



HAL
open science

Etudes physiologiques et moléculaires de l'adaptation des Mucor aux matrices fromagères

Stéphanie Morin-Sardin

► **To cite this version:**

Stéphanie Morin-Sardin. Etudes physiologiques et moléculaires de l'adaptation des Mucor aux matrices fromagères. Sciences agricoles. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2016. Français. NNT : 2016BRES0065 . tel-01499149v2

HAL Id: tel-01499149

<https://theses.hal.science/tel-01499149v2>

Submitted on 1 Apr 2017

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

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

THÈSE / UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE

sous le sceau de l'Université européenne de Bretagne

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE

Mention : Biologie-Santé

Spécialité : Microbiologie

École Doctorale SICMA

présentée par

Stéphanie MORIN-SARDIN

Préparée au Laboratoire Universitaire
de Biodiversité et Ecologie Microbienne
(EA 3882)

Etudes physiologiques et moléculaires de l'adaptation des *Mucor* aux matrices fromagères

Thèse soutenue le 07 octobre 2016
devant le jury composé de :

Joëlle DUPONT

Professeure, MNHN / *Rapporteur*

Nathalie DESMASURES

Professeure, Université de Caen / *Rapporteur*

Ivan LEGUERINEL

Professeur, UBO / *Examineur*

Jean-Louis HATTE

Ingénieur, Lactalis / *Examineur*

Jean-Luc JANY

Maitre de Conférence, UBO / *Co-encadrant*

Emmanuel COTON

Professeur, UBO / *Directeur de thèse*

REMERCIEMENTS

→ Cette thèse d'université s'est inscrite dans le cadre d'un congé de reclassement. Elle a été financée par mon ex-employeur, le groupe pharmaceutique international MERCK-SCHERING PLOUGH, suite à un Plan de Sauvegarde de l'Emploi (PSE) mis en place sur le site de production d'Hérouville Saint Clair où j'ai exercé durant plus de 10 ans en tant que spécialiste formation en charge des laboratoires de contrôle qualité de microbiologie et de physico-chimie et de l'unité de prélèvement et de contrôle des articles de conditionnement.



Je tiens en premier lieu à sincèrement remercier la société MERCK - SCHERING PLOUGH pour l'expérience qu'elle m'a permis d'acquérir durant ces 10 années. Bien que le contexte social des derniers mois avant mon départ ait été complexe, j'ai réellement beaucoup appris au niveau organisationnel, technique, managérial, et humain durant cette période. Cette expérience acquise est une réelle richesse, tant d'un point de vue personnel que professionnel, et elle m'a été d'une grande utilité au cours de ma thèse. J'ai une pensée toute particulière pour mes anciens collègues toujours en poste et pour ceux qui, comme moi, se sont engagés dans une nouvelle aventure professionnelle.

Je remercie également la direction de MERCK-SCHERING PLOUGH pour m'avoir donné la possibilité de réaliser ce projet personnel dans de très bonnes conditions, en finançant mon salaire durant ces 3 années mais également en contribuant largement à ma participation à des formations complémentaires (bioinformatique, qPCR, anglais, ISO17025, ...) et des congrès internationaux.

Je tiens à adresser des remerciements plus appuyés aux personnes qui m'ont suivie au quotidien dans la gestion des aspects administratifs de ce congé de reclassement : **Mme Karine RABOTIN et Mme Sonia SLIMANI de la société de conseil ALTEDIA, Mme Chantal LEREVEREND, de la société MERCK-SCHERING PLOUGH.**

→ Durant cette thèse en microbiologie, j'ai été accueillie au sein du **Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne (LUBEM)** de l'Université de Bretagne Occidentale (UBO), site de Plouzané.



Je remercie tout particulièrement le **Professeur Georges BARBIER**, à l'époque Directeur du LUBEM et actuellement Directeur de l'Ecole Supérieure d'Ingénieurs en Agroalimentaire de Bretagne (ESIAB), pour m'avoir permis de réaliser ma thèse au sein de son laboratoire. Il a parfaitement compris mon projet de reconversion et m'a fait confiance, considérant que mon parcours universitaire et professionnel diversifié était un atout et un gage d'adaptation plutôt qu'un frein.

Mes remerciements vont également à mon Directeur de Thèse, le **Professeur Emmanuel COTON**, actuel directeur du LUBEM, et à mon co-encadrant, le **Dr Jean-Luc JANY**. Manager une thésarde ayant une organisation de travail et un caractère marqué forgés par une expérience industrielle de plus de 10 années n'a pas toujours été simple mais je pense que les efforts consentis ont été productifs et les résultats obtenus à la hauteur du challenge. Je les remercie pour m'avoir permis de réaliser cette thèse qui finalise la formation pour et par la recherche que j'avais initiée il y a quelques années et j'espère que l'aventure des *Mucor* au LUBEM se poursuivra encore longtemps...

Merci également à tous les Maitres de Conférences qui ont été impliqués dans mon travail : le **Dr Louis COROLLER** et le **Dr Karim RIGALMA** pour la partie modélisation, le **Dr Stéphanie MADEC** pour la partie protéomique, le **Dr Laurence MESLET-CLADIÈRE** pour la partie génomique et métabolomique. Je leur suis reconnaissante de m'avoir fait partager leurs connaissances, de m'avoir fait découvrir une pluralité de techniques et méthodes et d'avoir participé, à mes côtés, aux développements nécessaires à l'approfondissement des connaissances sur les champignons du genre *Mucor*.

Un merci particulier au **Dr Patrice NODET** pour sa forte implication dans la partie médicale de la revue sur le genre *Mucor* que vous pourrez lire dans l'introduction bibliographique de ce manuscrit (publication n°1).

Merci également à **tout le personnel** : agents, techniciens, ingénieurs, secrétaires, ... **du LUBEM et de l'ESIAB** qui m'a apporté son soutien et son aide, tant au niveau administratif que scientifique.

Je souhaite à tous les **thésards et post-doctorants** que j'ai eu l'occasion de croiser durant ces trois ans de trouver rapidement un poste qui corresponde à leurs attentes et de s'épanouir professionnellement et personnellement.

→ Je tiens à remercier tous les extérieurs au LUBEM qui m'ont apporté un soutien technique et scientifique et sans qui cette thèse n'aurait pu aboutir :

- le **Pr Vianney PICHEREAU** et le **Dr Sébastien ARTIGAUD** de l'**Institut Universitaire Européen de la Mer (IUEM)** et le **Dr Benoît BERNAY** de la **Plateforme Proteogen de l'Université de Caen** pour la partie protéomique ;
- la **plateforme BioGenOuest** et la **station marine de Roscoff** pour les analyses RNaseq et l'initiation du travail d'annotation des génomes séquencés ;
- le département R&D du groupe **Lactalis**, représenté par **Mr Jean-Louis HATTE**, la **Société Fromagère de Riblaire**, la **Laitière de Haute-Savoie** et **Les fruitières de la Chapelle d'Abondance et de Bogève**.

→ Je remercie **les Pr Alain RINCE (Université de Caen) et Sylvie CHEVALIER (Université de Rouen)** pour m'avoir donné l'opportunité, durant cette thèse, de réaliser des cours magistraux en management de la qualité aux étudiants de leur Master II « Microbiologie et Qualité ».

→ Mes remerciements vont également à Mesdames les **Professeurs Joëlle DUPONT et Nathalie DESMASURES** pour avoir accepté d'être rapporteur de ce travail de thèse, ainsi qu'au **Professeur Ivan LEGUERINEL** et **Monsieur Jean-Louis HATTE**, examinateurs, qui me font l'honneur de participer à mon jury.

→ Merci à Madame **Michèle KERLEROUX** et à Mr le Professeur **Christian BROSEAU**, de l'École Doctorale SICMA, pour m'avoir accueillie au sein de leur ED et m'avoir apporté leur soutien dans les formalités administratives et la réalisation de formations.

→ Je remercie le **Conseil Régional de Bretagne** pour le soutien financier apporté à ce travail au travers du budget de fonctionnement qu'il nous a accordé suite à l'élaboration, au cours de la première année de thèse, du projet « **MUFROMIC** » en réponse à l'appel à projets Ingrédients & molécules, Matériaux, méthodes d'Analyses (AAP-IMA 2014).



→ Enfin, je tiens à adresser mes remerciements à mes proches...

Mes parents et beaux-parents, pour leur soutien et leur aide logistique.

Ma sœur, **Sylvie**, qui a toujours cru en moi.

Maurice, pour son aide et son grand cœur « tout neuf », et **Christian**, pour ses bons petits plats...

Bernadette, pour son soutien et ses conseils avisés.

Mes supporters de tous les instants, **Blacky et Jade**, à qui je fais de grosses caresses. Petite pensée pour **Nyma et Gaston**, qui ont fait notre bonheur pendant de nombreuses années.

Mes filles, **Juliette et Cassiopée**. Si cette aventure n'a pas été toujours simple pour elles, Maman n'étant pas toujours très disponible, elle a participé à leur inculquer le goût de l'effort, du travail, de l'entraide et de l'amour vrai. Juliette, Cassiopée, je vous promets de me rattraper rapidement ...

Mon mari, **Thierry**, pour son amour et son soutien de tous les instants. Nous voyageons tous les deux depuis près de 20 ans sur un chemin qui a été souvent semé d'embûches et d'épreuves. Qu'il est bon de pouvoir compter l'un sur l'autre pour les affronter et les dépasser ensemble...

Cette thèse a confirmé mon sentiment que dans un monde où tant de choses restent à découvrir et comprendre, où les évolutions technologiques s'accélèrent et ouvrent de nouveaux horizons, où les financements sont difficiles à obtenir et doivent être rationalisés, il apparaît indispensable de mutualiser, partager, solliciter, s'ouvrir, être curieux, s'organiser, optimiser afin de faire progresser ses acquis, relever ensemble les défis mais également enrichir le commun. Dans ce sens, mon expérience professionnelle antérieure a été pour moi une réelle valeur ajoutée et cette expérience de thèse viendra l'enrichir et en renforcer les principes.

« Souviens-toi de cette nuit, c'est la promesse de l'infini.

C'est une promesse qui vient récompenser le courage de ceux qui ont affrontés seuls tant d'années. C'est la preuve de la confiance entre deux êtres qui est le fondement même de l'amour.

C'est un effort de volonté pour oublier et s'affranchir des peines du passé.

C'est un serment qui lie deux âmes à l'exclusion de toute autre.

C'est le symbole d'un risque assumé et la reconnaissance des défis à venir.

Car à deux on est toujours plus fort, comme un équipage soudé pour surmonter les tempêtes du destin.

L'amour sera toujours la raison d'être des humains et la force qui guide leur vie.

Le plus important ce n'est pas cette cérémonie, elle ne sert qu'à montrer aux yeux du monde des sentiments déjà existants et des promesses déjà sellées au plus profond du cœur des mariés. »

Les frères Scott, Lucas

*A mes grands-parents, Aimée et Gabriel,
qui auraient été fiers du travail accompli*

SOMMAIRE

Remerciements

Abréviations

Tableaux & figures

AVANT PROPOS

1-4

PARTIE 1 : INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

5-78

CHAPITRE I. Les champignons filamenteux

5-17

I.1. Classification actuelle

5-8

I.2. Morphologie

8-9

I.3. Organisation cytologique

9-11

I.4. Besoins nutritifs

11-12

I.5. Croissance végétative

12-14

I.6. Reproduction asexuée et sexuée

14-16

I.7. Modes de vie

17

CHAPITRE II. Champignons filamenteux et production fromagère

19-30

II.1. Le fromage et ses principales étapes de fabrication

19-23

II.1.a. La coagulation

20-21

II.1.b. L'égouttage

22

II.1.c. L'affinage

22-23

II.2. Diversité microbienne associée aux fromages

24

II.3. Focus sur les moisissures

24-30

II.3.a. Rôles positifs lors de l'affinage

26-29

II.3.b. Rôles négatifs

29-30

CHAPITRE III. Le genre *Mucor*

31-78

Article n°1 : Mucor - a Janus-faced fungal genus with human health impact and industrial applications

33-78

Introduction**79-81****CHAPITRE I. Etude physiologique****83-98**

*Article n°2 : Effect of temperature, pH, and water activity on *Mucor* spp. growth on synthetic medium, cheese analog and cheese*

86-97

Points saillants

98

CHAPITRE II. Etude protéomique**99-192**

Introduction

99-101

II.1. Analyse comparative des protéomes de 4 souches de *Mucor* (technologique, mixte, contaminante et endophyte) sur milieu PDA et CA

101-102

*Article n°3 : Proteomic analysis of the adaptation of *Mucor* spp. to cheese environment*

103-153

Points saillants

154-155

II.2. Analyse interspécifique des modifications du protéome d'une souche technologique et d'une souche contaminante occasionnelle

156-192

II.2.a. Identification des protéines exprimées de façon différentielle sur un même milieu

156-166

*II.2.b. Analyse des protéines surexprimées et des voies métaboliques mises en jeu par homologie avec le protéome de *S. cerevisiae**

167-186

II.2.c. Etude des métabolites produits

187-191

II.2.c.1. Extraction des échantillons

187

II.2.c.2. Analyse LC-MS/MS

187-188

II.2.c.3. Principaux métabolites identifiés

188-191

Points saillants

192

CHAPITRE III. Discussion, conclusions et perspectives**193-202**

Physiologie et modélisation : des approches couplées suggérant l'adaptation des souches technologiques à l'environnement fromager

193-196

Apport de l'analyse comparative des protéomes dans l'identification des marqueurs de l'adaptation aux matrices fromagères

197-200

Perspectives apportées par la génomique

200-202

Postface **203**

BIBLIOGRAPHIE **205-220**

ANNEXES **221-256**

Annexe 1 : Liste et identification des spots témoins utilisés pour l'étude protéomique interspécifique **221-225**

Annexe 2 : Protocoles utilisés pour la contribution à l'étude génomique / Principaux résultats **226-232**

Annexe 3 : Valorisations scientifiques **233-252**

Annexe 4 : Formations continues **253-254**

ABREVIATIONS

AAP-IMA	Appel à Projet-Ingrédients & molécules, Matériaux, méthodes d'Analyses
ADN	Acide Désoxyribonucléique
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
AGL	Acides Gras Libres
ARN	Acide Ribonucléique
A_w	Activity of water (activité de l'eau).
CA	Cheese Agar
CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures, Institut néerlandais d'études sur les champignons
Cdh1	Cadhérine épithéliale
CRISPR	Clustered, regularly interspaced, short palindromic repeat »
Cas9	CRISPR associated protein 9
DSDM	Disulfure de Méthyle
ED SICMA	Ecole Doctorale Santé, Information/Communication et MATHématiques, MATière
ESIAB	Ecole Supérieure d'Ingénieurs en Agroalimentaire de Bretagne atlantique.
FAO	Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture
OMS	Organisation mondiale de la Santé
Gb	Giga base
GDH	Glutamate Déshydrogénase
GOGAT	Glutamine OxoGlutarate Amino Transférase
GS	Glutamine Synthétase
H^+	Proton
HACCP	Hazard Analysis Critical Control Point
Hiseq	High-throughput sequencing
HR	Humidité Relative
HTRs	Horizontally transferred regions
IEF	Isoélectrofocalisation
INRA	Institut National de la Recherche Agronomique
ISO	International Organization for Standardization
ITS	Internal Transcribed-Spacer
IUEM	Institut Universitaire Européen de la Mer
IUT	Institut Universitaire Technologique
K^+	Potassium
LAB	Lactic Acid Bacteria
λ	Phase de latence ou inflexion initiale
LUBEM	Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne
Maldi-Tof	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation-Time of Flight Mass Spectrometry
Mb	Mega Base
MGS	Matière Grasse dans l'extrait Sec
MSTN	Myostatine
mV	MilliVolt
V	Volt
NAD	Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NADH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Hydrogène
LC-MALDI TOF/TOF	Chromatography Liquid - Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation-Time of Flight / Time of Flight Mass Spectrometry
ng	Nanogramme
NGS	Next-Generation Sequencing

Pb	Paire de bases
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDA	Potato Dextrose Agar
pH	Potentiel d'Hydrogène
PDA	Potato Dextrose Agar
PSE	Plan de Sauvegarde de l'Emploi
qPCR	Quantitative Polymerase Chain Reaction
QTL	Quantitative Trait Locus
μ	Vitesse de croissance radiale
μg	microgramme
μL	microlitre
μm	micromètre
μopt	Vitesse de croissance optimale
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
RFLPs	Restriction Fragment Length Polymorphism
R_{max}	Rayon maximal ou épaulement
RNAi	RNA interference
RNaseq	Whole Transcriptome Shotgun Sequencing
RT-qPCR	Reverse-transcription - quantitative polymerase chain reaction
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SNP	Single-nucleotide polymorphism
SPK	Spitzenkörper
Spp.	Species
TCA	Tricarboxylic Acid
TEFD	Teneur en Eau dans le Fromage Dégraissé
T_{min}	Température minimale
T_{opt}	Température optimale
T_{max}	Température maximale
TSDM	Trisulfure de Diméthyle
UBOCC	Collection de Cultures de l'Université de Bretagne Occidentale
UFC.cm^{-2}	Unité Formant Colonie par centimètre carré
VSC	Composés volatiles soufrés
v-SNARES	Vesicular-Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor

TABLEAUX & FIGURES

Figure 1 : Représentation illustrée des bases de la dichotomie étudiée au cours de cette thèse.

Figure 2 : Groupes constituant le domaine des eucaryotes (Source : Baldauf, 2008).

Figure 3 : Répartition du règne des Fungi.

Figure 4 : Exemples de thalle de *Mucor lanceolatus* sur de la Tomme de Savoie non-affinée (A) et de *Mucor endophyticus* sur milieu Potatoe Dextrose Agar (B), après 4 jours de croissance à 15 °C.

Figure 5 : Hyphe mycélien (Source photographie : Curtis CLARK).

Figure 6 : Organisation de la paroi des champignons filamenteux (Source : <http://www.nammex.com/redefining-medicinal-mushrooms/>).

Figure 7 : Organisation schématique de l'apex d'un filament en période de croissance active (Source : Bouchet *et al.*, 2000).

Figure 8 : Cycle de développement des zygomycètes. Exemple de *Rhizopus nigricans*.

Figure 9 : Image en microscopie électronique d'une zygospore de *M. circinelloides* (marqueur d'échelle = 10 µm). Tiré de Lee et Heitman (2014).

Figure 10 : Illustration du processus de fabrication du fromage. A. Fruitière de la Chapelle d'Abondance. B. Cuves d'emprésurage et de coagulation. C. Egouttage - pressage. D. Salage. E. Affinage. F. Nettoyage de surface (Abondance). G et H. Tommes de Savoie affinées. (Photos Morin-Sardin ; Fruitière de la Chapelle d'Abondance).

Figure 11 : Illustrations de la diffusion « naturelle » des moisissures lors de la fabrication artisanale de la Tomme de Savoie. A, B : planches en bois « résineux » utilisées pour le stockage des fromages durant l'affinage. C : étape de salage par immersion. (Photos Morin-Sardin ; Fruitière de la Chapelle d'Abondance).

Figure 12 : Impact de champignons filamenteux sur les fromages. A, B : Moisissures à la surface de Tommes de Savoie (photos Morin-Sardin, fruitières de la Chapelle d'Abondance et de Bogève). C. Bleu du Vercors (photo www.les-alpages.fr).

Figure 13 : Tommes de Savoie d'aspect normal (A) et présentant un défaut de pigmentation (B). Phénomène de poil de chat à la surface d'une Tomme (C).

Figure 14 : Présentation schématique des axes de la thèse.

Figure 15 : Principe de détermination des valeurs cardinales de croissance à partir des modèles primaires et secondaires. Exemple du facteur température.

Figure 16 : Exemples de modifications phénotypiques obtenues après 4 jours à 15°C (i) pour une même souche en fonction du milieu et (ii) pour les différentes souches pour un même milieu.

Figure 17 : Protéomes de *M. lanceolatus* UBOCC-A-109153 (A) et *M. circinelloides* CBS 277-49 (B) sur milieu PDA. Les numéros indiqués correspondent aux spots protéiques présentant une différence d'expression égale ou supérieure à 1.6 pour une souche par rapport à l'autre.

Figure 18 : Protéomes de *M. lanceolatus* UBOCC-A-109153 (A) et *M. circinelloides* CBS 277-49 (B) sur milieu CA. Les numéros indiqués correspondent aux spots protéiques présentant une différence d'expression égale ou supérieure à 1.6 pour une souche par rapport à l'autre.

Figure 19 : Répartition fonctionnelle des protéines surexprimées sur milieu PDA (A) et CA (B) pour *M. lanceolatus* UBOCC-A-109153 (en gris) et *M. circinelloides* CBS 277-49 (en noir).

Figure 20 : Etude des protéines communément ou spécifiquement exprimées par *M. lanceolatus* UBOCC-A-109153 et *M. circinelloides* CBS 277-49 sur milieux PDA et CA.

Figure 21 : Analyse String-DB des protéines surexprimées par *M. lanceolatus* UBOCC-A-109153 sur milieu PDA. L'analyse a été menée sur la base des homologues déterminées avec le protéome de *S. cerevisiae*. L'épaisseur des lignes indique la force du support de données (confiance). Paramètres sélectionnés : (i) textmining, neighborhood, experiments, gene fusion, databases, co-occurrence and co-expression active interaction sources; (ii) medium confidence as the minimum required interaction source; (iii) no predicted interactors shown.

Figure 22 : Analyse String-DB des protéines surexprimées par *M. lanceolatus* UBOCC-A-109153 sur milieu CA. L'analyse a été menée sur la base des homologues déterminées avec le protéome de *S. cerevisiae*. L'épaisseur des lignes indique la force du support de données (confiance). Paramètres sélectionnés : (i) textmining, neighborhood, experiments, gene fusion, databases, co-occurrence and co-expression active interaction sources; (ii) medium confidence as the minimum required interaction source; (iii) no predicted interactors shown.

Figure 23 : Analyse String-DB des protéines surexprimées par *M. circinelloides* CBS 277-49 sur milieu PDA. L'analyse a été menée sur la base des homologues déterminées avec le protéome de *S. cerevisiae*. L'épaisseur des lignes indique la force du support de données (confiance). Paramètres sélectionnés : (i) textmining, neighborhood, experiments, gene fusion, databases, co-occurrence and co-expression active interaction sources; (ii) medium confidence as the minimum required interaction source; (iii) no predicted interactors shown.

Figure 24 : Analyse String-DB des protéines surexprimées par *M. circinelloides* CBS 277-49 sur milieu CA. L'analyse a été menée sur la base des homologues déterminées avec le protéome de *S. cerevisiae*. Paramètres sélectionnés : (i) textmining, neighborhood, experiments, gene fusion, databases, co-occurrence and co-expression active interaction sources; (ii) medium confidence as the minimum required interaction source; (iii) no predicted interactors shown.

Figure 25 : Structures chimiques développées des métabolites potentiels détectés chez *M. lanceolatus* UBOCC-A-109153 et *M. circinelloides* CBS 277-49 après 7 jours à 14°C sur milieu PDA (A) et CA (B).

Figure 26 : Croissance de *M. endophyticus* CBS 385-95 et de *M. lanceolatus* UBOCC-A-109153 sur Tomme de Savoie à 15°C. Les points correspondent à la moyenne de trois mesures.

Tableau 1 : Classification des fromages en fonction de leur consistance, de leur teneur en matière grasse et des principales caractéristiques d'affinage (FAO/OMS, 1978).

Tableau 2 : Identification et origine des souches des différentes espèces de *Mucor* utilisées.

Tableau 3 : Synthèse des résultats de l'analyse des protéomes de *M. circinelloides* CBS 277-49 et *M. lanceolatus* UBOCC-A-109153 sur milieux PDA et CA. Les spots protéiques présentant une différence d'expression égale ou supérieure à 1.6 entre les deux souches étudiées pour un même milieu ont été extraits et identifiés par LC MALDI TOF-TOF. Seules les identifications protéiques où plus d'une séquence peptidique a été obtenue ont été prises en compte. Pour chaque souche, le nombre de protéines surexprimées correspondant au nombre de spots protéiques analysés et la proportion d'homologie avec le protéome de *S. cerevisiae* sont indiqués.

Tableau 4 : Protéines surexprimées par *M. lanceolatus* UBOCC-A-109153 sur milieu PDA.

Tableau 5 : Protéines surexprimées par *M. circinelloides* CBS 277-49 sur milieu PDA.

Tableau 6 : Protéines surexprimées par *M. lanceolatus* UBOCC-A-109153 sur milieu CA.

Tableau 7 : Protéines surexprimées par *M. circinelloides* CBS 277-49 sur milieu CA.

Tableau n°8 : Programme de chromatographie en phase liquide.

Tableau n°9 : Principaux métabolites identifiés chez *M. lanceolatus* UBOCC-A-109153 et *M. circinelloides* CBS 277-49 après 7 jours à 14°C sur milieu CA et PDA. Les formules brutes des composés détectés ont été générées en utilisant le logiciel MassHunter. Les formules chimiques développées susceptibles de correspondre ont ensuite été recherchées avec la base de données Human Metabolome Database. TR correspond au temps de rétention en minutes. La masse est indiquée en g/Moles (m/z). La fréquence correspond au nombre de détection positive par triplicat.

Tableau n°10 : Génomes de *Mucor* actuellement disponibles.

AVANT PROPOS

Les champignons sont des organismes eucaryotes regroupés dans le règne des *Fungi*, règne estimé à plus de 5 millions d'espèces différentes (Blackwell, 2011). Ces micro-organismes ont un rôle important dans l'environnement et les écosystèmes, et présentent, pour certains, un intérêt majeur pour l'homme. Si un certain nombre de champignons, notamment des espèces de macromycètes saprophytes et symbiotiques rencontrées en forêt ou cultivées en caves, sont appréciés des mycophages, de nombreuses espèces de micromycètes sont utilisées dans l'élaboration de produits fermentés tels que les fromages, les produits de salaison ou certaines boissons ou sauces. Les champignons se caractérisent par leurs potentialités métaboliques, et particulièrement par une importante capacité à produire des métabolites secondaires, Ils peuvent ainsi constituer des réservoirs biotechnologiques de molécules d'intérêt dans le domaine médical (antibiotiques, molécules anticancéreuses ou anti-rejets...) ou industriel (enzymes, pigments composés exploitables pour la synthèse de carburants...).

Parmi ces champignons, le genre *Mucor* qui appartient au phylum *Mucoromycota* (Fungi, Mucoromycota, Mucoromycotina, Mucorales, Mucoraceae, *Mucor* selon Spatafora *et al.* (in press)), un groupe de champignons filamenteux basaux par rapport aux champignons supérieurs, est particulièrement d'intérêt du fait de son action ambivalente du point de vue de l'Homme. Ce genre regroupe un grand nombre d'espèces ubiquistes, majoritairement saprophytes, capables de coloniser des niches écologiques extrêmement diverses. Il est fréquemment rencontré en industrie agroalimentaire où certaines souches peuvent contribuer positivement, du fait notamment de leurs capacités à produire des lipases et des protéases, au développement des qualités organoleptiques et nutritionnelles de nombreux produits fermentés (d'origine végétale ou animale). A l'inverse, les *Mucor* spp. sont également à l'origine d'altérations ou d'accidents de fabrication majeurs, particulièrement dans l'industrie fromagère, générant des défauts organoleptiques et de lourdes pertes économiques.

Les travaux présentés dans cette thèse avaient pour objectifs de **mieux appréhender les bases de cette dichotomie observée entre souches dites technologiques et souches contaminantes (Figure 1)**. Ils ont consisté :

- i) à étudier le comportement de souches représentatives de diverses espèces de *Mucor* sous un angle physiologique, en particulier dans des conditions fromagères ;
- ii) sur la base des différences de comportement observées (latence, phénotypie), à analyser les protéines potentiellement support de l'adaptation à une culture sur milieu fromager.

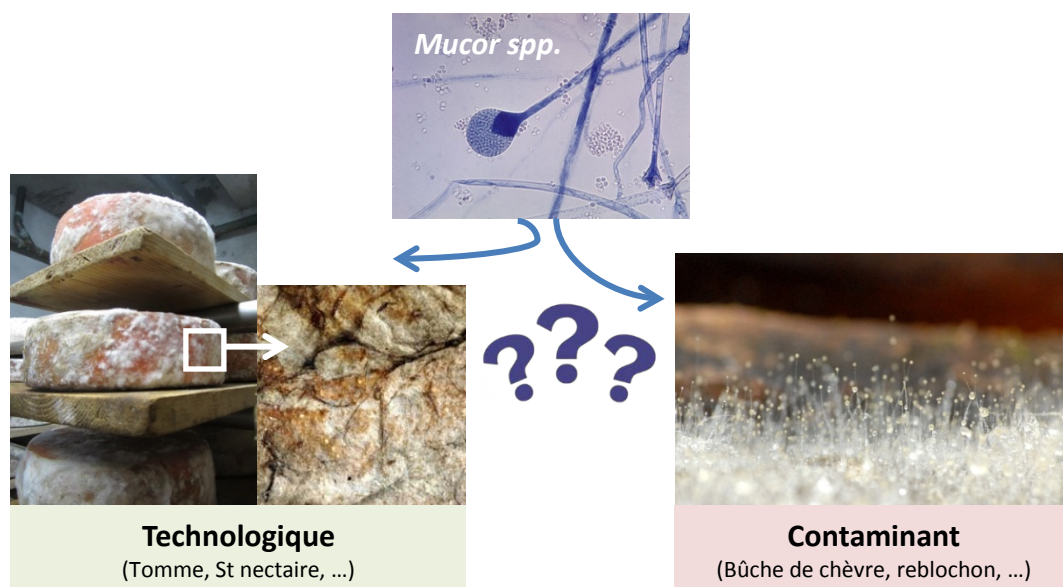


Figure 1 : Représentation illustrée des bases de la dichotomie étudiée au cours de cette thèse.

Le manuscrit qui restitue le travail effectué est divisé en deux parties, introduction bibliographique et résultats des travaux de recherche, composées chacune de 3 chapitres.

Les **chapitres 1 et 2** de la partie introductive proposent des données générales concernant les champignons filamenteux, les grandes lignes de la fabrication des fromages et l'intérêt de ces micro-organismes dans ces processus de fermentation. La visualisation pratique des étapes de fabrication et de leur environnement a été réalisée grâce à deux visites de fromageries artisanales productrices de Tommes de Savoie et de Reblochons implantées en Haute-Savoie ; visites qui ont permis d'illustrer cette partie du document.

Le **chapitre 3** s'articule autour d'une revue de synthèse (*Publication n°1*) faisant un bilan des connaissances sur le genre *Mucor* qui nous intéresse plus particulièrement dans le cadre de cette thèse. Après un descriptif de la position taxonomique actuelle de ce genre, de la morphologie des espèces le constituant et de son écologie, un aperçu de son importance grandissante en pathologie humaine et des multiples potentialités de ces champignons dans le domaine des biotechnologies est donné au travers d'une analyse de la littérature. L'intérêt technologique et les capacités d'altération des *Mucor* en industrie alimentaire, particulièrement dans le secteur fromager, finalisent cet état de l'art sur ce genre encore peu connu.

La deuxième partie de ce manuscrit aborde les résultats obtenus. Elle débute par une présentation du contexte du travail réalisé, des questions scientifiques traitées et de la stratégie mise en place au cours de cette thèse pour y répondre.

Le **chapitre 1** décrit la première phase de ce travail de recherche, qui a porté sur une étude physiologique de différentes souches de *Mucor* sélectionnées sur la base de leur rôle technologique ou d'altération en industrie fromagère. Cette étude a mesuré l'effet de facteurs abiotiques (pH, température, a_w) sur la croissance fongique sur différents types de matrices, milieux synthétiques ou fromages. Les résultats obtenus ont donné lieu à l'élaboration d'un modèle prévisionnel de croissance (*Publication n°2*) et ont permis d'émettre l'hypothèse d'une adaptation / domestication des souches dites technologiques de *Mucor* aux matrices fromagères.

Les bases moléculaires de cette potentielle adaptation / domestication ont été étudiées dans le **chapitre 2** dédié à la mise au point et à la réalisation d'une étude de protéomique comparative sur différentes souches technologiques ou d'altération présentant des caractéristiques phénotypiques et de croissance différentes sur milieu synthétique et milieu mimant le fromage. Cette étude a été complétée par une approche métabolomique. Les résultats obtenus ont permis d'initier le décryptage des voies métaboliques mises en œuvre chez ces différentes souches en fonction de leur environnement.

Le dernier chapitre, intitulé discussion / conclusions et perspectives, dresse un bilan synthétique des résultats obtenus, décrit les apports de cette thèse dans les études génomiques initiées lors de la thèse d'A. Hermet (LUBEM, 2010-2013) et poursuivies dans la

thèse en cours d'A. Lebreton (LUBEM et Station Biologique de Roscoff, 2016-2019), donne les conclusions majeures de ce travail et introduit les perspectives qui en découlent.

Les **annexes** présentent i) les données supplémentaires associées aux études de protéomique, ii) les protocoles et les principaux résultats de la contribution à la partie génomique), iii) les actions de valorisation (articles scientifiques, congrès nationaux et internationaux) et iv) les formations suivies durant ces trois années de thèse.

CHAPITRE I. Les champignons filamenteux

Les champignons filamenteux sont des micro-organismes eucaryotes hétérotrophes. Ubiquitaires dans tous les environnements (terrestres, aquatiques, chez les animaux et les hommes), ces champignons dépourvus de capacité photosynthétique jouent un rôle majeur dans le recyclage des matières organiques végétales. Ils contribuent à la digestion extracellulaire des végétaux en décomposition et, de par leur caractère absorbotrophe, peuvent recueillir, par l'intermédiaire de leur appareil végétatif à paroi perméable, l'eau et le carbone organique nécessaires à leur croissance et à leur synthèse d'énergie. Ce premier chapitre a pour objet de donner un aperçu synthétique des connaissances actuelles sur la classification, la structure et la reproduction des champignons filamenteux.

I.1. Classification actuelle

Longtemps considérés comme des végétaux du fait de la présence d'une paroi cellulaire, de l'absence de mobilité ou encore d'homologies entre leurs cycles de reproduction et celui des algues, ce n'est qu'en 1969 (Whittaker, 1969) que les champignons s'imposent comme un règne distinct dans la classification actuelle du vivant qui regroupe les eucaryotes (*Eucarya*), les archées (*Archaea*) et les bactéries (*Bacteria*) (Woese *et al.*, 1990). Leur classification, historiquement basée sur des critères phénotypiques qui avaient permis d'identifier quatre classes (phycomycètes, ascomycètes, basidiomycètes et deutéromycètes ou *fungi imperfecti* (Ainsworth 1973), a fortement évolué ces dernières années avec l'introduction de critères génotypiques.

La classification des êtres vivants repose sur l'utilisation de rangs taxonomiques : le règne, l'embranchement ou division, la classe, l'ordre, la famille, le genre et l'espèce. Ces rangs peuvent être complétés par des intermédiaires comme le sous-embranchement ou la sous-division, la sous-famille ou la sous-espèce, qui peut elle-même se diviser en variétés. La nomenclature utilisée pour déterminer le nom scientifique des espèces, basée sur les

principes énoncés par Carl Von Linné en 1753, est binomiale et fait référence au genre puis à l'espèce. Les différents taxons présentent une terminologie codifiée où le suffixe définit chaque rang taxonomique dans la classification hiérarchique : *-mycota* pour la division, *-mycotina* pour la sous-division, *-mycètes* pour la classe, *-ales* pour l'ordre, et *-aceae* pour la famille.

Le vivant est actuellement classé en trois domaines : les eucaryotes (*Eucarya*), les archées (*Archaea*) et les bactéries (*Bacteria*) (Ciccarelli *et al.*, 2006). Les champignons sont regroupés dans l'un des 8 groupes qui constituent le domaine des eucaryotes, les opisthokontes (Baldauf, 2008 ; **Figure 2**).

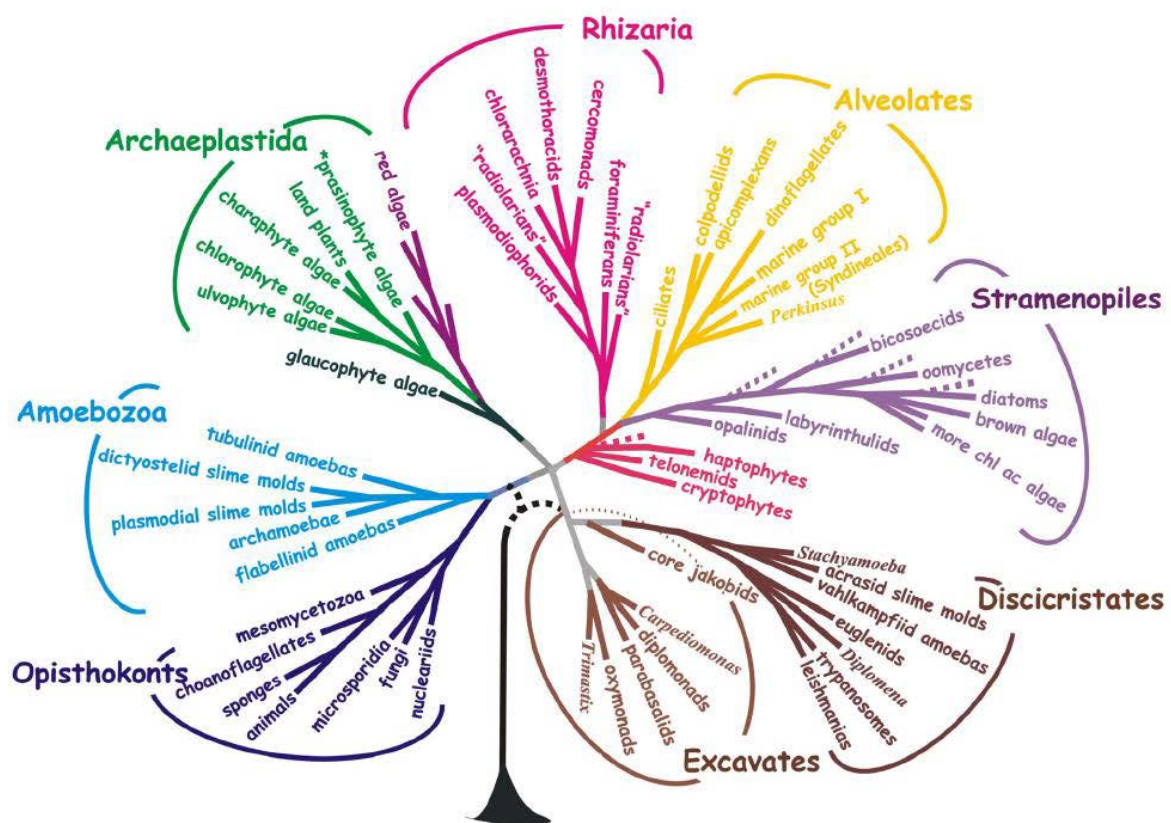


Figure 2 : Groupes constituant le domaine des eucaryotes (Source : Baldauf, 2008).

Au sein de ce groupe des opisthokontes, le règne des « champignons vrais » ou *Fungi*, appelé *Eumycètes*, est actuellement composé d'un sous-règne, de 7 divisions et de 10 sous-divisions (Hibbett *et al.*, 2007).

Le sous règne des *Dikarya* comporte deux divisions, *Ascomycota* et *Basidiomycota*. Les autres divisions sont les *Mucoromycota*, les *Zoopagomycota*, les *Chytridiomycota*, les *Neocallimastigomycota*, les *Blastocladiomycota* et les *Microsporidiomycota* (Hibbett *et al.*,

2007 ; Spatafora et al., in press). La division des *Ascomycota* se scinde en trois sous-divisions *Pezizomycotina*, *Saccharomycotina* et *Taphrinomycotina*, tandis que la division des *Basidiomycota* se décompose en trois sous-divisions *Pucciniomycotina*, *Ustilaginomycotina* et *Agaricomycotina* (**Figure 3**).

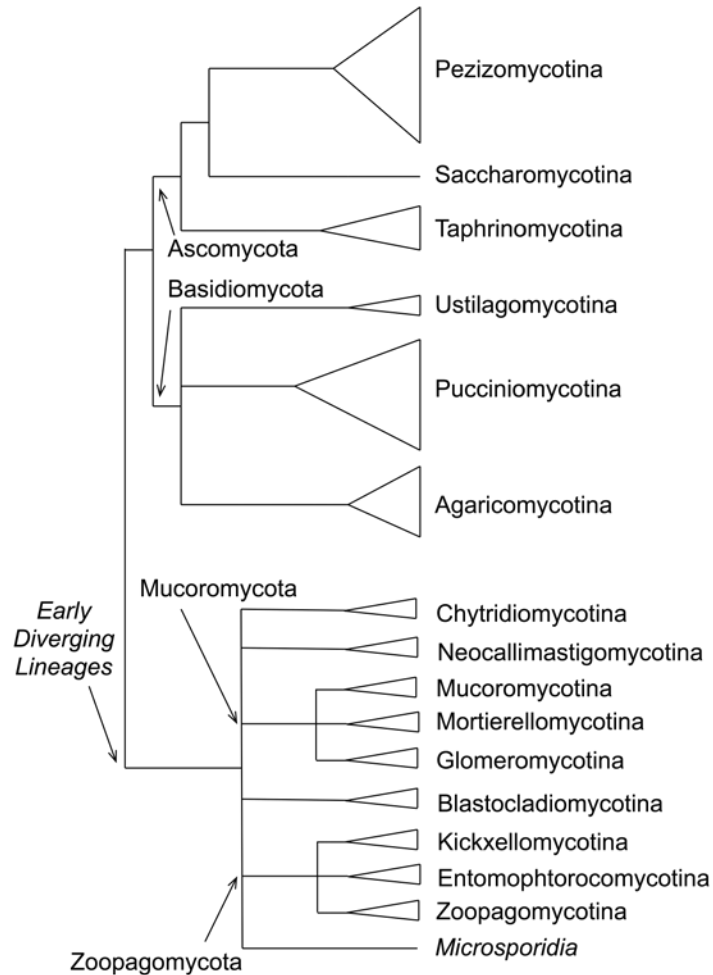


Figure 3 : Répartition du règne des Fungi. Arbre phylogénétique schématisé présentant les différentes divisions et sous-divisions fongiques.

Il est à noter qu'il existe chez les champignons un groupe taxonomique purement artificiel, équivalent à un phylum, celui des Deuteromycota. Il regroupe l'ensemble des formes asexuées des champignons du sous-règne dikarya et constitue un groupe polyphylétique. Initialement, ce groupe avait été établi afin de classer les champignons septés que l'absence de structures de reproduction sexuée empêchait de classer sur une base morphologique dans les Ascomycètes ou les Basidiomycètes. Ce groupe est couramment usité.

En sus de ce groupe artificiel, d'autres regroupements ont été réalisés sur des bases morphologiques essentiellement pour des raisons de commodité. Une première distinction est réalisée entre les micromycètes ou champignons microscopiques et les macromycètes ou champignons macroscopiques. Les micromycètes étant caractérisés par l'absence de structures de reproduction sexuée macroscopiques que l'on retrouve chez les macromycètes. Une seconde distinction est faite entre les champignons filamenteux qui produisent des thalles constitués d'entrelacs d'hyphes (filaments) pluricellulaires et les levures qui restent unicellulaires. Tous les macromycètes sont filamenteux, cependant que chez les micromycètes, les champignons filamenteux sont parfois appelés moisissures et s'opposent aux levures. Ces regroupements macromycètes / micromycètes et champignons filamenteux / levures n'ont pas une base génétique. Il faut noter par ailleurs que certaines espèces dimorphes peuvent exister, et sous forme filamenteuse et sous forme unicellulaire. Nous nous focaliserons dans cette partie sur les champignons filamenteux.

