%	-	0.10%	0.02%	0.08%
<i>Candida</i>	<i>rugosa</i>	0.13%	-	0.04%	0.02%	0.12%	0.02%	0,06%
	<i>intermedia</i>	-	-	0.02%	0.06%	0.08%	0.02%	0,03%
	<i>parapsilosis</i>	-	-	-	-	0.02%	-	<0.01%
<i>Debaryomyces</i>	<i>hansenii</i>	0.08%	0.06%	0.04%	0.02%	0.04%	0.02%	0.05%
<i>Kluyveromyces</i>	<i>marxiianus</i>	0.04%	0.02%	0.06%	0.04%	0.06%	0.04%	0,05%
<i>Torulasporea</i>	<i>delbrueckii</i>	0.02%	0.06%	0.02%	0.06%	0.02%	-	0,03%
<i>Trichosporon</i>	sp.	0.06%	0.04%	-	-	0.06%	-	0,03%
	<i>ovoides</i>	0.02%	-	0.06%	0.02%	-	-	0,02%
	<i>montevideense</i>	-	-	0.02%	-	0.04%	-	0,01%
<i>Pichia</i>	<i>fermentans</i>	0.04%	-	0.06%	-	0.02%	0.02%	0,02%
<i>Lewia</i>	<i>infectoria</i>	0.02%	0.02%	0.04%	-	0.02%	-	0,02%
<i>Clavisporea</i>	<i>lusitanae</i>	0.02%	-	0.02%	-	-	0.02%	0,01%
<i>Cladosporium</i>	<i>cladosporioides</i>	0.02%	-	-	0.02%	-	-	0,01%
<i>Myrothecium</i>	sp.	-	0.02%	-	-	-	-	<0.01%
<i>Nectria</i>	sp.	-	-	0.02%	-	-	-	<0.01%
<i>Others</i>		0.08%	0.04%	0.06%	0.04%	0.06%	-	0.05%

179



180

181 **Fig. 1.** Fungal genera distribution in the core of “Tomme d’Orchies” cheese, during the
 182 ripening process. a: Major genera dynamics. b: Focus on minor genera dynamics

183

184 3.2 Rind content

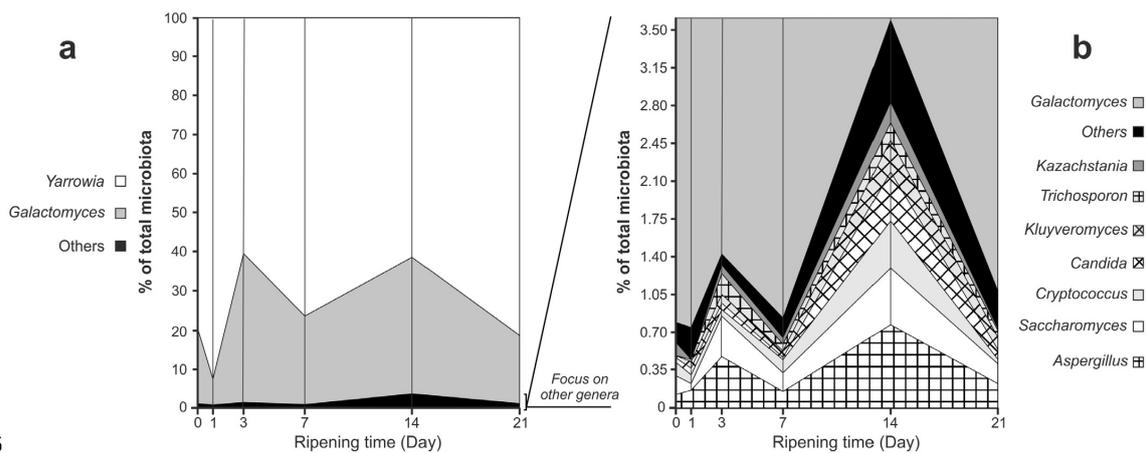
185 *Y. lipolytica* and *G. geotrichum* species are also prevalent in the rind of this cheese.
 186 The sequences allocated to *Y. lipolytica* ranged from 79.70% (at the beginning) to 81.47%
 187 (at the end) of the ripening process (Fig. 2), while the sequences allocated to *G. geotrichum*
 188 remained stable and estimated to 19.51% (at the beginning) even 17.45% (at the end) of the
 189 ripening process (Fig. 2). These two species constitute the most abundant species in the
 190 “Tomme d’Orchies” cheese as they represented 99.21% (at the beginning) and 98.92% (at
 191 the end) of the ripening process. Specific OTUs from the rind were associated with *C.*
 192 *zeylanoides*, *Exophiala phaeomuriformis*, *K. lactis*, *M. restricta*, *Trichosporon asahii*,
 193 *T. gracile*, *T. guehoae* and *Mucor circinelloides*. The sequences allocated to the inoculated
 194 yeast *D. hansenii* were estimated to 0.1%. Of particular interest, the rind contains
 195 abundantly *Y. lipolytica*, *G. geotrichum* species, and at a lesser extent *D. hansenii* and other
 196 species with 18 different OTUs representing more than 0.01% of the sequences for each
 197 OTU. All the sequences resulting from the 18 OTUs were estimated to 0.743%, at the
 198 beginning and 1.08%, at the end of the ripening process. A peak of 3.13% of the sequences
 199 was observed at the 14th day of the ripening process.

200 Molds contain 5 genera including *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Lewia*, *Nectria* and *Mucor*.
 201 The most abundant species were *A. niger* and *Cladosporium cladosporioides*. Unidentified
 202 sequences were present at the same level from the beginning to the end of the ripening
 203 process (0.08%) (Fig. 2b and Table 2). Regarding these unidentified sequences, a peak of
 204 0.37%, was also registered, at the 14th day of the ripening process.
 205

Table 2

Fungal microbiota distribution, at the species level, on the rind of the “Tomme d’Orchies” cheese, according to the period of ripening. Grey shading corresponds to strain added as a starter. Bold writing were molds, fine writing were yeasts.

Strains	Ripening (Day)						Average
	0	1	3	7	14	21	
<i>Yarrowia lipolytica</i>	79.70%	92.63%	60.47%	76.49%	61.43%	81.47%	75.37%
<i>Galactomyces geotrichum</i>	19.51%	6.64%	38.10%	22.67%	34.98%	17.45%	23.23%
<i>Aspergillus niger</i>	0.12%	0.15%	0.47%	0.15%	0.76%	0.17%	0.30%
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0.17%	0.06%	0.37%	0.17%	0.52%	0.23%	0.25%
<i>Cryptococcus sp.</i>	0.12%	0.08%	0.06%	0.12%	0.41%	0.04%	0.14%
<i>curvatus</i>	–	-	-	-	0.02%	-	<0.01%
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	0.02%	0.06%	0.08%	0.04%	0.29%	0.10%	0.10%
<i>lactis</i>	-	-	-	0.02%	-	-	<0.01%
<i>Kazachstania unispora</i>	0.12%	-	0.08%	0.06%	0.21%	0.02%	0.08%
<i>Candida rugosa</i>	0.04%	0.04%	0.04%	0.02%	0.16%	0.08%	0.07%
<i>intermedia</i>	-	0.02%	0.02%	-	0.27%	0.02%	0.06%
<i>zeylanoides</i>	-	-	-	-	0.02%	-	<0.01%
<i>Pichia fermentans</i>	0.04%	0.02%	0.02%	0.04%	0.04%	0.06%	0.04%
<i>Torulaspota delbrueckii</i>	-	0.02%	0.02%	-	0.06%	0.10%	0.04%
<i>Trichosporon ovoides</i>	-	-	0.08%	0.04%	0.04%	0.04%	0.03%
<i>gracile</i>	-	-	0.10%	-	0.02%	-	0.02%
<i>sp.</i>	-	-	-	0.02%	0.06%	0.02%	0.02%
<i>asahii</i>	-	0.02%	-	-	-	-	<0.01%
<i>guehoae</i>	-	-	-	-	0.02%	-	<0.01%
<i>montevideense</i>	-	-	-	-	0.02%	-	<0.01%
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	-	0.02%	-	0.02%	0.14%	0.02%	0.03%
<i>Debaryomyces hansenii</i>	-	0.02%	0.02%	0.02%	0.06%	0.02%	0.02%
<i>Clavispora lusitanae</i>	0.02%	0.02%	-	0.04%	0.02%	0.02%	0.02%
<i>Malassezia restricta</i>	0.02%	-	-	0.02%	0.02%	0.02%	0.01%
<i>Lewia infectoria</i>	-	0.02%	-	-	0.04%	-	0.01%
<i>Exophiala phaeoauriformis</i>	-	0.02%	-	-	-	-	0.01%
<i>Nectria sp.</i>	-	0.02%	-	-	-	-	<0.01%
<i>Mucor circinelloides</i>	0.02%	-	-	-	-	-	<0.01%
<i>Others</i>	0.08%	0.12%	0.04%	0.04%	0.37%	0.08%	0.12%



206

207 **Fig. 2.** Fungal genera distribution on the rind of “Tomme d’Orchies” cheese, during the
 208 ripening process. a: Major genera dynamics. b: Focus on minor genera dynamics

209

210 4. Discussion

211 The use of culture-dependent approach (Ceugniez et al., 2015), and metagenomic one
 212 allowed dissection of the "Tomme d'Orchies" fungal diversity. In the first place, the
 213 culture-dependent approach, but not the metagenetic analysis, allowed adventitious
 214 identification of *Saturnispora mendoncae*. This can likely be explained by a lack of ITS2-
 215 58S rDNA sequences in the UNITE database rather than a bias of the technology. It should
 216 be noted that both approaches permitted identification of *C. lusitaniae*, *D. hansenii*,
 217 *K. lactis*, *K. marxianus* and *Y. lipolytica*. Remarkably, the metagenetic technology
 218 permitted identification of a higher number of species such as *Candida intermedia*,
 219 *C. parapsilosis*, *C. rugosa*, *C. zeylanoides*, *Cryptococcus curvatus*, *E. phaeomuriformis*,
 220 *G. geotrichum*, *Kazachstania unispora*, *Malassezia restricta*, *Pichia fermentans*,
 221 *Saccharomyces cerevisiae*, *Trichosporon asahii*, *T. gracile*, *T. guehoae*, *T. montevidense*,
 222 *T. ovoides* and *Torulaspora delburekii*. In addition to yeasts content, the metagenomic
 223 approach addressed the molds content, which is at least composed of *A. niger*,
 224 *C. cladosporioides*, *M. circinelloides*, *L. infectoria*, *Myrothecium* sp., and *Nectria* sp.
 225 The genus *Malassezia* is the predominant fungal genus isolated from human skin. Among

11

226 the *Malassezia* genus, *M. restricta* is the most abundant fungal species found from both
227 healthy and diseased skin (Park et al., 2015). The adventitious presence of this species in
228 cow's and ewe's milk (Delavenne et al., 2011), could be originated from skin of the
229 manufacturers (Barnett et al., 2007; Guého-Kellermann et al., 2011). To the best of our
230 knowledge, this is the first report showing the presence of this fungal species in a
231 traditional cheese.

232 Another point that needs to be underlined is the proportion of *Y. lipolytica*. Indeed, the
233 culture-dependent (Ceugniet et al., 2015), and the metagenetic method reached to a same
234 conclusion on this point. The presence of *Y. lipolytica* in cheese is thought to be mediated
235 in some strains by galactose and broadly by lactic acid (Kurtzman, 2011) present in cheese
236 through the metabolism of LAB. Nevertheless, *Y. lipolytica* is also an emerging
237 opportunistic pathogen (Jacques and Casaregola, 2008).

238 As in soft and semi-soft cheese (Boutrou et al., 2006), the occurrence of *G. geotrichum* in
239 "Tomme d'Orchies" cheese was striking and might be originated from the raw cow milk.
240 On the other hand, a weak pattern of yeast starter *D. hansenii* was observed along this
241 analysis. This finding was unexpected because this species was shown to be prevalent in
242 other cheeses (Banjara et al., 2015). *D. hansenii* capabilities to grow in high salt
243 concentration and low pH, as well as to utilize lactate as the main source of carbon have
244 been reported (Borelli et al., 2006). The environment was not unfavorable for *D. hansenii*,
245 so a competition with other microbial species present in the "Tomme d'Orchies" could
246 explain its weak growth.

247 A low fungal abundance with more than 0.11% of the total sequences was observed for
248 *S. cerevisiae*, *A. niger* and *Cryptococcus* sp (Tables 1 and 2). Usually rinds are composed
249 of a body of bacterial and fungal species issued from raw milk, starter cultures added by
250 the cheesemakers, the aging environment, and likely other unknown sources (Fox et al.,
251 2004; Quigley et al., 2013). Therefore, the abundance of *S. cerevisiae* in the rind of
252 "Tomme d'Orchies" cheese could be explained by its rubbing in a mix of brown beer. The

253 presence of *Cryptococcus* is not unusual since this species has been reported as key species
254 in surface-ripened cheese (Corsetti et al., 2001), and other dairy products (Jakobsen and
255 Narvhus, 1996; Lopandic et al., 2006). The noticeable low level of *K. marxianus* and *K.*
256 *lactis* species is partly concordant with the previous results from Delavenne et al., (2011)
257 and Cocolin et al., (2002). These species were in low proportion, as expected. However the
258 sequences proportion of *K. marxianus* and *K. lactis* were reversed in the “Tomme
259 d’Orchies” with a higher proportion of *K. lactis*. Remarkably, other identified OTUs were
260 detected at extremely low level, under 0.02% in the rind, and under 1.9% in the core; and
261 are foreseen to be devoid of any significant impact on the cheese ripening, correspond to
262 about 5 log, following fungal count of the Tomme d’Orchies in Ceugniz et al., (2015) The
263 "Tomme d'Orchies" fungal content comprises besides *Clavispora lusitaniae*, an unusual
264 cheese contaminant (Jacques and Casaregola, 2008; Jakobsen and Narvhus, 1996),
265 frequently found in ewe’s and goat’s milk cheeses and in certain dairy products (Cosentino
266 et al., 2001; Fadda et al., 2001; Jacques and Casaregola, 2008; Lopandic et al., 2006;
267 Viljoen, 2001). *Clavispora lusitaniae* may come through a cross-contamination occurring
268 in the farm. Furthermore, the contaminants *C. rugosa*, *Pichia fermentans* and *Torulaspora*
269 *delbrueckii* were reported in raw milk (Cocolin et al., 2002; Delavenne et al., 2011; Fadda
270 et al., 2004), whereas *Trichosporon ovoides* in human and animal sources (Fadda et al.,
271 2004). On the other hand, *C. intermedia* was found in different surface-ripening cheeses
272 (Atanassova et al., 2016; Corsetti et al., 2001; Jacques and Casaregola, 2008), and also as a
273 contaminant of artisanal products (Lachance et al., 2011). Finally, *Kazachstania unispora*
274 which is an unusual species was encountered in fermented mare milk, semi-hard cow’s
275 milk, and other cheeses (Lopandic et al., 2006; Vaughan-Martini et al., 2011).

276 It is known that yeasts populations in cheeses can impact cheese texture and aroma
277 profiles (Addis et al., 2001; Álvarez-Martín et al., 2008; Atanassova et al., 2016). Yeasts
278 present at about 10^5 CFU/g could induce significant changes in the concentration of aroma
279 compounds during the cheese maturation (Atanassova et al., 2016).

280 To sum-up, the “Tomme d’Orchies” possesses a fungal diversity quite equivalent to
281 the previously reported studies on semi-soft cheeses (Corbo et al., 2001; Corsetti et al.,
282 2001; Lopandic et al., 2006; Minervini et al., 2001). However the “Tomme d’Orchies”
283 cheese contains some unusual species at proportions that are usually different from other
284 cheeses. *Y. lipolytica* and *G. geotrichum* are the most abundant species in both core and
285 rind parts of the cheese. The Illumina technology targeting the ITS2-5.8S rDNA permitted
286 us to gain insights on the fungal diversity of this artisanal made cheese.

287

288 **Acknowledgements**

289 This work was supported by "Le Ministère de l’Enseignement Supérieur et de la
290 Recherche, France" through PhD grant awarded to Alexandre Ceugniz. The authors
291 would like to thank Mr. Antoine Jean, from the G.A.E.C de la Motte at Nomain (France)
292 for providing samples used in this study, and Dr. Bruce Seal from Oregon State University
293 (USA) for English improvement and critical reading of the manuscript.

294

295 **References**

- 296 Addis, E., Fleet, G.H., Cox, J.M., Kolak, D., Leung, T., 2001. The growth, properties and
297 interactions of yeasts and bacteria associated with the maturation of Camembert and blue-
298 veined cheeses. *Int J Food Microbiol* 69, 25–36. doi:10.1016/S0168-1605(01)00569-4
- 299 Álvarez-Martín, P., Flórez, A.B., Hernández-Barranco, A., Mayo, B., 2008. Interaction
300 between dairy yeasts and lactic acid bacteria strains during milk fermentation. *Food*
301 *Control* 19, 62–70. doi:10.1016/j.foodcont.2007.02.003
- 302 Atanassova, M.R., Fernández-Otero, C., Rodríguez-Alonso, P., Fernández-No, I.C., Garabal,
303 J.I., Centeno, J.A., 2016. Characterization of yeasts isolated from artisanal short-ripened
304 cows’ cheeses produced in Galicia (NW Spain). *Food Microbiol.* 53, 172–181.
305 doi:10.1016/j.fm.2015.09.012
- 306 Banjara, N., Suhr, M.J., Hallen-Adams, H.E., 2015. Diversity of Yeast and Mold Species from a
307 Variety of Cheese Types. *Curr. Microbiol.* 70, 792–800. doi:10.1007/s00284-015-0790-1

- 308 Barnett, J.A., Payne, R.W., Yarrow, D., 2007. *Yeasts: characteristics and identification*, 3. ed.,
309 repr. ed. Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- 310 Bazzicalupo, A.L., Bálint, M., Schmitt, I., 2013. Comparison of ITS1 and ITS2 rDNA in 454
311 sequencing of hyperdiverse fungal communities. *Fungal Ecol.* 6, 102–109.
312 doi:10.1016/j.funeco.2012.09.003
- 313 Beresford, T.P., Fitzsimons, N.A., Brennan, N.L., Cogan, T.M., 2001. Recent advances in
314 cheese microbiology. *Int. Dairy J.* 11, 259–274. doi:10.1016/S0958-6946(01)00056-5
- 315 Bokulich, N.A., Mills, D.A., 2012. Next-generation approaches to the microbial ecology of
316 food fermentations. *BMB Rep.* 45, 377–389. doi:10.5483/BMBRep.2012.45.7.148
- 317 Borelli, B.M., Ferreira, E.G., Lacerda, I.C.A., Franco, G.R., Rosa, C.A., 2006. Yeast populations
318 associated with the artisanal cheese produced in the region of Serra da Canastra, Brazil.
319 *World J. Microbiol. Biotechnol.* 22, 1115–1119. doi:10.1007/s11274-006-9151-3
- 320 Boutrou, R., Kerriou, L., Gassi, J.-Y., 2006. Contribution of *Geotrichum candidum* to the
321 proteolysis of soft cheese. *Int. Dairy J.* 16, 775–783. doi:10.1016/j.idairyj.2005.07.007
- 322 Ceugniet, A., Drider, D., Jacques, P., Coucheney, F., 2015. Yeast diversity in a traditional
323 French cheese “Tomme d’orchies” reveals infrequent and frequent species with
324 associated benefits. *Food Microbiol.* 52, 177–184. doi:10.1016/j.fm.2015.08.001
- 325 Ceugniet, A., Taminiau, B., Coucheney, F., Jacques, P., Delcenserie, V., Daube, G., Drider,
326 D., 2016. Use of a metagenetic approach to monitor the bacterial microbiota of “Tomme
327 d’Orchies” cheese during the ripening process. *Int. J. Food Microbiol.*
328 doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2016.10.034
- 329 Cocolin, L., Aggio, D., Manzano, M., Cantoni, C., Comi, G., 2002. An application of PCR-
330 DGGE analysis to profile the yeast populations in raw milk. *Int. Dairy J.* 12, 407–411.
331 doi:10.1016/S0958-6946(02)00023-7
- 332 Corbo, M.R., Lanciotti, R., Albenzio, M., Sinigaglia, M., 2001. Occurrence and
333 characterization of yeasts isolated from milks and dairy products of Apulia region. *Int. J.*
334 *Food Microbiol.* 69, 147–152.

- 335 Corsetti, A., Rossi, J., Gobbetti, M., 2001. Interactions between yeasts and bacteria in the
336 smear surface-ripened cheeses. *Int. J. Food Microbiol.* 69, 1–10.
- 337 Cosentino, S., Fadda, M.E., Deplano, M., Mulargia, A.F., Palmas, F., 2001. Yeasts associated
338 with Sardinian ewe's dairy products. *Int. J. Food Microbiol.* 69, 53–58.
- 339 Delavenne, E., Mounier, J., Asmani, K., Jany, J.-L., Barbier, G., Le Blay, G., 2011. Fungal
340 diversity in cow, goat and ewe milk. *Int. J. Food Microbiol.* 151, 247–251.
341 doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.029
- 342 Delcenserie, V., Taminiau, B., Delhalle, L., Nezer, C., Doyen, P., Crevecoeur, S., Roussey,
343 D., Korsak, N., Daube, G., 2014. Microbiota characterization of a Belgian protected
344 designation of origin cheese, Herve cheese, using metagenomic analysis. *J. Dairy Sci.* 97,
345 6046–6056. doi:10.3168/jds.2014-8225
- 346 Fadda, M., Cosentino, S., Deplano, M., Palmas, F., 2001. Yeast populations in Sardinian feta
347 cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 69, 153–156. doi:10.1016/S0168-1605(01)00586-4
- 348 Fadda, M., Mossa, V., Pisano, M., Deplano, M., Cosentino, S., 2004. Occurrence and
349 characterization of yeasts isolated from artisanal Fiore Sardo cheese. *Int. J. Food*
350 *Microbiol.* 95, 51–59. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.02.001
- 351 Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M., Guinee, T., 2004. *Cheese: chemistry, physics*
352 *and microbiology.* Elsevier Academic, Oxford.
- 353 Franzosa, E.A., Hsu, T., Sirota-Madi, A., Shafquat, A., Abu-Ali, G., Morgan, X.C.,
354 Huttenhower, C., 2015. Sequencing and beyond: integrating molecular “omics” for
355 microbial community profiling. *Nat. Rev. Microbiol.* 13, 360–372.
356 doi:10.1038/nrmicro3451
- 357 Guého-Kellermann, E., Batra, R., Boekhout, T., 2011. *Malassezia* Baillon (1889), in: *The*
358 *Yeasts.* Elsevier, pp. 1807–1832.
- 359 Haasum, I., Nielsen, P.V., 1998. Physiological Characterization of Common Fungi Associated
360 with Cheese. *J. Food Sci.* 63, 157–161. doi:10.1111/j.1365-2621.1998.tb15699.x

- 361 Ihrmark, K., Bödeker, I.T.M., Cruz-Martinez, K., Friberg, H., Kubartova, A., Schenck, J.,
362 Strid, Y., Stenlid, J., Brandström-Durling, M., Clemmensen, K.E., Lindahl, B.D., 2012.
363 New primers to amplify the fungal ITS2 region--evaluation by 454-sequencing of
364 artificial and natural communities. *FEMS Microbiol. Ecol.* 82, 666–677.
365 doi:10.1111/j.1574-6941.2012.01437.x
- 366 Irlinger, F., Mounier, J., 2009. Microbial interactions in cheese: implications for cheese
367 quality and safety. *Curr. Opin. Biotechnol.* 20, 142–148.
368 doi:10.1016/j.copbio.2009.02.016
- 369 Jacques, N., Casaregola, S., 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: The
370 hemiascomycetous yeasts. *Int. J. Food Microbiol.* 126, 321–326.
371 doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.08.020
- 372 Jakobsen, M., Narvhus, J., 1996. Yeasts and their possible beneficial and negative effects on the
373 quality of dairy products. *Int. Dairy J.* 6, 755–768. doi:10.1016/0958-6946(95)00071-2
- 374 Kõljalg, U., Nilsson, R.H., Abarenkov, K., Tedersoo, L., Taylor, A.F.S., Bahram, M., Bates,
375 S.T., Bruns, T.D., Bengtsson-Palme, J., Callaghan, T.M., Douglas, B., Drenkhan, T.,
376 Eberhardt, U., Dueñas, M., Grebenc, T., Griffith, G.W., Hartmann, M., Kirk, P.M.,
377 Kohout, P., Larsson, E., Lindahl, B.D., Lücking, R., Martín, M.P., Matheny, P.B.,
378 Nguyen, N.H., Niskanen, T., Oja, J., Peay, K.G., Peintner, U., Peterson, M., Pöldmaa, K.,
379 Saag, L., Saar, I., Schüßler, A., Scott, J.A., Senés, C., Smith, M.E., Suija, A., Taylor,
380 D.L., Telleria, M.T., Weiss, M., Larsson, K.-H., 2013. Towards a unified paradigm for
381 sequence-based identification of fungi. *Mol. Ecol.* 22, 5271–5277.
382 doi:10.1111/mec.12481
- 383 Kurtzman, C.P., 2011. *Yarrowia van der Walt & von Arx (1980)*, in: *The Yeasts*.
384 Elsevier, pp. 927–929.
- 385 Lachance, M.-A., Boekhout, T., Scorzetti, G., Fell, J.W., Kurtzman, C.P., 2011. *Candida*
386 *Berkhout (1923)*, in: *The Yeasts*. Elsevier, pp. 987–1278.

- 387 Lindahl, B.D., Nilsson, R.H., Tedersoo, L., Abarenkov, K., Carlsen, T., Kjoller, R., Kõljalg,
388 U., Pennanen, T., Rosendahl, S., Stenlid, J., Kauserud, H., 2013. Fungal community
389 analysis by high-throughput sequencing of amplified markers - a user's guide. *New*
390 *Phytol.* 199, 288–299. doi:10.1111/nph.12243
- 391 Lopandic, K., Zelger, S., Bánszky, L.K., Eliskases-Lechner, F., Prillinger, H., 2006.
392 Identification of yeasts associated with milk products using traditional and molecular
393 techniques. *Food Microbiol.* 23, 341–350. doi:10.1016/j.fm.2005.05.001
- 394 Lozupone, C.A., Knight, R., 2007. Global patterns in bacterial diversity. *Proc. Natl. Acad.*
395 *Sci.* 104, 11436–11440. doi:10.1073/pnas.0611525104
- 396 Martin, K.J., Rygiewicz, P.T., 2005. Fungal-specific PCR primers developed for analysis of
397 the ITS region of environmental DNA extracts. *BMC Microbiol.* 5, 1.
- 398 Minervini, F., Montagna, M.T., Spilotros, G., Monaci, L., Santacroce, M.P., Visconti, A.,
399 2001. Survey on mycoflora of cow and buffalo dairy products from Southern Italy. *Int. J.*
400 *Food Microbiol.* 69, 141–146.
- 401 Nilsson, R.H., Ryberg, M., Abarenkov, K., Sjökvist, E., Kristiansson, E., 2009. The ITS
402 region as a target for characterization of fungal communities using emerging sequencing
403 technologies. *FEMS Microbiol. Lett.* 296, 97–101. doi:10.1111/j.1574-
404 6968.2009.01618.x
- 405 Ogier, J.-C., Son, O., Gruss, A., Tailliez, P., Delacroix-Buchet, A., 2002. Identification of the
406 bacterial microflora in dairy products by temporal temperature gradient gel
407 electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 3691–3701.
- 408 Park, M., Jung, W.H., Han, S.H., Lee, Y.H., Lee, Y.W., 2015. Characterisation and
409 Expression Analysis of MrLip1, a Class 3 Family Lipase of *Malassezia restricta*.
410 *Mycoses* 58, 671–678. doi:10.1111/myc.12412
- 411 Quigley, L., O'Sullivan, O., Stanton, C., Beresford, T.P., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F., Cotter,
412 P.D., 2013. The complex microbiota of raw milk. *FEMS Microbiol. Rev.* 37, 664–698.
413 doi:10.1111/1574-6976.12030

- 414 Rodriguez, C., Taminiou, B., Brévers, B., Avesani, V., Van Broeck, J., Leroux, A., Gallot, M.,
415 Bruwier, A., Amory, H., Delmée, M., Daube, G., 2015. Faecal microbiota characterisation of
416 horses using 16 rdna barcoded pyrosequencing, and carriage rate of clostridium difficile at
417 hospital admission. BMC Microbiol. 15. doi:10.1186/s12866-015-0514-5
- 418 Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartmann, M., Hollister, E.B.,
419 Lesniewski, R.A., Oakley, B.B., Parks, D.H., Robinson, C.J., Sahl, J.W., Stres, B.,
420 Thallinger, G.G., Van Horn, D.J., Weber, C.F., 2009. Introducing mothur: Open-Source,
421 Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing
422 Microbial Communities. Appl. Environ. Microbiol. 75, 7537–7541.
423 doi:10.1128/AEM.01541-09
- 424 Schoch, C.L., Seifert, K.A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J.L., Levesque, C.A., Chen,
425 W., Bolchacova, E., Voigt, K., Crous, P.W., others, 2012. Nuclear ribosomal internal
426 transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. Proc. Natl.
427 Acad. Sci. 109, 6241–6246.
- 428 Toju, H., Tanabe, A.S., Yamamoto, S., Sato, H., 2012. High-Coverage ITS Primers for the
429 DNA-Based Identification of Ascomycetes and Basidiomycetes in Environmental
430 Samples. PLoS ONE 7, e40863. doi:10.1371/journal.pone.0040863
- 431 Vaughan-Martini, A., Lachance, M.-A., Kurtzman, C.P., 2011. *Kazachstania Zubkova* (1971),
432 in: *The Yeasts*. Elsevier, pp. 439–470.
- 433 Viljoen, B.C., 2001. The interaction between yeasts and bacteria in dairy environments. Int. J.
434 Food Microbiol. 69, 37–44.
- 435 White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal
436 ribosomal RNA genes for phylogenetics, in: *PCR Protocols*. Elsevier, pp. 315–322.
- 437 Wojtatowicz, M., Chrzanowska, J., Juszczak, P., Skiba, A., Gdula, A., 2001. Identification
438 and biochemical characteristics of yeast microflora of Rokpol cheese. Int J Food
439 Microbiol 69, 135–140. doi:10.1016/S0168-1605(01)00582-7

- 440 Wolfe, B.E., Button, J.E., Santarelli, M., Dutton, R.J., 2014. Cheese Rind Communities
441 Provide Tractable Systems for In Situ and In Vitro Studies of Microbial Diversity. *Cell*
442 158, 422–433. doi:10.1016/j.cell.2014.05.041
- 443 Wolfe, B.E., Dutton, R.J., 2015. Fermented Foods as Experimentally Tractable Microbial
444 Ecosystems. *Cell* 161, 49–55. doi:10.1016/j.cell.2015.02.034
- 445

Publication 3

Criblage de levures antagonistes à partir de la Tomme d'Orchies et
essai de caractérisation des molécules antagonistes

Résumé de la publication

Comme indiqué précédemment, la recherche de levures antagonistes a été réalisée par une approche culture-dépendante. L'isolement a été réalisé sur les deux parties (cœur et surface) du fromage. Le travail a été réalisé sur un produit affiné de 21 jours. Ainsi, nous avons isolé 185 levures. Celles-ci ont été regroupées par la technique de REP-PCR, en six groupes distincts. Parmi elles, 30 levures ont été identifiées par trois méthodes incluant une identification biochimique à l'aide de galeries ID 32C (Biomérieux, France), une identification moléculaire par séquençage de l'ADNr 26 S et une identification moléculaire par séquençage des domaines ITS1-ITS2 de l'ADNr 5.8 S. Six espèces différentes ont été retrouvées, à savoir *Yarrowia lipolytica*, *Debaryomyces hansenii*, *K. lactis*, *K. marxianus*, *Clavispora lusitaniae* et *Saturnispora mendoncae*.

La recherche de souches susceptibles de produire des molécules antagonistes a été effectuée sur ces 30 levures. Deux souches, *K. marxianus* S-2-05 et *K. lactis* S-3-05, ont montré des capacités d'inhibition contre *Kocuria rhizophila* CIP 53.45 et *C. albicans* ATCC 10231, mais également contre un certain nombre de bactéries à Gram négatif et à Gram positif laissant augurer des perspectives d'application intéressantes. Cependant, il convient de signaler que l'antagonisme n'était visible que sur milieu gélosé. Des essais d'identification du composé ou composés responsable(s) de cette inhibition ont été également menés, mais les résultats restent sans succès.

1 **Yeast diversity in a traditional French cheese “Tomme d'Orchies”**

2 **reveals infrequent and frequent species with associated benefits**

3

4 Alexandre Ceugniet, Djamel Drider*, Philippe Jacques, Françoise Coucheney

5

6 Université Lille 1, Laboratoire Régional de Recherche en Agroalimentaire et

7 Biotechnologies, Institut Charles Viollette, Cité scientifique, (Bat Polytech), Boulevard

8 Paul Langevin, Villeneuve d'Ascq 59655, France

9

10 **Corresponding author:** djamel.drider@univ-lille1.fr

11

12 **Highlights:**

- 13 • Frequent and infrequent yeasts species were isolated from Tomme d'orchies cheese.
- 14 • Yeasts with inhibitory activities and safe characteristics were isolated.
- 15 • Characterization of antagonism was determined against food and medical pathogens.

16

17 **Abstract**

18 This study is aimed at unrevealing the yeast diversity of handmade cheese, Tomme
19 d'Orchies, produced and marketed in the north of France. A total of 185 yeast colonies were
20 isolated from the surface and core of this cheese. From these, 80 morphologically different
21 colonies were selected and subjected to rep-PCR analysis. The isolates were clustered into six
22 distinct groups based on their DNA fingerprints. From each group, at least 30% of isolates were
23 selected and identified to species level by biochemical characteristics (ID32C Api system) and
24 sequencing of the ITS1-5.8S-ITS2 and 26S rDNA regions. The isolates belonged to *Yarrowia*
25 *lipolytica*, *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces lactis* and *Kluyveromyces marxianus*,
26 frequently isolated, and less frequently isolated *Saturnispora mendoncae* and *Clavispora*
27 *lusitaniae*. Two isolates designated as *Kluyveromyces lactis* (isolate S-3-05) and *Kluyveromyces*
28 *marxianus* (isolate S-2-05) were non-hemolytic, sensitive to antifungal compounds and able to
29 inhibit the growth of pathogens including *Candida albicans*, *Listeria monocytogenes* and some
30 bacilli.

31 **Keywords:** Artisanal cheese, Yeast diversity, Repetitive extragenic palindromic (rep-
32 PCR), 26S rDNA sequencing, ITS1-5.8S-ITS2, Yeasts antagonism, Frequent and
33 infrequent species
34

35
36 .

37 1. Introduction

38 The microbial ecosystem in cheese is complex and may include a number of microorganisms
39 less frequently isolated than the usually present lactic acid bacteria (Beresford et al., 2001). A
40 number of yeast species indigenous to milk have been isolated from the surface of many types of
41 cheeses. The role these species play in cheese ripening is, however, poorly understood (Wyder and
42 Puhan, 1999; Lavoie et al., 2012). Monnet and co-workers (2014) reported on the development of
43 sensory properties due to the interactions of microbial communities present on the surface of cheese.
44 Biochemical changes occurring during the ripening process are directly or indirectly dependent on
45 the interactions between starter cultures (Mei et al., 2014). Yeasts are responsible for the
46 development of texture and specific flavour compounds (Binetti et al., 2013; Westall and Filtenborg,
47 1998). The development of yeast in dairy products depends on a number of physico-chemical
48 conditions such as low pH, mold content, high salt concentration, refrigerated ripening and storage
49 conditions (Fleet, 1990; Viljoen et al., 2003). In some cheese yeasts are added to facilitate ripening
50 (Lavoie et al., 2012). Yeasts were reported to inhibit growth of the undesirable microorganisms, most
51 often, through production of killer toxin or “mycocins” (Hatoum et al., 2012). Little is known about
52 the affect antimicrobial peptides, similar to that described for bacteria (Drider and Rebuffat, 2011),
53 may have on the growth of yeast. Such antagonistic properties may control the growth of spoilage
54 organisms and pathogens in dairy products, and may play a role in the ripening of some cheese
55 varieties (Irlinger and Mounier, 2009). On the other hand, Jakobsen and Narvhus (1996) reported that
56 yeasts could be responsible for some of the major defects in cheese making. It is thus important to
57 identify the yeasts in cheese. Identification based on phenotypic properties is laborious, technically
58 complex and could lead to misidentifications (Lopandinc et al., 2006; Alper et al., 2013).
59 Identification using robust molecular methods, as recommended in the guidelines for the evaluation
60 of probiotics in food (FAO/WHO, 2002), has to be implemented.

61 In this study we looked at the yeast diversity in traditional and atypical French cheese, Tomme
62 d'Orchies and report on the non-hemolytic and antifungal properties of two isolates classified as
63 *Kluyveromyces lactis* (isolate S-3-05) and *Kluyveromyces marxianus* (isolate S-2-05).

64 2. Materials and methods

65 2.1. Cheese manufacturing

66 Samples of “Tomme d'Orchies” cheese were obtained from the “G.A.E.C de la Motte” farm
67 located in Nomain (north of France). Eggwhite lysozyme and starter cultures were added to raw
68 milk from Holstein cows and the milk incubated for 1 h at 36-37 °C. The starter cultures were
69 PAL114D, *Propionibacterium* PAL25-2 and *Debaryomyces. hansenii* (PAL DH10), all obtained
70 from Standa laboratory (Caen, France). Natural rennet was added to the fermented milk, stirred,
71 cut, drained and shaped. The cheese were pressed in cheese cloth, dried at 15 °C, pickled and
72 brined. After further drying, the cheese were rubbed twice with a mixture of brown beer, Rocou
73 and chicory and ripened for at least 3 weeks, with turning each week. All equipment used were
74 stainless steel, except the wood board used for pressing (the board was not in direct contact with
75 the cheese). Cheese was made in the same dairy plant than goat cheese. The ripening room was
76 used only for other types of cheese.

77

78 2.2. Microbial analysis

79 Samples of cheese, collected three weeks of ripening, were split with a sterile knife
80 through the surface into the core. The surface was 2 mm thick. Ten grams of the surface and core
81 were suspended, respectively, in 90 ml tryptone-salt medium (1.0 g.L⁻¹ tryptone; 8.5 g.L⁻¹ NaCl)
82 and homogenized for 90 s, using a Stomacher Bag-Mixer® (Interscience, St-Nom, France).

83

84 2.3. Isolation and counting of yeasts

85 The homogenate was serially diluted and plated onto yeast-extract-glucose (YEG) agar
86 (5.0 g.L⁻¹ yeast extract; 20.0 g.L⁻¹ glucose, 15.0 g.L⁻¹ agar-agar), supplemented with 0.1% (w/v)
87 chloramphenicol. The plates were incubated for 3 days at 25 °C. Yeast colonies were isolated
88 from plates containing between 30 and 300 colonies, purified by streaking onto YEG agar and
89 stored at -80 °C in liquid YEG supplemented with 30% (v/v) glycerol.

90

91 2.4. Extraction and quantification of total DNA

92 Total DNA was extracted by the Bustin method (Harju et al., 2004). Cells were
 93 suspended in lysis buffer (Triton X-100 2%; SDS 1%; NaCl 100 mmol; Tris-HCl 10 mmol, pH
 94 8.0; EDTA 0.1 mmol), and disrupted by two repetitive heat shock cycles at -80 °C and +95 °C.
 95 DNA was extracted using the chloroform procedure, washed with absolute ethanol, 70% (v/v)
 96 ethanol, dried at 37 °C, and resuspended in 10 mmol Tris-EDTA buffer (pH 8.0). Concentration
 97 of total DNA was determined with a Nanodrop (BioWave II, Biochrom WPA, Cambridge, UK).

99 2.5. Yeasts fingerprinting and clustering

100 Rep-PCR was performed using a universal GTG5 primer (Ouoba et al., 2010, 2012),
 101 according to the method listed in Table 1. PCR products were separated on a 1.0% agarose gel
 102 labelled with 0.5% (v/v) GelRed for 2 h at 100 V. Gels were analysed with a Gel-Doc 2000®
 103 (Biorad, Hercules, CA, USA), and the resulting DNA patterns were analysed with GelCompar
 104 (Biosystematica, Ceredigion, Wales, UK).

106 **Table 1**

107 Primers and PCR programs used for molecular identification and rep-PCR

Amplified regions	Primers	PCR Program
Repetitive Extragenic Palindromic Elements	GTG5 (universal) 5'-GTG GTG GTG GTG GTG-3'	Initial denaturation 4min – 94°C
		Denaturation 1min – 94°C
		Hybridation 1min – 40°C
		Elongation 8min- 72°C
		Final elongation 16min – 72°C
		Cycles 30
D1 domains of 26S rDNA	NL-1 (Forward) 5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GGG GGG GCC ATA TCA ATA AGC GGA GGA AAA G-3'	Initial denaturation 5min – 95°C
		Denaturation 1min – 95°C
		Hybridation 45s – 52°C
		Elongation 1min – 72°C
		Final elongation 1min – 72°C
		Cycles 30
ITS1-5.8S-ITS2 region	ITS1 (Forward) 5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3'	Initial denaturation 5min – 94°C
		Denaturation 30s – 94°C
		Hybridation 30s – 57°C
		Elongation 1min – 72°C
		Final elongation 5min – 72°C
		Cycles 35
	ITS4 (Reverse) 5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'	Initial denaturation 5min – 94°C
		Denaturation 30s – 94°C
		Hybridation 30s – 57°C
		Elongation 1min – 72°C
		Final elongation 5min – 72°C
		Cycles 35

108

109

110 2.6. Yeasts identification

111 A total of 185 yeasts colonies were isolated and grouped by rep-PCR. From these, 80
112 morphologically different colonies were selected and subjected to rep-PCR analysis. Then, thirty
113 percent of the colonies, for each group, were identified by ID32C Api system, and molecular
114 (sequencing of the 26S rDNA and ITS1-5.8S-ITS2 region) methods.

115

116 2.6.1. ID32C API system identification

117 Identification was according to the manufacturer's guidelines. A fraction of a well-isolated
118 colony was aseptically transferred to sterile distilled water to prepare a suspension with a final
119 turbidity equivalent to McFarland standard #2. Five drops of this suspension were then dispensed
120 to a vial of C medium provided by the manufacturer and homogenized to prepare an even
121 dispersion of inoculum. After homogenizing, the inoculum suspension was used to inoculate the
122 wells in the strip, and the system was incubated at 25 °C for 48 h. The strips were then visually
123 inspected, and growth was determined to be positive or negative based upon the presence or
124 absence of turbidity in the wells. The results were transformed into numerical codes, and the
125 isolates were identified through the use of the ID 32C Analytical Profile Index (Biomérieux,
126 Marcy l'Etoile, France).

127

128 2.6.2. Molecular identification

129 Yeasts were identified by sequencing approximately 250 nucleotides, covering most of the
130 expansion loop of the D1 domain, present at the 50-end of the 26S rDNA (Cocolin, 2000,
131 Cocolin et al., 2002), and by sequencing 500 to 800 bp within the ITS1-5.8S-ITS2 region
132 (Belloch et al.,1998; Schoch et al., 2012). Total DNA extracted from appropriate isolate was
133 amplified using primers NL-1/LS-2 for 26S rDNA, and primers ITS1/ITS4 for ITS1-5.8S-ITS2
134 region. The primers sequences and PCR programmes used are indicated in Table 1. PCR
135 products were purified by the “Nucleospin® Gel and PCR Clean-Up kit of MacheryeNagel
136 (Düren, Germany). The purified PCR products were then sequenced at Eurofins Genomics

137 (Ebersberg, Germany). All DNA sequences resulting from the amplification of 26S rDNA and
 138 5.8S rDNAs were compared to those available at the NCBI database using a megablast research,
 139 and confirmed with Ribosomal Database project on sequence match with default parameters
 140 except size placed at “<1200” parameter (Cole et al., 2014). The corresponding accession
 141 numbers are indicated in Table 2.

142

143 **Table 2.** Identification of 30 isolates with ID32C API system and molecular methods: 26S rDNA and ITS1-5.8S-

144 ITS2 sequencing DNAs.

Isolate Code	Identification by ID32C Api system (%ID)	rep-PCR group	D1 domain of 26S rDNA (E-value)/(Accession number)	ITS1-5.8S-ITS2 sequences (E-value)/(Accession number)
S-1-01	<i>C. lipolytica</i> (99.9)	IV	<i>Y. lipolytica</i> (9.0E-79)/(KP195085)	<i>Y. lipolytica</i> (8.0E-148)/(KP219434)
S-1-03	<i>C. lipolytica</i> (99.9)	II	<i>Y. lipolytica</i> (1.0E-92)/(KP195086)	<i>Y. lipolytica</i> (1.0E-120)/(KP219435)
S-1-04	<i>C. lipolytica</i> (99.9)	IV	<i>Y. lipolytica</i> (7.0E-12)/(KP195087)	<i>Y. lipolytica</i> (7.0E-123)/(KP219436)
S-1-06	<i>C. lipolytica</i> (99.9)	IV	<i>Y. lipolytica</i> (1.0E-92)/(KP195088)	<i>Y. lipolytica</i> (2.0E-122)/(KP219437)
S-1-08	<i>C. lipolytica</i> (99.9)	III	<i>Y. lipolytica</i> (1.0E-92)/(KP195089)	<i>Y. lipolytica</i> (7.0E-123)/(KP219438)
S-1-12	<i>C. lipolytica</i> (99.9)	IV	<i>Y. lipolytica</i> (1.0E-92)/(KP195090)	<i>Y. lipolytica</i> (2.0E-122)/(KP219439)
S-1-15	<i>C. lipolytica</i> (99.9)	II	<i>Y. lipolytica</i> (1.0E-92)/(KP195091)	<i>Y. lipolytica</i> (5.0E-124)/(KP219440)
S-1-17	<i>C. lipolytica</i> (99.9)	IV	<i>Y. lipolytica</i> (1.0E-92)/(KP195092)	<i>Y. lipolytica</i> (3.0E-116)/(KP219441)
S-1-20	<i>C. lipolytica</i> (99.9)	IV	<i>Y. lipolytica</i> (1.0E-92)/(KP195093)	<i>Y. lipolytica</i> (9.0E-122)/(KP219442)
S-1-22	<i>Zygosaccharomyces</i> spp (48.3)	IV	<i>Y. lipolytica</i> (1.0E-92)/(KP195094)	<i>Y. lipolytica</i> (9.0E-122)/(KP219443)
S-2-02	<i>Zygosaccharomyces</i> spp (48.3)	I	<i>S. mendoncae</i> (2.0E-95)/(KP195095)	ND (8.5)/NA
S-2-04	<i>C. famata</i> (69.4)		<i>D. hansenii</i> (1.0E-103)/(KP195096)	<i>D. hansenii</i> (0.0)/(KP219444)
S-2-05	<i>C. kefyr</i> (99.9)	I	<i>Kl. marxianus</i> (2.0E-106)/(KP195097)	<i>Kl. marxianus</i> (0.0)/(KP219445)
S-2-08	<i>C. lipolytica</i> (99.9)	IV	<i>S. mendoncae</i> (3.0E-94)/(KP195098)	ND/NA
S-2-09	<i>Zygosaccharomyces</i> spp (48.3)	III	<i>S. mendoncae</i> (4.0E-93)/(KP195099)	<i>Saturnispora</i> sp. (7.0E-50)/NA
S-2-10	<i>Zygosaccharomyces</i> spp (48.3)	III	<i>S. mendoncae</i> (2.0E-95)/(KP195100)	ND/NA
S-2-19	<i>C. famata</i> (99.9)	IV	<i>Cl. lusitaniae</i> (5.0E-81)/(KP195101)	<i>Cl. lusitaniae</i> (1.0E-166)/(KP219446)
S-3-01	<i>C. lipolytica</i> (99.9)	IV	<i>Y. lipolytica</i> (1.0E-92)/(KP195102)	<i>Y. lipolytica</i> (3.0E-121)/(KP219447)
S-3-03	<i>C. lipolytica</i> (99.9)	IV	<i>Y. lipolytica</i> (1.0E-92)/(KP195103)	<i>Y. lipolytica</i> (4.0E-120)/(KP219448)
S-3-05	<i>C. sphaerica</i> (84.2)	V	<i>Kl. lactis</i> (3.0E-104)/(KP195104)	<i>Kl. Lactis</i> (0.0)/(KP219449)
C-1-04	<i>C. lipolytica</i> (99.9)	IV	<i>Y. lipolytica</i> (6.0E-91)/(KP195105)	<i>Y. lipolytica</i> (1.0E-120)/(KP219450)
C-1-06	<i>C. famata</i> (98.7)	III	<i>S. mendoncae</i> (2.0E-95)/(KP195106)	ND (8.6)/NA
C-2-05	<i>Zygosaccharomyces</i> spp (48.3)	III	<i>S. mendoncae</i> (2.0E-95)/(KP195107)	ND (34.0)/NA
C-2-06	<i>C. lipolytica</i> (99.9)	III	<i>S. mendoncae</i> (4.0E-93)/(KP195108)	<i>Saturnispora</i> sp. (2.0E-27)/NA
C-2-08	<i>Zygosaccharomyces</i> spp (48.3)	III	<i>S. mendoncae</i> (8.0E-95)/(KP195109)	ND/NA
C-3-01	<i>Zygosaccharomyces</i> spp (48.3)	III	<i>S. mendoncae</i> (9.0E-95)/(KP195110)	ND (0.55)/NA
C-3-06	<i>C. famata</i> (99.9)	IV	<i>D. hansenii</i> (9.0E-105)/(KP195111)	<i>D. hansenii</i> (0.0)/(KP219451)
C-3-08	<i>C. lipolytica</i> (99.9)	IV	<i>D. hansenii</i> (4.0E-103)/(KP195112)	<i>D. hansenii</i> (0.0)/(KP219452)
C-4-05	<i>Zygosaccharomyces</i> spp (48.3)	III	<i>S. mendoncae</i> (3.0E-94)/(KP195113)	ND (0.55)/NA
C-4-07	<i>Zygosaccharomyces</i> spp (48.3)	I	<i>S. mendoncae</i> (1.0E-92)/(KP195114)	ND (2.0E-9)/NA

145 *C.*: *Candida*, *Cl.*: *Clavispora*, *D.*: *Debaryomyces*, *Kl.*: *Kluyveromyces*, *S.*: *Saturnispora*, *Y.*: *Yarrowia*, ND: Not
 146 available in NCBI database, NA: Sequences not accepted by NCBI. In the code of colonies, the “C” and “S” letters
 147 design core and surface, respectively.

148

149

2.7. Statistical analysis

150 Statistical analysis of ID32C and 26S rDNA was performed with the software SPSS® Statistic
 151 v20 of IBM® (Armonk, NY, USA). Correlation and comparison were made with the crossed
 152 grid methods using V of Cramer and Kappa coefficient of Cohen.

153 2.8. Inhibitory properties

154 Attempts to decipher the inhibitory properties of yeasts were assessed against the indicator
 155 strains listed in Table 3. Thus three methods were used, among which (i) a delayed method, (ii)
 156 addition of supernatant and (iii) gas antagonism test. In the delayed method, 5 ml of yeast spots
 157 were deposited on Mueller-Hinton agar plates and incubated at 25 °C for 48 h. Colonies were
 158 removed and plates were swabbed with an overnight culture of *Kocuria rhizophila* CIP 53.45
 159 diluted to an OD_{600 nm} of 0.0025. Plates were incubated at 25 °C for 48 h. In the supernatant
 160 assay, the Mueller-Hinton agar plates were flooded with *Kocuria rhizophila* CIP 53.45 at OD₆₀₀
 161 nm of 0.0025. After drying the plates, 7 wells were made in each plate, and filled with 50-100 ml
 162 of 0.2 mm of filter sterilized yeast supernatant. After 2 h of incubation at 4 °C, allowing
 163 diffusion of supernatant, plates were incubated at 25 °C for 48 h. In the use of gas produced by
 164 yeasts method, Mueller-Hinton agar was casted in two compartments. The first compartment was
 165 flooded with overnight yeast culture and the second one was flooded with *Kocuria rhizophila*
 166 CIP 53.45. After drying the plates, they were incubated at 25 °C for 48 h. In all these
 167 experiments, the presence or absence of inhibition zones was inspected after the period of
 168 incubation.