I.2. Morphologie

Les champignons filamenteux sont caractérisés par une organisation rudimentaire. Ils possèdent un appareil végétatif, le thalle, qui correspond à un faisceau de filaments ou d'hyphes plus ou moins ramifiés qui constitue le mycélium (**Figure 4**). Le mycélium est une structure dynamique dont l'extension rapide peut générer des ramifications dont le rôle majeur est d'assurer une colonisation du milieu. Les hyphes sont diffus, tubulaires et fins, avec un diamètre compris entre 2 et 15 μm . Ces hyphes présentent généralement des cloisons transversales (*septa*) perforées permettant une communication intercellulaire. Les hyphes des champignons filamenteux les plus primitifs comme les espèces appartenant aux *Mucoromycota* ont la particularité d'être coenocytiques, c'est à dire de ne pas être cloisonnés et donc de contenir plusieurs noyaux non séparés les uns des autres. Ils sont qualifiés de coenocytiques ou « siphonnés » (**Figure 5**). On parle parfois de siphomycètes en opposition aux septomycètes.

L'extension mycélienne est générée au niveau de l'apex des hyphes. Les zones en arrière de l'apex peuvent néanmoins émettre des bourgeonnements, néoformations de nouveaux axes à croissance linéaire donnant naissance à des ramifications. La rencontre de deux hyphes peut générer des anastomoses, interconnexions permettant l'échange de nutriments voire d'organites (Chagnon, 2014). Cette structure végétative hyper-ramifiée qui se développe de

manière radiale autour d'un inoculum (spore par exemple) permet aux champignons filamenteux de disposer d'une surface de contact maximale avec le milieu, favorisée par le faible diamètre des hyphes.

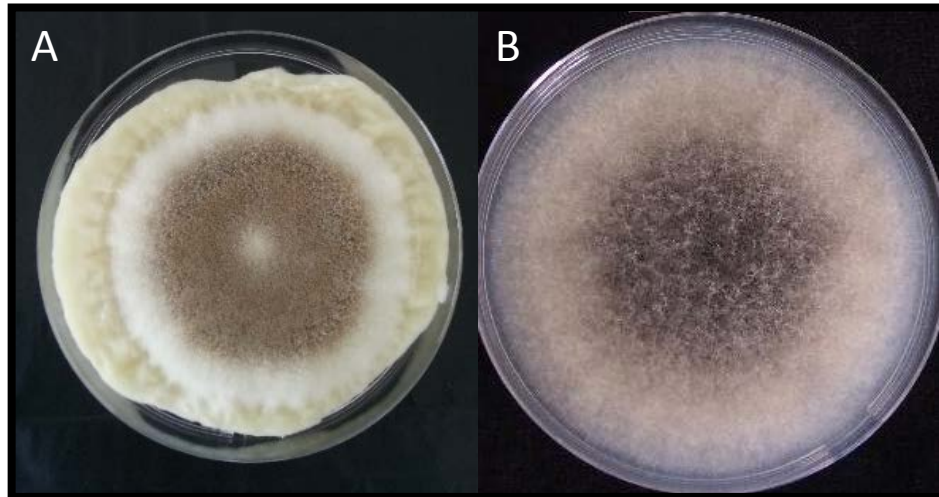


Figure 4 : Exemples de thalle de *Mucor lanceolatus* sur de la Tomme de Savoie non-affinée (A) et de *Mucor endophyticus* sur milieu Potatoe Dextrose Agar (B), après 4 jours de croissance à 15 °C (Source photographies : S. Morin-Sardin).

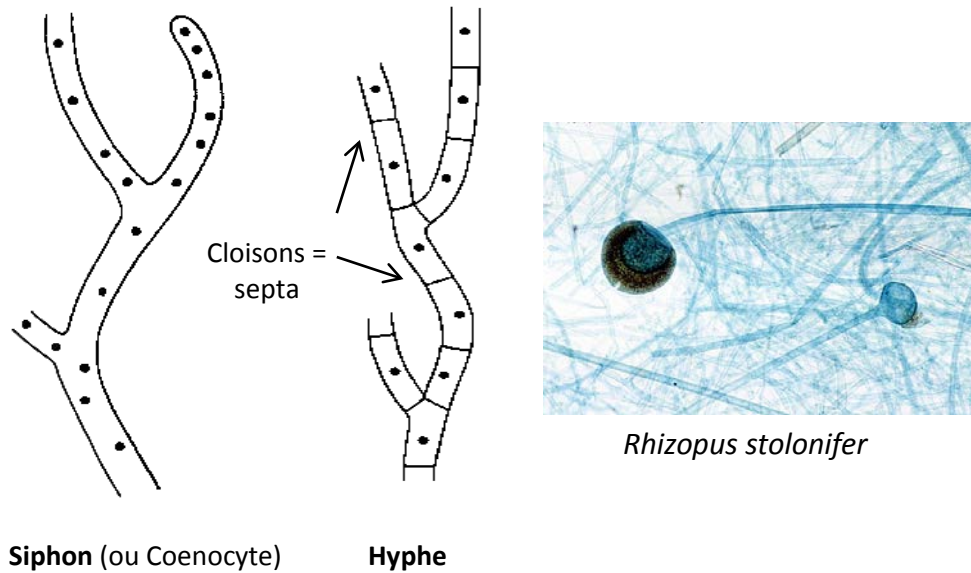


Figure 5 : Hyphe mycélien (Source photographie : Curtis Clark).

I.3. Organisation cytologique

Les champignons filamenteux ont une structure cellulaire eucaryote classique : un noyau abritant les chromosomes, un système endomembranaire (réticulum endoplasmique,

appareil de golgi, ...) et un endosquelette d'actine et de tubuline. Leurs génomes présentent une taille moyenne (environ 10^7 paires de base) intermédiaire entre ceux des plantes et des animaux ($\sim 10^{10}$ paires de base) et ceux des bactéries ($\sim 10^6$ pb). A titre d'exemples, les tailles des génomes complets du tabac commun (*Nicotiana tabacum*), d'*Enterococcus faecium* (souche E1002) et de *Mucor circinelloides* (souche WJ11) sont respectivement de l'ordre de 4,46 Gb, 2,614 Mb et 35,4 Mb (Sierro *et al.*, 2014 ; Tang *et al.*, 2015 ; Tytgat *et al.*, 2016). Quelques espèces hébergent des plasmides circulaires, identiques à ceux retrouvés chez les bactéries, qui codent notamment des métabolites secondaires (Kempken, 1995). Leur membrane cellulaire est riche en stérols (ergostérol principalement) (Zinser *et al.*, 1991) Les réserves carbonées peuvent prendre la forme de gouttelettes lipidiques (oléosomes) ou de glycogène.

Leur paroi, zone de contact privilégiée entre le champignon et son environnement, représente un élément essentiel permettant d'assurer la rigidité des hyphes et une protection vis-à-vis des agressions du milieu extérieur. Sa structure multicouche est composée de microfibrilles de chitine dispersées dans une matrice de glucanes (**Figure 6** ; Manocha et Colvin, 1967 ; Latgé, 2007 ; Free, 2013) :

- La chitine est une molécule formée de polymères de N-acétylglucosamine liées entre eux par des liaisons β -1,4. Elle est généralement accompagnée de chitosanes, c'est à dire de chitine désacétylée (polymères de N-glucosamine).
- Les glucanes de la matrice sont majoritairement de forme β -1,3 et β -1,6 mais des formes mixtes β -1,3-/ β -1,4 et des formes α -1,3 et α -1,4 ont également été décrites.

Bien qu'indispensable, la chitine est néanmoins présente en relativement faible proportion dans la paroi qui contient également des glycoprotéines et des mannanes qui jouent un rôle dans les phénomènes de reconnaissance, l'adhérence et l'hydrophobicité et interviennent dans la nutrition et l'allongement de la paroi. La synthèse pariétale est réalisée au niveau de l'apex de l'hyphe, zone assurant la colonisation du milieu où la paroi est la plus fine (Deacon, 2006).

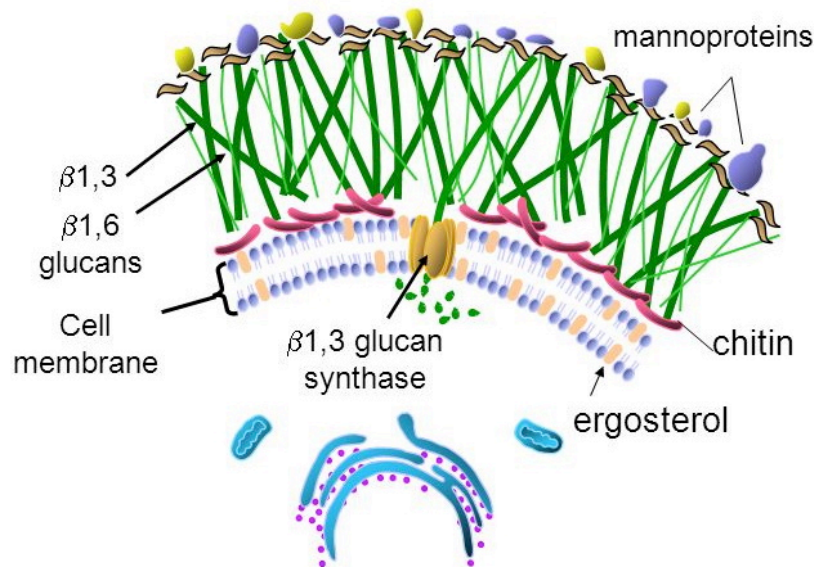


Figure 6 : Organisation de la paroi des champignons filamenteux
 (Source : <http://www.nammex.com/redefining-medicinal-mushrooms/>).

I.4. Besoins nutritifs

Du fait de leur caractère hétérotrophe vis-à-vis du carbone et de leur incapacité à phagocytter des substances solides, les champignons filamenteux assurent leur nutrition par l'absorption de substances organiques et minérales à l'état dissout (Bouchet *et al.*, 2000). Cette absorbotrophie ne concerne que les petites molécules comme les acides aminés et les ions minéraux qui peuvent traverser la paroi mycélienne ; les molécules de taille plus importantes (amidon, cellulose, protéines, ...) devant au préalable être dégradées (Cole, 1996).

Pour assurer leur croissance, les champignons filamenteux ont besoin :

- d'eau et d'ions minéraux (potassium, phosphore, magnésium, fer, cuivre, soufre, ...)
- d'une source de carbone organique. Celle-ci peut être apportée par des oses, des acides organiques, ou, plus rarement, des acides aminés ;
- d'une source d'azote tirée de nitrates, de sels ammoniacaux, de peptides, d'acides aminés ou encore d'urée. L'azote peut être assimilé par deux systèmes qui fonctionnent en simultané et dans une proportion qui est fonction de la nature de la source azotée, de la concentration en azote du milieu ou encore du stade de développement : le système glutamine synthétase (GS) / glutamate synthase (GOGAT) et le système glutamate déshydrogénase (GDH).

En complément, certaines espèces peuvent avoir des besoins spécifiques (vitamines, stérols, acides gras, purines ...), besoins qui sont parfois utilisés, notamment en mycologie médicale, pour l'identification de certains champignons pathogènes.

Parmi les paramètres abiotiques ayant un impact important pour le développement fongique, l'humidité relative (HR) est probablement le plus important. Elle est calculée selon la formule $HR = a_w \times 100$, où l' a_w représente l'**activité de l'eau**, c'est-à-dire la disponibilité en eau d'un substrat. Pour la majorité des champignons filamenteux, une croissance est observée pour des a_w comprises entre 0,85 et 0,99 (Pose *et al.*, 2009 ; Lahouar *et al.*, 2016 ; Morin-Sardin *et al.*, 2016). Un autre élément critique est la **température**. Si la majorité des moisissures sont mésophiles (20-25°C), une grande variabilité existe néanmoins selon les espèces considérées et des souches thermophiles, thermotolérantes ou psychrophiles ont été décrites. Trois autres paramètres sont également à considérer : l'**oxygène** ; le **pH**, généralement optimum entre 5,5 et 7,5 ; et le **potentiel redox** qui a une influence directe sur l'assimilation des nutriments via les pompes à protons.

I.5. Croissance végétative

La colonisation du milieu est assurée par une **croissance apicale** qui nécessite une utilisation de l'énergie obtenue via la dégradation par des enzymes (cellulases, laccases, pectinases, estérases, lactases, peroxydases, lipases, protéases, ...), puis l'absorption, au travers de la paroi des hyphes, de tous les éléments nécessaires à la nutrition du champignon (Cole, 1996). Ce mécanisme génère une désorganisation et une déstructuration du milieu propice au développement mécanique des structures mycéliennes. Cette phase d'expansion intensive, durant laquelle la croissance hyphale peut atteindre $1 \mu\text{m}.\text{sec}^{-1}$ (Köhli *et al.*, 2008), est fréquemment à l'origine des altérations observées sur les produits alimentaires. Lorsque le milieu devient limitant, le champignon ralentit ou stoppe sa croissance.

L'extrémité de l'apex, appelée dôme apical, et la zone adjacente directement en aval sont les zones clés du développement des champignons filamenteux. C'est à leur niveau que sont réalisées la dégradation et l'assimilation des substrats mais également l'extension des hyphes. Cette région, qualifiée de viscoélastique, est une zone dynamique où les éléments

structuraux de base de la paroi sont présents dans un cytosol particulièrement fluide mais sous une forme non-organisée : les micelles de chitine sont individualisées et les β -glucanes sont à l'état de polyoses solubles non polymérisés. La fragilité du dôme apical est néanmoins contrebalancée par la présence d'un réseau d'actine structuré. Cette structuration souple et dynamique est le siège de différents mécanismes. En effet, la croissance apicale fongique implique : i) la synthèse des composants de la paroi cellulaire (molécules de chitine et de glucane) dans le corps cellulaire, ii) l'incorporation de ces composants dans des vésicules d'exocytoses, iii) le transport de ces vésicules au niveau de l'apex (flux exocyttaire), iv) la libération du contenu de ces vésicules dans la zone apicale par fusion avec la membrane plasmique et v) le recyclage de certains composants par endocytose (**Figure 7** ; Fisher *et al.*, 2016).

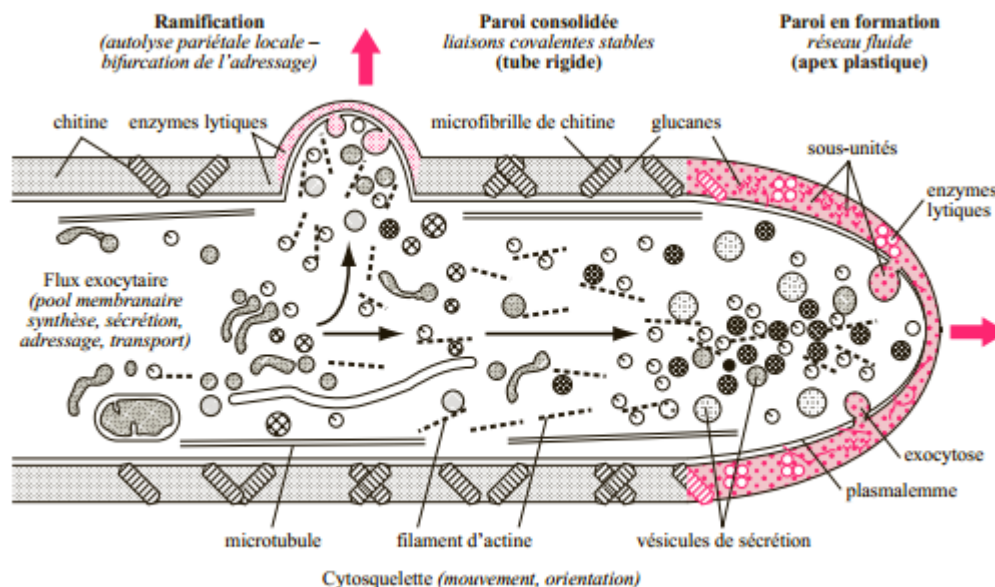


Figure 7 : Organisation schématique de l'apex d'un filament en période de croissance active (Source : Bouchet *et al.*, 2000).

Les vésicules d'exocytose contiennent également des enzymes responsables d'hydrolyse qui restent généralement associées à la couche amorphe mucilagineuse des hyphes. Le Spitzenkörper (SPK), situé immédiatement en arrière de l'apex, est assimilé à un « centre de transit » qui coordonne la circulation de ces vésicules d'exocytose (Verdin *et al.*, 2009). Chez *Neurospora crassa* ou *Aspergillus nidulans*, il a été démontré que la présence de cette structure est nécessaire à une croissance mycélienne rapide (Horio et Oakley, 2005 ; Araujo-Palomares *et al.*, 2007). Un flux inversé permet d'assurer un recyclage des membranes des

vésicules d'exocytose et des protéines impliquées dans leur fusion avec la membrane plasmique (comme les protéines de type *N*-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptor ou v-SNAREs) (Pelham, 1999 ; Read et Kalkman, 2003). Les microtubules et les microfilaments d'actines sont des éléments essentiels du système, jouant notamment un rôle dans le mouvement des vésicules et le maintien structural des zones de croissance (Taheri-Talesh *et al.*, 2008).

Lors de la trophophase, phase de croissance en milieu riche, se produit une absorption importante d'éléments nutritifs et, par voie de conséquence, la synthèse d'une multitude de vésicules d'exocytose chargées de matériel pariétal. La saturation de la circulation vers l'apex entraîne des accumulations de ces organites et des déversements localisés d'hydrolases qui désorganisent la paroi et aboutissent à la naissance de ramifications. Dans un milieu non-limitant, l'expansion du thalle fongique est donc rapide et les hyphes sont « hyper-ramifiés ».

La pénétration des nutriments (oses, acides aminés, phosphates...) dans le cytosol fait appel à un co-transport avec des protons rendu possible grâce à la présence de pompes de type ATPase H^+/K^+ qui génèrent un gradient de protons entre l'hyphes et le milieu extérieur (Takeuchi *et al.*, 1988; Schachtschabel *et al.*, 2012). Ces pompes sont très efficaces puisqu'elles permettent d'obtenir une différence de concentration entre les deux compartiments qui peut atteindre un facteur 1000, équivalent à 3 unités pH et à une différence de potentiel électrique de 200 à 300 mV.

I.6. Reproduction asexuée et sexuée

La reproduction des champignons, opération qui vise à assurer leur pérennité, est complexe et reflète l'hétérogénéité de leur mode de vie. Elle peut prendre deux formes : une reproduction **asexuée** (forme anamorphe), et une reproduction **sexuée** (forme téléomorphe) (Lee *et al.*, 2010). Elle met en jeu, dans les deux cas, des spores, cellules (ou parfois structures pluricellulaires) de petite taille (2 à 250 μm) au métabolisme réduit, produites en grande quantité et entourées d'une paroi protectrice particulièrement résistante.

La reproduction asexuée se fait sans fusion de gamètes et correspond majoritairement à la dispersion de spores asexuées produites par des structures spécialisées développées à partir du mycélium. Différents types de spores asexuées ont été décrits sur la base de leur mode de production :

- Des arthrospores, qui se développent à partir d'un fragment parent de mycélium ;
- Des sporocystiospores qui sont produites de manière endogène à l'intérieur de sporocystes (**Figure 8**) ;

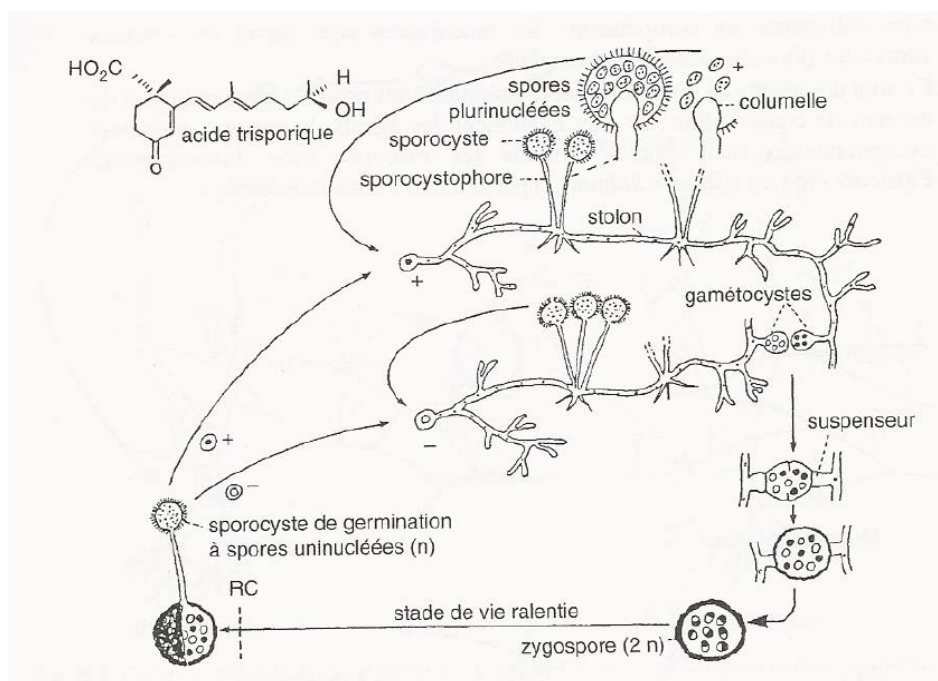


Figure 8 : Cycle de développement des Mucoromycotina. Exemple de *Rhizopus nigricans* (Source : Bouchet *et al.*, 2000).

- Des conidies ou conidiospores générées de manière exogène et en continu à l'extrémité de structures spécialisées appelées cellules conidiogènes (exemples : annélides, phialides etc.) Ces différents types de spores se désolidarisent du mycélium par des mécanismes enzymatiques (gélification de la paroi des sporocystes) et/ou physiques (choc mécanique, vibration, courant d'air) et sont propagées dans le milieu selon différents modes. Les gloeiospores qui ont pour caractéristique de présenter une paroi épaisse et humide leur permettant de rester collées entre elles par un mucus et de former ainsi des amas diffusent soit par contact, soit par des insectes ou soit par l'eau. Les xéropores sont au contraire des spores bien individualisées et facilement dispersées par l'air. Ces spores, germent lorsque les conditions environnementales sont propices et donnent naissance à du mycélium.

La reproduction sexuée consiste en la fusion de deux gamètes haploïdes (n) donnant un zygote diploïde ($2n$). La méiose génère des variations génétiques au sein des spores sexuées (ascospores, basidiospores, zygosporés) qui sont favorables à une adaptation plus rapide des populations à des environnements nouveaux ou stressants.

Chez les Mucoromycotina par exemple, ce phénomène est initié par la rencontre de deux hyphes sous l'impulsion de substances chimiques émises par les mycéliums qui jouent un véritable rôle hormonal (on parle de gamones), comme par exemple l'acide trisporique (Schimek *et al.*, 2003). La partie terminale des rameaux se cloisonne et se transforme en gamétocyste plurinucléé (**Figure 8**). Les gamétocytes des deux hyphes en contact fusionnent (plasmogamie) pour donner un cénozygote dans lequel les noyaux de chacun cohabitent sans fusionner (stade dicaryotique à $n + n$ chromosomes). Certains noyaux dégèrent mais ceux qui subsistent subissent finalement la caryogamie ou fécondation et donnent naissance à une zygosporé diploïde ($2n$; **Figures 9**). Cette zygosporé possède une paroi épaisse et verruqueuse. Elle restera en vie ralentie jusqu'à la germination où un processus de méiose et de formation d'un sporocyste permettront la libération de spores uninucléées. Chez les champignons supérieurs (dicarya), le phénomène est un peu plus complexe et le décalage entre la plasmogamie et la caryogamie, qui donne naissance à un stade dicaryotique, est plus important, notamment chez les basidiomycètes.

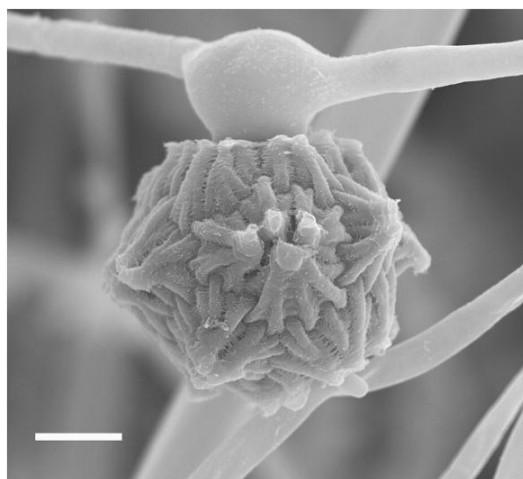


Figure 9 : Image en microscopie électronique d'une zygosporé de *M. circinelloides* (marqueur d'échelle = 10 μm). Tiré de Lee et Heitman (2014).

I.7. Modes de vie

Les champignons filamenteux ont une grande diversité de modes de vie. La majorité d'entre eux sont des **saprophytes** (du grec *sapros*, pourriture et *phyton*, plante), vivant grâce à de la matière organique morte d'origine végétale ou animale dont ils contribuent fortement au recyclage (Martins *et al.*, 2014 ; Zhang *et al.*, 2016). Une de leur principale caractéristique est leur capacité de synthèse d'une très large variété d'exo-enzymes, souvent induites en fonction du substrat sur lequel ils évoluent.

Le **parasitisme** est un autre phénomène fréquent pour lequel peuvent être distinguées les notions de biotrophie (« nourrissage » à partir de tissus vivants) et de nécrotrophie, terme opposé. Chez les champignons phytopathogènes par exemple, la **biotrophie** est mise en œuvre par les agents des mildious et des rouilles comme *Blumeria graminis*, *Puccinia* spp. et *Ustilago maydis* alors que la **nécrotrophie**, stratégie basée sur la sécrétion d'un arsenal d'enzymes dégradant les parois végétales et de toxines cytotoxiques, est utilisée par des moisissures comme *Botrytis cinerea* et *Sclerotinia sclerotiorum* (Dean *et al.*, 2012). Le parasitisme peut être parfois associé chez l'homme à des pathologies graves (cf Chapitre III).

Les champignons **symbiotiques** ont développé une stratégie différente basée sur une association à bénéfice réciproque avec un autre organisme vivant : ils obtiennent ainsi des nutriments grâce à leur « associé » en échange de certains bénéfices, tels qu'une amélioration de la nutrition hydrominérale ou bien une protection contre des micro-organismes pathogènes (Luo *et al.*, 2016 ; Ray and Craven, 2016). Les structures les plus connues sont les mycorhizes (ecto et endo), associations entre champignons et végétaux supérieurs, et les lichens, unions d'algues et de champignons. Une publication récente suggère que ces derniers pourraient, dans certains cas, être le résultat d'une symbiose incluant une levure comme troisième partenaire (Pennisi, 2016). Des symbioses champignons/insectes ont également été décrites (You *et al.*, 2015 ; van der Heijden *et al.*, 2015 ; Terrer *et al.*, 2016).

Enfin, le **commensalisme** permet aux champignons filamenteux de tirer un bénéfice de leur hôte sans leur nuire mais sans non plus leur apporter un quelconque avantage. Les bénéfices observés peuvent être la récupération des débris nutritifs de l'hôte, le transport ou le refuge.

CHAPITRE II. Champignons filamenteux et production fromagère

La fabrication du fromage peut faire intervenir différents types de micro-organismes, indigènes ou ajoutés lors de la fabrication en tant que cultures primaires et secondaires. Les cultures primaires comprennent toutes les **bactéries lactiques dites « starter »** qui sont impliquées dans la production d'acide pendant les étapes de fabrication puis durant l'affinage. Les **cultures secondaires ou auxiliaires** (*adjunct cultures*) comprennent des micro-organismes qui ont un rôle uniquement lors du processus d'affinage. On y retrouve des bactéries mais également des levures et des champignons filamenteux. Ces micro-organismes sont ajoutés du fait des caractéristiques qu'ils vont apporter au produit (coloration, texture, saveur typique, ...). Notre connaissance de la diversité microbienne dans les fromages a considérablement augmenté au cours de la dernière décennie en particulier en raison de l'application des techniques de biologie moléculaire pour l'étude des communautés microbiennes. Après un rappel des grandes étapes de fabrication du fromage, ce chapitre s'intéressera à la diversité et aux rôles des moisissures dans le processus d'affinage.

II.1. Le fromage et ses principales étapes de fabrication :

Selon le Décret n°2007-628 du 27 avril 2007 : « *La dénomination " **fromage** " est réservée aux produits fermentés ou non, affinés ou non, obtenus à partir des matières d'origine exclusivement laitière suivantes : lait, lait partiellement ou totalement écrémé, crème, matière grasse, babeurre (lait de baratte), utilisées seules ou en mélange et coagulées en tout ou en partie avant égouttage ou après élimination partielle de la partie aqueuse (). ... La teneur minimale en matière sèche du produit ainsi défini doit être de 23 grammes pour 100 grammes de fromage. »*

On distingue le fromage **affiné**, qui peut être consommé uniquement après avoir passé un certain temps à une température et dans des conditions nécessaires pour que s'opèrent des changements biochimiques et physiques caractéristiques, et le fromage **frais** (ou non affiné), consommable directement au terme de sa fabrication (FAO/OMS, 1978). Les fromages sont classés en fonction de la dureté de leur pâte, de leur teneur en matière grasse et de leurs caractéristiques d'affinage (**Tableau 1** ; FAO/OMS, 1978). Cette classification générale est

complétée par des normes individuelles précisant les caractéristiques particulières de divers fromages et des réglementations nationales.

La fabrication du fromage comprend trois étapes principales : i) la **coagulation (ou caillage)** ; ii) l'**égouttage**, qui permet d'obtenir un caillé et iii) l'**affinage** ou digestion enzymatique de ce caillé (**Figure 10**) (Cette dernière étape n'existe pas dans le cas des fromages frais consommés directement après égouttage). Ces trois étapes sont généralement précédées d'une phase préalable de préparation du lait qui comprend un certain nombre d'opérations (nettoyage par filtration statique ou centrifuge, standardisation en matières grasses et en matières protéiques, assainissement (généralement par traitement thermique), rééquilibrage en calcium, maturation ; FAO/OMS, 1978).

Tableau 1 : Classification des fromages en fonction de leur consistance, de leur teneur en matière grasse et des principales caractéristiques d'affinage (FAO/OMS, 1978).

Formule I		Formule II		Formule III
TEFD* (%)	1 ^{er} élément de dénomination	MGES** (%)	2 nd élément de dénomination	Dénomination d'après les principales caractéristiques d'affinage
<51	Pâte extra-dure	>60	Extra-gras	1. Affiné: a. principalement en surface b. principalement dans la masse
49-56	Pâte dure	45-60	Tout-gras	
54-63	Pâte semi-dure	25-45	Mi-gras	
61-69	Pâte semi-molle	10-25	Quart-gras	
>67	Pâte molle	<10	Maigre	2. Affiné aux moisissures: a. principalement en surface b. principalement dans la masse
				3. Frais

*TEFD = Pourcentage de la teneur en eau dans le fromage dégraissé $[(\text{Poids de l'eau dans le fromage}) \times 100 / (\text{Poids total du fromage} - \text{Matière grasse dans le fromage})]$

** MGES = Pourcentage de la matière grasse dans l'extrait sec $[(\text{Teneur en matière grasse du fromage} \times 100) / (\text{Poids total du fromage} - \text{Eau dans le fromage})]$

II.1.a. La coagulation

Le lait est, globalement, composé d'eau (~90%), de matières grasses (~3%), de protéines solubles et insolubles (~3%) et de lactose (~4% ; données pour le lait de vache ; Cerbulis et Farrell, 1975). Cette composition peut varier assez sensiblement en fonction de l'espèce animale considérée (Jandal, 1996 ; Devle *et al.*, 2012 ; Medhammar *et al.*, 2012). Au sein de la fraction protéique, les caséines représentent le composant majeur (environ 80% du total

des protéines). Elles sont structurées en sous-unités (submicelles), avec un cœur hydrophobe (caséine β) entouré par les parties hydrophiles des caséines phosphorylée α_{s1} et α_{s2} et de la caséine glycosylée κ . Ces protéines sont naturellement riches en minéraux et sont associées à du phosphate de calcium (Ronez, 2012). Elles ont un caractère acide très net et sont organisées en micelles, agrégats hétérogènes solubles composés de 10 à 100 sous-unités reliées entre elles par l'intermédiaire de ponts phospho-calciques. Au pH normal du lait (6,55 pour du lait de vache UHT demi-écrémé), ces micelles présentent une enveloppe d'hydratation protectrice du fait de leur importante capacité de fixation de molécules d'eau (3,7g pour 1g de protéines) et leurs charges de surface sont fortement négatives. Ces caractéristiques, couplées à l'existence de forces de répulsion électrostatiques, limitent leur rapprochement.

L'objectif de la coagulation est de déstabiliser ces micelles afin de permettre leur agrégation. Trois stratégies sont utilisées en industrie fromagère :

- une **voie fermentaire** basée sur l'utilisation de bactéries lactiques (cultures primaires ou « starter » évoquées précédemment) qui, en dégradant le lactose, produisent de l'acide lactique chargé positivement qui va venir neutraliser les charges négatives des molécules de caséines (Bouteille *et al.*, 2013). Lorsque le pH atteint le point isoélectrique de la caséine (4,6), les micelles flocculent et s'unissent via des interactions hydrophobes, formant un gel ou réseau homogène appelé coagulum ou caillé qui va emprisonner le lactosérum.

- une **voie enzymatique** faisant appel à des protéines coagulantes de différentes origines (animales, microbiennes, ...). L'enzyme protéolytique historiquement la plus utilisée est la présure (mélange de chymosine (80%) et de pepsine (20%), produite au niveau de la caillette des jeunes ruminants (Foltmann *et al.*, 1979). La dégradation spécifique de la caséine κ par la chymosine permet d'initier la formation du gel par l'intermédiaire des micelles modifiées. On notera que certains champignons filamenteux sont employés pour la production d'enzymes coagulantes comme alternative à la présure.

-une **voie mixte** combinant les 2 voies citées précédemment. Dans ce contexte, il existe une gamme variée de combinaisons.

Ces mécanismes aboutissent à la formation de coagulums dont les aptitudes à l'égouttage et à l'affinage sont spécifiques de leurs modes de formation.

II.1.b. L'égouttage

Le gel caséinique formé lors de l'étape de coagulation est dans un état physique instable et la phase dispersante va progressivement se séparer du coagulum sous la forme de lactosérum. L'égouttage est divisé en deux phénomènes physiques : i) la **synérèse**, phénomène actif de contraction du gel et ii) une **exsudation spontanée passive du lactosérum** du fait de la perméabilité du coagulum. Ces phénomènes vont induire une séparation des composants originels du lait : l'eau, le lactose et une petite partie de la matière grasse et des protéines sont éliminés par le sérum alors que la plus grande partie des protéines et de la matière grasse reste piégée dans le coagulum qui peut être moulé. En fonction des techniques utilisées, cette étape permet d'obtenir des fromages frais, à pâte molle ou à pâte persillée. L'intensification de l'égouttage par réalisation d'autres traitements technologiques comme le pressage donne des fromages à **pâte pressée** cuite ou non cuite (Dejmek et Walstra, 2004).

L'égouttage est suivi d'une phase de **salage** dont les principaux objectifs sont: i) de compléter l'égouttage et de contribuer à la formation et à la solidification de la croûte ; ii) de réguler l' a_w afin de mettre en place les conditions propices à la phase suivante, l'affinage ; iii) de contribuer au goût du fromage et iv) de limiter l'implantation de micro-organismes indésirables (Tabla *et al.*, 2015 ; Dugat-Bony *et al.*, 2016). On distingue le salage à sec par saupoudrage manuel ou mécanique, frottage ou incorporation dans le caillé et le salage en saumure (Guinee, 2004). La plupart des fromages ont une teneur en sel variant entre 1,5 à 2,5 %.

II.1.c. L'affinage

A la fin de l'égouttage, le coagulum ou caillé moulé doit subir (sauf dans le cas où il est consommé à l'état frais) une étape d'affinage (ou maturation) qui consiste en un ensemble complexe de réactions enzymatiques qui va conférer au produit fini ses qualités nutritionnelles (composition, valeur nutritive, digestibilité) et organoleptiques (aspect, consistance, saveur, odeur). En fonction du processus détaillé de fabrication et du microbiote naturel et/ou apporté (cultures secondaires ou auxiliaires) présent lors de cette phase d'affinage, on peut distinguer cinq grandes catégories de fromages : les pâtes pressées non-cuites, les pâtes persillées, les pâtes molles, les pâtes molles à croûtes lavées

et les pâtes molles à croûtes fleuries. La fermentation du lactose, la protéolyse et la lipolyse sont parmi les modifications biochimiques les plus importantes qui ont lieu au cours de cette étape durant laquelle les champignons filamenteux jouent un rôle important pour les fromages concernés.



Figure 10 : Illustration du processus de fabrication du fromage. A. Fruitière de la Chapelle d'Abondance. B. Cuves d'emprésurage et de coagulation. C. Egouttage - pressage. D. Salage. E. Affinage. F. Nettoyage de surface (Abondance). G et H. Tommes de Savoie affinées. (Photos Morin-Sardin ; Fruitière de la Chapelle d'Abondance).

II.2. Diversité microbienne associée aux fromages

Un total de plus de 70 genres et 200 espèces microbiennes ont été détectés, par des méthodes culture-dépendantes ou culture-indépendantes, dans le cœur et à la surface de différentes variétés de fromages (Jany et Barbier, 2008 ; Cogan *et al.*, 2014 ; Montel *et al.*, 2014 ; Hermet *et al.*, 2014 ; Irlinger *et al.*, 2015 ; Šuranská *et al.*, 2016). Il s'agit principalement de bactéries Gram négatives (> 50 espèces ; Coton *et al.*, 2012), d'Actinobactéries (> 40 espèces), de Firmicutes contenant des staphylocoques (Coton *et al.*, 2010) et des bactéries lactiques (LAB) (> 100 espèces), de levures (> 50 espèces) et de moisissures (> 20 espèces ; Montel *et al.*, 2014). L'abondance et la diversité de ces micro-organismes varient au cours du processus de maturation du fromage, selon le type de croûte (fleurie, lavée ou naturelle) et la technologie utilisée (pâte molle, pâte pressée). Au début du processus de fabrication, les bactéries lactiques « starter » sont quantitativement dominantes puis, au cours des quelques premiers jours de maturation, des levures et / ou moisissures colonisent progressivement la surface du fromage. Le nombre de cellules viables pour les levures peut atteindre environ 6-8 log₁₀ UFC.cm⁻². Ce nombre reste relativement constant jusqu'à la fin du processus de maturation. En général, leur nombre à l'intérieur du fromage est de 100 ou 1000 fois plus faible. La désacidification progressive de la surface du fromage favorisée par les levures et / ou moisissures permet la mise en place d'une communauté bactérienne sensible aux acides et tolérante au sel, de 1 à 2 unités log₁₀ plus élevé en nombre que les levures (Cogan *et al.*, 2014). Les données sur la dynamique des populations de moisissures ajoutées (cultures auxiliaires) sur le fromage sont rares. Contrairement aux bactéries ou aux levures unicellulaires, le réseau mycélien des moisissures n'est en effet pas facilement quantifiable et seuls les apports en spores peuvent donner lieu à un dénombrement. Il est néanmoins possible d'estimer la biomasse mycélienne en utilisant des approches de PCR en temps réel, comme celles proposées par pour *Penicillium roqueforti* et *P. camemberti* (Le Dréan *et al.*, 2010 ; Leclercq-Perlat *et al.*, 2013).

II.3. Focus sur les moisissures

Les moisissures sont principalement utilisées i) en surface sur des fromages comme le Brie, le Camembert, certains fromages de chèvre ou des Tommes ou ii) dans les veines de

fromages à pâte persillée comme le Roquefort, les bleus ou le Gorgonzola. La liste officielle de référence des micro-organismes avec une utilisation documentée dans les aliments, mise à jour en 2012, comprend plus d'une douzaine d'espèces de champignons filamenteux impliquées dans la production de fromage (Bourdichon *et al.*, 2012). On y retrouve, par exemple, *Fusarium domesticum*, *Penicillium camemberti*, *P. roqueforti*, *Sporendonema casei*, *Mucor mucedo*, *M. plumbeus*, *M. hiemalis* et *M. racemosus*. La plupart de ces moisissures sont des ascomycètes et se rapportent à deux classes : les *Eurotiomycetes* et les *Sordariomycetes* (Ropars *et al.*, 2012). Parmi ces ascomycètes, *P. roqueforti* et *P. camemberti* sont les deux espèces les plus largement retrouvées (Cantor *et al.*, 2004 ; Giraud *et al.*, 2010). L'étude menée par Hermet *et al.* (2014) a permis d'identifier d'autres moisissures comme *Fusarium domesticum*, *Sporendonema casei* et *Scopulariopsis* spp. Un certain nombre d'espèces du genre *Mucor* sont également d'importance, en particulier pour les fromages à pâte semi-dure (Hermet *et al.*, 2012 ; cf Chapitre 3).

Différentes moisissures, principalement des souches des espèces *P. roqueforti* et *P. camemberti* mais également d'autres espèces comme *S. casei*, sont commercialisées sous formes de cultures auxiliaires par plusieurs entreprises (BIOPROX, DuPont, Danisco, ...). Les informations fournies par ces producteurs de ferments comprennent des éléments sur la couleur du mycélium / des conidies, la vitesse de croissance et la hauteur de mycélium, les capacités protéolytique et lipolytiques, ... Pour les espèces qui ne sont pas commercialisées, l'apport est le plus souvent encore empirique et associé aux processus traditionnels de fabrication qui, lors de leur déroulement, permettent un enrichissement naturel par l'intermédiaire du lait, des ustensiles et matériaux, des solutions de saumure ou de l'environnement de la fromagerie ou du lieu dédié d'affinage (**Figure 11**). On assiste ainsi encore fréquemment à un transfert de moisissures des fromages âgés aux fromages plus jeunes. L'optimisation des bonnes pratiques d'hygiène en production fromagère, qui prend en considération l'ensemble des ressources dites 5M (pour milieu, matériel, méthode, matière et main d'œuvre ; Les éditions des journaux officiels, 2012) dans un objectif de maîtrise du risque sanitaire pour l'homme, a pour contre-effet négatif de réduire ces apports « naturels » de moisissures.

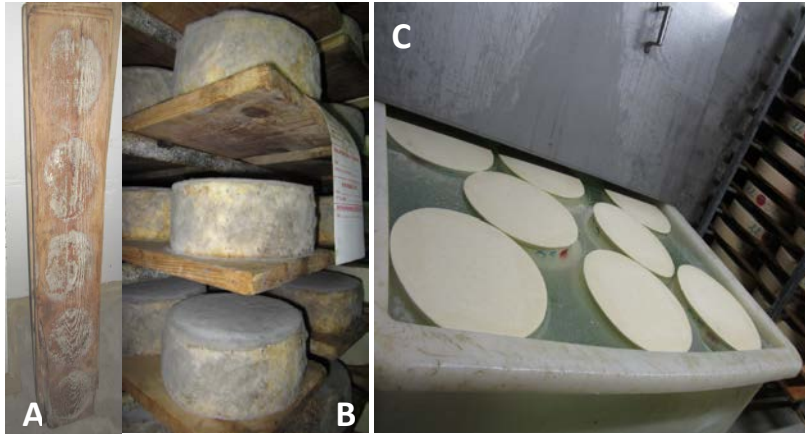


Figure 11 : Illustrations de la diffusion « naturelle » des moisissures lors de la fabrication artisanale de la Tomme de Savoie. A, B : planches en bois « résineux » utilisées pour le stockage des fromages durant l'affinage. C : Etape de salage par immersion. (Photos Morin-Sardin ; Fruitière de la Chapelle d'Abondance).

II.3.a. Rôles positifs des champignons filamenteux lors de l'affinage

Les champignons filamenteux sont à l'origine de différents mécanismes au cours du processus d'affinage, dont les principaux sont décrits et illustrés dans les pages suivantes.

↳ Catabolisme du lactate et désacidification

Comme c'est le cas pour les levures (*e.g.* *G. candidum* et *D. hansenii*), un grand nombre de moisissures comme *Penicillium camemberti* et *P. roqueforti*, produisent des enzymes nécessaires au catabolisme des substrats carbonés majeurs présents dans le fromage tel que l'acide lactique (Cerning *et al.*, 1987 ; Chávez *et al.*, 2011 ; Leclercq-Perlat *et al.*, 2013). La dégradation du lactate et la production de métabolites alcalins comme l'ammoniac conduisent à une augmentation du pH (ou désacidification) favorable à la croissance de bactéries aérobies de surface sensibles à l'acidité. Ces modifications ont un rôle majeur dans le processus d'affinage, notamment pour l'élaboration de fromages à pâtes molles. L'analyse du transcriptome de fromages de type Camembert a révélé une expression précoce de gènes de *P. camemberti* et *G. candidum* impliqués dans le catabolisme du lactate (Lessard, 2014). Une forte expression a également été observée pour des gènes impliqués dans la gluconogénèse, ce qui est cohérent avec la fonction de cette voie qui vise à rediriger les sources de carbone dans le métabolisme central.