170 **Table 3**

171 Antimicrobial activities of antagonistic yeasts isolated from the “Tomme d'orchies”; -: No activity; +/-: weak
 172 decreasing of growth density; (+): decreasing of growth density; +: strong inhibition.

Indicator organisms	Diameter of zones of inhibition (mm)	
	<i>Kl. marxianus</i> S-2-05	<i>Kl. lactis</i> S-3-05
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	-	-
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 21332	+9.6mm ± 0.9	+9.8mm ± 1.1
<i>Bacillus subtilis</i> BBG111	+13.6mm ± 1.8	+9.0mm ± 1.3
<i>Bacillus subtilis</i> BBG 168	-	-
<i>Bacillus thuringiensis</i> 407	-	-
<i>Bacillus thuringiensis</i> HD1	+7.8mm ± 1.0	+8.0mm ± 0.5
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	+15.8mm ± 1.7	+10.4mm ± 1.2
<i>Escherichia coli</i> JM107 et K12	-	-
<i>Kocuria rhizophila</i> CIP 53.45	+13.9mm ± 1.4	+14.0mm ± 1.4
<i>Listeria innocua</i> CIP80.11 et F	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i> LMG 13305	(+)/12.9mm ± 2.2	(+)/10.3mm ± 1.0
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (laboratory collection)	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-

173

174

175 *2.9. Hemolytic activity and susceptibility to antifungal compounds*

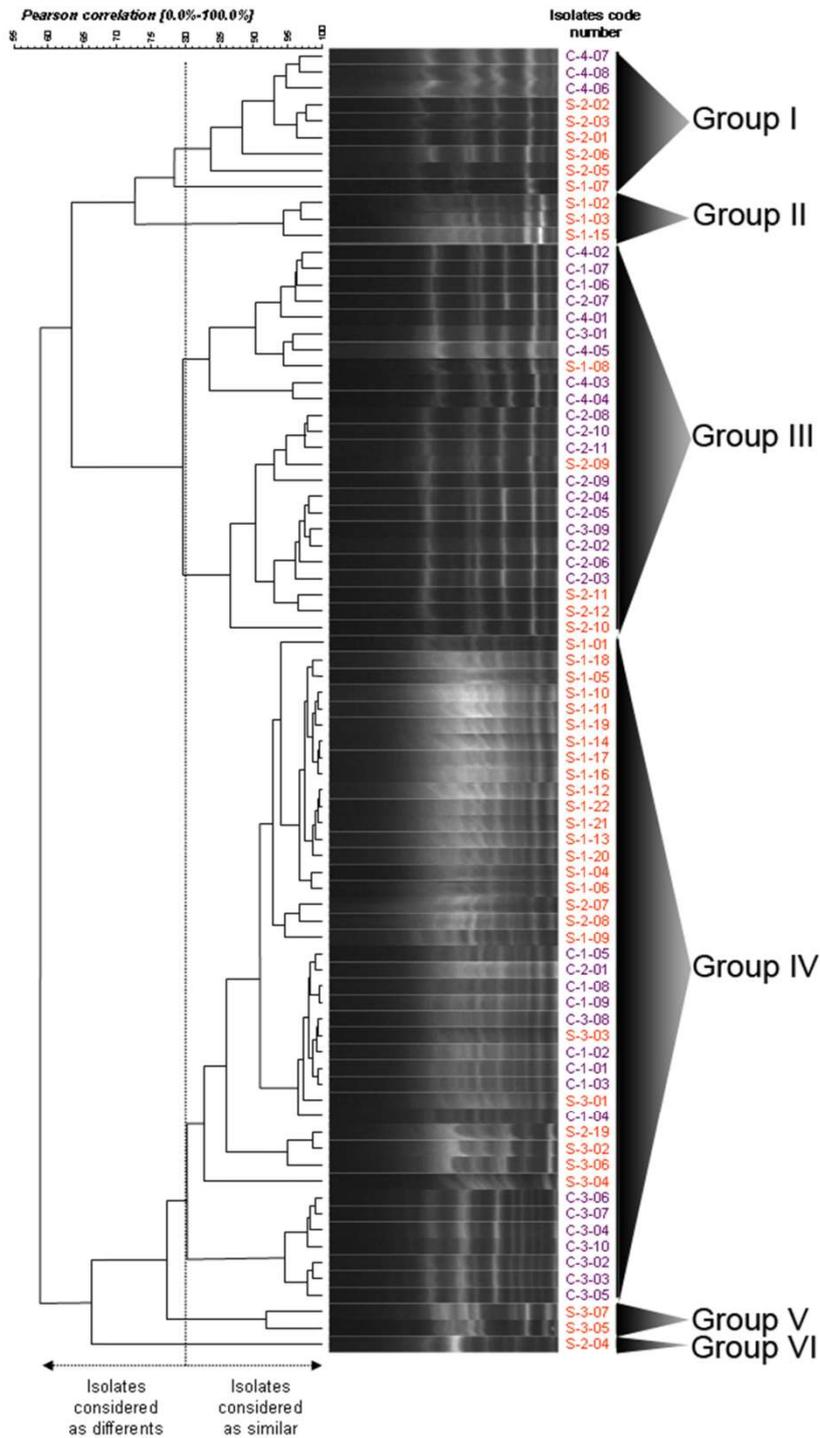
176 The hemolytic activity was determined by inoculating, *Kluveromyces marxianus* (isolate
177 S-2-05) and *Kluveromyces lactis* (isolate S-3-05) on Mueller -Hinton agar supplemented with
178 5% (v/v) of horse blood. The plates were incubated at 37 OC for 24e48 h. The development of a
179 clear zone around the colonies was considered as positive result. The sensitivity of antagonistic
180 strains to antifungal compounds was determined against amphotericin B, 5-fluorocytosin,
181 fluconazol, voriconazol and caspofungin. The interpretation of MICs values was performed in
182 accordance with the recommendations approved by the European Committee on Antimicrobial
183 Susceptibility Testing (EUCAST) and the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) using
184 *Candida albicans* as reference strain (Cuenca-Estrella et al., 2012).

185

186 **3. Results**

187 *3.1 Yeast counts and their genetic relatedness*

188 The microbial count was estimated to be 3.8×10^8 UFC.g⁻¹ on the surface and 5.1×10^6
189 UFC.g⁻¹ in the core of the cheese. The count of mold equalled to 1.8×10^7 UFC.g⁻¹ on the surface
190 and 3.6×10^5 UFC.g⁻¹ in the core of the cheese. A total of 185 of yeasts colonies were isolated
191 from the surface (76 colonies) and core (109 colonies) of the cheese. Afterwards, 80 colonies
192 were grouped by rep-PCR into six distinct groups (I, II, III, IV, V, VI) based on their DNA
193 fingerprinting. The isolates displaying a Pearson correlation higher than 80% were considered as
194 identical, conversely those displaying a correlation below 80%, which were considered as
195 different (Fig. 1). The group IV contains 41 colonies isolated from the surface of the cheese.
196 Group III contains 24 colonies isolated predominantly from the core of cheese. Groups I, II, V,
197 VI contain colonies isolated mostly from the surface of the cheese. The distribution of these
198 isolates within these groups comprised nine isolates in the group I, three in the group II, twenty
199 four in the group III, forty one in the group IV, two in the group V and one in the group VI.
200 Notably, isolates from the surface and the core were found in each group.



201
202
203
204
205
206

Fig. 1. REP-PCR profiles and dendrogram of yeasts isolated from “Tomme d’Orchies” cheese. Isolates displaying less than 80% of Pearson correlation were considered as different, whilst those displaying more than 80% of correlation were considered as similar. Six groups were gathered from the 80 isolates obtained, 38 isolates were from the core and 42 from the surface of the cheese. Colonies obtained from core were preceded “C” letter and those obtained from surface were preceded by “S” letter.

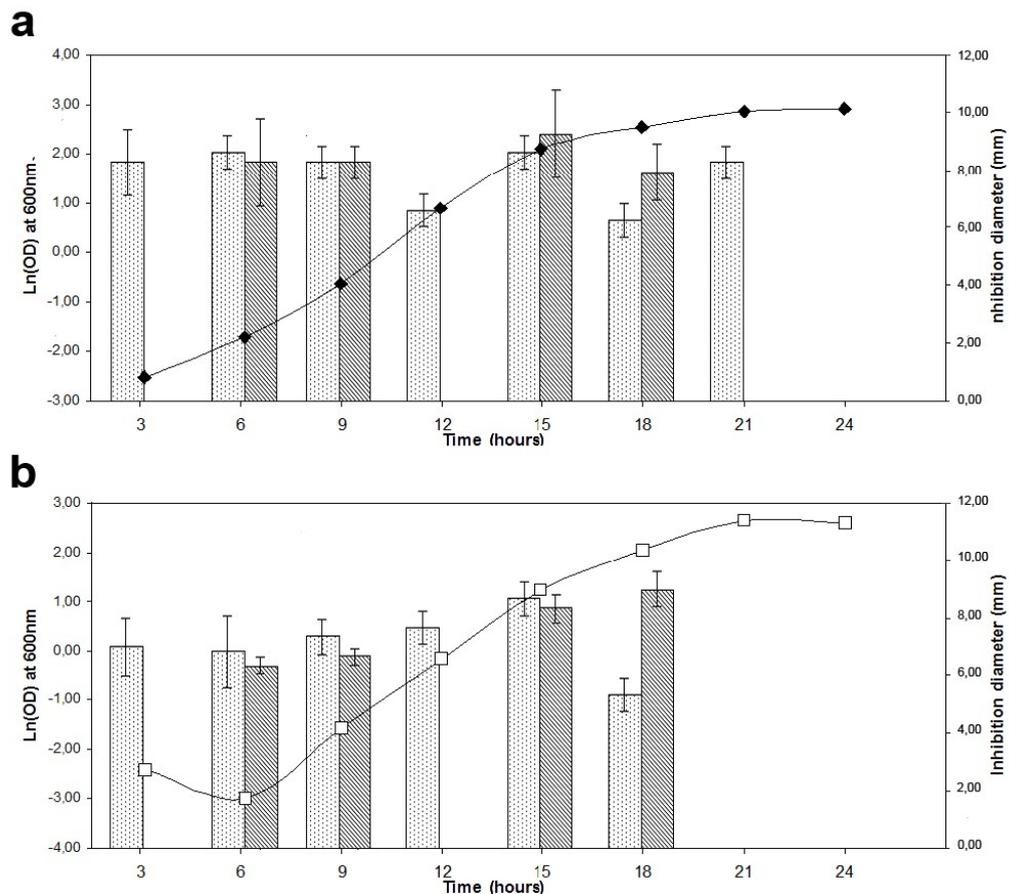
207 3.2 *Yeasts diversity revealed the presence of frequent and infrequent species*

208 The identification was performed on 3 isolates (group I), 1 isolate (group II), 9 isolates
209 (group III), 14 isolates (group IV), 2 isolates (group V) and 1 isolate (group VI). The
210 identification of *Candida lipolytica*, *Candida kefyr* and *Candida famata* by the ID32C Api
211 system are considered secure because the probability of identification was >99%. Nevertheless,
212 the ID32C Api system was not conclusive in the identification of some species such as
213 *Zygosaccharomyces* species, and at less extent *Candida sphaerica*. On the other hand, the
214 molecular methods permitted identification of more species including *Yarrowia lipolytica*,
215 *Saturnispora mendoncae*, *Debaryomyces hansenii*, *Clavispora lusitaniae*, *Kluyveromyces lactis*
216 and *Kluyveromyces marxianus* (Table 2). The reliability between ID32C API System and 26S
217 rDNA sequencing methods showed a high correlation score as supported by the Cramer (0.893)
218 and Cohen's Kappa (0.218) values.

219

220 3.3 *Capabilities of Kluyveromyces marxianus (isolate S-2-05) and Kluyveromyces lactis*
221 *(isolate S-3-05) to inhibit the growth of pathogens including yeast and bacteria*

222 *Kluyveromyces marxianus* (isolate S-2-05) and *Kluyveromyces lactis* (isolate S-3-05)
223 inhibited the growth of the indicator strains listed in Table 3, in cell-to-cell dependent manner.
224 The highest inhibitory activity against *Kocuria rhizophila* CIP 53.45 and *Candida albicans*
225 ATCC 10231 was observed at the end of exponential growth phase, after 15 h of growth, (Fig. 2a
226 and b). In the case of *Kluyveromyces lactis* S-3-05, the anti-*Candida albicans* activity, occurred
227 after 15 h of growth (Fig. 2a), and after 18 h of growth for *Kocuria rhizophila* CIP 53.45 (Fig.
228 2b). The antagonism assessed against other indicator strains unveiled the potential of the
229 aforementioned antagonistic yeasts to inhibit food pathogens including *Listeria monocytogenes*
230 LMG 13305 and some bacilli (Table 3). Nevertheless, the antagonism conducted with the
231 reference strains *Kluyveromyces lactis* MUCL 28769 and *Kluyveromyces marxianus*
232 MUCL 29917, used as control strains, showed only the inhibition of *Kocuria rhizophila*
233 CIP 53.45 by *Kluyveromyces marxianus* MUCL 29917.



234

235 **Fig. 2.** Kinetics of inhibition of *Kocuria rhizophila* CIP 53.45 (light grey) and *Candida albicans* ATCC 10231
 236 (strong grey). (a). The highest inhibition of *Kocuria rhizophila* CIP 53.45 and *Candida albicans* ATCC 10231 by
 237 *Kluyveromyces marxianus* (isolate S-2-05) (black dot) was observed after 15 h of growth. (b). The highest inhibition
 238 of *Kocuria rhizophila* CIP 53.45 and *Candida albicans* ATCC 10231 by *Kluyveromyces lactis* (isolate S-3-05) (white
 239 dot) was observed after 15 h and 18 h of growth respectively.

240

241 3.4 Safety properties of antagonistic yeasts

242 *Kluyveromyces lactis* (isolate S-3-05) and *Kluyveromyces marxianus* (isolate S-2-05) were
 243 non-hemolytic and sensitive to clinical antifungal compounds (Table 4), highlighting thereof
 244 their safe characteristics.

245

246

247 **Table 4**
 248 Sensibility of antagonistic yeast against antifungal compounds.

Antifungal compounds tested	Minimal inhibitory concentration (mg.l ⁻¹)	
	<i>Kluyveromyces marxianus</i> S-2-05	<i>Kluyveromyces lactis</i> S-3-05
Amphotericin B	0.380 (S)	0.250 (S)
5-fluorocytosine	0.500 (S)	0.012 (S)
Fluconazole	0.094 (S)	0.380 (S)
Voriconazole	0.004 (S)	0.023 (S)
Caspofungin	0.047 (S)	0.064 (S)

249 S : Sensitive.

250 MIC < 1 mg.l⁻¹ is considered as sensitive phenotype. Antifungal susceptibility testing (AST) was determined
 251 according to European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) and the Clinical Laboratory
 252 Standards Institute (CLSI) using *Candida albicans* as reference.

253

254 4. Discussion

255 This study enabled to establish the yeast diversity in a French traditional cheese,
 256 designated “Tomme d'orchies”. This diversity encompasses frequent species as *Yarrowia*
 257 *lipolytica*, *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus* and
 258 infrequent species as *Clavispora lusitaniae* and *Saturnispora mendoncae*. [Schoch et al. \(2012\)](#)
 259 pointed out the major importance of ITS1-5.8S-ITS2 sequence in the accurate identification of
 260 yeasts. Hereby, this method failed in the accurate identification of the infrequent species
 261 *Saturnispora mendoncae* conversely to the sequencing of the D1 of 26S rDNA. This non-
 262 conclusive data could be attributed to the lack of available ITS1-5.8S-ITS2 sequences gathered
 263 from this infrequent species, which is described as new species in 2006 by [Kurtzman \(2006\)](#).

264 On the other hand, the frequent species *C. lipolytica*, *C. kefyri*, *C. sphaerica* and *C. famata*
 265 are commonly found in raw milk and cheese products ([Montel et al., 2014](#)), and *D. hansenii* is
 266 used by the manufacturer of this cheese as component of starter. Furthermore, *C. lipolytica* and
 267 *Yarrowia lipolytica* could refer to the same species depending on their sexual or asexual forms
 268 ([Kurtzmann, 2011](#); [Kurtzmann et al., 2011](#)). In direct line, *D. hansenii* and *C. famata*, *C. kefyri*
 269 and *Kluyveromyces marxianus*, or *C. sphaerica* and *Kluyveromyces* could also design the same
 270 species ([Lachance, 2011](#)).

271

272 These strains were clustered into six distinct groups with a random distribution. Thus, the
273 frequent species *C. lipolytica* was abundant in group IV (9 isolates of 14 isolates identified), and
274 *C. famata* was found in group IV (2 isolates of 14 isolates identified). The infrequent species
275 *Saturnispora mendoncae* was predominant in group III (8 isolates of 9 identified), the ninth was
276 *C. lipolytica*. Besides, the infrequent species *Saturnispora mendoncae* was also found in group I
277 (2 isolates of 3 identified), while the third one was *C. kefyri*. In light of this data, we assume the
278 rep-PCR as powerful tool allowing on hand to decrease the number of isolates to be studied, and
279 on the other hand to show the DNA fingerprints.

280 Yeasts antagonism was most often attributed to nutritional competition, pH changes in the
281 medium, production of high concentrations of ethanol, and secretion of antibacterial compounds
282 such as killer toxins or “mycocins” (Suzuki et al., 2001; Golubev, 2013; Young and Yagiu,
283 1978). This study provides insightful informations on yeast antagonism. Indeed,
284 *Kluveromyces marxianus* (isolate S-2-05) and *Kluveromyces lactis* (isolate S-3-05) inhibited the
285 growth of strains of food and medical importance. Related to that, *L. monocytogenes*, and bacilli
286 used hereby could be found in foods (Carlin and Nguyen-The, 2013; Faille et al., 2014), while
287 the human fungal pathogen *Candida albicans* ATCC 10231, is a responsible of candidiasis
288 lesions (Souza et al., 2010), and bloodstream infections in children (Kumar and Singhi, 2013).
289 The mortality associated with invasive *Candida* infections remains relatively high, requesting
290 implementation of new diagnostic tools (Cuenca-Estrella et al., 2012).

291 Moreover, the bacilli are described to produce antimicrobial peptides designated
292 lipopeptides (Ongena and Jacques, 2008; Geys et al., 2014). Remarkably, the aforementioned
293 antagonistic strains hampered the growth of *Bacillus subtilis* BBG111, a lipopeptide producing
294 strain, but not that of *B. subtilis* BBG168, a non-producing lipopeptide strain, advocating thereof
295 the possible implication of lipopeptides in the antagonism. To strengthen this scheme, *Kocuria*
296 *rhizophila* and *Candida albicans* were already reported as potential producers of lipopeptides
297 (Das et al., 1998; Tuleva et al., 2009; Hamed et al., 2012; Muadcheingka and Tantivitayakul,
298 2015). Furthermore, antagonism assays conducted with the reference strains concluded to a

299 limited activity of *Kluveromyces marxianus* MUCL 29917 against *Kocuria rhizophila* CIP 53.45
300 but not against the other target organisms. At this stage, we can argue that inhibition attributed to
301 *Kluveromyces marxianus* (isolate S-2-05) and *Kluveromyces lactis* (isolate S-3-05) requires
302 certainly a viable cell-cell contact, and likely production of lipopeptides. In the best of our
303 knowledge, this is the first report showing the inhibition of food and medical pathogens by non-
304 *Saccharomyces* strains of cheese origin through a contact dependent manner.

305 To sum up, this prospective study permitted to unravel the yeast diversity of “Tomme
306 d’Orchies” cheese, using a culture dependent approach and robust molecular identification tools.
307 Frequent and infrequent species were reported of particular interest *Kluveromyces marxianus*
308 (isolate S-2-05) and *Kluveromyces lactis* (isolate S-3-05) because of their safe properties and
309 inhibitory capabilities against a set of food and medical pathogens.

310

311 **Acknowledgements**

312 This work was supported by Ministère de l’Enseignement Supérieur et de la Recherche
313 (France). The authors would like to thank Mr. Antoine Jean, from the G.A.E.C de la Motte at
314 Nomain (North, France), producer of the Tomme d’orchies cheese for his collaboration and
315 valuable informations regarding the cheese manufacture. The authors are indebted to Pr. Leon
316 Dicks for his critical reading of the manuscript.

317

318 **References**

- 319 Alper, I., Frenette, M., Labrie, S., 2013. Genetic diversity of dairy *Geotrichum candidum* strains
320 revealed by multilocus sequence typing. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 5907-5920.
- 321 Belloch, C., Barrio, E., Garcia, M.D., Querol, A., 1998. Phylogenetic reconstruction of the yeast
322 genus *kluveromyces*: restriction map analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal
323 internal transcribed spacer. *Syst. Appl. Microbiol.* 21, 266-273.
- 324 Beresford, T.P., Fitzsimons, N.A., Brennan, N.L., Cogan, T.M., 2001. Recent advances in cheese
325 microbiology. *Int. Dairy J.* 11, 259-274.

- 326 Binetti, A., Carrasco, M., Reinheimer, J., Suárez, V., 2013. Yeasts from autochthonal cheese
327 starters: technological and functional properties. *J. Appl. Microbiol.* 115, 434-444.
- 328 Carlin, F., Nguyen-The, C., 2013. Pathogen update: bacillus species. In: Sofos, J. (Ed.), *Advance*
329 *in Microbial Food Safety*, vol. 1. Woodhead Publishing, pp. 70-96.
- 330 Cocolin, L., 2000. Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations. *FEMS*
331 *Microbiol. Lett.* 189, 81-87.
- 332 Cocolin, L., Aggio, D., Manzano, M., Cantoni, C., Comi, G., 2002. An application of PCR-
333 DGGE analysis to profile the yeast populations in raw milk. *Int. Dairy J.* 12, 407-411.
- 334 Cole, J.R., Wang, Q., Fish, J.A., Chai, B., McGarrell, D.M., Sun, Y., Brown, C.T., Porras-
335 Alfaro, A., Kuske, C.R., Tiedje, J.M., 2014. Ribosomal Database Project: data and tools for
336 high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Res.* 42 (Database issue). D633-342.
- 337 Cuenca-Estrella, M., Verweij, P.E., Arendrup, M.C., Arikan-Akdagli, S., Bille, J., Donnelly, J.P.,
338 Jensen, H.E., Lass-Floerl, C., Richardson, M.D., Akova, M., Bassetti, M., Calandra, T.,
339 Castagnola, E., Cornely, O.A., Garbino, J., Groll, A.H., Herbrecht, R., Hope, W.W., Kullberg,
340 B.J., Lortholary, O., Meersseman, W., Petrikos, G., Roilides, E., Viscoli, C., Ullmann, A.J.,
341 ESCMID Fungal Infection Study Group, 2012. ESCMID* guideline for the diagnosis and
342 management of *Candida* diseases 2012: diagnostic procedures. *Clin. Microbiol. Infect.* 7, 9-18.
- 343 Das, M., Das, S.K., Mukherjee, R.K., 1998. Surface active properties of the culture filtrates of a
344 *Micrococcus* species grown on n-alkanes and sugars. *Bioresour. Technol.* 63, 231-235.
- 345 Drider, D., Rebuffat, S., 2011. *Prokaryotic Antimicrobial Peptides from Genes to Applications*.
346 Springer, NY-USA.
- 347 Faille, C., Bénézech, T., Midelet-Bourdin, G., Lequette, Y., Clarisse, M., Ronse, G., Ronse, A.,
348 Slomianny, C., 2014. Sporulation of *Bacillus* spp. Within biofilms: a potential source of
349 contamination in food processing environments. *Food Microbiol.* 40, 64-74.
- 350 FAO/WHO, 2002. *Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food*. Food and Agriculture
351 Organization of the United Nations and World Health Organization Working Group Report.
352 Available at. <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf>. accessed 2014.09.19.

- 353 Fleet, G.H., 1990. Yeasts in dairy products. *J. Appl. Bacteriol.* 68, 199-211.
- 354 Geys, R., Soetaert, W., Van Bogaert, I., 2014. Biotechnological opportunities in biosurfactant
355 production. *Curr. Opin. Biotechnol.* 30, 66-72.
- 356 Golubev, V.I., 2013. *Kluyveromyces lactis* mycocin is active at neutral pH. *Mikrobiologiya* 82,
357 295-299.
- 358 Hamed, S.B., Smii, L., Ghram, A., Maaroufi, A., 2012. Screening of potential biosurfactant-
359 producing bacteria isolated from seawater biofilm. *Afr. J. Biotechnol.* 11, 14153-14158.
- 360 Harju, S., Fedosyuk, H., Peterson, K.R., 2004. Rapid isolation of yeast genomic DNA: bust
361 n'Grab. *BMC. Biotechnol.* 4, 8.
- 362 Hatoum, R., Labrie, S., Fliss, I., 2012. Identification and partial characterization of antilisterial
363 compounds produced by dairy yeasts. *Prob. Antimicrob. Prot.* 5, 8-17.
- 364 Irlinger, Mounier, 2009. Microbial interactions in cheese: implications for cheese quality and
365 safety. *Curr. Opin. Biotechnol.* 20, 142-148.
- 366 Jakobsen, M., Narvhus, J., 1996. Yeasts and their possible beneficial and negative effects on the
367 quality of dairy products. *Int. Dairy. J.* 6, 755-768.
- 368 Kumar, S., Singhi, S., 2013. Role of probiotics in prevention of *Candida* infection in critically ill
369 children. *Mycoses* 56, 204-211.
- 370 Kurtzman, C.P., 2006. New species and new combinations in the yeast genera *Kregervanrija*
371 *gen. nov.*, *Saturnispora* and *Candida*. *FEMS. yeast. Res.* 6, 288-297.
- 372 Kurtzman, C.P., 2011. *Yarrowia van der Walt & von Arx (1980)*. In: *The Yeasts*. Elsevier,
373 pp. 927-929.
- 374 Kurtzman, C.P., Fell, J.W., Boekhout, T., 2011. Definition, classification and nomenclature of
375 the yeasts. In: *The Yeasts*. Elsevier, pp. 3-5.
- 376 Lachance, M.A., 2011. *Kluyveromyces van der Walt (1971)*. In: *The Yeasts*. Elsevier, pp. 471-481.
- 377 Lavoie, K., Touchette, M., St-Gelais, D., Labrie, S., 2012. Characterization of the fungal
378 microflora in raw milk and specialty cheeses of the province of Quebec. *Dairy Sci. Technol.*
379 92, 455-468.

- 380 Lopandic, K., Zelger, S., Banszky, L.K., Eliskases-Lechner, F., Prillinger, H., 2006.
381 Identification of yeasts associated with milk products using traditional and molecular
382 techniques. *Food. Microbiol.* 23, 341-350.
- 383 Mei, J., Guo, Q., Wu, Y., Li, Y., 2014. Microbial diversity of a Camembert-type cheese using
384 freeze-dried Tibetan kefir coculture as starter culture by culture-dependent and culture-
385 independent methods. *PLoS One* 9, e111648.
- 386 Montel, M.C., Buchin, S., Mallet, A., Delbes-Paus, C., Vuitton, D.A., Desmasures, N., Berthier,
387 F., 2014. Traditional cheeses: rich and diverse microbiota with associated benefits. *Int. J.*
388 *Food. Microbiol.* 177, 136-154.
- 389 Muadcheingka, T., Tantivitayakul, P., 2015. Distribution of *Candida albicans* and non-albicans
390 *Candida* species in oral candidiasis patients: correlation between cell surface hydrophobicity and
391 biofilm forming activities. *Arch. Oral Biol.* 60, 894-901.
- 392 Ongena, M., Jacques, P., 2008. Bacillus lipopeptides: versatile weapons for plant disease
393 biocontrol. *Trends. Microbiol.* 16, 115-125.
- 394 Ouoba, L.I.I., Nyanga-Koumou, C. a. G., Parkouda, C., Sawadogo, H., Kobawila, S.C., Keleke, S.,
395 Diawara, B., Louembe, D., Sutherland, J.P., 2010. Genotypic diversity of lactic acid bacteria
396 isolated from African traditional alkaline-fermented foods. *J. Appl. Microbiol.* 108, 2019-2029.
- 397 Ouoba, L.I.I., Kando, C., Parkouda, C., Sawadogo-Lingani, H., Diawara, B., Sutherland, J.P.,
398 2012. The microbiology of Bandji, palm wine of *Borassus akeassii* from Burkina Faso:
399 identification and genotypic diversity of yeasts, lactic acid and acetic acid bacteria. *J. Appl.*
400 *Microbiol.* 113, 1428-1441.
- 401 Schoch, C.L., Seifert, K.A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J.L., Levesque, C.A., Chen, W.,
402 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode
403 marker for Fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 6241-6246.
- 404 Souza, R.C., Junqueira, J.C., Rossoni, R.D., Pereira, C.A., Munin, E., Jorge, A.O.C., 2010. Comparison
405 of the photodynamic fungicidal efficacy of methylene blue, toluidine blue, malachite green and low-
406 power laser irradiation alone against *Candida albicans*. *Lasers. Med. Sci.* 25, 385-389.

-
- 407 Suzuki, C., Ando, Y., Machida, S., 2001. Interaction of SMKT, a killer toxin produced by *Pichia*
408 *farinosa*, with the 448 yeast cell membranes. *Yeast* 8, 1471-1478.
- 409 Tuleva, B., Christova, N., Cohen, R., Antonova, D., Todorov, T., Stoineva, I., 2009. Isolation
410 and characterization of trehalose tetraester biosurfactants from a soil strain *Micrococcus*
411 *luteus* BN56. *Process Biochem.* 44, 135-141.
- 412 Viljoen, B.C., Khoury, A.R., Hattingh, A., 2003. Seasonal diversity of yeasts associated with
413 white-surface mould-ripened cheeses. *Food. Res. Int.* 36, 275-283.
- 414 Westall, H., Filtenborg, S., 1998. Yeast occurrence in Danish feta cheese. *Food Microbiol.* 15,
415 215-222.
- 416 Wyder, M.T.M.T., Puhon, Z., 1999. Role of selected yeasts in cheese ripening. *Int. Dairy J.* 9,
417 117-124.
- 418 Young, T.W., Yagiu, M., 1978. A comparison of the killer character in different yeasts and its
419 classification. *Ant. Van Leeuwenhoek* 44, 59-77.

Autres résultats

Recherche de la nature et de l'origine de l'antagoniste de *K. marxianus*

S-2-05 et S-3-05

1. RECHERCHE PAR SPECTROMÉTRIE DE MASSE

Comme indiqué à plusieurs reprises dans ce document, l'effet antagoniste est visible uniquement en milieu gélosé. Nous avons établi plusieurs stratégies pour essayer de retrouver le, ou les, composé(s) en question. Ainsi, nous avons tenté une extraction et purification directement de la zone d'inhibition de la gélose, puis nous avons procédé à une analyse par spectrométrie de masse. Les paramètres utilisés dans cette analyse par spectrométrie de masse sont ceux pour la recherche de molécules protéique.

1.1. Méthodologie

Une première étape suivant l'extraction est effectuée par analyse MALDI-TOF, ou Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight. Ainsi, des fragments de 1 mm ont été prélevés dans les zones d'inhibition, puis macérés dans 2 mL de solution hydrophobe (33 % acétonitrile / 33 % butan-1-ol / 30 % H₂O) ou de solution hydrophile (70 % Isopropanol / 30 % Butan-1-ol) durant 24 à 48 h. Les extraits sont centrifugés, séchés au speed-vac et dilués dans 20 µL de solvant (70 % acétonitrile / 30 % H₂O / 0.1 % Acide trifluoroacétique), pour obtenir une solution 100 fois plus concentrée. Comme l'extraction est réalisée à partir du milieu gélosé, les échantillons risquent de contenir beaucoup de sels (hypersalés), ce qui réduit la sensibilité de l'analyse par spectrométrie de masse. De fait, avant dépôt sur plaque MALDI, certains échantillons sont donc passés en ZipTip C18 (MerckMillipore, Darmstadt, Allemagne) afin de les dessaler et de les concentrer. Les extraits sont ensuite testés, en même temps que plusieurs témoins, comprenant les souches *K. rhizophila* CIP 53.45, *C. albicans* ATCC 10231, *K. marxianus* S-2-05 et *K. lactis* S-3-05, *K. marxianus* MUCL 29917 (une souche de référence non antagoniste) et le milieu Mueller-Hinton.

L'analyse en spectrométrie de masse est réalisée à l'aide d'un MALDI-TOF Autoflex de Bruker Daltonics (Bremen, Allemagne), paramétré en mode réflectron positif, avec 6 000 tirs en moyenne par spectre. Le calibrant utilisé est le mélange PepMix (Bruker Daltonics, Allemagne) et la matrice utilisée est l'acide α -cyano-4 hydroxycinnamique (HCCA) à 10 mg.mL⁻¹, repris dans un mélange 50 % acétonitrile / 50 % H₂O / 0,1 % Acide trifluoroacétique.

1.2. Résultats

Les échantillons non traités au Ziptip sont trop salés pour permettre une analyse MALDI-TOF correcte. Le bruit de fond est trop élevé pour analyser d'une manière fiable les spectres générés. En revanche, les échantillons traités au ZipTip permettent des analyses de spectres fiables (Figure 33). Les spectres correspondant aux zones d'inhibition sont strictement superposables au spectre témoin, utilisant le milieu de culture Mueller-Hinton. Les témoins levures ou souches cibles seules présentent des pics spécifiques aux souches.

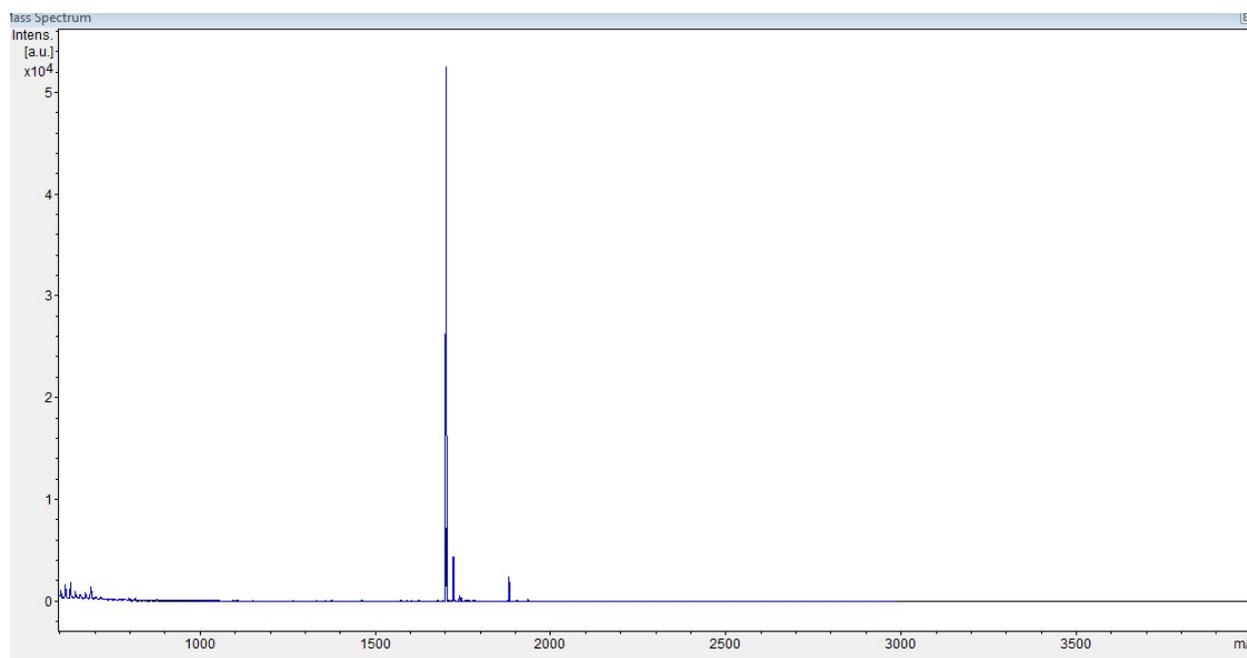


Figure 33. Spectres de masse d'une zone d'inhibition superposée sur le spectre du contrôle milieu

Le spectre de masse de l'extrait correspondant à la zone d'inhibition entre *K. marxianus* S-2-05 et *K. rhizophila* CIP 53.45 (en bleu) et superposé au spectre de masse du contrôle milieu Mueller-Hinton (en noir). Les deux échantillons ont été préalablement dessalés. Aucune différence n'est décelable entre les deux spectres.

1.3. Discussion

L'analyse des spectres obtenus dans ces conditions expérimentales, n'a pas permis d'identifier un composé susceptible de nous mettre sur des pistes d'investigation. En effet, les spectres générés, à partir des échantillons, prélevés dans la zone d'inhibition, ont été retrouvés dans le milieu de culture utilisé, comme témoin. L'absence de spectre additionnel dans nos échantillons pourrait s'expliquer par :

- Une gamme de masse (m/z) testée incorrecte / non adaptée.
- Un composé non-analysable par la technique MALDI.
- Une méthode d'extraction n'ayant pas permis d'extraire le/les composé(s).
- Un composé produit instable, perdant son activité dans le temps.

Par ailleurs, le composé ne semble pas être présent dans la gélose, ni dans le surnageant de culture, même après extraction et concentration. Il est possible qu'il soit présent uniquement dans l'enveloppe cellulaire de la levure, ou tout simplement dans le compartiment intracellulaire.

2. RECHERCHE DE LA LOCALISATION CELLULAIRE DU COMPOSÉ ANTAGONISTE

2.1. Méthodologie

Après lyse des cellules, un échantillon est prélevé afin de tester son activité inhibitrice contre *K. rhizophila* CIP 53.45. Les levures antagonistes sont cultivées 15 à 17 h dans du milieu YEG à 25°C, durée optimale pour observer un effet antagoniste. Elles sont ensuite centrifugées (3 000 g, 8 minutes, 4°C). Le culot cellulaire est rincé deux fois avec de l'eau ultrapure, ensuite resuspendu dans de l'eau ultrapure permettant une concentration 3 fois plus élevée que la suspension initiale. La suspension subit alors trois cycles de passage de -80°C, 5 à 10 minutes, à 95°C, 1 minute afin de lyser les cellules de levures. Le lysat est centrifugé (20 000 g, 15 minutes, 4°C). Le surnageant correspondant au contenu cytoplasmique, est utilisé directement pour les tests. Le culot, correspondant aux débris cellulaires est suspendu dans un tampon Tris/HCl pH 7,0. Une technique de lyse par ultrasons est également testée. Les cellules sont centrifugées et rincées dans de l'eau distillée, puis elles sont remises en suspension pour permettre une grande densité. La suspension subit 10 cycles d'ultrasons à 60 Hertz, durant 1 minute dans la glace, avec une pause d'une 1 minute toujours dans la glace. Le lysat obtenu est traité de façon à obtenir une fraction avec le contenu intracellulaire et une fraction avec les débris cellulaires. Afin de tester les cellules entières (mais non viables), celles-ci ont été inactivées comme suit. Un volume de culture est centrifugé, le culot obtenu est suspendu dans deux volumes de chloroforme pur pendant 15 minutes, à température ambiante. Les cellules inactivées sont centrifugées et suspendues dans un volume d'eau physiologique. Pour tester l'antagonisme, 5 µl de chaque lysat sont déposés sur une boîte de Pétri contenant les souches cibles *K. rhizophila* CIP 53.45 et *C. albicans* ATCC 10231.

Par ailleurs, les lysats obtenus par chocs thermiques sont analysés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE 10 %), en utilisant comme témoin le milieu de culture ayant servi à la croissance de la levure (milieu YEG). Le Tableau 9 indique, à titre informatif, les compositions des différentes solutions utilisées dans cette analyse.

Tableau 9. Composition des différentes solutions utilisées pour la migration sur un gel SDS-PAGE

Composition	Tampon de charge	Gel de concentration	Gel de séparation	Tampon de migration
Tampon Tris/HCl pH 6.8	62,5 mM	125 mM	-	-
Tampon Tris/HCl pH 8.8	-	-	375 mM	-
SDS	20 g.L ⁻¹	1 g.L ⁻¹	2 g.L ⁻¹	0,4 g.L ⁻¹
Glycérol	8,25 %	-	-	-
β -mercaptoéthanol	0,5 mM	-	-	-
Bleu de bromophénol	0,1 g.L ⁻¹	-	-	-
Acrylamide / Bisacrylamide 37,5 :1	-	3,5 %	10 %	-
APS	-	0,1 %	0,1 %	-
TEMED	-	0,1 %	0,1 %	-
Tris	-	-	-	3 g.L ⁻¹
Glycine	-	-	-	14,25 g.L ⁻¹

SDS : Sodium DodécylSulfate – APS : PerSulfate d'Ammonium – TEMED : Tétraméthyléthyléniédiamine.
L'acrylamide/Bisacrylamide provient de chez Biorad (Hercules, USA)

Avant chaque dépôt, les échantillons sont chauffés pendant 5 minutes à 95°C, dans le tampon de charge. La migration du gel de SDS-PAGE est réalisée à 100 V. Après migration, les gels sont colorés au bleu de Coomassie (0,3 % bleu de Coomassie R250, 20 % éthanol, 10 % acide acétique) pendant 1 h 30 à 3 h, puis ils sont mis dans des bains successifs de décoloration (25 % éthanol, 8 % acide acétique), pour éliminer la coloration non spécifique aux protéines.

2.2. Résultats

Seules les fractions correspondant aux levures inactivées ont montré une activité antagoniste contre les deux cibles testées.

L'analyse des différentes fractions de lyse par choc thermique ne permet pas de détecter de composé protéique particulier dans les différentes fractions. Les fractions ne contenant pas de cellules ne montrent aucune bande protéique. Toutes les fractions contenant des levures entières et/ou lysées présentent les mêmes bandes que les cellules entières initiales (Figure 34a et b). On peut ainsi dénombrer 5 bandes de 300, 510, 740, 960 et 1550 Da environ, et une double bande de 1 100 Da environ. Les cellules entières concentrées sont en trop grand nombre pour donner une bande analysable et apparaissent sous forme de *smear*.

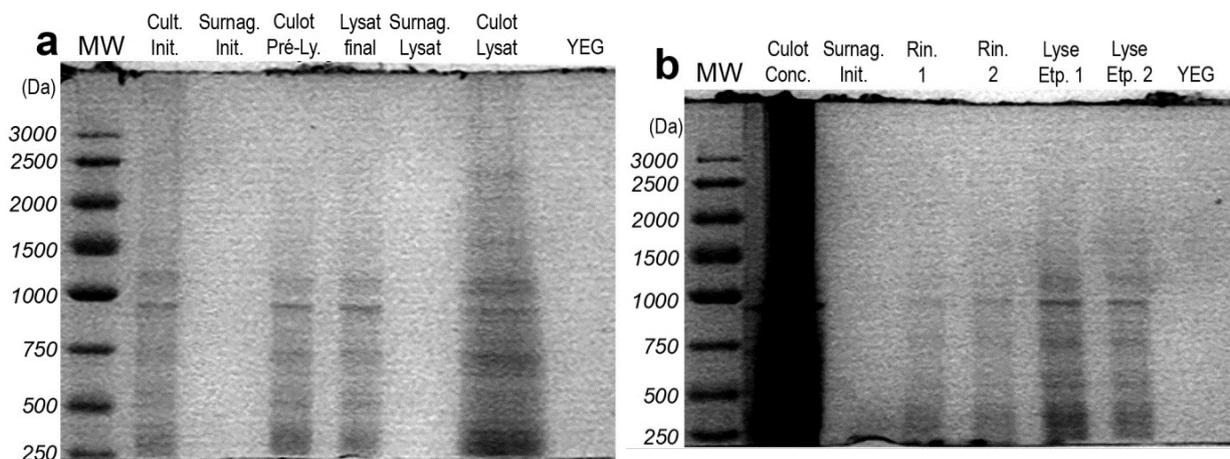


Figure 34. Gels SDS-PAGE des différentes fractions issues du lysat des *Kluyveromyces* antagonistes par cycle de congélation/décongélation.

A chaque étape de la lyse des levures antagonistes, des échantillons ont été prélevés afin d'identifier, par analyse SDS-PAGE, l'apparition ou la disparition de composés protéique d'intérêt. Les abréviations de fraction sont les suivantes : Cult. Init. : Culture initiale, avant lyse ; Surnag. Init. : Surnageant de la culture initiale ; Culot Pré-Ly. : Culot cellulaire de la culture initiale avant lyse ; Surnag. Lysat : Surnageant du lysat final ; Culot Conc. : Culot cellulaire de la culture initiale concentrée ; Rin. : Rinçage contenant les cellules de levures ; Lyse Etp. : Suspension après étape de congélation/décongélation.

2.3. Discussion

La méthode de lyse par congélation/décongélation n'utilise pas de composés chimiques et se base uniquement sur la formation de cristaux de glace pour fracturer les cellules de levures. Cette technique est peu dénaturante pour les composés présents dans et sur les cellules. Elle ne semble pas être suffisante pour lyser toutes les levures présentes dans un échantillon, car leurs parois sont très résistantes. La lyse mécanique par ultrasons semble, par contre, suffisante pour lyser la totalité des levures, mais elle ne permet pas de localiser le composé antagoniste. Celui-ci ne semble donc pas provenir du contenu intracellulaire ou des débris cellulaires de levures obtenues après lyse. L'utilisation de levures complètement « inactivées » indique que le composé antagoniste n'est pas présent sur la paroi et n'aurait pas été dégradé par les techniques de lyse utilisées. Ce composé pourrait être excrété et/ou produit de manière active par la cellule antagoniste, à des concentrations trop faibles pour être détectable dans le milieu liquide.

Publication 4

Étude de l'activité anti-*Salmonella* et du potentiel probiotique de
K. marxianus S-2-05 et de *K. lactis* S-3-05

Résumé de la publication

K. marxianus S-2-05 et *K. lactis* S-3-05 ont montré un pouvoir antagoniste contre un panel de microorganismes incluant des pathogènes alimentaires redoutables comme *Listeria monocytogenes* et *Salmonella*. L'effet des *Kluyveromyces* contre *Salmonella enterica* serovar Enteritidis, *S. Paratyphi* B et *S. Typhimurium* a été étudié par la technique de qPCR en ciblant l'expression de plusieurs gènes de virulence, comme *hil*, *sopD* et *ssrB2*. Seul le niveau d'expression du gène *sopD* a montré des fluctuations. Ainsi, *K. marxianus* S-2-05 semble induire une sous-expression de ce gène de virulence. Les souches de *Kluyveromyces* isolées de la Tomme d'Orchies présentent un pouvoir antagoniste intéressant, pouvant augmenter leur plus-value dans le cadre d'une application probiotique.

Ainsi les principales caractéristiques permettant d'établir le profil probiotique des souches ont été réalisées pour chacune des souches antagonistes. En effet, les souches ont été étudiées pour leurs propriétés de surface, capacités d'adhésion à une surface abiotique (le polystyrène), leurs capacités de résistance aux conditions d'un tractus intestinal artificiel et leurs interactions avec les cellules d'adénocarcinome intestinal Caco-2.

Il résulte de cette étude que les propriétés de surface, des deux souches de *Kluyveromyces*, sont hydrophiles et fortement basiques. Par ailleurs, la faible hydrophobicité est corrélée à une faible capacité à former des biofilms sur support abiotique (polystyrène) qui a des propriétés hydrophobes. Une bonne résistance au tractus intestinal *in vitro* a été observée, avec une perte d'environ 0.4 log de cellules. L'adhésion aux cellules Caco-2 est similaire, à celle de la souche probiotique *Saccharomyces boulardii*.

Dans l'hypothèse d'une colonisation du tractus intestinal, les souches de *Kluyveromyces* n'induisent pas, après 24 heures de contact, d'effets délétères et cytotoxiques. Les capacités d'adhésion aux solvants laissent à penser à une compatibilité théorique avec les mucines, qui est le principal constituant du mucus intestinal. Cette dernière notion est importante, car la majorité du microbiote intestinal adhérent est localisé dans ce mucus, une forte compatibilité avec ce dernier permettrait la colonisation du tractus intestinal, ce qui pourrait constituer un élément d'importance chez les probiotiques.

1 **Anti-Salmonella activity and probiotic trends of *Kluyveromyces***
2 ***marxianus* S-2-05 and *Kluyveromyces lactis* S-3-05 isolated from a French**
3 **cheese named “Tomme d'Orchies”**

4

5 Alexandre Ceugniet^a, Françoise Coucheney^{a,**}, Philippe Jacques^a,
6 Georges Daube^b, Véronique Delcenserie^b, Djamel Drider^{a*}

7

8 ^a *Univ. Lille, INRA, Univ. Artois, Univ. Littoral Côte d'Opale, EA 7394 – ICV - Institut*
9 *Charles Viollette, F-59000 Lille, France*

10 ^b *Fundamental and Applied Research for Animal & Health (FARAH), Food Science*
11 *Department, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, Liège, B-4000 Belgium*

12

13 * Corresponding authors: Fax. + 33 3.28.76.73.56

14 **Corresponding authors: Fax. + 33 3.28.76.73.56

15

16 E-mail addresses: Francoise.Coucheney@univ-lille1.fr, (F. Coucheney), djamel.drider@univ-
17 lille1.fr (D. Drider)

18

19

20 **ABSTRACT**

21 *Kluyveromyces marxianus* S-2-05 and *Kluyveromyces lactis* S-3-05 were recently
22 isolated from a traditional French cheese, Tomme d'Orchies, and characterized here for
23 their advantages using a different application perspective. First, we established their
24 anti-*Salmonella* activity and downregulation of the virulence *sopD* gene of *Salmonella*
25 *enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium, mainly in the presence of *K. marxianus*
26 S-2-05. In addition to their antagonism, these non-*Saccharomyces* yeasts were able to
27 survive under conditions mimicking the gastrointestinal environment and to form biofilms
28 on an abiotic device such as polystyrene. These strains also displayed highly hydrophilic
29 cell wall surfaces properties and capacity for adhesion to intestinal Caco-2 cells, thus
30 enhancing their potential as probiotic strains.

31

32 **Keywords:** Non-*Saccharomyces* yeasts; Anti-*Salmonella* antagonism; Probiotic

33

34 1. Introduction

35 As we near the end of the golden era of antibiotic discovery, natural antimicrobials are
36 being viewed as options for confronting increased bacterial resistance. According to the
37 European Center for Disease Prevention and Control (ECDC), 25,000 people die each year
38 from infections caused by multiresistant bacteria. Such collateral damage greatly increases
39 the cost, as well as extra healthcare services and productivity loss [1]. The combat against
40 bacterial resistance to antibiotics includes strategies outlined in different reviews [2-4], but
41 fecal microbiota transplantation, use of nanoparticles, essential oils and, to a lesser extent,
42 probiotics, are also weapons that need to be considered. The ultimate goal of all these
43 strategies is to tackle bacterial resistance. Alternatives to antibiotics must be considered in
44 both animal agriculture and human medicine. Use of probiotics in resolving medical
45 problems is safer and less expensive than antibiotic therapy. Probiotics are live
46 microorganisms with beneficial claims. Their intake in adequate amounts may confer health
47 benefits upon the host, according to FAO/WHO guidelines of 2002 [5]. Most probiotic
48 products are issued from lactic acid bacteria (LAB) strains, mainly *Lactobacillus* and
49 *Lactococcus* species or *Bifidobacterium* specie, but other bacteria such as *Escherichia coli*
50 Nissle and even yeast species are also used for probiotic applications [6]. The role of
51 probiotics as adjunctive measures led to a body of evidence supporting their role in primary
52 prevention of *Clostridium difficile* infection (CDI), which is a leading cause of hospital-
53 acquired bacterial infections and the most deadly enteric pathogen in the United States
54 [7,8]. In a recent review, Elzouki [9] underlined how probiotics can control several
55 gastrointestinal diseases such as antibiotic-related diarrhea, *C. difficile* toxin-induced colitis
56 and infectious diarrhea. Elsewhere, substantial documentation highlighted antimicrobial
57 resistance among pathogenic bacteria due to overuse of antibiotics in the poultry industry,
58 which caused public and governmental outcries. Antibiotics that are provided to healthy

59 animals as growth promoters at subtherapeutic doses have led to selection of bacterial
60 resistance in *Campylobacter*, *Salmonella*, *Enterococcus* and *E. coli* [10].

61 The rational design of probiotics includes, in addition to their health claims, several
62 criteria: stability during the manufacturing processes, viability during gastrointestinal
63 transit and functionality at the desired target site [11]. Adhesion to mucus, cell surface
64 properties, safety of the host and antagonism toward intestinal pathogens also are
65 determinant in the selection of probiotics.

66 Traditionally, probiotics are associated with dairy products, especially those derived from
67 cheese, which are remarkable for their microbial diversity. Most studies on yeast probiotics
68 focused on *Saccharomyces boulardii* [12,13]. The recent decade has witnessed much
69 evidence concerning non-*Saccharomyces* yeasts as probiotic candidates [14,15]. A recent
70 report from Li et al. [16] elucidated the GRAS status of *Kluyveromyces* species. Yeasts
71 might offer more advantages compared to bacteria, as they are insensitive to antibiotics and
72 can be easily used for antibiotic-associated diarrhea treatment [13,17]. Yeasts are also able to
73 produce major metabolites such as vitamins and/or antioxidants [18,19], and inhibit growth
74 of *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Aspergillus westerdijkiae* [20,21].

75 Taking advantage of the GRAS status of *Kluyveromyces* species, the present work
76 sought to further elucidate the beneficial effects of *Kluyveromyces marxianus* S-2-05 and
77 *Kluyveromyces lactis* S-3-05, recently isolated from a French traditional cheese named
78 “Tomme d'Orchies”. These yeasts were able to inhibit growth of the foodborne pathogen
79 *Salmonella* spp. and downregulate the virulent *sopD* gene of *Salmonella enterica* subsp.
80 *enterica* serovar Typhimurium.

81
82

83 2. Material and methods

84 2.1. Strains, growth conditions and inhibitory activity

85 *K. marxianus* S-2-05 and *K. lactis* S-3-03 were grown at 25 °C with shaking at 160 rpm
86 in YEG medium (pH 6.9) containing yeast extract 5 g/L and glucose 20 g/L. *S. boulardii*
87 Ultralevure (Biocodex, France) and *Candida albicans* ATCC 10231 were grown at 37 °C
88 under agitation at 160 rpm in YEG medium. *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis
89 SR071, *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Paratyphi B SR425 (from the FARAH
90 laboratory, Belgium) and *S. ser. Typhimurium* ATCC 14028 were grown at 37 °C under
91 agitation of 160 rpm in brain-heart infusion medium (BHI) (Sigma-Aldrich, Germany). For
92 gene expression analysis, *Salmonella* spp. were also grown in Luria broth (LB) (Sigma-
93 Aldrich, Germany) under the above-cited conditions. The assessment of antagonism was
94 carried as recently reported [22]. Briefly, the method consisted of flooding a Mueller-
95 Hinton agar plate with *Salmonella* sp. at about 10⁶ CFU/mL, and then adding 5 mL of
96 yeast cultures grown for 16-18 h and diluted to about 10⁸ CFU/mL. The plates were then
97 incubated at 25 °C and inspected after 48 h for inhibition.

98

99 2.2. Expression of *S. ser. Typhimurium* ATCC 14028 virulence genes

100 The method from Guri et al. [23] was used in this study. Briefly, *K. marxianus* S-2-05,
101 *K. lactis* S-3-03 and *S. ser. Typhimurium* ATCC 14028 were grown overnight. Then,
102 *S. ser. Typhimurium* ATCC 14028 at about 5 x 10⁴ CFU/mL was co-inoculated with
103 1 x 10⁶ CFU/mL of each yeast and incubated for 4 h under agitation at 37 °C.
104 *S. ser. Typhimurium* ATCC 14028 alone was used as a negative control assay, and each
105 experiment was carried out at least in triplicate. The cultures were centrifuged (4 °C, 10
106 min, 5000g), and the resulting pellets were treated with the RNeasy Mini kit (Qiagen,
107 Venlo, Netherlands) and the DNase I recombinant RNasefree kit (Roche Applied Sciences,
108 Vilvoorde, Belgium) in order to extract and purify total RNA. DNase was inactivated by

109 heating the suspension for 10 min at 75 °C, and then placed on ice. The cDNA high
110 capacity reverse transcription kit (Life Technologies, Carlsbad, USA) was used on the
111 purified total RNA following this program: 10 min at 25 °C, 120 min at 37 °C and 5 min at
112 85 °C. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was used to quantify the expression of
113 virulence genes *hilA*, *ssrB2*, *sopD* and housekeeping genes *gmk*, *rpoD* and 16S rDNA of
114 *S. ser. Typhimurium* ATCC 14028 (Table 1). The housekeeping gene with the utmost
115 expression stability was used for ratio calculation. Primers used in this study and listed
116 in Table 1 [23] were purchased from Eurogentec (Liège, Belgium). PCR mix was
117 prepared with GoTaq® qPCR Master Mix (Promega, Leiden, Netherlands), and run on the
118 ABI 7000 thermocycler (Applied Biosystems, Singapore) using the following program:
119 initial denaturation 10 min at 95 °C; 40 cycles: 30 s at 95 °C; 30 s at 54 °C; and 30 s at
120 72 °C. The melting curve was obtained by decreasing the temperature from 95 °C to 60 °C
121 with a rate at 0.1 °C/s.

122 The formula below [24] was used for gene expression. Ct_{CTRL} was the threshold value of
123 each related gene of *S. ser. Typhimurium* ATCC 14028 and Ct_S was the threshold value of
124 genes of *S. ser. Typhimurium* ATCC 14028 when grown concomitantly with the yeast strain.

125

$$126 \quad r = \frac{2^{(Ct_{CTRL} - Ct_S)} \text{ of tested gene}}{2^{(Ct_{CTRL} - Ct_S)} \text{ of housekeeping gene}}$$

127

128 A ratio below -1 was considered as a downregulated gene, while a ratio above +1 was
129 considered as upregulation.

130

131

Table 1
Primers used for the quantitative real-time PCR.

Amplified gene	Primers	Information
<i>hil</i>	Forward 5'-TGT CGG AAG ATA AAG AGC AT-3'	Virulence factor - Invasion protein regulator
	Reverse 5'-AAG GAA GTA TCG CCA ATG TA-3'	
<i>sopD</i>	Forward 5'-ATT AAT GCC GGT AAC TTT GA-3'	Virulence factor - Secreted effector protein
	Reverse 5'-CTC TGA AAA CGG TGA ATA GC-3'	
<i>ssrB2</i>	Forward 5'-TGG TTT ACA CAG CAT ACC AA-3'	Virulence factor -Type III secretion system regulator (transcriptional activator)
	Reverse 5'-GGT CAA TGT AAC GCT TGT TT-3'	
<i>gmk</i>	Forward 5'-TTG GCA GGG AGG CGT TT-3'	Housekeeping genes
	Reverse 5'-GCG CGA AGT GCC GTA GTA AT-3'	
ropD	Forward 5'-ACA TGG GTA TTC AGG TAA TGG AAG A-3'	
	Reverse 5'-CGG TGC TGG TGG TAT TTT CA-3'	
16S rRNA	Forward 5'-GAG TTT GAT CMT GGC TCA G-3'	
	Reverse 5'-TAC GGT TAC CTT GTT ACG AC-3'	

132

133 2.3. Growth of yeasts under different physiological conditions

134 *K. marxianus* S-2-05 and *K. lactis* S-3-05 were grown overnight, streaked on YEG
135 plates and incubated at 4, 8, 25, 30 and 37°C for 7 days in order to determine the optimal
136 growth temperature. Two other isolates on YEG plates were incubated at -20 °C and 55 °C
137 for 7 days and at 25 °C for another period of 7 additional days. Afterwards, plates were
138 inspected for colony growth.

139 To assess pH tolerance, overnight cultures were used to inoculate YEG broth (dilution:
140 1/100) adjusted to pH 5.0 using citrate buffer, to pH 6.0, 7.0 and 8.0 using phosphate buffer.

141 To assess sodium chloride (NaCl) tolerance, overnight cultures were used to inoculate
142 YEG broth (dilution: 1/100) in the presence of different NaCl concentrations (0, 1, 2.5, 5,
143 8.5, 10, 15 or 30% (w/v)). Broths were incubated under agitation for 7 days at 25 °C.

144

7

145 2.4. *Safe properties*146 2.4.1. *Biofilm formation*

147 Biofilm formation was performed as previously described [25]. Each strain was grown
148 overnight and diluted to about 5×10^6 CFU/mL, placed into 96 round polystyrene well
149 plates (Sarstedt, Germany) and incubated at 25 °C for 24 h or 48 h. Wells were washed
150 twice with trypton-salt solution (TSS) consisting of 1 g/L trypton and 8.5 g/L NaCl,
151 followed by addition of absolute ethanol, allowing biofilm fixation. Ethanol was
152 eliminated and crystal violet at 0.1% (w/v) was added for 45 min before washing with
153 TSS. Finally, glacial acetic acid at 33% (v/v) was added to dissolve the crystal violet fixed
154 to biofilm. The resulting solution was transferred to a new 96-round-well plate and read at
155 595 nm to estimate the biofilm formation capacity. Negative controls were wells without
156 yeast cells.

157

158 2.4.2. *Determination of cell affinity to solvents*

159 The microbial adhesion to solvents (MATS) was determined as previously reported
160 [26]. Overnight cultures of *Kluyveromyces* strains were centrifuged (room temperature,
161 15,000 x g, 10 min) and the resulting pellets were suspended in 100 mM phosphate buffer
162 in order to reach a concentration of about 10^7 CFU/mL. The optical densities (ODs) were
163 measured at 405 nm (A_0), and suspensions were mixed for 90 s with hexadecane,
164 chloroform, ethyl acetate or decane at a proportion of 1:7. The ODs of aqueous phases (A)
165 were taken after 5 min of contact. Cell affinity for each solvent was calculated using the
166 following formula:

167
$$\text{Affinity} = \left[1 - \left(\frac{A}{A_0} \right) \right]$$

168

169

170 The affinity for chloroform and hexadecane delineates the electron donor potential,
 171 whilst the affinity for ethyl acetate and decane indicates the electron acceptor potential of
 172 the cell surface [26]. Affinity of yeasts for hexadecane can be used as a measurement of
 173 cell surface hydrophobicity. Antagonistic yeasts were assessed for their affinities to
 174 solvent, using *C. albicans* ATCC 10231 and *S. boulardii* as controls.

175

176 *2.4.3. Evaluation of yeast survival in conditions mimicking the gastrointestinal tract*

177 Survival under conditions mimicking the gastrointestinal tract was evaluated as
 178 previously reported [27,28]. The contents of the gastric and intestinal fluids are given in
 179 Table 2. Yeasts from overnight cultures were added at 2×10^7 CFU/mL in gastric fluid and
 180 incubated under agitation for 2 h at 37 °C. Yeasts were then diluted (1:1) using the intestinal
 181 fluid and incubated under agitation for 2 h at 37 °C. Before treatment and after each step,
 182 samples were withdrawn, diluted in saline water (9 g/L NaCl) and then spread on YEG agar
 183 in order to determine the number of surviving cells. Experiments with the pathogen *C.*
 184 *albicans* ATCC 10231 and probiotic *S. boulardii* were run in the same conditions.

Table 2
 Composition of artificial gastro-intestinal fluids

Compound	Gastric fluid	Intestinal fluid
KCl	6.9 mM	6.8 mM
KH ₂ PO ₄	0.9 mM	0.8 mM
NaHCO ₃	24.5 mM	85 mM
NaCl	47.7 mM	38.4 mM
MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	0.105 mM	0.33 mM
NH ₄ HCO ₃	1 mM	-
HCl	15 mM	8.4 mM
CaCl ₂	0.15mM	0.6 mM
Pepsin (porcine)	4000 U.mL ⁻¹	-
Pancreatin (porcine)	-	100 U.mL ⁻¹
Bile extract (porcine)	-	60 g.L ⁻¹
pH	3.0 ± 0.2	7.0 ± 0.2

185

186

187 *2.4.4. Yeasts adhesion to intestinal Caco-2 cells*

188 Adhesion to Caco-2 cells from a human adenocarcinoma intestinal cell line was
189 performed as recently reported [28]. To this end, overnight yeast cultures were suspended
190 in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Dominique Dutscher, Brumath, France)
191 without antibiotic and fetal bovine serum (FBS). Yeasts were used at 2×10^7 CFU/mL for
192 the controls (*C. albicans* ATCC 10231 and *S. boulardii*), and at 6×10^5 CFU/mL for
193 probiotic candidates *K. marxianus* S-2-05 and *K. lactis* S-3-05. Each yeast suspension was
194 added onto the monolayer culture of Caco-2 at about 1.5×10^5 cells/well, on 24-well
195 plates. They were first washed with phosphate buffered saline (PBS) to avoid any
196 interfering reaction, and incubated for 2 h at 37 °C in the presence of 5% CO₂. Afterwards,
197 cells were washed twice with PBS to remove non-adherent yeasts and lysed using PBS and
198 0.1% Triton X100. The lysates were serial-diluted and spread on YEG agar plates to
199 determine the adherent yeast cell percentage per Caco-2 cells.

200

201 *2.4.5. Intestinal cell cytotoxicity*

202 Yeast cultures 24-h old were diluted to 2×10^6 CFU/mL in DMEM to be assessed for the
203 cytotoxicity assay and 100 µL of each suspension was used at a ratio of 1:4, Caco-2/yeast
204 and the monolayer culture of Caco-2 at about 5×10^4 cells/wells on 96-well plates. Strains
205 were first washed with DMEM without any supplementation. The plate with Caco-2 and
206 yeast was incubated for 24 h at 37 °C in the presence of 5% CO₂. Afterwards, cells were
207 washed twice with PBS in order to remove non-adherent yeasts, and PBS with 1 mg/mL of
208 propidium iodide was added. Fluorescence was measured using Xenius XM (SAFAS,
209 Monaco) with excitation/emission wavelength parameters of 575/615 nm and PMT voltage
210 of 1000 V. Each yeast strain was tested on three independent cultures, with three assays per
211 culture. Wells containing only Caco-2 cells were used for control of total viability.

212 2.5. Statistical analysis

213 Statistical analysis was performed with software SPSS® Statistic v20, IBM® (Armonk,
 214 NY, USA). Normality of value distributions was checked with ShaphiroeWilk and
 215 SkewnesseKurtosis tests. Normal values were compared with one-way ANOVA and the
 216 Tukey test or GameseHowell and T2 of Tamhane for heterogeneous variances. Non-
 217 normal values were treated with KruskaleWallis and ConovereIman tests.

218

219 **3. Results**

220 3.1. Kluyveromyces yeasts inhibited foodborne Salmonella spp.

221 *K. marxianus* S-2-05 and *K. lactis* S-3-05 displayed inhibitory activities against *S. ser.*
 222 Paratyphi B, *S. ser. Typhimurium* ATCC 14028 and *S. ser. Enteritidis* used as target organisms
 223 (Table 3). Here, housekeeping gene *rpoD* was used for calculation of gene expression [24].
 224 Expression of three *Salmonella* virulence genes for *K. marxianus* S-2-05 led to the following
 225 values: -10.67 ± 1.84 (*sopD*), -1.12 ± 4.82 (*ssrB2*) and 2.41 ± 0.44 (*hil*). In *K. lactis* S-3-05,
 226 data were not available for the *hil* gene, while expression of *sopD* and was estimated at
 227 -9.33 ± 10.92 and *ssrB2* at -1.67 ± 10.81 , respectively. These data delineate, for *K. marxianus*
 228 S-2-05, significant downregulation of the *sopD* gene of *S. ser. Typhimurium* (Fig. 1).

Table 3

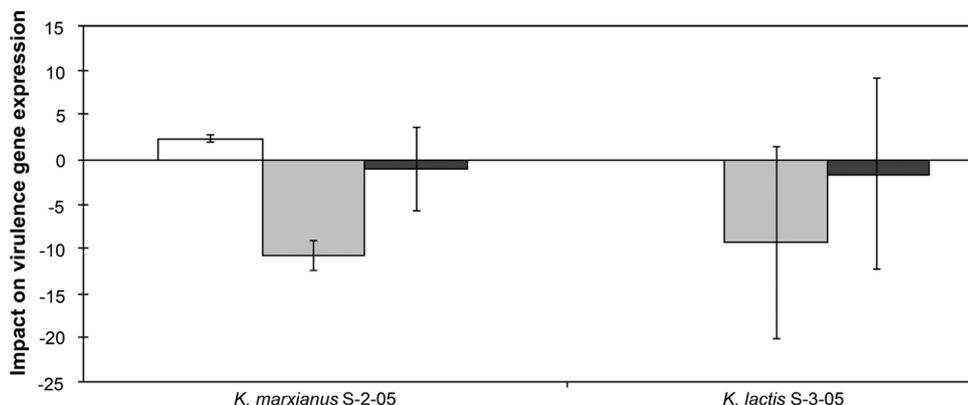
Antagonistic activities of yeasts isolated from the “Tomme d’Orchies” cheese against *Salmonella* spp.

Target strains	Yeasts	
	<i>K. marxianus</i> S-2-05	<i>K. lactis</i> S-3-05
<i>K. rhizophila</i> CIP 53.45	13.9 mm \pm 1.4; I	14.0 mm \pm 1.4; I
<i>S. ser. Enteritidis</i> (lab collection)	10.4 mm \pm 0.7; D	9.9 mm \pm 0.9; D
<i>S. ser. Paratyphi B</i> (lab collection)	12.7 mm \pm 0.6; D	9.8 mm \pm 0.9; D
<i>S. ser. Typhimurium</i> ATCC 14028	10.6 mm \pm 1.1; D	10.8 mm \pm 0.6; D

Kocuria rhizophila CIP 5345 was used as target reference strain because of its sensitivity to antimicrobials. Values (\pm SD) are means of at least three independent experiments. “I” corresponds to the inhibition activity and “D” to a decrease of growth density.

229

230



231

232 Fig 1. Effects of *K. marxianus* S-2-05 and *K. lactis* S-3-05 on the virulence gene expression of *S. enterica*
 233 subsp. *enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028. Results are illustrated for *hil* (white), *sopD* (grey) and
 234 *ssrB2* (dark grey). Values (±SD) are means of at least three independent experiments.

235

236 3.2. *K. marxianus* S-2-05 and *K. lactis* S-3-05 defied harsh growth conditions

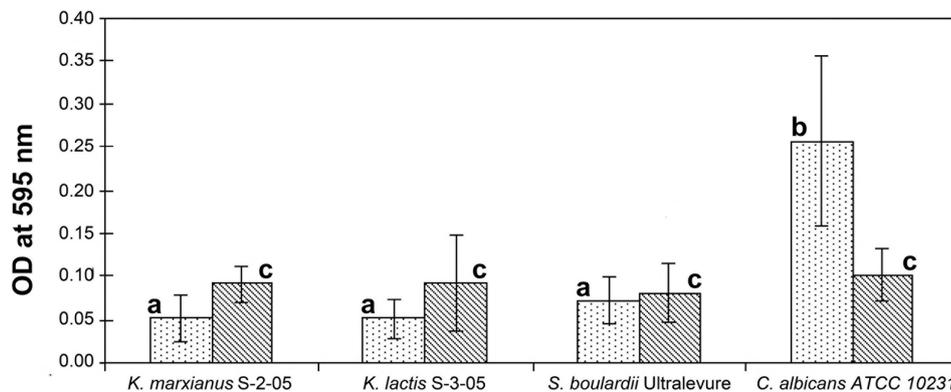
237 *K. marxianus* S-2-05 was able to grow until 8.5% NaCl, whereas *K. lactis* S-3-05 was
 238 even able to grow up until 10% NaCl. Both strains grew at pH values comprised between 5
 239 and 8, with an optimum pH 7. Each yeast displayed viability after 7 days at -20 °C and
 240 grew between 8 and 37 °C, but both strains were killed upon 2 h treatment at 55 °C.
 241 Growth for *K. marxianus* S-2-05 was between 25 and 37 °C, while that of *K. lactis* S-3-05
 242 was between 25 and 30 °C (data not shown).

243

244 3.3. Novel insights into *K. marxianus* S-2-05 and *K. lactis* S-3-05 probiotic properties

245 3.3.1. Biofilm formation on polystyrene

246 *K. lactis* S-3-05 and *K. marxianus* S-2-05, as well as *S. boulardii*, showed weak
 247 capacity to form biofilms on polystyrene after 24 h. The pathogenic human fungus
 248 *C. albicans* ATCC 10231 showed a different behavior in terms of biofilm formation on
 249 polystyrene. After 48 h, *Kluyveromyces* strains showed quite similar capacities to form
 250 biofilms, in contrast to the control strains (Fig. 2).



251

252 Fig. 2. Biofilm formation on polystyrene plates. Results obtained after 24 h of incubation are given in light grey
 253 and those from 48 h of incubation are depicted in dark grey. Values (\pm SD) are means of at least three independent
 254 experiments. Groups that were statistically similar are indicated by letters. Statistical analysis was performed using
 255 ANOVA and T2 of Tanhane for 24 h of incubation and Kruskal-Wallis method for 48 h of incubation.

256

257 3.3.2. Cell surface properties

258 Based on the MATS values (Table 4), all tested strains showed affinity to hexadecane
 259 under 10%, which delineate a strong hydrophilic property. However, *K. marxianus* S-2-05
 260 affinity for hexadecane was estimated to be $+8.89\% \pm 4.90$ and appeared to be different
 261 from the other strains. *Kluyveromyces* strains and *S. boulardii*, showed a very strong basic
 262 property while *C. albicans* ATCC 10231 was moderately basic. On the other hand, almost
 263 neutral acidic property was reported for *K. marxianus* S-2-05 and *C. albicans*
 264 ATCC 10231, while a moderate acidic property was observed for *S. boulardii*, and a
 265 moderate repulsion of electron was observed for *K. lactis* S-3-05. *Kluyveromyces* strains
 266 used were close to the probiotic *S. boulardii* rather than *C. albicans* ATCC 10231.

267

268

Table 4

MATS test of yeast cells cultured overnight in YEG.

Strain	Percent of adhesion to solvent			
	Hexadecane	Chloroform	Ethyl acetate	Decane
<i>K. marxianus</i> S-2-05	+8.89 ± 4.90 - (a)	+60.41 ± 10.46 - (a)	+21.78 ± 8.09 - (a)	+20.13 ± 7.56 - (a)
<i>K. lactis</i> S-3-05	-4.00 ± 5.22 - (a)(b)	+53.92 ± 11.49 - (a)	+2.55 ± 4.90 - (b)	+17.96 ± 14.86 - (a)(c)
<i>S. boulardii</i> Ultralevure	-8.94 ± 6.29 - (b)	+22.72 ± 8.48 - (b)	+11.48 ± 3.48 - (b)	-0.28 ± 4.51 - (b)
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	-8.97 ± 10.99 - (b)	+4.00 ± 6.33 - (c)	+5.51 ± 3.06 - (b)	+5.12 ± 3.63 - (b)(c)

Values (±SD) are means of at least three independent experiments. Values with the same letter are not significantly different ($P < 0.05$). Groups were made using ANOVA and Tukey test for chloroform, ethyl acetate and decane and ANOVA with Games-Howell test for hexadecane.

269

270 3.3.3. In vitro digestion

271 The mimicking of passage through the entire gastrointestinal tract, with an initial
 272 concentration of 1×10^7 CFU/mL, permitted designing two significantly different groups
 273 based on the Tukey test. The highly resistant group was composed of *C. albicans*
 274 ATCC 10231, with $1.1 \times 10^7 \pm 1.6 \times 10^6$ CFU/mL after digestion, and *S. boulardii* with
 275 $9.4 \times 10^6 \pm 1.9 \times 10^6$ CFU/mL. The less resistant group was composed of *K. marxianus*
 276 S-2-05, with $4.7 \times 10^6 \pm 2.1 \times 10^6$ CFU/mL, and *K. lactis* S-3-05, with
 277 $4.5 \times 10^6 \pm 2.8 \times 10^6$ CFU/mL.

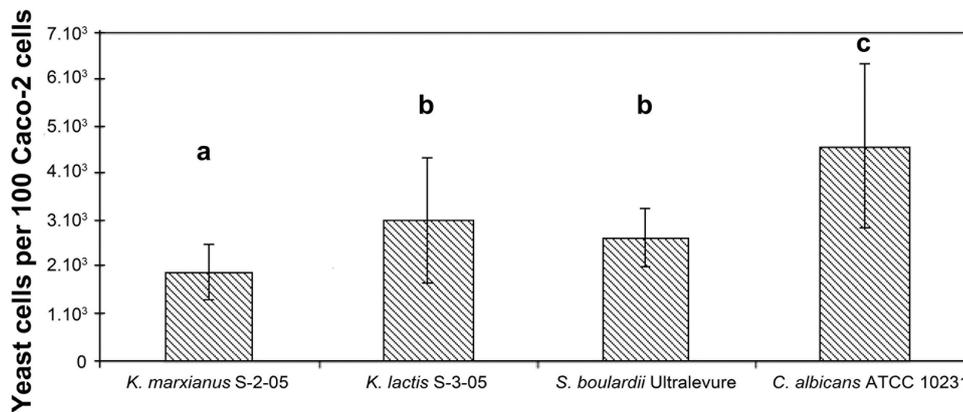
278

279 3.3.4 Adhesion to intestinal cells revealed no cytotoxicity for Kluyveromyces

280 *Kluyveromyces* strains adhered to Caco-2 intestinal cells upon 2 h of contact, reaching
 281 1.9×10^3 for *K. marxianus* S-2-05 cells/100 Caco-2 cells and 3.0×10^3 for *K. lactis* S-3-05
 282 cells/100 Caco-2. Interestingly, a similar adhesion score was reported for the probiotic
 283 strain *S. boulardii*, with 2.6×10^3 cells/100 Caco-2, and an elevated adhesion score was
 284 registered for *C. albicans* ATCC 10231, with 4.6×10^3 cells/100 Caco-2. Remarkably, the
 285 adhesion abilities of *K. lactis* S-3-05 and *S. boulardii* were shown to be statistically
 286 similar, in contrast to those observed for *K. marxianus* S-3-05 and *C. albicans* ATCC

14

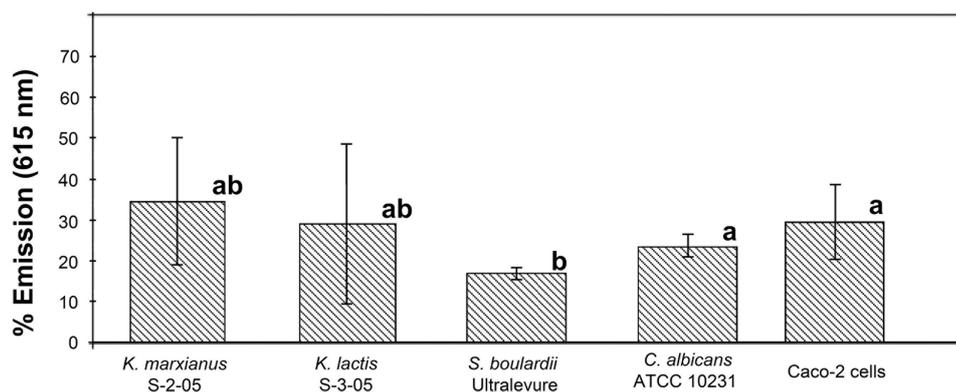
287 10231, which displayed different statistical data (Fig. 3). Furthermore, these assays
 288 discarded any cytotoxicity effect associated with yeast strains on Caco-2 cells (Fig. 4). It
 289 should be noted that iodure propidium interacts only with dead cells, so the emission
 290 percentage increased consequently with the number of dead cells. Thus, the probiotic
 291 *S. boulardii* displayed an increase in cell viability rather than a decrease.
 292



293

294 Fig. 3. Adhesion of yeast cells to Caco-2 intestinal adenocarcinoma cells, after 4 h of contact. Values (\pm SD)
 295 are means of at least three independent experiments. Letter corresponds to statistical groups of similarity
 296 made using ANOVA and Games-Howell analysis.

297



298

299 Fig. 4. Cytotoxicity of yeast cells on Caco-2 intestinal adenocarcinoma cells, after 24 h of contact using a
 300 ratio of 1:4 Caco-2/yeast cells. Values (\pm SD) are means of at least three independent experiments. Letter
 301 corresponds to statistical groups of similarity gathered from ANOVA and Games-Howell analyses.

302 **4. Discussion**

303 Production of antimicrobial substances is of major importance when confronted with
304 bacterial resistance to antibiotics [2-4]. Antagonism is a key criterion for selection of
305 probiotic strains. Microorganisms expected to be used as probiotics, and especially LAB,
306 are well known to produce a cocktail of antimicrobial substances, among them bacteriocins
307 [29]. Nevertheless, yeasts may also be sources of antimicrobial agents [30-32]. Here we
308 have corroborated the antagonistic properties of *K. marxianus* S-2-05 and *K. lactis* S-3-05
309 against diverse bacteria and the human pathogen fungus *C. albicans* [22]. These
310 *Kluyveromyces* species, whose genetic relatedness was established [33,34], are expected to
311 play a determinant role in biotechnology, food safety and probiotic use. Here we show that
312 *K. marxianus* S-2-05 and *K. lactis* S-3-05 are able to inhibit *Salmonella* spp. strains. It is
313 noteworthy that inhibition of *S. ser. Typhimurium*, by *K. marxianus* S-2-05 induced
314 downregulation of the chromosomal *sopD* gene, which is involved in epithelial cell
315 invasion [36]. To the best of our knowledge, this the first report showing a link between an
316 antagonistic yeast strain and gene expression of *S. ser. Typhimurium*, a primary enteric
317 pathogen infecting both humans and animals.

318 Moreover, these non-*Saccharomyces* yeasts were not toxic for intestinal Caco-2 cells
319 after 24 h of joint incubation. *K. marxianus* strains were reported to modulate the immune
320 response in Caco-2 [35] and to exert inhibition of the I-converting enzyme [16].

321 As reported by Smith et al. [15], *K. marxianus* and *Metschnikowia gruessii* were able to
322 repair *Salmonella* induced epithelial cell barrier disruption. On the other hand, França et al.
323 [14] revealed the ability of *Pichia pastoris* X-33 to inhibit *S. ser. Typhimurium* and to
324 hamper adhesion of this pathogen to HCT-116 intestinal cells. The process of adhesion to
325 intestinal cells can be mediated by extracellular polysaccharide (EPS) production and
326 temperature [36,37]. It was shown that the intestinal mucus is mainly composed of MUC2

327 mucin, which forms an aqueous gel [38]. The acidic properties of mucin [38], coupled with
328 the basic properties of *K. marxianus* S-2-05 and *K. lactis* S-3-05, could lead to ionic
329 interactions and therefore to adhesion. The adhesion capacities of *K. marxianus* S-2-05 and
330 *K. lactis* S-3-05 are similar to those of *S. boulardii*, *Kluyveromyces* strains and *C. albicans*
331 ATCC 10231. Moreover, *S. boulardii* showed a highly hydrophilic profile, while a strong
332 basic profile was observed for the *Kluyveromyces* antagonistic strains.

333 *K. lactis* S-3-05 and *K. marxianus* S-2-05 also possess a remarkable capacity to survive
334 in vitro gastrointestinal conditions, which are usually used for probiotic screening.
335 Remarkably, the potential of *K. marxianus* to defy bile salts was observed in vitro and
336 confirmed in mice [39]. The data obtained here are encouraging, and future efforts aimed
337 at confirming the observed effects should be performed *in vivo* to drive novel probiotic
338 claims.

339 Conversely to *C. albicans*, which is a biofilm-forming microbe [40], *K. lactis* S-3-05
340 and *K. marxianus* S-2-05, but also *S. boulardii*, displayed a weak level of biofilm
341 formation attributable to their highly hydrophilic cell surfaces. Our data differ from those
342 reported by Brugnoli et al. [41] regarding biofilm formation by *K. marxianus* strains.
343 Indeed, biofilm formation seems to be exerted in a strain-dependent manner.

344 A weak drop in cell counts was registered during in vitro gastro-intestinal digestion for
345 *K. lactis* S-3-05, *K. marxianus* S-2-05 and *C. albicans* ATCC 10231, but not for
346 *S. boulardii*. Nonetheless, survival of *K. lactis* S-3-05 and *K. marxianus* S-2-05 was in
347 good agreement with that of *K. marxianus* B0399 [35].

348 In addition to examining anti-*Salmonella* activity and downregulation of *sopD* gene
349 expression, this study provides additional evidence for the probiotic properties of *K. lactis*
350 S-3-05 and *K. marxianus* S-2-05 isolated from a traditional French cheese.

351
352

353 **Acknowledgements**

354 This work was supported by Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la
355 Recherche (France). The authors are indebted to Dr. Benoît Cudennec and Cyril Raveschot
356 for their assistance in the cell culture experiments, and to Mr. Pierre Lesur for his
357 assistance in biofilm experiments.

358

359 **References**

- 360 [1] Carlet J, Mainardi J-L. Antibacterial agents: back to the future? Can we live with only
361 colistin, co-trimoxazole and fosfomycin? Clin Microbiol Infect 2012;18:1e3.
362 <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03702.x>.
- 363 [2] Allen HK, Trachsel J, Looft T, Casey TA. Finding alternatives to antibiotics: finding
364 alternatives to antibiotics. Ann N Y Acad Sci 2014;1323:91e100.
365 <http://dx.doi.org/10.1111/nyas.12468>.
- 366 [3] Cheng G, Hao H, Xie S, Wang X, Dai M, Huang L, et al. Antibiotic alternatives: the
367 substitution of antibiotics in animal husbandry? Front Microbiol 2014;5.
368 <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2014.00217>.
- 369 [4] Rios AC, Moutinho CG, Pinto FC, Del Fiol FS, Jozala A, Chaud MV, et al. Alternatives to
370 overcoming bacterial resistances: state-of-the-art. Microbiol Res 2016;191:51e80.
371 <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2016.04.008>.
- 372 [5] FAO/WHO. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Food and Agriculture
373 Organization of the United Nations and World Health Organization Working Group
374 Report; 2002.
- 375 [6] Wassenaar TM. Insights from 100 years of research with probiotic *E. coli*. Eur J Microbiol
376 Immunol 2016;6:147e61. <http://dx.doi.org/10.1556/1886.2016.00029>.

- 377 [7] Goldstein EJC, Johnson SJ, Maziade P-J, Evans CT, Sniffen JC, Millette M, et al.
378 Probiotics and prevention of *Clostridium difficile* infection. *Anaerobe* 2016.
379 <http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2016.12.007>.
- 380 [8] Spinler JK, Ross CL, Savidge TC. Probiotics as adjunctive therapy for preventing
381 *Clostridium difficile* infection e what are we waiting for? *Anaerobe* 2016;41:51e7.
382 <http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2016.05.007>.
- 383 [9] Elzouki A-N. Probiotics and liver disease: where are we now and where are we going? *J Clin*
384 *Gastroenterol* 2016;50:S188e90. <http://dx.doi.org/10.1097/MCG.0000000000000712>.
- 385 [10] Park YH, Hamidon F, Rajangan C, Soh KP, Gan CY, Lim TS, et al. Application of
386 probiotics for the production of safe and high-quality poultry meat. *Korean J Food Sci*
387 *Anim Resour* 2016;36:567e76. <http://dx.doi.org/10.5851/kosfa.2016.36.5.567>.
- 388 [11] Foligné B, Daniel C, Pot B. Probiotics from research to market: the possibilities, risks and
389 challenges. *Curr Opin Microbiol* 2013;16:284e92. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2013.06.008>.
- 390 [12] Arslan S, Erbas M, Tontul I, Topuz A. Microencapsulation of probiotic *Saccharomyces*
391 *cerevisiae* var. *boulardii* with different wall materials by spray drying. *LWT Food Sci*
392 *Technol* 2015;63:685e90. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2015.03.034>.
- 393 [13] Tanriover MD, Aksoy DY, Unal S. Use of probiotics in various diseases: evidence and
394 promises. *Pol Arch Med Wewn* 2012;122(Suppl 1):72e7.
- 395 [14] França RC, Conceição FR, Mendonça M, Haubert L, Sabadin G, de Oliveira PD, et al.
396 *Pichia pastoris* X-33 has probiotic properties with remarkable antibacterial activity
397 against *Salmonella* Typhimurium. *Appl Microbiol Biotechnol* 2015;99:7953e61.
398 <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-015-6696-9>.
- 399 [15] Smith IM, Baker A, Arneborg N, Jespersen L. Non-*Saccharomyces* yeasts protect against
400 epithelial cell barrier disruption induced by *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar
401 Typhimurium. *Lett Appl Microbiol* 2015;61:491e7. <http://dx.doi.org/10.1111/lam.12481>.

- 402 [16] Li Y, Sadiq FA, Liu T, Chen J, He G. Purification and identification of novel peptides
403 with inhibitory effect against angiotensin I-converting enzyme and optimization of
404 process conditions in milk fermented with the yeast *Kluyveromyces marxianus*. J Funct
405 Foods 2015;16:278e88. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2015.04.043>.
- 406 [17] Lee YK. What could probiotic do for us? Food Sci Hum Wellness 2014; 3:47e50.
407 <http://dx.doi.org/10.1016/j.fshw.2014.06.001>.
- 408 [18] Serce O, Benzer D, Gursoy T, Karatekin G, Ovali F. Efficacy of *Saccharomyces boulardii* on
409 necrotizing enterocolitis or sepsis in very low birth weight infants: a randomised controlled
410 trial. Early Hum Dev 2013;89:1033e6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2013.08.013>.
- 411 [19] Silva T, Reto M, Sol M, Peito A, Peres CM, Peres C, et al. Characterization of yeasts
412 from Portuguese brined olives, with a focus on their potentially probiotic behavior. LWT
413 Food Sci Technol 2011;44:1349e54. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2011.01.029>.
- 414 [20] de Melo Pereira GV, Beux M, Pagnoncelli MGB, Soccol VT, Rodrigues C, Soccol CR.
415 Isolation, selection and evaluation of antagonistic yeasts and lactic acid bacteria against
416 ochratoxigenic fungus *Aspergillus westerdijkiae* on coffee beans. Lett Appl Microbiol
417 2016;62:96e101. <http://dx.doi.org/10.1111/lam.12520>.
- 418 [21] Ait-Seddik H, Ceugniez A, Bendali F, Cudennec B, Drider D. Yeasts isolated from
419 Algerian infants's feces revealed a burden of *Candida albicans* species, non-albicans
420 *Candida* species and *Saccharomyces cerevisiae*. Arch Microbiol 2016;198:71e81.
421 <http://dx.doi.org/10.1007/s00203-015-1152-x>.
- 422 [22] Ceugniez A, Drider D, Jacques P, Coucheney F. Yeast diversity in a traditional French
423 cheese “Tomme d’orchies” reveals infrequent and frequent species with associated
424 benefits. Food Microbiol 2015;52: 177e84. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2015.08.001>.

- 425 [23] Guri A, Paligot M, Crf evecoeur S, Piedboeuf B, Claes J, Daube G, et al. *In vitro*
426 screening of mare's milk antimicrobial effect and antiproliferative activity. *FEMS*
427 *Microbiol Lett* 2016;363. <http://dx.doi.org/10.1093/femsle/fnv234>. fnv234.
- 428 [24] Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in realtime RT-PCR.
429 *Nucleic Acids Res* 2001;29:45e45. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>.
- 430 [25] O'Toole GA, Kolter R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens*
431 WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol*
432 *Microbiol* 1998;28:449e61.
- 433 [26] Bellon-FontaineM-N, Rault J, vanOssCJ. Microbial adhesion to solvents: a novel method
434 to determine the electron-donor/electron-acceptor or Lewis acid-base properties of
435 microbial cells. *Colloids Surf B Biointerfaces* 1996; 7:47e53.
436 [http://dx.doi.org/10.1016/0927-7765\(96\)01272-6](http://dx.doi.org/10.1016/0927-7765(96)01272-6).
- 437 [27] Cudenec B, Balti R, Ravallec R, Caron J, Bougatef A, Dhulster P, et al. *In vitro*
438 evidence for gut hormone stimulation release and dipeptidylpeptidase IV inhibitory
439 activity of protein hydrolysate obtained from cuttlefish (*Sepia officinalis*) viscera. *Food*
440 *Res Int* 2015;78:238e45. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2015.10.003>.
- 441 [28] Messaoudi S, Manai M, Kergourlay G, Prf evost H, Connil N, Chobert J-M, et al.
442 *Lactobacillus salivarius*: bacteriocin and probiotic activity. *Food Microbiol*
443 2013;36:296e304. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2013.05.010>.
- 444 [29] Drider D, Rebuffat S, editors. Prokaryotic antimicrobial peptides. New York, NY:
445 Springer New York; 2011.
- 446 [30] Hatoum R, Labrie S, Fliss I. Antimicrobial and probiotic properties of yeasts: from fundamental
447 to novel applications. *Front Microbiol* 2012;3:421. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2012.00421>.

- 448 [31] Hatoum R, Labrie S, Fliss I. Identification and partial characterization of antilisterial
449 compounds produced by dairy yeasts. *Probiotics Antimicrob Proteins* 2013;5:8e17.
450 <http://dx.doi.org/10.1007/s12602-012-9109-8>.
- 451 [32] Kumura H, Tanoue Y, Tsukahara M, Tanaka T, Shimazaki K. Screening of dairy yeast strains
452 for probiotic applications. *J Dairy Sci* 2004;87: 4050e6. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022->
453 0302(04)73546-8.
- 454 [33] Lachance M-A. *Kluyveromyces van der Walt*. In: Fell JW, Boekhout T, editors. *The*
455 *yeasts*. 5th ed. London: Elsevier; 1971e2011. p. 471e81.
- 456 [34] Lane MM, Morrissey JP. *Kluyveromyces marxianus*: a yeast emerging from its sister's
457 shadow. *Fungal Biol Rev* 2010;24:17e26. [http:// dx.doi.org/10.1016/j.fbr.2010.01.001](http://dx.doi.org/10.1016/j.fbr.2010.01.001).
- 458 [35] Maccaferri S, Klinder A, Brigidi P, Cavina P, Costabile A. Potential probiotic
459 *Kluyveromyces marxianus* B0399 modulates the immune response in Caco-2 cells and
460 peripheral blood mononuclear cells and impacts the human gut microbiota in an in vitro
461 colonic model system. *Appl Environ Microbiol* 2012;78:956e64.
462 <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.06385-11>.
- 463 [36] Chae MS, Schraft H, Truelstrup Hansen L, Mackereth R. Effects of physicochemical
464 surface characteristics of *Listeria monocytogenes* strains on attachment to glass. *Food*
465 *Microbiol* 2006;23:250e9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2005.04.004>.
- 466 [37] Zeraik AE, Nitschke M. Influence of growth media and temperature on bacterial
467 adhesion to polystyrene surfaces. *Braz Arch Biol Technol* 2012; 55:569e76.
468 <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-89132012000400012>.
- 469 [38] Johansson MEV, Ambort D, Pelaseyed T, Schu'tte A, Gustafsson JK, Ermund A, et al.
470 Composition and functional role of the mucus layers in the intestine. *Cell Mol Life Sci*
471 2011;68:3635e41. <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-011-0822-3>.

- 472 [39] Diosma G, Romanin DE, Rey-Burusco MF, Londero A, Garrote GL. Yeasts from kefir
473 grains: isolation, identification, and probiotic characterization. *World J Microbiol*
474 *Biotechnol* 2014;30:43e53. <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-013-1419-9>.
- 475 [40] Gulati M, Nobile CJ. *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular
476 mechanisms. *Microbes Infect* 2016;18:310e21. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2016.01.002>.
- 477 [41] Brugnoli LI, Lozano JE, Cubitto MA. Potential of yeast isolated from apple juice to
478 adhere to stainless steel surfaces in the apple juice processing industry. *Food Res Int*
479 2007;40:332e40. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2006.10.003>.

Publication 5

Étude de de l'activité anti-oxydante et de l'interaction entre
K. marxianus S-2-05 et *Bacteroides thetaiotaomicron*

Résumé de la publication

Bacteroides thetaiotaomicron est une bactérie connue pour présenter des effets anti-inflammatoires en conditions proches du milieu intestinal, anaérobie. L'étude suivante a pour but de définir si des interactions entre *B. thetaiotaomicron* avec *K. marxianus* S-2-05 pourraient augmenter les propriétés anti-oxydantes. L'étude de l'interaction sera précédée d'une étude des capacités de *K. marxianus* à survivre et à croître en milieu anaérobie, nécessaire à *B. thetaiotaomicron*. La souche de *K. marxianus* S-2-05 est apte à survivre en milieu anaérobie et la co-culture avec *B. thetaiotaomicron* ne lui est pas délétère. L'extraction en milieu détergent des protéines présentes dans les cultures de *B. thetaiotaomicron* seul, de *K. marxianus* seul et de leur co-culture a permis d'obtenir des concentrations en protéines similaires. L'étude du potentiel anti-oxydant est effectuée avec ces extraits protéiques, sur des agents réactifs de l'oxygène (ROS), les anions superoxydes et le peroxyde d'hydrogène, dosés à l'aide de peroxydase. La co-culture de *Bacteroides* et de *Kluyveromyces* permet d'observer une amélioration de l'activité anti-oxydante, en particulier face au peroxyde d'hydrogène. De manière très intéressante, l'extrait issu de la culture de *K. marxianus* S-2-05 seul a un effet anti-oxydant très puissant, avec une inhibition de 50 % des ROS testées dès 25 µL d'extrait par millilitre. Cette forte activité pourrait être expliquée par la présence d'une superoxyde dismutase, déjà identifiée chez *K. marxianus*, ou de protéines contenant des groupements thiols. La souche de référence *K. marxianus* MUCL 29917 montre également un pouvoir anti-oxydant, moindre que celui visible chez *K. marxianus* issu de la Tomme d'Orchies.

Ces différents résultats permettent de voir l'espèce *K. marxianus* comme un bon candidat pour moduler ou stopper les cascades oxydo-inflammatoires, notamment pour une utilisation dans les maladies chroniques inflammatoires de l'intestin. La souche de *K. marxianus* serait donc un bon candidat probiotique, supplémenté d'une propriété anti-oxydante, intéressante pour des applications préventives, voire thérapeutiques.

1 **Interactions between *Kluyveromyces marxianus* from cheese origin and**
2 **the intestinal symbiont *Bacteroides thetaiotaomicron*: Impressive**
3 **antioxidative effects**

4
5 Alexandre Ceugniet, Mélissa Tourret, Elodie Dussert, Françoise Coucheney, Barbara
6 Deracinois, Philippe Jacques, Christophe Flahaut, Egon Heuson, Djamel Drider^{***}, Josette
7 Behra-Miellet^{*}

8
9 Univ. Lille, INRA, Univ. Artois, Univ. Littoral Côte d'Opale, EA 7394 – ICV - Institut
10 Charles Viollette, F-59000 Lille, France

11

12 **Corresponding author:** djamel.drider@univ-lille1.fr (D. Drider), Josette.behra@univ-
13 lille2.fr (J. Behra-Miellet)

14

15 **Highlights:**

- 16 • An impressive antioxidant power of the yeast *Kluyveromyce marxianus* was found.
17 • *Bacteroides thetaiotaomicron* was used as a model of intestine bacterial anaerobe.
18 • The release of antioxidant compounds by this symbiont depends on its environment.
19 • Co-incubating both microorganisms benefited the bacterial population.
20 • Together, they produced more antioxidant extracts than did the single bacteria.

21

Abstract

The effects of yeast *Kluyveromyces marxianus* S-2-05, of cheese origin, were assessed on the intestine anaerobe symbiont *Bacteroides thetaiotaomicron* ATCC 29741 to unveil any changes in its antioxidant properties. To this end, these microorganisms were grown and incubated either separately, or coincubated, under anaerobic atmosphere. Afterwards, the microbial cells were recovered and washed, and extracts were prepared using a sterile detergent solution to mimic the intestine detergent content. The extracts prepared from *K. marxianus* S-2-05 and reference strain *K. marxianus* MUCL 29917, grown under different conditions, were assessed for their antioxidant properties against superoxide anion and hydrogen peroxide. Extracts from both yeasts showed antioxidative effects, which were particularly important for *K. marxianus* S-02-5 after anaerobic incubation. Moreover, *K. marxianus* S-02-5 displayed a high level of activity against the aforementioned reactive oxygen species, enhancing that of *B. thetaiotaomicron* ATCC 29741, after the co-incubation process. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis was used to separate the proteins extracted. Superoxide dismutase, thiol peroxidase, rubrerythrin -intensively produced by *B. thetaiotaomicron* induced by the yeast-were identified by mass spectrometry. The antioxidative potential evidenced for *K. marxianus* S-02-5 is another advantage which could justify the utilization of this strain as a probiotic for countering intestinal inflammatory processes.

Keywords: *Kluyveromyces marxianus*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, Anaerobic, Antioxidant, Probiotic

Abbreviations: SOD, Superoxide dismutase; GR, glutathione reductase; ROS, reactive oxygen species; GYE, mediumglucose-yeast medium, aliquots of the extracts from both yeasts obtained after culture in broth (“*K. marxianus* S-02-5 liq” and “*K. marxianus* MUCL 29917 liq”, respectively), aliquots of the extracts from both yeasts obtained after aerobic culture on agar medium (“*K. marxianus* S-02-5 surf” and “*K. marxianus* MUCL 29917 surf”, respectively); TER, transepithelial electrical resistance; ACN, acetonitrile; DW, distilled water; TFA, Trifluoroacetic acid.