↳ Effet sur l'aspect, la texture et la pigmentation

Les moisissures impliquées dans la maturation des fromages contribuent au développement de leurs aspects physiques et macroscopiques. Les veines bleutées caractéristiques des fromages de type bleu sont provoquées par l'accumulation de conidies colorées de *P. roqueforti*. Pour cette espèce, des souches allant du bleu clair au jaune vont être utilisées dans le Gorgonzola tandis que pour le Roquefort, elles sont plutôt d'un vert sombre (Chamba et Irlinger, 2004). Chez les *Mucor*, *M. fuscus* et *M. lanceolatus* sont à l'origine d'un duvet blanchâtre à gris foncé à la surface des fromages à pâte semi-dure, directement en lien avec leur mycélium et la coloration de leurs spores asexuées (**Figure 12**). Cette matière fongique, lorsqu'elle est en excès, peut d'ailleurs nécessiter un lissage / brossage de la surface de fromage pour le rendre commercialement plus attrayant. Un certain nombre d'espèces de *Mucor* synthétisent également des caroténoïdes, un groupe important de pigments possédant des propriétés antioxydantes et anticancérigènes (Papp *et al.*, 2009).



Figure 12 : Impact de champignons filamenteux sur les fromages. A, B : Moisissures à la surface de Tommes de Savoie (photos Morin-Sardin, fruitières de la Chapelle d'Abondance et de Bogève). C. Bleu du Vercors (photo www.les-alpages.fr).

↳ Protéolyse et catabolisme des acides aminés

Les activités endo et exo-peptidases des champignons filamenteux jouent un rôle majeur dans la dégradation des caséines du lait (Gripon, 1977). Cette activité de protéolyse participe à l'augmentation du pH, et induit, en raison de la libération de peptides et d'acides aminés, des modifications de texture et la production d'arômes (Sousa *et al.*, 2001; Upadhyay *et al.*, 2004 ; Ardö, 2011). Chez *P. roqueforti* et *P. camemberti*, les systèmes protéolytiques sont assez semblables et comprennent des aspartyl protéases, des métalloprotéases, des

carboxypeptidases et des aminopeptidases (Cerning *et al.*, 1987). Chez *G. candidum*, l'activité aminopeptidase a été décrite comme plus importante que chez *P. camemberti* (Molimard *et al.*, 1994). Des activités protéolytiques ont également été rapportées chez un certain nombre d'espèces du genre *Mucor* (Alves *et al.*, 2002; 2005).

Les acides aminés sont fréquemment utilisés comme substrat énergétique par la plupart des champignons mais aussi des bactéries de surface (Mounier *et al.*, 2007 ; Mansour *et al.*, 2008). Le glutamate, l'acide aminé le plus abondant dans le fromage (Rosenberg et Altemueller, 2001), est transformé par la glutamate déshydrogénase en NADH (forme réduite de la nicotinamide adénine dinucléotide ou NAD), en ammoniacque et en alpha-cétoglutarate (Cerning *et al.*, 1987) qui peut entrer dans le cycle de l'acide tricarboxylique (TCA). L'alpha-cétoglutarate est également un substrat pour les réactions de transamination et favorise le catabolisme des autres acides aminés, aboutissant à la production de divers composés volatiles comme le disulfure de méthyle (DSDM) ou le trisulfure de diméthyle (TSDM ; Mansour *et al.*, 2009 ; Sørensen *et al.*, 2011).

↳ Lipolyse

La lipolyse est le mécanisme qui génère la production d'acides gras libres (AGL), substrats énergétiques pour de nombreux micro-organismes présents dans le fromage et éléments essentiels pour le développement de la flaveur (Collins *et al.*, 2004). Elle est très présente chez les fromages à croûtes fleuries (Gripon, 1993) où elle permet la production de méthylcétones (2-heptanone, 2 nonanone) et d'alcools secondaires (2-heptanol, 2-nonanol) (Cerning *et al.*, 1987). Comme pour les activités protéolytiques, les capacités lipolytiques peuvent fortement fluctuer en fonction des espèces et des souches considérées (Larsen et Jensen, 1999). Des lipases extracellulaires et/ou intracellulaires ont été notamment décrites pour *P. camemberti* (Cerning *et al.*, 1987 ; Molimard et Spinnler, 1996), *P. roqueforti* (Menassa et Lamberet 1982 ; Cakmakci *et al.*, 2013). Chez les *Mucor*, cette activité a également été largement rapportée (Sharma *et al.*, 2001 ; Alves *et al.*, 2002).

↳ Production d'arômes

Plusieurs études ont démontré l'importance des composés volatiles soufrés (VSC) dans la flaveur du fromage (Martínez-Cuesta *et al.*, 2013 ; Taylor *et al.*, 2013 ; Gkatzionis *et al.*, 2014). Considérant les principales voies métaboliques impliquées dans la production de

composés volatils chez le fromage (glycolyse, utilisation du citrate, protéolyse, lipolyse), la production de VSC, tels que le méthane-thiol, le sulfure de diméthyle, le DSDM ou le TSDM, est due en grande partie au catabolisme des acides aminés (Curioni *et al.*, 2002 ; Martin *et al.*, 2002 ; Lopez del Castillo-Lozano, 2007 ; Martínez-Cuesta *et al.*, 2013). Les arômes typiques qui caractérisent les fromages à croûte fleurie et à pâte persillée sont principalement associés à des méthylcétones (2-heptanone, 2-nonanone) et aux alcools secondaires qui dérivent de leur réduction (2-heptanol, 2-nonanol) (Spinner et Gripon, 2004 ; Leclercq-Perlat *et al.*, 2004). Des composés aliphatiques comme le 1-octène-3-ol (Gripon, 1993) ou le 1-octanol, molécules qui joueraient un rôle dans le quorum-sensing chez *P. camemberti* (Chitarra *et al.*, 2005 ; Gillot *et al.*, 2016), ont également été décrits ainsi qu'un grand nombre d'autres composés comme des thiols, des esters, des aldéhydes, de l'ammoniaque, ... (Jolivet *et al.*, 1993 ; Molimard et Spinnler, 1996 ; Martin *et al.*, 2002 ; Boutrou et Gueguen 2005 ; Lopez del Castillo-Lozano, 2007 ; Sourabié *et al.*, 2008 ; De Freitas *et al.*, 2009).

↳ Effet protecteur contre les agents pathogènes et la flore d'altération

Plusieurs publications rapportent la faculté qu'ont certaines moisissures comme *P. camemberti*, à inhiber la croissance de contaminants fongiques ou bactériens (Larsen *et al.*, 1997 ; Dieuleveux *et al.*, 1998 ; Decker et Nielsen, 2005 ; Naz *et al.*, 2013). Certaines souches brevetées de *P. camemberti* présentent, par exemple, une activité « anti-*Mucor* » utilisée pour éviter l'apparition de défauts de type « poil de chat » (Bouvier *et al.*, 1993).

II.3.b. Rôles négatifs

Bien que certaines espèces de moisissures, dites « technologiques », jouent un rôle positif très important dans le processus de maturation des fromages affinés, la présence de moisissures dans les fromages peut néanmoins parfois prendre des aspects négatifs qui se traduisent (i) par des modifications d'aspects comme le défaut « poil de chat » provoqués par certaines espèces de *Mucor* (Brenet *et al.*, 1972 ; Cengi-Goga *et al.*, 2014) ; (ii) des défauts de saveur : goût trop prononcé, présence d'amertume, sensation de rance (Bergère et Lenoir, 1997) et / ou, dans certaines conditions, (iii) la production de mycotoxines (Fernández-Bodega *et al.*, 2009 ; Fontaine *et al.*, 2015). Les espèces de champignons

filamenteux à l'origine de ces impacts négatifs sont considérés comme des espèces contaminantes à l'origine d'altérations. Cependant, on notera que dans certains cas, ce distinguo est caduc puisqu'en fonction du fromage considéré, la même espèce peut être considérée comme technologique (ex. *Mucor* sur une Tomme, *P. roqueforti* dans une pâte persillée) ou d'altération (*Mucor* sur un fromage de chèvre, *P. roqueforti* sur du gruyère râpé).

Chapitre III. Le genre *Mucor*

Comme présenté ci-dessus, le genre *Mucor* fait partie des champignons présentant un caractère ambivalent en fromagerie. Ce genre, largement utilisé également dans les produits asiatiques (Han *et al.*, 2004), rassemble un certain nombre d'espèces technologiques utilisées dans l'affinage de certains fromages tels que les Tommes, le Saint-Nectaire ou encore le Cantal, où elles sont à l'origine du développement de caractères organoleptiques typiques. Plusieurs espèces de *Mucor* se caractérisent par leur capacité à produire des enzymes de type lipases (Kozo *et al.*, 1969 ; Ulker et Karaoğlu, 2012) et protéases (Zhang et Zhao, 2010) qui améliorent la texture, la saveur et les qualités nutritionnelles des fromages. A contrario, dans d'autres fromages, les *Mucor* spp. sont des contaminants qui engendrent des accidents de fabrication (Bärtschi *et al.*, 1994 ; Montagna *et al.*, 2004 ; **Figure 13**). Ces altérations ont un impact économique, à l'échelle d'une fromagerie artisanale, d'une production industrielle ou du consommateur, mais aussi en termes de gaspillage alimentaire.



Figure 13 : Tommes de Savoie d'aspect normal (A) et présentant un défaut de pigmentation (B) (photos Morin-Sardin, fromagères de la Chapelle d'Abondance et de Bogève). Phénomène de poil de chat à la surface d'une Tomme (C) (photo : <http://fr.academic.ru/dic.nsf/frwiki/1197386>).

Plusieurs espèces de *Mucor* ont ainsi un impact majeur en fromagerie. *M. fuscus* et *M. lanceolatus* sont, par exemple, des espèces prépondérantes dans les fromages (Barrios *et al.*, 1998 ; Hermet *et al.*, 2012 ; 2014) au sein desquels elles jouent un rôle technologique important. A contrario, *M. racemosus*, même s'il peut être parfois inoculé volontairement, est un contaminant fréquent des productions fromagères alors que *M. circinelloides* ne joue qu'un rôle de contaminant occasionnel.

Ce chapitre propose, au travers d'une revue de la bibliographie existante, une présentation générale de l'état des connaissances actuelles sur le genre *Mucor*, en soulignant plus particulièrement son impact dans le domaine de l'alimentation, de la santé humaine et des biotechnologies.

Publication n°1 :

Mucor: a Janus-faced fungal genus with human health impact and industrial applications

Morin-Sardin S., Nodet P., Coton E., Jany J.L.

Soumise à Mycologia le 29/07/2016

***Mucor*: a Janus-faced fungal genus**
with human health impact and industrial applications

Stéphanie MORIN-SARDIN, Patrice NODET, Emmanuel COTON, Jean-Luc JANY*

Université de Brest, EA 3882 Laboratoire Universitaire de Biodiversité et d'Ecologie Microbienne, IBSAM, ESIAB, Technopôle Brest-Iroise, 29280 Plouzané, France

Abstract: The *Mucor* genus, a polyphyletic group pertaining to the early diverging lineages of fungi, includes a high number of ubiquitous species with some of them having positive or negative incidences on human activities. Indeed, some pathogenic *Mucor* species are a threat for animal and human health and are more and more identified as mycosis causative agents especially in immunocompromised patients. On the contrary a small number of *Mucor* species have been used for centuries in food manufacturing for cheese ripening or Asian fermented food preparation. Some species are even used as biotechnological microorganisms due to different assets as their high growth rates, their dimorphism for certain species and even a previously unsuspected potential for secondary metabolite production. Despite all these important roles played by *Mucor* spp. they have been less investigated than ascomycetous or basidiomycetous species and their taxonomy, metabolism and ecology is less documented than their counterparts in the so-called higher fungi. Nevertheless, researches focusing most often on the emblematic *M. circinelloides* species have led to an increase of knowledge on the biology of this genus and overall on fungal biology when it comes to understanding dimorphism or light-induced gene regulation for example. The aim of this review is to give an overview of the knowledge on *Mucor* morphology, taxonomy, ecology and genetics and of its importance regarding human health and industrial applications.

Keywords: asian fermented food; biotechnology; cheese; contaminant; mucormycosis

Short-title: The genus *Mucor*

Corresponding author:

jean-luc.jany@univ-brest.fr - phone: +33 (0)2 90 91 51 55 – fax: +33 (0)2 90 91 51 01

I. INTRODUCTION

Mucor is a fungal genus classified in the *Mucorales*, the most prominent order of the zygosporangium-forming fungi that formerly constituted the *Zygomycota*, a phylum which is not currently accepted due to polyphyly. *Mucor* species as well as other members of this pseudo-phylum “*Zygomycota*” are early diverging fungi, basal in comparison to the higher fungi (i.e. *Ascomycota* and *Basidiomycota* phyla). This group constitutes the most primitive terrestrial fungi (Krings et al. 2013) with oldest fossils originating from the Precambrian, between 800 Ma to 1.2–1.4 Ga ago. According to Ainsworth (1965), the first microscopical observation of a *Mucor* specimen was done in 1665 by Robert Hooke. From this very first description until today, several hundreds of potential species have been reported. *Mucor* species along with other members of the *Mucorales* order are possibly the most studied species among the species formerly classified in the “*Zygomycota*”. However, the *Mucor* genus has retained much less attention than emblematic genera pertaining to *Ascomycota* and *Basidiomycota*. Still, there is a growing interest for *Mucor* species due to some particularities that made them good models for genetic studies, their importance as pathogens, including for humans, and their contribution to the production or fermented foods as well as their biotechnological abilities. This review aims to provide up to date information concerning the *Mucor* genus and its impact on human health and activities.

II. A *Mucor* portrait

II.1. Systematics

Prior to 1969 and the establishment of the Fungi kingdom by Whittaker (1969), fungal organisms were classified in the Thallophyta subdivision within the Plant kingdom. Species producing coenocytic hyphae were grouped in the Phycomycetes class that included fungi producing zygospores but also water molds forming oospores (Bisby 1945, Bessey 1951). After the Fungi kingdom was established, Phycomycetes were reclassified into Zygomycotina (for species without flagellated zoospores) and other series of new classes (Ainsworth et al. 1971). At the end of the twentieth century, fungi were classified into five phyla, the *Mucor* genus being placed within the *Zygomycota* a group which is basal compared to the so called higher fungi (Dikarya). With successive revisions of fungal systematic, the *Zygomycota*

phylum has been considered as polyphyletic and subdivided into different phyla and subphyla defined on the basis of biological and molecular criteria. (James et al. 2006, White et al. 2006, Hibbett et al. 2007, Humber 2012). Today, on the basis of the analysis of 350 whole genome sequences of early diverging fungal species, Spatafora *et al.* (in press) identified that zygomycete fungi actually correspond to two phyla: (i) Mucoromycota including Mucoromycotina, Mortierellomycotina and Glomeromycotina subphyla and (ii) Zoopagomycota including Zoopagomycotina, Kickxellomycotina and Entomophthoromycotina subphyla. The current classification for *Mucor* being Fungi, Mucoromycota, Mucoromycotina, Mucorales, Mucoraceae, *Mucor*. With a total of 58 currently accepted species (Walther et al. 2013), *Mucor* is the largest genus within the *Mucorales* order and the *Mucoraceae* family.

Molecular phylogenies based on the analysis of different loci such as the ribosomal deoxyribonucleic acid (rDNA) internal transcribed spacer (ITS) sequences and/or translation elongation factor EF-1 α gene and/or actin gene sequences, concluded that *Mucor* cannot be considered as a monophyletic group (O'Donnell et al. 2001, Voigt and Wöstemeyer 2001, Budziszewska et al. 2010, Álvarez et al. 2011, de Souza et al. 2012, Walther et al. 2013). In particular, the extensive study published by Walther and colleagues (2013), which included nearly 400 *Mucor* strains, placed *Mucor* species in different groups. Those groups were intermingled, within the 28S rDNA phylogeny proposed, with more than twenty genera such as *Chaetocladium*, *Helicostylum*, *Pilaira*, *Pirella*, *Thamnidium* or *Zygorhynchus* and even *Mycotypha* and *Choanoephora* that are not members of the *Mucoraceae* but belong to the Mycotyphaceae and Choanepheraceae, respectively. Noteworthy, the groups recently detected using molecular phylogenetics (2013) are largely concordant with the species and species group delimitations yielded by the early extensive and detailed studies by Schipper (1967, 1973, 1975, 1976, 1978) which were based on morphological descriptions and mating tests. Those groups include the *Mucor flavus*, *M. mucedo*, *M. hiemalis*, *M. racemosus*, *M. amphibiorum* and *M. recurvus* groups. Each one of these group includes different species sharing some common morphological characters. However, some species delimited by Schipper (Schipper 1967, 1976) (e.g. *M. circinelloides*, *M. hiemalis* and *M. flavus*) were not identified as monophyletic groups since their corresponding clades included other species of even other genera (Walther et al. 2013). Moreover, the latter authors identified several Molecular Operational Taxonomic Units (MOTUs) that may represent new *Mucor* species.

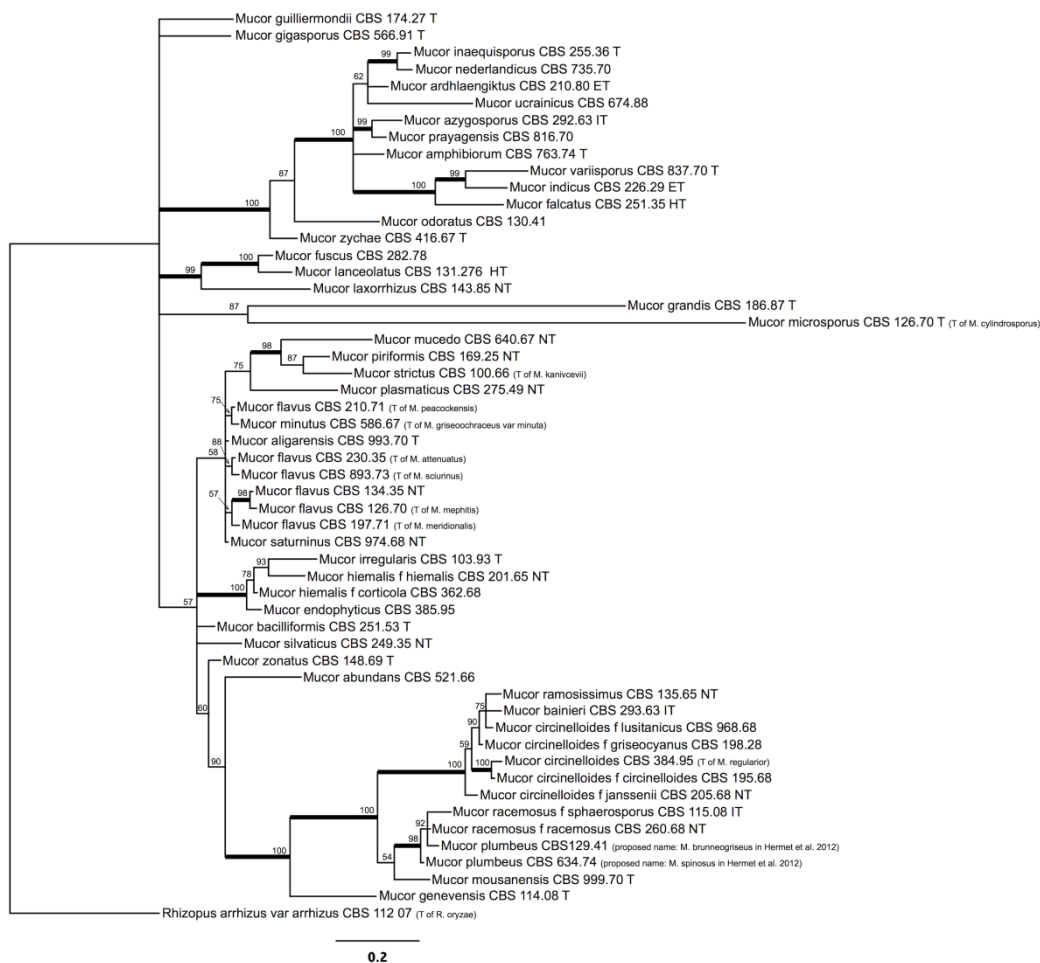


Fig. 1 Bayesian tree based on analysis of the partial D1/D2 region (595 bp) of the large subunit (LSU) ribosomal DNA (rDNA) of 53 *Mucor* spp. and 1 *Rhizopus* strains. Sequences downloaded from the National Center for Biotechnology Information Center (NCBI) nucleotide database were published in Walther *et al.* (2013) except for *M. lanceolatus* CBS 131.276 and *M. plumbeus* CBS 226.32 (*M. spinosus*). Sequences were aligned using MAFFT (Katoh *et al.*, 2002) using the G-INS-i iterative refinement method, edited using Gblocks (Castresana, 2000) and Mesquite (Maddison & Maddison, 2001) (Alignment # available in TreeBASE). The phylogenetic reconstruction was done using MrBayes (Huelsenbeck and Ronquist, 2001) (4 MCMC chains were run simultaneously for 10000000 generations with trees saved every 100th generation). Posterior probabilities are indicated next to branches and branches are indicated in bold when posterior probabilities are higher than 0.95. Ex-type strains are designated by: T=ex-type strain; ET=ex-epitype strain; HT=ex-holotype strain; IT=ex-isotype strain; LT=ex-lectotype strain; NT=ex-neotype strain.

Recently, *M. lanceolatus* has been identified on the basis of a multilocus sequencing approach as a new species which is used for cheese ripening (Hermet *et al.* 2012). Hermet *et al.* (2012) also proposed to consider *M. spinosus* and *M. brunneogriseus* that are currently classified as two *M. plumbeus* *formae*, as two discrete species. On the contrary, the different *formae* of *M. circinelloides*, i.e. *formae* *circinelloides*, *griseocyanus*, *lusitanicus* and *janssenii* might correspond to discrete species (Álvarez *et al.* 2011). Multilocus phylogeny and the use of the gold standard of species criterion in fungi, the Genealogical Concordance -

Phylogenetic Species Recognition criterion (GC-PSR) (Taylor et al. 2000, Dettman et al. 2003, Le Gac et al. 2007, Giraud et al. 2008) should be more broadly applied to detect hypothetical new species. Moreover, given the observed polyphylies both at the genus and family levels, these studies should rely on extensive samplings including representative strains from other genera such as *Backusella*, *Chaetocladium*, *Choanoephora*, *Helicostylum*, *Mycotypha*, *Pilaira*, *Pirella*, *Thamnidium* or *Zygorhynchus*. Such studies may lead to important taxonomic revisions within the *Mucorales*. This taxonomic revision should yield to changes in the denomination of several species currently classified as non-*Mucor* species, to putative cryptic species and/or synonym identification and modify the current phylogeny (**FIG. 1**).

Since the *Mucor* genus has undergone, and will certainly still undergo, substantial changes, the literature reports a lot of erroneous species denominations. Among the most cited species, *Rhizomucor miehei* often appears as *Mucor miehei* and *Rhizomucor pusillus* has sometimes been named *Mucor pusillus* while those two species belong to the *Rhizomucor* genus that only comprises thermophilic species and does not include *Mucor endophyticus* anymore which is often found in the literature as *Rhizomucor endophyticus*. Similarly, *Rhizopus arrhizus* var. *arrhizus* often appears as *Mucor rouxii* while it is definitely not included in the *Mucor* genus (see Hoffmann et al. 2013, Walther et al. 2013 for recent taxonomies).

II.2. Morphology

Morphological characters of *Mucor* species have been extensively reported by Schipper (Schipper 1967, 1969, 1973, Schipper and van Wetenschappen 1975, Schipper 1976, 1978) and Zycha (Zycha et al. 1969). *Mucor* species grow primarily as hyphae described as coenocytic, septa being rare. When septa are observed, they isolate i) sexual or asexual structures (Stajich et al. 2009) and ii) senescent hyphal regions to avoid cytotoxic compounds to flow all over the hyphal network (Carlile 1995). Rhizoids are rare in *Mucor* but may be described in some species (**FIG. 2**). Asexual reproduction in *Mucor* involves multispored sporangia forming above a distinct columella which is, unlike for other members of the *Mucorales* (i.e. *Rhizopus* spp., *Absidia* spp.), non-apophysate (i.e. not generating a natural swelling that separates the sporangium from the sporangiophore and the rest of the mycelium) (**FIG. 2**). It is worth noting that *Mucor* do not produce specialized sporangiola as found for example in *Thamnidium*. Some *Mucor* species develop vegetative spores within

hyphae (most often in senescent or aged hyphae), i.e. chlamydo spores, sometimes very abundantly (e.g. *M. racemosus*) (FIG. 2).

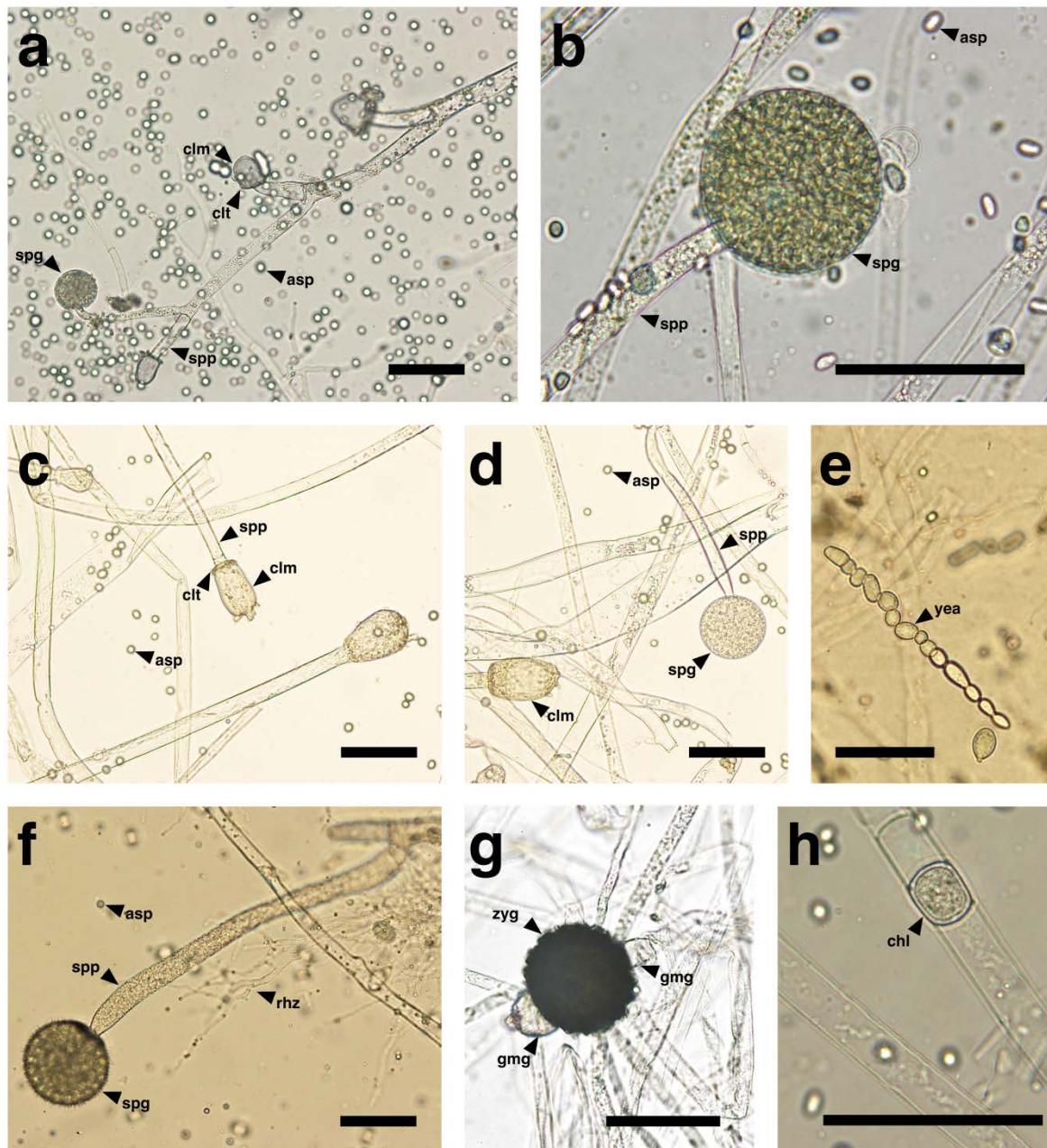


Fig. 2 Morphological characters in *Mucor*. Different *Mucor* specimens were mounted onto glass slides in water drops and observed under a microscope. a. *Mucor circinelloides* UBOCC-A-105016 repeatedly branched sporangiophores bearing sporangia with columella and collar; b. *Mucor hiemalis* UBOCC-A-101360 isolated sporangiophore bearing a sporangium; c-d. *Mucor spinosus* UBOCC-A-101363 (*M. plumbeus*) sporangiophores bearing sporangia with columella with distinctive finger-like apical projections, and collar; e. *Mucor circinelloides* UBOCC-A-105016 yeast forms; f. *Mucor hiemalis* UBOCC-A-101360 zygospore with two suspensor cells corresponding to the two gametangia; h. *Mucor racemosus* UBOCC-A-101366 chlamydo spore within a vacuolized hypha. Scale bars = 50 μ m.

Mucor species are haploid with zygotic meiosis when sexual reproduction occurs. Sexual spores (zygospores) (**FIG. 2**), that may be smooth to warty, result from the fusion of morphologically similar, naked and opposed gametangia arising from a single mycelium in homothallic species or from different but sexually compatible mycelia in heterothallic species.

In Mucoromycotina, the sexual compatibility leading to the fusion relies on a single mating locus with two alleles (bipolar mating system) *sexP* for the (+) and *sexM* for the (-) mating types, respectively. The locus encodes a high mobility group (HMG) domain transcription factor as observed first in the genus *Phycomyces* (Idnurm et al. 2008) and later in *M. circinelloides* and *M. mucedo* (Lee et al. 2008, Li et al. 2011, Wetzel et al. 2012). In *Mucor*, the sex genes are associated within a gene cluster with the *tpta* gene encoding for a triose phosphate transporter (TPT) and *rnhA* gene that encodes a RNA helicase (see Lee and Heitman 2014). The *SexP* and *SexM* genes have been shown to be differentially regulated (Wetzel et al. 2012) and *SexM* seems to be upregulated when the trisporic acid pheromone is supplemented in the growth medium (Lee and Heitman 2014). The recognition process between the two mating partners is regulated by a family of β -carotene derived signal compounds known as trisporoids (Schachtschabel et al. 2008, Schimek and Wöstemeyer 2009).

Hyphal growth in *Mucor* is fast (Trinci 1969) and spores are abundantly produced (Le Bars Bailly et al. 1999). Interestingly, some *Mucor* species such as *M. circinelloides* (Orlowski 1991) or *M. indicus* (Karimi and Zamani 2013) are dimorphic (i.e. able to grow either under a filamentous or a yeast-like form). This dimorphism was at one point at the origin of the consideration that *Mucor* originated from *Saccharomyces* species by “transmutation” (Bartnicki-García 1963). The morphogenic transition depends actually on environmental conditions and especially on the oxygen and carbon dioxide concentrations (Bartnicki-García 1963). In aerobic conditions, dimorphic *Mucor* species (e.g. *M. circinelloides*) grow as a mold; while in anaerobic conditions, they exhibit yeast-like forms (**FIG. 2**). This transition is driven by a serine/threonine-specific protein phosphatase and a cAMP-dependent protein kinase A (PKA) (Lee et al. 2013) and, in *M. circinelloides*, directly influences host-pathogen interactions (Lee et al. 2015). Calcineurin is necessary for hyphal growth whereas PKA activity is increased during yeast growth. In addition, Valle-Maldonado *et al.* (2015) showed

that different assemblages of genes encoding heterotrimeric G protein subunits were co-expressed depending on the *M. circinelloides* form.

II.3. Life style

Mucor species are very abundant in nature and often ubiquitous (Voigt and Wöstemeyer 2001, Hoffmann et al. 2013, Voigt et al. 2016). They are primary saprobes but some species have been described as plant endophytes, others as opportunistic animal and human pathogens (Hoffmann et al. 2013). Although some Mucoromycotina (i.e. *Endogone* spp.) may establish mycorrhizal symbioses with Pinaceae (Fasolo and Scannerini 1977) or liverworts (Field et al. 2015a and 2015b), no *Mucor* species has been reported to establish mutualistic association with plants. Likewise, no endosymbioses have been described in *Mucor* species while some Mucoromycotina host vertically and horizontally transferred bacterial endosymbiotic partners: for examples, mollicutes-related bacteria in *Endogone* (Desirò et al. 2014) or *Burkholderia* spp. in *Rhizopus* spp. (Partida-Martinez et al. 2007a, 2007b, Lackner et al. 2009). However, to our best knowledge, endosymbiotic bacteria have not been extensively looked for in *Mucor* species.

Mucor spp. are found in a large variety of substrates, but most often, are infested to moist environments. *Mucor* preference for high water activities ($a_w > 0.90$) was recently confirmed for several *Mucor* strains (Morin-Sardin et al. 2016). *Mucor* spores, which are issued in large numbers, present strong moisture absorption capacity, high level of adherence to various surfaces and can be dispersed in moist air. They also germinate quickly in humid environment when they find a favourable substrate (Brenet et al. 1972a). All these properties highly contribute to their high colonization potential. Reported optimal growth conditions of *Mucor* spp. are as follows: temperature of 20 to 25°C, pH of 5.0 to 6.0, relative humidity of 90 to 95%, and water activity >0.95 (Panasenko 1967, Dantigny et al. 2005, Pitt and Hocking 2009b, Morin-Sardin et al. 2016). Some species (e.g. *M. circinelloides*, *M. indicus* or *M. ramosissimus*) are thermotolerant and are therefore prone to grow as human or animal pathogens.

According to Andrews (1992), who attributed to fungi different ecological strategies based on plant ecology, *Mucor* species develop a ruderal (R-selected) strategy characterized by « *a high reproductive potential and short life span which facilitates successful exploitation in severely disturbed but nutrient rich conditions* ». This strategy can be opposed to stress-

tolerant and combative strategies characterizing ascomycetes and basidiomycetes, respectively (Cooke and Rayner 1984). This stress avoidance and rich medium preference strategy means that *Mucor* species are encountered in early stages of ecological succession in the environment. However, contrary to what may be thought this rich medium preference cannot be attributed to low enzyme competence. Indeed, *Mucor* species are known to produce a wide range of enzymes giving them the ability to degrade organic matter in different niches and that can be put to good use in various industrial applications (Voigt and Kirk 2014, Voigt et al. 2016). For example, multiple species have been reported to have the capacity to produce amylases (Mohapatra et al. 1998, Alves et al. 2002, Houghton-Larsen and Pedersen 2003), allowing growth on starch (Mcintyre et al. 2002), or cellulases, *Mucor* species being known for a long time (Sadasivan 1939) for their ability to grow on straw.

II.4. Metabolism

Up to now, metabolic studies have concerned a small number of species mainly targeting specific aspects of their metabolism with special regards to the production of metabolites of interest for the industry (see part IV). The most comprehensive studies concern lipid biosynthesis (Tang et al. 2016) and carotenoid production (Voigt et al. 2016). Indeed, part of the nitrogen and amino acid as well as carbon metabolisms have recently been detailed by the systematic proteomics approach developed by Tang *et al.* (2016) who followed regulated proteins (including metabolic enzymes) in *M. circinelloides* under nitrogen deficiency (a condition favouring lipid accumulation at the detriment of amino acids). Regarding carotenoids and terpenoids, they are synthesized in *M. circinelloides* as side-products of the acetate-mevalonate (AMV) pathway, in which precursors of the different terpene derivatives are synthesized from acetyl-CoA (Voigt et al. 2016). The AMV pathway produces β -carotene which can be converted into different carotenoids or can yield, through a degradation pathway for which only a few enzymes are currently identified (Voigt et al. 2016), to the chemotactic pheromone trisporic acid. Trisporic acid is a molecule supposedly encountered in all fungi of the Mucoromycotina since it induces zygospore formation (Wöstemeyer et al. 2005) when synthesized by the two compatible mating partners.

Concerning secondary metabolites, interestingly, the only toxic secondary metabolites detected so far by analyzing fungi pertaining to the Mucoromycotina are i) rhizoxin, a cytostatic and antimetabolic polyketide macrolide, ii) rhizonin, a hepatotoxic cyclopeptide (see

Jennessen et al. 2005) that are both actually produced by *Burkholderia* endosymbionts present in the cytoplasm of several *Rhizopus* species (Partida-Martinez et al. 2007a, Scherlach et al. 2012, Dolatabadi et al. 2015) and iii) the neurotoxic 3-nitropropionic acid, a suicide inhibitor of succinate dehydrogenase (see Ludolph and Ludolph 1991) found in *M. circinelloides* (Hollmann et al. 2008). The latter authors pointed out that the mycotoxin-producing capacity of these fungi has not been deeply investigated so far. More recently, following a survey showing the toxicity of *M. circinelloides* forma *circinelloides* on mice, Lee et al. (2014) found that the genomes of *M. circinelloides* formae *circinelloides* and *lusitanicus* “contain genes predicted to be involved in the production of secondary metabolites which indicates that *Mucor* might produce harmful toxins”. Such genes, i.e. polyketide synthase (PKS), nonribosomal peptide synthetase (NRPS) and L-tryptophan dimethylallyl transferase (DMAT) encoding genes, have been identified in publicly available drafts of genomes of species of the Mucoromycota (Voigt et al. 2016) and in *M. fuscus*, *M. lanceolatus* and *M. racemosus* genomes by Hermet (2013). This author found different genes involved in mycotoxin production but dispersed and not organized in clusters as it is usually the case for known mycotoxin-producers. One might think that the absence of mycotoxin production in ruderal species (R-selected), such as *Mucor*, is not surprising given that it does not necessarily represent a competitive (and therefore evolutive advantage) contrary to ascomycetous fungi that face drastic competition. However, the recent findings mentioned above indicate that it would be worth investigating the toxin secondary metabolism when analysing the different *Mucor* genomes that will become available. The availability of genome sequences for several *Mucor* species will facilitate the annotation and characterization of metabolic pathways and will help unravelling primary and secondary metabolisms in the genus.

II.5. Mucor circinelloides: a model organism

Although *Mucor* genetics is at a very early stage compared to what has been done in *Aspergillus* or *Neurospora*, this genus presents different assets that makes it a model of interest for genetic studies and for both fundamental and applied researches. The 36.6 Mb genome of *M. circinelloides* f. *lusitanicus* was the first publicly available *Mucor* genome (<http://genome.jgi.doe.gov/Mucci2/Mucci2.home.html>) and its ongoing annotation will help deciphering its metabolism. In addition, this species is of interest as it is easily

transformable. van Heeswijck and Roncero (1984) were the first authors to transform *M. circinelloides* protoplasts using polyethylene glycol and CaCl₂ to transfer plasmids. The protocol has, since then, been regularly improved and the protoplast-mediated transformation remains the gold standard method (see Garre et al. 2014) although some other strategies have been developed as biolistic (Gonzalez-Hernandez et al. 1997) or *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation (ATMT) (Nyilasi et al. 2005). Depending on the goals, one can use the self-replicative properties of plasmids transferred in *M. circinelloides* (Papp et al. 2010) or, if required, force transgene integration within the genome using either restricted enzyme-mediated transformation (REMI) (Papp et al. 2013) or ATMT (Nyilasi et al. 2005). Interestingly, homologous recombination is efficient and gene knock-out is feasible using linear-DNA fragments containing a selectable marker gene flanked by DNA sequences up- and down-stream the target locus (Garre et al. 2014). In addition, *M. circinelloides* allows heterologous gene expression (Iturriaga et al. 1992), this species being a natural competent organism.

These available tools and the possibility to knock out genes of interest in *M. circinelloides* allowed making important discoveries in fungal genetics, especially in terms of gene regulation. If *Neurospora crassa* has been proven to be a paradigm for studying the process of blue light regulation, different studies in *M. circinelloides* have also been very informative for fungal geneticists. Due to its dimorphism, this species has been a perfect choice for elucidating, via the use of mutants (Wolff et al. 2002, Lee et al. 2013, 2015), how the transition from unicellular to hyphal growth is driven. Maybe more specific to *M. circinelloides* have been the progress made in understanding how RNA-mediated gene silencing pathway also known as RNA interference (RNAi), a conserved defense mechanism against invasive nucleic acid such as viruses, transposons or transgenes in different eukaryotes including fungi (Buchon and Vaury 2006, Nicolás and Ruiz-Vázquez 2013), may play a role in gene regulation. Indeed, not only the *M. circinelloides* RNAi machinery serves as a defense mechanism but it also plays a relevant role in the regulation of a significant number of endogenous genes (Nicolás et al. 2015, Torres-Martínez and Ruiz-Vázquez 2016).

III. IMPACT OF *MUCOR* ON HUMAN HEALTH

III.1. Brief history

Diseases caused by members of *Mucorales* were first reported in 1885 and named as “Mycosis Mucorina” (Paltauf 1885). As the classification of *Mucor*, and more largely that of fungi have been changing over time, fungal disease names have also evolved. Before 1969, the name “phycomycosis” was proposed by Emmons (Joe et al. 1956) to provide a convenient term for mycoses caused by any one of the several *Phycomycetes* species. Even after the Fungi kingdom was established (Whittaker, 1969) and *Phycomycetes* were reclassified into *Zygomycetes* and other series of new classes (Ainsworth et al., 1971), the name phycomycosis was still employed. However, during the same time, the American pathologist R. D. Baker proposed the name “mucormycosis” to denote a mycosis caused by certain members of *Mucorales* (Baker 1956, 1957). But the medical community did not retain this term, with the exception of the pathologist B. M. Clark (1968). Finally, it was only in 1976 that Ajello and colleagues proposed to replace the name « phycomycosis » by “zygomycosis” to concur with the taxonomic changes. The disease was defined to include any mycosis caused by the species of the *Mucorales* but also *Entomophthorales* orders.

For many years, the term “zygomycosis” has been used in the medical literature. Today with the recent revisions of the *Zygomycota* it seems more accurate to use different names for the diseases. As *Entomophthoromycota* and *Mucoromycotina* are now considered as a phylum and a subphylum *incertae sedis* (i.e., uncertain) respectively (James et al. 2006, White 2006, Hibbett et al. 2007, Humber 2016) it seems preferable to clearly distinguish “entomophthoramycosis” and “mucormycosis” (Moore and Richardson 2014). Moreover, *Entomophthorales* are uncommon pathogens, with infections typically restricted to tropical areas, that produce chronic cutaneous and subcutaneous infections whereas *Mucorales* species are frequent in the tempered areas, causing diseases ranging from cutaneous, rhinocerebral, and sinopulmonary to disseminated and frequently fatal infections (Petrikos et al. 2012). Interestingly, some authors recently suggested the use of the name “mucoralomycosis” instead of “mucormycosis” (Kwon-Chung 2012, Voigt et al. 2013, Muszewska et al. 2014) to reflect that the majority of *Mucoromycotina* pathogens belong to the *Mucorales* order. Although the classification within the *Mucorales* will probably undergo substantial changes (see Part I) leading to changes in the terms used for pathologies the

generic term “mucormycosis” should be currently used to describe infections caused by all these molds (Moore and Richardson 2014). Moreover, with the current and future revisions within the *Mucor* genus, e.g. transfer of some *Rhizomucor* spp. to *Mucor* (Walther et al. 2013), the estimation of *Mucor* spp. incidence in mucormycoses should be reevaluated in the upcoming years.