50 1. Introduction

51 *Bacteroides thetaiotaomicron* can be considered as a model of anaerobic bacterium, a
52 Gram-negative bacillus symbiont highly adaptable to its environment (Xu & Gordon, 2003), and
53 belonging to the predominant intestinal microbiota which is mainly composed of anaerobes.
54 While this bacterium was well known before the 2000s as an opportunistic pathogen with an
55 alarming profile of antibiotic resistance, a novel vision was then born after 2004 indicating that
56 *B. thetaiotaomicron* could have beneficial attributes for humans (Kelly et al., 2004). For the
57 treatment of severe colitis or Crohn's disease, fecal microbiota transplantation is the infusion of
58 liquid filtrate feces from a healthy donor (who is negative to a screening panel of laboratory
59 exams) into the gut and *B. thetaiotaomicron* is a part of stool or fecal microbiota transferred to
60 patients (Cammarota et al., 2015; Petrof & Khoruts, 2014). This bacterium has also received
61 Orphan Designation for paediatric Crohn's disease by the US Food and Drug Administration
62 (2013). Previously, we established that under defined conditions, *B. thetaiotaomicron* displayed
63 antioxidant and anti-inflammatory properties and antioxidant enzyme/proteins, chaperonin
64 proteins produced by this bacterium were identified (Hochart-Behra, Drobecq, Turret, Dubreuil,
65 & Behra-Miellet, 2014; Hochart-Behra et al., 2008). To gain more insights, we investigated the
66 interactions between *B. thetaiotaomicron* ATCC 29741 and *Kluyveromyces marxianus* S-02-5
67 recently isolated from cheese and characterized for its beneficial attributes (Ceugniez, Drider,
68 Jacques, & Coucheney, 2015). Here we established that co-incubation of *B. thetaiotaomicron*
69 ATCC 29741 with *Kluyveromyces marxianus* S-02-5 could either retain or enhance its
70 antioxidant potential. The antioxidative properties of yeasts were reported to induce microbial
71 production of SOD (Dellomonaco et al., 2007). *K. marxianus* species were previously found to
72 enhance superoxide dismutase (SOD) and glutathione reductase (GR) when they were exposed
73 to hydrogen peroxide (Pinheiro, Belo, & Mota, 2002), delineating their antioxidative properties.
74 In direct line, Maccaferri et al. (Maccaferri, Klinder, Brigidi, Cavina, & Costabile, 2012).
75 reported the capacities of *K. marxianus* B0399 to diminish the levels of production of
76 proinflammatory cytokines in PBMCs and Caco-2 cells, caused by stimulation with

77 lipopolysaccharide.

78 The present work aimed at studying, under anaerobic conditions, the interactions between
79 *B. thetaiotaomicron* ATCC 29741 and *K. marxianus* S-02-5. To this end, they were placed into a
80 mild detergent mixture containing a cholic acid derivative preserving viability, in order to detect
81 if these microorganisms are able to reject antioxidant elements from their surface at a higher
82 level than previously described for *B. thetaiotaomicron* grown alone (Hochart-Behra et al., 2008,
83 2014). The activities against superoxide anion and hydrogen peroxide were measured in vitro.
84 These reactive oxygen species (ROS) are the first described in the oxidative cascade of
85 phagocytes (Hochart-Behra et al., 2008, 2014). Two-dimensional (2D) gels and matrix-assisted
86 laser desorption ionization time of flight e Time of flight (MALDI TOF/TOF) were used to
87 separate and identify any antioxidant enzymes/proteins in the compounds secreted both
88 microorganisms.

89

90 **2. Materials and methods**

91 *2.1. Strains and growth conditions*

92 *B. thetaiotaomicron* strain ATCC 29741 (American Type Cultured Collection) and *K.*
93 *marxianus* strain S-02-5 recently isolated from cheese (Ceugniez et al., 2015), stored at -32 °C,
94 were revitalized and pre-cultured in/on suitable broth or agar medium before any experiment.
95 *B. thetaiotaomicron* ATCC 29741 was grown on anaerobe broth (DIFCO, BD Dickinson, Le
96 Pont de Claix, France), and yeasts *K. marxianus* strain S-02-5 and *K. marxianus* MUCL 29917,
97 used as reference strain, were grown on GYE (glucose-yeast) agar medium (2% Glucose, 0.5%
98 yeast extract, 1.5% Agar). Preliminary growth of *B. thetaiotaomicron* ATCC 29741 and yeasts
99 were observed after a three-day incubation in anaerobic jars (AnaeroGen, Oxoid, Basingstoke,
100 Hampshire, England), at 35-36 °C and aerobically at 30 °C for *B. thetaiotaomicron* ATCC 29741
101 and *K. marxianus* S-02-5, respectively.

102

103

104 2.2. Interactions inter-species: *B. thetaiotaomicron* ATCC 29741 vs. *K. marxianus* S-02-5

105 After a preliminary growth, *B. thetaiotaomicron* ATCC 29741 and *K. marxianus* S-02-5 were
106 cultured separately or co-cultured anaerobically at 35-36 °C for two days in pre-reduced Brucella
107 broth (DIFCO) supplemented with K3 vitamin (1 mg/L) (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France),
108 suitable for *Bacteroides*. For *K. marxianus* S-02-5, the moistened yeast equivalent to 400 mg of the
109 dried microorganism (determined by drying the strains for 2.5 h using a SpeedVac) (LabConco
110 Corporation, Kansas City, USA), was inoculated into the growth medium. Counts before and after
111 *B. thetaiotaomicron* ATCC 29741 and *K. marxianus* S-02-5 together, were performed. After three-
112 days co-culture of both strains together in a growth medium, the broth containing strains was
113 transferred into pre-sterile centrifuge tubes, and tubes were centrifuged at 10,000 g for 13 min at 4
114 °C. The supernatant was decanted off and the pellet cells were washed and diluted in
115 Ringer ¼ medium (Oxoid, Hampshire, England). The spreading of the suitably diluted cells was
116 done on Brucella agar surface (enriched with K3 vitamin and haemin at the concentrations of 1 and 5
117 mg/L, respectively) to assess the viability and/or growth of microorganisms after co-culture. The
118 same process was applied to *B. thetaiotaomicron* ATCC 29741 and *K. marxianus* S-02-5 grown
119 concomitantly and separately, in the same conditions as for their co-culture. After centrifugation,
120 followed by three successive washes in Ringer medium ¼, the pellets of pure *B. thetaiotaomicron*
121 ATCC 29741 and of pure *K. marxianus* S-02-5 and of *B. thetaiotaomicron* ATCC 29741 co-
122 culturing with *K. marxianus* S-02-5 were placed in agitation in mild detergent solution containing 7
123 mM 3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1 propanesulfonate, 0.5 mM tris(hydroxymethyl)
124 aminomethane hydrochloride at pH 6.8 (Serva, Heidelberg, Germany) - a cholic acid derivative -
125 overnight at 4 °C, as previously described for *B. thetaiotaomicron* (Hochart-Behra et al., 2008, 2014)
126 at a rate of 4 ml of extraction solution per g of microorganisms. The suspensions were centrifuged
127 and the supernatant was filtered 0.22 µm (Millipore corporation, Bedford, MA, USA), and assayed
128 for protein content (Hochart-Behra et al., 2008). The extracts were supposed to contain antioxidant
129 compounds released from the surface of microorganisms. Counts were also performed before and
130 after extraction in order to assess the viability of *B. thetaiotaomicron* ATCC 29741 and *K. marxianus*
131 S-02-5. The in vitro pharmacological assays were then carried out as noted below.

132 *2.3. Comparison of intra yeast species: K. marxianus S-02-5 vs. K. marxianus MUCL 29917*

133 After the preliminary growth, both yeast strains *K. marxianus* S-02-5 and *K. marxianus*
134 MUCL 29917 were separately incubated in the pre-reduced Brucella broth as mentioned above,
135 under anaerobic atmosphere, before proceeding with the extraction of elements secreted at the
136 surface of the yeasts, using the method described above. The same extraction procedure was
137 performed on both yeast strains collected from GYE agar after an aerobic two-day incubation.
138 The aliquots of the extracts from both yeasts were named “*K. marxianus* S-02-5 liq” and
139 “*K. marxianus* MUCL 29917 liq” (after culture in broth), “*K. marxianus* S-02-5 surf” and
140 “*K. marxianus* MUCL 29917 surf” (after aerobic culture on agar medium). Protein extracts were
141 assayed using the Folin and Lowry method (Lowry, Rosebrough, Farr, & Randall, 1951).

142

143 *2.4. Pharmacological in vitro assays*

144 A superoxide anion produced using a cell-free model and hydrogen peroxide (Sigma)
145 was placed into a reaction mixture at a concentration of about 10 nmol/ml. Both ROS were in
146 contact with increasing concentrations of the different extracts to study their inhibitory effect
147 on ROS. Measurements of O_2^- superoxide anion and H_2O_2 were made by spectrophotometry,
148 according to Aruoma et al. (Aruoma, Halliwell, Hoey, & Butler, 1989), and using methods
149 largely tested and adapted to prevent interference (e.g., with peroxidases) (Leavey et al., 2002).

150

151 *2.5. Statistical analysis*

152 To study the variations between the populations of *B. thetaiotaomicron* ATCC 29741 and
153 *K. marxianus* S-02-5 and *K. marxianus* MUCL 29917 during co-culture and extraction, the
154 non-parametric sign-test was used at the 5% level ($n = 5$ independent experiments) and the Mann and
155 Withney test was used at the 5% level, in case of small non-paired samples (Anastat). For
156 pharmacological in vitro assays, the data was analysed from five independent assays using the
157 Kruskal & Wallis test at the 5% level ($p = 0.05$) (Anastat). Results were presented as box-plots where
158 the extremities of the lowest and the highest bars represent the 10th and 90th percentiles of
159 percentages for each extract concentration. The 25th, 50th and 75th percentiles correspond to the
160 inferior, interior and superior horizontal bars of the boxes constructed for each extract concentration.

6

161 *2.6. Proteomic analysis*

162 The extracts (all at a volume equivalent to 500 mg proteins secreted by *K. marxianus* S-02-5)
163 were desalted, re-solubilized, lyophilized and the protein separation performed in gels as
164 previously described for 2D PAGE (Hochart-Behra et al., 2014). Proteins were loaded on precast
165 immobilized pH 3e10 gradient ReadyStrip (17 cm, BioRad) and isoelectric focusing (IEF) was
166 performed in the BioRad Protean IEF cell system. Vertical gels with 4-20% acrylamide (BioRad)
167 gradient (non-denaturing gels) were performed for SDS PAGE. Separate proteins in the gels
168 were then stained (colloidal Coomassie blue) fixed and washed. Gel images were acquired using
169 a GS800 densitometer (BioRad). PDQuest software (BioRad) was used to analyze the protein
170 profile of the 2D-gels of pH 3-10 gradient. Protein spots of interest were excised and prepared to
171 perform protein identification by peptide mass finger printing technique using MALDI
172 TOF/TOF mass spectrometer. They were in gel trypsin-digested according a method adapted
173 from that of Shevchenko et al. (Shevchenko, Wilm, Vorm, & Mann, 1996). Protein spots were
174 first discolored [20 mM ammonium bicarbonate (Prolabo, Fontenay-Sous-Bois, France), 50%
175 (vol/vol) acetonitrile (ACN, Carlo Erba Reagents) in distilled water (DW) solution], dried by
176 rotary evaporation (miVac QUATTRO concentrator, Genevac®, Ipswich, England). Then
177 reduction for 45 min at 56 °C [20 mM ammonium bicarbonate, 10 mM 1,4-dithiothreitol in DW
178 solution (Sigma)], removal of supernatants and alkylation for 45 min at 20 ° in the dark [20 mM
179 ammonium bicarbonate, 55 mM iodoacetamide (Sigma)] were performed. After removal of
180 supernatants, washing of the gels with acetonitrile and drying by rotary evaporation, the trypsin
181 digest was then made using a 12,5 mg.L⁻¹ trypsin solution (Trypsin/Lys-C Mix, Promega,
182 Madison, WI). The peptides were extracted from protein spots with 50% ACN, 50% ammonium
183 bicarbonate in DW (vol/vol) solution and finally with a solution of 0.5% formic acid in ACN.
184 The supernatants were pooled before being concentrated and desalted on a ZipTip μ-C18®
185 column (Millipore). The peptides were eluted by an 80% ACN, 0.1% trifluoroacetic acid (TFA)
186 (vol/vol) solution. Mass analysis was performed with a Bruker Autoflex Speed MALDI
187 TOF/TOF mass spectrometer (Bruker-Franzen Analytik, Bremen, Germany) according

188 Shevchenko et al. (Shevchenko et al., 1996). The MALDI target plate (AnchorChip™) was
189 covered with extracted peptides mixed with α -cyano-4-hydroxy-cinnamic acid matrix (2.8 mg/ml
190 in ACN:TFA, 85:0.1 vol/vol). The molecular mass measurements were performed in automatic
191 mode using FlexControl™ 3.4 software on an Autoflex Speed™ TOF/TOF instrument and in
192 reflectron mode for MALDI-TOF peptide mass fingerprinting (PMF) or LIFT mode for MALDI-
193 TOF/TOF peptide fragmentation fingerprinting (PFF). External calibration over the 1000-3500
194 mass range was performed using the [M+H]⁺ monoisotopic ions of bradykinin 1-7, angiotensin
195 I, angiotensin II, substance P, bombesin and adrenocorticotrophic hormone (clips 1e17 and clips
196 18e39) from a peptide calibration standard kit (Bruker Daltonik). Each spectrum was produced
197 by accumulating data from 1200 laser shots. A maximum of ten precursor ions per sample were
198 chosen for LIFT-TOF/TOF MS/MS analysis. Peak lists were generated from MS and MS/MS
199 spectra using Flexanalysis™ 3.4 software (Bruker Daltonik). Database searches using combined
200 PMF and/or PFF datasets were performed in the UniProt and NCBI nr databases via BioTools 3.2
201 (Bruker Daltonik) [with Mascot 2.2 (Matrix Science Ltd, London, UK)] or PEAKS Studio 7.0
202 (Bioinformatics Solutions) or Profound (taxonomy restricted to Bacteria, Yeast or not restricted).
203 A mass tolerance of 150 ppm and 1 missing cleavage site for PMF and an MS/MS tolerance of
204 0.5 Da and 1 missing cleavage site for MS/MS searching were allowed. Variable cysteine
205 carbamidomethylation and methionine oxidation were also considered. The relevance of protein
206 identities was judged according to their score in the research software (p value of 0.05 (p < 0.05),
207 False Discovery Rate < 1%). Searching was also made with Mascot in the National Center for
208 Biotechnology Information (NCBI), SwissProt and Uniprot databases.

209

210

211 3. Results

212 3.1. The interaction benefited the intestine bacteria and the yeast population was stable

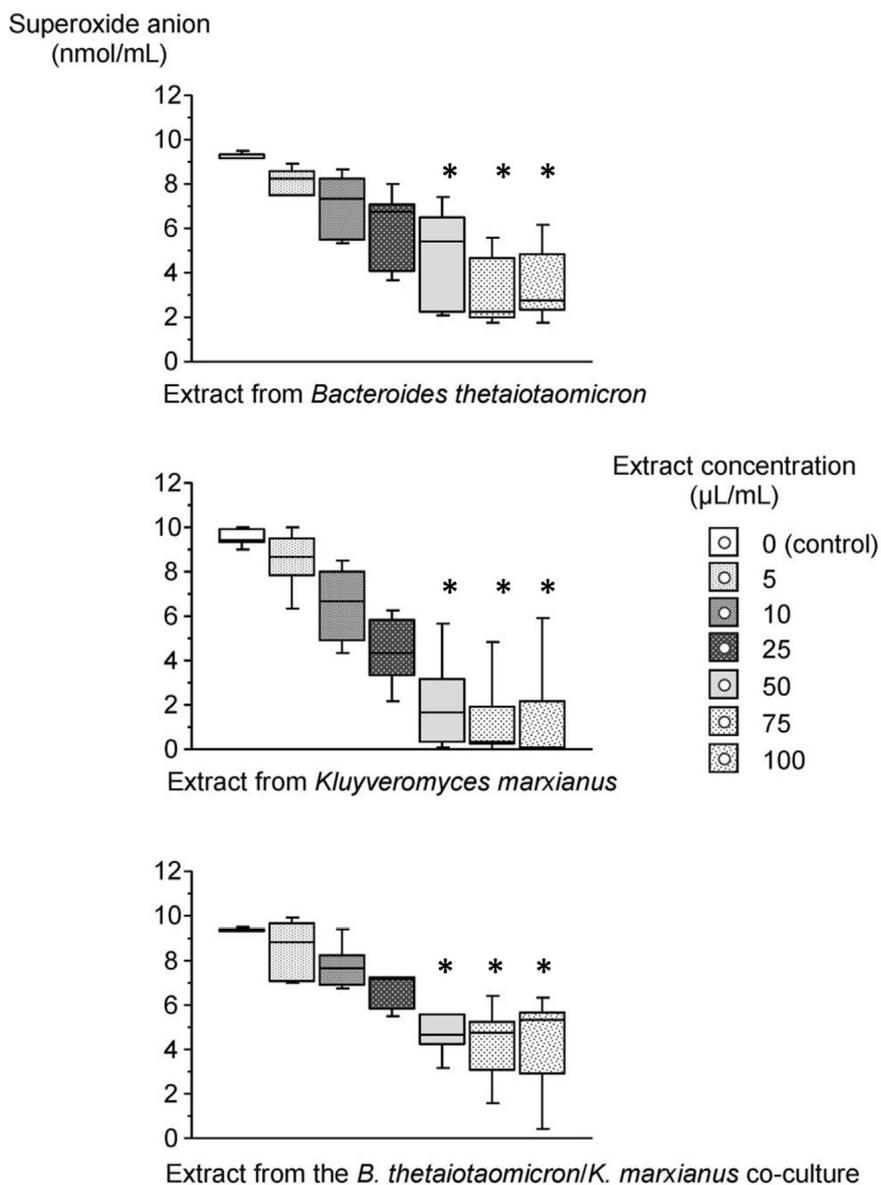
213 As expected, when grown alone under anaerobic conditions, the cell count of
214 *B. thetaiotaomicron* ATCC 29741 increased by about 1 log (CFU/L of culture) ($p = 0.0313$). On
215 the other hand, the yeast cell count remained stable during transit in the anaerobic atmosphere.
216 Means of CFU counts varied from 10.35 ± 0.07 log to 10.22 ± 0.09 log. Nevertheless, during co-
217 incubation, the cell count of *B. thetaiotaomicron* ATCC 29741, expressed in CFU/L of culture,
218 significantly increased by a mean value of about 0.9 log ($p = 0.0313$) whilst that of *K. marxianus*
219 S-02-5 has a drop of about 0.3 log CFU/L of culture. Clearly, *B. thetaiotaomicron* ATCC 29741
220 took advantage of this interaction but the cell counts of yeasts remained stable. During the
221 extraction of the surface elements from these microorganisms, the viabilities of *K. marxianus*
222 S-02-5 and *B. thetaiotaomicron* ATCC 29741 were also stable after single cultures. The counts
223 of these populations, expressed in log CFU per total suspension of microorganisms in solution of
224 extraction, were 10.33 ± 0.27 log before extraction and 11.07 ± 0.27 log after extraction
225 ($p = 0.6875$) for *B. thetaiotaomicron* ATCC 29741; 9.93 ± 0.45 log before extraction and
226 9.81 ± 0.56 log after extraction for *K. marxianus* S-02-5 ($p = 0.1875$). The bacterial population
227 remained stable overall during the extraction after co-culture. Indeed, the counts ranged from
228 10.71 ± 0.81 to 10.96 ± 1.17 log, with p value 0.500, and a small but not statistically significant
229 loss was observed for *K. marxianus* S-02-5, the counts of which ranged from 10.08 ± 0.08 to
230 9.88 ± 0.63 log with p value of 0.1875. Notably, similar protein quantities were found in the
231 extracts (2.94 ± 1.75 , 1.82 ± 0.94 and 1.36 ± 0.42 mg/ml in the extracts related to coculture, to
232 ATCC 29741 grown alone and to *K. marxianus* S-02-5, respectively).

233 As depicted in Figs. 1 and 2, the data of the pharmacological in vitro assays show the
234 effects of the extracts on superoxide anion and hydrogen peroxide, respectively. The
235 antioxidative effect of the extract from the co-culture appeared to be similar against superoxide
236 anion (concentration of inhibition at 50% or IC₅₀ of about 51 ml of extract/ml) and higher
237 against hydrogen peroxide (IC₅₀ of about 31 ml of extract.ml), than the effect of the extract

238 obtained from *B. thetaiotaomicron* ATCC 29741 alone. The IC₅₀ was 51 ml of extract/ml for
239 superoxide anion, and was not reached at the highest concentration of extract tested on hydrogen
240 peroxide. The extract obtained from *K. marxianus* S-02-5 cultured alone inhibited superoxide
241 anion at the concentration of 10 nmol/ml with an IC₅₀ of about 25 ml of extract/ml. IC₅₀ for
242 hydrogen peroxide was obtained at 6 ml of extract/ml.

243 The protein analysis of the *B. thetaiotaomicron* extract revealed the presence of antioxidant
244 or oxidation-reduction enzymes (2D gel and protein identifications available in Supplementary
245 material in Fig. S1 and Tables S5 and S6) such as thiol peroxidase (spots o1 and o2), ferritin
246 (o3), antibiotic biosynthesis monooxygenase (o4). However, superoxide dismutase is not
247 detected in these extracts. As previously described (Hochart-Behra et al., 2008), chaperonin
248 proteins were also found such as chaperone protein DnaK (c1), SCO1/SenC chaperone.
249 Glutamate decarboxylase (s1), is another stress protein previously widely described in our
250 extracts (Hochart-Behra et al., 2008). The other proteins concern the carbohydrate catabolic
251 pathway from Bacteroides (phosphoenolpyruvate carboxykinase in spots p1 and p2,
252 lactate/malate dehydrogenase in spots p5 and p6, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in
253 spots p7, p9 to p11). Tetratricopeptide repeat protein (spot p3), magnesium chelatase, subunit
254 I/ATPase (p4) and glutaminase (in spot p8) were also found.

255 As native 2D-gels were used for protein migration, protein associations could be possible
256 such as dimers (or more associated monomers) and they could migrate at different molecular
257 weights in the gels. With this technique, protein interactions can be visualized and one spot can
258 correspond to several proteins. Conversely, although our method was less denaturing for the
259 proteins migrating in the gels, their breaking in fragments could however occur and appear at a
260 molecular weight lower than expected.

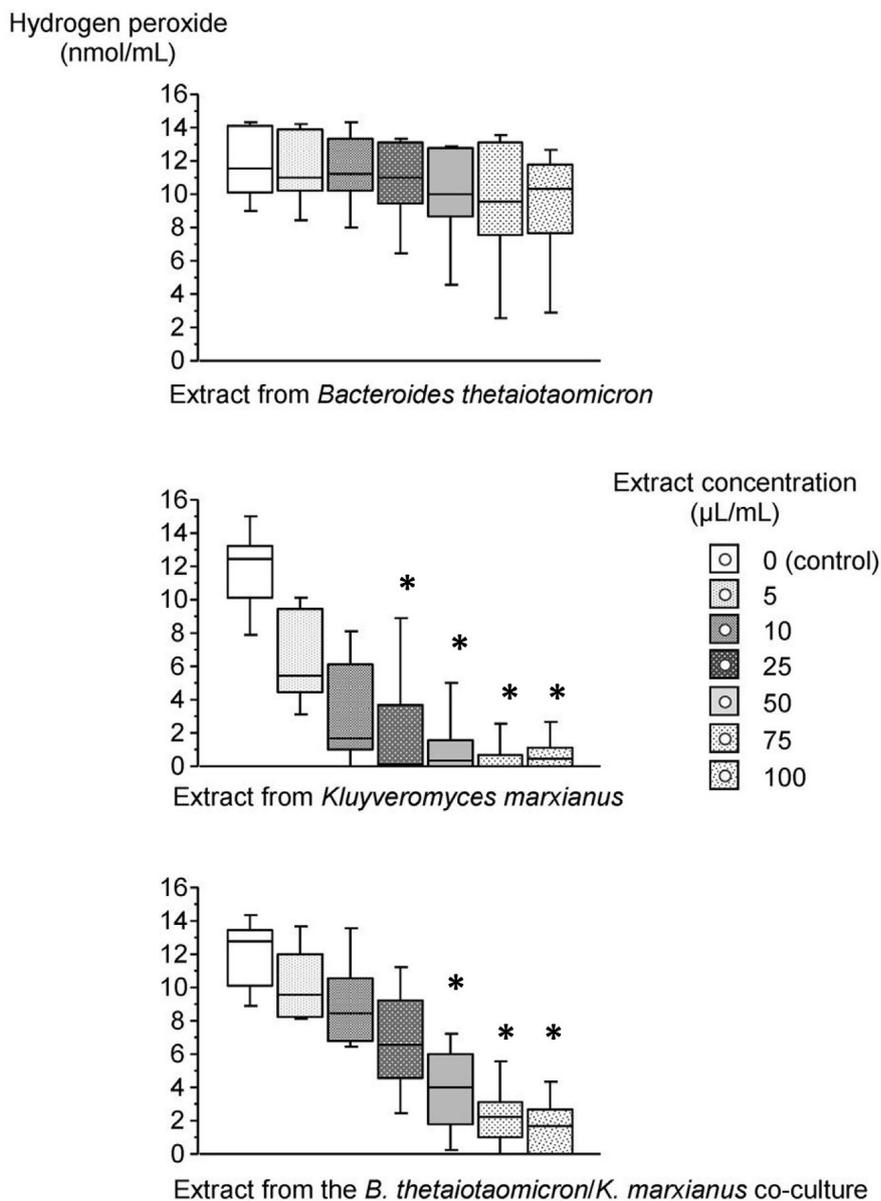


261

262 **Fig. 1. Inhibition of superoxide anion by three types of extracts obtained from single cultures of**
 263 *Bacteroides thetaiotaomicron* ATCC 29741 and *Kluyveromyces marxianus* S-02-5 or after their co-
 264 **culture.** Superoxide anion was *in vitro* produced in a cell-free model using the xanthine-xanthine oxidase
 265 system. The effects of the extracts obtained from *B. thetaiotaomicron* ATCC 29741, *K. marxianus* S-02-5
 266 (isolated from cheese) and both microorganisms co-cultured, were measured on this reactive oxygen species
 267 (* Superoxide anion concentration statistically different from that obtained with the control without extract,
 268 Kruskal & Wallis test, $p = 0.05$, AnaStat, $n = 5$ five independent experiments). Means \pm standard deviations
 269 are available in [Supplementary Material Table S1](#).

270

271



272

273 **Fig. 2. Inhibition of hydrogen peroxide by 3 types of extracts obtained from single cultures of**
 274 ***Bacteroides thetaiotaomicron* and *Kluyveromyces marxianus* S-02-5 or after their co-culture.** Hydrogen
 275 peroxide was in vitro incubated in cell-free model with the extracts obtained from *B. thetaiotaomicron*
 276 ATCC29741, *K. marxianus* S-02-5 from cheese origin and both microorganisms co-cultured. The H₂O₂
 277 inhibition was significant for the extracts obtained from *K. marxianus* after single culture or from both
 278 microorganisms cocultured (* Hydrogen peroxide concentration statistically different from that obtained with
 279 the control without extract, Kruskal & Wallis test, p = 0.05, AnaStat, n = 5 five independent experiments).
 280 Means ± standard deviations are available [Supplementary Material Table S2](#).

281

282

283 The proteins extracted from both co-cultivated microorganisms were mainly identified for *B.*
284 *thetaiotaomicron* (Fig. 3; protein identification available in [Supplementary Material Tables S7](#)
285 [and S8](#)) in different categories: the group of antioxidant proteins with superoxide dismutase
286 (spots BT-o1 and BT-o2), rubrerythrin (BT-o3), probable thiol peroxidase/lipid hydroperoxide
287 peroxidase (BT-o4 to BT-o7), the group of chaperones with the Chaperone protein DnaK (BT-
288 c1), Molecular chaperone DnaJ (BT-c2), Cationic outer membrane protein OmpH (BT-c3), Heat
289 shock protein Hsp20 (BT-c4), 10 kDa chaperonin (BT-c5) and other stress proteins such as
290 Glutamate decarboxylase (BT-s1 and BT-s2). Proteins of the carbohydrate catabolic pathway
291 from *Bacteroides* were also found in these extracts (phosphoenolpyruvate carboxykinase in spots
292 BT-p1, BT-p3 and BT-p4 or lactate/malate dehydrogenase/glyceraldehyde- 3-phosphate
293 dehydrogenase (in spots BT-p2 and BT-p6 to BT-p9) or 2,3-bisphosphoglycerate-dependent
294 phosphoglycerate mutase in spots BT-p12 and BT-p13. Succinate-CoA ligase in spot BT-p14),
295 NAD dependent epimerase (BT-p15) were also identified. Enolase was found for *K. marxianus*
296 S-02-5 (K-p1). Tetratricopeptide repeat protein (BT-p5), Choloylglycine hydrolase (BT-p10),
297 Glutaminase (BT-p11).

298 In the extract obtained from *K. marxianus* S-02-5, protein analysis (2D gel and protein
299 identifications available in [Supplementary Material Fig. S2](#) and [Tables S9 and S10](#)) could
300 underpin among others the presence of glucose-6-phosphate isomerase (p3), hexokinase (in spot
301 p4), enolase (p1, p5, p7, p12, p14, p19, p20), enoate reductase 1 (p10), phosphoglycerate kinase
302 (p9, p12, p13, p15), (exo)inulinase (p2), NAD(P)H-dependent D-xylose reductase or Xyl1 (o2),
303 NADPH-dependent alpha-keto amide reductase (o1), phosphoglycerate mutase 1 (p16 à p18),
304 peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (s1).

305

	Identified protein	Numbering in gel
Oxidative stress proteins	Superoxide dismutase (<i>B. thetaiotaomicron</i>)	BT-o1
	Superoxide dismutase (<i>B. thetaiotaomicron</i>)	BT-o2
	Rubryerythrin (<i>B. thetaiotaomicron</i>)	BT-o3
	Thiol peroxidase (<i>B. thetaiotaomicron</i>)	BT-o4
	Thiol peroxidase (<i>B. thetaiotaomicron</i>)	BT-o5
	Thiol peroxidase (<i>B. thetaiotaomicron</i>)	BT-o6
	Thiol peroxidase (<i>B. thetaiotaomicron</i>)	BT-o7
Chaperonin proteins	Chaperone protein DnaK (<i>B. thetaiotaomicron</i>)	BT-c1
	Chaperone protein DnaJ (<i>B. thetaiotaomicron</i>)	BT-c2
	Outer membrane protein OmpH (<i>B. thetaiotaomicron</i>)	BT-c3
	Heat shock protein Hsp20 (<i>B. thetaiotaomicron</i>)	BT-c4
	10 kDa chaperonin (<i>B. thetaiotaomicron</i>)	BT-c5
Other stress proteins	Glutamate decarboxylase (<i>B. thetaiotaomicron</i>)	BT-s1
	Glutamate decarboxylase (<i>B. thetaiotaomicron</i>)	BT-s2
Other proteins	Phosphoenolpyruvate carboxykinase (ATP) (<i>B. thetaiotaomicron</i>)	BT-p1
	Malate dehydrogenase (<i>B. thetaiotaomicron</i>)	BT-p2
	Phosphoenolpyruvate carboxykinase (ATP) (<i>B. thetaiotaomicron</i>)	BT-p3
	Phosphoenolpyruvate carboxykinase (ATP) (<i>B. thetaiotaomicron</i>)	BT-p4
	Tetratricopeptide repeat protein (<i>B. thetaiotaomicron</i>)	BT-p5
	Lactate malate dehydrogenase (<i>B. thetaiotaomicron</i>)	BT-p6
	Lactate malate dehydrogenase (<i>B. thetaiotaomicron</i>)	BT-p7
	Lactate malate dehydrogenase or glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (<i>B. thetaiotaomicron</i>)	BT-p8
	Glyceroldehyde-3-phosphate dehydrogenase (<i>B. thetaiotaomicron</i>)	BT-p9
	Choloyglycine hydrolase (<i>B. thetaiotaomicron</i>)	BT-p10
	Glutaminase (<i>B. thetaiotaomicron</i>)	BT-p11
	2,3-bisphosphoglycerate-dependent phosphoglycerate mutase (<i>B. thetaiotaomicron</i>)	BT-p12
	2,3-bisphosphoglycerate-dependent phosphoglycerate mutase (<i>B. thetaiotaomicron</i>)	BT-p13
Succinate-CoA ligase (ATP-forming) (<i>B. thetaiotaomicron</i>)	BT-p14	
NAD dependent epimerase/dehydratase (<i>B. thetaiotaomicron</i>)	BT-p15	
Enolase (<i>K. marxianus</i>)	K-p1	
Control	Serum albumin (<i>Bos taurus</i>)	Control

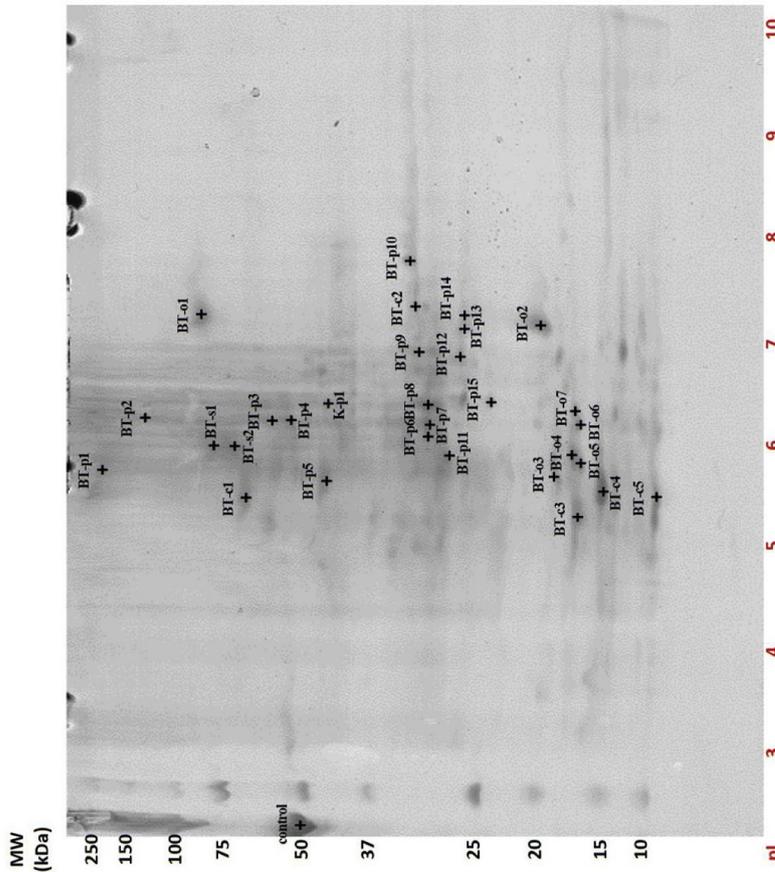


Fig. 3. Two-dimensional gel obtained with the proteins extracted from *Bacteroides thetaiotaomicron* ATCC 29741 and *Kluyveromyces marxianus* S-02-5 grown together. (MW) Molecular weight standards. (pI) Isoelectric points. Stress proteins were identified by peptide mass finger printing through two different search algorithms (“PEAKS” and “MASCOT”) in the NCBI (National Center for Biotechnology Information), UniProt, SwissProt: oxidative stress proteins (BT-o1 to BT-o7); chaperonin proteins (BT-c1 to BT-c5); other stress proteins (BT-s1, BT-s2); other proteins (BT-p1 to BT-p15; K-p1); control (serum albumin).

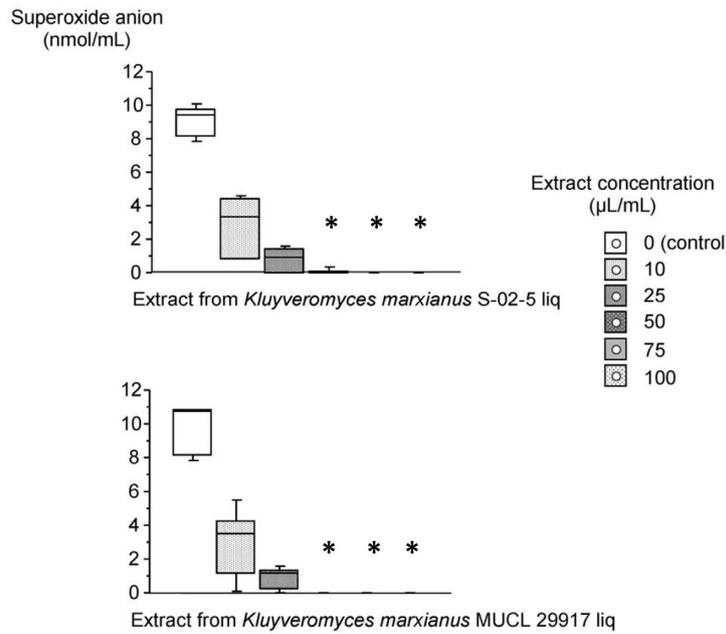
312 3.2. Comparison of both *K. marxianus* strains: stability of the yeasts incubated under
313 anaerobic condition or during the extraction of antioxidant metabolites

314 *K. marxianus* S-02-5 and *K. marxianus* MUCL 29917 strains were compared for their
315 antioxidant potential. Thus, their incubation under anaerobic conditions at 35-36 °C confirmed
316 the stability of the cell counts of *K. marxianus* S-02-5 or *K. marxianus* MUCL 29917 under these
317 conditions. Remarkably, both yeasts survived during the process of extraction as indicated by
318 colony forming unit (CFU) counts (only 0.1 log CFU-loss during the extraction). When yeasts
319 were collected at the GYE surface after aerobic culture, cell counts before and after extraction
320 underlined the stability of *K. marxianus* S-02-5 and *K. marxianus* MUCL 29917 during the
321 extraction ($p > 0.05$).

322 Overall, the protein contents of the extracts appeared to depend on the method of yeast
323 production. The mean protein concentration of the extract “*K. marxianus* S-02-5 liq” (2.6 ± 0.41
324 mg/ml) was tenfold higher than that of “*K. marxianus* S-02-5 surf” (0.25 ± 0.14 mg/ml). For
325 “*K. marxianus* MUCL 29917 liq”, protein concentration was quadrupled (2.08 ± 0.35 mg/ml),
326 relatively to that of “*K. marxianus* MUCL 29917 surf” (0.53 ± 0.31 mg/ml).

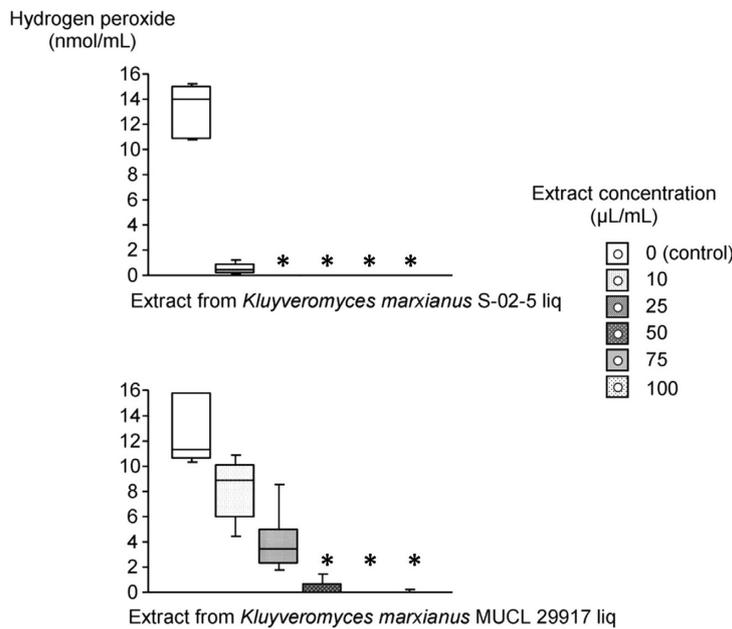
327 After growth of *K. marxianus* S-02-5 and *K. marxianus* MUCL 29917 under anaerobic
328 conditions in broth, the mean IC₅₀ of the extracts against superoxide anion were about 7 ml/ml
329 for both “*K. marxianus* S-02-5 liq” and “*K. marxianus* MUCL 29917 liq” (Fig. 4). A strong
330 action of both extracts was found against hydrogen peroxide, with however a superiority to
331 “*K. marxianus* S-02-5 liq” which IC₅₀ was still of about 5 ml of extract/ml. That of
332 “*K. marxianus* MUCL 29917 liq” reached 14 ml of extract/ml (Fig. 5).

333 After aerobic growth of yeast strains on GYE agar, an inhibitory effect was observed for the
334 extract “*K. marxianus* S-02-5 surf” against superoxide anion, with a maximal activity (39.6%
335 inhibition of the positive control of O₂⁻ production) at 100 ml of extract/ml. For “*K. marxianus*
336 MUCL 29917 surf” the maximal mean inhibition was higher with 84.6% at 100 ml of extract/ml
337 (IC₅₀ 30.75 ml of extract/ml). The maximal mean inhibitions of hydrogen peroxide of 23.5% and
338 43% were observed for “*K. marxianus* S-02-5 surf” and “*K. marxianus* MUCL 29917 surf” at 100
339 ml of both extracts/ml, respectively.



340
341
342
343
344
345
346

Fig. 4. Inhibition of superoxide anion by both *Kluveromyces marxianus* extracts. They were obtained from single cultures of the strains S-02-5 and MUCL 29917 grown in broth medium (liq). Superoxide anion was *in vitro* produced in a cell-free model using the xanthine-xanthine oxidase system (* Superoxide anion concentration statistically different from that obtained with the control without extract, Kruskal & Wallis test, $p = 0.05$, AnaStat, $n = 5$ five independent experiments). Means \pm standard deviations are available [Supplementary Material Table S3](#).



347
348
349
350
351
352

Fig. 5. Inhibition of hydrogen peroxide by both *Kluveromyces marxianus* extracts. They were obtained from single cultures of the strains S-02-5 and MUC 29917 (liq). Hydrogen peroxide was *in vitro* incubated in cell-free model with the extracts. (* Hydrogen peroxide concentration statistically different from that obtained with the control without extract, Kruskal & Wallis test, $p = 0.05$, AnaStat, $n = 5$ five independent experiments). Means \pm standard deviations are available [Supplementary Material Table S4](#).

353 4. Discussion

354 In the intestinal environment, the interactions between the symbiont *B. thetaiotaomicron*,
355 known for its anti-inflammatory and antioxidative properties (Hochart-Behra et al., 2008, 2014)
356 and *K. marxianus*, were reported to produce antioxidant enzymes. Here, novel insights regarding
357 the anti-oxidative properties of the anaerobe in contact with yeast isolated from cheese
358 *K. marxianus* S-02-5 and *K. marxianus* MUCL 29917 used as control were examined and the
359 cell counts of these microorganisms were determined. Overall, the experiments performed here
360 were aimed at establishing whether *K. marxianus* S-02-5, recently isolated from cheese, could
361 provide further probiotic attributes for its utilization in inflammatory bowel diseases.

362 The interactions between *B. thetaiotaomicron* ATCC 29741 and *K. marxianus* S-02-5 and
363 *K. marxianus* MUCL 29917 privileged the *B. thetaiotaomicron* ATCC 29741 population under
364 anaerobic conditions. The extracts obtained in the detergent solution, mimicking therefore the
365 intestinal detergent conditions, confirmed an inhibitory effect of *B. thetaiotaomicron* ATCC
366 29741 metabolites on both O_2^- and H_2O_2 . The proteins identified in the intense spots in the gel,
367 relative to the bacterial extract, were similar to those previously reported (Hochart-Behra et al.,
368 2014), such as ferritin, thiol peroxidase. They are likely involved in the antioxidative effects
369 observed for the extract. However, SOD was not detected, especially in its hexameric form
370 (Hochart-Behra et al., 2008). Stress proteins and chaperones were also found as expected in this
371 type of extract: DnaK, SCO1/SenC chaperone which family has been extensively studied for its
372 role in the incorporation of copper in the catalytic site of oxidases (Fujimoto et al., 2012) and
373 other proteins such as glutamate decarboxylase (largely described in our previous extracts)
374 which genes are known to be positively regulated by acidic shock, salt stress and stationary
375 growth phase in *Escherichia coli* (De Biase, Tramonti, Bossa, & Visca, 1999). Magnesium
376 chelatase, subunit I/ATPase was identified in the *B. thetaiotaomicron* extract whose ATPase
377 activity could be regulated by thioredoxin redox. In pea plants, it has been reported to modulate
378 the redox-mediated signaling in tetrapyrrole biosynthesis and the homeostasis of reactive oxygen
379 species (Luo et al., 2012). A group of main enzymes involved in the carbohydrate catabolic

380 pathway of *Bacteroides* which lead to acetate, butyrate, propionate, succinate and lactate
381 (Fischbach & Sonnenburg, 2011) was found here yet. We identified a tetratricopeptide repeat
382 protein (TPR). It could participate in the formation of protein complexes. TPRs generally form
383 amphipathic helix pairs that mediate protein-protein interactions and multiprotein complex
384 assemblies with other TPR-containing or non-TPR-containing proteins (Bakolitsa et al., 2010).
385 Such patterns have been described for a protein complex of *B. thetaiotaomicron* involved in the
386 starch utilization. Under our experimental conditions, we had previously shown using electronic
387 microscopy that the anaerobic bacterium exported to the extraction medium an assembly of
388 survival proteins in the form of budding vesicles which were probably responsible for the
389 antioxidant effect of the extract (Hochart-Behra et al., 2014).

390 The effect of the extract on ROS was enhanced especially on H₂O₂, when both
391 microorganisms (*K. marxianus* and *B. thetaiotaomicron*) were co-incubated. Moreover, the
392 viabilities of both microorganisms were stable during the extraction. The effect of the extract
393 obtained from *K. marxianus* S-02-5 incubated alone in broth under anaerobic conditions showed
394 strong antioxidant activity. Indeed, as little as 25 ml of extract/ml was sufficient to inhibit 50%
395 of superoxide anion or hydrogen peroxide. The superoxide dismutase from *K. marxianus* was
396 previously reported to act efficiently against O₂⁻ (Stefanova, Ratcheva, Nikolova, & Neychev,
397 2014), and could explain the inhibition observed here upon addition of our extracts. Curiously,
398 no yeast SOD was identified among the major spots in the gels relative to the extracts resulting
399 from the co-culture or from *K. marxianus* S-02-5 grown alone. The eukaryotic yeast Cu/Zn SOD
400 has been studied and would appear in gel at around 34 kDa as dimeric form or at 17 kDa as
401 monomer (Dellomonaco et al., 2007; Nedeva et al., 2009; Stefanova et al., 2014). *K. marxianus*
402 was viable during the extraction arguing that cell disruption did not occur during the process.
403 The *K. marxianus* SOD is cytosolic and was not released into the extraction medium.
404 Furthermore, we could also expect the presence of peroxidases and/or of thiol-containing
405 proteins in the extracts, countering H₂O₂. The unique yeast protein identified in 2D-gel
406 performed with the extract from the co-culture was enolase, enzyme of the glycolytic pathway.

407 The yeast seemed overshadowed by the contact of *B. thetaiotaomicron* after anaerobic co-
408 culture. As a reminder, *B. thetaiotaomicron* is able to produce a large amount of acetate via the
409 carbohydrate anaerobic pathway. It has been recently reported (Martynova et al., 2016) that
410 *K. marxianus* was inhibited in its growth by acetate. It could extend lag phase, during which cells
411 adapt to elevated acetate concentrations, and growth reoccurs at a slower rate. In contrast, the
412 anaerobe seemed rapidly benefit from the presence of yeast and produced key-antioxidant/stress
413 proteins, much more abundant way than when it is cultivated at the same level out of the
414 presence of the yeast. The full range of enzymes/ proteins useful in the detoxification of ROS
415 was highlighted in 2D-gels, especially the SOD in its hexameric (in spot o1 in Fig. 3) or
416 monomeric (spot BT-o2 in Fig. 3) form. The presence in gels of an intense spot of SOD hexamer
417 seemed related to a powerful effect against superoxide anion (Hochart-Behra et al., 2008).
418 Rubrerythrin (spot BT-o3), probable thiol peroxidase/lipid hydroperoxide peroxidase (spots BT-
419 o4 to BT-o7) as shown in Fig. 3 constitute a full arsenal against H₂O₂. Rubrerythrins are non-
420 heme di-iron proteins involved in oxidative stress defense as peroxide scavengers in a wide
421 range of organisms. These proteins belonging to the ferritinlike superfamily contain a C-terminal
422 rubredoxin-like domain involved in electron transport used during catalysis in anaerobic
423 conditions (Cardenas, Quatrini, & Holmes, 2016). *B. thetaiotaomicron*, was reported by Mishra
424 and Imlay (Mishra & Imlay, 2013) to use a consortium of enzymes to scavenge hydrogen
425 peroxide, and rubrerythrin devoid of any secretory leader sequence. It appears, for these authors,
426 to be devoted to scavenging H₂O₂ in the cytoplasmic compartment. However, in our study, the
427 bacterial cell viability was preserved and we observed an intense protein spot for rubrerythrin in
428 2D-gel. Our previous studies have also shown a particular protein export mode by budding of
429 vesicles on the bacterial wall which could be used for rubrerythrin and peroxidase export.
430 Chaperones are useful for refolding aggregated proteins after stress such as (in Fig. 3) DnaK (in
431 spot BT-c1), DnaJ (BT-c2), cationic outer membrane protein OmpH (BT-c3), Heat shock protein
432 Hsp20 (BT-c4), 10 kDa chaperonin (BT-c4) and other stress proteins such as glutamate
433 decarboxylase (BT-s1 and BT-s2). So the *B. thetaiotaomicron* glutaminase found in our extract

434 may be essential to provide from glutamine the glutamate substrate to glutamate decarboxylase.
435 TPR was once again identified in the extract, performed this time with both microorganisms. The
436 extract from the co-culture contained also the full enzyme necessary for the carbohydrate
437 catabolism et to provide energy (Miller & Wolin, 1979). As for choloylglycine hydrolase, this
438 enzyme catalyzes the hydrolysis of amide bonds of conjugated bile salts and could act under our
439 experimental conditions on the 3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1 propanesulfonate
440 detergent mimicking bile salts (Ridlon, Kang, & Hylemon, 2006).

441 When the extract was made with *K. marxianus* S-02-5 only, the identification of the protein
442 in the gel has especially shown glycolysis enzymes, (exo)inulinase, Xyl11 which is,
443 NADPHdependent alpha-keto amide reductase. (Exo)inulinase from *K. marxianus* is a powerful
444 extracellular enzyme of pharmaceutical interest, which rapidly hydrolyzes inulin to produce
445 fructooligosaccharides and fructose whose metabolism bypasses the metabolic pathway of
446 glucose and therefore does not require insulin (Singh & Lotey, 2010). Inulinase from
447 *K. marxianus* exists in two forms. The inulinase present in the culture fluid is a dimer, and the
448 enzyme retained in the cell wall is a tetramer. In our case, the spot p2 found at a molecular
449 weight of around 125 kDa in the nondenaturing gel (available in [supplementary content 7](#)) could
450 be compatible with the dimer (Rouwenhorst, Hensing, Verbakel, Scheffers, & van Duken, 1990).
451 *K. marxianus* is capable of growing under anaerobic fermentation conditions that lead to ethanol
452 production even if alternating aerobic and anaerobic stages has been shown to promote the
453 growth of the yeast. *K. marxianus* is also capable to use various hexoses or pentoses for its
454 fermentation to ethanol (Banat, Singh, & Marchant, 1996). Inulinase is produced by
455 *K. marxianus* under aerobic conditions while its fermentation occurs under anaerobic conditions
456 or with limited oxygen supply (Yuan, Zhao, Ge, & Bai, 2008). So we put the hypothesis that
457 ethanol was released into our yeast extracts. Moreover, the NADPH dependent alpha-keto amide
458 reductase found in gel is in favor of the conversion of various carbonyl compounds into their
459 corresponding alcohol products and this enzyme was studied in *Saccharomyces cerevisiae*
460 (Chang, Griest, Harter, & Petrash, 2007). The xylose fermentation to ethanol under anaerobic

461 conditions (Zhang et al., 2015) can also be evoked in our study, since NAD(P)Hdependent
462 D-xylose reductase or Xyl1 was found in gel for our strain *K. marxianus* S-02-5. This enzyme
463 catalyzes the first step of the xylose fermentation. Thus, an ethanol release into the yeast extract
464 could be expected in this study. To summarize, under anaerobic conditions, *K. marxianus* S-02-5
465 was likely limited in its
466 growth and developed a fermentative metabolism at least partially using pentose pathway. Was
467 this yeast subject to stress? Peptidylprolyl cis-trans isomerase was identified in the extract, which
468 is known as a chaperone refolding aggregated proteins (Göthel & Marahiel, 1999).

469 Both *K. marxianus* S-02-5 and *K. marxianus* MUCL 29917 demonstrated remarkable
470 stability during their anaerobic incubation and in the presence of the mild detergent derived from
471 cholic acid supposed to mimic intestinal conditions during the extraction process. Extracts
472 prepared from these strains demonstrated strong action against O_2^- as well as against H_2O_2 .
473 Moreover, these microorganisms were able to secrete antioxidant compounds at a higher level
474 than did *B. theraiotaomicron* ATCC 29741, previously studied for its antioxidant properties
475 (Hochart-Behra et al., 2008, 2014). These compounds showed remarkable activity in vitro
476 against superoxide anion and hydrogen peroxide, which are the first ROS described in the
477 oxidative cascade of phagocytes (Hochart-Behra et al., 2008, 2014). Remarkably, these species
478 were shown to be the first ROS produced in case of inflammatory burst by phagocytes,
479 especially by neutrophils (Van Eeden, Klut, ..., & Hogg, 1999).

480 *K. marxianus* species could be a good yeast candidate either to modulate or stop the
481 oxidative-inflammatory cascade. Furthermore, *K. marxianus* was reported to exhibit stronger
482 properties relative to the enhancement of transepithelial electrical resistance (TER) across a
483 monolayer of differentiated human colonocytes (Caco-2 cells) (50% TER increase) than probiotic
484 *S. boulardii* (30% TER increase) (Smith, Baker, Arneborg, & Jespersen, 2015). *K. marxianus*, as
485 well as *Metschnikowia gruessii*, were reported as the non-*Saccharomyces* yeasts to protect human
486 epithelial cells from pathogen invasion (Smith et al., 2015), and the antioxidative effects evidenced
487 here may explain, partially, the protective action of the *K. marxianus* species.

488 However, when *K. marxianus* S-02-5 and *K. marxianus* MUCL 29917 were cultured under
489 aerobic atmosphere, their extracts did not show the same antioxidative potency. The protein
490 contents of the extracts were also different depending on the mode of yeast incubation. Under
491 anaerobic conditions, *K. marxianus* S-02-5 was more efficient. One hypothesis could be
492 advanced that the alcoholic fermentation process could be at the origin of this difference. Indeed
493 ethanol which is often used as solvent in the extraction of active natural products has been shown
494 to have strong scavenger properties against ROS and probably to interfere with the effects that
495 the authors seek to demonstrate. One should be vigilant before to attribute antioxidant effects to
496 ingredients that are extracted with alcoholic solutions (Li, 2013). In our study, antioxidant
497 proteins were not identified in the intense spots in gels for *K. marxianus*. Antioxidant
498 compounds could be of lower molecular weight than 10 kDa, because the extracts were desalted
499 on filters with cut-off level of 10 kDa. Some thiols of low molecular weight could be powerful.
500 So, assays were finally performed on the corresponding filtrates that were stored in freezing to
501 search their possible antioxidant power. Antioxidant effects were found with notable variations
502 from one filtrate to the other which could be explained by the lability of ethanol or thiols that can
503 be rapidly oxidized in disulphide bonds over time.

504 The intestinal content is characterized by anaerobic conditions, detergent medium and a
505 strong representation of *Bacteroides* genus in intestinal flora. Basically we can expect the
506 inhibition of the oxidative-inflammatory cascade in the presence of *K. marxianus* S-02-5,
507 especially in the case of inflammatory bowel diseases.

508

509

510 5. Conclusion

511 *K. marxianus* S-02-5 appears to bring a benefit for antioxidant activity when it is co-
512 incubated with *B. thetaiotaomicron* under conditions mimicking the intestinal environment.
513 Indeed, the antioxidant power of the extract performed from both microorganisms grown
514 together was much more powerful than that obtained with the extract from the single bacterium.
515 Moreover, *K. marxianus* S-02-5 exhibited strong inhibition of superoxide anion and hydrogen
516 peroxide as well as the reference strain *K. marxianus* MUCL 29917. However, that could be due
517 to ethanol fermentation. Animal models of inflammation will be of great interest in the study of
518 the antioxidant and anti-inflammatory status of the tissues in contact with *K. marxianus* S-02-5.
519 The data obtained in this study underpinned the antioxidative properties of *K. marxianus* species,
520 mainly those of *K. marxianus* S-02-5, recently isolated from cheese, when it is incubated under
521 anaerobic conditions in the presence of the *B. thetaiotaomicron* intestine symbiont. This attribute
522 could then support the health claim of this yeast as a potential probiotic to counter intestinal
523 inflammatory processes.

524

525 Conflict of interest

526 The authors do not declare any conflict of interest.

527

528 Acknowledgements

529 This work was realised at Charles Viollette Institute in University of Lille (France). Alexandre
530 Ceugnies obtained a PhD scholarship from Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la
531 Recherche (France). The authors thank Portia Winters for her copyedited version of the manuscript.
532 The REALCAT platform is benefiting from a governmental subvention administrated by the French
533 National Research Agency (ANR) within the frame of the "Future Investments" program (PIA), with
534 the contractual reference "ANR-11-EQPX-0037". The Hauts-de-France region, the FEDER, Ecole
535 Centrale de Lille and Centrale Initiative Foundation are warmly acknowledged for their financial
536 contribution to the acquisition of the equipment of the REALCAT platform.

537

538 **References**

- 539 Aruoma, O. I., Halliwell, B., Hoey, B. M., & Butler, J. (1989). The antioxidant action of N-
540 acetylcysteine: Its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and
541 hypochlorous acid. *Free Radical Biology and Medicine*, 6(6), 593e597.
- 542 Bakolitsa, C., Xu, Q., Rife, C. L., Abdubek, P., Astakhova, T., & Axelrod, H. L. (2010).
543 Structure of BT_3984, a member of the SusD/RagB family of nutrient-binding molecules.
544 *Acta Crystallographica. Section F, Structural Biology and Crystallization*
545 *Communications*, 66, 1274e1280. <http://dx.doi.org/10.1107/S1744309110032999>.
- 546 Banat, I. M., Singh, D., & Marchant, R. (1996). The use of a thermotolerant fermentative
547 *Kluyveromyces marxianus* IMB3 yeast strain for ethanol production (PDF Download
548 Available). *Acta Biotechnology*, 16(2e3), 215e223. <http://dx.doi.org/10.1002/abio.370160223>.
- 549 Cammarota, G., Ianiroa, G., Cianci, R., Bibbò, S., Gasbarrini, A., & Currò, D. (2015). The involvement
550 of gut microbiota in inflammatory bowel disease pathogenesis: Potential for therapy. *Pharmacology*
551 *& Therapeutics*, 149, 191e212. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2014.12.006>.
- 552 Cardenas, J. P., Quatrini, R., & Holmes, D. S. (2016). Aerobic lineage of the oxidative stress response
553 protein rubrerythrin emerged in an ancient microaerobic, (Hyper)Thermophilic environment.
554 *Frontiers in Microbiology*, 7, 1822. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2016.01822>.
- 555 Ceugniet, A., Drider, D., Jacques, P., & Coucheney, F. (2015). Yeast diversity in a traditional
556 French cheese “Tomme d'orchies” reveals infrequent and frequent species with associated
557 benefits. *Food Microbiology*, 52, 177e184. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2015.08.001>.
- 558 Chang, Q., Griest, T. A., Harter, T. M., & Petrash, J. M. (2007). Functional studies of aldo-
559 keto reductases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et biophysica acta*, 1773,
560 321e329. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.10.009>.
- 561 De Biase, D., Tramonti, A., Bossa, F., & Visca, P. (1999). The response to stationaryphase
562 stress conditions in *Escherichia coli*: Role and regulation of the glutamic acid
563 decarboxylase system. *Molecular Microbiology*, 32(6), 1198e1211.mmi1430 [pii].

24

- 564 Dellomonaco, C., Amaretti, A., Zanoni, S., Pompei, A., Matteuzzi, D., & Rossi, M. (2007). Fermentative
565 production of superoxide dismutase with *Kluyveromyces marxianus*. *Journal of Industrial*
566 *Microbiology & Biotechnology*, 34, 27e34. <http://dx.doi.org/10.1007/s10295-006-0158-4>.
- 567 Fischbach, Michael A., & Sonnenburg, Justin L. (2011). Eating for Two: How metabolism
568 establishes interspecies interactions in the gut. *Cell Host & Microbe*, 10, 336e347.
569 <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2011.10.002>.
- 570 Fujimoto, M., Yamada, A., Kurosawa, J., Kawata, A., Beppu, T., & Takano, H. (2012).
571 Pleiotropic role of the Sco1/SenC family copper chaperone in the physiology of
572 streptomyces. *Microbial Biotechnology*, 5, 477e488. [http://dx.doi.org/10.1111/j.1751-](http://dx.doi.org/10.1111/j.1751-7915.2011.00319.x)
573 [7915.2011.00319.x](http://dx.doi.org/10.1111/j.1751-7915.2011.00319.x).
- 574 Göthel, S. F., & Marahiel, M. (1999). Peptidyl-prolyl cis-trans isomerases, a superfamily of
575 ubiquitous folding catalysts. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(3), 423e436.
576 <http://dx.doi.org/10.1007/s000180050299>.
- 577 Hochart-Behra, A. C., Behra-Miellet, J., Sam, J., Drobecq, H., Gressier, B., & Luyckx, M.
578 (2008). Antioxidative effect of *Bacteroides thetaiotaomicron* extracts: Superoxide
579 dismutase identification. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391(1), 415e423.
580 <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-008-1993-0>.
- 581 Hochart-Behra, A. C., Drobecq, H., Tourret, M., Dubreuil, L., & Behra-Miellet, J. (2014).
582 Anti-stress proteins produced by *Bacteroides thetaiotaomicron* after nutrient starvation.
583 *Anaerobe*, 28, 18e23. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2014.04.008>.
- 584 Kelly, D., Campbell, J. I., King, T. P., Grant, G., Jansson, E. A., & Coutts, A. G. (2004).
585 Commensal anaerobic gut bacteria attenuate inflammation by regulating nuclear-
586 cytoplasmic shuttling of PPAR-gamma and RelA. *Nature Immunology*, 5(1), 104e112.
587 <http://dx.doi.org/10.1038/ni1018>.
- 588 Leavey, P. J., Gonzalez-Aller, C., Thurman, G., Kleinberg, M., Rinckel, L., & Ambruso, D.
589 W. (2002). A 29-kDa protein associated with p67phox expresses both peroxiredoxin and
590 phospholipase A2 activity and enhances superoxide anion production by a cell-free

- 591 system of NADPH oxidase activity. *Journal of Biological Chemistry*, 47(22),
592 45181e45187. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M202869200>.
- 593 Li, X. (2013). Solvent effects and improvements in the deoxyribose degradation assay for hydroxyl radical-
594 scavenging. *Food Chemistry*, 141, 2083e2088. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.05.084>.
- 595 Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement
596 with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265e275.
- 597 Luo, T., Fan, T., Liu, Y., Rothbart, M., Yu, J., & Zhou, S. (2012). Thioredoxin redox regulates
598 ATPase activity of magnesium chelatase CHLI subunit and modulates redox-mediated
599 signaling in tetrapyrrole biosynthesis and homeostasis of reactive oxygen species in pea
600 plants. *Plant Physiology*, 159, 118. <http://dx.doi.org/10.1104/pp.112.195446>.
- 601 Maccaferri, S., Klinder, A., Brigidi, P., Cavina, P., & Costabile, A. (2012). Potential probiotic
602 *Kluyveromyces marxianus* B0399 modulates the immune response in Caco-2 cells and
603 peripheral blood mononuclear cells and impacts the human gut microbiota in an in vitro
604 colonic model system. *Applied Environmental Microbiology*, 78(4), 956e964,
605 0.1128/AEM.06385-11.
- 606 Martynova, J., Kokina, A., Kibilds, J., Liepins, J., Scerbaka, R., & Vigants, A. (2016). Effects of
607 acetate on *Kluyveromyces marxianus* DSM 5422 growth and metabolism. *Applied Microbiology
608 and Biotechnology*, 100, 4585e4594. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-016-7392-0>.
- 609 Miller, T. L., & Wolin, M. J. (1979). Fermentations by saccharolytic intestinal bacteria. *The
610 American Journal of Clinical Nutrition*, 32, 164e172.
- 611 Mishra, S., & Imlay, J. A. (2013). An anaerobic bacterium, *Bacteroides thetaiotaomicron*,
612 uses a consortium of enzymes to scavenge hydrogen peroxide. *Molecular Microbiology*,
613 90, 1356e1371. <http://dx.doi.org/10.1111/mmi.12438>.
- 614 Nedeva, T., Dolashka-Angelova, P., Moshtanska, V., Voelter, W., Petrova, V., &
615 Kujumdzieva, A. (2009). Purification and partial characterization of Cu/Zn superoxide
616 dismutase from *Kluyveromyces marxianus* yeast. *Journal of Chromatography. B*,

- 617 Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 877, 3529e3536.
618 <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.08.015>.
- 619 Petrof, E. O., & Khoruts, A. (2014). From stool transplants to next-generation microbiota therapeutics.
620 Gastroenterology, 146, 1573e1582. <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2014.01.004>.
- 621 Pinheiro, R., Belo, I., & Mota, M. (2002). Oxidative stress response of *Kluyveromyces*
622 *marxianus* to hydrogen peroxide, paraquat and pressure. Applied Microbiology and
623 Biotechnology, 58, 842e847. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-001-0927-y>.
- 624 Ridlon, J. M., Kang, D. J., & Hylemon, P. B. (2006). Bile salt biotransformations by human
625 intestinal bacteria. Journal of Lipid Research, 47(2), 241e259. R500013-JLR200 [pii] 10.
626 1194/jlr.R500013eJLR200.
- 627 Rouwenhorst, R. J., Hensing, M., Verbakel, J., Scheffers, W. A., & van Duken, J. P. (1990).
628 Structure and properties of the extracellular inulinase of *Kluyveromyces marxianus* CBS
629 6556. Applied and Environmental Microbiology, 56, 3337e3345.
- 630 Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., & Mann, M. (1996). Mass spectrometric sequencing of
631 proteins silver-stained polyacrylamide gels. Analytical Chemistry, 68(5), 850e858, 0003-
632 2700/96/0368-0850\$12.00/0.
- 633 Singh, R. S., & Lotey, S. (2010). Enhanced exoinulinase production from *Kluyveromyces*
634 *marxianus* YS-1 using response surface methodology. Brazilian Archives of Biology and
635 Technology, 53, 1005e1013. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-9132010000500002>.
- 636 Smith, I. M., Baker, A., Arneborg, N., & Jespersen, L. (2015). Non-*Saccharomyces* yeasts
637 protect against epithelial cell barrier disruption induced by *Salmonella enterica* subsp.
638 *enterica* serovar Typhimurium. Letter in Applied Microbiology, 61(5), 491e497.
639 <http://dx.doi.org/10.1111/lam.12481>.
- 640 Stefanova, T. H., Ratcheva, I., Nikolova, N. J., & Neychev, H. O. (2014). Effect of yeast
641 superoxide dismutase treatment on some mediators of inflammation during adjuvant-
642 induced arthritis in mice. Zeitschrift für Naturforschung C, 65, 141e147.
643 <http://dx.doi.org/10.1515/znc-2010-1-222>.

- 644 Van Eeden, S. F., Klut, M. E., & Hogg, J. C. (1999). The use of flow cytometry to measure
645 neutrophil function. *Journal of Immunological Methods*, 232(1), 23e43.
646 [http://dx.doi.org/10.1016/S0022-1759\(99\)00148-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-1759(99)00148-9).
- 647 Xu, J., & Gordon, J. I. (2003). Inaugural Article: Honor the symbiont. *Proceeding of the*
648 *National Academy of Science U S A*, 100(18), 10452e10459.
649 <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.17340631001734063100> [pii].
- 650 Yuan, W. j., Zhao, X. q., Ge, X. m., & Bai, F. w. (2008). Ethanol fermentation with
651 *Kluyveromyces marxianus* from Jerusalem artichoke grown in salina and irrigated with a
652 mixture of seawater and freshwater. *Journal of Applied Microbiology*, 105, 2076e2083.
653 <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03903.x>.
- 654 Zhang, B., Zhang, J., Wang, D., Gao, X., Sun, L., & Hong, J. (2015). Data for rapid ethanol
655 production at elevated temperatures by engineered thermotolerant *Kluyveromyces*
656 *marxianus* via the NADP(H)-preferring xylose reductaseexylitol dehydrogenase pathway.
657 *Data in Brief*, 5, 179e186. <http://dx.doi.org/10.1016/j.dib.2015.08.038>.

Supplementary Materials

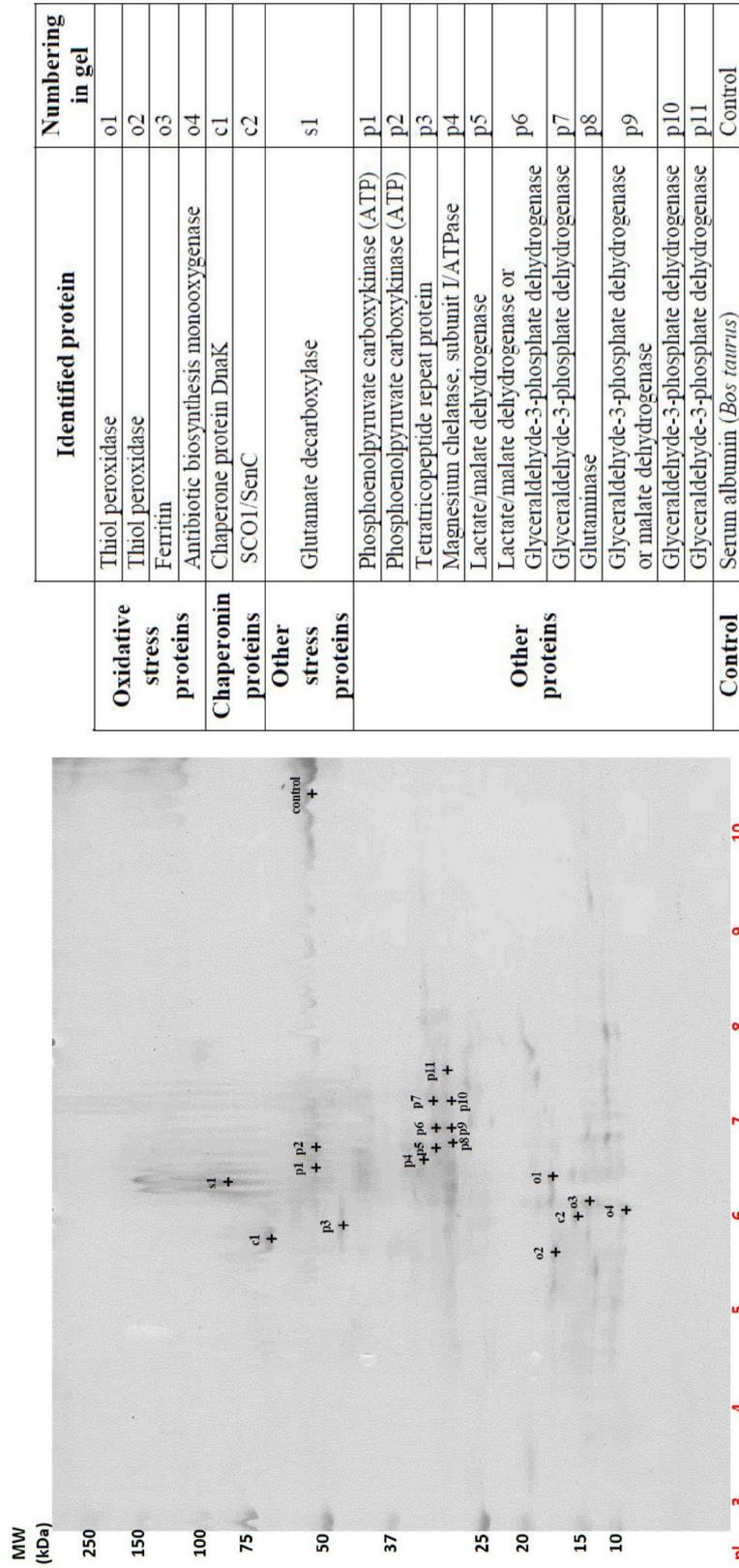


Fig. S1. Two-dimensional gel obtained with the proteins extracted from *Bacteroides thetaiotaomicron* ATCC 29741 grown alone. (MW) Molecular weight standards. (pI) Isoelectric points. Stress proteins were identified by peptide mass fingerprinting through two different search algorithms ("PEAKS" and "MASCOT") and the NCBI (National Center for Biotechnology Information), UniProt, SwissProt database: oxidative stress proteins (o1 to o4); chaperonin proteins (c1; c2); other stress proteins (s1); other proteins (p1 to p11); control (serum albumin).

658
659

660

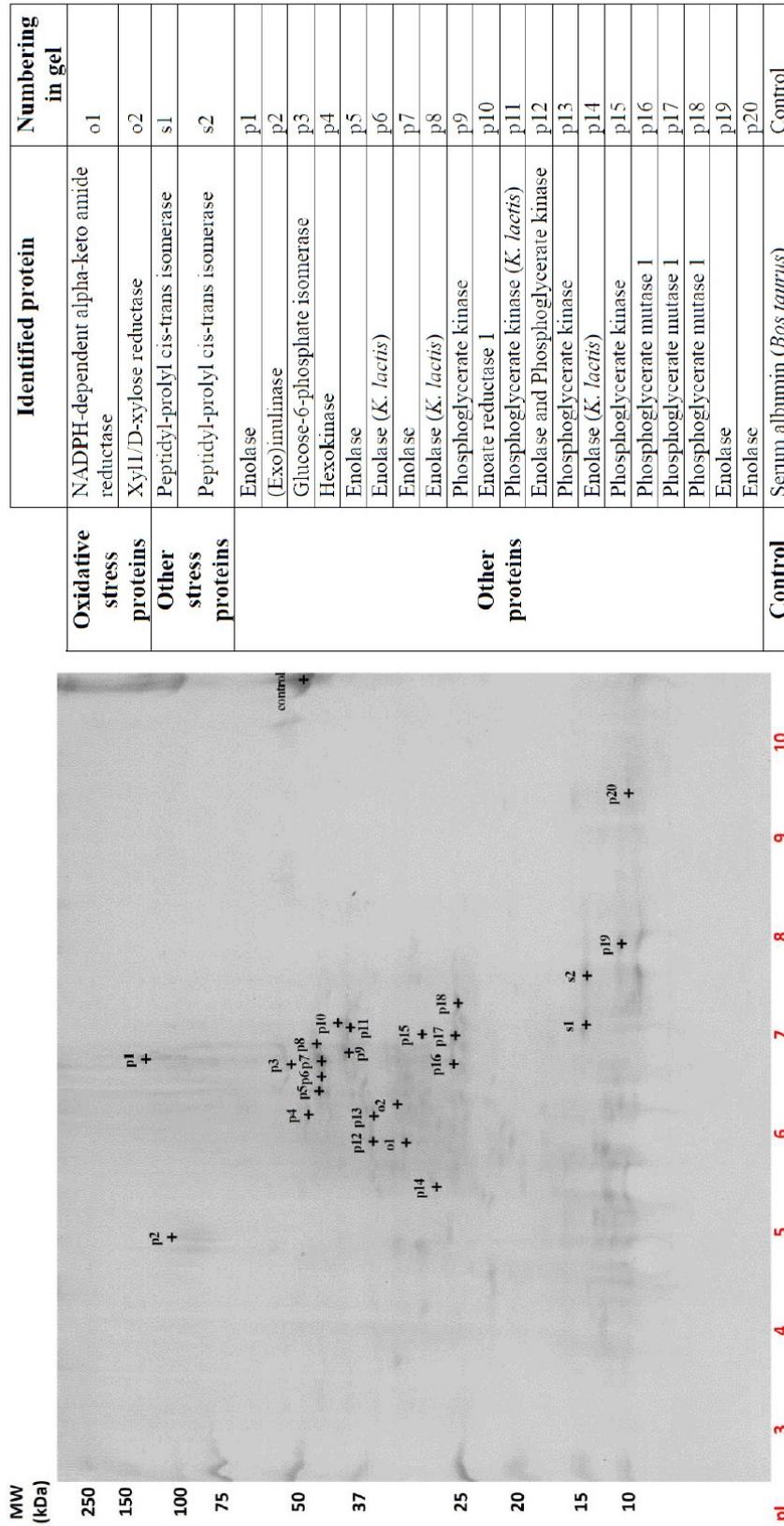


Fig. S2. Two-dimensional gel obtained with the proteins extracted from *Kluyveromyces marxianus* S-02-5 grown alone. (MW) Molecular weight standards. (pI) Isoelectric points. Stress proteins were identified by peptide mass fingerprinting through two different search algorithms ("PEAKS" and "MASCOT") and the NCBI (National Center for Biotechnology Information), UniProt, SwissProt database: oxidative stress proteins (o1; o2); other stress proteins (s1; s2); other proteins (p1 to p20); control (serum albumin).

Table S1: Inhibition of superoxide anion by the extracts performed with *Bacteroides thetaiotaomicron* ATCC 29741 and *Kluyveromyces marxianus* S-02-5 grown separately or after their co-culture

Type of extract	Extract from <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> ATCC 29741	Extract from <i>Kluyveromyces marxianus</i> S-02-5	Extract from the <i>B.thetaiotaomicron</i> ATCC 29741 and <i>Kluyveromyces marxianus</i> S-02-5 co-culture
Extract Concentration (µl/ml)	Superoxide anion concentrations (mean ± standard deviation; n=5) obtained after inhibition by the extracts (nmol/ml)		
0 (positive control)	9.29 ± 0.12	9.52 ± 0.38	9.36 ± 0.09
5	8.12 ± 0.60	8.53 ± 1.39	8.48 ± 1.34
10	6.99 ± 1.53	6.46 ± 1.76	7.72 ± 1.05
25	5.86 ± 1.85	4.42 ± 1.62	6.61 ± 0.83
50	4.68 ± 2.38 *	2.02 ± 2.22 *	4.68 ± 0.98 *
75	3.20 ± 1.69 *	1.27 ± 2.03 *	4.24 ± 1.79 *
100	3.50 ± 1.75 *	1.37 ± 2.56 *	4.23 ± 2.32 *

Legend: * significant difference with the positive control value (Kruskal & Wallis test, $p=0.05$; $n=5$)

Table S2: Inhibition of hydrogen peroxide by the extracts performed with *Bacteroides thetaiotaomicron* ATCC 29741 and *Kluyveromyces marxianus* S-02-5 grown separately or after their co-culture

Type of extract	Extract from <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> ATCC 29741	Extract from <i>Kluyveromyces marxianus</i> S-02-5	Extract from the <i>B.thetaiotaomicron</i> ATCC 29741 and <i>Kluyveromyces marxianus</i> S-02-5 co-culture
Extract concentration (µl/ml)	Hydrogen peroxide (mean ± standard deviation; n=5) obtained after inhibition by the extracts (nmol/ml)		
0 (positive control)	11.85 ± 2.28	11.77 ± 2.60	11.95 ± 2.20
5	11.65 ± 2.38	6.53 ± 2.98	10.21 ± 2.34
10	11.49 ± 2.41	3.29 ± 3.36	8.98 ± 2.85
25	10.87 ± 2.77	2.20 ± 3.80 *	6.79 ± 3.34
50	10.03 ± 3.37	1.15 ± 2.17 *	3.89 ± 2.73 *
75	9.60 ± 4.40	0.54 ± 1.16 *	2.28 ± 2.04 *
100	9.32 ± 3.84	0.74 ± 1.10 *	1.64 ± 1.78 *

Legend: * significant difference with the positive control value (Kruskal & Wallis test, $p=0.05$; $n=5$)

Table S3: Comparison of the inhibitions of superoxide anion by the extracts performed with both *Kluyveromyces marxianus* S-02-5 and MUCL 29917 strains

Type of extract →	Extract from <i>Kluyveromyces marxianus</i> S-02-5	Extract from <i>Kluyveromyces marxianus</i> MUCL 29917
Extract concentration (µl/ml)	Superoxide anion concentrations (mean ± standard deviation; n=5) obtained after inhibition by the extracts (nmol/ml)	Superoxide anion concentrations (mean ± standard deviation; n=5) obtained after inhibition by the extracts (nmol/ml)
0 (positive control)	9.04 ± 0.94	9.69 ± 1.51
10	2.80 ± 1.86	2.89 ± 2.11
25	0.78 ± 0.75	0.87 ± 0.69
50	0.07 ± 0.15 *	0 ± 0.01 *
75	0 ± 0.01 *	0 ± 0.01 *
100	0 ± 0.01 *	0 ± 0.01 *

Legend: * significant difference with the positive control value (Kruskal & Wallis test, $p=0.05$; $n=5$)

Table S4: Comparison of the inhibitions of hydrogen peroxide by the extracts performed with both *Kluyveromyces marxianus* S-02-5 and MUCL 29917 strains

Type of extract	Extract from <i>Kluyveromyces marxianus</i> S-02-5	Extract from <i>Kluyveromyces marxianus</i> MUCL 29917
Extract concentration ($\mu\text{l/ml}$)	Hydrogen peroxide concentrations (mean \pm standard deviation; n=5) obtained after inhibition by the extracts (nmol/ml)	
0 (positive control)	13.18 \pm 2.15	12.79 \pm 2.74
10	0.55 \pm 0.44	8.12 \pm 2.62
25	0 \pm 0.01 *	4.04 \pm 2.68
50	0 \pm 0.01 *	0.37 \pm 0.62 *
75	0 \pm 0.01 *	0 \pm 0.01 *
100	0 \pm 0.01 *	0.03 \pm 0.08 *

Legend: * significant difference with the positive control value (Kruskal & Wallis test, $p=0.05$; $n=5$)

667 668 Table S5. Proteins of the extract obtained from the culture of *Bacteroides thetaiotaomicron* ATCC 29741, that migrated on a gel with an isoelectric point gradient from 3 to 10 and identified by the technique of peptide mapping by mass through the search algorithm « PEAKS »

Protein family	Spot no.	Data		Research algorithm: PEAKS			
		Definition	Accession number: NCBI reference sequence (version)	Theoretical MW (kDa)	Sequence coverage (%)	-log ₁₀ p Database	
	o1	Probable thiol peroxidase OS=Bacteroides thetaiotaomicron CAG:40 GN=BN644_00854 PE=4 SV=1	tr7LN16R7LINS_9BACE	9.620	22	98.64	UniProt
	o1	Probable thiol peroxidase OS=Bacteroides thetaiotaomicron GN=fxp PE=3 SV=1	trA0A174HE88A0A174HE88_BACT4	18.104	11	98.64	UniProt
	o1	Probable thiol peroxidase OS=Bacteroides thetaiotaomicron GN=fxp PE=3 SV=1	trA0A0P0FKD8A0A0P0FKD8_BACT4	18.118	11	98.64	UniProt
	o1	Probable thiol peroxidase OS=Bacteroides thetaiotaomicron (strain ATCC 29148 / DSM 2079 / NCTC 10582 / E50 / VPL-5482) GN=fxp PE=3 SV=1	trQ8A84S1Q8A84S_BACTN	18.104	11	98.64	UniProt
	o1	Probable thiol peroxidase OS=Bacteroides thetaiotaomicron dnlKV9 GN=fxp PE=3 SV=1	trR9HP63R9HP63_BACT4	18.118	11	98.64	UniProt
	o1	Probable thiol peroxidase OS=Bacteroides thetaiotaomicron GN=fxp PE=3 SV=1	trA0A174HE88A0A174HE88_BACT4	18.104	11	80.12	UniProt
	o1	Probable thiol peroxidase OS=Bacteroides thetaiotaomicron GN=fxp PE=3 SV=1	trA0A0P0FKD8A0A0P0FKD8_BACT4	18.118	11	80.12	UniProt
	o1	Probable thiol peroxidase OS=Bacteroides thetaiotaomicron (strain ATCC 29148 / DSM 2079 / NCTC 10582 / E50 / VPL-5482) GN=fxp PE=3 SV=1	trQ8A84S1Q8A84S_BACTN	18.104	11	80.12	UniProt
	o1	Probable thiol peroxidase OS=Bacteroides thetaiotaomicron dnlKV9 GN=fxp PE=3 SV=1	trR9HP63R9HP63_BACT4	18.118	11	80.12	UniProt
	o1	Thiol peroxidase [Bacteroides thetaiotaomicron CAG:40] [gi:524776417.emb CD181873.1] probable thiol peroxidase [Bacteroides thetaiotaomicron CAG:40]	gi:548252747	9.620	22	71.11	NCBI
	o1	MULTISPECIES: lipid hydroperoxide peroxidase [Bacteroides] [gi:293467397.pep NP_810242.1] thiol peroxidase [Bacteroides thetaiotaomicron VPI-5482] [gi:293386366 AAO76436.1] putative thiol peroxidase [Bacteroides thetaiotaomicron CAG:40]	gi:498224405	18.104	11	71.11	NCBI
	o2	Thiol peroxidase [Bacteroides thetaiotaomicron CAG:40] [gi:524776415.emb CD181873.1] probable thiol peroxidase [Bacteroides thetaiotaomicron CAG:40]	gi:548252747	9.620	41	90.53	NCBI
	o2	MULTISPECIES: lipid hydroperoxide peroxidase [Bacteroides] [gi:293467397.pep NP_810242.1] thiol peroxidase [Bacteroides thetaiotaomicron VPI-5482] [gi:293386366 AAO76436.1] putative thiol peroxidase [Bacteroides thetaiotaomicron CAG:40]	gi:498224405	18.104	22	90.53	NCBI
	o3	Ferritin OS=Bacteroides thetaiotaomicron GN=ftna_1 PE=3 SV=1	trA0A174HD7A0A174HD7_BACT4	18.155	18	177.98	UniProt
	o3	Ferritin OS=Bacteroides thetaiotaomicron (strain ATCC 29148 / DSM 2079 / NCTC 10582 / E50 / VPL-5482) GN=BT_1428 PE=3 SV=1	trQ8A80J1Q8A80J_BACTN	17.970	18	177.98	UniProt
	o3	Ferritin OS=Bacteroides thetaiotaomicron dnlKV9 GN=BT_1428 PE=3 SV=1	trA0A174VXXM1A0A174VXXM1_BACT4	17.898	18	177.98	UniProt
	o3	Ferritin OS=Bacteroides thetaiotaomicron dnlKV9 GN=C799_00522 PE=3 SV=1	trR9HL9R9HL9_BACT4	17.970	18	177.98	UniProt
	o3	Ferritin OS=Bacteroides thetaiotaomicron GN=ftna_3 PE=3 SV=1	trA0A0N79Y8A0A0N79Y8_BACT4	17.970	18	177.98	UniProt
	o3	MULTISPECIES: ferritin [Bacteroides] [gi:293467838.pep NP_810286.1] ferritin [Bacteroides thetaiotaomicron VPI-5482] [gi:293386889 gh AAO76480.1] ferritin A [Bacteroides thetaiotaomicron VPI-5482] [gi:25183803 gh EES66102.1]...	gi:496037896	17.970	18	116.98	NCBI
	o4	Uncharacterized protein OS=Bacteroides thetaiotaomicron (strain ATCC 29148 / DSM 2079 / NCTC 10582 / E50 / VPL-5482) GN=BT_1428 PE=1 SV=1	trA0A139K022A0A139K022_BACT4	10.536	16	96.75	UniProt
o4	Uncharacterized protein OS=Bacteroides thetaiotaomicron (strain ATCC 29148 / DSM 2079 / NCTC 10582 / E50 / VPL-5482) GN=BT_1428 PE=1 SV=1	trC8A7U6Q8A7U6_BACTN	10.536	16	96.75	UniProt	
o4	Uncharacterized protein OS=Bacteroides thetaiotaomicron CAG:40 GN=BN644_01976 PE=4 SV=1	trR7TKD5R7TKD5_9BACE	10.536	16	96.75	UniProt	
o4	Uncharacterized protein OS=Bacteroides thetaiotaomicron GN=ycnE PE=4 SV=1	trA0A174HKL5A0A174HKL5_BACT4	10.522	16	96.75	UniProt	
o4	Putative monooxygenase YcnE OS=Bacteroides thetaiotaomicron GN=ycnE PE=4 SV=1	trA0A0P0FK48A0A0P0FK48_BACT4	10.535	16	96.75	UniProt	
o4	Uncharacterized protein OS=Bacteroides thetaiotaomicron dnlKV9 GN=C799_00462 PE=4 SV=1	trR9FHQ1R9FHQ1_BACT4	10.536	16	96.75	UniProt	
o4	Antibiotic biosynthesis monooxygenase OS=Bacteroides thetaiotaomicron GN=HMPRE2534_04044 PE=4 SV=1	trA0A139K022A0A139K022_BACT4	10.536	16	200.00	UniProt	
o4	Uncharacterized protein OS=Bacteroides thetaiotaomicron (strain ATCC 29148 / DSM 2079 / NCTC 10582 / E50 / VPL-5482) GN=BT_1428 PE=1 SV=1	trC8A7U6Q8A7U6_BACTN	10.536	16	200.00	UniProt	
o4	Antibiotic biosynthesis monooxygenase OS=Bacteroides thetaiotaomicron GN=ycnE PE=4 SV=1	trR7TKD5R7TKD5_9BACE	10.536	16	200.00	UniProt	
o4	Uncharacterized protein OS=Bacteroides thetaiotaomicron dnlKV9 GN=C799_00462 PE=4 SV=1	trR9FHQ1R9FHQ1_BACT4	10.536	16	200.00	UniProt	
o4	MULTISPECIES: antibiotic biosynthesis monooxygenase [Bacteroides] [gi:293468389.pep NP_810341.1] hypothetical protein BT_1428 [Bacteroides thetaiotaomicron VPI-5482] [gi:293387353 gh AAO76555.1] conserved hypothetical protein...	gi:496037841	10.536	16	121.01	NCBI	
o4	Chain A, Crystal Structure Of Conserved Protein Of Unknown Function From Bacteroides Thetaiotaomicron Vpi-5482 At 2.10 A Resolution, Possible Oxidoreductase	gi:88192927	10.771	16	121.01	NCBI	
o4	MULTISPECIES: antibiotic biosynthesis monooxygenase [Bacteroides] [gi:293468389.pep NP_810341.1] hypothetical protein BT_1428 [Bacteroides thetaiotaomicron VPI-5482] [gi:293387353 gh AAO76555.1] conserved hypothetical protein...	gi:496037841	10.536	16	67.23	NCBI	
o4	Chain A, Crystal Structure Of Conserved Protein Of Unknown Function From Bacteroides Thetaiotaomicron Vpi-5482 At 2.10 A Resolution, Possible Oxidoreductase	gi:88192927	10.771	16	67.23	NCBI	
Chaperonin proteins	c1	Chaperone protein DnaK OS=Bacteroides thetaiotaomicron GN=dnk2 PE=2 SV=1	trA0A174NIW8A0A174NIW8_BACT4	68.023	2	73.62	UniProt
	c1	Chaperone protein DnaK OS=Bacteroides thetaiotaomicron GN=dnk2_1 PE=2 SV=1	trA0A174VLW6A0A174VLW6_BACT4	68.421	2	73.62	UniProt
	c1	Chaperone protein DnaK OS=Bacteroides thetaiotaomicron GN=dnk2_1 PE=2 SV=1	trA0A0P0FN3A0A0P0FN3_BACT4	68.367	2	73.62	UniProt
	c1	Chaperone protein DnaK OS=Bacteroides thetaiotaomicron dnlKV9 GN=dnk1 PE=2 SV=1	trR9HG01R9HG01_BACT4	68.309	2	73.62	UniProt
c1	Chaperone protein DnaK OS=Bacteroides thetaiotaomicron (strain ATCC 29148 / DSM 2079 / NCTC 10582 / E50 / VPL-5482) GN=dnk1 PE=3 SV=1	trQ889YD61Q889YD61_BACTN	68.367	2	73.62	UniProt	

Cl	Protein	Accession	Length	Mass	PI	Inst
Other stress proteins	Chaperone protein DnaK	OS=Bacteroides thetaiotaomicron GN=dnak2 PE=2 SV=1	68321	7362	2	UnitProt
	Chaperone protein DnaK	OS=Bacteroides thetaiotaomicron GN=dnak PE=2 SV=1	68309	7362	2	UnitProt
	Chaperone protein DnaK	OS=Bacteroides thetaiotaomicron GN=dnak PE=3 SV=1	68367	9168	2	SwissProt
	MULTISPECIES: molecular chaperone DnaK [Bacteroides]gij29350023refNP_813526.1 molecular chaperone DnaK [Bacteroides thetaiotaomicron VPI-5482]gij33112274sqj089YWG.1 DnaK_BACTIN RecName: Full=Chaperone protein DnaK; A...	gij496040288	68367	10984	2	NCBI
	MULTISPECIES: molecular chaperone DnaK [Bacteroides]gij29262645gijEPI05509.1 chaperone protein DnaK [Bacteroides sp. 1.1.4]gij507740961gijE0800260.1 chaperone DnaK [Bacteroides thetaiotaomicron dnl.KV9]	gij496035845	68309	10984	2	NCBI
	Cationic outer membrane protein OS=Bacteroides thetaiotaomicron (strain ATCC 29148 / DSM 2079 / NCTC 10582 / E50 / VPI-5482) GN=BT_3724 PE=4 SV=1	ijfQ8AIE2 Q8A1E2_BACTIN	19170	8265	15	UnitProt
	Uncharacterized protein OS=Bacteroides thetaiotaomicron (strain ATCC 29148 / DSM 2079 / NCTC 10582 / E50 / VPI-5482) GN=BT_4595 PE=4 SV=1	ijfQ89YY5 Q89YY5_BACTIN	16262	7461	8	UnitProt
	SCOL/SenC OS=Bacteroides thetaiotaomicron GN=RS3882461_037f63 PE=4 SV=1	ijfA0A174SD45 A0A174SD45_BACTIN	16107	7461	8	UnitProt
	SCOL/SenC OS=Bacteroides thetaiotaomicron GN=RS3882557_00745 PE=4 SV=1	ijfA0A174NIM4 A0A174NIM4_BACTIN	16246	7461	8	UnitProt
	Uncharacterized protein OS=Bacteroides thetaiotaomicron GN=Btheta7330_03383 PE=4 SV=1	ijfA0A0P0FFM6 A0A0P0FFM6_BACTIN	16262	7461	8	UnitProt
	Uncharacterized protein OS=Bacteroides thetaiotaomicron CAG:40 GN=BN644_02251 PE=4 SV=1	ijfR7KM0R R7KM0_9BACE	16262	7461	8	UnitProt
	Uncharacterized protein OS=Bacteroides thetaiotaomicron dnl.KV9 GN=C799_02118 PE=4 SV=1	ijfR0F8C0 R0F8C0_BACTIN	16292	7461	8	UnitProt
	Hypothetical protein [Bacteroides thetaiotaomicron]gij507740973gijE0800272.1 hypothetical protein BT_4595 [Bacteroides thetaiotaomicron VPI-5482]gij298419.4 gijAAO79700.1 conserved hypothetical protein [Bacteroides thetaiotaomicron dnl.KV9]	gij511013816	16292	3036	8	NCBI
	MULTISPECIES: hypothetical protein [Bacteroides thetaiotaomicron]gij29350003refNP_813506.1 hypothetical protein BT_4595 [Bacteroides thetaiotaomicron VPI-5482]gij29350003refNP_813506.1 hypothetical protein BT_4595 [Bacteroides thetaiotaomicron VPI-5482]gij29350003refNP_813506.1 glutamate decarboxylase [Bacteroides thetaiotaomicron dnl.KV9]	gij499420894	54854	12561	7	NCBI
	Glutamate decarboxylase [Bacteroides thetaiotaomicron (strain ATCC 29148 / DSM 2079 / NCTC 10582 / E50 / VPI-5482) GN=pdkA PE=3 SV=1]	Q8A414 PCKA_BACTIN	59163	6875	3	SwissProt
	MULTISPECIES: phosphoenolpyruvate carboxylase [ATP] [Bacteroides]gij29348109refNP_811702.1 phosphoenolpyruvate carboxylase [Bacteroides thetaiotaomicron VPI-5482]gij31340265sqj Q8A414_PCKA_BACTIN RecName: Full=...	gij496037466	59163	9004	5	NCBI
	Phosphoenolpyruvate carboxylase [ATP] OS=Bacteroides thetaiotaomicron (strain ATCC 29148 / DSM 2079 / NCTC 10582 / E50 / VPI-5482) GN=pdkA PE=3 SV=1	sqjQ8A414 PCKA_BACTIN	59163	11066	3	UnitProt
	Phosphoenolpyruvate carboxylase [ATP] OS=Bacteroides thetaiotaomicron (strain ATCC 29148 / DSM 2079 / NCTC 10582 / E50 / VPI-5482) GN=pdkA PE=3 SV=1	ijfA0A0P0EUD6 A0A0P0EUD6_BACTIN	59163	11066	3	UnitProt
	Phosphoenolpyruvate carboxylase [ATP] OS=Bacteroides thetaiotaomicron dnl.KV9 GN=pdkA PE=3 SV=1	ijfR0F5E3 R0F5E3_BACTIN	59163	11066	3	UnitProt
	Phosphoenolpyruvate carboxylase [ATP] OS=Bacteroides thetaiotaomicron (strain ATCC 29148 / DSM 2079 / NCTC 10582 / E50 / VPI-5482) GN=pdkA PE=3 SV=1	sqjQ8A414 PCKA_BACTIN	59163	14022	5	UnitProt
Phosphoenolpyruvate carboxylase [ATP] OS=Bacteroides thetaiotaomicron dnl.KV9 GN=pdkA PE=3 SV=1	ijfA0A0P0EUD6 A0A0P0EUD6_BACTIN	59163	14022	5	UnitProt	
Phosphoenolpyruvate carboxylase [ATP] OS=Bacteroides thetaiotaomicron (strain ATCC 29148 / DSM 2079 / NCTC 10582 / E50 / VPI-5482) GN=pdkA PE=3 SV=1	ijfR0F5E3 R0F5E3_BACTIN	59163	14022	5	UnitProt	
MULTISPECIES: phosphoenolpyruvate carboxylase [ATP] [Bacteroides]gij29348109refNP_811702.1 phosphoenolpyruvate carboxylase [Bacteroides thetaiotaomicron VPI-5482]gij31340265sqj Q8A414_PCKA_BACTIN RecName: Full=...	Q8A414 PCKA_BACTIN	59163	8778	5	SwissProt	
PivA tetranucleotide repeat protein OS=Bacteroides thetaiotaomicron GN=IMPRE2534_045763 PE=4 SV=1	gij496037466	59163	6545	3	NCBI	
Tetranucleotide repeat protein OS=Bacteroides thetaiotaomicron GN=IMPRE2534_045763 PE=4 SV=1	ijfQ8A9E5 Q8A9E5_BACTIN	45444	5399	2	UnitProt	
Tetranucleotide repeat protein OS=Bacteroides thetaiotaomicron GN=Btheta7330_02553 PE=4 SV=1	ijfA0A139I27 A0A139I27_BACTIN	46320	5399	2	UnitProt	
Magnesium chelatase, subunit I OS=Bacteroides thetaiotaomicron (strain ATCC 29148 / DSM 2079 / NCTC 10582 / E50 / VPI-5482) GN=BT_0910 PE=4 SV=1	ijfA0A0P0EUD5 A0A0P0EUD5_BACTIN	46306	5399	2	UnitProt	
MoxR-like ATPase OS=Bacteroides thetaiotaomicron dnl.KV9 GN=C799_01160 PE=4 SV=1	ijfR9HLS8 R9HLS8_BACTIN	37406	13660	10	UnitProt	
Magnesium chelatase subunit I OS=Bacteroides thetaiotaomicron CAG:40 GN=BN644_02173 PE=4 SV=1	ijfR7KP20 R7KP20_9BACE	37406	13660	10	UnitProt	
ATPase RawA OS=Bacteroides thetaiotaomicron GN=rawA_1 PE=4 SV=1	ijfA0A0P0EUD3 A0A0P0EUD3_BACTIN	37406	13660	10	UnitProt	
ATPase [Bacteroides bacterium MSJ]	gij755016162	37265	5194	7	NCBI	
Lactate/malate dehydrogenase, NAD binding domain protein OS=Bacteroides thetaiotaomicron GN=mdh_2 PE=3 SV=1	ijfA0A0P0P9V9 A0A0P0P9V9_BACTIN	36425	8	10477	UnitProt	
Malate dehydrogenase OS=Bacteroides thetaiotaomicron (strain ATCC 29148 / DSM 2079 / NCTC 10582 / E50 / VPI-5482) GN=BT_2510 PE=3 SV=1	ijfQ8A4T7 Q8A4T7_BACTIN	36425	8	10477	UnitProt	
Malate dehydrogenase OS=Bacteroides thetaiotaomicron dnl.KV9 GN=C799_04790 PE=3 SV=1	ijfR9GYW5 R9GYW5_BACTIN	36425	8	10477	UnitProt	
Uncharacterized protein OS=Bacteroides thetaiotaomicron CAG:40 GN=BN644_01565 PE=3 SV=1	ijfR7K29R K29R_9BACE	36425	8	10477	UnitProt	
Malate dehydrogenase OS=Bacteroides thetaiotaomicron GN=mdh_1 PE=3 SV=1	ijfA0A174HIA3 A0A174HIA3_BACTIN	36450	8	10477	UnitProt	
MULTISPECIES: malate dehydrogenase [Bacteroides]gij29347920refNP_811423.1 malate dehydrogenase [Bacteroides thetaiotaomicron VPI-5482]gij29339822sqj AAO77617.1 malate dehydrogenase [Bacteroides thetaiotaomicron VPI-...	gij496039102	36425	9088	8	NCBI	
Lactate/malate dehydrogenase, NAD binding domain protein OS=Bacteroides thetaiotaomicron GN=mdh_2 PE=3 SV=1	ijfA0A0P0P9V9 A0A0P0P9V9_BACTIN	36425	12414	8	UnitProt	
Malate dehydrogenase OS=Bacteroides thetaiotaomicron (strain ATCC 29148 / DSM 2079 / NCTC 10582 / E50 / VPI-5482) GN=BT_2510 PE=3 SV=1	ijfQ8A4T7 Q8A4T7_BACTIN	36425	12414	8	UnitProt	
Malate dehydrogenase OS=Bacteroides thetaiotaomicron dnl.KV9 GN=C799_04790 PE=3 SV=1	ijfR9GYW5 R9GYW5_BACTIN	36425	12414	8	UnitProt	
Uncharacterized protein OS=Bacteroides thetaiotaomicron CAG:40 GN=BN644_01565 PE=3 SV=1	ijfR7K29R K29R_9BACE	36425	12414	8	UnitProt	
Malate dehydrogenase OS=Bacteroides thetaiotaomicron GN=mdh_1 PE=3 SV=1	ijfA0A174HIA3 A0A174HIA3_BACTIN	36450	12414	8	UnitProt	
Glyceralddehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Bacteroides thetaiotaomicron dnl.KV9 GN=C799_02511 PE=3 SV=1	ijfR9PFE5 R9PFE5_BACTIN	35872	24005	11	UnitProt	

672 Table S6. Proteins of the extract obtained from the culture of *Bacteroides thetaiotaomicron* ATCC 29741, that migrated on a gel with an isoelectric point gradient from 3
 673 to 10 and identified by the technique of peptide mapping by mass through the search algorithm « Mascot »
 674 (http://www.matrixscience.com/cgi/search_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=PMF)