III.2. Species involved in mucormycosis

Only a few *Mucor* species are currently suspected to cause human diseases (Iwen et al. 2005, Walther et al. 2013). These include thermotolerant species like *M. circinelloides*, *M. indicus*, and *M. ramosissimus*, but also species that either do not grow or grow poorly at 37°C (Ribes et al. 2000, Chayakulkeeree et al. 2006) thus questioning their actual potential to cause human diseases (De Hoog et al. 2000). It is worth noting that there is no direct correlation between thermotolerance and pathogenicity as several thermotolerant or even thermophilic taxa have never been reported to cause infections (Walther et al. 2013). This also raises identification question in zygomycosis cases. According to Iwen (2011), the zygomycetes species identification is generally not performed by clinical laboratories and, when performed, the usual result reported in is a genus-only identification (Skiada et al. 2011).

Additionally, in cases where an isolate has been identified to the species level it is generally done by morphological study only, although morphology alone has been shown to be unreliable for species determination in zygomycetes (Kontoyiannis and Lionakis 2005). Nonetheless, due to the occurrence of species-specific susceptibility profiles, it is obvious that causative agents should be identified to the species level (Vitale et al. 2011). For some years now, the general consensus among clinical mycologists is that fungal species identification should include a combination of morphological and molecular methods (Borman et al. 2008, Balajee et al. 2009a, 2009c). This has been successfully applied to zygomycosis in recent cases studies (Iwen et al. 2011) and should become the general practice. In the literature only three *Mucor* species are frequently cited in mucormycosis cases (i.e. *M. circinelloides*, *M. indicus*, and *M. irregularis*), while other species are occasionally (i.e. *M. hiemalis*, *M. racemosus*, *M. ramosissimus* and *M. pusillus*) or more rarely (i.e. *M. fragilis* and *M. ardhlaengiktus*) cited (**TABLE 1**), but the actual involvement of the latter species in infections is questionable (De Hoog et al. 2000, Walther et al. 2013). Noteworthy,

M. pusillus was recently reassigned to *Rhizomucor pusillus* (Walther et al. 2013) and therefore should not be considered anymore as a *Mucor* species.

TABLE 1. Non exhaustive list of *Mucor* species reported as disease causative agents with associated diseases.

Reported <i>Mucor</i> species ^a	Associated disease	Reference
<i>M. circinelloides</i> f. <i>circinelloides</i> , f. <i>lusitanicus</i> (syn. <i>M. lusitanicus</i> , <i>M. fragilis</i>) f. <i>janssenii</i> (syn. <i>M. velutinosus</i>)	Infection (unspecified site)	Álvarez <i>et al.</i> 2009, 2011; Del Palacio <i>et al.</i> 1999; Dizbay <i>et al.</i> 2009; Fetchick <i>et al.</i> 1986; Li <i>et al.</i> 2011; Yang <i>et al.</i> 2016; Skiada <i>et al.</i> 2011; Sugui <i>et al.</i> 2011
	Cutaneous mucormycosis	Chandra and Woodgyer 2002; Fingerth <i>et al.</i> 1994; Khan <i>et al.</i> 2009; Wang <i>et al.</i> 1990;
<i>M. indicus</i>	Intestinal infection	Koteda <i>et al.</i> 2013; de Repentigny <i>et al.</i> 2008; Zhao <i>et al.</i> 2013
	Cutaneous mucormycosis	Essayag <i>et al.</i> 2001; Luo <i>et al.</i> 2014; Sobel 2001
<i>M. irregularis</i>	Cutaneous and subcutaneous mucormycosis	Hemashettar <i>et al.</i> 2011; Li and De Lun 2012; Lu <i>et al.</i> 2009, 2013; Zhao <i>et al.</i> 2009
<i>M. hiemalis</i>	Cutaneous and subcutaneous mucormycosis	Costa <i>et al.</i> , 1990; Prevoo <i>et al.</i> , 1991
<i>M. racemosus</i>	Cutaneous mucormycosis	Scholer <i>et al.</i> 1983; Wang <i>et al.</i> 2002
<i>M. ramosissimus</i>	Cutaneous mucormycosis	Hesseltine and Ellis 1964; Vignale <i>et al.</i> 1964; Weitzman <i>et al.</i> 1993
	Rhinocerebral mycosis	Bullock <i>et al.</i> 1974
	Septic arthritis	Sharma <i>et al.</i> 1995
<i>M. ardhaengiktus</i> (syn. <i>M. ellipsoidus</i>)	Infection (unspecified site)	Álvarez <i>et al.</i> 2009; 2011

a: species names were given according to Walther *et al.* 2013

Concerning the three main *Mucor* associated with mucormycosis, *M. circinelloides sensu lato* was occasionally reported in human infections (Fetchick *et al.* 1986a, Del Palacio *et al.* 1999, Dizbay *et al.* 2009, Skiada *et al.* 2011) but the incidence of this species in human

infections may be underestimated as in numerous case the identification was limited to the genus. In a molecular identification of 190 clinical isolates morphologically identified as zygomycetes, Alvarez *et al.* (2009) found that 9.5 % of the isolates were *Mucor circinelloides*, placing this species as the third species involved in human mucormycosis (behind *Rhizopus oryzae* and *Rhizopus microsporus*). Another point of concern regarding *M. circinelloides* is that recently *M. circinelloides* f. *circinelloides* has been described as putatively responsible of human illnesses after consumption of mold-contaminated yoghurt (Lee *et al.* 2014) although its involvement was not clearly proven.

Mucor indicus is an emerging cause of intestinal human zygomycosis (de Repentigny *et al.* 2008, Koteda *et al.* 2013, Zhao *et al.* 2013). It was suggested that this species could have an oral route of infection (Aboltins and Pratt 2006, de Repentigny *et al.* 2008). In contrast, some reports consider the fungus as a safe microorganism for human (Millati *et al.* 2005). Some authors suggest that the pathogenicity could be strain-dependent (Karimi and Zamani 2013), but another explanation can once again be the species misidentification.

Among the most characteristic pathogenic Mucorales, *Rhizomucor variabilis* has been moved to the *Mucor* genus and renamed *M. irregularis* on the basis of rDNA ITS phylogeny placing it as a close species of *M. hiemalis* (Voigt *et al.* 1999, Álvarez *et al.* 2011). The *Mucor irregularis* clinical infection pattern deviates considerably from that of other *Mucorales* by being chronic and by occurring in immunocompetent patients without apparent underlying disorder (Lu *et al.* 2009, Hemashettar *et al.* 2011). The infection is cutaneous and subcutaneous without angio-invasion especially at the early stage (Lu *et al.* 2009, Zhao *et al.* 2009), usually the infection persists several years on exposed sites such as the face and the extremities, and finally leads to severe mutilation (Lu *et al.* 2009, Li and De Lun 2012). Between 1991 and 2013, 17 cases have been reported, suggesting that *M. irregularis* is one of the few truly emerging opportunistic fungi (Lu *et al.* 2013).

III.3. *Mucor* interaction with the host

The determinism for virulence in mucormycoses is poorly known and only partial data have been obtained so far. It appears that the vegetative growth form and the spore size have an impact on virulence. For example in *M. circinelloides*, the filamentous form has been proven to more virulent than the yeast form (Lee *et al.* 2013, 2015) and the (-) mating type isolates were shown to produce larger and more virulent spores than (+) mating type isolates (Li *et*

al. 2011). Noteworthy, virulence tests using a murine system, showed that the most virulent strains were the one that did not induce pro-inflammatory cytokines (Lee et al. 2014). From the host side, the reaction relies mainly on the innate immune system, and in particular on phagocytic effector cells, to control infections (Mendoza et al. 2014). Macrophages and neutrophils play an important role in the immune response to mucormycete infection. Using a zebrafish larval model macrophages and neutrophils were shown to be recruited *in vivo* to the site of infection by *M. circinelloides* in intact hosts prior to spore phagocytosis (Voelz et al. 2015). The molecular and cellular nature of the interaction remains however poorly understood. *In vitro* assays using isolated mammalian cells and more promisingly *in vivo* model systems such as the zebrafish larval model developed by Voelz *et al.* (2015) can be used in association with omics studies to identify virulence factors.

III.4. Clinical aspects of mucormycosis

To our best knowledge, there is no study about specific aspects of *Mucor* spp. infections, and it is therefore only possible to describe the clinical aspects of mucormycosis cases due to Mucoralean fungus as a whole. Mucormycosis is a devastating acute invasive fungal infection, but the symptoms of infections by Mucorales remain unspecific for a long time making diagnosis extremely difficult (Lanternier et al. 2012, Hoffmann et al. 2013). Invasive mucormycosis is characterized by the rapid development of tissue necrosis as a result of vascular invasion and subsequent thrombosis (Sun and Singh 2011). The clinical manifestations of mucormycosis ranges from cutaneous, rhinocerebral, sinopulmonary, and gastrointestinal, prone to dissemination and frequently fatal infections (Roden et al. 2005, Petrikkos et al. 2012, Riley et al. 2016), the rhino-orbital-cerebral manifestation being the more frequent (Moore and Richardson 2014) (**TABLE 1**). In the general population, mucormycosis is a very rare disease, classified as a rare infectious disease by Orphanet (<http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/index.php>); however, its prevalence is not known (Muszewska et al. 2014). As reviewed by Mendoza *et al.* (2014) the main host risk factors in mucormycoses are: i) free iron increased availability that occurs for example during diabetic ketoacidosis in the blood (the subsequent acidification process leads to an increase in free iron, an essential factor for *Mucorales*), ii) suppressed immunity leading to impaired macrophage and neutrophil function and iii) breakdown of physical barriers such as the skin.

Indeed, mucormycosis occurs mostly in patients severely immunocompromised (diabetes, hematological malignancy) (Bitar et al. 2009, Pagano et al. 2009) or those who have undergone organ or hematopoietic stem cell transplantation (Almyroudis et al. 2006). Numerous cases have now been recognized as an additional complication of healthcare procedures (Lanternier et al. 2012). However, immunocompetent people can also be infected as several cases of mucormycosis following trauma with contaminated soil have been described (Adam et al. 1994). Numerous cases of cutaneous mucormycosis have been seen after burns or penetrating trauma, including road accidents (Richardson 2009), but also as a consequence of natural disasters like tsunamis (Andresen et al. 2005, Richardson 2009, Fanfair et al. 2012, Slavin and Chakrabarti 2012). Another point of concern about mucormycosis is that gastrointestinal infections could be due to consumption of mold contaminated food, even in an immunocompetent person. This has been suspected with *M. indicus* (Aboltins and Pratt 2006, de Repentigny et al. 2008) and, as stated above, with *M. circinelloides* (Lee et al. 2014).

In the last two decades, the reported number of mucormycosis cases has constantly increased (Mendoza et al. 2014). This is probably due to a permanent worldwide increase of patients with predisposing factors such as immunosuppression, malignancies and diabetes (Roden et al. 2005, Skiada et al. 2011, Petrikos et al. 2012, Walther et al. 2013). But this increase could also be explained by a better diagnostic of mucormycosis due to a rising awareness and an improved identification of Mucorales via molecular methods (Walther et al. 2013). Mucormycosis, although remaining rare, is now considered as an important fungal infection with high associated mortality rates. Indeed, survival rates for mucormycosis are very low overall (53 % depending on the location of the infection) (Skiada et al. 2011, Lanternier et al. 2012). In a large study of more than 900 mucormycosis cases, Roden *et al.* (2005) have shown that a lack of treatment had a fatal outcome, with only 3 % survival. A double treatment consisting of antifungal therapy combined with surgical debridement of the infected tissues was the most successful, leading to the survival of 70 % of patients. In a similar study of 230 cases, Skiada *et al.* (2011) reach to the same conclusion. A real problem of drug treatments against mucormycosis is that Zygomycota are resistant to some classical antifungals (Skiada et al. 2011, Lewis et al. 2012, Muszewska et al. 2014, Riley et al. 2016). The main antifungal drugs belong to five different groups: echinocandins, azoles, polyenes, allylamines, and pyrimidine analogs. Among these drugs amphotericin B (a polyene) was the

most active and posaconazole (an azole) was the second most effective anti-Zygomycota agent (Izquierdo and Castelli 2009, Skiada et al. 2011, Sun and Singh 2011, Vitale et al. 2011, Lewis et al. 2012, Muszewska et al. 2014). But the susceptibility of Mucorales to antifungals varies at the family, genus, and species levels, reflecting the phylogenetic diversity of the Mucorales (Vitale et al. 2011). Another problem is that some classical antifungal drugs like voriconazole (an azole antifungal classically used against aspergillosis or candidosis) were suspected to be risk factors for mucormycosis in several studies (Lamaris et al. 2009, Pongas et al. 2009, Lewis et al. 2011). In fact, *in vitro*, voriconazole lacked of activity against most of Mucorales strains (Izquierdo and Castelli 2009, Vitale et al. 2011). In addition, low-cost prophylactic treatments such as the use of acetic acid, even at concentrations as low as 0.3%, could represent a solution for preventing mucormycoses in high-risk patients (e.g. severely injured patients) in remote areas (Trzaska et al. 2015).

In all cases an early, and reliable, diagnosis is the key factor for a successful outcome (Roden et al. 2005, Walsh and Gamaletsou 2012, Moore and Richardson 2014), so there is a pressing need for a rapid and effective method of Mucorales identification at the species level (Vitale et al. 2011). Mucormycosis diagnosis relies on clinical findings, risk factor analysis, histopathology and culture samples inspection (Moore and Richardson 2014, Muszewska et al. 2014). However, conventional diagnosis is difficult because symptoms remain unspecific for a long time, and vary with the form (rhinocerebral, pulmonary, gastrointestinal etc.) and stage of the infection (Hoffmann et al. 2013, Dolatabadi et al. 2014, Muszewska et al. 2014). For some years the general consensus among clinical mycologists is that fungal species identification should include a combination of morphological and molecular testing methods (Borman et al. 2008, Balajee et al. 2009b, 2009d). The development of molecular assays for the diagnosis of zygomycosis has been in progress for some years (Dolatabadi *et al.*, 2014 ; Muszewska *et al.*, 2014; Bernal-Martínez *et al.*, 2013 ; Millon *et al.*, 2013; Walsh *et al.*, 2012; Iwen *et al.*, 2011 ; Zhao *et al.*, 2011, Yang, 2015, Yang et al., 2016). New assay development should also include rapid, sensitive and cost-effective methods that are easy to use in a clinical context such as matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) that has been widely used for microorganism identification including some Mucorales (Schrödl et al. 2011, De Carolis et al. 2012).

Improving taxonomy within the Mucorales is an urgent prerequisite to the development of efficient identification assays yielding to efficient diagnostics. Beyond this identification

aspect, it is worth noting that knowledge regarding the *Mucor*-host interaction is poor. There is only few data regarding the genetic and immunological background of the *Mucor* pathogenicity, regarding its virulence mechanisms while such a knowledge is essential to the development of drugs to cure mucormycosis. Future research must take advantage of all the tools developed in the *M. circinelloides* model species to contribute to fill this knowledge gap.

IV. POTENTIAL OF *MUCOR* IN BIOTECHNOLOGY

The combination of high growth rates observed in *Mucor* spp. in a large range of temperatures (Morin-Sardin et al. 2016), thermophilic capacity of several species, existence in certain *Mucor* spp. of a yeast state (Orlowski 1991) and high proteolytic and lipolytic enzymatic activities (Ma et al. 2011) makes them a good option for biotechnologists. It is especially the case for *M. circinelloides* which cumulates all these assets and is readily transformable (see Garre et al. 2014), offering opportunities for genetic engineering but other *Mucor* species have been also widely use in production of metabolites of interest or biotransformations (i.e. using the metabolic activity of organisms to modify the structure of bioactive substrates).

IV.1. Enzyme production

Alves *et al.* (2002) highlighted *Mucor*'s potential for enzyme production. Polygalacturonases, amylases, proteases and lipases were shown to be produced in significant quantities by the majority of 26 strains pertaining to 6 different species (*M. circinelloides*, *M. hiemalis*, *M. genevensis*, *M. piriformis*, *M. racemosus* and *M. variosporus*). *M. circinelloides* was found to be a good producer of cellulases, xylanases and polygalacturonases (Thakur et al. 2010, Lee et al. 2011). Among the different produced enzymes, *Mucor* proteinases are among the most exploited in the industry. Wang (1967) demonstrated the potential of *M. hiemalis* to produce aspartic proteinases, an interesting substitute for the bovine-derived milk coagulant chymosin. Since then, a large number of other *Mucor* species have been described as aspartic proteinases producers such as *M. racemosus*, *M. fragilis*, *M. mucedo*, *M. spinosus*, *M. bacilliformis* or *M. circinelloides* (Fraile et al. 1978, Alves et al. 2002). Industrial use of this

potential was developed through the design of adapted cultivation by submerged or solid substrate fermentation systems associated with efficient recovery and purification methods (Lahore and Auday 1999, Kumar and Bhalla 2005, Sathya et al. 2009, Yegin et al. 2011). Integration and expression of *Mucor* genes encoding aspartic proteinases in bacteria, easy to multiply in large quantities in fermenters, represents a way forward to increase the use of these enzymes (Gama Salgado et al. 2013) which have many other applications than milk clotting in the dairy industry, like fruit juice clarification (Sumantha et al. 2006) or meat tenderization (Bekhit et al. 2013).

IV.2. Biofuel production

Biodiesel represents an interesting source of renewable energy with enhanced biodegradation, reduced toxicity and lower emission profile (Fukuda et al. 2001, Yousef et al. 2005). In this context, *M. circinelloides* was successfully tested for its ability to form structures capturing microalgae used to generate biofuel products from wastewater (Zhou et al. 2010, Zhang and Hu 2012, Gultom and Hu 2013, Li et al. 2014). This strategy of fungal-assisted algal flocculation represents an innovative and economically viable approach to improve the harvest of microalgae cells. In addition to this crop facilitator role, some *Mucor* spp. can be more directly involved in the production of biodiesel, acting through their biological activities. Actually, some *M. circinelloides* strains can be considered as oleaginous fungi (as their storage lipid content, under the form of triacylglycerols, may constitute more than 20% of their dry biomass) (Tang et al. 2015), and are therefore of interest for functional oil and feedstock for biodiesel production through oil transesterifications (Huang et al. 2013). Oleaginous microorganisms start to accumulate polyunsaturated fatty acids when grown in a medium with carbon excess and a depletion of other nutrients (Voigt et al. 2016). The glycolytic pathway, pentose phosphate pathway, as a provider of NADPH, malic enzyme, and ATP:citrate lyase (Tang et al. 2016) as well as the malate transporter (Zhao et al. 2016) were shown to play important roles in lipid accumulation in *M. circinelloides*. This species was also shown to be an interesting producer of γ -linoleic acid rich oil and saponifiable matter which can be directly transformed by transesterification in highly pure fatty acid methyl esters (FAMES) which are the main constituent molecules of biodiesel (Vicente et al. 2009, Huang et al. 2013, Carvalho et al. 2015, Tang et al. 2015, 2016, Zhao et al. 2016). Optimizations are still needed to validate the process at an industrial scale, but the first

results obtained suggest that it is technically and economically feasible. Noteworthy extracellular lipases (EC 3.1.1.3) produced by *M. circinelloides* were also efficiently used as biocatalysers for the alcoholysis from sunflower, mango, soybean, rapeseed, babassu or tallow oils to biodiesel (Nelson et al. 1996, Al-Zuhair et al. 2006, Andrade et al. 2014).

IV.3. Terpenoid production and biotransformation

Terpenoids are natural products resulting from the combination of several isoprene units. They are extensively used in the industry for several applications like pharmaceuticals, flavors, fragrances, pesticides, disinfectants (Bohlmann and Keeling 2008, Oliveira Silva et al. 2013).

Among terpenoids, carotenoid pigments have antioxidant and various protective properties (Bhosale and Bernstein 2005, Avalos and Limón 2015), and are therefore frequently used as ingredients in different pharmaceutical, cosmetic and food products (Palozza and Krinsky 1992, Bhosale and Bernstein 2005). The hydroxylated derivatives of β -carotene (xanthophylls) as well as the ketolated derivatives of β -carotene (*e.g.* canthaxanthin) having among the strongest antioxidant activities and also offer various beneficial effects on human and animal health (Csernetics et al. 2015). Although the major part of carotenoid production is chemically synthesized, there is an increasing interest for microorganism-driven carotenoid industrial production with the use, for example, of *Blakesleanus trispora* (Mucoromycota) (Csernetics et al. 2015). The latter microorganism lacks however a transformation system necessary for genetic engineering. In this context, and given the knowledge regarding carotenoid production in *Mucor circinelloides*, this species constitutes a candidate of interest for carotenoid production. This is particularly true since recent studies prove that xanthophyll accumulation can be increased by genetic transformation of *M. circinelloides* (Csernetics et al. 2015).

Terpenoid biotransformation by *Mucor* spp. to obtain products with more active or new properties has also been widely investigated. Various species, such as *M. mucedo*, *M. piriformis* or *M. plumbeus* have been used for monoterpenoids, diterpenoids and sesquiterpenoids biotransformation in order to enhance their biological activity or to synthesize intermediate molecules in the preparation of more complex molecules (for a comprehensive review, see (de Oliveira Silva et al. 2013). Among the most recent studies, *M. spinosus* was shown to display a potential for production of metabolites exhibiting enhanced

cytotoxic effects on human leukemia cells and improved bioavailability from 20(S)-protopanaxatriol, a molecule belonging to the ginsenosides components isolated from *Panax ginseng* (Yin Tian et al. 2005, Zhang et al. 2007), but also for generating efficient diterpenoid derivatives from neoandrographolide, a lactone known as anti-inflammatory, anti-viral and antipyretic drug (Wang et al. 2011). Capacities of *M. racemosus* to transform 20(S)-protopanaxatriol in hydroxylated and hydroxperoxylated metabolites with enhanced cytotoxic activities against human prostate cancer cells were also reported (Chen et al. 2013).

IV.4. Other applications

Different *Mucor* strains have been used in steroid biotransformations. Steroids which are widely distributed and correspond to vital compounds (Bhatti and Khera 2012) are used in pharmaceutical compounds. Biotransformations of steroids by *Mucor* species (e.g. *M. circinelloides*, *M. griseocyanus*, *M. hiemalis*, *M. parasiticus*, *M. piriformis*, *M. plumbeus*, *M. racemosus*, *M. spinosus* or *M. subtilissimus*) were mainly used for steroid hormones and drugs production (for a review, see: (Silva et al. 2014). The first commercialized process corresponded to the production of 11 alpha-hydroxy-progesterone, an antiandrogenic and blood-pressure-regulator molecule and used *M. racemosus* mutants (Hamdi et al. 1999, Minofy et al. 1999, Khattab and Abd-El Salam 2012). *Mucor* strains have also been used for the biotransformation of flavonoids and coumarins, mainly in order to identify new active molecules for the pharmaceutical industry or to modify some active components to improve their activity (Silva et al. 2014), of alkaloids (Hüttel and Hoffmeister 2011) and other compounds including aromatic compounds (Hüttel and Hoffmeister 2011).

In other contexts, a recent study reported that an endophyte *M. fragilis* strain, found on *Podophyllum spp.* (Berberidaceae), was able to synthesize directly and with a high yield podophyllotoxin and kaempferol, two pharmaceutically important bioactive compounds used as anticancer and antiviral drugs which are generally extracted from its host plant (Huang et al. 2014). *M. plumbeus* was shown to efficiently degrade pentachlorophenol, a worldwide used insecticide and herbicide (Carvalho et al. 2011), which is interesting for phytoremediation of heavy metal contaminated soils (Deng et al. 2011, 2013). Similarly, *M. circinelloides* was used for the inhibition of *Listeria monocytogenes* and for the coating of

fruits to inhibit the postharvest action of the pathogenic fungus *Aspergillus flavus* (Silva et al. 2014, de Souza et al. 2015).

V. *MUCOR* IN THE FOOD INDUSTRY

Besides their role in the industry as biotransformants or as various metabolite producers, *Mucor* are important actors in the food industry. In this context, once again *Mucor* spp. exhibit an ambivalent behavior as they can sometimes have a negative impact (spoiling agent) and sometimes be essential to obtain the looked for qualities of a final product (adjunct technological organism), especially in cheeses (Hermet et al. 2012, 2014) and traditional Asian and African food (Hesseltine 1983, Nout and Aidoo 2002).

In foodstuffs, *Mucor* contamination can occur at any step of the food chain, from the first stages of raw material production to their transformation into processed products, but also during their transport or storage. These events can result in food spoilage, i.e. defects inducing a significant modification in the appearance, smell or taste of a food that makes it unacceptable to the consumer and consequently unmarketable. While, in food products, an emphasis is often done on pathogenic organisms, microbial spoilage leads to larger economic losses and food waste. Highly disseminated via their spores, *Mucor* spp. can be found in a large variety of raw materials and processed food (TABLE 2) with undesirable effects including rots and decomposition (Snowdon 1990), off-flavours (Foschino and Garzaroli 1993, Bärtschi and Berthier 1994), anomalous textures (Montagna et al. 2004, Lugauskas et al. 2005) or discolorations (Hayaloglu and Kirbag 2007, Sengun et al. 2008, Wu et al. 2015).

However, some *Mucor* species also present a technological interest, highly contributing to the texture, flavor and nutritional characteristics of many fermented products (Huang and Dooley 1976, Hesseltine 1983, Fox and McSweeney 2004, Han et al. 2004, Hayaloglu and Kirbag 2007, Zhang and Zhao 2010, Hermet et al. 2012). These traits are associated with the enzymatic potential of *Mucor* spp. especially through the secretion of lipolytic and proteolytic enzymes (Zhang and Zhao 2010, Yegin et al. 2011). In this context, *Mucor* species are used as starters in food fermentations, especially for traditional Asian and African foods such as sufufu, ragi, tempeh, furu and mureha (Hesseltine 1983, Nout and Aidoo 2002, Han et

al. 2004). In cheeses, *Mucor* is one of the most commonly encountered fungus. It was reported in 27% of a variety of 52 commercial Spanish cheeses including fresh, semi-ripened and ripened cheeses made from different types of milk (cow, ewe, goat and mixed) (Barrios et al. 1998) and 4.2% of 122 goat and cheese cheeses from southern Italy (Montagna et al. 2004) although it seems more prominent in pressed uncooked cheeses (Hermet et al. 2014).

TABLE 2. Non exhaustive list of raw materials and food substrates on which *Mucor* contaminations have been described.

Raw material / foodstuff	Reported <i>Mucor</i> species	Reference
fruits		
berries: raspberries, strawberries and loganberries	<i>M. piriformis</i>	Snowdon, 1990; Tournas and Katsoudas, 2005
solanaceous fruits: tomato, capsicum, eggplant	<i>M. hiemalis</i> , <i>M. mucedo</i>	Sonoda <i>et al.</i> , 1981; Reyes, 1990
pome fruits: apples and pears	<i>M. piriformis</i>	Caccioni and Guizzardi 1992
stone fruits: peaches, plums, apricots, nectarines and cherries	<i>M. racemosus</i> , <i>M. plumbeus</i> , <i>M. piriformis</i>	Caccioni and Guizzardi 1992; Michailides, 1991; Sholberg, 1990; Borve and Vangdal, 2007
melons and other cucurbits: cucumber	<i>M. mucedo</i>	Reyes, 1990
grapes: raisins	<i>M. racemosus</i>	Youssef <i>et al.</i> , 2000
citrus fruits: citrus	<i>M. racemosus</i>	Chupp and Sherf, 1960
tropical fruits: gauvas	<i>M. hiemalis</i>	Ito <i>et al.</i> , 1979
chestnuts	<i>M. hiemalis</i>	Jermini <i>et al.</i> , 2006
vegetables		
onions	<i>M. alboater</i> , <i>M. hiemalis</i> , <i>M. murorum</i>	Lugauskas <i>et al.</i> , 2005
potatoes, sweet potatoes	<i>M. racemosus</i>	Chupp and Sherf, 1960
roots and tubers: carrots	<i>M. silvaticus</i> , <i>M. hiemalis</i> , <i>M. mucedo</i> , <i>M. murorum</i>	Lugauskas <i>et al.</i> , 2005
yams	<i>M. circinelloides</i> , <i>M. piriformis</i>	Pitt and Hocking, 2009a; Amusa and Baiyewu, 1999; Iwama, 2006
cabbages	<i>M. hiemalis</i>	Lugauskas <i>et al.</i> , 2005
meat		
beef	<i>M. mucedo</i>	Campano <i>et al.</i> , 1985
cereals, nuts and oilseeds		
mung beans, soybeans, cocoa beans	<i>M. circinelloides</i> , <i>M. hiemalis</i> <i>M. racemosus</i>	Pitt <i>et al.</i> , 1993 ; 1994; Pitt and Hocking, 2009a
maize, barley	<i>M. circinelloides</i> , <i>M. hiemalis</i> <i>M. racemosus</i>	Pitt <i>et al.</i> , 1993 ; 1994; Pitt and Hocking, 2009a
hazelnuts, walnuts,	<i>M. circinelloides</i> , <i>M. hiemalis</i> ,	Pitt <i>et al.</i> , 1993 ; 1994; Pitt and Hocking, 2009a

cassava and yam chips	<i>M. racemosus</i> <i>M. piriformis</i>	Gnonlonfin <i>et al.</i> , 2008
processed foodstuff / drinks		
flour	<i>Mucor spp.</i>	Pitt and Hocking, 2009a
bakery product	<i>Mucor spp.</i>	Pitt and Hocking, 2009a
salami	<i>M. racemosus</i>	Cantoni <i>et al.</i> , 2007
frozen and processed meats	<i>M. racemosus</i>	Pitt and Hocking, 1997
beer	<i>Mucor spp.</i>	Orlowski, 1991
apple juice	<i>M. plumbeus</i>	Taniwaki <i>et al.</i> , 2001
dairy products		
cheese	<i>M. racemosus</i> , <i>M. circinelloides</i> , <i>M. plumbeus</i> , <i>M. hiemalis</i> , <i>M. globosus</i> , <i>M. fuscus</i> , <i>M. mucedo</i>	Brenet <i>et al.</i> , 1972; Kivanç, 1992; Bärtschi <i>et al.</i> , 1994; Le Bars-Bailly <i>et al.</i> , 1999; Zeller, 2005
yoghurt	<i>M. hiemalis</i> <i>M. racemosus</i> <i>M. circinelloides</i>	Foschino <i>et al.</i> , 1993 Lee <i>et al.</i> , 2014

V.1. Involvement in cheese production and cheese spoilage

V.1.1. From Saint nectaire to the “cat-hair” defect

Cheese is another good example of the dichotomy of *Mucor* impact as members of this genus can be either contaminant or of technological interest. *Mucor* spp. are part of the normal microbiota of Saint-Nectaire cheese and Tomme de Savoie (Marcellino and Benson 1992, Michel *et al.* 2001). The main *Mucor* species encountered in cheeses are *M. circinelloides*, *M. fuscus*, *M. lanceolatus*, *M. plumbeus* and *M. racemosus* (Hermet *et al.* 2012, Marín *et al.* 2014). *M. fuscus* and *M. lanceolatus* are particularly prominent in dairy products where they play a crucial technological role (Hermet *et al.* 2012, Desmasures 2014, Hermet *et al.* 2014). Interestingly, a recent study showed that strains pertaining to *M. fuscus* and *M. lanceolatus* had a preferential growth behavior on Tomme compared to other cheese types (goat cheese or cheese mimicking medium) or synthetic media (Morin-Sardin *et al.* 2016), suggesting a potential adaptation of these technological species to this specific habitat.

In one hand some *Mucor* species play an important technological role in the cheese industry in the other hand, *Mucor* contamination is frequently observed on a large variety of soft cheeses such as Brie or Camembert but was also reported on several semi hard or hard cheeses like Saint-Maure, Reblochon, Kufllu, Kashar (Brenet *et al.* 1972a, Zeller 1980, Kivanç

1992b, Bärtschi et al. 1994). The most frequent physical defect associated with *Mucor* contamination consists in the occurrence of fluffy white tufts on the cheese surface which is commonly called "Cat hair" defect. This phenomenon, often sudden and invasive, generally begins two to five days after cheese fabrication with the apparition of blackish clumps of mould (Brenet et al. 1972a). This defect usually persists for a few days, affecting a limited number of cheese (Le Bars Bailly et al. 1999), but can also evolve in an acute form where whole batches are flooded with greyish to blackish tufts giving a bleak visual appearance, a musty kind of smell and altered taste. Contamination seems to occur preferentially during moulding, brining or on the first days of ripening (Le Bars Bailly et al. 1999). Growth in anaerobic conditions in the interior of the curd is possible through a β -galactosidase activity which allow the fungus to use lactose from the whey giving to it a significant competitive advantage. On the surface, *Mucor* spp. often show high development capacities compared to technological fungi of interest like *Penicillium* species (Le Bars Bailly et al. 1999). Main sources of contamination are contaminated liquids (milk, washing water, brine) and surfaces (floors, walls, ceilings); utensils and accessories, particularly trays on which cheeses are stored that are traditionally made of wood; and staff. Confined and water-saturated environment of artisanal or industrial production sites are very suitable for dissemination of multispored sporangia (Brenet et al. 1972a). Tormo and Barral (2004) proposed a method for determining the origin of contamination based on the time of appearance of *Mucor* on the surface of cheeses: early onset (1 to 2 days after the curd) preferentially indicates a milk contamination whereas a latter appearance (3 to 4 days after draining) is associated with curd, cheese forms and utensils contamination while side contamination strongly suggests an airborne contamination. *M. racemosus* and *M. circinelloides* are among the most common cheese contaminants but other *Mucor* species like *M. plumbeus*, *M. hiemalis*, *M. globosus*, *M. fuscus*, and *M. mucedo* were also reported (Le Bars Bailly et al. 1999).

A better understanding of *Mucor* and their specific features will enhance the technological potential of interesting strains and the control of contaminant ones. Based on comparative physiological studies between technological and contaminant strains, a first dedicated growth predictive model was recently developed and could optimize the use of *Mucor* spp. in cheese production (Morin-Sardin et al. 2016).

V.1.2. Ways to prevent and control spoilage

Establishment of prevention measures based on Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP) method is essential in artisanal or industrial sites to avoid or limit contamination. Critical points for mould contamination in each step from the milking to the marketing of cheeses must be identified (Kure et al. 2004) and adapted control measures must be set up. Studies on production sites particularly highlighted the crucial importance of air quality (Kure et al. 2004) and of an accurate control of the technological process (milk composition, time of coagulation, temperature, water activity, pH, NaCl rate ...) (Bekada *et al.*, 2004). Once contamination has occurred, the strategy mainly consists to reduce the spread and the number of spores by eliminating all infested cheeses and by implementing all the control levers (air extraction, washing and disinfection, adjustment of abiotic factors...). Several technological solutions like acidification of the curd (Brenet et al. 1972a), modified atmospheres (20–40% CO₂ and 1–5% O₂; (Taniwaki et al. 2001), ethanol (Dantigny et al. 2005), ammonium and UV light treatments (Tormo et Barral, 2004) were also reported to control spoilage associated to *Mucor*. Competitive inhibition strategies based on the use of *Geotrichum candidum*, *Aspergillus* and *Penicillium* species, *Lactobacillus coryniformis* or *Brevibacterium linens* and Lactic Acid Bacteria producing antifungal molecules appear to be other interesting ways (Le Bars Bailly et al. 1999, Schnürer and Magnusson 2005, Cholet 2006, Delavenne et al. 2012).

V.2. Involvement of *Mucor* spp. in production of other fermented food products

Mucor spp. can be associated with a variety of other food products. Concerning foodstuff based on raw product of animal origin, beyond dairy product, one can cite their involvement in fermented sausages. Indeed, occurrence of *M. racemosus* and *M. hiemalis* was reported on the surface of Argentinian sausages that were produced without starters (Canel et al. 2013). *Mucor* spp. were also found in Southern countries of Europe, in Greek (Papagianni et al. 2007) and Italian (Cocolin et al. 2006) traditional sausages. The possible use of *M. racemosus* as ripening agent was also evaluated on Spanish salsichon and led to a significant sensory properties improvement (Bruna et al. 2000).

Concerning product of vegetal origin, *Mucor* spp. are associated with a variety of products (Tamang) The first foodstuff group corresponds to soybean-derived products, namely the Chinese Douchi and Sufu, and the Korean Doenjang. For Douchi, a salt-fermented product

consumed directly as a soup or used as a flavoring agent, boiled soybeans are inoculated with either *Mucor* or *Aspergillus oryzae* spores. *Mucor*-type douchi is fermented for 10–12 months at about 20°C (Kang, 2001). Concerning Sufu (also known as Furu), a spreadable cheese-like product, *M. circinelloides*, *M. hiemalis* and *M. racemosus* were recently identified in mould starter cultures inoculated on tofu curd dices, resulting after 2 to 7 days at 12–30 °C in mycelium-covered pieces called ‘pehtze’ (Han et al. 2004). For Doenjang, *M. plumbeus* was identified in the complex microbiota, consisting of lactic acid bacteria and fungi, allowing for the production of this paste used as a condiment (Kim et al. 2009, Jung et al. 2014). *M. indicus* is part of a complex microbial mixture that converts soybeans into tempeh (Samson et al. 1987).

The second food related product group of vegetal origin corresponds to ethnic amylolytic mixed starters based on cereals (mainly rice) supplemented with various ingredients. These products, are not consumed directly but used for the production of alcoholic beverages (Tamang). Production of these starters correspond to backslopping, i.e. recycling part of an old batch for production of a new one. Marcha is a mixed dough inocula prepared for the production of alcoholic beverages in the Himalayan regions (Tamang). Several studies reported the presence of various *Mucor* species in Marcha or its fermented products (Tamang and Sarkar 1995, Lv et al. 2015, Thakur et al. 2015). After adjunction of the inocula, *Mucor* spp., along with other microorganisms, contribute to the saccharification and liquefaction of rice, allowing for alcohol production and typical aroma formation. Dominance of *Mucor* spp. among moulds was also reported in Ragi, an amylolytic starter from Indonesia, and its fermented products (Hesseltine 1992, Karimi and Zamani 2013). *Mucor* spp., including *M. circinelloides*, were also described among the complex microbiota of Philippian Bubod (Kozaki and Uchimura 1990) and Thai Loog-pang (Limtong et al. 2005) or Vietnamese Banh men (Lee and Fujio 1999).

Concerning African foods, while the *Mucor* genus is indicated to be widely used for fermented products (Botha and Botes 2014), actually information on *Mucor* spp. occurrence, frequency and role is seldom. Species of *Mucor* were reported in African salad (Abacha), a traditional delicacy from Nigeria (Oranusi et al. 2013), while the actual impact of these isolates in this food is not known. Also in Nigeria, Fapohunda and Ogundero (1990) reported the presence of *M. hiemalis* in wheat base fast foods and *M. racemosus* was identified on smoked-dried fish (Ikutegbe and Sikoki 2014).

Noteworthy, some of these products, especially the ethnic ones, would clearly benefit of the use of metagenomics or the latest identification methods to better evaluate the occurrence of *Mucor* spp. and the nature of the involved species. Finally, as stated before, *Mucor* spp. don't only have a positive impact on food but can also be found in unspoiled foods or can be spoiling agents. In this context, *Mucor* spp. have been shown to spoil various food. According to Pitt and Hocking (2009a), while at least 20 *Mucor* spoiling species have been described, the main species, namely, *M. circinelloides*, *M. hiemalis*, *M. pririiformis*, *M. plumbeus* and *M. racemosus* are associated with products of animal (dairy products, cheese, meat including processed or frozen products, smoked-dried fish) or vegetal origin (e.g. fruits-even cold stored-, nuts, beans, cereals, cacao and chocolate).

VI. CONCLUSIONS

The ubiquitous *Mucor* species have increasing negative and positive impacts on society. On the one hand the increasing number of mucormycoses due to *Mucor* as well as their high potential for food contamination constitute threats. The lack of knowledge regarding their taxonomy as well as their metabolic production sometimes precludes good diagnostics and risk evaluations. On the second hand, *Mucor* species can be more and more considered as allies: in addition to their potential for fermented food production and given their growth capacity, their metabolite productions, the existence of transformation protocols, they constitute promising organisms for biosynthesis and biotransformations usable for drug or energy production. However, much work is needed in order to improve their current taxonomy and unravel their metabolism and potentialities. Available genome sequences and efficient genetic tools will benefit the scientific community to achieve these tasks.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Franck Deniel and Christelle Donot for excellent technical assistance. We also thank Grit Walther, Joey Spatafora and Jason Stajich for sharing information.

REFERENCES

- Aboltins CA, Pratt W. 2006. Fungemia secondary to gastrointestinal *Mucor indicus* infection. *Clinical Infection. Clin Infect Dis.* 42:154–155. doi:10.1086/498751.
- Adam RD, Hunter G, DiTomasso J. 1994. Mucormycosis: emerging prominence of cutaneous infections. *Clin Infect Dis.* 19: 67–76. doi:10.1093/clinids/19.1.67.
- Ainsworth GC. 1965. Historical introduction to mycology. In: Ainsworth GC, Sussman S, eds. *The fungi*. Vol. I. Academic Press, New York.
- Ainsworth GC, James PW, Hawksworth DL. 1971. *Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, UK, 245 p.
- Ajello L, Dean DF, Irwin RS. 1976. The zygomycete *Saksenaea vasiformis* as a pathogen of humans with a critical review of the etiology of zygomycosis. *Mycologia.* 52-62. doi:10.2307/3758897.
- Al-Zuhair S, Jayaraman KV, Krishnan S, Chan W-H. 2006. The effect of fatty acid concentration and water content on the production of biodiesel by lipase. *Biochem Eng J.* 30:212–217. doi:10.1016/j.bej.2006.04.007.
- Almyroudis NG, Sutton DA, Linden P. 2006. Zygomycosis in solid organ transplant recipients in a tertiary transplant center and review of the literature. *Am J Transplant.* 6: 2365–2374. doi:10.1111/j.1600-6143.2006.01496.x.
- Alvarez E, Sutton DA, Cano J, Fothergill AW, Stchigel A, Rinaldi MG, Guarro J. 2009. Spectrum of zygomycete species identified in clinically significant specimens in the United States. *J Clin Microbiol.* 47:1650–1656. doi:10.1128/JCM.00036-09.
- Alvarez E, Cano J, Stchigel AM, Sutton DA, Fothergill A, Salas V, Rinaldi MG, Guarro J. 2011. Two new species of *Mucor* from clinical samples. *Med Mycol* 49:62–72. doi:10.3109/13693786.2010.499521.
- Alves MH, Campos-Takaki GM, Porto ALF, Milanez AI. 2002. Screening of *Mucor* spp. for the production of amylase, lipase, polygalacturonase and protease. *Braz J Microbiol.* 33:325–330. doi:10.1590/S1517-83822002000400009.
- Amusa NA, Baiyewu RA. 1999. Storage and market disease of yam tubers in southwestern Nigeria. *Ogun J Agric Res (Nig).* 11:211–225.
- Andrade GSS, Carvalho AKF, Romero CM, Oliveira PC, de Castro HF. 2014. *Mucor circinelloides* whole-cells as a biocatalyst for the production of ethyl esters based on babassu oil. *Bioprocess Biosyst Eng.* 37:2539–2548. doi:10.1007/s00449-014-1231-4
- Andresen D, Donaldson A, Choo L, Knox A. 2005. Multifocal cutaneous mucormycosis complicating polymicrobial wound infections in a tsunami survivor from Sri Lanka. *The Lancet.* 65:876–878. doi:10.1016/S0140-6736(05)71046-1.
- Andrews JH. 1992. Fungal life-history strategies. In: Carroll GC, Wicklow DT eds. *The Fungal Community*. 2nd ed. New York: Dekker.
- Avalos J, Limón MC. 2015. Biological roles of fungal carotenoids. *Curr Genet.* 61:309–324. doi:10.1007/s00294-014-0454-x.
- Baker RD. 1956. Pulmonary mucormycosis. *Am J of Pathol.* 32:287–313. doi:10.1016/0003-4975(94)90243-7.

Baker RD. 1957. Mucormycosis—a new disease? *Jama.* 163:805–808. doi:10.1001/jama.1957.02970450007003.