Protein family		Data				Research algorithm: Mascot			
Spot no.	Definition	Theoretical pI	Theoretical MW (kDa)	Nb	Rank	Probability mowse score (signification threshold)	ppm	-10lgP	Database
Other proteins	WP_016268477.1-TypeI.glyceraldéhyde-3-phosphate-déshydrogénase [Bacteroides thetaiotaomicron]	5.87	36.134	8	1	92.02	42.6	0.048	NCBI

675 **Legend.** In the algorithm Mascot with the SwissProt and NCBI "National Center for Biotechnology Information" database, protein identification is
 676 "significant" if the probability mowse score is greater than the signification threshold where P is the probability that the observed match is a random event.
 677 (Spot no.) spot number. (MW) molecular weight. (Nb) number of experimental peptides recognized. Maximum ≠ between theoretical/experimental masses =
 678 maximum difference between theoretical peptide masses and experimental ones, expressed in ppm (parts per million).
 679

Table S7. Proteins of the extract obtained from the co-culture of *Bacteroides thetaiotaomicron* ATCC 29741 and *Kluyveromyces marxianus* S-02-5, that migrated on a gel with an isoelectric point gradient from 3 to 10 and identified by the technique of peptide mapping by mass through the search algorithm « PEAKS »

Protein family	Spot no.	Data		Accession number: NCBI reference sequence (version)	Theoretical MW (kDa)	Sequence coverage (%)	-10lgP	Database
		Definition	Research algorithm: PEAKS					
Oxidative stress proteins	BT-01	Superoxide dismutase OS=Bacteroides thetaiotaomicron (strain ATCC 29148 / DSM 2079 / NCTC 10582 / E50 / VPI-5482) GN=BT_0655 PE=3 SV=1	BT-01	gi884410 Q8AA10 BACTIN	21.776	28	200.41	UniProt
	BT-01	Superoxide dismutase OS=Bacteroides thetaiotaomicron GN=modB PE=3 SV=1	BT-01	gi400174 L0V1 JA0A174L0V1 BACT4	21.776	27	200.41	UniProt
	BT-01	Superoxide dismutase OS=Bacteroides thetaiotaomicron GN=modB PE=3 SV=1	BT-01	gi400174 B3E0 JA0A174B3E0 BACT4	23.150	27	200.41	UniProt
	BT-01	Superoxide dismutase OS=Bacteroides thetaiotaomicron dnlKV9 GN=C799_00839 PE=3 SV=1	BT-01	gi909HF0R9R9HF0 BACT4	23.138	27	200.41	UniProt
	BT-01	Superoxide dismutase OS=Bacteroides thetaiotaomicron GN=modB PE=3 SV=1	BT-01	gi400174 A0A0174A0A174A0A174RM01 BACT4	23.138	27	200.41	UniProt
	BT-01	Superoxide dismutase OS=Bacteroides thetaiotaomicron GN=modB PE=3 SV=1	BT-01	gi400174 KZC8 R7KZC8_9BACE	23.139	27	200.41	UniProt
	BT-01	Superoxide dismutase [Bacteroides thetaiotaomicron] gi29340065 fnp_809568 1 superoxide dismutase [Bacteroides thetaiotaomicron VPI-5482] gi29337959 gbl AAO75762 1 superoxide dismutase (Fe) [Bacteroides thetaiotaomicron...]	BT-01	gi499419912	21.776	23	77.43	NCBI
	BT-01	MULTISPECIES: superoxide dismutase [Bacteroides thetaiotaomicron dnlKV9] superoxide dismutase [Fe] [Bacteroides sp. 1.1.14] gi507743658 gbl E0802787 1 superoxide dismutase [Fe] [Bacteroides thetaiotaomicron dnlKV9]...	BT-01	gi490036821	23.138	21	77.43	NCBI
	BT-02	Superoxide dismutase OS=Bacteroides thetaiotaomicron (strain ATCC 29148 / DSM 2079 / NCTC 10582 / E50 / VPI-5482) GN=BT_0655 PE=3 SV=1	BT-02	gi884410 Q8AA10 BACTIN	21.776	5	55.50	UniProt
	BT-02	Superoxide dismutase OS=Bacteroides thetaiotaomicron GN=modB PE=3 SV=1	BT-02	gi400174 L0V1 JA0A174L0V1 BACT4	23.150	4	55.50	UniProt
	BT-02	Superoxide dismutase OS=Bacteroides thetaiotaomicron GN=modB PE=3 SV=1	BT-02	gi400174 B3E0 JA0A174B3E0 BACT4	23.154	4	55.50	UniProt
	BT-02	Superoxide dismutase OS=Bacteroides thetaiotaomicron dnlKV9 GN=C799_00839 PE=3 SV=1	BT-02	gi909HF0R9R9HF0 BACT4	23.138	4	55.50	UniProt
	BT-02	Superoxide dismutase OS=Bacteroides thetaiotaomicron GN=modB PE=3 SV=1	BT-02	gi400174 A0A0174A0A174A0A174RM01 BACT4	23.138	4	55.50	UniProt
	BT-02	Superoxide dismutase OS=Bacteroides thetaiotaomicron GN=modB PE=3 SV=1	BT-02	gi400174 KZC8 R7KZC8_9BACE	23.138	4	55.50	UniProt
	BT-02	Superoxide dismutase [Bacteroides thetaiotaomicron] gi29340065 fnp_809568 1 superoxide dismutase [Bacteroides thetaiotaomicron VPI-5482] gi29337959 gbl AAO75762 1 superoxide dismutase (Fe) [Bacteroides thetaiotaomicron...]	BT-02	gi755016645	23.121	5	52.50	NCBI
	BT-03	Uncharacterized protein OS=Bacteroides thetaiotaomicron dnlKV9 GN=C799_03542 PE=4 SV=1	BT-03	gi909HF0R9R9HF0 BACT4	21.737	7	89.76	UniProt
	BT-03	Rubrythrin OS=Bacteroides thetaiotaomicron CAG:40 GN=BN644_03382 PE=4 SV=1	BT-03	gi7K7W1J R7KWL1_9BACE	21.737	7	89.76	UniProt
	BT-03	Rubrythrin OS=Bacteroides thetaiotaomicron (strain ATCC 29148 / DSM 2079 / NCTC 10582 / E50 / VPI-5482) GN=BT_3182 PE=4 SV=1	BT-03	giQ8A2X3 Q8A2X3 BACTIN	21.737	7	89.76	UniProt
	BT-03	Rubrythrin OS=Bacteroides thetaiotaomicron GN=modB PE=3 SV=1	BT-03	gi400174 A0A0174A0A174A0A174RM01 BACT4	21.737	7	89.76	UniProt
	BT-03	Rubrythrin OS=Bacteroides thetaiotaomicron GN=modB PE=3 SV=1	BT-03	gi400174 KZC8 R7KZC8_9BACE	21.737	7	89.76	UniProt
	BT-03	Uncharacterized protein OS=Bacteroides thetaiotaomicron dnlKV9 GN=C799_03542 PE=4 SV=1	BT-03	gi909HF0R9R9HF0 BACT4	21.737	7	200.00	UniProt
	BT-03	Rubrythrin OS=Bacteroides thetaiotaomicron GN=modB PE=3 SV=1	BT-03	gi7K7W1J R7KWL1_9BACE	21.737	7	200.00	UniProt
	BT-03	Rubrythrin OS=Bacteroides thetaiotaomicron CAG:40 GN=BN644_03382 PE=4 SV=1	BT-03	gi7K7W1J R7KWL1_9BACE	21.737	7	200.00	UniProt
	BT-03	Putative rubrythrin OS=Bacteroides thetaiotaomicron GN=modB PE=3 SV=1	BT-03	gi400174 XIX9 JA0A174XIX9 BACT4	21.704	7	200.00	UniProt
	BT-03	MULTISPECIES: rubrythrin [Bacteroides thetaiotaomicron (strain ATCC 29148 / DSM 2079 / NCTC 10582 / E50 / VPI-5482) GN=BT_3182 PE=4 SV=1] rubrythrin [Bacteroides thetaiotaomicron VPI-5482] gi29340496 gbl AAO78288 1 rubrythrin [Bacteroides thetaiotaomicron VPI-5482] gi251841088 gbl E...	BT-03	gi490036827	21.737	7	79.43	NCBI
	BT-04	Probable thiol peroxidase OS=Bacteroides thetaiotaomicron GN=modB PE=3 SV=1	BT-04	gi400174 A0A0174A0A174A0A174RM01 BACT4	18.118	51	199.88	UniProt
	BT-04	Probable thiol peroxidase OS=Bacteroides thetaiotaomicron dnlKV9 GN=modB PE=3 SV=1	BT-04	gi909HF0R9R9HF0 BACT4	18.118	51	199.88	UniProt
	BT-04	MULTISPECIES: lipid hydroperoxide peroxidase [Bacteroides thetaiotaomicron dnlKV9 GN=modB PE=3 SV=1] hydroperoxide peroxidase [Bacteroides sp. 1.1.14] gi507743658 gbl E0802787 1 thiol peroxidase [Bacteroides sp. 1.1.14] gi507743658 gbl E0802787 1	BT-04	gi490037935	18.118	51	181.30	NCBI
	BT-05	Probable thiol peroxidase OS=Bacteroides thetaiotaomicron GN=modB PE=3 SV=1	BT-05	gi7R7L N6R7 LN6_9BACE	9.620	55	139.90	UniProt
	BT-05	Probable thiol peroxidase OS=Bacteroides thetaiotaomicron CAG:40 GN=BN644_06854 PE=4 SV=1	BT-05	gi400174 A0A0174A0A174A0A174RM01 BACT4	18.118	29	139.90	UniProt
	BT-05	Probable thiol peroxidase OS=Bacteroides thetaiotaomicron dnlKV9 GN=modB PE=3 SV=1	BT-05	gi909HF0R9R9HF0 BACT4	18.118	29	139.90	UniProt
	BT-05	Probable thiol peroxidase OS=Bacteroides thetaiotaomicron GN=modB PE=3 SV=1	BT-05	gi400174 H888 A0A174H888 BACT4	18.104	29	139.90	UniProt
	BT-05	Probable thiol peroxidase OS=Bacteroides thetaiotaomicron (strain ATCC 29148 / DSM 2079 / NCTC 10582 / E50 / VPI-5482) GN=modB PE=3 SV=1	BT-05	gi400174 H888 A0A174H888 BACT4	18.104	29	139.90	UniProt
BT-05	Thiol peroxidase [Bacteroides thetaiotaomicron CAG:40] gi29340496 gbl AAO78288 1 thiol peroxidase [Bacteroides thetaiotaomicron VPI-5482] gi29337959 gbl AAO75762 1 thiol peroxidase [Bacteroides thetaiotaomicron VPI-5482] gi29337959 gbl AAO75762 1	BT-05	gi498224405	9.620	55	136.78	NCBI	
BT-05	MULTISPECIES: lipid hydroperoxide peroxidase [Bacteroides thetaiotaomicron VPI-5482] gi29337959 gbl AAO75762 1 putative thiol peroxidase [Bacteroides thetaiotaomicron VPI-5482] gi29337959 gbl AAO75762 1	BT-05	gi498224405	18.104	29	136.78	NCBI	

BT-p5	MULTISPECIES: hypothetical protein [Bacteroides]gij298201806g EF104672.1 tetranicopeptide repeat family protein [Bacteroides sp. 1.1.14]gij507742938g E0802034.1 hypothetical protein C-799_01149 [Bacteroides thetaiotaomicron]...	g 496037057	46.320	2	37.78	NCBI
BT-p5	Hypothetical protein [Bacteroides sp. 1.1.6]gij251842342g EES70422.1 hypothetical protein BSFG_0695 [Bacteroides sp. 1.1.6]	g 496041221	46.306	2	37.78	NCBI
BT-p5	Hypothetical protein [Bacteroides thetaiotaomicron]gij2934631 ref NP_809813.1 hypothetical protein BT_0900 [Bacteroides thetaiotaomicron VPI-5482]gij29338205g AAO76007.1 putative tetranicopeptide repeat family pro...	g 4959420048	45.444	2	33.20	NCBI
BT-p5	Uncharacterized protein BN772_01791 [Bacteroides sp. CAG:754]	g 524328669	46.398	2	33.20	NCBI
BT-p5	Hypothetical protein [Bacteroides sp. D2]gij313692470g EF329805.1 hypothetical protein BSFG_0005 [Bacteroides sp. D2]	g 4960287600	46.463	2	33.20	NCBI
BT-p5	MULTISPECIES: hypothetical protein [Bacteroides]gij29944159g E0495950.1 tetranicopeptide repeat protein [Bacteroides sp. D1]gij2623354918g E04010.1 tetranicopeptide repeat protein [Bacteroides sp. 2.1.22]gij2...	g 490443568	46.536	2	33.20	NCBI
BT-p5	MULTISPECIES: hypothetical protein [Bacteroides]gij298201806g EF104672.1 tetranicopeptide repeat family protein [Bacteroides sp. 1.1.14]gij507742938g E0802034.1 hypothetical protein C-799_01149 [Bacteroides thetaiotaomicron]...	g 496037057	46.320	2	33.20	NCBI
BT-p5	Lactate/malate dehydrogenase, NAD binding domain protein OS=Bacteroides thetaiotaomicron GN=mdh_2 [PE=3 SV=1]	g 496041221	46.306	2	33.20	NCBI
BT-p6	Malate dehydrogenase OS=Bacteroides thetaiotaomicron dnl.KY9 GN=C799_04790 [PE=3 SV=1]	h A0A0P0F9V9 A0A0P0F9V9_BACT74	36.425	4	105.79	UnitProt
BT-p6	Uncharacterized protein OS=Bacteroides thetaiotaomicron CAG:40 GN=BN644_01565 [PE=3 SV=1]	h RSGYW5 JRSGYW5_BACT74	36.425	4	105.79	UnitProt
BT-p6	Malate dehydrogenase OS=Bacteroides thetaiotaomicron (strain ATCC 29148 / DSM 2079 / NCTC 10582 / E50 / VPI-5482) GN=BT_2510 [PE=3 SV=1]	h RKI29R 7K129_9BACE	36.425	4	105.79	UnitProt
BT-p6	Lactate/malate dehydrogenase OS=Bacteroides thetaiotaomicron GN=mdh_1 [PE=3 SV=1]	h A0A174H1A3 A0A174H1A3_BACT74	36.450	4	105.79	UnitProt
BT-p6	Malate dehydrogenase OS=Bacteroides thetaiotaomicron dnl.KY9 GN=C799_04790 [PE=3 SV=1]	h A0A0P0F9V9 A0A0P0F9V9_BACT74	36.425	4	94.80	UnitProt
BT-p6	Uncharacterized protein OS=Bacteroides thetaiotaomicron CAG:40 GN=BN644_01565 [PE=3 SV=1]	h RKI29R 7K129_9BACE	36.425	4	94.80	UnitProt
BT-p6	Malate dehydrogenase OS=Bacteroides thetaiotaomicron (strain ATCC 29148 / DSM 2079 / NCTC 10582 / E50 / VPI-5482) GN=BT_2510 [PE=3 SV=1]	h C8A417 C8A417_BACTIN	36.425	4	94.80	UnitProt
BT-p6	Malate dehydrogenase OS=Bacteroides thetaiotaomicron GN=mdh_1 [PE=3 SV=1]	h A0A174H1A3 A0A174H1A3_BACT74	36.450	4	94.80	UnitProt
BT-p7	Lactate/malate dehydrogenase, NAD binding domain protein OS=Bacteroides thetaiotaomicron GN=mdh_2 [PE=3 SV=1]	h A0A0P0F9V9 A0A0P0F9V9_BACT74	36.425	21	170.07	UnitProt
BT-p7	Uncharacterized protein OS=Bacteroides thetaiotaomicron CAG:40 GN=BN644_01565 [PE=3 SV=1]	h RKI29R 7K129_9BACE	36.425	21	170.07	UnitProt
BT-p7	Malate dehydrogenase OS=Bacteroides thetaiotaomicron (strain ATCC 29148 / DSM 2079 / NCTC 10582 / E50 / VPI-5482) GN=BT_2510 [PE=3 SV=1]	h C8A417 C8A417_BACTIN	36.425	21	170.07	UnitProt
BT-p7	Malate dehydrogenase OS=Bacteroides thetaiotaomicron dnl.KY9 GN=C799_04790 [PE=3 SV=1]	h RSGYW5 JRSGYW5_BACT74	36.425	21	170.07	UnitProt
BT-p7	MULTISPECIES: malate dehydrogenase [Bacteroides]gij29347920 ref NP_811423.1 malate dehydrogenase [Bacteroides thetaiotaomicron VPI-5482]gij29339822g AAO77617.1 malate dehydrogenase [Bacteroides thetaiotaomicron VPI-5482]...	g 496039102	36.425	21	190.39	NCBI
BT-p8	Lactate/malate dehydrogenase, NAD binding domain protein OS=Bacteroides thetaiotaomicron GN=mdh_2 [PE=3 SV=1]	h A0A0P0F9V9 A0A0P0F9V9_BACT74	36.425	15	199.73	UnitProt
BT-p8	Malate dehydrogenase OS=Bacteroides thetaiotaomicron (strain ATCC 29148 / DSM 2079 / NCTC 10582 / E50 / VPI-5482) GN=BT_2510 [PE=3 SV=1]	h C8A417 C8A417_BACTIN	36.425	15	199.73	UnitProt
BT-p8	Malate dehydrogenase OS=Bacteroides thetaiotaomicron dnl.KY9 GN=C799_04790 [PE=3 SV=1]	h RSGYW5 JRSGYW5_BACT74	36.425	15	199.73	UnitProt
BT-p8	Uncharacterized protein OS=Bacteroides thetaiotaomicron CAG:40 GN=BN644_01565 [PE=3 SV=1]	h RKI29R 7K129_9BACE	36.425	15	199.73	UnitProt
BT-p8	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Bacteroides thetaiotaomicron dnl.KY9 GN=C799_02511 [PE=3 SV=1]	h R919E5 R919E5_BACT74	35.872	8	136.49	UnitProt
BT-p8	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Bacteroides thetaiotaomicron GN=HMPREF2534_05031 [PE=3 SV=1]	h A0A1390SA2 A0A1390SA2_BACT74	35.872	8	136.49	UnitProt
BT-p8	MULTISPECIES: malate dehydrogenase [Bacteroides]gij29347920 ref NP_811423.1 malate dehydrogenase [Bacteroides thetaiotaomicron VPI-5482]gij29339822g AAO77617.1 malate dehydrogenase [Bacteroides thetaiotaomicron VPI-5482]...	g 496039102	36.425	15	73.26	NCBI
BT-p9	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Bacteroides thetaiotaomicron GN=HMPREF2534_05031 [PE=3 SV=1]	h R919E5 R919E5_BACT74	35.872	11	150.48	UnitProt
BT-p9	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Bacteroides thetaiotaomicron dnl.KY9 GN=C799_02511 [PE=3 SV=1]	h A0A1390SA2 A0A1390SA2_BACT74	35.872	11	150.48	UnitProt
BT-p9	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [Bacteroides]gij29347920 ref NP_811423.1 malate dehydrogenase [Bacteroides thetaiotaomicron VPI-5482]gij29339822g AAO77617.1 malate dehydrogenase [Bacteroides thetaiotaomicron VPI-5482]...	g 511014083	35.872	11	113.66	NCBI
BT-p10	Choloyglycine hydrolase OS=Bacteroides thetaiotaomicron GN=bbh_1 [PE=4 SV=1]	h A0A174Q0R6 A0A174Q0R6_BACT74	39.239	18	124.08	UnitProt
BT-p10	Choloyglycine hydrolase OS=Bacteroides thetaiotaomicron (strain ATCC 29148 / DSM 2079 / NCTC 10582 / E50 / VPI-5482) GN=BT_2086 [PE=1 SV=1]	h C8A600 C8A600_BACTIN	39.167	18	124.08	UnitProt
BT-p10	Choloyglycine hydrolase OS=Bacteroides thetaiotaomicron GN=bbh_1 [PE=4 SV=1]	h A0A0P0E1E5 A0A0P0E1E5_BACT74	39.167	18	124.08	UnitProt
BT-p10	Choloyglycine hydrolase OS=Bacteroides thetaiotaomicron CAG:40 GN=BN644_02566 [PE=4 SV=1]	h RKZ1R 7KZ1R_9BACE	39.167	18	124.08	UnitProt
BT-p10	Uncharacterized protein OS=Bacteroides thetaiotaomicron dnl.KY9 GN=C799_04211 [PE=4 SV=1]	h R919E5 R919E5_BACT74	39.149	18	124.08	UnitProt
BT-p11	Glutaminase OS=Bacteroides thetaiotaomicron GN=gbaA [PE=3 SV=1]	h A0A1591W01 A0A1591W01_BACT74	34.245	3	49.54	UnitProt
BT-p11	Glutaminase OS=Bacteroides thetaiotaomicron GN=gbaA [PE=3 SV=1]	h A0A174RMA2 A0A174RMA2_BACT74	34.259	3	49.54	UnitProt
BT-p11	MULTISPECIES: glutaminase [Bacteroides]gij29347920 ref NP_811484.1 glutaminase [Bacteroides thetaiotaomicron VPI-5482]gij47605693g C8A4M8.1 G1.SA_BACTIN RecName: Full=Glutaminase [Bacteroides thetaiotaomicron VPI-5482]...	g 496040698	34.245	3	44.16	NCBI
BT-p12	2,3-bisphosphoglycerate-dependent phosphoglycerate mutase OS=Bacteroides thetaiotaomicron CAG:40 GN=gpmaA [PE=3 SV=1]	h RKI29R 7K129_9BACE	28.753	20	150.75	UnitProt
BT-p12	2,3-bisphosphoglycerate-dependent phosphoglycerate mutase OS=Bacteroides thetaiotaomicron GN=gpmaA [PE=3 SV=1]	h A0A1390XU9 A0A1390XU9_BACT74	28.809	20	150.75	UnitProt

Table S8. Proteins of the extract obtained from the co-culture of *Bacteroides thetaiotaomicron* ATCC 29741 and *Kluyveromyces marxianus* S-02-5, that migrated on a gel with an isoelectric point gradient from 3 to 10 and identified by the technique of peptide mapping by mass through the search algorithm « Mascot » (http://www.matrixscience.com/cgi/search_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=PMF)

Protein family	Spot no.	Definition	Research algorithm: Mascot									
			Sequence coverage (%)	Theoretical pI	Theoretical MW (kDa)	Nb	Rank	Probability mowse score (signification threshold)	ppm	-10lgP	Database	
Oxidative stress proteins	BT-s6	WP_008762442.1.MULTISPECIES: 2-Cys peroxidoxin [Bacteroides]	62	5.28	18.221	9	1	101(92)	38	0.0065	NCBI	
	BT-s5	WP_010539043.1.MULTISPECIES: molecular chaperone GroES [Bacteroides]	78	5.09	9.654	9	1	114(92)	19.6	0.00633	NCBI	
Chaperonin proteins	BT-s5	CH10_BACTN_10kDa chaperonin OS=Bacteroides thetaiotaomicron (strain ATCC 29148/DSM 2079/NCTC 10582)/E50/VPI-5482) GN=groS PE=3 SV=1	78	5.09	9.654	9	1	114(88)	19.6	1.3E-6	SwissProt	
	BT-s1	WP_008765204.1.MULTISPECIES: glutamate decarboxylase [Bacteroides]	22	6.16	55.118	13	1	98(92)	28.5	0.0014	NCBI	
Other proteins	BT-p3	PCKA_BACTN-Phosphoenolpyruvate carboxylase (ATP) OS=Bacteroides thetaiotaomicron (strain ATCC 29148/DSM 2079/NCTC 10582/E50/VPI-5482) GN=pckA PE=3 SV=1	28	5.47	59.582	16	1	70(68)	73.2	0.031	SwissProt	
	BT-p4	WP_008761973.1.MULTISPECIES: phosphoenolpyruvate carboxylase (ATP) [Bacteroides]	42	5.47	59.582	14	1	156(92)	19	2.0E-8	NCBI	
	BT-p4	PCKA_BACTN-Phosphoenolpyruvate carboxylase (ATP) OS=Bacteroides thetaiotaomicron (strain ATCC 29148/DSM 2079/NCTC 10582/E50/VPI-5482) GN=pckA PE=3 SV=1	42	5.47	59.582	14	1	156(88)	19	8.4e-11	SwissProt	
	BT-p6	WP_004314987.1.MULTISPECIES: malate dehydrogenase [Bacteroides]	41	5.56	36.726	12	1	129(92)	27.3	1.0E5	NCBI	
	BT-p7	WP_004314987.1.MULTISPECIES: malate dehydrogenase [Bacteroides]	41	5.56	36.726	12	1	115(92)	25	0.00026	NCBI	
	BT-p9	WP_016268477.1-type I glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [Bacteroides thetaiotaomicron]	42	5.87	36.134	11	1	92(92)	51.9	0.048	NCBI	
	BT-p10	WP_008761025.1-choloyglycine hydrolase [Bacteroides thetaiotaomicron]	37	8.59	39.256	15	1	110(92)	36.2	0.00083	NCBI	

Legend. In the algorithm Mascot with the SwissProt and NCBI "National Center for Biotechnology Information" database, protein identification is "significant" if the probability mowse score is greater than the signification threshold where P is the probability that the observed match is a random event. (Spot no.) spot number. (MW) molecular weight. (Nb) number of experimental peptides recognized. Maximum ≠ between theoretical/experimental masses = maximum difference between the theoretical peptide masses and experimental ones, expressed in ppm (parts per million).

Table S9. Proteins of the extract obtained from the culture of *Kluyveromyces marxianus* S-02-5, that migrated on a gel with an isoelectric point gradient from 3 to 10 and identified by the technique of peptide mapping by mass through the search algorithm « PEAKS »

Protein family	Spot no	Definition	Research algorithm: PEAKS				
			Accession number: NCBI reference sequence (version)	Theoretical pI (pI) (kDa)	Sequence coverage (%)	-log ₁₀ Database	
Oxidative stress proteins	o1	NADPH-dependent alpha-keto amide reductase [Kluyveromyces marxianus]	g169390411	35.371	4	22.34	NCBI
	o1	NADPH-dependent alpha-keto amide reductase [Kluyveromyces marxianus DMKU13-1042]	g1574143982	35.401	4	22.34	NCBI
	o1	NADPH-dependent alpha-keto amide reductase [Kluyveromyces marxianus DMKU13-1042]	g1574143982	35.401	9	43.02	NCBI
	o2	XylI [Kluyveromyces marxianus]	g1844287320	37.458	17	122.17	NCBI
	o2	XylII [Kluyveromyces marxianus]	g1844287320	37.398	17	122.17	NCBI
	o2	Xylose reductase [Kluyveromyces marxianus]	g1319998017	37.445	17	122.17	NCBI
	o2	NADPH-dependent xylose reductase [Kluyveromyces marxianus]	g1574140510	37.444	17	122.17	NCBI
	o2	NADPH-dependent xylose reductase [Kluyveromyces marxianus]	g1844287320	37.458	17	127.74	NCBI
	o2	NADPH-dependent xylose reductase [Kluyveromyces marxianus]	g1574140510	37.444	17	127.74	NCBI
	o2	NADPH-dependent xylose reductase [Kluyveromyces marxianus]	g1319998017	37.445	17	127.74	NCBI
Other stress proteins	s1	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase [Kluyveromyces marxianus]	g1574143364	17.362	23	92.23	NCBI
	s1	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase [Kluyveromyces marxianus]	g1574143364	17.362	15	85.76	NCBI
	s2	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase [Kluyveromyces marxianus]	g1574143364	17.362	23	92.23	NCBI
	p1	Enolase [Kluyveromyces marxianus]	g1574140289	46.802	16	187.66	NCBI
	p1	Enolase [Kluyveromyces marxianus]	g1574140289	46.802	16	187.66	NCBI
	p2	Enolase [Kluyveromyces marxianus]	g1574140289	46.802	14	139.28	NCBI
	p2	Enolase [Kluyveromyces marxianus]	g1574140289	46.802	14	139.28	NCBI
	p2	Enolase [Kluyveromyces marxianus]	g1574140289	46.802	14	139.28	NCBI
	p2	Enolase [Kluyveromyces marxianus]	g1574140289	46.802	14	139.28	NCBI
	p2	Enolase [Kluyveromyces marxianus]	g1574140289	46.802	14	139.28	NCBI
Other proteins	p10	Enolase reductase [Kluyveromyces marxianus]	g1574140285	45.932	7	68.23	NCBI
	p10	Enolase reductase [Kluyveromyces marxianus]	g1574140285	45.932	7	68.23	NCBI
	p10	Enolase reductase [Kluyveromyces marxianus]	g1574140285	45.932	7	68.23	NCBI
	p10	Enolase reductase [Kluyveromyces marxianus]	g1574140285	45.932	7	68.23	NCBI
	p10	Enolase reductase [Kluyveromyces marxianus]	g1574140285	45.932	7	68.23	NCBI
	p10	Enolase reductase [Kluyveromyces marxianus]	g1574140285	45.932	7	68.23	NCBI
	p10	Enolase reductase [Kluyveromyces marxianus]	g1574140285	45.932	7	68.23	NCBI
	p10	Enolase reductase [Kluyveromyces marxianus]	g1574140285	45.932	7	68.23	NCBI
	p10	Enolase reductase [Kluyveromyces marxianus]	g1574140285	45.932	7	68.23	NCBI
	p10	Enolase reductase [Kluyveromyces marxianus]	g1574140285	45.932	7	68.23	NCBI
Serum albumin cont of	control	Albumin [Bos taurus]	g16264849	66.463	17	141.98	NCBI
	control	Albumin [Bos taurus]	g16264849	66.463	17	141.98	NCBI
	control	Albumin [Bos taurus]	g16264849	66.463	17	141.98	NCBI
	control	Albumin [Bos taurus]	g16264849	66.463	17	141.98	NCBI
	control	Albumin [Bos taurus]	g16264849	66.463	17	141.98	NCBI
	control	Albumin [Bos taurus]	g16264849	66.463	17	141.98	NCBI
	control	Albumin [Bos taurus]	g16264849	66.463	17	141.98	NCBI
	control	Albumin [Bos taurus]	g16264849	66.463	17	141.98	NCBI
	control	Albumin [Bos taurus]	g16264849	66.463	17	141.98	NCBI
	control	Albumin [Bos taurus]	g16264849	66.463	17	141.98	NCBI

695 696 Legend. In the algorithm PEAKS with the UniProt, SwissProt, NCBI "National Center for Biotechnology Information" databases, protein identification is "significant" if the (-log₁₀P) score is greater than the peptide hit threshold (30.0). P is the probability that the observed match is a random event. (Spot no.) spot number. (MW) molecular weight.

697 **Table S10. Proteins of the extract obtained from the culture of *Kluyveromyces marxianus* S-02-5, that migrated on a gel with an isoelectric point gradient from 3 to 10 and identified by the**
 698 **technique of peptide mapping by mass through the search algorithm « Mascot » (http://www.matrixscience.com/cgi/search_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=PMF)**

Protein family	Spot no.	Data				Research algorithm: Mascot					
		Definition	Sequence coverage (%)	Theoretical pI	Theoretical MW (kDa)	Nb	Rank	Probability mouse score (signification threshold)	ppm	-10logP	Database
Oxidative stress proteins	o2	ADY91498.1 xylose reductase [Kluyveromyces marxianus]	39	5.39	37.536	9	1	97(81)	14.2	0.0014	NCBI
	p5	BAO38084.1 enolase [Kluyveromyces marxianus] DMKU3-1042]	37	5.74	46.830	10	1	115(81)	16.3	2.1e-05	NCBI
	p7	BAO38081.1 enolase [Kluyveromyces marxianus] DMKU3-1042]	46	5.74	46.830	13	1	146(81)	12.2	1.6e-08	NCBI
Other proteins	p8	BAO38084.1 enolase [Kluyveromyces marxianus] DMKU3-1042]	32	5.74	46.830	10	1	102(81)	14.1	0.00041	NCBI
	p9	BAO38162.1 phosphoserine kinase [Kluyveromyces marxianus] DMKU3-1042]	39	6.28	44.475	9	1	105(81)	49.5	0.00021	NCBI
	p11	BAO38162.1 phosphoserine kinase [Kluyveromyces marxianus] DMKU3-1042]	42	6.28	44.475	12	1	138(81)	18.3	1.0e-7	NCBI
	p13	BAO38162.1 phosphoserine kinase [Kluyveromyces marxianus] DMKU3-1042]	37	6.28	44.475	9	1	99(81)	40	0.00086	NCBI
	p16	BAP70103.1 phosphoserate mutase [Kluyveromyces marxianus]	48	6.32	27.480	11	1	143(81)	49.6	3.3e-08	NCBI
	p17	BAP70103.1 phosphoserate mutase [Kluyveromyces marxianus]	52	6.32	27.480	13	1	151(81)	45.6	5.2E-9	NCBI
	p18	BAP70103.1 phosphoserate mutase [Kluyveromyces marxianus]	40	6.32	27.480	9	1	100(81)	39.2	0.00065	NCBI

699 **Legend. In the algorithm Mascot with the SwissProt and NCBI "National Center for Biotechnology Information" database, protein identification is "significant" if the probability**
 700 **mouse score is greater than the significance threshold where P is the probability that the observed match is a random event. (Spot no.) spot number. (MW) molecular weight. (Nb)**
 701 **number of experimental peptides recognized. Maximum ≠ between theoretical/experimental masses = maximum difference between theoretical peptide masses and experimental**
 702 **ones, expressed in ppm (parts per million).**

Conclusions générales

L'analyse comparée de tous les résultats précédents permet de définir des conclusions et hypothèses globales sur les levures antagonistes à potentiels probiotiques, mais également une comparaison entre les méthodologies utilisées. Ainsi, une conclusion sur la différence entre l'approche culture-dépendante et l'approche métagénomique sera exprimée, additionnée des conclusions sur la composition des écosystèmes fongiques et bactériens. S'en suivra une conclusion sur les capacités antagonistes des levures de la Tomme d'Orchies et une conclusion sur le potentiel probiotique de ces souches.

1. ÉTUDES DES ÉCOSYSTÈMES PAR UNE APPROCHE MÉTAGÉNOMIQUE ET UNE APPROCHE CULTURE-DÉPENDANTE

1.1. Comparaison de méthodes et résultats obtenus

Deux approches peuvent être utilisées pour étudier les écosystèmes microbiens. L'approche culture-dépendante, qui est traditionnelle, Pasteurienne, et l'approche métagénomique, utilisant une technologie moderne. Notre expérience nous amène à dire que ce sont deux méthodes complémentaires. Ce constat est prouvé à travers l'analyse du microbiote de la Tomme d'Orchies. Certes, l'approche métagénomique permet une étude rapide et précise de la composition du microbiote, avec des réplicas permettant une étude statistique. Cette technique est basée sur l'utilisation des ADN totaux de l'échantillon. Ainsi, si une espèce est inconnue, ou non répertoriée dans les bases de données appropriées, cela constituera une forme de biais. L'espèce concernée sera alors incluse dans les séquences non-identifiées. La technologie Illumina ne permet pas l'utilisation de tous les gènes d'identification habituellement utilisés, elle peut donc aboutir à une perte d'information. Pour illustrer ceci, nous pouvons citer le cas de l'espèce *Saturnispora mendoncae* qui n'a pas été identifiée par approche métagénomique, car elle n'est pas répertoriée dans les bases de données des gènes ITS1-5,8 S-ITS2. En revanche, cette espèce a été identifiée, en grande proportion, en utilisant l'approche traditionnelle, basée sur le séquençage de l'ADNr 26 S. Il faut noter que cet ADNr est incompatible, de part sa longueur, avec la technologie Illumina utilisé dans cette étude.

La méthode culture-dépendante est fastidieuse, chronophage, mais aboutit à du matériel biologique, donc à des isolats qui pourront être exploités pour leurs identifications. Cette approche offre aussi d'autres avantages, comme la recherche d'isolats antagonistes, la caractérisation de cet antagonisme, à l'instar de ce qui a été fait dans le cadre de ce travail sur la Tomme d'Orchies.

1.2. Composition et évolution du microbiote de la Tomme d'Orchies

La Tomme d'Orchies est un fromage au lait cru de vache, à pâte pressée non cuite. Il présente un écosystème bactérien normal avec des BAL et NSBAL. Notre analyse a montré que le microbiote de la Tomme d'Orchies présente de fortes similarités avec les écosystèmes, du moins bactérien, des fromages à pâtes lavées, comme en témoigne la présence de *Brevibacterium* ou de *Psychrobacter*. Cette particularité peut s'expliquer par le frottage du fromage avec une saumure contenant de la bière et du rocou durant l'affinage. La composition du microbiote de la Tomme d'Orchies ne correspond pas totalement aux microbiotes retrouvés classiquement dans les fromages à pâte pressée non-cuite.

En revanche, le contenu fongique de la Tomme d'Orchies reste classique par la présence de *Kluyveromyces*, *Yarrowia* ou *Galactomyces*. Cependant, une espèce peu fréquente, *Clavispora lusitaniae*, a été retrouvée dans la Tomme d'Orchies. On peut aussi citer *Kazachstania unispora* ou *Malassezia restricta*. Cette dernière est, selon nos connaissances, décrite pour la première fois dans un produit fromager produit à partir de lait de vache.

Un autre point original de cette étude est la proportion de ces levures dans la Tomme d'Orchies. Nous avons observé, contrairement aux autres études et donc autres fromages, une proportion importante de *Yarrowia* et une faible proportion de *Galactomyces*. Par ailleurs, *Debaryomyces hansenii* est présente à de faibles taux, malgré son utilisation comme culture initiale. Contrairement aux ratios retrouvés usuellement, *K. marxianus* est plus abondant que *K. lactis*. Enfin *Saturnispora mendoncae* a été retrouvée en forte proportion dans l'analyse culture-dépendante.

En conclusion, la Tomme d'Orchies présente un microbiote classique des fromages, avec des spécificités d'espèces et des proportions atypiques. Ces points particuliers pourraient être des marqueurs de la typicité de la Tomme d'Orchies.

2. PROPRIÉTÉS ANTAGONISTES

Deux souches isolées donc de la Tomme d'Orchies, en l'occurrence *K. marxianus* S-2-05 et *K. lactis* S-3-05, présentent des propriétés antagonistes contre des bactéries à Gram-positif (*Kocuria rhizophila*, *Bacillus* sp., *Listeria monocytogenes*), des bactéries à Gram-négatif (*Salmonella* sp.) et contre *Candida albicans*. Cet antagonisme n'est mis en évidence qu'en co-culture simultanée, en milieu gélosé, avec un optimum d'inhibition obtenu avec une pré-culture de 15 à 18 h.

Le ou les composé(s) responsable(s) de cet antagonisme ont fait l'objet de nombreuses analyses, mais reste(nt) à ce jour non-identifié(s).

3. POTENTIEL PROBIOTIQUE

En plus de leurs propriétés antagonistes, *K. marxianus* S-2-05 et *K. lactis* S-3-05 présentent un fort potentiel probiotique. En effet, les tests *in vitro* ont montré une résistance au tractus gastro-intestinal et une aptitude à adhérer à l'épithélium intestinal sans présenter de cytotoxicité. De plus, la souche de *K. marxianus* S-2-05 présente un pouvoir anti-oxydant puissant, dans des conditions intestinales *in vitro*.

Les deux souches de *Kluyveromyces* antagonistes sont donc de très bons candidats pour être utilisées comme levures probiotiques non-*Saccharomyces*. En attendant la validation de ces études par des expériences *in vivo*, nous pouvons affirmer l'importance de ces deux souches, *K. marxianus* S-2-05 et *K. lactis* S-3-05, comme souches probiotiques pour diverses applications. En santé humaine, elles pourraient trouver un écho favorable comme anti-oxydants. En santé animale, elles pourraient servir en remplacement des antibiotiques utilisés comme moyen de prévention et comme facteurs de croissances.

Perspectives

Les travaux présentés précédemment ont permis une première analyse d'un produit de notre région. C'est un projet exploratoire visant à développer certains outils au sein de notre laboratoire, mais aussi à établir des compétences et un rayonnement dans le domaine de l'écologie microbienne. Ce projet exploratoire donc a abouti à des informations pertinentes d'un point de vue scientifique, et ouvre des perspectives d'applications industrielles certaines.

Outre la Tomme d'Orchies, d'autres fromages ou produits fermentés de notre région, voire de Belgique, seront considérés dans les prochains projets.

Les questions auxquelles, nous comptons répondre dans un futur proche sont les suivantes :

- Quelle est la nature exacte des molécules antagonistes ? Comment les identifier et comment les mettre en évidence ?
- L'activité antagoniste, ainsi mise en évidence, est-elle spécifique aux deux souches de *K. marxianus* S-2-05 et *K. lactis* S-3-05 ou communes avec d'autres souches de ces espèces ?
- Y-a-t-il une autre exploitation de cet antagonisme ? Comme par exemple une activité antivirale ?
- Le potentiel probiotique observé *in vitro* est-il observable *in vivo* ?

L'étude et la caractérisation des écosystèmes fromagers appellent à se pérenniser et à s'intensifier. Ainsi, tout en continuant à décrypter et à étudier d'autres microbiotes issus des produits fromagers de notre région, il sera intéressant d'étudier ceux issus des produits fromagers d'autres régions du monde, comme la Belgique et le Canada. Outre les aspects microbiotes, d'autres enjeux sont visés comme la typicité de ces produits et la contribution des flores. Nous y introduirons aussi des études métatranscriptomiques pour mieux comprendre cette typicité. Ces études prendront part dans une perspective d'internationalisation de notre activité, visant à caractériser et à comparer les écosystèmes des fromages européens et canadiens.

Les réponses que nous souhaitons apporter à court terme, aux questions posées sont les suivantes :

- Identification des composés antagonistes chez *K. marxianus* S-2-05 et *K. lactis* S-3-05 ?

Comme indiqué, les approches biochimiques n'ont pas abouti. Une approche de génomique comparative est prévue afin d'essayer de répondre à cette question. À cet égard, les génomes des deux souches sont déjà séquencés. Les molécules susceptibles d'être à l'origine de cet antagonisme seront produites et surexprimées dans des systèmes hétérologues.

- L'activité antagoniste est-elle spécifique de *K. marxianus* S-2-05 et *K. lactis* S-3-05 ?

D'autres recherches seront entreprises dans ce sens afin d'isoler de nouvelles souches du genre *Kluyveromyces*. Les souches seront testées pour leur antagonisme dans les mêmes conditions expérimentales, que celles utilisées dans le cadre de ce projet.

- *K. marxianus* S-2-05 et *K. lactis* S-3-05 sont-elles dotées d'une activité antivirale ?

C'est une activité intéressante car la recherche sur les levures à activité antivirale sont rares. Dans l'hypothèse d'une telle activité, un champ d'investigation nouveau s'ouvrira pour nous, afin de comprendre comment des levures peuvent être actives contre des virus enveloppés et des virus non enveloppés.

- Le potentiel probiotique de *K. marxianus* S-2-05 et de *K. lactis* S-3-05 peut-il être confirmé *in vivo* ?

Les souches de *Kluyveromyces* antagonistes ont montré les caractéristiques essentielles pour être considérées comme des probiotiques potentiels. Cependant, pour pouvoir les définir comme de réels probiotiques, des études complémentaires *in vivo* sont nécessaires. Si les tests sont concluants, ces souches de *Kluyveromyces* pourront être considérées comme de vrais probiotiques. Une application dans la santé animale ou humaine pourra ainsi être envisagée.

Bibliographie

- ABRIOUEL, H., BENOMAR, N., LUCAS, R., ET AL., 2011. Culture-independent study of the diversity of microbial populations in brines during fermentation of naturally-fermented Aloreña green table olives. *International Journal of Food Microbiology* **144**, 487-496. | [DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.11.006](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.11.006)
- ADDIS, E., FLEET, G.H., COX, J.M., ET AL., 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. | [DOI:10.1016/S0168-1605\(01\)00569-4](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00569-4)
- AHMAD, V., KHAN, M.S., JAMAL, Q.M.S., ET AL., 2016. Antimicrobial potential of bacteriocins: in therapy, agriculture and food preservation. *International Journal of Antimicrobial Agents*. | [DOI:10.1016/j.ijantimicag.2016.08.016](https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.08.016)
- AKABANDA, F., OWUSU-KWARTENG, J., TANO-DEBRAH, K., ET AL., 2013. Taxonomic and molecular characterization of lactic acid bacteria and yeasts in nunu, a Ghanaian fermented milk product. *Food Microbiology* **34**, 277-283. | [DOI:10.1016/j.fm.2012.09.025](https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.09.025)
- ALEXANDRE, Y., LE BLAY, G., BOISRAMÉ-GASTRIN, S., ET AL., 2014. Probiotics: A new way to fight bacterial pulmonary infections? *Médecine et Maladies Infectieuses* **44**, 9-17. | [DOI:10.1016/j.medmal.2013.05.001](https://doi.org/10.1016/j.medmal.2013.05.001)
- ALIM'AGRI, 2012. Les différentes familles de fromages. [URL: http://agriculture.gouv.fr/les-differentes-familles-de-fromages](http://agriculture.gouv.fr/les-differentes-familles-de-fromages) (consulté le 01.08.2016).
- AOKI, S.K., DINER, E.J., DE ROODENBEKE, C. T'KINT, ET AL., 2010. A widespread family of polymorphic contact-dependent toxin delivery systems in bacteria. *Nature* **468**, 439-442. | [DOI:10.1038/nature09490](https://doi.org/10.1038/nature09490)
- ARSLAN, S., ERBAS, M., TONTUL, I., ET AL., 2015. Microencapsulation of probiotic *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* with different wall materials by spray drying. *LWT - Food Science and Technology* **63**, 685-690. | [DOI:10.1016/j.lwt.2015.03.034](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.03.034)
- ARTEAU, M., LABRIE, S., ROY, D., 2010. Terminal-restriction fragment length polymorphism and automated ribosomal intergenic spacer analysis profiling of fungal communities in Camembert cheese. *International Dairy Journal* **20**, 545-554. | [DOI:10.1016/j.idairyj.2010.02.006](https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2010.02.006)

- ARZUMANIAN, V.G., SERGEEV, A.Y., SHELEMEKH, O.V., ET AL., 2009. Antagonistic activity of *Malassezia* spp. towards other clinically significant yeast genera. *Bulletin of experimental biology and medicine* **148**, 410-415.
- BAJAJ, B.K., RAINA, S., SINGH, S., 2013. Killer toxin from a novel killer yeast *Pichia kudriavzevii* RY55 with idiosyncratic antibacterial activity: Killer toxin from a novel killer yeast *Pichia kudriavzevii*. *Journal of Basic Microbiology* **53**, 645-656. | DOI:10.1002/jobm.201200187
- BALCIUNAS, E.M., CASTILLO MARTINEZ, F.A., TODOROV, S.D., ET AL., 2013. Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review. *Food Control* **32**, 134-142. | DOI:10.1016/j.foodcont.2012.11.025
- BARNETT, J.A., PAYNE, R.W., YARROW, D., 2007. Yeasts: characteristics and identification, 3. ed., repr. ed. *Cambridge Univ. Press*, Cambridge. | ISBN:978-0-521-57396-2
- BAZZICALUPO, A.L., BÁLINT, M., SCHMITT, I., 2013. Comparison of ITS1 and ITS2 rDNA in 454 sequencing of hyperdiverse fungal communities. *Fungal Ecology* **6**, 102-109. | DOI:10.1016/j.funeco.2012.09.003
- BEGEROW, D., NILSSON, H., UNTERSEHER, M., ET AL., 2010. Current state and perspectives of fungal DNA barcoding and rapid identification procedures. *Applied Microbiology and Biotechnology* **87**, 99-108. | DOI:10.1007/s00253-010-2585-4
- BELGUESMIA, Y., MADI, A., SPERANDIO, D., ET AL., 2011. Growing insights into the safety of bacteriocins: the case of enterocin S37. *Research in microbiology* **162**, 159-163. | DOI:10.1016/j.resmic.2010.09.019
- BELLOCH, C., QUEROL, A., BARRIO, E., 2011. « Yeasts and molds | *Kluyveromyces* spp. »; Dans: Fuquay, J.W., Fox, P.F., McSweeney, P.L.H. (Éd.), *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Elsevier, p. 754-764. | ISBN:978-0-12-374407-4
- BERESFORD, T.P., FITZSIMONS, N.A., BRENNAN, N.L., ET AL., 2001. Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal* **11**, 259-274. | DOI:10.1016/S0958-6946(01)00056-5
- BIANCHINI, A., 2015. « Lactic acid bacteria as antifungal agents »; Dans: *Advances in Fermented Foods and Beverages*. Elsevier, p. 333-353. | ISBN:978-1-78242-015-6
- BIENVENUE À LA FERME, 2016. Bienvenue à la Ferme : Tourisme Rural : Gite, Camping à la Ferme, Ferme de découverte, Restaurant à la Ferme ... URL: <http://www.bienvenue-a-la-ferme.com/> (consulté le 07.11.2016).
- BIK, H.M., PORAZINSKA, D.L., CREER, S., ET AL., 2012. Sequencing our way towards understanding global eukaryotic biodiversity. *Trends in Ecology & Evolution* **27**, 233-243. | DOI:10.1016/j.tree.2011.11.010

- BINETTI, A., CARRASCO, M., REINHEIMER, J., ET AL., 2013. Yeasts from autochthonal cheese starters: technological and functional properties. *Journal of Applied Microbiology* **115**, 434-444. | [DOI:10.1111/jam.12228](https://doi.org/10.1111/jam.12228)
- BOCKELMANN, W., HOPPE-SEYLER, T., 2001. The surface flora of bacterial smear-ripened cheeses from cow's and goat's milk. *International Dairy Journal* **11**, 307-314. | [DOI:10.1016/S0958-6946\(01\)00060-7](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00060-7)
- BOCKELMANN, W., WILLEMS, K.P., NEVE, H., ET AL., 2005. Cultures for the ripening of smear cheeses. *International Dairy Journal* **15**, 719-732. | [DOI:10.1016/j.idairyj.2004.08.022](https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.08.022)
- BORELLI, B.M., FERREIRA, E.G., LACERDA, I.C.A., ET AL., 2006. Yeast populations associated with the artisanal cheese produced in the region of Serra da Canastra, Brazil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **22**, 1115-1119. | [DOI:10.1007/s11274-006-9151-3](https://doi.org/10.1007/s11274-006-9151-3)
- BRANCO, P., FRANCISCO, D., CHAMBON, C., ET AL., 2014. Identification of novel GAPDH-derived antimicrobial peptides secreted by *Saccharomyces cerevisiae* and involved in wine microbial interactions. *Applied Microbiology and Biotechnology* **98**, 843-853. | [DOI:10.1007/s00253-013-5411-y](https://doi.org/10.1007/s00253-013-5411-y)
- BRENNAN, N.M., WARD, A.C., BERESFORD, T.P., ET AL., 2002. Biodiversity of the bacterial flora on the surface of a smear cheese. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 820-830. | [DOI:10.1128/AEM.68.2.820-830.2002](https://doi.org/10.1128/AEM.68.2.820-830.2002)
- BROOME, M.C., POWELL, I.B., LIMSOWTIN, G.K.Y., 2011. « Cheese | Starter cultures: specific properties »; Dans: Fuquay, J.W., Fox, P.F., McSweeney, P.L.H. (Éd.), *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Elsevier, p. 559-566. | [ISBN:978-0-12-374407-4](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4)
- BÜCHL, N.R., SEILER, H., 2011. « Yeasts and molds | Yeasts in milk and dairy products »; Dans: Fuquay, J.W., Fox, P.F., McSweeney, P.L.H. (Éd.), *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Elsevier, p. 744-753. | [ISBN:978-0-12-374407-4](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4)
- BUZZINI, P., CORAZZI, L., TURCHETTI, B., ET AL., 2004. Characterization of the in vitro antimycotic activity of a novel killer protein from DBVPG 4561 against emerging pathogenic yeasts. *FEMS Microbiology Letters* **238**, 359-365. | [DOI:10.1016/j.femsle.2004.07.060](https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.07.060)
- CALLON, C., RETUREAU, E., DIDIENNE, R., ET AL., 2014. Microbial biodiversity in cheese consortia and comparative *Listeria* growth on surfaces of uncooked pressed cheeses. *International Journal of Food Microbiology* **174**, 98-109. | [DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2014.01.003](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.01.003)
- CANDELA, M., SEIBOLD, G., VITALI, B., ET AL., 2005. Real-time PCR quantification of bacterial adhesion to Caco-2 cells: Competition between bifidobacteria and enteropathogens. *Research in Microbiology* **156**, 887-895. | [DOI:10.1016/j.resmic.2005.04.006](https://doi.org/10.1016/j.resmic.2005.04.006)
- CAVERA, V.L., ARTHUR, T.D., KASHTANOV, D., ET AL., 2015. Bacteriocins and their position in the next wave of conventional antibiotics. *International Journal of Antimicrobial Agents* **46**, 494-501. | [DOI:10.1016/j.ijantimicag.2015.07.011](https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2015.07.011)