Balajee SA, Borman AM, Brandt ME, Cano J, Cuenca-Estrella M, Dannaoui E, Guarro J, Haase G, Kibbler CC, Meyer W, O'Donnell K, Petti CA, Rodriguez-Tudela JL, Sutton D, Velegraki A, Wickes BL. 2009a. Sequence-based identification of *Aspergillus*, *Fusarium*, and mucorales species in the clinical mycology laboratory: where are we and where should we go from here? *J Clin Microbiol.* 47:877–884. doi:10.1128/JCM.01685-08.

Balajee SA, Sigler L, Brandt DME. 2009c. DNA and the classical way: Identification of medically important molds in the 21st century. *Med Mycol.* 45:475–490. doi:10.1080/13693780701449425.

Barrios MJ, Medina LM, Lopez MC. 1998. Fungal biota isolated from Spanish cheeses. *J Food Safety.* 18: 151–157. doi:10.1111/j.1745-4565.1998.tb00210.x.

Bartnicki-Garcia S. 1963. III. Mold-yeast dimorphism of *Mucor*. *Bacteriol Rev.* 27, 293 p.

Bärtschi C, Berthier J, Valla G. 1994. Evolution of surface fungal flora of Reblochon cheese [diagnosis, Api system]. *Lait (France).*

Bekada AMA., Benakriche B, Hamadi K, Bensoltane A. 2008. Modelling of effects of water activity, pH and temperature on the growth rate of *Mucor racemosus* isolated from soft Camembert cheese. *World J Agr Sci.* 4:790-794.

Bekhit AA, Hopkins DL, Geesink G, Bekhit AA, Franks P. 2013. Exogenous Proteases for Meat Tenderization. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 54:1012–1031. doi:10.1080/10408398.2011.623247.

Bernal-Martínez L, Buitrago MJ, Castelli MV, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. 2013. Development of a single tube multiplex real-time PCR to detect the most clinically relevant Mucormycetes species. *Clin Microbiol Infect.* 19, E1-E7. doi:10.1111/j.1469-0691.2012.03976.x.

Bessey EA. 1951. Morphology and Taxonomy of Fungi. *Soil Science.* 71(1), 79 p.

Bhatti HN, Khera RA. 2012. Biological transformations of steroidal compounds: A review. *Steroids.* 77:1267–1290. doi:10.1016/j.steroids.2012.07.018.

Bhosale P, Bernstein PS. 2005. Microbial xanthophylls. *Appl Microbiol Biotechnol.* 68:445–455. doi:10.1007/s00253-005-0032-8.

Bisby GR. 1945. An introduction to the taxonomy and nomenclature of fungi 2nd ed., Butler and Tanner Ltd. Great Britain.

Bitar D, Van Cauteren D, Lanternier F, Dannaoui E. 2009. Increasing incidence of zygomycosis (mucormycosis), France, 1997–2006. *Emerg Infect Dis.* 15: 1395–1401.

Bohlmann J, Keeling CI. 2008. Terpenoid biomaterials. *Plant J.* 54:656–669. doi:10.1111/j.1365-313X.2008.03449.x.

Borman AM, Linton CJ, Miles SJ. 2008. Molecular identification of pathogenic fungi. *J Antimicrobiol Chem.* 61:i7–i12. doi:10.1093/jac/dkm425.

Botha A, Botes A. 2014. *Mucor*. In: Batt C, Tortorello ML, eds. *Encyclopedia of Food Microbiology.* Academic Press, New York:834–840.

Brenet M, Centeleghe JL, Milliere JB, Ramet JP, Weber F. 1972b. Etude d'un accident en fromagerie de type. *Lait.* 52:141–148.

Bruna JM, Fernández M, Hierro EM, Ordontez JA, Hoz L. 2000. Improvement of the Sensory Properties of

Dry Fermented Sausages by the Superficial Inoculation and/or the Addition of Intracellular Extracts of *Mucor racemosus*. J Food Sci. 65:731–738. doi:10.1111/j.1365-2621.2000.tb16081.x.

Buchon N, Vaury C. 2006. RNAi: a defensive RNA-silencing against viruses and transposable elements. Heredity. 96:195–202. doi:10.1038/sj.hdy.6800789.

Budziszewska J, Piatkowska J, Wrzosek M. 2010. Taxonomic position of *Mucor hiemalis* f. luteus. Mycotaxon. 111:75–85. doi:10.5248/111.75.

Bullock JD, Jampol LM, Fezza AJ. 1974. Two cases of orbital phycomycosis with recovery. Am J Ophthalmol. 78:811–815.

Børve J, Vangdal E. 2004. Fungal pathogens causing fruit decay on plum (*Prunus domestica* L.) in Norway. VIII International Symposium on Plum and Prune Genetics, Breeding and Pomology 734.

Caccioni D, Guizzardi MCSDPPLCELTD(BI. 1992. *Mucor piriformis* Fischer on cold stored apples and pears. Informatore Fitopatologico (Italy).

Campano SG, Kotula AW, Kinsman DM. 1985. Antibacterial nature of molds isolated from aged beef. J Food Protect. 48:699–701.

Canel RS, Wagner JR, Stenglein SA, Ludemann V. 2013. Indigenous filamentous fungi on the surface of Argentinean dry fermented sausages produced in Colonia Caroya (Córdoba). Int J Food Microbiol. 164:81–86. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2013.03.022.

Carlile MJ. 1995. The Success of the Hypha and Mycelium. In: Gow NAR, Gadd GM, eds. Chapman and Hall, New York:3–19.

Carvalho M, Tavares S, Medeiros J, et al (2011) Degradation pathway of pentachlorophenol by *Mucor plumbeus* involves phase II conjugation and oxidation–reduction reactions. Journal of Hazardous Materials 198:133–142. doi:10.1016/j.jhazmat.2011.10.021.

Carvalho AKF, Rivaldi JD, Barbosa JC, de Castro HF. 2015. Biosynthesis, characterization and enzymatic transesterification of single cell oil of *Mucor circinelloides* – A sustainable pathway for biofuel production. Bioresour Technol. 181:47–53. doi:10.1016/j.biortech.2014.12.110.

Castresana J. 2000. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. Mol Biol Evol. 17:540–552.

Chandra S, Woodgyer A. 2002. Primary cutaneous zygomycosis due to *Mucor circinelloides*. Australas J Dermatol. 43:39–42. doi:10.1046/j.1440-0960.2002.00550.x.

Chayakulkeeree M, Ghannoum MA, Perfect JR. 2006. Zygomycosis: the re-emerging fungal infection. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 25:215–229. doi:10.1007/s10096-006-0107-1.

Chen G, Yang X, Nong S, Yang M, Xu B, Zhang W. 2013. Two novel hydroperoxylated products of 20(S)-protopanaxadiol produced by *Mucor racemosus* and their cytotoxic activities against human prostate cancer cells. Biotechnol Lett. 35:439–443. doi:10.1007/s10529-012-1098-x.

Cholet O. 2006. Etude de l'écosystème fromager par une approche biochimique et moléculaire [Doctoral dissertation] INAPG, Paris France.

Chupp C, Sherf AF. 1960. Vegetable Diseases and Their Control. Sherf AF, Macnab AA, eds. John Wiley and sons, New York. 780p.

Clark. 1968. The Epidemiology of Phycomycosis. In: Wolstenholme GEW, Porter R, eds. Ciba Foundation Symposium - Systemic Mycoses. Chichester, UK: John Wiley & Sons:179–205.

- Cocolin L, Urso R, Rantsiou K, Cantoni C, Comi G. 2006. Dynamics and characterization of yeasts during natural fermentation of Italian sausages. *FEMS Yeast Res.* 6:692–701. doi:10.1111/j.1567-1364.2006.00050.x.
- Cooke RC, Rayner ADM. 1984. Ecology of saprotrophic fungi. Longman, New York. 415p.
- Costa AR, Porto E, Tayah M, Valente NY, Lacaz CDS, Maranhão WM, Rodrigues MC. 1990. Subcutaneous mucormycosis caused by *Mucor hiemalis* Wehmer f. *luteus* (Linnemann) Schipper 1973. *Mycoses.* 33:241–246.
- Csernetics A, Tóth E, Farkas A, Nagy G, Bencsik O, Vágvölgyi C, Papp T. 2015. Expression of Xanthophyllomyces dendrorhous cytochrome-P450 hydroxylase and reductase in *Mucor circinelloides*. *World J Microbiol Biotechnol.* 31:321–336. doi:10.1007/s11274-014-1784-z.
- Dantigny P, Guilmart A, Benssoussan M. 2005. Basis of predictive mycology. *Int J Food Microbiol.* 100:187–196. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.10.013.
- De Carolis E, Posteraro B, Flörl CL. 2012. Species identification of Aspergillus, Fusarium and Mucorales with direct surface analysis by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Microbiol.* 18:475–484. doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03599.x.
- De Hoog G, Guarro J, Gené J, Figueras MJ. 2000. Atlas of Clinical Fungi, 2nd. Utrecht/Reus: Centraalbureau voor Schimmelcultures: 305–310.
- de Oliveira Silva E, Furtado NAJC, Aleu J, Collado IG. 2013. Terpenoid biotransformations by Mucor species. *Phytochem Rev.* 12:857–876. doi:10.1007/s11101-013-9313-5.
- de Repentigny L, St-Germain G, Charest H, Kokta V, Vobecky S. 2008. Fatal zygomycosis caused by *Mucor indicus* in a child with an implantable left ventricular assist device. *Pediatr Infect Dis J.* 27:365–369. doi:10.1097/INF.0b013e3181634f2b.
- de Souza EL, Sales CV, de Oliveira CEV, Lopes LAA, da Conceição ML, Berger LRR, Stamford TCM. 2015. Efficacy of a coating composed of chitosan from Mucor circinelloides and carvacrol to control *Aspergillus flavus* and the quality of cherry tomato fruits. *Front Microbiol.* 6:620. doi:10.3389/fmicb.2015.00732.
- de Souza JI, Pires-Zottarelli CLA, Santos dos JF, Costa JP, Harakava R. 2012. *Isomucor* (Mucoromycotina): a new genus from a Cerrado reserve in state of Sao Paulo, Brazil. *Mycologia.* 104:232–241. doi:10.3852/11-133.
- Del Palacio A, Ramos MJ, Pérez A, Arribi A, Amondarain I, Alonso S, Ortíz MC. 1999. Five cases of zygomycosis. *Rev Iberoam Micol.* 16:50–56.
- Delavenne E, Mounier J, Déniel F, Barbier G. 2012. Biodiversity of antifungal lactic acid bacteria isolated from raw milk samples from cow, ewe and goat over one-year period. *Int J Food Microbiol.* 155:185–190. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.02.003.
- Deng Z, Cao L, Huang H, Jiang X, Wang W, Shi Y, Zhang R. 2011. Characterization of Cd- and Pb-resistant fungal endophyte *Mucor* sp. CBRF59 isolated from rapeseed (Brassica chinensis) in a metal-contaminated soil. *J Hazard Mat.* 185:717–724. doi:10.1016/j.jhazmat.2010.09.078.
- Deng Z, Zhang R, Shi Y, Hu L, Tan H, Cao L. 2013. Enhancement of phytoremediation of Cd- and Pb-contaminated soils by self-fusion of protoplasts from endophytic fungus *Mucor* sp. CBRF59. *Chemosphere.* 91:41–47. doi:10.1016/j.chemosphere.2012.11.065.
- Desirò A, Salvioli A, Ngonkeu EL, Mondo SJ, Epis S, Faccio A, Kaech A, Pawlowska TE, Bonfante P. 2014. Detection of a novel intracellular microbiome hosted in arbuscular mycorrhizal fungi. *ISME J.* 8:257–270. doi:10.1038/ismej.2013.151.
- Desmaures N. 2014. Mold-Ripened Varieties. In: Batt C, Tortorello ML, eds. Encyclopedia of Food Microbiology. Academic Press, New York:409–416.

Dettman JR, Jacobson DJ, Taylor JW. 2003. A multilocus genealogical approach to phylogenetic species recognition in the model eukaryote *Neurospora*. *Evolution*. 57:2703–2720. doi:10.1111/j.0014-3820.2003.tb01514.x.

Dizbay M, Adisen E, Kustimur S, Sari N, Cengiz B. 2009. Fungemia and cutaneous zygomycosis due to *Mucor circinelloides* in an intensive care unit patient: case report and review of literature. *Jpn J Infect Dis*. 62:146-148.

Dolatabadi S, Najafzadeh MJ, Hoog GS. 2014. Rapid screening for human-pathogenic Mucorales using rolling circle amplification. *Mycoses*. 57:67–72. doi:10.1111/myc.12245.

Dolatabadi S, Scherlach K, Figge M, Hertweck C. 2015. Food preparation with mucoralean fungi: A potential biosafety issue? *Fungal Biol*. 120:393:401. doi:10.1016/j.funbio.2015.12.001.

Essayag SM, Magaldi S, Capriles D. 2001. *Mucor indicus* necrotizing fasciitis. *Int J Dermatol*. 406:406–408. doi:10.1046/j.1365-4362.2001.01246-3.x.

Fanfair RN, Benedict K, Bos J. 2012. Necrotizing cutaneous mucormycosis after a tornado in Joplin, Missouri, in 2011. *New Eng J Med*. 367:2214-2225. doi:10.1056/NEJMoa1204781.

Fapohunda SO, Ogundero VW. 1990. Physiology of fungi associated with fast foods in Nigeria. *Int Biodeter*. 26:23–32. doi:10.1016/0265-3036(90)90033-4.

Fasolo PB, Scannerini S. 1977. Cytological observations on the mycorrhiza *Endogone flammicorona-Pinus strobus*. *Allionia*. 22: 23–24.

Fetchick RJ, Rinaldi MG, Sun SH. 1986a. Zygomycosis due to *Mucor circinelloides*, a rare agent of human fungal diseases [abstract no. F42]. Proceedings of the Annual Meeting of the American Society for Microbiology. Washington DC. American Society for Microbiology (Vol. 404).

Field KJ, Rimington WR, Bidartondo MI, Allinson KE, Beerling DJ, Cameron DD, Duckett JG, Leake JT, Pressel S. 2015. First evidence of mutualism between ancient plant lineages (Haplomitriopsida liverworts) and Mucoromycotina fungi and its response to simulated Palaeozoic changes in atmospheric CO₂. *New Phytol*. 205:743–756. doi:10.1111/nph.13024.

Field KJ, Pressel S, Duckett JG, Rimington WR, Bidartondo MI. 2015. Symbiotic options for the conquest of land. *Trends Ecol Evol*. 30:477–486. doi:10.1016/j.tree.2015.05.007.

Fingerroth JD, Roth RS, Talcott JA, Rinaldi MG. 1994. Zygomycosis Due to *Mucor circinelloides* in a Neutropenic Patient Receiving Chemotherapy for Acute Myelogenous Leukemia. *Clin Infect Dis*. 19:135–137. doi:10.1093/clinids/19.1.135.

Foschino R, Garzaroli C. 1993. Microbial contaminants cause swelling and inward collapse of yoghurt packs. *Lait*. 73:395–400.

Fox PF, McSweeney P. 2004. Cheese: an overview. In: Fox PF, McSweeney PLH, Cogan TM, Guinee TP, eds. *Cheese: chemistry, physics and microbiology*. Academic Press, New York:1–18.

Fraille ER, Bernardinelli SE, Handel M, Jauregui AM. 1978. Selección de cepas de *Mucor* sp productoras de enzimas coagulantes de leche. *Rev Argent Microbiol*. 10:65–69.

Fukuda H, Kondo A, Noda H. 2001. Effective Biofuel Production by an Intelligent Bioreactor. In: Hofman M, Thonart P, eds. *Engineering and Manufacturing for Biotechnology*. Springer Netherlands, Dordrecht:449–455.

Gama Salgado J, Kangwa M, Fernandez-Lahore M. 2013. Cloning and expression of an active aspartic

- proteinase from *Mucor circinelloides* in *Pichia pastoris*. BMC Microbiol. 13:250. doi:10.1186/1471-2180-13-250.
- Garre V, Barredo JL, Iturriaga EA. 2014. Transformation of *Mucor circinelloides* f. *lusitanicus* Protoplasts. In: van den Berg MA, Maruthachalam K, eds. Genetic Transformation Systems in Fungi, Volume 1. Springer International Publishing:49–59.
- Giraud T, Refrégier G, Le Gac M, de Vienne DM. 2008. Speciation in fungi. Fungal Genet Biol. 45:791–802. doi:10.1016/j.fgb.2008.02.001.
- Gnonlonfin GJB, Hell K, Fandohan P, Siame AB. 2008. Mycoflora and natural occurrence of aflatoxins and fumonisin B1 in cassava and yam chips from Benin, West Africa. Int J Food Microbiol. 122:140–147. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.047.
- Gonzalez-Hernandez GA, Herrera-Estrella L, Rocha-Ramirez V, Roncero MIG, Gutierrez-Corona JF. 1997. Biolistic transformation of *Mucor circinelloides*. Mycol Res. 101:953–956. doi:10.1017/S0953756297003614.
- Gultom S, Hu B. 2013. Review of Microalgae Harvesting via Co-Pelletization with Filamentous Fungus. Energies. 6:5921–5939, doi:10.3390/en6115921.
- Hamdi AA, Minofy El HA, Abd-Elsalam IS. 1999. Microbiological transformation of progesterone to 11 α -hydroxy progesterone using *Mucor racemosus* NRRL 3639. Egypt J Microbiol. 34:167–180.
- Han B-Z, Kuijpers AFA, Thanh NV, Nout MJR. 2004. Mucoraceous moulds involved in the commercial fermentation of Sufu Pehtze. Antonie Van Leeuwenhoek. 85:253–257. doi:10.1023/B:ANTO.0000020157.72415.b9.
- Hayaloglu AA, Kirbag S. 2007. Microbial quality and presence of moulds in Kuflu cheese. Int J Food Microbiol. 115:376–380. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2006.12.002.
- Hemashettar BM, Patil RN, O'Donnell K, Chaturvedi V, Ren P, Padhye AA. 2011. Chronic rhinofacial mucormycosis caused by *Mucor irregularis* (*Rhizomucor variabilis*) in India. J Clin Microbiol. 49:2372–2375. doi:10.1128/JCM.02326-10.
- Hermet A. 2013. Caractérisation des communautés fongiques associées à différents types de fromages [Doctoral dissertation]. Université de Bretagne Occidentale, Brest, France.
- Hermet A, Méheust D, Mounier J, Barbier G, Jany J-L. 2012. Molecular systematics in the genus *Mucor* with special regards to species encountered in cheese. Fungal Biol. 116:692–705. doi:10.1016/j.funbio.2012.04.002.
- Hermet A, Mounier J, Keravec M, Vasseur V, Barbier G, Jany JL. 2014. Application of capillary electrophoresis single-stranded conformation polymorphism (CE-SSCP) analysis for identification of fungal communities in cheese. Food Microbiol. 41:82–90. doi:10.1016/j.fm.2014.01.013.
- Hesseltine CW. 1983. Microbiology of Oriental Fermented Foods. Annu Rev Microbiol. 37:575–601, doi:10.1146/annurev.mi.37.100183.003043.
- Hesseltine CW. 1992. Food Fermentations: Mucorales in Ragi and Related Products. In: Leatham GF, ed. Frontiers in Industrial Mycology. Chapman and Hall, New York:24–39.
- Hesseltine CW, Ellis JJ. 1964. An interesting species of *Mucor*, *M. ramosissimus*. Sabouraudia. 3:151–154.
- Hibbett DS, Binder M, Bischoff JF, Blackwell M, Cannon PF, Eriksson OE, Huhndorf S, James T, Kirk PM, Lücking R, Thorsten Lumbsch H, Lutzoni F, Matheny PB, McLaughlin DJ, Powell MJ, Redhead S, Schoch CL, Spatafora JW, Stalpers JA, Vilgalys R, Aime MC, Aptroot A, Bauer R, Begerow D, Benny GL, Castlebury LA, Crous PW, Dai Y-C, Gams W, et al. 2007. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. Mycol Res. 111:509–547. doi:10.1016/j.mycres.2007.03.004.

Hoffmann K, Pawłowska J, Walther G, Wrzosek M, de Hoog GS, Benny GL, Kirk PM, Voigt K. 2013. The family structure of the Mucorales: a synoptic revision based on comprehensive multigene-genealogies. *Persoonia*. 30:57–76. doi:10.3767/003158513X666259.

Hollmann M, Razzazi-Fazeli E, Grajewski J. 2008. Detection of 3-nitropropionic acid and cytotoxicity in *Mucor circinelloides*. *Mycotox Res*. 24:140–150.

Houghton-Larsen J, Pedersen PA. 2003. Cloning and characterisation of a glucoamylase gene (GlaM) from the dimorphic zygomycete *Mucor circinelloides*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 62:210–217. doi:10.1007/s00253-003-1267-x.

Huang HT, Dooley JG. 1976. Enhancement of cheese flavors with microbial esterases. *Biotechnol Bioeng*. 18:909–919. doi:10.1002/bit.260180704.

Huang J-X, Zhang J, Zhang X-R, Zhang K, Zhang X, He X-R. 2014. *Mucor fragilis* as a novel source of the key pharmaceutical agents podophyllotoxin and kaempferol. *Pharm Biol*. 52:1237–1243. doi:10.3109/13880209.2014.885061.

Huang W, Tang S, Zhao H, Tian S. 2013. Activation of Commercial CaO for Biodiesel Production from Rapeseed Oil Using a Novel Deep Eutectic Solvent. *Ind Eng Chem Res*. 52:11943–11947. doi:10.1021/ie401292w.

Huelsenbeck JP, Ronquist F. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*. 17:754–755.

Humber RA. 2012. Entomophthoromycota: a new phylum and reclassification for entomophthoroid fungi. *Mycotaxon*. 120:477–492. doi:10.5248/120.477.

Hüttel W, Hoffmeister D. 2011. Fungal biotransformations in pharmaceutical sciences. In: Hoffrichter M, ed.: *Industrial Applications*. Springer Berlin. The Mycota X:293–317.

Idnurm A, Walton FJ, Floyd A, Heitman J. 2008. Identification of the sex genes in an early diverged fungus. *Nature*. 451:193–196. doi:10.1038/nature06453.

Ikutegbe V, Sikoki F. 2014. Microbiological and biochemical spoilage of smoke-dried fishes sold in West African open markets. *Food Chem*. 161:332–336. doi:10.1016/j.foodchem.2014.04.032.

Ito PJ, Kunimoto R, Ko WH. 1979. Transmission of *Mucor* rot of guava fruits by three species of fruit flies. *Trop Agric*. 56:49–52.

Iturriaga EA, Díaz-Mínguez JM, Benito EP, Alvarez MI. 1992. Heterologous transformation of *Mucor circinelloides* with the *Phycomyces blakesleeanus* leul gene. *Curr Genet*. 21:215–223.

Iwama TA-KA, Forestry Research Center, Kuroishi (Japan)). 2006. *Mucor* rot of long Chinese yam (*Dioscorea batatas*) caused by *Mucor piriformis*. Annual Report of the Society of Plant Protection of North Japan (Japan).

Iwen PC, Freifeld AG, Sigler L, Tarantolo SR. 2005. Molecular identification of *Rhizomucor pusillus* as a cause of sinus-orbital zygomycosis in a patient with acute myelogenous leukemia. *J Clin Microbiol*. 43:5819–5821. doi:10.1128/JCM.43.11.5819-5821.2005.

Iwen PC, Thapa I, Bastola D. 2011. Review of methods for the identification of zygomycetes with an emphasis on advances in molecular diagnostics. *Lab Med*. 42:260–266. doi:<http://dx.doi.org/10.1309/LMJ8Z0QPJ8BFVMZF>.

Izquierdo AA, Castelli MV. 2009. *In vitro* activity of antifungals against Zygomycetes. Clin Microbiol Infect.15:71–76. doi:10.1111/j.1469-0691.2009.02984.x.

James TY, Kauff F, Schoch CL, Matheny PB, Hofstetter V, Cox CJ, Celio G, Gueidan C, Fraker E, Miadlikowska J, Lumbsch HT, Rauhut A, Reeb V, Arnold AE, Amtoft A, Stajich JE, Hosaka K, Sung GH, Johnson D, Ben O'Rourke, Crockett M, Binder M, Curtis JM, Slot JC, Wang Z, Wilson AW, Schüssler A, Longcore JE, O'Donnell K, et al. 2006. Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. Nature. 443:818–822. doi:10.1038/nature05110.

Jennessen J, Nielsen KF, Houbraken J. 2005. Secondary metabolite and mycotoxin production by the *Rhizopus microsporus* group. J Agri Food Chem. 53:1833-1840. doi:10.1021/jf048147n.

Jermi M, Conedera M, Sieber TN, Sassella A, Schärer H, Jelmini G, Höhn E. 2006. Influence of fruit treatments on perishability during cold storage of sweet chestnuts. J Sci Food Agri. 86:877–885. doi:10.1002/jsfa.2428.

Joe LK, Eng N, Pohan A, Van der Meulen H. 1956. *Basidiobolus ranarum* as a cause of subcutaneous mycosis in Indonesia. AMA Arch Dermatol. 74:378–383.

Jung JY, Lee SH, Jeon CO. 2014. Microbial community dynamics during fermentation of doenjang-meju, traditional Korean fermented soybean. Int J Food Microbiol. 185:112–120. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2014.06.003.

Kang MG. 2001. Handbook of technology for chinese and foreign fermented foods. Beijing, China: Chemical Industrial Press: 99–111.

Karimi K, Zamani A. 2013. *Mucor indicus*: Biology and industrial application perspectives: A review. Biotechnol Adv. 31:466–481. doi:10.1016/j.biotechadv.2013.01.009.

Katoh K, Misawa K, Kuma KI, Miyata T. 2002. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. Nucleic Acids Res. 30:3059–3066. doi:10.1093/nar/gkf436.

Khan ZU, Ahmad S, Brazda A, Chandy R. 2009. *Mucor circinelloides* as a cause of invasive maxillofacial zygomycosis: an emerging dimorphic pathogen with reduced susceptibility to posaconazole. J Clin Microbiol. 47:1244–1248. doi:10.1128/JCM.02030-08.

Khattab AA, Abd-El Salam IS. 2012. Construction of new mutants of *M. racemosus* to improve progesterone biotransformation. Aust J Basic Appl Sci. 6:356–363.

Kim T-W, Lee J-H, Kim S-E, Park M-H, Chang HC, Kim H-Y. 2009. Analysis of microbial communities in doenjang, a Korean fermented soybean paste, using nested PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. Int J Food Microbiol. 131:265–271. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2009.03.001.

Kivanç M. 1992a. Fungal contamination of Kashar cheese in Turkey. Die Nahrung. 36:578–583.

Kontoyiannis DP, Lionakis MS. 2005. Zygomycosis in a tertiary-care cancer center in the era of Aspergillus-active antifungal therapy: a case-control observational study of 27 recent cases. J Infect Dis. 191:1350–1360. doi:10.1086/428780.

Koteda S, Nomura K, Hashiguchi M, Kawaguchi K, Oku E, Osaki K, Nakamura T, Mouri F, Imamura R, Seki R, Nagafuji K, Makimura K, Okamura T. 2013. Fatal zygomycosis caused by *Mucor indicus* after haplo-identical stem cell transplantation. Rinsho Ketsueki. 54:311–315.

Kozaki M, Uchimura T. 1990. Micro-organisms in Chinese starter 'bubod'and rice wine 'tapuy'in the Philippines. J Brew Soc Jpn. 85:818–824.

Krings M, Taylor TN, Dotzler N. 2013. Fossil evidence of the zygomycetous fungi. Pers - Int Mycol J. 30:1–

10. doi:10.3767/003158513X664819.

Kumar D, Bhalla TC. 2005. Microbial proteases in peptide synthesis: approaches and applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* 68:726–736.

Kure CF, Skaar I, Brendehaug J. 2004. Mould contamination in production of semi-hard cheese. *Int J Food Microbiol.* 93:41–49. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2003.10.005.

Kwon-Chung KJ. 2012. Taxonomy of fungi causing mucormycosis and entomophthoromycosis (zygomycosis) and nomenclature of the disease: molecular mycologic perspectives. *Clin Infect Dis.* 54 Suppl 1:S8–S15. doi:10.1093/cid/cir864.

Lackner G, Partida-Martinez LP, Hertweck C. 2009. Endofungal bacteria as producers of mycotoxins. *Trends Microbiol.* 17:570–576. doi:10.1016/j.tim.2009.09.003.

Lahore HF, Auday RM. 1999. Purification and characterization of an acid proteinase from mesophilic *Mucor* sp. solid-state cultures. *J Pept Res.* 53:599–605. doi:10.1034/j.1399-3011.1999.00043.x.

Lamaris GA, Ben-Ami R, Lewis RE. 2009. Increased virulence of Zygomycetes organisms following exposure to voriconazole: a study involving fly and murine models of zygomycosis. *J Infect Dis.* 199:1399–1406.

Lanternier F, Dannaoui E, Morizot G. 2012. A global analysis of mucormycosis in France: the RetroZygo Study (2005–2007). *Clin Infect Dis.* 199:1399–1406. doi:10.1093/cid/cir880.

Le Bars Bailly S, Bailly JD, Brugere H. 1999. Mold-related failings in cheesemaking. *Revue De Medecine Vétérinaire (France).*

Le Gac M, Hood ME, Fournier E, Giraud T. 2007. Phylogenetic evidence of host-specific cryptic species in the anther smut fungus. *Evolution.* 61:15–26. doi:10.1111/j.1558-5646.2007.00002.x.

Lee AC, Fujio Y. 1999. Microflora of banh men, a fermentation starter from Vietnam. *World J Microbiol Biotechnol.* 15:51–55.

Lee SC, Billmyre RB, Li A, Carson S, Sykes SM, Huh EY, Mieczkowski P, Ko DC, Cuomo CA, Heitman J. 2014. Analysis of a food-borne fungal pathogen outbreak: virulence and genome of a *Mucor circinelloides* isolate from yogurt. *MBio.* 5:e0139014. doi:10.1128/mBio.01390-14.

Lee SC, Corradi N, Byrnes EJ, Torres-Martinez S. 2008. Microsporidia evolved from ancestral sexual fungi. *Curr Biol.* 18:1675:1679. doi:10.1016/j.cub.2008.09.030.

Lee SC, Heitman J. 2014. Sex in the Mucoralean Fungi. *Mycoses.* 57:18–24. doi:10.1111/myc.12244.

Lee SC, Li A, Calo S, Heitman J. 2013. Calcineurin plays key roles in the dimorphic transition and virulence of the human pathogenic zygomycete *Mucor circinelloides*. *PLoS Pathog.* 9:e1003625. doi:10.1371/journal.ppat.1003625.

Lee SC, Li A, Calo S, Inoue M, Tonthat NK, Bain JM, Louw J, Shinohara ML, Erwig LP, Schumacher MA, Ko DC, Heitman J. 2015. Calcineurin orchestrates dimorphic transitions, antifungal drug responses and host–pathogen interactions of the pathogenic mucoralean fungus *Mucor circinelloides*. *Mol Microbiol.* 97:844–865. doi:10.1111/mmi.13071.

Lee SJ, Lee YM, Lee HB, Kim JJ. 2011. Rice straw-decomposing fungi and their cellulolytic and xylanolytic enzymes. *J Microbiol Biotechnol.* 21:1322–1329.

Lewis RE, Ben-Ami R, Best L, Albert N. 2012. Tacrolimus enhances the potency of posaconazole against *Rhizopus oryzae* in vitro and in an experimental model of mucormycosis. *J Infect Dis.* 207:834–841.

Lewis RE, Liao G, Wang W, Prince RA. 2011. Voriconazole pre-exposure selects for breakthrough mucormycosis in a mixed model of *Aspergillus fumigatus*-*Rhizopus oryzae* pulmonary infection. *Virulence*. 2:248–355. doi:10.4161/viru.2.4.17074.

Li CH, Cervantes M, Springer DJ, Boekhout T, Ruiz-Vázquez RM, Torres-Martinez SR, Heitman J, Lee SC. 2011. Sporangiospore Size Dimorphism Is Linked to Virulence of *Mucor circinelloides*. *PLoS Pathog*. 7:e1002086. doi:10.1371/journal.ppat.1002086.

Li DM, De Lun L. 2012. *Mucor irregularis* infection and lethal midline granuloma: a case report and review of published literature. *Mycopathologia*. 174:429–439.

Li L, Singh P, Liu Y, Pan S, Wang G. 2014. Diversity and biochemical features of culturable fungi from the coastal waters of Southern China. *AMB Express*.4:1–1.

Limtong S, Sintara S, Suwanarit P. 2005. Species diversity of molds in Thai traditional fermentation starters (Loog-Pang). *Kasetsart J(Nat Sci)*. 39:511–518.

Lu X, Liu Z, Shen Y, She X, Lu G. 2009. Primary cutaneous zygomycosis caused by *Rhizomucor variabilis*: a new endemic zygomycosis? A case report and review of 6 cases reported from China. *Clin Infect Dis*. 49:e39–e43. doi:10.1086/600817.

Lu XL, Najafzadeh MJ, Dolatabadi S, Ran YP, Gerrits van den Ende AHG, Shen YN, Li CY, Xi LY, Hao F, Zhang QQ, Li RY, Hu ZM, Lu GX, Wang JJ, Drogari-Apiranthitou M, Klaassen C, Meis JF, Hagen F, Liu WD, de Hoog GS. 2013. Taxonomy and epidemiology of *Mucor irregularis*, agent of chronic cutaneous mucormycosis. *Pers - Int Mycol J*. 30:48–56. doi:10.3767/003158513X665539.

Ludolph AC, Ludolph AG. 1991. 3-Nitropropionic acid-abundant xenobiotic excitotoxin linked to putaminal necrosis and tardive dystonia. *Ann Neurol*. 30:252–253.

Lugauskas A, Repeckiene J, Novosinskas H. 2005. Micromycetes, producers of toxins, detected on stored vegetables. *Ann Agric Environ Med*. 12:253–260.

Luo Y, Zeng F, Huang X, Li Q, Tan G, Xi L, Lu C, Guo Q. 2014. Successful treatment of a necrotizing fasciitis patient caused by *Mucor indicus* with amphotericin B and skin grafting. *Mycopathologia*. 177:187–192.

Lv X-C, Chen Z-C, Jia R-B, Liu Z-B, Zhang W, Chen S-J, Rao P-F, Ni L. 2015. Microbial community structure and dynamics during the traditional brewing of Fuzhou Hong Qu glutinous rice wine as determined by culture-dependent and culture-independent techniques. *Food Control*. 57:216–224. doi:10.1016/j.foodcont.2015.03.054.

Ma L, Liu X, Liang J, Zhang Z. 2011. Biotransformations of cinnamaldehyde, cinnamic acid and acetophenone with *Mucor*. *World J Microbiol Biotechnol*. 27: 2133–2137.

Maddison WP, Maddison DR. 2001. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis.

Marcellino N, Benson DR. 1992. Scanning electron and light microscopic study of microbial succession on Bethlehem St. Nectaire Cheese. *Appl Environ Microbiol*. 58:3448–3454.

Marín P, Palmero D, Jurado M. 2014. Effect of solute and matric potential on growth rate of fungal species isolated from cheese. *Int Dairy J*. 26:89–84.

Mcintyre M, Breum J, Arnau J, Nielsen J. 2002. Growth physiology and dimorphism of *Mucor circinelloides* (syn. *racemosus*) during submerged batch cultivation. *Appl Microbiol Biotechnol*. 58:495–502. doi:10.1007/s00253-001-0916-1.

Mendoza L, Vilela R, Voelz K, Ibrahim AS. 2014. Human fungal pathogens of Mucorales and Entomophthorales. *Cold Spring Harbor. Perspect Med*. 5:483–494.

Michailides TJ. 1991. Characterization and comparative studies of *Mucor* isolates from stone fruits from California and Chile. *Plant Dis.* 75:373–380.

Michel V, Hauwuy A, Chamba J-F. 2001. La flore microbienne de laits crus de vache : diversité et influence des conditions de production. *Lait.* 81:575–592, doi:10.1051/lait:2001151.

Millati R, Edebo L, Taherzadeh MJ. 2005. Performance of *Rhizopus*, *Rhizomucor*, and *Mucor* in ethanol production from glucose, xylose, and wood hydrolyzates. *Enz Micro Technol.* 36:294–300.

Million L, Larosa F, Lepiller Q, Legrand F, Rocchi S, Daguindau E, Scherer E, Bellanger AP, Leroy J, Grenouillet, F. (2013). Quantitative polymerase chain reaction detection of circulating DNA in serum for early diagnosis of mucormycosis in immunocompromised patients. *Clin Infect Dis*, 56:e95–e101.

Minofy El HA, Hamdi AA, Abd-Elsalam IS. 1999. Biotransformation of progesterone to 11 α -hydroxyprogesterone using the immobilized spores and mycelium of *Mucor racemosus* NRRL 3639. *Egypt J Microbiol.* 34:153–166.

Mohapatra BR, Banerjee UC, Bapuji M. 1998. Characterization of a fungal amylase from *Mucor* sp. associated with the marine sponge *Spirastrella* sp. *J Biotechnol.* 60:113–117. doi:10.1016/S0168-1656(97)00197-1.

Montagna MT, Santacroce MP, Spilotros G, Napoli C. 2004. Investigation of fungal contamination in sheep and goat cheeses in southern Italy. *Mycopathologia.* 158:245–249.

Moore CB, Richardson MD. 2014. 12 Infections caused by Mucorales. In: Kurzai O, ed.: Human fungal pathogens. Springer Berlin. The Mycota XII: 214–221.

Morin-Sardin S, Rigalma K, Coroller L, Jany J-L, Coton E. 2016. Effect of temperature, pH, and water activity on *Mucor* spp. growth on synthetic medium, cheese analog and cheese. *Food Microbiol.* 56:69–79. doi:10.1016/j.fm.2015.11.019.

Muszewska A, Pawłowska J, Krzyściak P. 2014. Biology, systematics, and clinical manifestations of Zygomycota infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 33:1273–1287. doi:10.1007/s10096-014-2076-0.

Nelson LA, Foglia TA, Marmer WN. 1996. Lipase-catalyzed production of biodiesel. *J Am Oil Chem Soc.* 73:1191–1195. doi:10.1007/BF02523383.

Nicolás F, Ruiz-Vázquez R. 2013. Functional Diversity of RNAi-Associated sRNAs in Fungi. *Int J Mol Sci.* 14:15348–15360. doi:10.3390/ijms140815348.

Nicolás FE, Vila A, Moxon S, Cascales MD, Torres-Martínez S, Ruiz-Vázquez RM, Garre V. 2015. The RNAi machinery controls distinct responses to environmental signals in the basal fungus *Mucor circinelloides*. *BMC Genomics.* 16:195. doi:10.1186/s12864-015-1443-2.

Nout M, Aidoo KE. 2002. Asian fungal fermented food. In: Hoffrichter M, ed. Industrial applications. Springer Berlin. The Mycota X:23–47.

Nyilasi I, Ács K, Papp T, Nagy E, Vágvölgyi C. 2005. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Mucor circinelloides*. *Folia Microbiol.* 50:415–420. doi:10.1007/BF02931423.

O'Donnell K, Lutzoni FM, Ward TJ, Benny GL. 2001. Evolutionary Relationships among Mucoralean Fungi (Zygomycota): Evidence for Family Polyphyly on a Large Scale. *Mycologia.* 93:286–297. doi:10.2307/3761650.

Oliveira Silva E de, Furtado NAJC, Aleu J, Collado IG. 2013. Terpenoid biotransformations by *Mucor* species. *Phytochem Rev.* 12:857–876. doi:10.1007/s11101-013-9313-5.

Oranusi SU, Braide W, Eze UC, Chinakwe E. 2013. Quality Aspects of African Salad. *J Emerg Trends Eng Appl Sci.* 4:287–292.

Orlowski M. 1991. *Mucor* dimorphism. *Microbiol Rev.* 55:234–258.

Pagano L, Valentini CG, Fianchi L. 2009. The role of neutrophils in the development and outcome of zygomycosis in haematological patients. *Clin Microbiol Infect.* 15:33–36. doi:10.1111/j.1469-0691.2009.02977.x.

Palozza P, Krinsky NI. 1992. Astaxanthin and canthaxanthin are potent antioxidants in a membrane model. *Arch Biochem Biophys.* 297:291–295. doi:10.1016/0003-9861(92)90675-M.

Paltauf A. 1885. Mycosis mucorina. *Virchows Archiv.* 102:543–564.

Panasenko VT. 1967. Ecology of microfungi. *Bot Rev.* 33:189–215, doi:10.1007/BF02858637.

Papagianni M, Ambrosiadis I, Filiouis G. 2007. Mould growth on traditional greek sausages and penicillin production by *Penicillium* isolates. *Meat Science.* 76:653–657. doi:10.1016/j.meatsci.2007.01.018.

Papp T, Csernetics A, Nagy G, Bencsik O, Iturriaga EA, Eslava AP, Vágvölgyi C. 2013. Canthaxanthin production with modified *Mucor circinelloides* strains. *Appl Microbiol Biotechnol.* 97:4937–4950. doi:10.1007/s00253-012-4610-2.

Papp T, Csernetics A, Nyilasi I, Ábrok M, Vágvölgyi C. 2010. Genetic transformation of zygomycetes fungi. In: Rai M, Kövics G, eds. *Progress in Mycology.* Springer Netherland:75–94.

Partida-Martinez LP, Groth I, Schmitt I, Richter W, Roth M, Hertweck C. 2007a. *Burkholderia rhizoxinica* sp. nov. and *Burkholderia endofungorum* sp. nov., bacterial endosymbionts of the plant-pathogenic fungus *Rhizopus microsporus*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 57:2583–2590. doi:10.1099/ij.s.0.64660-0.

Partida-Martinez LP, Monajembashi S, Greulich K-O, Hertweck C. 2007b. Endosymbiont-Dependent Host Reproduction Maintains Bacterial-Fungal Mutualism. *Curr Biol.* 17:773–777. doi:10.1016/j.cub.2007.03.039.

Petrikkos G, Skiada A, Lortholary O, Roilides E, Walsh TJ, Kontoyiannis DP. 2012. Epidemiology and clinical manifestations of mucormycosis. *Clin Infect Dis.* 54:S23–34. doi:10.1093/cid/cir866.

Pitt JI, Hocking AD. 2009a. Zygomycetes. In: Pitt JI, Hocking AD, eds. *Fungi and Food Spoilage*, Third edition. Springer New York S:145-167.

Pitt JI, Hocking AD. 2009b. The Ecology of Fungal Food Spoilage. In: Pitt JI, Hocking AD, eds. *Fungi and Food Spoilage*, Third edition. Springer New York:3–9.

Pitt JI, Hocking AD, Bhudhasamai K, Miscamble BF, Wheeler KA, Tanboon-Ek P. 1993. The normal mycoflora of commodities from Thailand. 1. Nuts and oilseeds. *Int J Food Microbiol.* 20:211–226.

Pitt JI, Hocking AD, Bhudhasamai K, Miscamble BF, Wheeler KA, Tanboon-Ek P. 1994. The normal mycoflora of commodities from Thailand. 2. Beans, rice, small grains and other commodities. *Int J Food Microbiol.* 23:35–43.

Pongas GN, Lewis RE, Samonis G. 2009. Voriconazole-associated zygomycosis: a significant consequence of evolving antifungal prophylaxis and immunosuppression practices? *Clin Microbiol Infect.* 15:93–97. doi:10.1111/j.1469-0691.2009.02988.x.

Prevo R, Starink TM, de Haan P. 1991. Primary cutaneous mucormycosis in a healthy young girl: report of a case caused by *Mucor hiemalis* Wehmer. *J Am Acad Dermatol.* 24:882–885.

Reyes AA. 1990. Pathogenicity, Growth, and Sporulation of *Mucor mucedo* and *Botrytis cinerea* in Cold

or CA Storage. HortScience. 25:549–552.

Ribes JA, Vanover-Sams CL, Baker DJ. 2000. Zygomycetes in human disease. *Clinical Microbiol Rev.* 13:236–301. doi:10.1128/CMR.13.2.236-301.2000.

Richardson M. 2009. The ecology of the Zygomycetes and its impact on environmental exposure. *Clin Microbiol Infect.* 15:2–9. doi:10.1111/j.1469-0691.2009.02972.x.