- CHELLIAH, R., RAMAKRISHNAN, S.R., PRABHU, P.R., ET AL., 2016. Evaluation of antimicrobial activity and probiotic properties of wild-strain *Pichia kudriavzevii* isolated from frozen *idli* batter: Extremophile potential probiotic yeast. *Yeast* **33**, 385-401. | [DOI:10.1002/yea.3181](https://doi.org/10.1002/yea.3181)
- CHEON, Y., KIM, J.-S., PARK, J.-B., ET AL., 2014. A biosynthetic pathway for hexanoic acid production in *Kluyveromyces marxianus*. *Journal of Biotechnology* **182-183**, 30-36. | [DOI:10.1016/j.jbiotec.2014.04.010](https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.04.010)
- CNIEL, 2015. Les produits laitiers - En France, on produit au moins 1200 variétés de fromage ! *Les produits laitiers*. URL: <http://www.produits-laitiers.com/article/le-chiffre-du-mois-1200> (consulté le 01.08.2016).
- COCOLIN, L., NUCERA, D., ALESSANDRIA, V., ET AL., 2009. Microbial ecology of Gorgonzola rinds and occurrence of different biotypes of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* **133**, 200-205. | [DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2009.05.003](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.05.003)
- COGAN, T.M., 2011a. « Cheese | Microbiology of cheese »; Dans: Fuquay, J.W., Fox, P.F., McSweeney, P.L.H. (Éd.), *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Elsevier, p. 625-631. | [ISBN:978-0-12-374407-4](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4)
- COGAN, T.M., 2011b. « Cheese | Public health aspects »; Dans: Fuquay, J.W., Fox, P.F., McSweeney, P.L.H. (Éd.), *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Elsevier, p. 645-651. | [ISBN:978-0-12-374407-4](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4)
- COOPER, C.R., 2011. « Yeasts pathogenic to humans »; Dans: *The Yeasts: A Taxonomic Study*. Elsevier, p. 9-19. | [ISBN:978-0-444-52149-1](https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52149-1)
- CORSETTI, A., ROSSI, J., GOBBETTI, M., 2001. Interactions between yeasts and bacteria in the smear surface-ripened cheeses. *International Journal of Food Microbiology* **69**, 1-10. | [DOI:10.1016/S0168-1605\(01\)00567-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00567-0)
- COSTANZA, A.C., MOSCAVITCH, S.D., FARIA NETO, H.C.C., ET AL., 2015. Probiotic therapy with *Saccharomyces boulardii* for heart failure patients: A randomized, double-blind, placebo-controlled pilot trial. *International Journal of Cardiology* **179**, 348-350. | [DOI:10.1016/j.ijcard.2014.11.034](https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2014.11.034)
- COUGHLAN, L.M., COTTER, P.D., HILL, C., ET AL., 2015. Biotechnological applications of functional metagenomics in the food and pharmaceutical industries. *Frontiers in Microbiology* **6**. | [DOI:10.3389/fmicb.2015.00672](https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00672)
- CULLIGAN, E.P., SLEATOR, R.D., MARCHESI, J.R., ET AL., 2014. Metagenomics and novel gene discovery: Promise and potential for novel therapeutics. *Virulence* **5**, 399-412. | [DOI:10.4161/viru.27208](https://doi.org/10.4161/viru.27208)
- DELCSNERIE, V., TAMINIAU, B., DELHALLE, L., ET AL., 2014. Microbiota characterization of a Belgian protected designation of origin cheese, Herve cheese, using metagenomic analysis. *Journal of Dairy Science* **97**, 6046-6056. | [DOI:10.3168/jds.2014-8225](https://doi.org/10.3168/jds.2014-8225)

- DIAZ-SANCHEZ, S., HANNING, I., PENDLETON, S., ET AL., 2013. Next-generation sequencing: The future of molecular genetics in poultry production and food safety. *Poultry Science* **92**, 562-572. | [DOI:10.3382/ps.2012-02741](https://doi.org/10.3382/ps.2012-02741)
- DONADIO, S., SOSIO, M., 2009. « Glycopeptides, antimicrobial »; Dans: Encyclopedia of Microbiology. *Elsevier*, p. 455-471. | [ISBN:978-0-12-373944-5](https://www.isbn-international.org/product/9780123739445)
- DRIDER, D., PRÉVOST, H. (ÉD.), 2009. Bactéries lactiques: physiologie, métabolisme, génomique et applications industrielles. *Economica*, Paris. | [ISBN:978-2-7178-5676-7](https://www.isbn-international.org/product/9782717856767)
- DRIDER, D., REBUFFAT, S. (ÉD.), 2011. Prokaryotic antimicrobial peptides. *Springer New York*, New York, NY. | [ISBN:978-1-4419-7691-8](https://www.isbn-international.org/product/9781441976918)
- DUGAT-BONY, E., STRAUB, C., TEISSANDIER, A., ET AL., 2015. Overview of a surface-ripened cheese community functioning by meta-omics analyses. *PloS One* **10**, e0124360. | [DOI:10.1371/journal.pone.0124360](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124360)
- EL-SHAROUH, W.M., BELLOCH, C., PERIS, D., ET AL., 2009. Molecular identification of yeasts associated with traditional Egyptian dairy products. *Journal of Food Science* **74**, M341-346. | [DOI:10.1111/j.1750-3841.2009.01258.x](https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01258.x)
- EL-TARABILY, K.A., SIVASITHAMPARAM, K., 2006. Potential of yeasts as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. *Mycoscience* **47**, 25-35. | [DOI:10.1007/S10267-005-0268-2](https://doi.org/10.1007/S10267-005-0268-2)
- ERCAN, D., DEMIRCI, A., 2015. Enhanced human lysozyme production by *Kluyveromyces lactis* K7 in biofilm reactor coupled with online recovery system. *Biochemical Engineering Journal* **98**, 68-74. | [DOI:10.1016/j.bej.2015.02.032](https://doi.org/10.1016/j.bej.2015.02.032)
- ERCAN, D., DEMIRCI, A., 2014. Enhanced human lysozyme production in biofilm reactor by *Kluyveromyces lactis* K7. *Biochemical Engineering Journal* **92**, 2-8. | [DOI:10.1016/j.bej.2014.04.013](https://doi.org/10.1016/j.bej.2014.04.013)
- ESPINOSA, É., CHILLET, P., 2010. Immunologie. *Ellipses*, Paris. | [ISBN:978-2-7298-6076-9](https://www.isbn-international.org/product/9782729860769)
- FADDA, M., MOSSA, V., PISANO, M., ET AL., 2004. Occurrence and characterization of yeasts isolated from artisanal Fiore Sardo cheese. *International Journal of Food Microbiology* **95**, 51-59. | [DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.02.001](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.02.001)
- FADDA, M.E., MOSSA, V., DEPLANO, M., ET AL., 2017. In vitro screening of *Kluyveromyces* strains isolated from Fiore Sardo cheese for potential use as probiotics. *LWT - Food Science and Technology* **75**, 100-106. | [DOI:10.1016/j.lwt.2016.08.020](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.08.020)
- FAITH, N.G., GARCIA, G., SKEBBA, V.P., ET AL., 2015. Use of a commercial mixture of volatile compounds from the fungus *Muscodor* to inhibit *Salmonella* in ground turkey and beef. *Food Control* **47**, 628-633. | [DOI:10.1016/j.foodcont.2014.07.059](https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.07.059)

- FAO/WHO, 2011. Codex Alimentarius - Milk and milk products second edition. URL: <http://www.fao.org/docrep/015/i2085e/i2085e00.pdf> (consulté le 01.08.2016).
- FAO/WHO, 2002. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. *Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Working Group Report*.
- FLEET, G.H., 2011. « Yeast spoilage of foods and beverages »; Dans: Kurtzman, C.P. (Éd.), *The Yeasts: A Taxonomic Study*. Elsevier, p. 53-63. | ISBN:978-0-444-52149-1
- FLEET, G.H., 1990. Yeasts in dairy products. *The Journal of Applied Bacteriology* **68**, 199-211.
- FLISSI, A., DUFRESNE, Y., MICHALIK, J., ET AL., 2016. Norine, the knowledgebase dedicated to non-ribosomal peptides, is now open to crowdsourcing. *Nucleic Acids Research* **44**, D1113-D1118. | DOI:10.1093/nar/gkv1143
- FOLIGNÉ, B., PARAYRE, S., CHEDDANI, R., ET AL., 2016. Immunomodulation properties of multi-species fermented milks. *Food Microbiology* **53**, 60-69. | DOI:10.1016/j.fm.2015.04.002
- FONSECA, G.G., HEINZLE, E., WITTMANN, C., ET AL., 2008. The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. *Applied Microbiology and Biotechnology* **79**, 339-354. | DOI:10.1007/s00253-008-1458-6
- FOX, P.F., 2011a. « Introduction | History of dairy products and processes »; Dans: Fuquay, J.W., Fox, P.F., McSweeney, P.L.H. (Éd.), *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Elsevier, p. 12-17. | ISBN:978-0-12-374407-4
- FOX, P.F., 2011b. « Cheese | Overview »; Dans: Fuquay, J.W., Fox, P.F., McSweeney, P.L.H. (Éd.), *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Elsevier, p. 533-543. | ISBN:978-0-12-374407-4
- FOX, P.F., MCGUFFEY, R.K., SHIRLEY, J.E., ET AL., 2011. « Introduction | History of dairy science and technology »; Dans: Fuquay, J.W., Fox, P.F., McSweeney, P.L.H. (Éd.), *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Elsevier, p. 1. | ISBN:978-0-12-374407-4
- GADANHO, M., SAMPAIO, J.P., 2002. Polyphasic taxonomy of the basidiomycetous yeast genus *Rhodotorula* : *Rh. glutinis* sensu stricto and *Rh. dairenensis* comb. nov. *FEMS Yeast Research* **2**, 47-58. | DOI:10.1111/j.1567-1364.2002.tb00068.x
- GARDINI, F., TOFALO, R., BELLETTI, N., ET AL., 2006. Characterization of yeasts involved in the ripening of Pecorino Crotonese cheese. *Food Microbiology* **23**, 641-648. | DOI:10.1016/j.fm.2005.12.005
- GENG, P., CHEN, S., HU, M., ET AL., 2011. Combination of *Kluyveromyces marxianus* and sodium bicarbonate for controlling green mold of citrus fruit. *International Journal of Food Microbiology* **151**, 190-194. | DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.023
- GIACCHI, V., SCIACCA, P., BETTA, P., 2016. « Multistrain probiotics »; Dans: Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics. Elsevier, p. 279-302. | ISBN:978-0-12-802189-7

- GILL, H.S., 2003. Probiotics to enhance anti-infective defences in the gastrointestinal tract. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* **17**, 755-773. | [DOI:10.1016/S1521-6918\(03\)00074-X](https://doi.org/10.1016/S1521-6918(03)00074-X)
- GILLILAND, S.E., 2003. « Probiotics »; Dans: Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition. Elsevier, p. 4792-4798. | [ISBN:978-0-12-227055-0](https://doi.org/10.1016/B0123-1227055-0)
- GKATZIONIS, K., YUNITA, D., LINFORTH, R.S.T., ET AL., 2014. Diversity and activities of yeasts from different parts of a Stilton cheese. *International Journal of Food Microbiology* **177**, 109-116. | [DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.016](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.016)
- GOLDBERG, I., ROKEM, J.S., 2009. « Organic and fatty acid production, microbial »; Dans: Encyclopedia of Microbiology. Elsevier, p. 421-442. | [ISBN:978-0-12-373944-5](https://doi.org/10.1016/B0123-373944-5)
- GOLUBEV, W., NAKASE, T., 1997. Mycocinogeny in the genus *Bullera*: taxonomic specificity of sensitivity to the mycocin produced by *Bullera sinensis*. *FEMS Microbiology Letters* **146**, 59-64.
- GOLUBEV, W.I., 2013. Action spectrum of *Kluyveromyces lactis* mycocins. *Microbiology* **82**, 77-84. | [DOI:10.1134/S0026261713010025](https://doi.org/10.1134/S0026261713010025)
- GOLUBEV, W.I., 1998. « Mycocins (killer toxins) »; Dans: The Yeasts. Elsevier, p. 55-62. | [ISBN:978-0-444-81312-1](https://doi.org/10.1016/B0123-44481312-1)
- GOLUBEV, W.I., PFEIFFER, I., GOLUBEVA, E., 2002. Mycocin production in *Trichosporon pullulans* populations colonizing tree exudates in the spring. *FEMS Microbiology Ecology* **40**, 151-7. | [DOI:10.1111/j.1574-6941.2002.tb00947.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2002.tb00947.x)
- GORETTI, M., TURCHETTI, B., BURATTA, M., ET AL., 2009. In vitro antimycotic activity of a *Williopsis saturnus* killer protein against food spoilage yeasts. *International Journal of Food Microbiology* **131**, 178-182. | [DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2009.02.013](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.02.013)
- GULATI, M., NOBILE, C.J., 2016. *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. *Microbes and Infection / Institut Pasteur* **18**, 310-321. | [DOI:10.1016/j.micinf.2016.01.002](https://doi.org/10.1016/j.micinf.2016.01.002)
- GULICK, A.M., 2016. Structural insight into the necessary conformational changes of modular nonribosomal peptide synthetases. *Current Opinion in Chemical Biology* **35**, 89-96. | [DOI:10.1016/j.cbpa.2016.09.005](https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.09.005)
- GUYARD, C., DEHECQ, E., TISSIER, J.-P., ET AL., 2002a. Involvement of β -glucans in the wide-spectrum antimicrobial activity of *Williopsis saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968 killer toxin. *Molecular Medicine* **8**, 686-694.
- GUYARD, C., SÉGUY, N., CAILLIEZ, J.-C., ET AL., 2002b. Characterization of a *Williopsis saturnus* var. *mrakii* high molecular weight secreted killer toxin with broad-spectrum antimicrobial activity. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **49**, 961-971. | [DOI:10.1093/jac/49.6.961](https://doi.org/10.1093/jac/49.6.961)

- HAMMAMI, R., ZOUHIR, A., BEN HAMIDA, J., ET AL., 2007. BACTIBASE: a new web-accessible database for bacteriocin characterization. *BMC Microbiology* **7**, 89. | [DOI:10.1186/1471-2180-7-89](https://doi.org/10.1186/1471-2180-7-89)
- HANDELSMAN, J., RONDON, M.R., BRADY, S.F., ET AL., 1998. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chemistry & Biology* **5**, R245-R249. | [DOI:10.1016/S1074-5521\(98\)90108-9](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(98)90108-9)
- HATOUM, R., LABRIE, S., FLISS, I., 2013. Identification and partial characterization of antilisterial compounds produced by dairy yeasts. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* **5**, 8-17. | [DOI:10.1007/s12602-012-9109-8](https://doi.org/10.1007/s12602-012-9109-8)
- HATOUM, R., LABRIE, S., FLISS, I., 2012. Antimicrobial and probiotic properties of yeasts: from fundamental to novel applications. *Frontiers in microbiology* **3**, 421. | [DOI:10.3389/fmicb.2012.00421](https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00421)
- HEBERT, P.D., CYWINSKA, A., BALL, S.L., ET AL., 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* **270**, 313-321. | [DOI:10.1098/rspb.2002.2218](https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218)
- HEO, P., YANG, T.-J., CHUNG, S.-C., ET AL., 2013. Simultaneous integration of multiple genes into the *Kluyveromyces marxianus* chromosome. *Journal of Biotechnology* **167**, 323-325. | [DOI:10.1016/j.jbiotec.2013.06.020](https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.06.020)
- HERNÁNDEZ, A., MARTÍN, A., CÓRDOBA, M.G., ET AL., 2008. Determination of killer activity in yeasts isolated from the elaboration of seasoned green table olives. *International Journal of Food Microbiology* **121**, 178-188. | [DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.044](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.044)
- HILL, A.R., KETHIREDDIPALLI, P., 2013. « Dairy products »; Dans: Eskin, N.A.M., Shahidi, F. (Éd.), *Biochemistry of Foods*. Elsevier, p. 319-362. | [ISBN:978-0-12-242352-9](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-242352-9)
- H-KITTIKUN, A., BISCOLA, V., EL-GHAISH, S., ET AL., 2015. Bacteriocin-producing *Enterococcus faecalis* KT2W2G isolated from mangrove forests in southern Thailand: Purification, characterization and safety evaluation. *Food Control* **54**, 126-134. | [DOI:10.1016/j.foodcont.2014.12.037](https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.12.037)
- IHRMARK, K., BÖDEKER, I.T.M., CRUZ-MARTINEZ, K., ET AL., 2012. New primers to amplify the fungal ITS2 region - evaluation by 454-sequencing of artificial and natural communities. *FEMS Microbiology Ecology* **82**, 666-677. | [DOI:10.1111/j.1574-6941.2012.01437.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2012.01437.x)
- IMRAN, M., DESMASURES, N., VERNOUX, J.-P., 2010. From undefined red smear cheese consortia to minimal model communities both exhibiting similar anti-listerial activity on a cheese-like matrix. *Food Microbiology* **27**, 1095-1103. | [DOI:10.1016/j.fm.2010.07.016](https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.07.016)
- INVS, 2015a. Listériose. [URL: http://www.invs.sante.fr/Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/Risques-infectieux-d-origine-alimentaire/Listeriose/Aide-memoire](http://www.invs.sante.fr/Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/Risques-infectieux-d-origine-alimentaire/Listeriose/Aide-memoire) (consulté le 06.08.2016).

- INVS, 2015b. Syndrome hémolytique et urémique. URL: <http://www.invs.sante.fr/Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/Risques-infectieux-d-origine-alimentaire/Syndrome-hemolytique-et-uremique> (consulté le 06.08.2016).
- INVS, 2006a. Salmonelloses non typhiques. URL: <http://www.invs.sante.fr/fr/Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/Risques-infectieux-d-origine-alimentaire/Salmonelloses-non-typhiques/Aide-memoire> (consulté le 06.08.2016).
- INVS, 2006b. Toxi-infections alimentaires collectives. URL: <http://www.invs.sante.fr/Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/Risques-infectieux-d-origine-alimentaire/Toxi-infections-alimentaires-collectives/Aide-memoire> (consulté le 06.08.2016).
- IRLINGER, F., MOUNIER, J., 2009. Microbial interactions in cheese: implications for cheese quality and safety. *Current Opinion in Biotechnology* **20**, 142-148. | DOI:10.1016/j.copbio.2009.02.016
- İZGÜ, F., ALTINBAY, D., ACUN, T., 2006. Killer toxin of *Pichia anomala* NCYC 432; purification, characterization and its exo- β -1,3-glucanase activity. *Enzyme and Microbial Technology* **39**, 669-676. | DOI:10.1016/j.enzmictec.2005.11.024
- JAKOBSEN, M., NARVHUS, J., 1996. Yeasts and their possible beneficial and negative effects on the quality of dairy products. *International Dairy Journal* **6**, 755-768. | DOI:10.1016/0958-6946(95)00071-2
- JOHANSSON, M.E.V., AMBORT, D., PELASEYED, T., ET AL., 2011. Composition and functional role of the mucus layers in the intestine. *Cellular and molecular life sciences: CMLS* **68**, 3635-3641. | DOI:10.1007/s00018-011-0822-3
- JOHNSON, E.A., ECHAVARRI-ERASUN, C., 2011. « Yeast biotechnology »; Dans: The Yeasts: A Taxonomic Study. *Elsevier*, p. 21-44. | ISBN:978-0-444-52149-1
- JOSHI-NAVARE, K., PRABHUNE, A., 2013. A biosurfactant-sophorolipid acts in synergy with antibiotics to enhance their efficiency. *BioMed Research International* **2013**, 1-8. | DOI:10.1155/2013/512495
- JUMPPONEN, A., JONES, K.L., DAVID MATTOX, J., ET AL., 2010. Massively parallel 454-sequencing of fungal communities in *Quercus* spp. ectomycorrhizas indicates seasonal dynamics in urban and rural sites. *Molecular Ecology* **19**, 41-53. | DOI:10.1111/j.1365-294X.2009.04483.x
- JUNG, W.J., MABOOD, F., SOULEIMANOV, A., ET AL., 2014. Antibacterial activity of antagonistic bacterium *Bacillus subtilis* DJM-51 against phytopathogenic *Clavibacter michiganensesubsp. michiganense* ATCC 7429 *in vitro*. *Microbial Pathogenesis* **77**, 13-16. | DOI:10.1016/j.micpath.2014.10.008
- KAMINARIDES, S.E., ANIFANTAKIS, E.M., 1989. Evolution of the microflora of Kopanisti cheese during ripening. Study of the yeast flora. *Le Lait* **69**, 537-546.

- KESZTHELYI, A., HAMARI, Z., PFEIFFER, I., ET AL., 2008. Comparison of killer toxin-producing and non-producing strains of *Filobasidium capsuligenum*: Proposal for two varieties. *Microbiological Research* **163**, 267-276. | [DOI:10.1016/j.micres.2008.01.002](https://doi.org/10.1016/j.micres.2008.01.002)
- KITAMOTO, H.K., OHMOMO, S., NAKAHARA, T., 1993. Selection of killer yeasts (*Kluyveromyces lactis*) to prevent aerobic deterioration in silage making. *Journal of Dairy Science* **76**, 803-811. | [DOI:10.3168/jds.S0022-0302\(93\)77404-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(93)77404-4)
- KÖLJALG, U., NILSSON, R.H., ABARENKOV, K., ET AL., 2013. Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi. *Molecular Ecology* **22**, 5271-5277. | [DOI:10.1111/mec.12481](https://doi.org/10.1111/mec.12481)
- KORRES, A.M., BUSS, D.S., VENTURA, J.A., ET AL., 2011. *Candida krusei* and *Kloeckera apis* inhibit the causal agent of pineapple fusariosis, *Fusarium guttiforme*. *Fungal Biology* **115**, 1251-8. | [DOI:10.1016/j.funbio.2011.09.001](https://doi.org/10.1016/j.funbio.2011.09.001)
- KUMURA, H., TANOUE, Y., TSUKAHARA, M., ET AL., 2004. Screening of dairy yeast strains for probiotic applications. *Journal of Dairy Science* **87**, 4050-4056. | [DOI:10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73546-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73546-8)
- KURTZMAN, C.P. (ÉD.), 2011. The Yeasts: A taxonomic study, 5. ed. ed. Elsevier, Amsterdam. | [ISBN:978-0-444-52149-1](https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52149-1)
- KURTZMAN, C.P., FELL, J.W., BOEKHOUT, T., 2011. « Definition, classification and nomenclature of the yeasts »; Dans: Kurtzman, C.P. (Éd.), The Yeasts: A Taxonomic Study. Elsevier, p. 3-5. | [ISBN:978-0-444-52149-1](https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52149-1)
- KUTTY, S.N., PHILIP, R., 2008. Marine yeasts—a review. *Yeast* **25**, 465-483. | [DOI:10.1002/yea.1599](https://doi.org/10.1002/yea.1599)
- LACHANCE, M.-A., 2011. « *Kluyveromyces van der Walt* (1971) »; Dans: Fell, J.W., Boekhout, T. (Éd.), The Yeasts: A taxonomic study. Elsevier, London, p. 471-481. | [ISBN:978-0-444-52149-1](https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52149-1)
- LANE, M.M., MORRISSEY, J.P., 2010. *Kluyveromyces marxianus*: A yeast emerging from its sister's shadow. *Fungal Biology Reviews* **24**, 17-26. | [DOI:10.1016/j.fbr.2010.01.001](https://doi.org/10.1016/j.fbr.2010.01.001)
- LAROUSSE, 2016. Définitions : Antagonisme - Dictionnaire de français Larousse. [URL: http://www.larousse.fr/dictionnaires/francais/antagonisme/3781?q=antagonisme#3778](http://www.larousse.fr/dictionnaires/francais/antagonisme/3781?q=antagonisme#3778) (consulté le 12.08.2016).
- LAVOIE, K., TOUCHETTE, M., ST-GELAIS, D., ET AL., 2012. Characterization of the fungal microflora in raw milk and specialty cheeses of the province of Quebec. *Dairy Science & Technology* **92**, 455-468. | [DOI:10.1007/s13594-011-0051-4](https://doi.org/10.1007/s13594-011-0051-4)
- LEE, Y.K., 2014. What could probiotic do for us? *Food Science and Human Wellness* **3**, 47-50. | [DOI:10.1016/j.fshw.2014.06.001](https://doi.org/10.1016/j.fshw.2014.06.001)

- LESSARD, M.-H., 2014. Le suivi de la croissance et de l'activité spécifique des mycètes pendant l'affinage du Camembert. *Université Laval*.
- LI, Y., SADIQ, F.A., LIU, T., ET AL., 2015. Purification and identification of novel peptides with inhibitory effect against angiotensin I-converting enzyme and optimization of process conditions in milk fermented with the yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Journal of Functional Foods* **16**, 278-288. | [DOI:10.1016/j.jff.2015.04.043](https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.04.043)
- LIKOTRAFITI, E., RHOADES, J., 2016. « Chapter 32 - Probiotics, prebiotics, synbiotics, and foodborne illness »; Dans: Preedy, V.R. (Éd.), Probiotics, prebiotics, and synbiotics. *Academic Press*, p. 469-476. | [ISBN:978-0-12-802189-7](https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.04.043)
- LINDAHL, B.D., NILSSON, R.H., TEDERSOO, L., ET AL., 2013. Fungal community analysis by high-throughput sequencing of amplified markers - a user's guide. *New Phytologist* **199**, 288-299. | [DOI:10.1111/nph.12243](https://doi.org/10.1111/nph.12243)
- LING, L.L., SCHNEIDER, T., PEOPLES, A.J., ET AL., 2015. A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. *Nature* **517**, 455-459. | [DOI:10.1038/nature14098](https://doi.org/10.1038/nature14098)
- LOPANDIC, K., ZELGER, S., BÁNSZKY, L.K., ET AL., 2006. Identification of yeasts associated with milk products using traditional and molecular techniques. *Food Microbiology* **23**, 341-350. | [DOI:10.1016/j.fm.2005.05.001](https://doi.org/10.1016/j.fm.2005.05.001)
- LOWES, K.F., SHEARMAN, C.A., PAYNE, J., ET AL., 2000. Prevention of yeast spoilage in feed and food by the yeast mycocin HMK. *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 1066-1076.
- LUCEY, J.A., 2011. « Cheese | Rennet-induced coagulation of milk »; Dans: Encyclopedia of Dairy Sciences. *Elsevier*, p. 579-584. | [ISBN:978-0-12-374407-4](https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.04.043)
- MADHANI, H.D., 2007. From a to α : yeast as a model for cellular differentiation. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Cold Spring Harbor, N.Y. | [ISBN:978-0-87969-737-2](https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.04.043)
- MARTÍN, M.J., LARA-VILLOSLADA, F., RUIZ, M.A., ET AL., 2015. Microencapsulation of bacteria: A review of different technologies and their impact on the probiotic effects. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **27**, 15-25. | [DOI:10.1016/j.ifset.2014.09.010](https://doi.org/10.1016/j.ifset.2014.09.010)
- MEHLOMAKULU, N.N., SETATI, M.E., DIVOL, B., 2014. Characterization of novel killer toxins secreted by wine-related non-*Saccharomyces* yeasts and their action on *Brettanomyces* spp. *International Journal of Food Microbiology* **188**, 83-91. | [DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2014.07.015](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.07.015)
- MESSAOUDI, S., MADI, A., PRÉVOST, H., ET AL., 2012. In vitro evaluation of the probiotic potential of *Lactobacillus salivarius* SMXD51. *Anaerobe* **18**, 584-589. | [DOI:10.1016/j.anaerobe.2012.10.004](https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2012.10.004)
- MESSAOUDI, S., MANAI, M., KERGOURLAY, G., ET AL., 2013. *Lactobacillus salivarius*: bacteriocin and probiotic activity. *Food Microbiology* **36**, 296-304. | [DOI:10.1016/j.fm.2013.05.010](https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.05.010)

- MILLER, D.S.J., HILL, C.S., 2016. « TGF- β superfamily signaling »; Dans: Encyclopedia of Cell Biology. *Elsevier*, p. 37-50. | ISBN:978-0-12-394796-3
- MOHD REDZWAN, S., JAMALUDDIN, R., AHMAD, F.N., ET AL., 2016. « Probiotics as potential adsorbent of aflatoxin »; Dans: Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics. *Elsevier*, p. 409-419. | ISBN:978-0-12-802189-7
- MONTEL, M.-C., BUCHIN, S., MALLET, A., ET AL., 2014. Traditional cheeses: rich and diverse microbiota with associated benefits. *International Journal of Food Microbiology* **177**, 136-154. | DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.019
- MORSE, R.P., WILLETT, J.L.E., JOHNSON, P.M., ET AL., 2015. Diversification of β -Augmentation Interactions between CDI Toxin/Immunity Proteins. *Journal of Molecular Biology* **427**, 3766-3784. | DOI:10.1016/j.jmb.2015.09.020
- MOUNIER, J., GELSOMINO, R., GOERGES, S., ET AL., 2005. Surface Microflora of Four Smear-Ripened Cheeses. *Applied and Environmental Microbiology* **71**, 6489-6500. | DOI:10.1128/AEM.71.11.6489-6500.2005
- NAGHMOUCHI, K., BAAH, J., HOBER, D., ET AL., 2013. Synergistic effect between colistin and bacteriocins in controlling Gram-negative pathogens and their potential to reduce antibiotic toxicity in mammalian epithelial cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **57**, 2719-2725. | DOI:10.1128/AAC.02328-12
- NAGHMOUCHI, K., BELGUESMIA, Y., BAAH, J., ET AL., 2011a. Antibacterial activity of class I and IIa bacteriocins combined with polymyxin E against resistant variants of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*. *Research in Microbiology* **162**, 99-107. | DOI:10.1016/j.resmic.2010.09.014
- NAGHMOUCHI, K., PATERSON, L., FORSTER, B., ET AL., 2011b. Paenibacillus polymyxa JB05-01-1 and its perspectives for food conservation and medical applications. *Archives of Microbiology* **193**, 169-177. | DOI:10.1007/s00203-010-0654-9
- NCBI, 2016a. mycocin - PubMed - NCBI. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=mycocin> (consulté le 21.10.2016).
- NCBI, 2016b. bacteriocin - PubMed - NCBI. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=bacteriocin> (consulté le 21.10.2016).
- NCBI TAXONOMY, 2016. Taxonomy browser (Fungi). URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Undef&id=4751&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock> (consulté le 29.07.2016).
- NILSSON, R.H., RYBERG, M., ABARENKOV, K., ET AL., 2009. The ITS region as a target for characterization of fungal communities using emerging sequencing technologies. *FEMS Microbiology Letters* **296**, 97-101. | DOI:10.1111/j.1574-6968.2009.01618.x

- NONKLANG, S., ABDEL-BANAT, B.M.A., CHA-AIM, K., ET AL., 2008. High-temperature ethanol fermentation and transformation with linear DNA in the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* DMKU3-1042. *Applied and Environmental Microbiology* **74**, 7514-7521. | [DOI:10.1128/AEM.01854-08](https://doi.org/10.1128/AEM.01854-08)
- NÚÑEZ, F., LARA, M.S., PEROMINGO, B., ET AL., 2015. Selection and evaluation of *Debaryomyces hansenii* isolates as potential bioprotective agents against toxigenic penicillia in dry-fermented sausages. *Food Microbiology* **46**, 114-120. | [DOI:10.1016/j.fm.2014.07.019](https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.07.019)
- O'FLAHERTY, S., KLAENHAMMER, T.R., 2011. The impact of omic technologies on the study of food microbes. *Annual Review of Food Science and Technology* **2**, 353-371. | [DOI:10.1146/annurev-food-030810-110338](https://doi.org/10.1146/annurev-food-030810-110338)
- OGIER, J.-C., SON, O., GRUSS, A., ET AL., 2002. Identification of the bacterial microflora in dairy products by temporal temperature gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 3691-3701.
- OUOBA, L.I.I., KANDO, C., PARKOUDA, C., ET AL., 2012. The microbiology of Bandji, palm wine of *Borassus akeassii* from Burkina Faso: identification and genotypic diversity of yeasts, lactic acid and acetic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology* **113**, 1428-1441. | [DOI:10.1111/jam.12014](https://doi.org/10.1111/jam.12014)
- OUOBA, L.I.I., NYANGA-KOUMOU, C. A. G., PARKOUDA, C., ET AL., 2010. Genotypic diversity of lactic acid bacteria isolated from African traditional alkaline-fermented foods. *Journal of Applied Microbiology* **108**, 2019-2029. | [DOI:10.1111/j.1365-2672.2009.04603.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04603.x)
- ØVERLAND, M., KARLSSON, A., MYDLAND, L.T., ET AL., 2013. Evaluation of *Candida utilis*, *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* yeasts as protein sources in diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* **402-403**, 1-7. | [DOI:10.1016/j.aquaculture.2013.03.016](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.03.016)
- PANELLI, S., BRAMBATI, E., BONACINA, C., ET AL., 2013. Diversity of fungal flora in raw milk from the Italian Alps in relation to pasture altitude. *SpringerPlus* **2**, 405. | [DOI:10.1186/2193-1801-2-405](https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-405)
- PEREIRA-DIAS, S., POTES, M.E., MARINHO, A., ET AL., 2000. Characterisation of yeast flora isolated from an artisanal Portuguese ewes' cheese. *International Journal of Food Microbiology* **60**, 55-63.
- PERIN, L.M., DAL BELLO, B., BELVISO, S., ET AL., 2015. Microbiota of Minas cheese as influenced by the nisin producer *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* GLc05. *International Journal of Food Microbiology* **214**, 159-167. | [DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.08.006](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.08.006)
- POGLIANO, J., POGLIANO, N., SILVERMAN, J.A., 2012. Daptomycin-mediated reorganization of membrane architecture causes mislocalization of essential cell division proteins. *Journal of Bacteriology* **194**, 4494-4504. | [DOI:10.1128/JB.00011-12](https://doi.org/10.1128/JB.00011-12)

- POWELL, I.B., BROOME, M.C., LIMSOWTIN, G.K.Y., 2011. « Cheese | Starter cultures: General aspects »; Dans: Fuquay, J.W., Fox, P.F., McSweeney, P.L.H. (Éd.), *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Elsevier, p. 552-558. | ISBN:978-0-12-374407-4
- PRESCOTT, L.M., 2013. *Microbiologie*. De Boeck, Bruxelles. | ISBN:978-2-8041-8039-3
- PRODUITS LAITIERS, 2016. Les produits laitiers - Tout savoir sur le lait, le beurre, le fromage. URL: <http://www.produits-laitiers.com/> (consulté le 07.11.2016).
- QUAST, C., PRUESSE, E., YILMAZ, P., ET AL., 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research* **41**, D590-D596. | DOI:10.1093/nar/gks1219
- RADEMAKER, J.L.W., PEINHOPF, M., RIJNEN, L., ET AL., 2005. The surface microflora dynamics of bacterial smear-ripened Tilsit cheese determined by T-RFLP DNA population fingerprint analysis. *International Dairy Journal* **15**, 785-794. | DOI:10.1016/j.idairyj.2004.08.027
- RASTALL, R.A., GIBSON, G.R., 2015. Recent developments in prebiotics to selectively impact beneficial microbes and promote intestinal health. *Current Opinion in Biotechnology* **32**, 42-46. | DOI:10.1016/j.copbio.2014.11.002
- RATTRAY, F.P., EPPERT, I., 2011. « Cheese | Secondary cultures »; Dans: Fuquay, J.W., Fox, P.F., McSweeney, P.L.H. (Éd.), *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Elsevier, p. 567-573. | ISBN:978-0-12-374407-4
- REDDY, K.V.R., YEDERY, R.D., ARANHA, C., 2004. Antimicrobial peptides: premises and promises. *International Journal of Antimicrobial Agents* **24**, 536-547. | DOI:10.1016/j.ijantimicag.2004.09.005
- REID, G., JASS, J., SEBULSKY, M.T., ET AL., 2003. Potential uses of probiotics in clinical practice. *Clinical Microbiology Reviews* **16**, 658-672.
- RIDLEY, C.P., KHOSLA, C., 2009. « Polyketides »; Dans: *Encyclopedia of Microbiology*. Elsevier, p. 472-481. | ISBN:978-0-12-373944-5
- RILEY, M.A., 2009. « Bacteriocins, biology, ecology, and evolution »; Dans: *Encyclopedia of Microbiology*. Elsevier, p. 32-44. | ISBN:978-0-12-373944-5
- ROOSTITA, R., FLEET, G.H., 1996. The occurrence and growth of yeasts in Camembert and blue-veined cheeses. *Int J Food Microbiol* **28**, 393-404.
- RUHE, Z.C., LOW, D.A., HAYES, C.S., 2013. Bacterial contact-dependent growth inhibition. *Trends in Microbiology* **21**, 230-237. | DOI:10.1016/j.tim.2013.02.003
- SANTOS, A., SANCHEZ, A., MARQUINA, D., 2004. Yeasts as biological agents to control *Botrytis cinerea*. *Microbiological Research* **159**, 331-338. | DOI:10.1016/j.micres.2004.07.001
- SAVEUR EN OR, 2016. Saveurs en Or | La Marque des Gens qui font le Nord ! URL: <http://saveursenor.com/> (consulté le 07.11.2016).

- SAXELIN, M., TYNKKYNEN, S., MATTILA-SANDHOLM, T., ET AL., 2005. Probiotic and other functional microbes: from markets to mechanisms. *Current Opinion in Biotechnology* **16**, 204-211. | [DOI:10.1016/j.copbio.2005.02.003](https://doi.org/10.1016/j.copbio.2005.02.003)
- SCHISLER, D.A., JANISIEWICZ, W.J., BOEKHOUT, T., ET AL., 2011. « Agriculturally important yeasts »; Dans: *The Yeasts: A Taxonomic Study*. Elsevier, p. 45-52. | [ISBN:978-0-444-52149-1](https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52149-1)
- SCHOCH, C.L., SEIFERT, K.A., HUHDORF, S., ET AL., 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**, 6241–6246.
- SENSES-ERGUL, S., ÁGOSTON, R., BELÁK, Á., ET AL., 2006. Characterization of some yeasts isolated from foods by traditional and molecular tests. *International Journal of Food Microbiology* **108**, 120-124. | [DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2005.10.014](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.10.014)
- SERCE, O., BENZER, D., GURSOY, T., ET AL., 2013. Efficacy of *saccharomyces boulardii* on necrotizing enterocolitis or sepsis in very low birth weight infants: A randomised controlled trial. *Early Human Development* **89**, 1033-1036. | [DOI:10.1016/j.earlhumdev.2013.08.013](https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2013.08.013)
- SILVA, T., RETO, M., SOL, M., ET AL., 2011. Characterization of yeasts from Portuguese brined olives, with a focus on their potentially probiotic behavior. *LWT - Food Science and Technology* **44**, 1349-1354. | [DOI:10.1016/j.lwt.2011.01.029](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.01.029)
- SINGH, R.S., SOOCH, B.S., PURI, M., 2007. Optimization of medium and process parameters for the production of inulinase from a newly isolated *Kluyveromyces marxianus* YS-1. *Bioresource Technology* **98**, 2518-2525. | [DOI:10.1016/j.biortech.2006.09.011](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.09.011)
- SNOEK, I.S.I., STEENSMA, H.Y., 2006. Why does *Kluyveromyces lactis* not grow under anaerobic conditions? Comparison of essential anaerobic genes of *Saccharomyces cerevisiae* with the *Kluyveromyces lactis* genome. *FEMS Yeast Research* **6**, 393-403. | [DOI:10.1111/j.1567-1364.2005.00007.x](https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2005.00007.x)
- SOCOL, C.R., VANDENBERGHE, L.P. DE S., SPIER, M.R., ET AL., 2010. The potential of probiotics: A review. *Food Technology and Biotechnology* **48**, 21.
- SOLAIMAN, D.K.Y., ASHBY, R.D., ZERKOWSKI, J.A., ET AL., 2015. Control-release of antimicrobial sophorolipid employing different biopolymer matrices. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* **4**, 342-348. | [DOI:10.1016/j.bcab.2015.06.006](https://doi.org/10.1016/j.bcab.2015.06.006)
- SPADARO, D., VOLA, R., PIANO, S., ET AL., 2002. Mechanisms of action and efficacy of four isolates of the yeast *Metschnikowia pulcherrima* active against postharvest pathogens on apples. *Postharvest Biology and Technology* **24**, 123-134. | [DOI:10.1016/S0925-5214\(01\)00172-7](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(01)00172-7)
- SPOHNER, S.C., SCHAUM, V., QUITMANN, H., ET AL., 2016. *Kluyveromyces lactis*: An emerging tool in biotechnology. *Journal of Biotechnology* **222**, 104-116. | [DOI:10.1016/j.jbiotec.2016.02.023](https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.02.023)

- STAATS, M., ARULANDHU, A.J., GRAVENDEEL, B., ET AL., 2016. Advances in DNA metabarcoding for food and wildlife forensic species identification. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **408**, 4615-4630. | [DOI:10.1007/s00216-016-9595-8](https://doi.org/10.1007/s00216-016-9595-8)
- STARMER, W.T., LACHANCE, M.-A., 2011. « Yeast ecology »; Dans: The Yeasts: A Taxonomic Study. *Elsevier*, p. 65-83. | [ISBN:978-0-444-52149-1](https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52149-1)
- TABERLET, P., COISSAC, E., HAJIBABAEI, M., ET AL., 2012. Environmental DNA. *Molecular Ecology* **21**, 1789–1793. | [DOI:10.1111/j.1365-294X.2012.05542.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05542.x)
- TANRIOVER, M.D., AKSOY, D.Y., UNAL, S., 2012. Use of probiotics in various diseases: evidence and promises. *Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej* **122 Suppl 1**, 72-77.
- TEDERSOO, L., NILSSON, R.H., ABARENKOV, K., ET AL., 2010. 454 Pyrosequencing and Sanger sequencing of tropical mycorrhizal fungi provide similar results but reveal substantial methodological biases. *New Phytologist* **188**, 291-301. | [DOI:10.1111/j.1469-8137.2010.03373.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03373.x)
- TEMPEL, T. VAN DEN, JAKOBSEN, M., 1998. Yeasts associated with Danablu. *International Dairy Journal* **8**, 25-31. | [DOI:10.1016/S0958-6946\(98\)00013-2](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(98)00013-2)
- TODOROV, S.D., WACHSMAN, M., TOME, E., ET AL., 2010. Characterisation of an antiviral pediocin-like bacteriocin produced by *Enterococcus faecium*. *Food Microbiology* **27**, 869-879. | [DOI:10.1016/j.fm.2010.05.001](https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.05.001)
- TOJU, H., TANABE, A.S., YAMAMOTO, S., ET AL., 2012. High-Coverage ITS Primers for the DNA-Based Identification of Ascomycetes and Basidiomycetes in Environmental Samples. *PLoS ONE* **7**, e40863. | [DOI:10.1371/journal.pone.0040863](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040863)
- TORNADIJO, M.E., FRESNO, J.M., MARTIN SARMIENTO, R., ET AL., 1998. Study of the yeasts during the ripening process of Armada cheeses from raw goat's milk. *Le Lait* **78**, 647-659. | [DOI:10.1051/lait:1998657](https://doi.org/10.1051/lait:1998657)
- VACHEYROU, M., NORMAND, A.-C., GUYOT, P., ET AL., 2011. Cultivable microbial communities in raw cow milk and potential transfers from stables of sixteen French farms. *International Journal of Food Microbiology* **146**, 253-262. | [DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.02.033](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.02.033)
- VALDES-STAUER, N., SCHERER, S., SEILER, H., 1997. Identification of yeasts and coryneform bacteria from the surface microflora of brick cheeses. *International Journal of Food Microbiology* **34**, 115-129.
- VAN BOGAERT, I.N.A., SAERENS, K., DE MUYNCK, C., ET AL., 2007. Microbial production and application of sophorolipids. *Applied Microbiology and Biotechnology* **76**, 23-34. | [DOI:10.1007/s00253-007-0988-7](https://doi.org/10.1007/s00253-007-0988-7)

- VAN DER AA KÜHLE, A., SKOVGAARD, K., JESPERSEN, L., 2005. In vitro screening of probiotic properties of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* and food-borne *Saccharomyces cerevisiae* strains. *International Journal of Food Microbiology* **101**, 29-39. | [DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.10.039](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.10.039)
- VILJOEN, B.C., GREYLING, T., 1995. Yeasts associated with Cheddar and Gouda making. *International Journal of Food Microbiology* **28**, 79-88. | [DOI:10.1016/0168-1605\(94\)00114-L](https://doi.org/10.1016/0168-1605(94)00114-L)
- VILJOEN, B.C., KHOURY, A.R., HATTINGH, A., 2003. Seasonal diversity of yeasts associated with white-surface mould-ripened cheeses. *Food Research International* **36**, 275-283. | [DOI:10.1016/S0963-9969\(02\)00169-2](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(02)00169-2)
- WAGHU, F.H., BARAI, R.S., GURUNG, P., ET AL., 2016. CAMPR3: a database on sequences, structures and signatures of antimicrobial peptides. *Nucleic Acids Research* **44**, D1094-1097. | [DOI:10.1093/nar/gkv1051](https://doi.org/10.1093/nar/gkv1051)
- WALSTRA, P., WOUTERS, J., GEURTS, T., 2006a. « Cheese varieties »; Dans: Dairy Science and Technology. *CRC Press*, p. 687-741. | [ISBN:978-0-8247-2763-5](https://www.crcpress.com/ISBN-978-0-8247-2763-5)
- WALSTRA, P., WOUTERS, J., GEURTS, T., 2006b. « Principles of cheese making »; Dans: Dairy Science and Technology. *CRC Press*, p. 577-582. | [ISBN:978-0-8247-2763-5](https://www.crcpress.com/ISBN-978-0-8247-2763-5)
- WALSTRA, P., WOUTERS, J., GEURTS, T., 2005. « Microbiology of milk »; Dans: Dairy Science and Technology. *CRC Press*, p. 175-205. | [ISBN:978-0-8247-2763-5](https://www.crcpress.com/ISBN-978-0-8247-2763-5)
- WALTER, M.J., 2006. « Interleukins | IL-12 »; Dans: Encyclopedia of Respiratory Medicine. *Elsevier*, p. 377-382. | [ISBN:978-0-12-370879-3](https://www.elsevier.com/ISBN-978-0-12-370879-3)
- WANG, G., LI, X., WANG, Z., 2016. APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education. *Nucleic Acids Research* **44**, D1087-D1093. | [DOI:10.1093/nar/gkv1278](https://doi.org/10.1093/nar/gkv1278)
- WILLETT, J.L.E., RUHE, Z.C., GOULDING, C.W., ET AL., 2015. Contact-dependent growth inhibition (CDI) and CdiB/CdiA two-partner secretion proteins. *Journal of Molecular Biology* **427**, 3754-3765. | [DOI:10.1016/j.jmb.2015.09.010](https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.09.010)
- WILLIAMS, G.C., DELVES-BROUGHTON, J., 2003. « Nisin »; Dans: Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition. *Elsevier*, p. 4128-4135. | [ISBN:978-0-12-227055-0](https://www.elsevier.com/ISBN-978-0-12-227055-0)
- WINKELSTRÖTER, L.K., TULINI, F.L., DE MARTINIS, E.C.P., 2015. Identification of the bacteriocin produced by cheese isolate *Lactobacillus paraplantarum* FT259 and its potential influence on *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *LWT - Food Science and Technology* **64**, 586-592. | [DOI:10.1016/j.lwt.2015.06.014](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.06.014)
- WOJTATOWICZ, M., CHRZANOWSKA, J., JUSZCZYK, P., ET AL., 2001. Identification and biochemical characteristics of yeast microflora of Rokpol cheese. *International Journal of Food Microbiology* **69**, 135-140. | [DOI:10.1016/S0168-1605\(01\)00582-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00582-7)

- WOLFE, B.E., BUTTON, J.E., SANTARELLI, M., ET AL., 2014. Cheese Rind Communities Provide Tractable Systems for *In Situ* and *In Vitro* Studies of Microbial Diversity. *Cell* **158**, 422-433. | [DOI:10.1016/j.cell.2014.05.041](https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.041)
- WYDER, M.-T.M.-T., PUHAN, Z., 1999. Role of selected yeasts in cheese ripening: *International Dairy Journal* **9**, 117-124. | [DOI:10.1016/S0958-6946\(99\)00032-1](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(99)00032-1)
- XIE, N., ZHOU, T., LI, B., 2012. Kefir yeasts enhance probiotic potentials of *Lactobacillus paracasei* H9: The positive effects of coaggregation between the two strains. *Food Research International* **45**, 394-401. | [DOI:10.1016/j.foodres.2011.10.045](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.10.045)
- XU, L., RAVNSKOV, S., LARSEN, J., ET AL., 2012. Soil fungal community structure along a soil health gradient in pea fields examined using deep amplicon sequencing. *Soil Biology and Biochemistry* **46**, 26-32. | [DOI:10.1016/j.soilbio.2011.11.010](https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2011.11.010)
- YADAV, J.S.S., BEZAWADA, J., AJILA, C.M., ET AL., 2014. Mixed culture of *Kluyveromyces marxianus* and *Candida krusei* for single-cell protein production and organic load removal from whey. *Bioresource Technology* **164**, 119-127. | [DOI:10.1016/j.biortech.2014.04.069](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.04.069)
- ZANIRATI, D.F., ABATEMARCO, M., SANDES, S.H. DE C., ET AL., 2015. Selection of lactic acid bacteria from Brazilian kefir grains for potential use as starter or probiotic cultures. *Anaerobe* **32**, 70-76. | [DOI:10.1016/j.anaerobe.2014.12.007](https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2014.12.007)
- ZHOU, H.-X., XU, J.-L., CHI, Z., ET AL., 2013. β -Galactosidase over-production by a mig1 mutant of *Kluyveromyces marxianus* KM for efficient hydrolysis of lactose. *Biochemical Engineering Journal* **76**, 17-24. | [DOI:10.1016/j.bej.2013.04.010](https://doi.org/10.1016/j.bej.2013.04.010)

Index des figures

Figure 1. Résumé des différentes étapes de fabrication d'un fromage	4
Figure 2. Représentation de la coagulation de la caséine du lait par la présure.....	5
Figure 3. Représentation graphique de l'évolution des microflores du fromage selon le pH et l'étape de production.....	16
Figure 4. Localisation de la commune de Nomain par rapport aux départements Nord et Pas-de-Calais.	24
Figure 5. Résumé des différentes étapes de fabrication de la Tomme d'Orchies.....	25
Figure 6. Aspect final de la Tomme d'Orchies	25
Figure 7. Schéma de coupe pour l'analyse séparée de la croûte et du cœur d'un fromage.....	27
Figure 8. Représentation schématique de la région ITS1-5,8 S-ITS2 chez les <i>fungi</i>	29
Figure 9. Étape préliminaire du séquençage Illumina	31
Figure 10. Schématisation du séquençage Illumina	32
Figure 11. Processus de traitement bio-informatique des données issues d'analyses métagénomiques.....	33
Figure 12. Schéma des différents mécanismes d'antagonisme	36
Figure 13. Représentation du mécanisme d'antagonisme par compétition pour les nutriments et l'espace.....	37
Figure 14. Représentation schématique du mécanisme d'antagonisme par modification physicochimique du milieu via la production de métabolites secondaires.....	38
Figure 15. Représentation schématique des mécanismes d'action des composés antagonistes agissant sur la membrane plasmique ou la paroi bactérienne.....	41
Figure 16. Représentation de la composition en acides aminés de la nisine A.....	42
Figure 17. Représentation schématique des mécanismes d'actions des composés antagonistes agissant sur l'ADN et sur la synthèse protéique	44
Figure 18. Classification des bactériocines	45
Figure 19. Nombre de publications sur NCBI concernant les bactériocines au cours du temps	47
Figure 20. Nombre de publications sur NCBI concernant les mycocines au cours du temps	48
Figure 21. Représentation semi-développée d'une unité cétide	48

Figure 22. Représentation moléculaire de la vancomycine et de l'érythromycine..... 49

Figure 23. Représentation schématique d'une levure et des types de reproduction..... 54

Figure 24. Différents domaines biotechnologiques utilisant les levures..... 56

Figure 25. Représentation des sites d'actions probiotiques dans la modulation de l'immunité sur l'épithélium intestinal 70

Figure 26. Photographie de *Kluyveromyces lactis* au microscope à contraste interférentiel..... 76

Figure 27. Photographie de *Kluyveromyces marxianus* au microscope à contraste interférentiel.....77

Figure 28. Représentation du plan d'expérimentation suivi au cours des travaux de recherches.....87

Figure 29. Analyse métagénomique du microbiote bactérien de la Tomme d'Orchies selon la durée d'affinage..... 88

Figure 30. Analyse métagénomique du microbiote fongique de la Tomme d'Orchies selon la durée d'affinage..... 89

Figure 31. Regroupements phylogénétiques des isolats de levures issues de la Tomme d'Orchies à l'aide de la technique de REP-PCR 91

Figure 32. Zone d'inhibition observée autour des deux souches de *Kluyveromyces* antagonistes92

Figure 33. Spectres de masse d'une zone d'inhibition superposée sur le spectre du contrôle milieu ...166

Figure 34. Gels SDS-PAGE des différentes fractions issues du lysat des *Kluyveromyces* antagonistes par cycle de congélation/décongélation..... 171

Index des tableaux

Tableau 1. Résumé des communications scientifiques inhérentes aux travaux de thèse.....	XII
Tableau 2. Les différentes variétés de fromages selon la classification européenne et française7	
Tableau 3. Genres, espèces, fréquence et zone d'isolement des bactéries retrouvées dans les fromages au lait de vache	12
Tableau 4. Genres, espèces, fréquence et zone d'isolement des <i>fungi</i> retrouvés dans les fromages au lait de vache	13
Tableau 5. Présentation de plusieurs fromages, et de leur type, produit dans le Nord-Pas-de-Calais	23
Tableau 6. Résumé des technologies NGS actuellement disponibles.....	28
Tableau 7. Exemples de nomenclatures possibles chez les levures.....	55
Tableau 8. Liste des probiotiques utilisés chez l'homme et l'animal	62
Tableau 9. Composition des différentes solutions utilisées pour la migration sur un gel SDS-PAGE	170

Annexe I

Identification et mise en évidence d'activité antagonistes chez des levures isolées chez des enfants hospitalisés, en Algérie

Yeasts isolated from Algerian infants's feces revealed a burden of *Candida albicans* species, non-*albicans Candida* species and *Saccharomyces cerevisiae*

Hamza Ait Seddik¹, Alexandre Ceugniez², Farida Bendali¹, Benoit Cudennec², Djamel Drider²

¹Laboratoire de Microbiologie Appliquée, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université de Bejaia, Bejaia 06000, Algérie.