Riley TT, Muzny CA, Swiatlo E, Legendre DP. 2016. Breaking the Mold: A Review of Mucormycosis and Current Pharmacological Treatment Options. *Ann Pharmacother.* 1060028016655425. doi:10.1177/1060028016655425.

Roden MM, Zaoutis TE, Buchanan WL, Knudsen TA, Sarkisova TA, Schaufele RL, Sein M, Sein T, Chiou CC, Chu JH, Kontoyiannis DP, Walsh TJ. 2005. Epidemiology and outcome of zygomycosis: a review of 929 reported cases. *Clin Infect Dis.* 41:634–653. doi:10.1086/432579.

Sadasivan TS. 1939. Succession of fungi decomposing wheat straw in different soils, with special reference to *Fusarium culmorum*. *Ann Appl Biol.* 26:497–508. doi:10.1111/j.1744-7348.1939.tb06986.x.

Samson RA, Van Kooij JA, De Boer E. 1987. Microbiological quality of commercial tempeh in the Netherlands. *J Food Protect.* 50: 92–94.

Sathya R, Pradeep BV, Angayarkanni J, Palaniswamy M. 2009. Production of milk clotting protease by a local isolate of *Mucor circinelloides* under SSF using agro-industrial wastes. *Biotechnol Bioproc E.* 14:788–794. doi:10.1007/s12257-008-0304-0.

Schachtschabel D, David A, Menzel K-D, Schimek C, Wöstemeyer J, Boland W. 2008. 19035372. *ChemBioChem.* 9:3004–3012. doi:10.1002/cbic.200800477.

Scherlach K, Busch B, Lackner G. 2012. Symbiotic cooperation in the biosynthesis of a phytotoxin. *Angew Chem.* 124:9753–9756. doi:10.1002/ange.201204540.

Schimek C, Wöstemeyer J. 2009. Carotene derivatives in sexual communication of zygomycete fungi. *Phytochemistry.* 70:1867–1875. doi:10.1016/j.phytochem.2009.07.014.

Schipper MA. 1969. Zygosporic stages in heterothallic *Mucor*. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 35:189–208.

Schipper MA.. 1976. On *Mucor circinelloides*, *Mucor racemosus* and related species. *Studies Mycol.* 12:1:40.

Schipper MA. 1973. A study on variability in *Mucor hiemalis* and related species. *Studies Mycol.* 4:1:40.

Schipper MA.. 1978. On certain species of *Mucor* with a key to all accepted species. *Studies Mycol.* 17:1:52.

Schipper MA., van Wetenschappen KNA. 1975. On *Mucor mucedo*, *Mucor flavus* and related species. *Stuides Mycol.* 10:1–33.

Schipper MA.. 1967. On *Mucor fuscus* and its synonyms. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 33:473–476. doi:10.1007/BF02045599.

Schnürer J, Magnusson J. 2005. Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. *Trends Food Sci Tech.* 16:70–78. doi:10.1016/j.tifs.2004.02.014.

Schrödl W, Heydel T, Schwartze VU, Hoffmann K, Große-Herrenthey A, Walther G, Alastruey-Izquierdo A, Rodriguez-Tudela JL, Olias P, Jacobsen ID. 2011. Direct analysis and identification of pathogenic *Lichtheimia* species by Matrix Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI) Time-Of-Flight (TOF) analyzer-mediated mass

spectrometry. J Clin Microbiol. JCM. 01070–11.

Sengun I, Yaman D, Gonul S. 2008. Mycotoxins and mould contamination in cheese: a review. World Mycotox J. 1:291–298. doi:10.3920/WMJ2008.x041.

Sharma R, Sekhon AS, Premachandra BR. 1995. *In vitro* susceptibility of *Mucor ramosissimus* Samutsevitch, a rare fungal pathogen, to antimycotics. Chemotherapy. 41:200–203.

Sholberg PL. 1990. A new postharvest rot of peaches in Canada caused by *Mucor piriformis*. Can J Plant Pathol. 12:219–221. doi:10.1080/07060669009501032.

Silva E de O, Furtado NAJC, Aleu J, Collado IG. 2014. Non-terpenoid biotransformations by *Mucor* species. Phytochem Rev. 14:745–764. doi:10.1007/s11101-014-9374-0.

Skiaada A, Pagano L, Groll A, Zimmerli S, Dupont B, Lagrou K, Lass Florl C, Bouza E, Klimko N, Gaustad P, Richardson M, Hamal P, Akova M, Meis JF, Rodriguez-Tudela JL, Roilides E, Mitrousia Ziouva A, Petrikos G. 2011. Zygomycosis in Europe: analysis of 230 cases accrued by the registry of the European Confederation of Medical Mycology (ECMM) Working Group on Zygomycosis between 2005 and 2007. Clin Microbiol Infect. 17:1859–1867, doi:10.1111/j.1469-0691.2010.03456.x.

Slavin MA, Chakrabarti A. 2012. Opportunistic fungal infections in the Asia-Pacific region. Med Mycol. 50:18–25.

Snowdon AL. 1990. A Color Atlas of Post-harvest Diseases & Disorders of Fruits & Vegetables Vol 1:General Introduction & Fruits. CRC Press, Boca Raton, FL. 302 p.

Sobel JD. 2001. Vaginal mucormycosis: a case report. Infect Dis Obstet Gynecol. 9:117–118.

Sonoda RM, Hayslip NC, Stoffella PJ. 1981. Tomato fruit rot infection cycle in a fresh market packing operation (*Rhizopus stolonifer*, *Mucor hiemalis*, *Geotrichum candidum*, Florida). Proceedings of the annual meeting of the Florida State horticultural Society, 1981.

Stajich JE, Berbee ML, Blackwell M, Hibbett DS, James TY, Spatafora JW, Taylor JW. 2009. Primer - The Fungi. Curr Bio. 19:R840–R845. doi:10.1016/j.cub.2009.07.004.

Sugui JA, Christensen JA, Bennett JE, Zelazny AM, Kwon-Chung KJ. 2011. Hematogenously disseminated skin disease caused by *Mucor velutinosus* in a patient with acute myeloid leukemia. J Clin Microbiol. 49:2728–2732. doi:10.1128/JCM.00387-11.

Sumantha A, Larroche C, Pandey A. 2006. Microbiology and industrial biotechnology of food-grade proteases: a perspective. Food Technol Biotechnol. 44:211.

Sun HY, Singh N. 2011. Mucormycosis: its contemporary face and management strategies. Lancet Infect Dis. 11:301–311.

Tamang JP. Diversity of Fermented Beverages and Alcoholic Drinks. In: Tamang JP, Kailasapathy K, eds. Fermented Foods and Beverages of the World. CRC Press, Boca Raton, FL:85–116.

Tamang JP, Sarkar PK. 1995. Microflora of murcha: an amylolytic fermentation starter. Microbios. 81: 115–122.

Tang X, Zan X, Zhao L, Chen H, Chen YQ, Chen W, Song Y, Ratledge C. 2016. Proteomics analysis of high lipid-producing strain *Mucor circinelloides* WJ11: an explanation for the mechanism of lipid accumulation at the proteomic level. Microb Cell Fact. 15:151. doi:10.1186/s12934-016-0428-4.

Taniwaki MH, Hocking AD, Pitt JI, Fleet GH. 2001. Growth of fungi and mycotoxin production on cheese under modified atmospheres. Int J Food Microbiol. 68:125–133. doi:10.1016/S0168-1605(01)00487-1.

Taylor JW, Jacobson DJ, Kroken S, Kasuga T, Geiser DM, Hibbett DS, Fisher MC. 2000. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genet Biol.* 31:21–32. doi:10.1006/fgbi.2000.1228.

Thakur A, Pahwa R, Singh S, Gupta R. 2010. Production, purification, and characterization of polygalacturonase from *Mucor circinelloides* ITCC 6025. *Enzyme Research.*

Thakur N, Savitri, Saris PEJ, Bhalla TC. 2015. Microorganisms associated with amylolytic starters and traditional fermented alcoholic beverages of North Western Himalayas in India. *Food Biosci.* 11:92–96. doi:10.1016/j.fbio.2015.05.002.

Tormo H, Barral J. 2004. Accidents de fromagerie. <http://www.accident-fromagerie.fr/spip.php?rubrique2>. Accessed 17 July 2016.

Torres-Martínez S, Ruiz-Vázquez RM. 2016. RNAi pathways in *Mucor*: A tale of proteins, small RNAs and functional diversity. *Fungal Genet Biol.* 90:44–52. doi:10.1016/j.fgb.2015.11.006.

Tournas VH, Katsoudas E. 2005. Mould and yeast flora in fresh berries, grapes and citrus fruits. *Int J Food Microbiol.* 105:11–17. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2005.05.002.

Trinci APJ. 1969. A Kinetic Study of the Growth of *Aspergillus nidulans* and Other Fungi. *J Gen Microbiol.* 57:11–24. doi:10.1099/00221287-57-1-11.

Trzaska WJ, Correia JN, Villegas MT, May RC, Voelz K. 2015. pH manipulation as a novel strategy for treating mucormycosis. *Antimicrob Agents Chemother.* 59:6968–6974. doi:10.1128/AAC.01366-15.

Valle-Maldonado MI, Jácome-Galarza IE, Díaz-Pérez AL, Martínez-Cadena G, Campos-García J, Ramírez-Díaz MI, Reyes-De la Cruz H, Riveros-Rosas H, Díaz-Pérez C, Meza-Carmen V. 2015. Phylogenetic analysis of fungal heterotrimeric G protein-encoding genes and their expression during dimorphism in *Mucor circinelloides*. *Fungal Biol.* 119:1179–1193. doi:10.1016/j.funbio.2015.08.009.

van Heeswijck R, Roncero M. 1984. High frequency transformation of *Mucor* with recombinant plasmid DNA. *Carlsberg Res Comm.* 49:691–702.

Vicente G, Bautista LF, Rodríguez R, Gutiérrez FJ, Sádaba I, Ruiz-Vázquez RM, Torres-Martínez S, Garre V. 2009. Biodiesel production from biomass of an oleaginous fungus. *Biochem Eng J.* 48:22–27. doi:10.1016/j.bej.2009.07.014.

Vignale R, Mackinnon JE, De Vilboa EC. 1964. Chronic, destructive, mucocutaneous phycomycosis in man. *Sabouraudia: J Med Vet Mycol.* 3:143–147.

Vitale RG, de Hoog GS, Schwarz P, Dannaoui E, Deng S, Machouart M, Voigt K, van de Sande WWJ, Dolatabadi S, Meis JF, Walther G. 2011. Antifungal susceptibility and phylogeny of opportunistic members of Mucorales. *J Clin Microbiol.* 50:JCM.06133–11–75. doi:10.1128/JCM.06133-11.

Voelz K, Gratacap RL, Wheeler RT. 2015. A zebrafish larval model reveals early tissue-specific innate immune responses to *Mucor circinelloides*. *Dis Model Mech.* 8:1375–1388. doi:10.1242/dmm.019992.

Voigt K, Cigelnik E, O'Donnell K. 1999. Phylogeny and PCR identification of clinically important Zygomycetes based on nuclear ribosomal-DNA sequence data. *J Clin Microbiol.* 37:3957–3964.

Voigt K, Kirk PM. 2014. Fungi. Classification of Zygomycetes: Reappraisal as Coherent Class Based on a Comparison between Traditional versus Molecular Systematics. In: Batt CA, Tortorello ML, eds. *Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)*. 54–67.

Voigt K, Vaas L, Stielow B, de Hoog GS. 2013. The zygomycetes in a phylogenetic perspective. *Pers - Int Mycol J.* 30:i–4. doi:10.3767/003158513X666277.

Voigt K, Wolf T, Ochsenreiter K, Nagy G, Kaerger K, Shelest E, Papp T. 2016. 15 Genetic and Metabolic Aspects of Primary and Secondary Metabolism of the Zygomycetes. In: Hoffmeister D, ed. Biochemistry and Molecular Biology. The Mycota III: 361–385.

Voigt K, Wöstemeyer J. 2001. Phylogeny and origin of 82 zygomycetes from all 54 genera of the Mucorales and Mortierellales based on combined analysis of actin and translation elongation factor EF-1 α genes. *Gene*. 270:113–120. doi:10.1016/S0378-1119(01)00464-4.

Walsh TJ, Gamaletsou MN. 2012. Early clinical and laboratory diagnosis of invasive pulmonary, extrapulmonary, and disseminated mucormycosis (zygomycosis). *Clin Infect Dis*. 54:S55–S60. doi:10.1093/cid/cir868.

Walther G, Pawłowska J, Alastruey-Izquierdo A, Wrzosek M, Rodriguez-Tudela JL, Dolatabadi S, Chakrabarti A, de Hoog GS. 2013. DNA barcoding in Mucorales: an inventory of biodiversity. *Pers - Int Mycol J*. 30:11–47. doi:10.3767/003158513X665070.

Wang HL. 1967. Release of proteinase from mycelium of *Mucor hiemalis*. *J Bacteriol*. 93:1800–1810.

Wang JJ, Satoh H, Takahashi H, Hasegawa A. 1990. A case of cutaneous mucormycosis in Shanghai, China. *Mycoses*. 33:311–315.

Wang JJ, Zhang QQ, Li L. 2002. A case of primary cutaneous mucormycosis due to *Mucor racemosus*. *Chinese J Dermatol*. 35:413.

Wang Y, Chen L, Zhao F, Liu Z, Li J, Qiu F. 2011. Microbial transformation of neoandrographolide by *Mucor spinosus* (AS 3.2450). *J Mol Catal. B: Enzym*. 68:83–88. doi:10.1016/j.molcatb.2010.09.016. doi:10.1016/j.molcatb.2010.09.016.

Weitzman I, Della-Latta P, Housey G, Rebatta G. 1993. *Mucor ramosissimus* Samutsevitch isolated from a thigh lesion. *J Clin Microbiol*. 31:2523–2525.

Wetzel J, Burmester A, Kolbe M. 2012. The mating-related loci *sexM* and *sexP* of the zygomycetous fungus *Mucor mucedo* and their transcriptional regulation by trisporoid pheromones. *Microbiology*. 158:1016–1023. doi:10.1099/mic.0.054106-0.

White MM. 2006. Evolutionary implications of a rRNA-based phylogeny of Harpellales. *Mycol Res*. 110:1011–1024. doi:10.1016/j.mycres.2006.06.006.

White MM, James TY, O'Donnell K, Cafaro MJ, Tanabe Y, Sugiyama J. 2006. Phylogeny of the Zygomycota based on nuclear ribosomal sequence data. *Mycologia*. 98:872–884. doi:10.3852/mycologia.98.6.872.

Whittaker RH. 1969. New concepts of kingdoms of organisms. *Science*. 163:150–160.

Wolff AM, Appel KF, Petersen JB. 2002. Identification and analysis of genes involved in the control of dimorphism in *Mucor circinelloides* (syn. *racemosus*). *FEMS Yeast Res*. 2: 203–213. doi:http://dx.doi.org/10.1111/j.1567-1364.2002.tb00085.x

Wöstemeyer J, Grünler A, Schimek C, Voigt K. 2005. Genetic regulation of carotenoid biosynthesis in fungi. In: Arora DK, Berka R, eds. Applied mycology and biotechnology, vol 5: Genes and Genomics. Elsevier, Amsterdam:257–274.

Wu G, Zhao H, Li C, Rajapakse MP, Wong WC, Xu J, Saunders CW, Reeder NL, Reilman RA, Scheynius A, Sun S, Billmyre BR, Li W, Averette AF, Mieczkowski P, Heitman J, Theelen B, Schröder MS, De Sessions PF, Butler G, Maurer-Stroh S, Boekhout T, Nagarajan N, Dawson TL. 2015. Genus-wide comparative genomics of *Malassezia* delineates its phylogeny, physiology, and niche adaptation on human skin. *PLoS Genet*. 11:e1005614. doi:10.1371/journal.pgen.1005614.

Yang M, Lee JH, Kim Y-K, Ki C-S, Huh HJ, Lee NY. 2016. Identification of Mucorales From Clinical Specimens: A 4-Year Experience in a Single Institution. *Ann Lab Med.* 36:60. doi:10.3343/alm.2016.36.1.60.

Yegin S, Fernandez-Lahore M, Salgado AJG, Guvenc U, Goksungur Y, Tari C. 2011. Aspartic proteinases from *Mucor* spp. in cheese manufacturing. *Appl Microbiol Biotechnol.* 89:949–960. doi:10.1007/s00253-010-3020-6.

Yin Tian, Hongzhu Guo, Jian Han A, Guo D. 2005. Microbial Transformation of 20(S)-Protopanaxatriol by *Mucor spinosus*. *J Nat Prod.* 68:678–680. doi:10.1021/np049688.

Yousef T, Al-Zuhair S, Al-Atabi M. 2005. Performance of diesel engine using an emulsion of biodiesel-conventional diesel fuel. *J Mech Eng.* 56:137–142.

Youssef MS, Abo-Dahab NF. 2000. Mycobiota and mycotoxin contamination of dried raisins in Egypt. *Afr J Mycol Biotechnol.* 8: 69–86.

Zeller B. 1980. Le fromage de chèvre: spécificités technologiques et économiques.[Doctoral dissertation]. Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, Toulouse, France.

Zhang J, Guo H, Tian Y, Liu P, Li N, Zhou J, Guo D. 2007. Biotransformation of 20(S)-protopanaxatriol by *Mucor spinosus* and the cytotoxic structure activity relationships of the transformed products. *Phytochemistry.* 68:2523–2530. doi:10.1016/j.phytochem.2007.05.028.

Zhang J, Hu B. 2012. A novel method to harvest microalgae via co-culture of filamentous fungi to form cell pellets. *Bioresour Technol.* 114:529–535. doi:10.1016/j.biortech.2012.03.054.

Zhang N, Zhao X-H. 2010. Study of *Mucor* spp. in semi-hard cheese ripening. *J Food Sci Technol.* 47:613–619. doi:10.1007/s13197-010-0108-z.

Zhao Z, Lili L, Wan Z, CHen W, Llu H, Li R. 2011. Simultaneous detection and identification of *Aspergillus* and Mucorales species in tissues collected from patients with fungal rhinosinusitis. *J Clin Microbiol.* 49:1501–1507. doi:10.1128/JCM.02262-10 .

Zhao L, Cánovas-Márquez JT, Tang X, Chen H, Chen YQ, Chen W, Garre V, Song Y, Ratledge C. 2016. Role of malate transporter in lipid accumulation of oleaginous fungus *Mucor circinelloides*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 100:1297–1305. doi:10.1007/s00253-015-7079-y.

Zhao Q, Han XY, Balachandran A. 2013. Toxic Megacolon and Perforated Fungal Diverticulitis due to *Mucor indicus* Infection in a Patient with Chronic Myelogenous Leukemia. *Am J Clin Canc Res.* 1:45–50.

Zhao Y, Zhang Q, Li L, Zhu J, Kang K, Chen L. 2009. Primary cutaneous mucormycosis caused by *Rhizomucor variabilis* in an immunocompetent patient. *Mycopathologia.* 168:243–247.

Zhou X, Zhu H, Liu L, Lin J, Tang K. 2010. A review: recent advances and future prospects of taxol-producing endophytic fungi. *Appl Microbiol Biotechnol.* 86:1707–1717.

Zycha H, Siepmann R, Linneman G. 1969. Mucorales. J. Cramer. Keys.(A revision of Zycha. 355 p, 155 pl.

PARTIE 2 : RESULTATS DES TRAVAUX DE RECHERCHE

Introduction

Bien que plusieurs espèces de *Mucor* soient associées à la production fromagère soit en tant que culture technologique soit comme contaminant, relativement peu de données existent concernant : i) leur diversité ; ii) l'impact de différents facteurs abiotiques (température, pH, a_w ,...) sur leur croissance et iii) leur capacité à produire des molécules d'intérêt dans ce type d'environnement. Dans ce contexte, le Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne (LUBEM) a parmi ses objectifs, au travers de différents programmes de recherche, d'améliorer le niveau de connaissances sur les espèces du genre *Mucor* afin de mieux comprendre leur rôle dans l'affinage des fromages et d'aboutir à une meilleure maîtrise de leur utilisation pour la production fromagère.

Cet axe de recherche a été initié avec le projet ANR Food Microbiomes et la thèse d'Antoine Hermet réalisés sur la période 2009-2012, qui ont permis d'étudier différentes espèces de *Mucor* associées aux fromages et de préciser leur positionnement taxonomique au travers d'une analyse phylogénétique multilocus complétée par des études biologiques et morphologiques. Un total de 70 souches de *Mucor* dont 36 issues de fromages ont été analysées : six espèces rencontrées dans les fromages ont été identifiées (*M. circinelloides*, *M. racemosus*, *M. spinosus*, *M. brunneogriseus*, *M. fuscus* et *M. lanceolatus*) et une nouvelle espèce d'importance en fromagerie a été découverte (*M. lanceolatus*). D'autre part, il a été démontré que l'entité *M. plumbeus* correspondait en fait à deux espèces phylogénétiques distinctes, à savoir *M. spinosus* et *M. brunneogriseus* (Hermet *et al.*, 2012). Le génome total de deux souches appartenant aux espèces *M. fuscus* et *M. racemosus* a également été séquencé afin de réaliser une annotation fonctionnelle visant à décrire leurs potentialités métaboliques.

Dans la continuité de ce travail, cette thèse avait deux objectifs majeurs :

⇒ **Evaluer l'impact de facteurs abiotiques en lien avec le procédé de fabrication du fromage sur la croissance de souches représentatives d'espèces de *Mucor* d'intérêt.** Au-

delà d'un aspect cognitif, l'intérêt majeur, via le développement de modèles descriptifs, était d'identifier, s'ils existent, des leviers technologiques pour améliorer l'utilisation des espèces d'intérêt technologique et le contrôle des espèces contaminantes.

⇒ **Etudier**, sur la base de la mise en évidence de comportements différents (en termes de croissance et/ou de morphologie) entre les espèces technologiques et les espèces contaminantes ou non-fromagères, **les variations d'expression du métabolisme afin d'identifier des marqueurs d'adaptation au milieu fromager.**

La stratégie mise en place afin de répondre à ces objectifs a consisté à réaliser, dans une première étape, une étude de physiologie comparée de 7 souches représentatives d'espèces technologiques, contaminantes et non-fromagères (endophyte) de *Mucor* sur différents milieux (synthétique, mimant le fromage et fromager) en fonction de différents facteurs abiotiques clés du processus de production des fromages (température, a_w , pH ; **chapitre 1, Figure 14**).

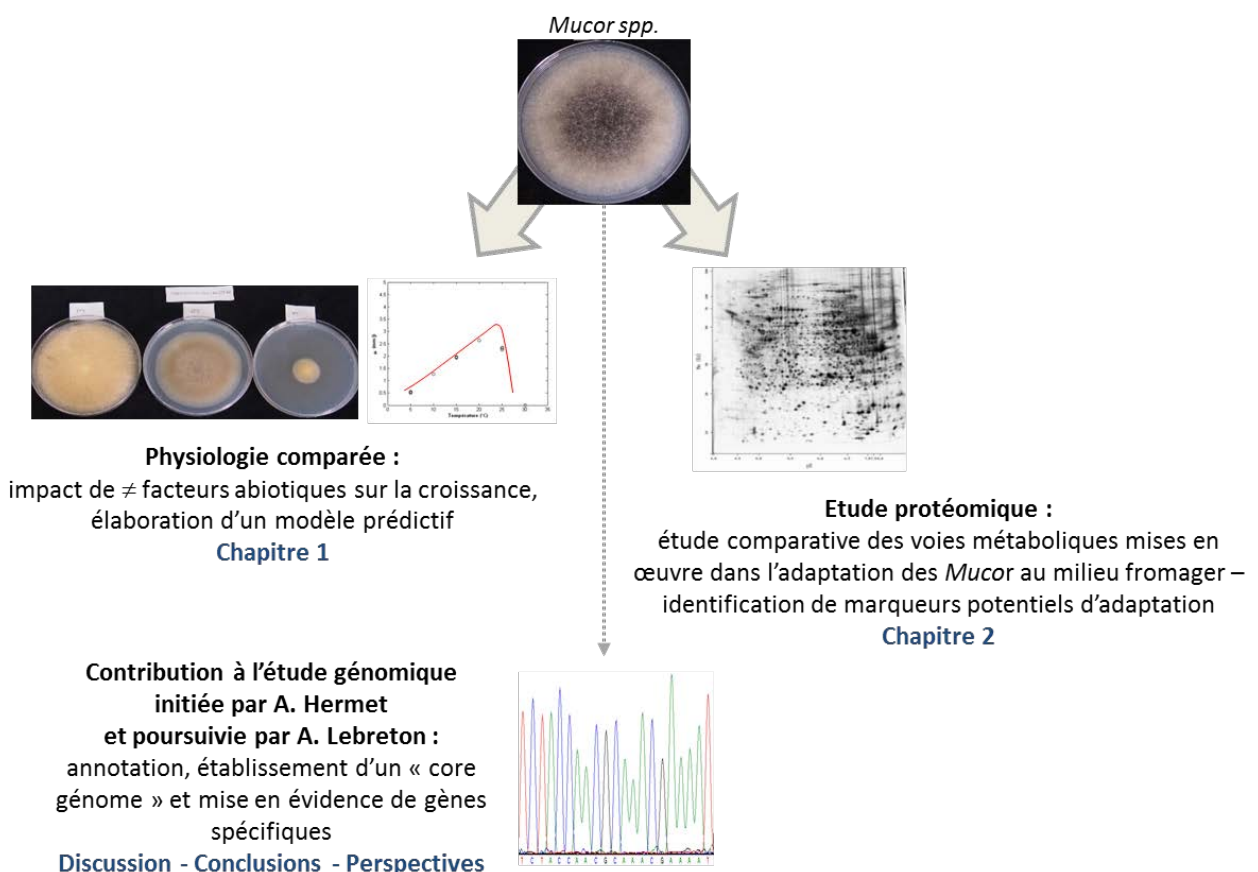


Figure 14 : Présentation schématique des axes de la thèse.

Les résultats de cette étude ont permis d'établir un modèle prédictif de croissance de ces espèces en fonction du milieu et des facteurs abiotiques et de sélectionner des conditions pour la réalisation d'une étude protéomique dont l'objectif était de nous aider à déterminer les bases métaboliques et moléculaires des différences de comportement mises en évidence lors de la phase physiologique (**chapitre 2**). Cette approche protéomique a été complétée par des analyses exploratoires de métabolomique.

L'ensemble des résultats obtenus est analysé dans une dernière partie (**discussion-conclusions-perspectives**) qui ouvre sur les perspectives de ce travail, en lien étroit avec l'étude génomique actuellement menée dans le cadre de la thèse d'université d'Annie Lebreton.

CHAPITRE I. Etude physiologique

Dans le cadre de cette partie « physiologie », les cinétiques de croissance radiale et l'aspect morphologique macroscopique de six souches fromagères technologiques et/ou contaminantes et d'une souche endophyte non-fromagère (**Tableau 2**) ont été déterminées sur milieu synthétique Potato Dextrose Agar (PDA) en fonction de différents facteurs environnementaux (températures de 0 °C à 50 °C, pH de 3 à 10, a_w de 0,98 à 0,82 et teneur en NaCl de 0% à 20%). La sélection de ces souches a été réalisée, d'une part, sur la base des travaux effectués par A. Hermet (Hermet *et al.*, 2012, 2013) et, d'autre part, avec la volonté d'avoir une espèce « outgroup », d'où le choix de l'endophyte *M. endophyticus*.

Tableau 2 : Identification et origine des souches des différentes espèces de *Mucor* utilisées.

Espèce	Référence	Origine et rôle	Source bibliographique
<i>Mucor fuscus</i>	UBOCC-A-109160	Fromage Espèce technologique	Hermet <i>et al.</i> , 2012, 2014
<i>M. lanceolatus</i>	UBOCC-A-109153	Fromage Espèce technologique	Desmaures, 2014
<i>M. racemosus</i>	UBOCC-A-109155	Espèce soit contaminante soit technologique	Le Bars-Bailly <i>et al.</i> , 1999 ; Fox <i>et al.</i> , 2004 ; Leclercq- Perlat <i>et al.</i> , 2007 ; Pitt and Hocking, 2009
<i>M. circinelloides</i>	CBS 277-49 V2.0	Espèce contaminante	Lazar <i>et al.</i> , 2014 ; Lee <i>et al.</i> , 2014
<i>M. brunneogriseus</i>	CBS 129-41	Fromage Espèce contaminante	Le Bars-Bailly <i>et al.</i> , 1999 ; Hermet <i>et al.</i> , 2012 ;
<i>M. spinosus</i>	CBS 226-32	Fromage Espèce contaminante	Marin <i>et al.</i> , 2014
<i>M. endophyticus</i>	CBS 385-95	Végétal Espèce non fromagère	RuYong and Hong, 1995 ; Walther <i>et al.</i> , 2013

Les données de croissance radiale collectées ont été compilées avec Microsoft Excel puis traitées avec le logiciel MatLab (Applied Maths, MatLab R2013b) afin d'effectuer une modélisation de la croissance en deux étapes. La première étape (modélisation primaire dérivée du modèle de Rosso) a consisté à générer les cinétiques de croissance (rayons mycéliens en fonction du temps) pour la totalité des souches et des conditions abiotiques testées (environ 2000 cinétiques) et à déterminer 3 paramètres clés : la phase de latence ou inflexion initiale (λ , exprimée en jours), la vitesse de croissance radiale (μ , exprimée en

mm.jour⁻¹) et le rayon maximal ou épaulement (R_{max} , exprimé en mm) (**Figure 15** ; Rosso *et al.*, 1995). La deuxième étape (modélisation secondaire) a permis, au travers de la mise en relation des vitesses de croissance (μ) obtenues pour chaque souche et chaque valeur de facteur abiotique (X), d'élaborer des modèles prédictifs de croissance et de calculer les valeurs cardinales : vitesse de croissance optimale (μ_{opt}) et valeurs minimales (X_{min}), optimales (X_{opt}) et maximales (X_{max}) de croissance (Dantigny et Bensoussan, 2008).

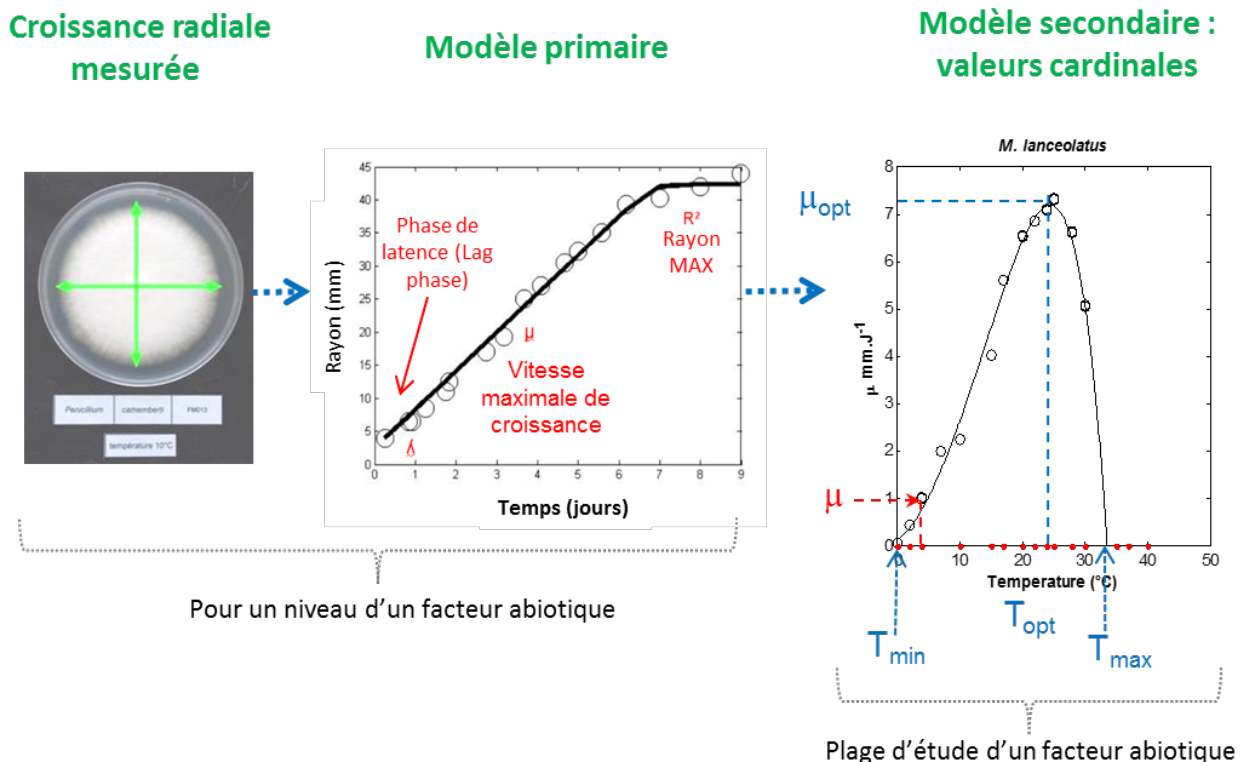


Figure 15 : Principe de détermination des valeurs cardinales de croissance à partir des modèles primaires et secondaires. Exemple du facteur température.

Afin de valider la capacité des modèles élaborés (à partir de données acquises sur milieu PDA) à prédire le comportement de chacune des souches étudiées sur matrices fromagères, la croissance radiale de ces souches a été étudiée dans une dernière phase pour 4 valeurs de température représentatives des conditions de production fromagère (5, 10, 15 et 20°C) sur i) une matrice synthétique mimant le fromage (milieu *Cheese Agar* ; Nielsen *et al.*, 1998 ; Le Dréan *et al.*, 2010 ; Zhang *et al.*, 2010) et ii) sur deux matrices naturelles, la tomme de Savoie (cœur et surface), matrice à pâte pressée non cuite fabriquée avec du lait de vache et la bûche de chèvre frais, matrice à pâte lactique présentant une croûte fleurie. Les valeurs

expérimentales ont été reportées sur les profils obtenus avec le modèle prédictif pour chaque espèce sur milieu PDA.

Une partie de ce travail a été réalisée dans le cadre du stage d'IUT Génie Biologique, option Analyses Biologiques et Biochimiques (2^{ème} année) de Rémy DUGAL, intitulé « Impact de la température sur la croissance de *Mucor* spp. associés aux fromages » (avril-juin 2014).

Ces travaux ont été valorisés au travers de la publication suivante :

Publication n° 2 :

Food Microbiology 56 (2016) 69–79



Contents lists available at [ScienceDirect](#)

Food Microbiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/fm



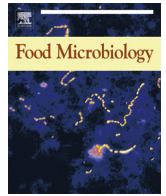
Effect of temperature, pH, and water activity on *Mucor* spp. growth on synthetic medium, cheese analog and cheese



Stéphanie Morin-Sardin ^a, Karim Rigalma ^a, Louis Coroller ^b, Jean-Luc Jany ^a,
Emmanuel Coton ^{a,*}

^a Université de Brest, EA 3882, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne, ESIAB, Technopôle Brest Iroise, 29280 Plouzané, France

^b Université de Brest, EA3882, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne, UMT Spore Risk, IUT Quimper, 6 Rue de l'Université, 29334 Quimper, France



Effect of temperature, pH, and water activity on *Mucor* spp. growth on synthetic medium, cheese analog and cheese



Stéphanie Morin-Sardin ^a, Karim Rigalma ^a, Louis Coroller ^b, Jean-Luc Jany ^a, Emmanuel Coton ^{a,*}

^a Université de Brest, EA 3882, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne, ESIAB, Technopôle Brest Iroise, 29280 Plouzané, France

^b Université de Brest, EA3882, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne, UMT Spore Risk, IUT Quimper, 6 Rue de l'Université, 29334 Quimper, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 June 2015

Received in revised form

10 November 2015

Accepted 30 November 2015

Available online 10 December 2015

Keywords:

Mucor

Growth

Abiotic factors

Cheese

Adaptation

Predictive model

ABSTRACT

The *Mucor* genus includes a large number of ubiquitous fungal species. In the dairy environment, some of them play a technological role providing typical organoleptic qualities to some cheeses while others can cause spoilage. In this study, we compared the effect of relevant abiotic factors for cheese production on the growth of six strains representative of dairy technological and contaminant species as well as of a non cheese related strain (plant endophyte). Growth kinetics were determined for each strain in function of temperature, water activity and pH on synthetic Potato Dextrose Agar (PDA), and secondary models were fitted to calculate the corresponding specific cardinal values. Using these values and growth kinetics acquired at 15°C on cheese agar medium (CA) along with three different cheese types, optimal growth rates (μ_{opt}) were estimated and consequently used to establish a predictive model. Contrarily to contaminant strains, technological strains showed higher μ_{opt} on cheese matrices than on PDA. Interestingly, lag times of the endophyte strain were strongly extended on cheese related matrices. This study offers a relevant predictive model of growth that may be used for better cheese production control but also raises the question of adaptation of some *Mucor* strains to the cheese.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The *Mucor* genus, belonging to the Mucoromycotina subphylum and Mucorales order, includes basal coenocytic fungi. This genus groups many ubiquitous species found in the environment (soil, air, dust), on raw materials or foodstuffs. *Mucor* spp. are regularly encountered as contaminants of meat, fruits, vegetables or processed products, such as dairy products, where their uncontrolled growth may induce undesirable effects including off-flavours (Foschino et al., 1993; Bärtschi and Berthier, 1994), anomalous textures (Montagna et al., 2004; Lugauskas, 2005) or discolorations (Hayaloglu and Kirbag, 2007; Sengun et al., 2008; Pitt and Hocking, 2009). However, several *Mucor* species also present a technological interest, highly contributing to the texture and the sensory characteristics of many fermented products such as cheeses (Huang, 1976; Zhang and Zhao, 2010; Hermet et al., 2012) or sufu (Hesseltine, 1983). These traits are associated with the enzymatic

potential of the *Mucor* spp. especially through the secretion of lipolytic and proteolytic enzymes (Zhang and Zhao, 2010; Yegin et al., 2011). The main *Mucor* species encountered in cheeses are *Mucor circinelloides*, *Mucor fuscus*, *Mucor lanceolatus*, *Mucor plumbeus* and *Mucor racemosus* (Hermet et al., 2012; Marín et al., 2014). *M. fuscus* and *M. lanceolatus* are particularly prominent in dairy products where they play a crucial technological role (Hermet et al., 2012, 2014; Desmasures, 2014). On the other hand, *M. racemosus* and *M. circinelloides* are among the most common cheese contaminants. *M. circinelloides* has been suspected to have caused nausea, vomiting and diarrhea and even a rhinocerebral mucormycosis following contaminated yoghurt ingestion (Lazar et al., 2014; Lee et al., 2014).

Although several *Mucor* species are used for their technological properties or encountered as contaminants in cheese, few data exist to this date regarding their growth behavior (Le Bars-Bailly et al., 1999) and, to our knowledge, no study was directly performed on cheese matrices. Bekada et al. (2008) reported an effect of temperature and water activity (a_w), but no effect of pH on the growth, on synthetic Sabouraud agar medium, of *M. racemosus*

* Corresponding author.

E-mail address: emmanuel.coton@univ-brest.fr (E. Coton).

strains isolated from a Camembert cheese. Other studies strongly suggested an effect of a_w on germination and development of several species used in the cheese production, including *M. racemosus* and *M. circinelloides* (Gervais et al., 1988; Gervais, 1990; Marín et al., 2014). In this context, the aims of this study were: (i) to determine the effect of abiotic factors (temperature, pH and a_w) on the growth of *Mucor* species commonly encountered in the cheesemaking environment, as cardinal values determination may allow for a better control of their development, and (ii) to reveal potential behavior differences among these *Mucor* species, either technological, contaminant or non-cheese related (out-group) that may be associated with adaptation to cheese matrices.

2. Material and methods

2.1. *Mucor* strains

Seven *Mucor* strains from the Université de Bretagne Occidentale Culture Collection, (UBOCC, France; <http://www-tmp.univ-brest.fr/souchotheque/>) or the Centraal Bureau Voor Schimmelcultuur CBS (The Netherlands, <http://www.cbs.knaw.nl>) were used in this study. *Mucor* species selection was based on their known or proposed role in cheesemaking plants or cheese products (Table 1).

Strain identification was confirmed by nuclear ribosomal Deoxyribonucleic Acid Internal Transcribed Spacer region (rDNA ITS) sequencing (Hermet et al., 2012; Walther et al., 2013). Strains were maintained in the dark at 25°C on Potato Dextrose Agar (PDA) medium (Difco Laboratories, USA).

2.2. Spore production

Spore suspensions of each species were used to inoculate Roux flasks (Easy Flask 225 cm² Nunc - Thermofisher Scientific, Denmark) containing 80 mL of PDA medium. After seven day incubation at 25°C, 20 mL of 0.1% Tween were added to each flask. The surface was scraped with a disposable sterile plastic rake in order to collect spores that were then suspended in 0.1% Tween. Spore suspensions of each species were centrifuged at 5000 g for 5 min at 20°C. The supernatant was removed and the pellet of spores resuspended in 3 mL of 15% glycerol. Spores were counted in Malassez cells and the concentrations were adjusted to 10⁷ to 10⁸ spores.mL⁻¹ prior to storage at -80°C until use.

2.3. Growth media

The effect of temperature, pH and a_w on the growth of the 7 selected *Mucor* strains was studied on PDA medium. To validate that temperature effect was similar whatever the medium used, growth assessment were performed at different temperatures (5°C, 10°C, 15°C and 20°C) on Cheese Agar (CA) medium and actual cheeses.

The synthetic PDA medium used was previously described by Sautour et al. (2002). This medium exhibited an a_w ranging from

0.992 to 0.993 and a pH of 5.6 ± 0.2. This medium (25 mL) was poured into 90 mm diameter Petri dishes for the purpose of this study.

CA medium is a synthetic preparation adapted from Hansen and Nielsen (1996) and Nielsen et al. (1998), and developed especially for the growth of cheese related fungi. Briefly, 6.00 g agar (Bio-merieux, France), 7.80 g NaCl, 2.60 g lactose (Sigma Aldrich, USA), 0.65 g of yeast extract (AES Laboratory, France) were added to 222.20 ml of sterile water. pH was adjusted to 5 with HCl 1M (Fisher Scientific, UK) and the resulting solution (solution 1) was autoclaved 15 min at 121°C. In parallel, 26.70 g of anhydrous milk fat (Lactalis, France) were dissolved in 35.60 mL of sterile water and 2.80 mL of lactic acid (Sigma Aldrich, USA). This solution was then added to solution 1. The resulting solution was mixed using a T25 ultra-turrax (IKA, Germany) and 20.40 g of milk protein concentrate (Lactalis, France) were progressively added to obtain a homogeneous mixture. The CA medium was heated 30 min in a water bath at 80°C (Mettler GmbH, Germany), then 25 mL were poured into 90 mm diameter Petri dishes. The obtained medium presents an a_w of 0.970 and a pH of 4.7 ± 0.02.

Two cheese types were also used, namely an unripened Tomme de Savoie and an unripened fresh goat cheese. Tomme de Savoie is an uncooked pressed cheese made with cow milk. In our case it presented a 26.75% fat content, 52.56% fat content/dry matter ratio, 50.89% total dry extract, a_w of 0.955 and pH of 5.4 ± 0.02. Two different parts of this unripened Tomme de Savoie were used, the surface corresponding to the external part of the cheese (called Tomme surface thereafter) and the internal part of the cheese (called Tomme core thereafter). Fresh goat cheese had a bloomy rind, with a 19.97% fat content, 48.27% fat content/dry matter ratio, a 41.37% total dry extract, a_w of 0.975 and pH of 4.5 ± 0.02. For radial growth measurement, 85 ± 5 mm diameter and 0.8 ± 0.1 mm high slices from the cheese surface (Tomme de Savoie and goat cheese) and the cheese internal part (Tomme de Savoie) were positioned in 90 mm diameter Petri dishes.

2.4. Spore inoculation and radial growth measurement

Spore suspensions were diluted into Potato Dextrose Broth solution (Difco Laboratories, USA) at an identical a_w to that of the matrix to be tested (Garcia et al., 2010) in order to obtain a concentration of 10⁶ spores.mL⁻¹. The spore suspension (10 µL) was deposited in the center of the Petri dish containing either synthetic medium or a cheese sample. Petri dishes were then stored in airtight boxes and incubated under different defined conditions (see below). Four Petri dishes were prepared per species and per abiotic condition (independent replications of the whole experimental design). Radial growth of each mycelium was measured daily over two predetermined perpendicular directions until either a 80 mm diameter or a 70 day duration was reached. Given the wide range of growth observed for some species, two measurements a day were usually performed.

Table 1
Mucor strains used in this study.

Species	Strain	Putative role	References ^a
<i>M. fuscus</i>	UBOCC-A-109160	Technological	Hermet et al., 2012, 2014; Desmases, 2014
<i>M. lanceolatus</i>	UBOCC-A-109153	Technological	
<i>M. racemosus</i>	UBOCC-A-109155	Technological or contaminant	Le Bars-Bailly et al., 1999; Fox et al., 2004; Leclercq-Perlat et al., 2007; Pitt and Hocking, 2009,
<i>M. circinelloides</i>	CBS 277-49	Contaminant	Lazar et al., 2014; Lee et al., 2014
<i>M. brunneogriseus</i>	CBS 129-41	Contaminant	Le Bars-Bailly et al., 1999; Hermet et al., 2012; Marín et al., 2014.
<i>M. spinosus</i>	CBS 226-32	Contaminant	
<i>M. endophyticus</i>	CBS 385-95	Endophyte (outgroup)	RuYong and Hong, 1995; Walther et al., 2013

^a References indicating a putative role for the different species tested in this study.

2.5. Impact of abiotic factors on radial growth

The effect of 18 different temperature levels, ranging from 0 to 50°C ± 0.5 (2, 4, 5, 7, 10, 15, 17, 20, 22, 24, 25, 28, 30, 35, 37, 40, 45 and 50°C), on the growth of the 7 selected species was evaluated on PDA medium. On CA medium and cheese matrices, growths were monitored at 5, 10, 15, 20°C. Temperatures were maintained using calibrated incubators (KB240, Binder Scientific, Germany) and controlled overtime using TomProbe mobile probes (AES Chem-unex, France).

Concerning a_w impact, PDA medium water activity was regulated using 2 different solutes: either glycerol or sodium chloride (NaCl), as previously described (Lerici and Nicoli, 1996). Addition of 0–41.6% glycerol (Fisher Scientific, UK; W/W; 0–4.51 mol·L⁻¹) in PDA medium allowed obtaining 11 theoretical different a_w values ranging from 0.840 to 0.993 (Robinson and Stokes, 1965; Resnik and Chirife, 1988). In parallel, addition of 0–16.1% NaCl (Sigma Aldrich, USA; W/W; 0–2.76 mol·L⁻¹) in PDA medium led to 15 other theoretical a_w conditions ranging from 0.850 to 0.994 (Robinson and Stokes, 1965; Resnik and Chirife, 1988). After inoculation, each medium a_w was stabilized by placing each replicate in a 1.5 L closed box with 150 mL NaCl-water solution exhibiting the same a_w

time (days). r_0 was fixed at 2.5 mm since the inoculum diameter was approximately 5 mm. We considered lag time as the time from which mycelial growth was visible (i.e. when the colony diameter was larger than 2. r_0).

Instead of using a direct estimate, lag time (λ) was calculated through a $\ln K$ estimation as suggested by Augustin and Carlier (2000) (equation (2)).

$$\ln K = \ln(\mu \cdot \lambda) \quad (2)$$

Where K is a constant. The re-parametrization of K into $\ln K$ has the advantage of stabilizing the variance of the estimated parameter. When the $\ln K$ seemed to be constant for each couple strain-abiotic factor among all growth kinetics, the hypothesis was tested (see above) and when it was possible, a single $\ln K$ value was estimated.

To quantify the influence of the environmental factors on the growth rate, the gamma concept was used (Zwietering et al., 1992). The optimal growth rate μ_{opt} was assumed to be characteristic of both strain and medium. The relationship between the growth rate (μ) and the 3 tested abiotic factors (temperature, a_w , pH) was assessed using cardinal models (Rosso, 1995; Pinon et al., 2004) (equation (3)).

$$\mu = \mu_{opt(X)} \cdot CM_n(X)$$

$$CM_n(X) = \begin{cases} 0 & X \leq X_{min} \\ \frac{(X - X_{max}) \cdot (X - X_{min})^n}{(X_{opt} - X_{min})^{n-1} \cdot \{(X_{opt} - X_{min}) \cdot (X - X_{opt}) - (X_{opt} - X_{max}) [(n-1) \cdot X_{opt} + X_{min} - n \cdot X]\}} & X_{min} < X < X_{max} \\ 0 & X > X_{max} \end{cases} \quad (3)$$

as the medium one (Sautour et al., 2001). The different media were then incubated at 25°C for up to 70 days. Media a_w and their stability as a function of time of incubation were checked using a water activity meter (FA-st /1, CBX Scientific Instruments, France) on 3 replicates for each solute and a_w level.

As for pH, the impact of 11 different conditions (from pH 1.8 to 13.6) on the selected *Mucor* strain growth was tested on PDA medium. pH values were obtained by adding volumes of 0.2M Na₂HPO₄, 0.1M citric acid, 0.025M borax, 0.25M CAPS, 1M HCl and 0.1M NaOH, to the PDA medium. For each tested pH, 7 replicates were analyzed, 4 replicates for growth monitoring and 3 replicates to check for pH stability over time. The different samples were incubated at 25°C for up to 70 days and the pH stability regularly controlled on agar culture media using a 662–1770 flat-bottom electrode (VWR, France) (Gorski and Ritzert, 1977; Maurice et al., 2011).

2.6. Data analysis and model fitting

A two-step modeling approach was adopted. In the first step, radius of the mycelium was modeled as a function of incubation time using a primary model with latency (Buchanan, 1993, equation (1)):

$$r(t) = \begin{cases} r_0 & , t \leq \lambda \\ r_0 + \mu \cdot (t - \lambda), & t > \lambda \end{cases} \quad (1)$$

Where $r(t)$ is the measured radius at time t , r_0 is the initial radius of the inoculum, μ is the radial growth rate (mm.day⁻¹) and λ the lag

Where X corresponds to the abiotic factors (temperature, a_w , pH), X_{min} is the minimum value of the factor allowing growth, at X_{opt} growth reach its higher value for the studied factor, X_{max} is the maximum value of the factor allowing growth and n is a shape parameter. The n parameter took different values according to the studied abiotic factor, $n = 2$ for temperature (Rosso et al., 1993), $n = 2$ for a_w and $a_{wmax} = 1000$ (Sautour et al., 2001), and $n = 1$ for pH (Rosso, 1995).

The primary and the secondary models were fitted by minimizing the sum of squares of the residual values with NLFIT function of MATLAB R2014 (The MathWorks Inc., USA). Confidence intervals of 95% were obtained by using traditional methods based on a linear approximation with NLPARCI function in MATLAB. A square root transformation of the radial growth rate was used for the secondary modeling (Dantigny and Bensoussan, 2008). To evaluate the model fitting performances, the coefficient of determination (r^2), the Root Mean Square Error (RMSE), and the Akaike Information Criterion (AIC) were computed (Sutherland et al., 1995; Ratkowsky et al., 2004; Akaike, 1971).

For model calibration on cheese media, a $\ln K$ value and a μ_{opt} value were used. The $\ln K$ value was estimated on the kinetics observed at 15°C in dairy media. The μ_{opt} value was estimated by fitting equation (3) on the observed μ values in the same conditions. From these 2 parameters, growth kinetic could be simulated using equation (1), in dairy environment at a given temperature. The μ value was computed for the given temperature with equation (3), using the μ_{opt} value specific of the dairy media and the cardinal values (T_{min} , T_{opt} , T_{max}). The lag was computed using equation (2), the simulated μ value and the $\ln K$ value.

For model prediction validation, independent data were acquired at 5 and 10°C (temperatures used in cheese process) as well as 20°C (laboratory temperature for fungal studies) for CA medium, Tomme de Savoie (surface and core) and goat cheese. Then, the simulated kinetics were compared with the experimentally observed kinetics. The Relative Error (RE) and the Standard Error of Prediction (SEP) were computed to evaluate the accuracy of the model prediction on the tested matrices CA (García-Gimeno et al., 2003; Campos et al., 2005).

2.7. Statistical analysis

In order to test whether the cardinal values are influenced or not by the use of glycerol or NaCl, the likelihood ratio test was used. The model was fitted to estimate the cardinal values for the use of NaCl or glycerol (Unconstrained model, U). The model also fitted with the cardinal values common for the both solutes (Constrained model, C). The fits of the models were compared with a likelihood ratio test and a statistic test, SL, computed as given by equation (4).

$$SL = n \cdot \log(RSS_C) - n \cdot \log(RSS_U) \quad (4)$$

Where n is the number of data, RSS_C is the Residual Square Sum for the Constrained (C) model, and RSS_U is the Residual Square Sum for the Unconstrained (U) model. SL is low when the fixed value of the parameter has no significant incidence on the quality of fitting. When n tends toward infinity, the limiting distribution of SL is Chi square test (χ^2) distributed with 3 degrees of freedom as 3 parameters were constrained (a_{wmin} , a_{wopt} , a_{wmax}). If SL is lower than χ^2 ($\alpha = 0.05$), the difference in the fitting of both models is considered not significant and then the parameter of interest could be equal to the fixed value.

3. Results

3.1. Impact of abiotic factors on the radial growth on PDA medium

3.1.1. Growth kinetics

Regardless of the tested abiotic factor, radial growth kinetics of the 7 *Mucor* strains could be divided into two distinct phases: a lag phase followed by a constant radial growth of the mycelium. In optimal conditions, lag phases were relatively short whereas growth rates were high (data not shown). Under less favorable conditions, lag phases were longer and growth rates were lower. A single $\ln K$ value corresponding to the product of the radial growth

rate (in $\text{mm}\cdot\text{day}^{-1}$) and the lag time (in days) was estimated for each experimental design (i.e. abiotic factor or media) (Table 2). When calculated from several kinetics (temperature, pH, a_w NaCl and a_w glycerol), AIC values were always greater ($+35.3 \pm 0.75\%$, mean \pm standard deviation) than AIC values obtained using a single $\ln K$ for each strain-abiotic factor couple or validation matrix. *M. racemosus*, *Mucor brunneogriseus*, *Mucor spinosus* representative strains exhibited longer lag times than the other species. For a given medium, this simplification implied that the lag time is inversely proportional to the growth rate (Augustin and Carlier, 2000).

3.1.2. Temperature impact

Among the 7 strains, minimal and maximal temperatures for which *Mucor* growth was observed were 0°C (*M. racemosus*, *M. lanceolatus*, *M. circinelloides*, *M. brunneogriseus*, *M. spinosus*) and 37°C (*M. circinelloides* and *Mucor endophyticus*), respectively. Secondary models were fitted to describe growth rate dependence as a function of temperature (ranging from 0 to 50°C) for all strains (Fig. 1). These models also allowed to estimate parameters with biological meanings, i.e. minimum (T_{min}), optimum (T_{opt}) and maximum (T_{max}) growth temperatures for each studied strains (Ross et al., 2010). Residual variability between predictive and observed values of growth was low (RMSE values ranged from 0.09 to 0.12 $\text{mm}\cdot\text{day}^{-1}$) and the coefficient of determination (r^2) values were higher or equal to 0.98 for all strains except for *M. endophyticus* (RMSE = 0.36 $\text{mm}\cdot\text{day}^{-1}$ and $r^2 = 0.92$) (Table 3). The estimated values of the parameters, from the model, were T_{min} varying from -5.7 – 2.3 °C, T_{opt} from 21.4 to 29.2°C and T_{max} from 25.8 to 40.9°C (Table 3).

3.1.3. pH impact

M. racemosus, *M. circinelloides* and *M. spinosus* strains grew at the minimal pH tested (1.8) while no development was observed for these strains above pH 11.4, a value at which only *M. racemosus*, *M. circinelloides* and *M. spinosus* strains grew. *M. fuscus*, *M. brunneogriseus*, *M. lanceolatus* and *M. endophyticus* had a slightly narrower range of growth allowing pH. A good quality of fit was obtained as suggested by the low RMSE value ≤ 0.27 $\text{mm}\cdot\text{day}^{-1}$ and the r^2 values greater or equal to 0.96, except for the *M. circinelloides* strain (RMSE = 0.53 $\text{mm}\cdot\text{day}^{-1}$ and $r^2 = 0.86$). The estimated parameter values were pH_{min} varying from 2.39 to 3.20, pH_{opt} from 4.92 to 6.58 and pH_{max} from 8.52 to 10.92 (Table 3). *M. fuscus*, *M. lanceolatus*, *M. racemosus*, *M. spinosus* and *M. endophyticus* exhibited the lowest pH_{max} (from 4.92 to 5.37); whereas, *M. circinelloides* and *M. brunneogriseus* presented the highest values (6.49 and 6.58, respectively).

Table 2

$\ln K$ values obtained for the 7 studied *Mucor* strains for the temperature, pH and a_w factors on PDA medium. For a_w , results obtained for glycerol and sodium chloride are included. $\ln K$ values obtained for the predictive optimal growth rates were compared to experimental data for all tested strains for the abiotic factor temperature on cheese agar medium, unripened goat cheese and unripened Tomme (surface and core). Indicated species were represented by the following strains: UBOCC-A-109160 (*Mucor fuscus*); UBOCC-A-109153 (*Mucor lanceolatus*); UBOCC-A-109155 (*Mucor racemosus*); CBS 219-41 (*Mucor brunneogriseus*); CBS 226-32 (*Mucor spinosus*); CBS 277-49 (*Mucor circinelloides*); CBS 385-95 (*Mucor endophyticus*).

	$\ln K$ value							
	PDA				Cheeses			
	Temperature	pH	a_w NaCl	a_w glycerol	CA medium	Goat cheese	Tomme surface	Tomme core
<i>M. fuscus</i> ^a	-22.15	1.01	-31.53	-25.28	0.79	1.43	1.55	1.78
<i>M. lanceolatus</i> ^a	-14.28	-44.63	-13.37	0.04	0.86	2.15	2.08	2.14
<i>M. racemosus</i> ^{a,b}	1.74	-16.34	-27.01	-14.27	1.75	2.87	2.20	2.54
<i>M. brunneogriseus</i> ^b	1.96	-0.02	-19.95	1.32	1.37	2.49	2.21	2.24
<i>M. spinosus</i> ^b	1.37	1.02	-29.39	0.54	1.28	2.34	1.36	1.30
<i>M. circinelloides</i> ^b	-52.73	-45.34	-44.53	-58.38	0.92	2.15	1.24	1.42
<i>M. endophyticus</i> ^c	-0.11	1.36	-42.38	0.73	1.47	2.45	1.96	2.23

^a Technological species.

^b Contaminant species.

^c Endophyte species.

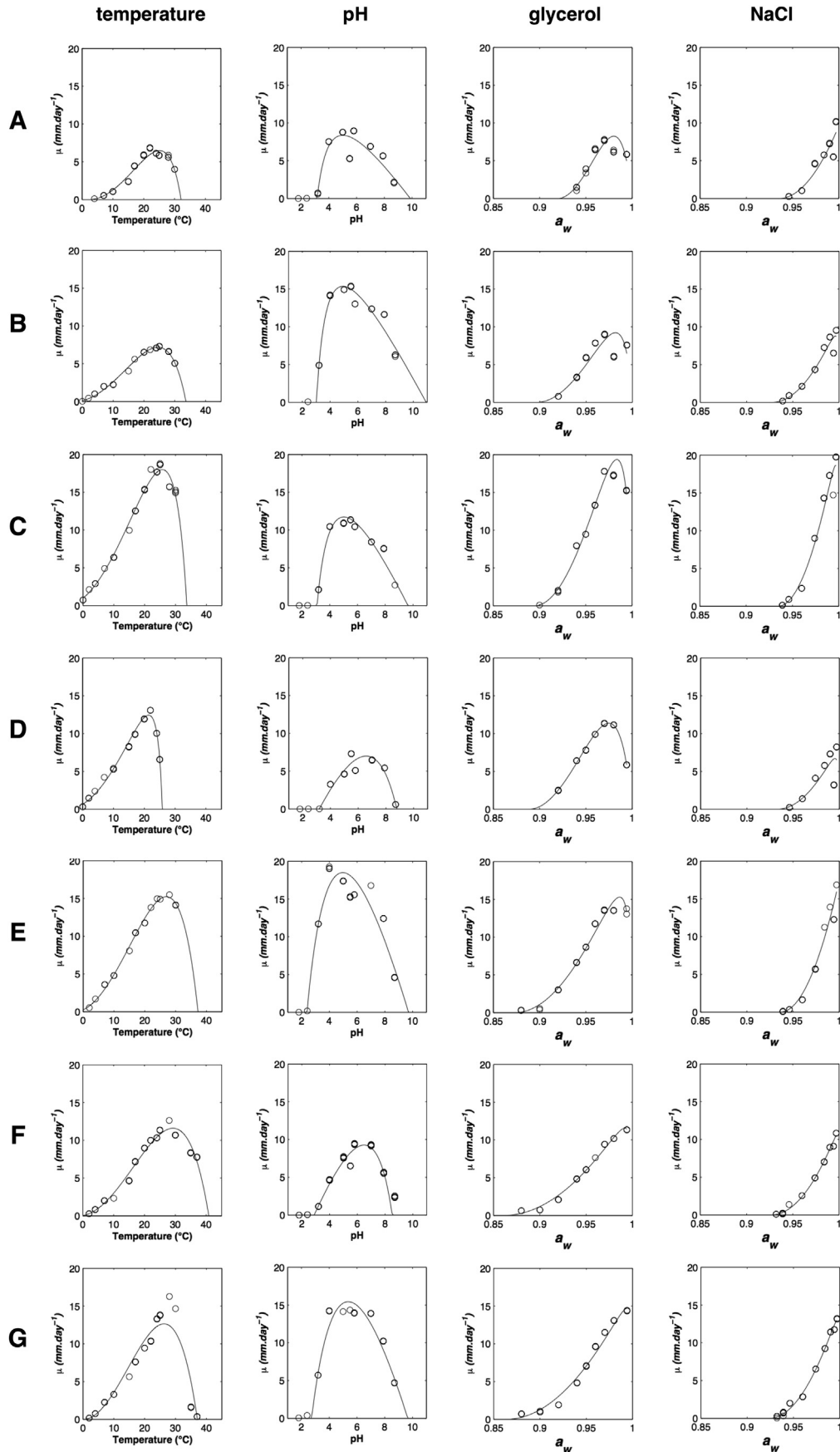


Fig. 1. Secondary models obtained for the 7 studied *Mucor* species for temperature, pH and a_w on PDA medium. Radial growths ($\text{mm}\cdot\text{day}^{-1}$) of *Mucor fuscus* (A), *M. lanceolatus* (B), *M. racemosus* (C), *M. brunneogriseus* (D), *M. spinosus* (E), *M. circinelloides* (F) and *M. endophyticus* (G) expressed in function of temperature (column temperature), pH (column pH) and a_w (columns glycerol and NaCl respectively). Symbols: (○) experimental data; (—) calculated values according to equation (3).

Table 3
Cardinal values and optimal growth rates (μ_{opt}) determined for the 7 studied *Mucor* strains for temperature, pH and a_w (mean \pm standard deviation) on PDA medium. For a_w , results obtained for glycerol and sodium chloride are presented. The accuracy of the cardinal model was evaluated using the root mean square error (RMSE) and the coefficient of determination r^2 values. Studied strains: *Mucor fuscus* UBOCC-A-109160; *M. lanceolatus* UBOCC-A-10915; *M. racemosus* UBOCC-A-109155; *M. brunneogriseus* CBS 219-41; *M. spinosus* CBS 226-32; *M. circinelloides* CBS 277-49; *M. endophyticus* CBS 385-95. For a_w , X_{max} was set at 1.000.

Abiotic factor	Species*	Cardinal values			μ_{opt} (\pm SD) mm.day ⁻¹	r^2	RMSE
		X_{min} (\pm SD)	X_{opt} (\pm SD)	X_{max} (\pm SD)			
Temperature (°C)	<i>M. fuscus</i> ^a	2.3 (\pm 0.5)	25.1 (\pm 0.4)	32.1 (\pm 0.5)	6.5 (\pm 0.2)	0.98	0.12
	<i>M. lanceolatus</i> ^a	-2.4 (\pm 0.5)	24.5 (\pm 0.2)	33.6 (\pm 0.8)	7.2 (\pm 0.3)	0.99	0.10
	<i>M. racemosus</i> ^{d, b}	-5.7 (\pm 0.4)	25.7 (\pm 0.3)	33.7 (\pm 0.7)	18.0 (\pm 0.2)	0.99	0.11
	<i>M. brunneogriseus</i> ^b	-5.2 (\pm 0.5)	21.4 (\pm 0.3)	25.8 (\pm 0.2)	12.4 (\pm 0.3)	0.98	0.12
	<i>M. spinosus</i> ^b	-2.7 (\pm 0.4)	27.0 (\pm 0.4)	37.2 (\pm 1.6)	15.2 (\pm 0.2)	0.99	0.09
	<i>M. circinelloides</i> ^b	-1.2 (\pm 0.5)	29.2 (\pm 0.4)	40.9 (\pm 0.7)	11.6 (\pm 0.2)	0.98	0.13
	<i>M. endophyticus</i> ^c	0.2 (\pm 0.9)	26.3 (\pm 0.8)	37.1 (\pm 0.1)	12.6 (\pm 0.6)	0.92	0.36
pH	<i>M. fuscus</i> ^a	3.16 (\pm 0.02)	5.01 (\pm 0.26)	9.87 (\pm 0.37)	8.37 (\pm 0.37)	0.96	0.25
	<i>M. lanceolatus</i> ^a	3.02 (\pm 0.06)	4.92 (\pm 0.20)	10.92 (\pm 0.46)	15.36 (\pm 0.45)	0.98	0.19
	<i>M. racemosus</i> ^{d, b}	3.09 (\pm 0.03)	5.01 (\pm 0.13)	9.64 (\pm 0.16)	11.73 (\pm 0.31)	0.99	0.15
	<i>M. brunneogriseus</i> ^b	3.20 (\pm 0.01)	6.58 (\pm 0.12)	8.78 (\pm 0.02)	6.98 (\pm 0.26)	0.98	0.16
	<i>M. spinosus</i> ^b	2.39 (\pm 0.01)	4.97 (\pm 0.16)	9.71 (\pm 0.23)	18.50 (\pm 0.64)	0.97	0.27
	<i>M. circinelloides</i> ^b	2.89 (\pm 0.17)	6.49 (\pm 0.36)	8.52 (\pm 0.53)	9.27 (\pm 0.95)	0.86	0.53
	<i>M. endophyticus</i> ^c	2.74 (\pm 0.17)	5.37 (\pm 0.25)	9.66 (\pm 0.30)	15.44 (\pm 0.64)	0.97	0.27
a_w (glycerol)	<i>M. fuscus</i> ^a	0.920 (\pm 0.005)	0.980 (\pm 0.002)	–	8.25 (\pm 0.51)	0.86	0.23
	<i>M. lanceolatus</i> ^a	0.896 (\pm 0.007)	0.982 (\pm 0.002)	–	9.23 (\pm 0.61)	0.85	0.29
	<i>M. racemosus</i> ^{d, b}	0.895 (\pm 0.001)	0.984 (\pm 0.001)	–	19.37 (\pm 0.40)	0.99	0.13
	<i>M. brunneogriseus</i> ^b	0.889 (\pm 0.001)	0.975 (\pm 0.000)	–	11.38 (\pm 0.08)	1.00	0.04
	<i>M. spinosus</i> ^b	0.873 (\pm 0.003)	0.986 (\pm 0.001)	–	15.30 (\pm 0.51)	0.98	0.20
	<i>M. circinelloides</i> ^b	0.861 (\pm 0.003)	1.010 (\pm 0.003)	–	19.29 (\pm 2.14)	0.98	0.14
	<i>M. endophyticus</i> ^c	0.863 (\pm 0.004)	0.994 (\pm 0.003)	–	14.70 (\pm 0.91)	0.97	0.20
a_w (NaCl)	<i>M. fuscus</i> ^a	0.935 (\pm 0.004)	1.000 (\pm 2.088)	–	9.64 (\pm 1243.40)	0.93	0.26
	<i>M. lanceolatus</i> ^a	0.928 (\pm 0.002)	0.996 (\pm 0.002)	–	8.79 (\pm 0.45)	0.97	0.18
	<i>M. racemosus</i> ^{d, b}	0.934 (\pm 0.002)	0.997 (\pm 0.001)	–	18.67 (\pm 1.01)	0.98	0.23
	<i>M. brunneogriseus</i> ^b	0.933 (\pm 0.006)	0.995 (\pm 0.003)	–	6.70 (\pm 0.70)	0.81	0.38
	<i>M. spinosus</i> ^b	0.936 (\pm 0.001)	1.000 (\pm 1.285)	–	17.56 (\pm 1416.74)	0.98	0.20
	<i>M. circinelloides</i> ^b	0.927 (\pm 0.001)	0.998 (\pm 0.002)	–	10.74 (\pm 1.12)	0.99	0.13
	<i>M. endophyticus</i> ^c	0.924 (\pm 0.001)	0.997 (\pm 0.002)	–	13.01 (\pm 0.76)	0.99	0.15

^a Technological species.

^b Contaminant species.

^c Endophyte species.

3.1.4. a_w impact

Water activity impact on fungal radial growth was studied by adding glycerol or NaCl in media in order to test a_w ranging from 0.840 to 0.993. A growth rate decrease was observed when lowering a_w with either solute. With glycerol, the minimal a_w for which growth was observed corresponded to 0.881 (*M. circinelloides*, *M. spinosus* and *M. endophyticus*). Growths were observed at $a_w > 0.920$ for all strains except for *M. fuscus* that required $a_w > 0.940$. When using NaCl, the minimal a_w allowing for growth was 0.890 (*M. endophyticus*) and a development was observed at $a_w > 0.920$ for all strains except for *M. brunneogriseus* and *M. fuscus* that required $a_w > 0.935$. Minimum (a_{wmin}), and optimum (a_{wopt}) water activities were estimated for each solute and *Mucor* strains. A good fit quality of the secondary model was observed for data modeling using either glycerol or NaCl with RMSE lower than 0.30 mm/days for both solutes. In addition r^2 values were always higher than 0.80 with an average value of 0.95. When using glycerol, a_{wmin} varied from 0.861 to 0.920 and optimum values from 0.975 to 1.000 (Fig. 1, Table 3).

When using NaCl, cardinal values showed a more restrictive range with a_w min ranging from 0.924 to 0.936 and a_{wopt} from 0.997 to 1.000 (Fig. 1, Table 3). For all strains, except for *M. fuscus*, a significant difference between the cardinal values of growth obtained using glycerol and the cardinal values of growth obtained using NaCl (DoF = 4, $\chi = 9.4877$, $\alpha = 0.05$) was observed.

3.2. Calibration and validation of the predictions on cheese media

Using cardinal values obtained on PDA medium and μ values obtained at 15°C on CA medium and cheese matrices, μ_{opt} were

estimated and consequently used to model radial growth rate for each *Mucor* strains on CA medium and cheese matrices.

On PDA medium, optimal growth rates for the temperature factor appeared to be higher for *M. circinelloides*, *M. brunneogriseus* and *M. spinosus* as well as for the *M. endophyticus* strain (11.60–15.24 mm.day⁻¹) compared to strains belonging to the technological species *M. fuscus* and *M. lanceolatus* (6.47 and 7.18 mm.day⁻¹, respectively). The *M. racemosus* strain displayed the maximum optimal growth rate (18.00 mm.day⁻¹).

Optimal growth rate values, as estimated on the validation matrices (CA medium and cheeses), were generally lower than optimal growth rate values obtained on PDA medium except for three strains (Fig. 2 and Table 4). Indeed, compared to μ_{opt} obtained on PDA medium, the *M. fuscus* strain had an increased μ_{opt} in CA medium (+58%), Tomme de Savoie (+74% for Tomme core; +41% for Tomme surface) and goat cheese (+7%); the *M. lanceolatus* strain had increased values on Tomme (+16% for Tomme core; +18% for Tomme surface) and to a lower extent, the *M. circinelloides* strain on CA medium (+5%). Among the different strains, *M. brunneogriseus* and *M. spinosus* strains had the highest decrease of μ_{opt} on validation matrices compared to PDA medium (with a maximum of -51% for *M. spinosus* on Tomme surface) (Fig. 2 and Table 4). *M. racemosus* and *M. circinelloides* strains displayed a relative stability regarding their μ_{opt} whatever the medium/matrix considered (variations < 26%) (Fig. 2 and Table 4).

Overall, lag times and growth rates were well predicted according to low RE and SEP values (Tables S1 and S2). *M. brunneogriseus* and *M. racemosus* lag time and radial growth predictions were in agreement with the experimental observations at 5, 10 and 20°C (Fig. 3) with SEP values comprised between 1.2

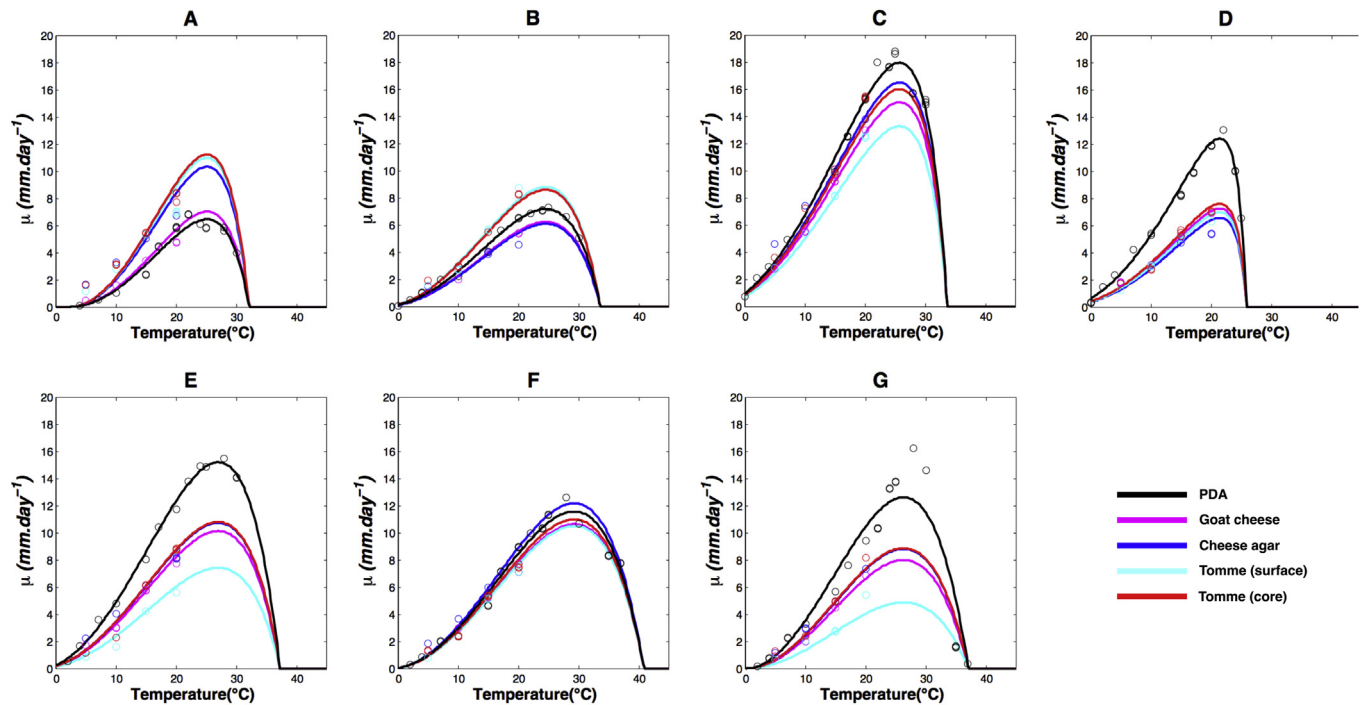


Fig. 2. Predictive secondary models obtained for the 7 studied *Mucor* species on the 5 tested growth media. Optimal radial growth ($\text{mm}\cdot\text{day}^{-1}$) was expressed in function of temperature. Species: *Mucor fuscus* (A), *M. lanceolatus* (B), *M. racemosus* (C), *M. brunneogriseus* (D), *M. spinosus* (E), *M. circinelloides* (F) and *M. endophyticus* (G). Media: PDA (black), cheese agar (dark blue), unripened goat cheese (pink), unripened Tomme surface (light blue) and unripened Tomme core (red). Symbols: (○) experimental data; (—) calculated values according to equation (3). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Table 4

Calibration and validation of the predictive model developed on PDA medium. Predictive optimal growth rates were compared to experimental data obtained for all studied strains for the temperature factor on Cheese Agar medium, unripened goat cheese and unripened Tomme de Savoie (surface and core). The accuracy of the prediction was evaluated using the SEP, RE, RMSE and AICC values. Studied strains: *Mucor fuscus* UBOCC-A-109160; *M. lanceolatus* UBOCC-A-10915; *M. racemosus* UBOCC-A-109155; *M. brunneogriseus* CBS 219-41; *M. spinosus* CBS 226-32; *M. circinelloides* CBS 277-49; *M. endophyticus* CBS 385-95.

	CA medium			Goat cheese			Tomme surface			Tomme core			PDA	RMSE	AICC (\pm SD)
	μ_{opt} (\pm SD)	SEP	RE	μ_{opt} (\pm SD)	SEP	RE	μ_{opt} (\pm SD)	SEP	RE	μ_{opt} (\pm SD)	SEP	RE	μ_{opt} (\pm SD)		
<i>M. fuscus</i> ^a	10.3 \pm 0.02	0.53	-0.56	7.0 \pm 0.04	0.20	-0.20	11.0 \pm 0.02	0.40	-0.36	11.3 \pm 0.05	0.46	-0.50	6.5 \pm 0.21	0.43	147.67 \pm 3.08
<i>M. lanceolatus</i> ^a	6.1 \pm 0.17	0.22	-0.11	6.2 \pm 0.02	0.08	0.00	8.8 \pm 0.06	0.14	-0.03	8.6 \pm 0.06	0.18	-0.09	7.2 \pm 0.16	0.2	14.69 \pm 6.06
<i>M. racemosus</i> ^{a,b}	16.5 \pm 0.00	0.27	-0.11	15.1 \pm 0.04	0.03	0.00	13.3 \pm 0.05	0.13	-0.06	16.0 \pm 0.64	0.22	-0.09	18.0 \pm 0.33	0.2	44.08 \pm 6.01
<i>M. brunneogriseus</i> ^b	6.6 \pm 0.02	0.16	-0.03	7.3 \pm 0.02	0.09	-0.03	7.0 \pm 0.00	0.08	0.04	7.6 \pm 0.43	0.11	0.01	12.4 \pm 0.29	0.55	186.17 \pm 2.10
<i>M. spinosus</i> ^b	10.8 \pm 0.03	0.21	-0.10	10.2 \pm 0.01	0.12	-0.03	7.4 \pm 0.00	0.17	0.09	10.8 \pm 0.02	0.21	0.09	15.2 \pm 0.22	0.48	149.83 \pm 2.54
<i>M. circinelloides</i> ^b	12.2 \pm 0.01	0.28	-0.10	10.7 \pm 0.01	0.11	-0.07	10.5 \pm 0.13	0.09	0.05	11 \pm 0.16	0.14	-0.02	11.6 \pm 0.29	0.16	57.49 \pm 6.90
<i>M. endophyticus</i> ^c	8.8 \pm 0.01	0.17	-0.14	8.0 \pm 0.02	0.11	-0.05	4.9 \pm 0.08	0.26	-0.24	8.9 \pm 0.07	0.20	-0.14	12.6 \pm 0.62	0.44	170.83 \pm 2.71

^a Technological species.

^b Contaminant species.

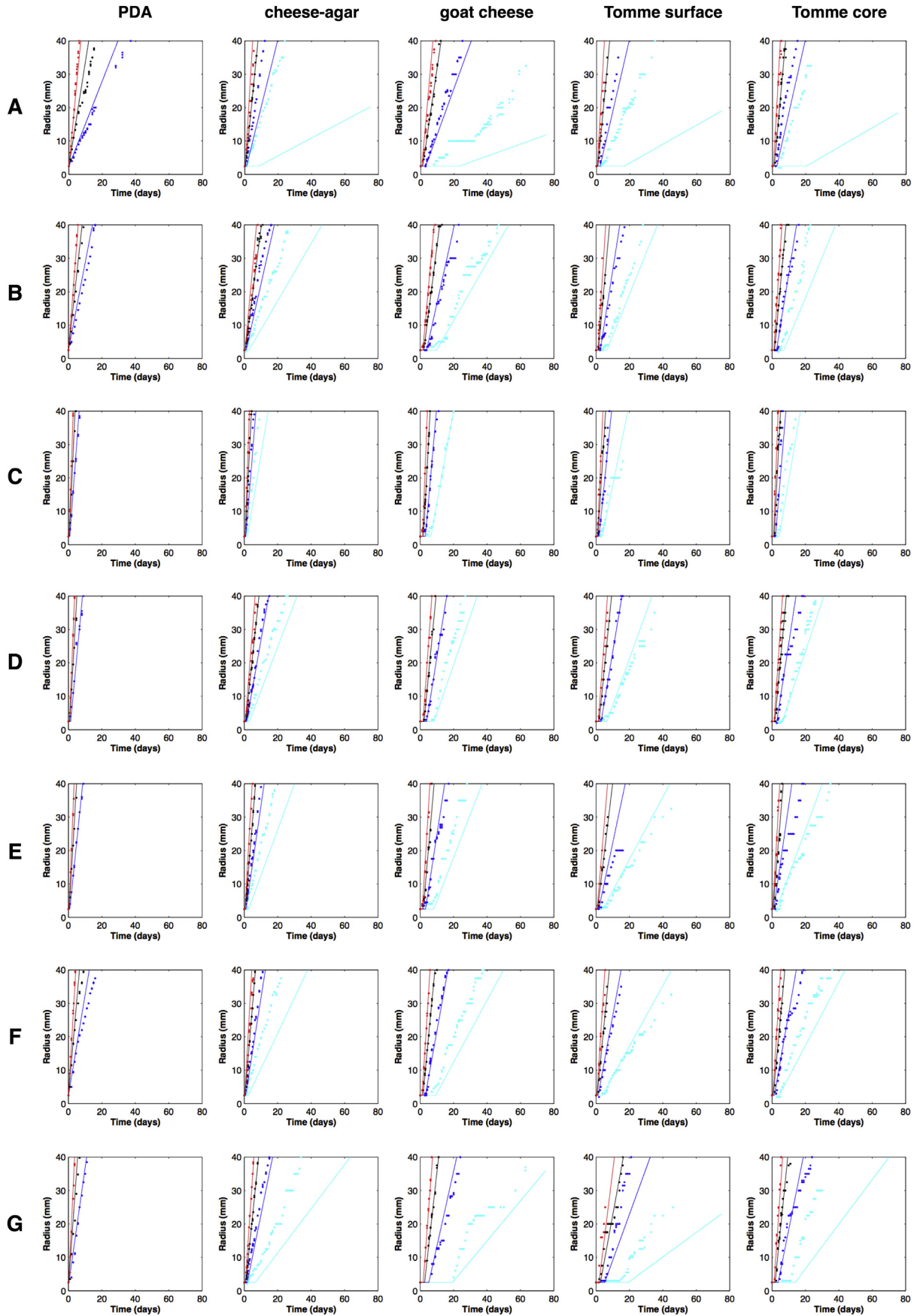
^c Endophyte species.

and 7.6 mm (Table S2). For *M. circinelloides*, *M. lanceolatus* and *M. spinosus* lag times at all temperatures and radial growth at 10 and 20°C appeared correctly predicted while radial growths of these species were slightly underestimated by the model at 5°C (SEP values comprised between 1.0 and 12.2 mm) (Table S2, Fig. 3). Regarding *M. endophyticus* and *M. fuscus* lag times and radial growths appeared correctly predicted at 10 and 20°C but were underestimated at 5°C on most of the media (SEP values comprised between 1.1 and 17.0 mm) (Table S2, Fig. 3). Both temperature and medium effects on lag times were observed. Concerning the temperature effect, lag times were higher at 5°C than at higher temperatures. Considering the medium effect, lag times were the lowest on PDA and the highest on goat cheese.

Noteworthy, *M. endophyticus* lag times were much higher on cheese related matrices (CA medium, goat cheese and Tomme) than on PDA.

4. Discussion

Mucor spp. are regularly encountered as contaminants in a large variety of food products (Foschino et al., 1993; Bärtschi and Berthier, 1994; Montagna et al., 2004; Lugauskas, 2005; Hayaloglu and Kirbag, 2007; Sengun et al., 2008; Pitt and Hocking, 2009) but numerous species also present a high technological interest, particularly in the cheese industry (Hermet et al., 2012, 2014). Despite their negative or positive impacts, *Mucor* spp. growth behavior has not been well documented. In this study, the effect of abiotic factors, namely temperature, pH and a_{wv} , on lag times and growth rates of several *Mucor* strains representative of technological and contaminant species encountered in the dairy industry was determined on synthetic PDA medium and on cheese related matrices. To cover the diverse physicochemical environmental conditions encountered during cheese production, with



temperature varying from 4 to 30°C, pH from 4.0 to 6.0, a_w from 0.950 to 0.990 and NaCl concentration from 1.5 to 3%, a large spectrum of values was tested.

The primary model fitted accurately the growth kinetics whatever the studied species and media.

For a given medium, the use of a single $\ln K$ value implies that the lag time is inversely proportional to the growth rate (Augustin and Carlier, 2000). At a single spore concentration, lag time includes both germination plus early hyphal elongation. Nevertheless, most studies focusing on mold growth, including this one, have been performed using inocula containing high spore numbers (Huchet et al., 2013; Dagnas et al., 2014). In this case, the observed population lag time is a single value corresponding to the shortest lag time observed. It is important to keep in mind that this population lag time may be different from the actual lag time of a fungal contaminant on a food product for which the colonization is initiated by low spore numbers.

The secondary model, based on studies by Rosso et al. (1993, 1995) and Pinon et al. (2004), integrating a square root transformation of the radial growth rate as suggested by Dantigny and Bensoussan (2008), correctly predicted growth rates associated with the different tested abiotic factors values. As expected, the various representative *Mucor* strains investigated in the present study were characterized as fast growing fungi: μ_{opt} calculated for the seven strains when cultured on PDA were high, varying for example for the temperature factor from 6.5 (± 0.21) mm.day⁻¹ (*M. fuscus*) to 18 (± 0.33) mm.day⁻¹ (*M. racemosus*). They exhibited higher growth rates than most of other foodborne fungi. Indeed, μ_{opt} for the temperature factor calculated for the *P. camemberti* and *Penicillium roqueforti* ascomycetes, cultured on PDA in similar conditions, were only 2.60 (± 0.06) mm.day⁻¹ and 4.51 (± 0.06) mm.day⁻¹ respectively (Rigalma, personal communication) whereas the minimal μ_{opt} obtained in this study was 6.5 (± 0.21) mm.day⁻¹ for the technological species *M. fuscus*. Pitt and Hocking (1999) suggested that the absence of septae in hyphae of these coenocytic Mucoromycotina probably facilitates rapid translocation of nutrients and organelles between sites of growth, resulting in a rapid development. The rapid growth of Mucoromycotina species has led some authors to describe their ecological strategy as ruderal or R-selected (Cooke and Rayner, 1984; Magan and Aldred, 2007). This ruderal strategy is associated with rapid growth, rapid commitment to reproduction, utilization of easily assimilable resources and non-persistence. It can be opposed to stress-tolerant and combative strategies characterizing ascomycetes and basidiomycetes, respectively (Cooke and Rayner, 1984). This stress avoidance and rich media preference strategy means that *Mucor* species are encountered in early stages of ecological succession in the environment. Nevertheless, in the particular rich cheese environment they can persist throughout cheese ripening.