²Laboratoire Régional de Recherche en Agroalimentaire et Biotechnologie: Institut Charles Viollette. Bâtiment Polytech'Lille, Université Lille 1, Avenue Paul Langevin, Cité Scientifique, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France.

Corresponding author: djamel.drider@univ-lille1.fr (D. Drider)

Abstract

This study aimed at showing the yeast diversity in feces of Algerian infants, aged between 1 and 24 months, hospitalized at Bejaia hospital (northeast side of the country). Thus, 20 colonies with yeast characteristics were isolated and identified using biochemical (ID32C Api system) and molecular (sequencing of ITS1-5.8S-ITS2 region) methods. Almost all colonies isolated (19 strains) were identified as *Candida* spp., with predominance of *Candida albicans* species, and one strain was identified as *Saccharomyces cerevisiae*. Screening of strains with inhibitory activities unveiled the potential of *Candida parapsilosis* P48L1 and *Candida albicans* P51L1 to inhibit the growth of *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Further studies performed with these two *Candida* strains revealed their susceptibility to clinically used antifungal compounds and were then characterized for their cytotoxicity and hemolytic properties. On the other hand, *Saccharomyces cerevisiae* P9L1 isolated as well in this study was shown to be devoid of antagonism but resulted safe and overall usable as probiotic.

Keywords: Infant feces; *Candida* species; Antagonistic yeasts; *Saccharomyces cerevisiae*; Probiotic.

Introduction

The human gastrointestinal tract is a complex ecological niche containing a multitude of microbes including bacteria, yeast and fungi. These microbes are foreseen to be inherited from the mother and the surrounding environments and colonize the gastrointestinal tract of infants immediately after the birth (O'Hara and Shanahan 2006). Bacteria are the most dominant microbes (more than 99 % of total population) (Ojetti et al. 2009), but eukaryotic cells such as yeasts and filamentous fungi are also part of this microbiota (Rajilić-Stojanović et al. 2009). The presence of yeasts in the gastrointestinal tract of infants was observed at early age, although these unicellular eukaryotic cells represent <1 % of the gut microbiota (Chandler et al. 1980). However, their role and functions in the equilibrium of the microbiota are not insignificant (Parfrey et al. 2011). *Candida* species are typically harmless eukaryotic commensal yeasts that are members of the Ascomycota phylum and can thus be recovered from the mammalian and environment sources. They are detected in all gastrointestinal sections of about 70 % of healthy adults and are normally found in feces. Most of yeasts isolated are members of the *Candida* genus (Schulze and Sonnenborn 2009) and are commonly located in the normal commensal microbiota on the mucosal surfaces of the gastrointestinal and genitourinary tracts (Kumamoto 2011). *Candida* species were also encountered in the majority of neonates by the end of the first month of life (Schulze and Sonnenborn 2009). Remarkably, *Candida* genus could provoke local or systemic opportunistic infections in hospitalized patients, particularly in patients with compromised immune system (Moris et al. 2008). Most often *Candida albicans* is the guilty agent, but prevalence of non-albicans *Candida* species in some patients was reported (Mac Callum 2010). Harmless and nonpathogenic species such as *Saccharomyces cerevisiae* were also reported (Psomas et al. 2001). *S. cerevisiae* is marketed as probiotic formulation to treat various human gastrointestinal disorders (Lukaszewicz 2012). The beneficial effects of yeasts

include their competitiveness for nutrients and adhesion, production of antagonistic compounds, immunomodulation, cholesterol assimilation, toxin elimination and adhesion and then neutralization of pathogenic bacteria (Moslehi-Jenabian et al. 2010; Hatoum et al. 2012; Ceugniz et al. 2015). Here, we use a culture dependent approach to establish the yeast diversity of Algerian infants hospitalized at Bejaia hospital, for reasons other than gastrointestinal disorders. This analysis permitted the isolation of 20 yeasts with a bulk of *C. albicans* species, and lesser with non-*albicans Candida* species and one isolate of *S. cerevisiae* P9L1. This report unveils the inhibitory properties of yeast pathogens *C. parapsilosis* P48L1 and *C. albicans* P51L1. These antagonistic yeasts as well as *S. cerevisiae* P9L1 were deeply studied for their negative and positive effects. To the best of our knowledge, this is the first report shedding light and dealing with yeast diversity from an Algerian infants reservoir.

Materials and methods

Isolation of yeasts

Yeasts were isolated from feces of 62 infants without gastrointestinal disorders (diarrhea), aged between 1 and 24 months, and hospitalized in the pediatric service of Khalil Amrane hospital at Bejaia city (Algeria). An aliquot (1 g) of feces was resuspended in 9 ml of saline solution (0.9 % NaCl) and then plated in yeast extract-peptonedextrose agar (YPD), pH 5.5, supplemented with 100 µg/ml of filter-sterilized oxytetracycline (Biokar, France). Plates were incubated at 37 °C for 48 h. Five colonies with yeast characteristics were purified by repeated streaking on YPD agar plates. These colonies were then maintained in YPD broth at +4 °C until use.

Biochemical identification of yeasts with ID 32C Api systems

All yeast colonies were identified based on their biochemical profiles using ID32C strips (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France). Before inoculation of the ID32C system, strains were streaked on YPD agar plates and incubated for 24 h at 25 °C. After inoculation, ID32C systems were incubated at 25 °C for 48 h. After this period of incubation, the carbohydrate assimilation profile obtained for each tested isolate was compared to the database apiweb version 3.0 (BioMérieux) to obtain the final yeast diagnosis (Ceugniet *et al.* 2015). Statistical analysis of ID32 C and ITS1-5.8S-ITS2 rDNA sequencing was performed with the software SPSS® Statistic v20 of IBM® (Armonk, NY, USA). Correlation and comparison were made with the crossed grid methods using Kappa of Cohen value.

Molecular identification of yeasts by sequencing their ITS1-5.8S-ITS regions

Total DNA was extracted from each isolate with the Bustin'Grab method (Harju *et al.* 2004). Afterward, it was quantified and amplified using the ITS1 forward primer 5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3' and the ITS4 reverse primer 5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3' (Belloch *et al.* 1998; Schoch *et al.* 2012) and the following PCR program: initial denaturation 5 min at 94 °C, denaturation 30 s at 94 °C, annealing 30 s at 57 °C, elongation 1 min at 72 °C and final elongation 5 min at 72 °C. Thirty-five cycles were used for each amplification.

PCR products were purified using the Nucleospin® Gel and PCR Clean-Up kit of Machery-Nagel (Düren, Germany). PCR products were sequenced at Eurofins Genomics (Ebersberg, Germany). All these sequences were compared to those available on the NCBI database using a megablast research, and confirmed using the Ribosomal Database project on sequence match with default parameters except size placed at "<1200" parameter (Cole *et al.* 2014).

Screening of yeasts with inhibitory activities

The spot-on-lawn method was used to evaluate the antagonistic activity of yeast isolates against *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923 and *Listeria innocua* CLIP 74915. An overnight culture of each yeast isolate was prepared in YPD broth at 37 °C and individually inoculated onto YPD agar plates by spot-inoculating 5 µl, leading to a zone of inhibition of 6 mm. The plates were incubated at 37 °C for 48 h. The growth in each plate was then overlaid with 10 ml of molten nutrient agar [0.7 % (w/v) agar, Fluka, Ireland] previously inoculated with the pathogen cultures (10⁶ CFU/ml). The plates were incubated aerobically at 37 °C for 18 h and then examined for growth inhibition zones (Gotcheva et al. 2002).

Hemolytic activity

The hemolytic activity of yeasts was carried out as recently described by Kumar and Sharma (2013) but with slight modifications. Thus, 10 µl of yeast culture was spotted onto YPD agar plates containing 5 % (v/v) sheep blood (Eurobio, Les Ulis, France). Plates were incubated at 37 °C for 48 h in aerobic conditions. After this period, a transparent/ semitransparent zone around the spots was considered as positive hemolytic activity.

Acid and bile tolerance

The survival under conditions simulating those encountered in the gastrointestinal tract was investigated for antagonistic yeasts and *S. cerevisiae*. To test the strains for acid tolerance, yeasts from fresh (24 h) culture in YPD broth were centrifuged (5000g, 10 min) and the pellets obtained were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) and then resuspended, at 10⁷ CFU/ml, in 5 ml of PBS adjusted to pH 1.5, 2 or 3. Samples were taken after 0, 1 and 3 h of incubation at 37 °C and plated onto YPD agar to determine the number of viable cells. Survival rate was determined by comparing the number of viable cells after

incubation to the initial suspended cells number. To test the bile tolerance, 5 ml PBS containing 0.3, 0.5, 1 and 2 % (w/v) oxgall bile (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) was inoculated with the yeast culture (10^6 CFU/ml) and then incubated at 37 °C for 4 h. After incubation, survival rate was determined as described for acid tolerance assays.

Antifungal susceptibility tests

Antagonistic yeasts as well as *S. cerevisiae* were tested for in vitro susceptibility to amphotericin, 5-fluorocytosin, fluconazole, voriconazole and caspofungin of clinical use using the CLSI BMD method (Clinical and standard, Institute). Minimum inhibitory concentration (MIC) assays were read after 24 h of incubation when tested against *Candida* spp., whereas the MIC endpoints for triazoles were read after 48 h when they were tested against non-*Candida* yeasts. In all instances, MICs were determined visually as the lowest concentration of drug that caused significant diminution of growth levels.

Adhesion and cytotoxicity assays performed on antagonistic yeasts

Cell line culture

The cell line used for the adhesion and cytotoxicity assays was the human colorectal adenocarcinoma Caco-2 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany). Cells were routinely grown in 75 cm² flasks in a controlled atmosphere of 5 % CO₂ and 95 % air at 37 °C in Dulbecco's Modified Essential Medium (DMEM, Biowest, France) containing 4.5 g/l glucose, 2 mM l-glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 U/ml streptomycin, 1 % (v/v) nonessential amino acids and 10 % (v/v) fetal bovine serum (FBS). All the reagents were from PAN-Biotech GmbH (Aidenbach, Germany).

Adhesion assay

To assess the adhesion potential, when sub-confluence was reached, Caco-2 cells were prepared in 24-well tissue culture plates by seeding 4×10^4 cells per well and incubating for 24 h. Overnight yeast cultures (10^7 CFU/ml) were harvested by centrifugation (5000g, 10 min), resuspended in DMEM without FBS and antibiotics and then applied on confluent Caco-2 cell monolayers (10^6 CFU/well). After 2 h of incubation at 37 °C (5 % CO₂ and 95 % air), monolayers were washed twice with 300 µl of phosphate-buffered saline (PBS, 100 mM, pH 7.4) to remove nonadherent yeasts, and Caco-2 cells were lysed by incubation at room temperature for 15 min in the presence of 0.1 % Triton X100, to keep yeast only. Lysates were diluted and plated onto YPD agar to determine the number of adherent yeasts.

CCK-8 cytotoxicity assay

Cytotoxicity of selected yeast strains toward Caco-2 cells was assessed in vitro using the Cell Counting Kit-8 (CCK-8) assay (Dojindo Molecular Technologies, Japan). CCK-8 allows convenient assays using water-soluble tetrazolium salt: WST-8[2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt], which produces, upon bioreduction by cellular dehydrogenases, an orange-colored formazan. The amount of formazan produced is directly proportional to the number of living cells. Caco-2 cells were seeded at a density of 8×10^3 cells/well in 96-well cell culture plates and preincubated for 24 h before being incubated with yeasts (10^5 CFU/well) prepared in DMEM as described for the adhesion assay. After incubation, the medium was removed and cells were incubated with 150 µl of DMEM containing 50 µl of CCK-8 reagent for 4 h 37 °C. The relative viability (%) was then calculated based on absorbance at 450 nm using a microplate reader (Xenius SAFAS, Monaco). Results were expressed as percentage of proliferation. Viability of nontreated control cells was defined as 100 %. Absorbance of wells without Caco-2 cells and with yeasts was subtracted from absorbance of wells containing Caco-2 cells and yeasts.

Aggregation assays

The auto-aggregation assays were performed using the method described by [Kos and al. \(2003\)](#). Yeast was grown for 24 h at 37 °C in YPD broth. The cells were harvested by centrifugation (5000g, 10 min at 4 °C), washed twice with PBS (pH 7.2) and resuspended in the PBS. Cells suspensions were mixed by vortexing for 30 s, and autoaggregation was determined after 2 and 4 h of incubation at 37 °C. An aliquot (1 ml) of these suspensions was carefully removed from the upper zone, and the absorbance at 600 nm was read on a spectrophotometer (Shimadzu, Germany). The auto-aggregation percentage was expressed as:

$$1 - (A_t/A_0) \times 100,$$

where A_t represented the absorbance at time $t = 2$ or 4 h

and A_0 the absorbance at $t = 0$ h.

For co-aggregation with pathogens, *E. coli* ATCC 25922 and *S. aureus* ATCC 25923 were grown in nutrient broth at 37 °C for 18 h. Yeast and pathogens cell suspensions from overnight cultures were prepared as described above in PBS. Equal volumes (2 ml) of yeast and pathogen suspensions were mixed by vortexing 30 s in glass test tubes. Control tubes contained 4 ml of suspension of each bacterial and yeast strains. Absorbance was measured immediately and after 2 h incubation at 37 °C. The percentage of co-aggregation was calculated using equation:

$$\% \text{ Co-aggregation} = \frac{(A_x + A_y)/2 - A(x + y)}{(A_x + A_y)/2} \times 100$$

where A represented absorbance, x and y represented each of the two strains in the control tubes, and $(x + y)$ their mixture.

Construction of phylogenetic tree

A phylogenetic tree was established on PhyML v3.1 based on Maximum-Likelihood algorithm, after ClustalΩ multialign of all sequenced strains, and with following parameters: bootstrap on branch support of 1000 replicates, nucleotide equilibrium frequencies on optimized, invariable sites in optimized, across site variations in optimized, tree-searching operation in best of NNI & SPR and starting tree at BioNJ and optimized tree topology. To set up this phylogenetic tree, we used the recent seaview software (Gouy et al. 2010).

Results

Yeasts isolated from Algerian infants display inhibitory properties

Yeasts were isolated from feces of infants aging between 1 and 24 months (Table 1). Afterward, their identification was performed by ID 32C Api system, and sequencing of the ITS1-5.8S-ITS2 region is shown in Table 1. Out of 20 strains identified by these two independent methods, only the identification of P5L1 and P27L1 resulted to be different. The identification of P1L1 is consistent because *Pichia kuriavzevii*, which is a synonym for *Issatchenkia orientalis*, is the teleomorph of *C. krusei* (Table 1). Thus, these two independent methods showed a good correlation and concordance, as supported statistically with Kramer and Kappa values of 0.914 and 0.615, respectively. Out 20 colonies, 19 colonies belonged to *Candida* species, whilst one colony was identified as *S. cerevisiae* P9L1. In this repertoire, *C. albicans* was the dominant species. The ITS1-5.8S-ITS2 sequences of *C. albicans* isolated here were highly similar (>99 %) to that of *C. albicans* ATCC 10231 (Table 1). The phylogenetic tree indicated that all the *C. albicans* isolates belonged to the same group (Fig. 1; Table 2), considering the strain P35L1 as the most “ancestral”. Remarkably, the reference strain *C. albicans* ATCC 10231, not present in the hospital, was in the same group of hospital strains, advocating that a multigenic phylogenetic tree would be more suitable. Furthermore, pathogen yeasts *C. parapsilosis* P48L1 and *C. albicans* P51L1 displayed inhibitory activities against *E. coli* ATCC 25922 and *S. aureus* ATCC 25923 (Table 3; Fig. 2).

Table 1 Identification of yeasts isolated from infant feces based on their phenotypic criteria (ID32C Api system) and sequences of the ITS1-5.8S-ITS2 region

Isolate	Infant	Age month	Sex	ITS1-5.8S-ITS2 sequencing	% ID	e value	ID 32C Api system	Reliability
P1L1	1	1	M	<i>Pichia kudriavzevii</i>	99	0	<i>Candida krusei</i>	Ok
P2L1	2	24	M	<i>Candida albicans</i>	99	7.00E-159	<i>Candida albicans</i>	Ok
P3L1	3	1	F	<i>Candida glabrata</i>	99	0	<i>Candida glabrata</i>	Ok
P5L1	5	2	M	<i>Candida glabrata</i>	99	0	<i>Candida albicans</i>	-
P8L1	8	1	F	-			<i>Candida rugosa</i>	-
P9L1	9	24	M	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	100	6.00E-03	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Ok
P11L1	11	15	M	<i>Candida parapsilosis</i>	100	0	<i>Candida parapsilosis</i>	Ok
P15L1	15	1	M	<i>Candida albicans</i>	99	0	<i>Candida albicans</i>	Ok
P18L1	18	1	F	<i>Candida albicans</i>	99	0	<i>Candida albicans</i>	Ok
P21L1	21	2	M	<i>Candida albicans</i>	99	0	<i>Candida albicans</i>	Ok
P25L1	25	2	M				<i>Candida tropicalis</i>	-
P27L1	27	6	M	<i>Candida tropicalis</i>	100	2.00E-102	<i>Candida parapsilosis</i>	
P35L1	35	2	M	<i>Candida albicans</i>	99	0	<i>Candida albicans</i>	Ok
P45L1	45	3	F	<i>Candida glabrata</i>	99	0	<i>Candida glabrata</i>	Ok
P48L1	48	12	F	<i>Candida parapsilosis</i>	100	0	<i>Candida parapsilosis</i>	Ok
P49L1	49	20	F	<i>Candida albicans</i>	99	0	<i>Candida albicans</i>	Ok
P51L1	51	24	M	<i>Candida albicans</i>	99	0	<i>Candida albicans</i>	Ok
P54L1	54	9	F	<i>Candida albicans</i>	99	0	<i>Candida albicans</i>	Ok
P56L1	56	2	M	<i>Candida rugosa</i>	99	4.00E-52	<i>Candida albicans</i>	Ok
P62L1	62	20	M	<i>Clavispora lusitanae</i>	100	2.00E-08	<i>Candida rugosa</i>	-
ATCC 10231				<i>Candida albicans</i>	100	0	-	Ok

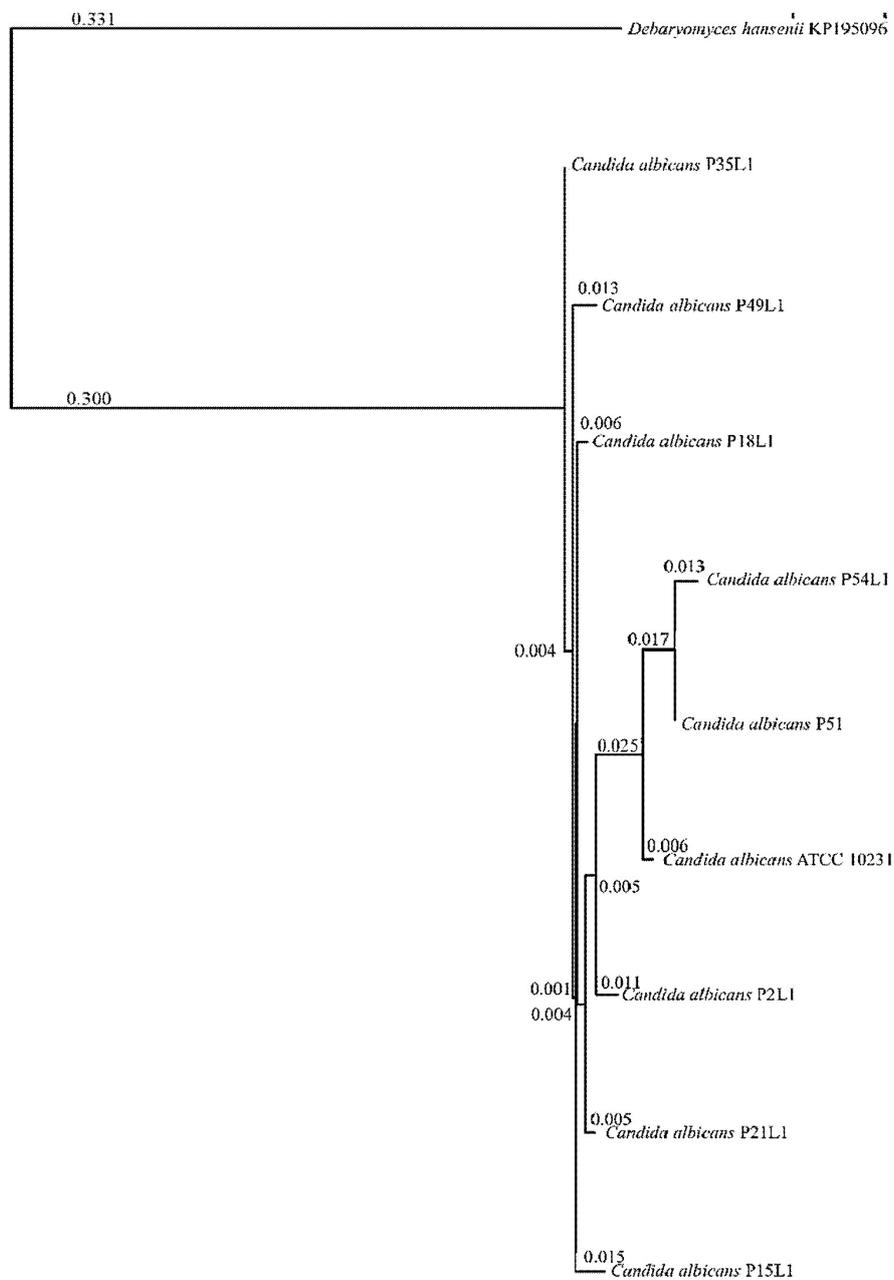


Fig. 1 Phylogenetic tree based on 5.8S ITS1-ITS2 rDNA sequencing of species isolated from the feces of Algerian infants. The tree was established on maximum-likelihood analysis with a bootstrap on branch support of 1000 replicates

Table 2 Analysis of ITS1-5.8S-ITS2 similarities of *Candida albicans* species isolates

Similarity (%)	<i>D. hansenii</i> KP195096 (%)	<i>C. albicans</i> ATCC 10231 (%)	<i>C. albicans</i> P2L1 (%)	<i>C. albicans</i> P15L1 (%)	<i>C. albicans</i> P18L1 (%)	<i>C. albicans</i> P21L1 (%)	<i>C. albicans</i> P35L1 (%)	<i>C. albicans</i> P49L1 (%)	<i>C. albicans</i> P51L1 (%)	<i>C. albicans</i> P54L1 (%)
<i>D. hansenii</i> KP195096	100.0									
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	96.0	100.0								
<i>C. albicans</i> P2L1	95.0	99.4	100.0							
<i>C. albicans</i> P15L1	95.2	98.6	99.0	100.0						
<i>C. albicans</i> P18L1	96.0	99.4	98.7	98.8	100.0					
<i>C. albicans</i> P21L1	96.0	99.4	99.4	98.6	100.0	100.0				
<i>C. albicans</i> P35L1	96.0	99.4	99.4	98.8	99.6	99.6	100.0			
<i>C. albicans</i> P49L1	96.0	99.4	99.4	98.6	99.8	99.8	99.8	100.0		
<i>C. albicans</i> P51L1	96.0	99.8	99.4	99.0	99.2	99.2	99.4	99.2	100.0	
<i>C. albicans</i> P54L1	95.9	99.5	99.5	98.7	99.2	99.2	99.2	99.2	99.7	100.0
Score with external taxon	98.6	Standard deviation with external taxon		1.5						
Score without external taxon	99.3	Standard deviation without external taxon		0.4						
Score without reference strain	99.3	Standard deviation without reference strain		0.3						

Table 3 Antagonism exerted by *Candida parapsilosis* P48L1, *Candida albicans* P51L1 and *Saccharomyces cerevisiae* P9L1

Yeast strain	Inhibitory activity (mm)		
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>Listeria innocua</i> CLIP 749158
<i>C. parapsilosis</i> P48L1	14 ± 0.57	14 ± 1.00	0
<i>C. albicans</i> P51L1	12 ± 1.15	12 ± 0.57	0
<i>S. cerevisiae</i> P9L1	0	0	0

The data (±SD) are the mean of at least three independent experiments

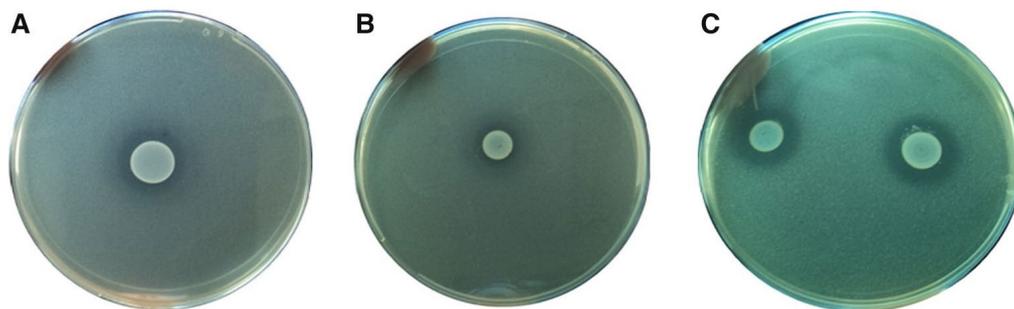


Fig. 2 Plates showing zones of growth inhibition of a *C. albicans* P51L1 against *E. coli* ATCC 25922, b *C. parapsilosis* P48L1 against *E. coli* ATCC 25922, c *C. parapsilosis* P48L1 and *C. albicans* P51L1 against *S. aureus* ATCC 25923

Highlights on probiotic properties of antagonistic yeasts

Adhesion and cytotoxicity to Caco-2 cells

The capabilities of adhesion of *C. parapsilosis* P48L1, *C. albicans* p51L1 and *S. cerevisiae* P9L1 to human Caco-2 cells are studied. As shown in Fig. 3a, the highest level of adhesion was obtained with *S. cerevisiae* P9L1 with 6.34 %, followed then by *C. parapsilosis* P48L1 with 2.03 % and *C. albicans* P51L1 with 0.76 %. Besides, a cytotoxic effect was observed as expected for *C. parapsilosis* P48L1 and *C. albicans* P51L1 with 5.33 and 20.56 % survival, respectively (Fig. 3b). However, no cytotoxic effect was registered for *S. cerevisiae* P9L1 (Fig. 3b), as no significant difference was noted between the control test (noninfected Caco-2 cells) and *S. cerevisiae* P9L1 with a p value >0.5.

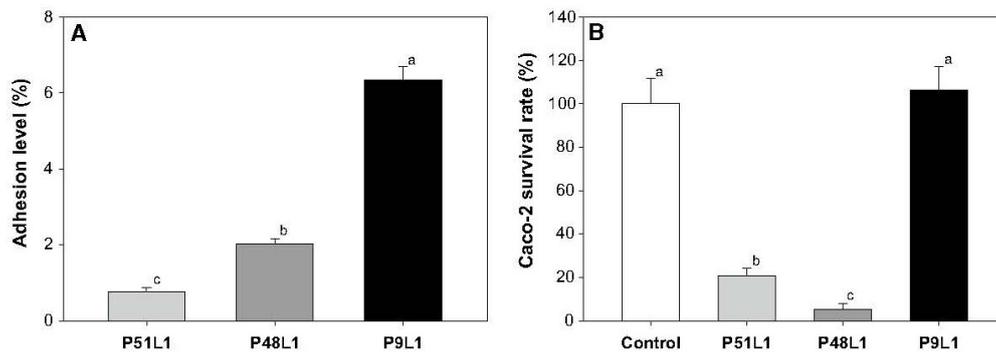


Fig.3 a Adhesion capabilities of *C. albicans* P51L1, *C. parapsilosis* P48L1 and *S. cerevisiae* P9L1 to Caco-2 cells after 2 h of incubation at 37 °C. The data are the means of at least three independent experiments. **b** Cytotoxic effect of *C. albicans* P51L1, *C. parapsilosis* P48L1 and *S. cerevisiae* P9L1 on Caco-2 cells (24 h). The data are the means of at least three independent experiments. Means without a common letter are different ($p < 0.01$) using one-way ANOVA with Tukey test for pairwise comparisons.

Resistance to acidic conditions, bile concentration and antifungal compounds

As shown on Fig. 4a, the survival of *S. cerevisiae* P9L1 was pH dependent. At pH 3, this yeast resisted perfectly even after 3 h of incubation. When the pH was adjusted to 2 and 1.5, a drop in survival rate was registered reaching thereof 92.1 and 28.4 % after 3 h of incubation, respectively. Conversely, no decrease in survival of *C. parapsilosis* P48L1 and *C. albicans* P51L1 was registered. Similarly, these three yeasts were examined for their bile tolerance. As shown on Fig. 4b, *C. parapsilosis* P48L1 and *C. albicans* P51L1 were fully resistant to 2 % (not for 4 %, data not shown) of bile concentration and after 4 h of incubation, contrarily to *S. cerevisiae* P9L1, which was unable to support such harsh conditions as only 46.7 % of survival was registered.

Moreover, the antifungal susceptibility profiles of *C. parapsilosis* P48L1, *C. albicans* P51L1 and *S. cerevisiae* P9L1 were performed in an effort to provide MIC data (Table 4) for optimal therapy. The assays performed showed that *C. parapsilosis* P48L1, *C. albicans* P51L1 and *S. cerevisiae* P9L1 were susceptible to clinical antifungal compounds such as amphotericin B, 5-fluorocytosin, fluconazole, voriconazole and caspofungin. The interpretation

of susceptibility and resistance to antifungal compounds were performed in agreement with the EUCAST and CLSI recommendations (Cuenca-Estrella et al. 2012).

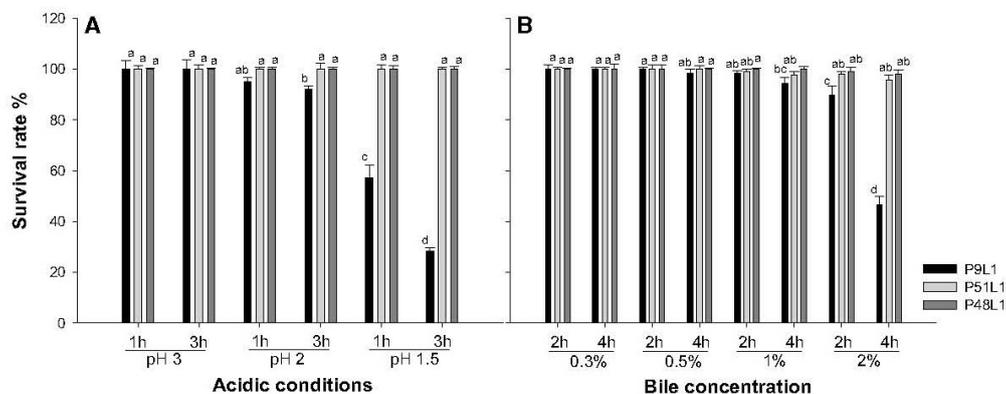


Fig.4 a Survival rate of the strains *S. cerevisiae* P9L1, *C. parapsilosis* P48L1 and *C. albicans* P51L1 under acidic pH conditions after 1 and 3 h of incubation.. **b** Survival rate of *S. cerevisiae* P9L1, *C. parapsilosis* P48L1 and *C. albicans* P51L1 at different bile concentration after 2 and 4 h of incubation. The standard deviations are indicated by error bars. The data are the means of values from three independent experiments. Means without a common letter are different ($p < 0.05$) using one-way ANOVA with Tukey test for pairwise comparisons.

Table 4 Antifungal susceptibility tests of antagonistic yeasts and *S. cerevisiae*P9L1 isolated in this work

Clinical antifungal susceptibility tests	<i>S. cerevisiae</i> P9L1 MIC ($\mu\text{g/ml}$)	<i>C. parapsilosis</i> P48L1 MIC ($\mu\text{g/ml}$)	<i>C. albicans</i> ATCC 10231 MIC ($\mu\text{g/ml}$)
Amphotericin	0.75 (S)	0.500 (S)	0.380 (S)
5 Fluorocytosin	0.012 (S)	0.023 (S)	0.064 (S)
Fluconazole	3.00 (S)	0.190 (S)	0.750 (S)
Voriconazole	0.032 (S)	0.120 (S)	0.016 (S)
Caspofungin	0.190 (S)	0.380 ®	0.016 (S)

Susceptibility (S) and résistance (R) were determined according to EUCAST and CLSI recommendations

(Cuenca-Estrella et al. 2012)

Hemolytic activities and aggregation properties

Candida albicans P51L1 and *S. cerevisiae* P9L1 could be considered as nonhemolytic strains contrary to *C. parapsilosis* P48L1 which resulted to be hemolytic (Fig. 5). The auto-aggregation rate of *S. cerevisiae* was 22.5 ± 2.6 and 45.9 ± 3.4 % after 2 and 4 h of incubation, respectively. This strain co-aggregated with two tested pathogenic bacteria. Notably, the co-aggregation was stronger and faster with *E. coli* ATCC 25922 (38.2 ± 3.9 %) than with *S. aureus* ATCC 25923 (23.5 ± 2.9 %) after 2 h of incubation. Conversely, the antagonistic strains *C. parapsilosis* P48L1 and *C. albicans* P51L1 did not co-aggregate with the tested pathogenic bacteria. These strains showed an auto-aggregation rate of 41.5 ± 1.9 and 31.6 ± 2.9 after 4 h, respectively (Table 5). Thus, *C. albicans* P51L1 was the less autoaggregative strain.



Fig.5 Plates showing alpha-hemolysis of *C. parapsilosis* P48L1

Table 5 Auto-aggregation and co-aggregation scores of yeasts isolated in this study

Time (h)/pathogenic bacteria	Auto-aggregation (%)		Co-aggregation (%)	
	2 h	4 h	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923
P1L1	3.1 ± 1.55	9 ± 1.7	-	-
P2L1	6.1 ± 2.1	18.3 ± 2.73	-	-
P3L1	8.3 ± 2	17.7 ± 2.6	-	-
P5L1	2.7 ± 2	12.9 ± 2.5	-	-
P5L2	12.6 ± 3.5	27.4 ± 2.4	-	-
P8L1	5.1 ± 1.73	14.5 ± 2.6	-	-
P9L1	22.0 ± 5.36	45.9 ± 3.4	38.2 ± 3.9	23.5 ± 2.9
P11L1	13.5 ± 2	42.2 ± 2.4	29	-
P15L1	8.5 ± 2	22 ± 2.7	-	-
P18L1	9.8 ± 1.2	25.8 ± 2.8	-	-
P21L1	15.2 ± 3.1	45.5 ± 2.4	31.3	13.1
P25L1	13.9 ± 2.5	36.6 ± 2.7	-	-
P27L1	11.6 ± 3.2	25.4 ± 3.3	-	-
P35L1	5.6 ± 1.8	18.2 ± 2.1	-	-
P45L1	16 ± 2.1	36 ± 3.2	-	-
P48L1	18.4 ± 2.1	41.5 ± 1.9	-	-
P49L1	4.2 ± 2.1	12.2 ± 2.25	-	-
P51L1	13.6 ± 1.9	31.3 ± 3.9	-	-
P54L1	9.6 ± 1.3	25.9 ± 2.1	-	-
P55L1	7.8 ± 1.3	19.2 ± 2	-	-
P62L1	5.4 ± 1	13.3 ± 2.8	-	-

- No co-aggregation was observed

Accession numbers

The ITS1-5.8S-ITS2 rDNA sequences of the strains isolated here are available on NCBI under accession number KP878240 to KP878254.

Discussion

This study showed, for the first time, the yeast diversity of Algerian infants hospitalized at Bejaia hospital. Out of 20 strains isolated and purified from feces of different donors, 19 strains belonged to *Candida* species, and one was identified as *S. cerevisiae* P9L1. The identification performed with biochemical (ID32C Api system) and molecular (sequencing of ITS1-5.8S-ITS2 region) methods showed a very good reliability. The most abundant species recovered was *C. albicans*, a species that has been found in diverse niches including the normal gastrointestinal tract, oral cavity and urogenital tract microbiota (De Vos et al. 2012).

Recently, Papon et al. (2013) pointed out *C. albicans* as the most frequent agent of candidiasis. Similar studies carried out worldwide reported the dominance of *C. albicans* species in infant feces. Indeed, Rozkiewicz et al. (2005) studied the prevalence of this pathogen in feces of hospitalized children with and without diarrhea in Bialystok (Poland). The authors identified *C. parapsilosis* and *C. krusei*, and noteworthy *C. albicans*. Indeed, 131 strains belonged to *C. albicans* (Rozkiewicz et al. 2005). The incidence of fecal *C. albicans* in children with and without diarrhea was comparable (Rozkiewicz et al. 2005). In another study carried out on Nigerian infants, *C. albicans* resulted as the dominant species even other species including *C. tropicalis*, *C. pseudotropicalis*, *C. glabrata* and *C. parapsilosis* were also identified (Enweani et al. 1994). The study realized by Forbes et al. (2001) on fecal yeasts in feces of hospitalized children in Western Australia has revealed the presence of *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. lipolytica*, *C. humicola*, *Torulopsis glabrata*, *Trichosporon beigeli* and *Rhodotorula glutinis*, but *C. albicans* was the most commonly identified species.

Moreover, non-*albicans* *Candida* (NAC) species have been also isolated from feces of Algerian infants but with a lower isolation rate. The NAC species isolated were *C. krusei* (synonym: *Issatchenkia orientalis*), *C. glabrata*, *C. rugosa*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. rugosa* and *C. famata* (synonym: *Debaryomyces hansenii*). According to Papon et al. (2013), the NAC species now account for a substantial part of clinical isolates collected worldwide in hospitals. The last decade has demonstrated the success of DNA sequence- based methods (SBM methods) as suitable method to study epidemiology of *C. albicans*. To strengthen the SBM approaches, we show here that ITS1-5.8S-ITS2 sequences analysis is a robust and affordable method that might be used to identify *C. albicans* species and NAC species. The dendrogram resulting from ITS1-5.8S-ITS2 sequences analysis led us to think that our *C. albicans* isolates are genetically related to *C. albicans* ATCC 10231 (data not shown). Screening of inhibitory activities has shed light on the potential of *C. parapsilosis* P48L1 and

C. albicans P51L1 to inhibit *E. coli* ATCC 25922 and *S. aureus* ATCC 25923. In the best of our knowledge, this is the first report underlining inhibitory properties of notorious pathogen yeast species from infant origin. *C. parapsilosis* P48L1 and *C. albicans* P51L1 were active against *E. coli* ATCC 25922 and *S. aureus* ATCC 25923 although they were unable to co-aggregate and weakly aggregating, arguing that a cell–cell contact might not be only the inhibitory pathway requested. Related to inhibitory activities of yeasts, [Hatoum et al. \(2012\)](#) reported that most often yeast antagonism was attributed to killer toxins. However, yeast antagonism remains to be investigated contrarily to its bacterial counterpart, which is well characterized ([Drider and Rebuffat 2011](#)). The auto-aggregation is considered as key element for adhesion and biofilm formation. Indeed, the auto-aggregation potential reported for *S. cerevisiae* P9L1 renders this strain as potential candidate for probiotic design. Moreover, the co-aggregation confers the ability to form a barrier against pathogens, and it is therefore considered as an important property for probiotic strains according to [Mobili et al. \(2010\)](#). *S. cerevisiae* P9L1 isolated in this study fulfills these properties.

The adverse effects registered for *C. parapsilosis* P48L1 and *C. albicans* P51L1 yeasts render evidently these strains as nonsuitable for probiotic design in spite of their antagonism against *E. coli* ATCC 25922 and *S. aureus* ATCC 25923, their in vitro tolerance to bile salts and susceptibility to traditional antifungal compounds such as amphotericin B, 5-fluorocytosin, fluonazole, voriconazole and caspofungin, which are routinely and clinically used and recommended to treat fungi infections therapy.

Further, *C. parapsilosis* P48L1 and *C. albicans* P51L1, conversely to harmless *S. cerevisiae* P9L1, displayed low adhesion score and cytotoxic effects to human epithelial colorectal adenocarcinoma Caco-2 cells. The adhesion process to host cells has been described as a prerequisite factor in the *Candida* infection process ([Schulze and Sonnenborn 2009](#); [Vazquez and Sobel 2011](#)) on the other hand considered the adhesion step as a key event, which permits interactions between probiotics and the host cells ([Lu and Walker 2001](#)).

To sum up, this prospective study allowed the isolation of 20 yeasts including *C. albicans* and NAC species from Algerian infants. *C. parapsilosis* P48L1 and *C. albicans* P51L1 exhibited antibacterial activity against pathogenic bacteria but resulted to be toxic. *S. cerevisiae* P9L1 appeared to be devoid of hemolytic activity, resistant to acidic conditions, tolerant to increasing bile concentration, and able to adhere to epithelial cells, aggregate and coaggregates with pathogens. To the best of our knowledge, this is the first report discussing yeast diversity in a north-African reservoir and characterizing these yeasts for their positive and negative effects.

Acknowledgments

The authors are indebted to Dr. Xavier Lepoutre (Victor Provo hospital at Roubaix, France) for assessment of antifungal susceptibility and to Dr. Delphine Caly (Lille 1 University, France) for critical reading and English improvement of the manuscript.

Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

References

- Belloch C, Barrio E, Garcia MD, Querol A (1998) Phylogenetic reconstruction of the yeast genus *Kluyveromyces*: restriction map analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacer. *Syst Appl Microbiol* 21:266–273
- Ceugniez A, Drider D, Jacques P, Coucheney F (2015) Yeast diversity in a traditional French cheese “Tomme d’orchies” reveals infrequent and frequent species with associated benefits. *Food Microbiol* 52:177–184

- Chandler FW, Kaplan W, Ajello L (1980) Color atlas and text of the histopathology of mycotic diseases. Year Book Medical Publisher, Chicago, p 333
- Cole JR, Wang Q, Fish JA, Chai B, McGarrell DM, Sun Y, Brown CT, Porras-Alfaro A, Kuske CR, Tiedje JM (2014) Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Res* 42:D633–D642
- Cuenca-Estrella M, Verweij PE, Arendrup MC, Arikian-Akdagli S, Bille J, Donnelly JP, Jensen HE, Lass-Flörl C, Richardson MD, Akova M, Bassetti M, Calandra T, Castagnola E, Cornely OA, Garbino J, Groll AH, Herbrecht R, Hope WW, Kullberg BJ, Lortholary O, Meersseman W, Petrikos G, Roilides E, Viscoli C, Ullmann AJ, ESCMID Fungal Infection Study Group 2012 (2012) ESCMID* guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: diagnostic procedures. *Clin Microbiol Infect* 7:9-18
- De Vos WM, Engstrand L, Drago L, Reid G, Schaubert J, Hay R, Mendling W, Schaller M, Spiller R, Gahan CG, Rowland I (2012) Human microbiota in health and disease. *SelfCare* 3(S1):1–68
- Dridger D, Rebuffat S (2011) Prokaryotic antimicrobial peptides: from genes to applications. Springer, New York, p 451
- Enweani IB, Obi CL, Jokpeyibo M (1994) Prevalence of *Candida* species in Nigerian children with diarrhoea. *J Diarrhoeal Dis Res* 12:133–135
- Forbes D, Ee L, Camer-Pesci P, Ward PB (2001) Faecal *Candida* and diarrhea. *Arch Dis Child* 84:328–331
- Gotcheva V, Hristozova E, Hristozova T, Guo M, Roshkova Z, Angelov A (2002) Assessment of potential probiotic properties of lactic acid bacteria and yeast strains. *Food Biotechnol* 16:211–225
- Gouy M, Guindon S, Gascuel O (2010) SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol Biol Evol* 27:221–224

- Harju S, Fedosyuk H, Peterson KR (2004) Rapid isolation of yeast genomic DNA: bust n' Grab. BMC Biotechnol 4:8
- Hatoum R, Labrie S, Fliss I (2012) Antimicrobial and probiotic properties of yeasts: from fundamental to novel applications. Front Microbiol 3:421
- Kos B, Susković J, Vuković S, Simpraga M, Frece J, Matosić S (2003) Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. J Appl Microbiol 94:981–987
- Kumamoto CA (2011) Inflammation and gastrointestinal *Candida* colonization. Curr Opin Microbiol 14:386–391
- Kumar A, Sharma PC (2013) In vitro studies on selective virulence traits of fluconazole resistant *Candida* species isolated from clinical cases. Int J Biol Pharm Res 4:685–696
- Lu L, Walker WA (2001) Pathologic and physiologic interactions of bacteria with the gastrointestinal epithelium. Am J Clin Nutr 73:1124–1130
- Lukaszewicz M (2012) *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*: probiotic yeast. In: Rigobelo EC (ed) Probiotics. In Tech, Rijeka, Croatia, pp 385–398
- Mac Callum DM (2010) *Candida* infections and modelling disease. In: Ashbee HR, Bignell E (eds) Pathogenic yeasts, the yeast handbook. Springer, Heidelberg, pp 41–67
- Mobili P, Gerbino E, Tymczyszyn EE, Gómez-Zavaglia A (2010) S-layers in lactobacilli: structural characteristics and putative role in surface and probiotic properties of whole bacteria. In: Méndez-Vilas A (ed) Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology. Formatex Research Center, Badajoz, pp 1224–1234
- Moris DV, Melhem MSC, Martins MA, Mendes RP (2008) Oral *Candida* spp. colonization in human immunodeficiency virus infected individuals. J Venom Anim Toxins 14:224–257

- Moslehi-Jenabian S, Lindegaard PL, Jespersen L (2010) Beneficial effects of probiotic and food borne yeasts on human health. *Nutrients* 2:449–473
- O’Hara A, Shanahan F (2006) The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep* 7:688–693
- Ojetti V, Gigante G, Ainora ME, Fiore F, Barbaro F, Gasbarrini A (2009) Microflora imbalance and gastrointestinal diseases. *Dig Liver Dis Suppl.* 3:35–39
- Papon N, Courdavault V, Clastre M, Bennett RJ (2013) Emerging and emerged pathogenic *Candida* species: beyond the *Candida albicans* paradigm. *PLoS Pathog* 9:e1003550
- Parfrey LW, Walters WA, Knight R (2011) Microbial eukaryotes in the human microbiome: ecology, evolution, and future directions. *Front Microbiol* 2:153
- Psomas E, Andrighetto C, Litopoulou-Tzanetaki E, Lombardi A, Tzanetakis N (2001) Some probiotic properties of yeast isolates from infant faeces and Feta cheese. *Int J Food Microbiol* 69:125–133
- Rajilić-Stojanović M, Smidt H, de Vos WM (2009) Diversity of the human gastrointestinal tract microbiota revisited. *Environ Microbiol* 9:2125–2136
- Rozkiewicz D, Daniluk T, Sciepek M, Kurzqtkowska B, Ołdak E, Zaremba ML (2005) Prevalence of *Candida albicans* in stool of hospitalized children in 2003 with or without diarrhea from the Bialystok region. *Przegl Epidemiol* 59:43–51
- Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, Chen W, Fungal Barcoding Consortium (2012) Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for fungi. *Proc Natl Acad Sci USA* 109:6241–6246
- Schulze J, Sonnenborn U (2009) Yeasts in the gut: from commensals to infectious agents. *Dtsch Arztebl Int* 106:837–842
- Vazquez JA, Sobel JD (2011) Candidiasis. In: Kauffman CA, Pappas PG, Sobel JD, Dismukes WE (eds) *Essentials of clinical mycology*. Springer, New York, pp 167–206



UNIVERSITÉ LILLE 1 – SCIENCES ET TECHNOLOGIES
ECOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA MATIÈRE, DU RAYONNEMENT ET DE L'ENVIRONNEMENT
(ED104)