Noteworthy, only a few number of studies estimated these values for *Mucor* species (Le Mens, 1996; Sautour et al., 2002; Bekada et al., 2008). The growth parameters calculated by Sautour et al. (2002) and Bekada et al. (2008) for *M. racemosus* with an optimal growth rate of 13.3 mm/day at 20–25°C, an optimal a_w of 0.985, an optimal pH of 4.5–5, a minimum a_w of 0.91 and a minimum temperature of -4 °C are concordant with the values obtained for this study selected *M. racemosus* strain using our secondary model, although 3 different strains were used in the 3

studies. Most of the *Mucor* species analyzed in this study displayed a mesophilic behavior with an optimal temperature comprised between 21.4°C and 29.2 °C with however, low T_{min} . For *M. circinelloides*, *M. endophyticus* and *M. spinosus*, there was a shift of T_{min} , T_{opt} and T_{max} towards higher temperatures. *M. endophyticus* has been defined as a thermoresistant fungus (RuYong and Hong, 1995) while the ability to grow at temperature close to 37°C makes *M. circinelloides* a potent pathogen that colonizes animal and human organs (de Hoog et al., 2000; Walther et al., 2013). The ability to grow at low temperatures (even lower than 0°C) of the different tested *Mucor* species, except for *M. fuscus* and *M. endophyticus*, is an important feature for growth on cold stored foods.

As for other fungal species (Bekada et al., 2008, 2013), *Mucor* spp. growth tended to be steady and optimal in a large range of pH, a trend that could not be taken into account by the model derived from Rosso. Although the latter observation showed that pH, contrarily to a_w and temperature, is not among the most limiting factors, it would be interesting to test other models. Noteworthy, the use of Dantigny's pH model (Dantigny et al., 2014) only provided overall a slightly better description of the plateau (data not shown).

Regarding a_w , none of the seven studied *Mucor* strains had the ability to grow at a_w values lower than 0.86. This result is in accordance with other observations (Panasencko, 1967; Pitt and Hocking, 1999). More recently, Bekada et al. (2013) reported a development inhibition of zygomycetes such as *Rhizopus* and *Mucor* for water activities inferior to 0.92, whereas numerous ascomycetous foodborne fungal species have the capacity to grow at lower a_w values (<0.80). This inability to grow at low a_w values contrasts with the behavior of the xerophilic ascomycetes known to cause spoilage at water activity values below 0.75 (Pitt and Hocking, 1999) such as in bakery products and confectionary. Noteworthy, the solute used to modify the water activity of a medium can have an impact on the growth of filamentous fungi (Lahlali et al., 2005). In this context, a significant difference between the effects yielded by glycerol and NaCl was observed in this study for all *Mucor* species except for the *M. fuscus* representative strain. Such differences were noticed by Marín et al. (2014) who described a better tolerance to non-ionic stress (glycerol) than to ionic stress (salt). Toxic effect of the NaCl ions has already been demonstrated included in fungi resulting among other factors from a competition phenomenon at the membrane level (Rengel, 1992; Niu et al., 1996; Gómez et al., 1996; Prista et al., 1997).

Overall, the different tested *Mucor* strains had the ability to grow under pH, a_w and temperature conditions commonly encountered during the cheesemaking process. However, cheese is a unique substrate with high protein and fat content harboring a microbial community which can be complex (Irlinger and Mounier, 2009). To estimate the performance of the model designed on PDA medium, model predictions were then compared for the temperature factor with data obtained from experimentally inoculated matrices corresponding. These matrices corresponded, on one hand, to a medium mimicking cheese and, on the other hand, to actual unripened cheeses. In this context, 2 cheese matrices were selected, Tomme de Savoie for which *Mucor* spp. are classically used for the ripening process (Desmaures, 2014) and goat cheeses, frequently contaminated by *Mucor* spp. (Montagna et al., 2004).

Fig. 3. Observed and estimated growth kinetics of the 7 studied *Mucor* species on the 5 tested growth media at different temperatures. Species: *Mucor fuscus* (A), *M. lanceolatus* (B), *M. racemosus* (C), *M. brunneogriseus* (D), *M. spinosus* (E), *M. circinelloides* (F) and *M. endophyticus* (G). Temperatures: 5°C (light blue), 10°C (dark blue), 15°C (black) and 20°C (red) on PDA (column PDA), cheese agar (column cheese-agar), unripened goat cheese (column goat cheese), unripened Tomme surface (column Tomme surface) and unripened Tomme core (column Tomme core). Symbols: (●) experimental data; (—) calculated values according to equations (1)–(3). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Temperatures tested varied from 5 to 20°C to cover the ripening step which generally occurs between 8 and 15°C.

Data collection on cheese media at 15°C, along with cardinal values obtained on synthetic medium, allowed for good predictions of growth kinetics at different temperatures. However, in order to improve predictions, cardinal values have to be obtained using an optimal medium that does not limit the growth. In the present study *M. fuscus* growth rate was underestimated and lag phase was overestimated because growth of the *M. fuscus* strain on PDA medium was limited compared to cheese based media. A cheese mimicking medium, such as the CA medium, would be a more pertinent choice for modeling this species growth behavior.

Interestingly, growth of *M. racemosus*, *M. brunneogriseus*, *M. spinosus*, *M. circinelloides* and *M. endophyticus* strains was lowered on unripened cheeses compared to growth on synthetic medium PDA or on the CA medium. On the opposite, strains belonging to the technological species *M. fuscus* and *M. lanceolatus* had higher growth rates on Tomme de Savoie (both Tomme surface and Tomme core) than on goat cheese, CA and PDA media. Concerning goat cheese, the observed lower rate could be explained by the cheesemaking process as it corresponds to a lactic curd, hence a lower pH and presence of organic acids known for their antifungal properties (Schnürer and Magnusson, 2005). Moreover, *M. fuscus* and *M. lanceolatus*, which had by far the lowest optimal growth rates on synthetic medium (PDA), had optimal growth rates similar to other strains on Tomme (surface and core) (Table 4). *M. fuscus* exhibited the second most important optimal growth rate on these two cheese matrices after *M. racemosus*, the fastest growing strain in all conditions. Interestingly, at temperatures commonly used for Tomme ripening (10 and 15°C), *M. fuscus* and *M. lanceolatus* had shorter lag phases on Tomme (surface and core) than on other media and than most of other species tested on Tomme. This preferential growth of the strains belonging to species regularly used as technological strains for Tomme making could be due to adaptation of these strains to cheese and more specifically to the Tomme habitat (Hermet, personal communication). Indeed, some fungal species only known from cheeses, such as *P. camemberti*, *F. domesticum*, *Scopulariopsis flava* and *Sporendonema casei* are thought to be adapted to the particular cheese habitat (Ropars et al., 2012). The adaptation of these species might arise from a domestication process involving the acquisition of key fermentative activities and the loss of functions (Ropars et al., 2012). Even more ubiquitous species, not only encountered in cheeses, such as *P. roqueforti*, might have “come to cheese recently and may represent species that have an origin as contaminants of cheese, or that are in the process of domestication” (Ropars et al., 2012). Some domestication mechanisms were already described in fungi such as in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* in which differentiation has been found according to different food processes (bread, beer, wine or sake) (Fay and Benavides, 2005; Legras et al., 2007; Sicard and Legras, 2011). The cheese environment was also the place for horizontal gene transfers that have possibly played a role in fungal domestication (Gibbons and Rinker, 2015) as shown for *Penicillium* species (Cheeseman et al., 2014; Ropars et al., 2015). It would be of interest to investigate whether or not *M. fuscus* and *M. lanceolatus* are encountered in other substrates than cheeses and if their genomes harbor domestication imprint.

The predictive model developed in the present study may be applied not only to the selected technological representative strains but to a larger panel (e.g. different *M. fuscus* and *M. lanceolatus* strains) in order to select ripening adjunct exhibiting both technological abilities and fast growth rates. Furthermore, although cheesemaking of typical products is highly dependent on specific processes, this predictive model of growth could also represent a potent tool to define adjustments of abiotic parameters allowing for

a better and faster ripening of the considered cheese, which can be of interest from an economical point of view. Moreover, these adjustments may favor the development of technological strains over contaminants. For example, considering the growth kinetics obtained on Tomme, a temperature decrease of the ripening phase, if compatible with organoleptic requirements, is likely to specifically promote the growth of technological strains. Nevertheless, given cheese ecosystem complexity, the influence of biotic parameters, including cheese microbiote composition and microbial interactions (Le Bars-Bailly et al., 1999), should also be taken into account.

The growth predictive model developed in this study allowed to determine cardinal values for temperature, a_w and pH for 7 strains representative of species that play either a positive or negative role in the cheese industry. This model could contribute to optimize the use of technological *Mucor* spp. and better control the contaminating ones, by adjusting abiotic parameters during ripening process. Interestingly, growth patterns and morphological differences were observed on synthetic media and cheeses according to the considered *Mucor* strains and abiotic conditions. The obtained results for the technological *M. fuscus* and *M. lanceolatus* species, especially in comparison to those of the *M. endophyticus* endophyte, raise the question of an adaptation to the cheese matrix. The molecules supporting this putative adaptation are actually under investigation through proteomic and molecular approaches.

Acknowledgments

S. Morin-Sardin acknowledges a salary financing by the Schering Plough company. The authors are thankful to the following structures for kindly supplying cheeses or information on manufacturing processes: R&D Lactalis (France), Société Fromagère de Riblaire (France), Laitière de Haute-Savoie (France) and Les fruitières de la Chapelle d'Abondance et de Bogève (France). We would like to thank Rémi Dugal for technical assistance and Philippe Dantigny for fruitful discussions.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2015.11.019>.

References

- Akaike, H., 1973. Information theory and an extension of the maximum likelihood principle. In: Petrov, B.N., Csáki, F. (Eds.), 2nd International Symposium on Information Theory, Tsahkadsor, Armenia, USSR, September 2–8, 1971. Akadémiai Kiadó, Budapest, pp. 267–281.
- Augustin, J.C., Carlier, V., 2000. Mathematical modelling of the growth rate and lag time for *Listeria monocytogenes*. Int. J. Food Microbiol. 56, 29–51.
- Bärtschi, C., Berthier, J., 1994. Evolution of the surface fungal flora of Reblochon cheese. Lait. 74, 105–114.
- Bekada, A.M.A., Benakriche, B., Hamadi, K., Bensoltane, A., 2008. Modelling of effects of water activity, pH and temperature on the growth rate of *Mucor racemosus* isolated from soft Camembert cheese. World J. Agri. Sci. 4, 790–794.
- Bekada, A.M.A., Saada, D., Chabane, L.A., Cheriguene, A., Benakriche, B., 2013. Substitution effect of the mesophilic lactic starter by the thermophilic ones on the contamination of standard soft cheese camembert by *Mucor* sp. World J. Dairy Food Sci. 8 (1), 45–50.
- Buchanan, R.L., 1993. Predictive food microbiology. Trends Food Sci. Technol. 4, 6–11.
- Campos, D.T., Marks, B.P., Powell, M.R., Tamplin, M.L., 2005. Quantifying the robustness of a broth-based *Escherichia coli* O157:H7 growth model in ground beef. J. Food Prot. 68, 2301–2309.
- Cheeseman, K., Ropars, J., Renault, P., Dupont, J., Gouzy, J., Branca, A., Brygoo, Y., 2014. Multiple recent horizontal transfers of a large genomic region in cheese making fungi. Nat. Commun. 5.
- Cooke, R.C., Rayner, A.D.M., 1984. Ecology of Saprotrophic Fungi. Longman, London and New York, p. 415.
- Dagnas, S., Onno, B., Membré, J.M., 2014. Modeling growth of three bakery product spoilage molds as a function of water activity, temperature and pH. Int. J. Food

- Microbiol. 186, 95–104.
- Dantigny, P., Bensoussan, M., 2008. The logarithmic transformation should be avoided for stabilising the variance of mould growth rate. *Int. J. Food Microbiol.* 121, 225–228.
- Dantigny, P., Burgain, A., Deniel, F., Bensoussan, M., 2014. A model for the effect of pH on the growth of chalk yeasts. *Int. J. Food Microbiol.* 186, 49–54.
- de Hoog, G.S., Guarro, J., Gené, J., Figueras, M.J., 2000. *Atlas of Clinical Fungi*, second ed. Centraalbureau voor Schimmeltculturen (CBS).
- Desmaures, N., 2014. CHEESE. Mold-ripened Varieties. *Encyclopedia of Food Microbiology*, second ed., pp. 409–415.
- Fay, J.C., Benavides, J.A., 2005. Evidence for domesticated and wild populations of *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genet.* 1, 66–71.
- Foschino, R., Garzaroli, C., Ottogalli, G., 1993. Microbial contaminants cause swelling and inward collapse of yoghurt packs. *Lait* 73, 395–400.
- Fox, P.F., McSweeney, P.L., Cogan, T.M., Guinee, T.P. (Eds.), 2004. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. General Aspects, vol. 1. Academic Press.
- García, D., Ramos, A.J., Sanchis, V., Marín, S., 2010. Modelling mould growth under suboptimal environmental conditions and inoculum size. *Food Microbiol.* 27, 909–917.
- García-Gimeno, R.M., Hervás-Martínez, C., Barco-Alcalá, E., Zurera-Cosano, G., Sanz-Tapia, E., 2003. An artificial neural network approach for *Escherichia coli* O157:H7 growth estimation. *J. Food Sci.* 68, 639–645.
- Gervais, P., 1990. Water activity: a fundamental parameter for aroma production by microorganisms. *Appl. Microbiol. Biot.* 33, 72–75.
- Gervais, P., Bensoussan, M., Grajek, W., 1988. Water activity and water content: comparative effects on the growth of *Penicillium roqueforti* on solid substrate. *Appl. Microbiol. Biot.* 27, 389–392.
- Gibbons, J.G., Rinker, D.C., 2015. The genomics of microbial domestication in the fermented food environment. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 35, 1–8.
- Gómez, M.J., Luyten, K., Ramos, J., 1996. The capacity to transport potassium influences sodium tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 135, 157–160.
- Gorski, T.W., Ritzert, R.W., 1977. pH measurements of agar culture media by using a flat-bottom electrode. *Appl. Environ. Microbiol.* 34, 242–243.
- Hansen, B.V., Nielsen, P.V., 1996. Development of a semi-synthetic cheese medium for fungi using chemometric methods. *J. Dairy Sci.* 80, 1237–1245.
- Hayaloglu, A.A., Kirbag, S., 2007. Microbial quality and presence of moulds in Kufu cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 115, 376–380.
- Hermet, A., Meheust, D., Mounier, J., Barbier, G., Jany, J.L., 2012. Molecular systematics in the genus *Mucor* with a special regards to species encountered in cheese. *Fungal Biol.* 116, 692–705.
- Hermet, A., Mounier, J., Keravec, M., Vasseur, V., Barbier, G., Jany, J.L., 2014. Application of capillary electrophoresis single-stranded conformation polymorphism (CE-SSCP) analysis for identification of fungal communities in cheese. *Food Microbiol.* 41, 82–90.
- Hesseltine, C.W., 1983. Microbiology of Oriental fermented foods. *Annu. Rev. Microbiol.* 37, 575–601.
- Huang, H., 1976. Enhancement of cheese flavors with microbial esterases. *Bio-technol. Bioeng.* 18, 909–919.
- Huchet, V., Pavan, S., Lochardet, A., Divanac'h, M.L., Postollec, F., Thuault, D., 2013. Development and application of a predictive model of *Aspergillus candidus* growth as a tool to improve shelf life of bakery products. *Food Microbiol.* 36, 254–259.
- Irlinger, F., Mounier, J., 2009. Microbial interactions in cheese: implications for cheese quality and safety. *Curr. Opin. Biotech.* 20, 142–148.
- Lahlali, R., Serrhini, M.N., Jijakli, M.H., 2005. Studying and modeling the combined effect of temperature and water activity on the growth rate of *Penicillium expansum*. *Int. J. Food Microbiol.* 103, 315–322.
- Lazar, S.P., Lukaszewicz, J.M., Persad, K.A., Reinhardt, J.F., 2014. Rhinocerebral *Mucor circinelloides* infection in immunocompromised patient following yogurt ingestion. *Del. Med. J.* 86, 245–248.
- Le Bars-Bailly, S., Bailly, J.D., Brugère, H., 1999. Accidents de fabrication dus aux moisissures en fromagerie. *Rev. Med. Vet.* 150, 413–430.
- Le Mens, P., 1996. Controlling the *mucor*. *Goat J.* 212, 15–24.
- Leclercq-Perlat, M.N., Corrieu, G., Spinnler, H.E., 2007. Controlled production of Camembert-type cheeses: part III role of the ripening microflora on free fatty acid concentrations. *J. Dairy Res.* 74 (02), 218–225.
- Lee, S.C., Billmyre, R.B., Li, A., Carson, S., Sykes, S.M., Huh, E.Y., Mieczkowski, P., Ko, D.C., Cuomo, C.A., Heitman, J., 2014. Analysis of a food-borne fungal pathogen outbreak: virulence and genome of a *Mucor circinelloides* isolate from yogurt. *MBio* 5 e01390–14.
- Legras, J.L., Merdinoglu, D., Cornuet, J.M., Karst, F., 2007. Bread, beer and wine: *Saccharomyces cerevisiae* diversity reflects human history. *Mol. Ecol.* 16, 2091–2102.
- Leric, C.R., Nicoli, M.C., 1996. Chemical and physico-chemical properties affecting the quality and stability of bakery products. *Adv. Food Sci.* 18, 229–233.
- Lugauskas, A., 2005. Potential toxin producing micromycetes on food raw material and products of plant origin. *Bot. Lith.* 7, 3–16.
- Magan, N., Aldred, D., 2007. Why do fungi produce mycotoxins? In: Dijksterhuis, J., Samson, R.A. (Eds.), *Food Mycology*. CRC Press, New York, NY, USA, pp. 121–133.
- Marín, P., Palmero, D., Jurado, M., 2014. Effect of solute and matrix potential on growth rate of fungal species isolated from cheese. *Int. Dairy J.* 36, 89–94.
- Maurice, S., Coroller, L., Debaets, S., Vasseur, V., Le Floch, G., Barbier, G., 2011. Modelling the effect of temperature, water activity and pH on the growth of *Serpula lacrymans*. *J. Appl. Microbiol.* 111 (6), 1436–1446.
- Montagna, M.T., Santacroce, M.P., Spilotos, G., Napoli, C., Minervini, F., Papa, A., Dragoni, I., 2004. Investigation of fungal contamination in sheep and goat cheeses in southern Italy. *Mycopathologia* 158, 245–249.
- Nielsen, M.S., Frisvad, J.C., Nielsen, P.V., 1998. Protection by fungal starters against growth and secondary metabolite production of fungal spoilers of cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 42, 91–99.
- Niu, X., Damsz, B., Kononowicz, A.K., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M., 1996. NaCl-induced alterations in both cell structure and tissue-specific plasma membrane H⁺-ATPase gene expression. *Plant Physiol.* 111, 679–686.
- Panasenko, V.T., 1967. Ecology of microfungi. *Botanical Rev.* 33 (3), 189–215.
- Pinon, A., Zwietering, M., Perrier, L., Membré, J.M., Leporq, B., Mettler, E., Thuault, D., Coroller, L., Stahl, V., Vialette, M., 2004. Development and validation of experimental protocols for use of cardinal models for prediction of microorganism growth in food products. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 1081–1087.
- Pitt, J.L., Hocking, A.D., 2009. *Fungi and Food Spoilage*. Springer Science third edition, pp. 1–503.
- Prista, C., Almagro, A., Loureiro-Dias, M.C., Ramos, J., 1997. Physiological basis for the high salt tolerance of *Debaryomyces hansenii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 4005–4009.
- Ratkowsky, D.A., McKellar, R.C., Lu, X., 2004. Model fitting and uncertainty. *Model. Microb. responses food* 151–196.
- Rengel, Z., 1992. The role of calcium in salt toxicity. *Plant, Cell & Env.* 15, 625–632.
- Resnik, S.L., Chirife, J., 1988. Proposed theoretical water activity values at various temperatures for selected solutions to be used as reference sources in the range of microbial growth. *J. Food Prot.* 51, 419–423.
- Robinson, R.A., Stokes, R.H., 1965. *Electrolyte Solutions*, 2d ed. Butterworth and Co., Ltd, London, p. 158.
- Ropars, J., Cruaud, C., Lacoste, S., Dupont, J., 2012. A taxonomic and ecological overview of cheese fungi. *Int. J. Food Microbiol.* 155, 199–210.
- Ropars, J., de la Vega, R.C.R., López-Villavicencio, M., Gouzy, J., Sallet, E., Dumas, É., Giraud, T., 2015. Adaptive horizontal gene transfers between Multiple cheese-associated fungi. *Curr. Biol.* 25 (19), 2562–2569.
- Ross, T., Olley, J., McMeekin, T.A., Ratkowsky, D.A., 2011. Some comments on Huang, L., 2010. Growth kinetics of *Escherichia coli* O157:H7 in mechanically-tenderized beef. *Int. J. Food Microbiol.* 140, 40–48. *Int. J. Food Microbiol.* 147(1), 78–80.
- Rosso, L., 1995. Convenient model to describe the combined effects of temperature and pH on microbial growth. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 610–616.
- Rosso, L., Lobry, J.R., Flandrois, J.P., 1993. An unexpected correlation between cardinal temperatures of microbial growth highlighted by a new model. *J. Theor. Biol.* 162, 447–463.
- RuYong, Z., Hong, J., 1995. *Rhizomucor endophyticus* sp. nov., an endophytic zygomycetes from higher plants. *Mycotaxon* 56, 455–466.
- Sautour, M., Dantigny, P., Divies, C., Bensoussan, M., 2001. A temperature-type model for describing the relationship between fungal growth and water activity. *Int. J. Food Microbiol.* 67, 63–69.
- Sautour, M., Soares Mansur, C., Divies, C., Bensoussan, M., Dantigny, P., 2002. Comparison of the effects of temperature and water activity on growth rate of food spoilage moulds. *J. Ind. Microbiol. Biot.* 28, 311–315.
- Schnürer, J., Magnusson, J., 2005. Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. *Trends Food Sci. Tech.* 16, 70–78.
- Sengun, I.Y., Yaman, D.B., Gonul, S.A., 2008. Mycotoxins and mould contamination in cheese: a review. *World Mycotoxin J.* 1, 291–298.
- Sicard, D., Legras, J.L., 2011. Bread, beer and wine: yeast domestication in the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *Comptes Rendus Biol.* 334, 229–236.
- Sutherland, J.P., Bayliss, A.J., Braxton, D.S., 1995. Predictive modelling of growth of *Escherichia coli* O157:H7: the effects of temperature, pH and sodium chloride. *Int. J. Food Microbiol.* 25, 29–49.
- Walther, G., Pawlowska, J., Alastruey-Izquierdo, A., Wrzosek, M., Rodriguez-Tudela, J.L., Dolatabadi, S., Chakrabarti, A., de Hoog, G.S., 2013. DNA barcoding in Microales: an inventory of biodiversity. *Persoonia – Mol. Phylogeny Evol. Fungi* 30, 11–47.
- Yegin, S., Fernandez-Lahore, M., Salgado, A.J.H., Guvenc, U., Goksungur, Y., Tari, C., 2011. Aspartic proteinases from *Mucor* spp. in cheese manufacturing. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89, 949–960.
- Zhang, N., Zhao, X.H., 2010. Study of *Mucor* spp. in semi-hard cheese ripening. *J. Food Sci. Tech.* 47, 1–7.
- Zwietering, M.H., Wijtes, T., de Witt, J.C., van't Riet, K., 1992. A decision support system for prediction of the microbial spoilage in foods. *J. Food Prot.* 55, 973–979.

Supplementary tables.

Table S1: RE values as calculated from the comparison between observed and estimated growth kinetics of the 7 studied *Mucor* strains on the 5 tested media at different temperatures. Studied strains: *M. fuscus* UBOCC-A-109160; *M. lanceolatus* UBOCC-A-10915; *M. racemosus* UBOCC-A-109155; *M. brunneogriseus* CBS 219-41; *M. spinosus* CBS 226-32; *M. circinelloides* CBS 277-49; *M. endophyticus* CBS 385-95.

	PDA			CA medium				Goat cheese				Tomme surface				Tomme core			
	10°C	15°C	20°C	5°C	10°C	15°C	20°C	5°C	10°C	15°C	20°C	5°C	10°C	15°C	20°C	5°C	10°C	15°C	20°C
<i>M. fuscus</i> ^t	-0.14	-0.21	0.03	0.68	0.36	-0.02	-0,27	0.61	0.13	-0.02	-0.22	0.58	0.23	-0.04	-0.34	0.64	0.34	-0.07	-0.13
<i>M. lanceolatus</i> ^t	-0.20	-0.18	-0.05	0.37	0.19	-0.04	-0,24	0.16	-0.20	0.02	-0.03	0.22	-0.19	0.07	0.13	0.33	-0.09	-0.01	0.10
<i>M. racemosus</i> ^{t,c}	0.01	-0.08	0.05	0.39	0.18	-0.02	-0,01	0.10	0.01	0.07	0.08	0.07	0.07	0.10	0.11	0.27	0.17	-0.08	0.10
<i>M. brunneogriseus</i> ^c	0.11	0.03	-0.04	0.27	0.06	-0.07	-0,26	0.26	0.00	0.00	-0.06	-0.06	-0.01	-0.04	-0.13	0.02	-0.21	-0.10	-0.12
<i>M. spinosus</i> ^c	0.03	-0.03	0.00	0.38	0.16	-0.04	-0,13	0.33	-0.02	-0.01	-0.14	-0.16	-0.38	-0.09	-0.16	-0.23	-0.47	-0.32	-0.08
<i>M. circinelloides</i> ^c	-0.22	-0.20	0.01	0.41	0.11	-0.09	-0,31	0.34	0.02	-0.01	-0.02	-0.10	-0.19	-0.17	-0.08	0.18	-0.20	-0.16	-0.07
<i>M. endophyticus</i> ^e	-0.19	-0.35	-0.24	0.41	0.22	-0.03	-0,05	0.41	-0.18	0.01	0.02	0.40	0.27	0.11	0.28	0.49	-0.08	-0.07	0.04

^t: technological species; ^c: contaminant species; ^e: endophyte species.

Table S2: SEP values as calculated from the comparison between observed and estimated growth kinetics of the 7 studied *Mucor* strains on the 5 tested media at different temperatures. Studied strains: *M. fuscus* UBOCC-A-109160; *M. lanceolatus* UBOCC-A-10915; *M. racemosus* UBOCC-A-109155; *M. brunneogriseus* CBS 219-41; *M. spinosus* CBS 226-32; *M. circinelloides* CBS 277-49; *M. endophyticus* CBS 385-95.

	PDA			CA medium				Goat cheese				Tomme surface				Tomme core			
	10°C	15°C	20°C	5°C	10°C	15°C	20°C	5°C	10°C	15°C	20°C	5°C	10°C	15°C	20°C	5°C	10°C	15°C	20°C
<i>M. fuscus</i> ^t	3.57	7.05	2.25	16.97	7.75	0.68	5.90	9.21	3.26	1.09	4.98	13.79	4.84	1.13	4.99	16.27	7.16	1.78	4.16
<i>M. lanceolatus</i> ^t	3.90	3.08	1.24	7.91	4.01	1.41	4.68	9.21	3.26	1.09	4.98	4.17	4.57	1.24	2.24	8.84	2.62	2.26	2.55
<i>M. racemosus</i> ^{t,c}	1.95	3.04	0.62	7.55	4.39	1.46	1.31	1.20	2.58	1.20	1.49	3.67	2.51	2.75	2.38	5.37	5.25	3.18	3.52
<i>M. brunneogriseus</i> ^c	2.41	2.06	0.57	5.22	1.52	1.08	4.30	6.43	1.76	1.32	1.84	3.55	1.40	1.32	3.52	3.24	6.79	2.93	1.88
<i>M. spinosus</i> ^c	1.05	1.64	1.34	7.64	2.98	1.04	2.35	6.36	3.97	3.06	2.56	2.59	6.74	1.65	1.45	4.30	12.22	4.22	2.24
<i>M. circinelloides</i> ^c	6.80	6.72	1.25	8.81	2.81	1.32	6.16	7.97	2.00	1.80	0.96	2.68	2.77	2.12	2.86	6.35	6.05	2.19	3.09
<i>M. endophyticus</i> ^e	2.27	5.65	3.20	9.04	3.64	0.78	1.06	8.21	4.57	1.03	1.53	6.39	7.78	3.69	5.23	11.28	6.21	3.54	3.34

^t: technological species; ^c: contaminant species; ^e: endophyte species.

Points saillants :

Les résultats majeurs de cette étude de physiologie comparée sont :

- ↳ L'établissement des cinétiques de croissance de 7 souches de *Mucor* représentative de 7 espèces (technologiques, contaminantes, mixte, endophyte) sur milieu synthétique PDA, milieu mimant le fromage CA et matrices fromagères ;
- ↳ La détermination des valeurs cardinales de croissance de ces 7 souches pour 3 facteurs abiotiques (température, pH, a_w) sur milieu PDA ;
- ↳ L'élaboration d'un modèle prédictif de croissance sur matrices fromagères pour le facteur température ;
- ↳ Des perspectives d'utilisation du modèle prédictif pour optimiser les facteurs abiotiques durant le processus d'affinage ;
- ↳ La mise en évidence de la possible adaptation des souches technologiques à l'environnement fromager.

CHAPITRE II. Etude protéomique

Introduction

Les résultats obtenus au terme de la partie « physiologie » ont permis d'observer des différences au niveau des profils de croissance (par ex. forte latence pour *M. endophyticus*) et des morphologies entre le milieu synthétique PDA, le milieu CA et les matrices fromagères en fonction des souches de *Mucor* et des conditions abiotiques considérées (**Figure 16**). Ces résultats démontrent que les souches appartenant aux espèces technologiques *M. fuscus* et *M. lanceolatus* présentent une meilleure croissance sur matrices fromagères (particulièrement la Tomme de Savoie) et milieu mimant le fromage que sur milieu synthétique ; ce qui n'est pas le cas pour les espèces contaminantes et l'endophyte. L'ensemble de ces éléments soulève la question d'une adaptation voire d'une domestication de ces souches à cet environnement particulier.

M. lanceolatus UBOCC-A-109153 *M. racemosus* UBOCC-A-109155 *M. brunneogriseus* UBOCC-A-109207 *M. endophyticus* CBS 385-95



Figure 16 : Exemples de modifications morphologiques observées après 4 jours à 15 °C pour une même souche en fonction du milieu et pour les différentes souches pour un même milieu.

L'**adaptation** peut être définie comme l'ajustement fonctionnel d'un être vivant à son milieu. On peut distinguer l'adaptation évolutive, qui correspond à une évolution naturelle du génome associée à l'acquisition, la perte ou le développement de caractères, physiologiques ou comportementaux, nouveaux et héréditaires, et la réponse adaptative qui se traduit par la mise en œuvre de mécanismes de régulation de l'expression génique. Ces phénomènes sont souvent associés. Chez les poissons appartenant au sous-ordre des notothenoïdes (dits « poissons des glaces »), l'adaptation aux eaux froides et fortement oxygénées de l'océan austral est associée à plusieurs phénomènes dont une réduction de la diversité moléculaire et fonctionnelle de leurs hémoglobines, transporteurs sanguins du dioxygène ; la présence dans leur système sanguin de glycoprotéines à rôle antigel ou encore une flexibilité accrue de leurs protéines enzymatiques (Beers *et al.*, 2015). L'absence de chitine et de β -glucane chez les formes trophiques de *Pneumocystis jirovecii*, champignon responsable de pneumonies chez des patients immunodéprimés, permet d'améliorer l'absorption des nutriments par contact direct de cellule à cellule ou par endocytose (Ma *et al.*, 2016). Chez *Lactococcus lactis*, les souches « à tropisme » végétal possèdent plusieurs gènes qui ont trait à l'utilisation des polymères végétaux ; gènes qui sont absents chez les souches « laitières » qui ont développé des capacités à utiliser les protéines du lait en tant que source d'acides aminés (Siezen *et al.*, 2005; Makarova *et al.*, 2006). L'évolution des souches « végétales » vers des souches adaptées à l'environnement laitier serait associée à plusieurs autres phénomènes : perte de transposons porteurs de gènes non-indispensables en milieu fromager, sous-expression de gènes impliqués dans le métabolisme de la cellobiose, du galactose et de l'acide uronique, surexpression de transporteurs d'oligopeptides, indispensables pour le transport de peptides caséiniques, ou de protéines impliquées dans le métabolisme de l'azote (Bachmann *et al.*, 2012).

La notion de **domestication** correspond à une adaptation orientée intégrant une interaction prolongée, un contrôle, voire une sélection délibérée de la part des communautés humaines. Elle est de fait plus couramment employée pour les espèces animales ou végétales. Prenons l'exemple de la mutation du gène MSTN codant pour la myostatine chez les bovins, à l'origine d'un développement musculaire exceptionnel (+20% ; Grobet *et al.*, 1997), ou celui du polymorphisme du gène *cdh1* codant une cadhérine épithéliale impliquée dans la résistance à l'infection par le virus de la nécrose pancréatique infectieuse (vNPI) chez le saumon atlantique (Moen *et al.*, 2015) ; modifications qui présentent toutes deux un

intérêt majeur évident en élevage. Les modifications génétiques à l'origine de ce type de changements morphologiques, physiologiques ou comportementaux sont souvent complexes à identifier et, faute de pouvoir caractériser précisément les gènes impliqués, ce sont souvent les zones génomiques à l'origine de traits particuliers qui sont recherchés. Ces zones, auxquelles sont données en génétique le nom de QTL (quantitative trait locus) peuvent, une fois identifiées, être utilisées par l'homme pour assister la sélection d'adaptations d'intérêt. De nombreux QTL ont été décrits ces dernières années chez différentes espèces animales et ont permis d'asseoir un grand nombre de processus de domestication (Dave *et al.*, 2014 ; Gonen *et al.*, 2015). Chez les bovins, la sélection a porté sur des caractéristiques telles que la croissance, la qualité de la viande, la composition du lait, le comportement, la fécondité et la reproduction, la mammite et la pigmentation (Polineni *et al.*, 2006).

Le terme de domestication est couramment employé pour évoquer *S. cerevisiae*, levure chez laquelle a été décrit un certain nombre d'évènements génétiques qui ont progressivement contribué à l'amélioration du potentiel technologique de souches qui sont désormais exploitées pour différentes applications (panification, vinification, brasserie, production de bioéthanol, ...). Parmi ces évènements, citons les exemples, chez les souches utilisées pour la fermentation alcoolique, de l'acquisition du gène *fot* qui, lorsqu'il est exprimé, leur procure un avantage de croissance en augmentant les sources d'oligopeptides assimilables comme source d'azote (Marsit *et al.*, 2015, 2016) ou encore de la translocation chromosomique « XV-t-XVI » qui induit une surexpression de pompes à sulfite durant les premières heures de la fermentation (Zimmer *et al.*, 2014).

II.1. Description des voies métaboliques mises en jeu sur milieu fromager

Sur la base des différences morphologiques et de croissance mises en évidence dans le cadre de l'étude physiologique, nous avons choisi de comparer les protéomes des souches de *M. lanceolatus* (UBOCC-A-109153), *M. racemosus* (UBOCC-A-109155), *M. circinelloides* (CBS 277-49) et *M. endophyticus* (CBS 385-95) après 7 jours de culture à 14 °C sur milieu synthétique Potato Dextrose Agar ou milieu mimant le fromage (Cheese Agar), avec l'objectif de comparer les voies métaboliques impliquées dans la croissance sur milieu fromager et

non-fromager. La température de 14°C a été sélectionnée comme représentative de la phase d'affinage des fromages.

Après un temps de culture de 7 jours à 14°C, des morphologies et des profils de croissance différents ont été observés entre les souches étudiées. Après une phase d'optimisation du protocole (extraction des protéines, isoélectrofocalisation et SDS-PAGE), les protéines exprimées différentiellement sur milieu PDA versus CA ont été analysées, pour chacune des souches, par LC-MALDI TOF/TOF au niveau de la Plateforme Proteogen de l'Université de Caen. Leur identification a été faite grâce au logiciel Mascot en utilisant les génomes de *M. racemosus* UBOCC-A-109155 et *M. lanceolatus* UBOCC-A-109153 séquencés par le LUBEM, et disponibles sur la plateforme ABIMS de la Station de Biologie Marine de Roscoff, ainsi que des bases de données publiques comme NCBI (pour le génome de *M. circinelloides* CBS 277-49). Un total de 209 protéines présentant des variations d'expression ($\geq 1,6$) d'un milieu par rapport à l'autre ont pu être identifiées, avec un nombre particulièrement plus élevé de protéines surexprimées pour la souche technologique *M. lanceolatus* UBOCC-A-10915 sur milieu CA. Des fonctions putatives ont pu être attribuées à la majorité d'entre elles, notamment grâce à une forte homologie (85,2%) avec le protéome de *Saccharomyces cerevisiae*. Des analyses bioinformatiques (String DB, Blast2Go) ont permis de proposer une analyse descriptive complète de ces protéines, de leurs fonctions potentielles et de leurs interactions. Malgré la complexité des deux conditions testées, un aperçu des voies métaboliques mises en jeu sur chacun des milieux par les quatre souches étudiées a pu être obtenu. Le nombre limité de protéines surexprimées communes entre les souches va dans le sens d'une réponse adaptative spécifique d'espèce qui pourrait être liée à des capacités différentes en termes d'adaptabilité aux milieux testés. Les voies métaboliques sont en effet apparues globalement plus actives sur milieu PDA que sur CA pour *M. circinelloides* CBS 277-49 et *M. endophyticus* CBS 385-95, assez similaires entre les deux milieux pour *M. racemosus* UBOCC-A-109155, et plus intense sur milieu CA pour l'espèce technologique *M. lanceolatus* UBOCC-A-109153. Ces observations sont en accord avec les données de physiologie présentées dans la publication n°2.

Quelques protéines communes à certaines souches 2 à 2 ont néanmoins pu être identifiées, comme EF-2 (Elongation factor 2), THOP1 (zinc metalloendopeptidase) ou PHS1 (glycogen phosphorylase). Elles pourraient constituer des marqueurs d'adaptation potentiels.

Ces travaux ont fait l'objet d'une publication, soumise dans la revue Journal of Proteomics :

Publication n° 3 :

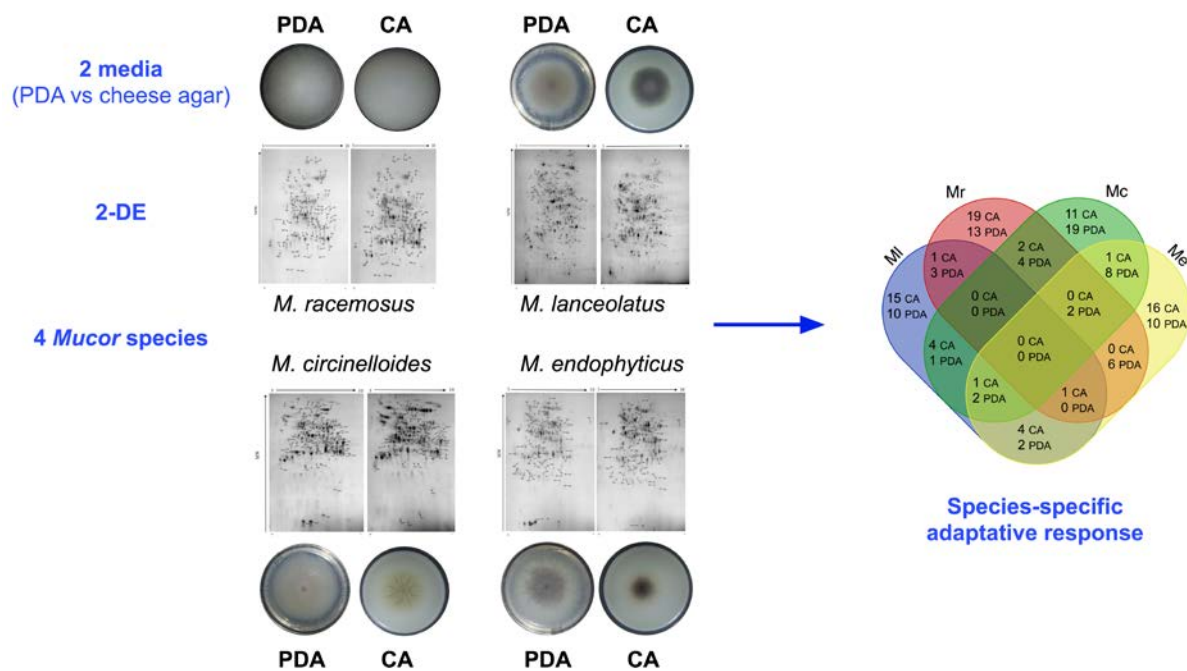
Proteomic analysis of the adaptation of *Mucor* spp. to cheese environment

Morin-Sardin S., Jany J.L., Artigaud S., Berney B., Pichereau V., Coton E., Madec S.

Soumise à Journal of Proteomics le 25/07/2016

Significance

The *Mucor* genus consists of a multitude of poorly known species. In the food context, few species are known for their positive role in the production of various food products, including cheese while others are spoiling agents. The present study focused on the analysis of morphological and proteome differences of different *Mucor* strains known as either technological or contaminant in the cheese industry or non-related (endophyte) on two different media, a synthetic medium and a cheese-mimicking medium, with the aim to study adaptative traits of technological strains to the cheese environment. This work was based on observations we did in a recently published physiological study (Morin-Sardin *et al.*, 2016). One of the important innovative aspect lies in the use for the first time of an extensive 2-DE approach to compare proteome variations for 4 strains on two different media. Results obtained offered an insight in the metabolic mechanisms associated with growth on a given medium and represents an essential step point for more targeted studies.



Highlights

- 4 representative *Mucor* strains were compared in synthetic and cheese-mimicking media
- Differential morphologies and growth capacities were confirmed
- 209 proteins were differentially expressed according to the considered medium
- Main cellular processes changes were described, by homology with *S. cerevisiae*
- Adaptive response appears to be species-specific

Proteomic analysis of the adaptative response of *Mucor* spp. to cheese environment

Stéphanie MORIN-SARDIN¹, Jean-Luc JANY¹, Sébastien ARTIGAUD², Vianney PICHEREAU², Benoît BERNAY³, Emmanuel COTON¹, Stéphanie MADEC¹.

¹Université de Brest, EA 3882 Laboratoire Universitaire de Biodiversité et d'Ecologie Microbienne, IBSAM, ESIAB, Technopôle Brest-Iroise, 29280 Plouzané, France ² Université de Brest, UMR 6539, Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin, LEMAR CNRS/UBO/IRD/Ifremer, Institut Universitaire Européen de la Mer, Université de Bretagne Occidentale, 29280 Plouzané, France

³Plateforme Proteogen SFR ICORE, Université de Caen Basse-Normandie, 14032 Caen Cedex, France

*** Corresponding author:** Stéphanie Madec

Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne EA3882

Technopôle Brest-Iroise, 29280 Plouzané, France

Tel: +33 (0)2.90.91.51.00

Fax: +33 (0)2.90.91.51.01

stephanie.madec@univ-brest.fr

Running title: Adaptative response of *Mucor* spp. to cheese environment

Abstract

In the cheese industry context, *Mucor* species exhibit an ambivalent behavior as some species are essential technological organisms of some cheeses while others can be spoiling agents. Previously, we observed that cheese technological species exhibited higher optimal growth rates on cheese related matrices than on synthetic media [1]. This growth pattern combined with morphological differences raise the question of the adaptation capacity to cheese. In this study, using a comparative proteomic approach, we described the metabolic pathways potentially implicated in the adaptative response of *Mucor* representative strains (technological, contaminant and non-cheese related) to the dairy environment. Overall, 15.8 to 19.0% of the proteomes showed a fold change ≥ 1.6 in Potato Dextrose Agar versus Cheese Agar, a cheese mimicking-medium. 209 differentially expressed proteins were identified by LC MS/MS. No common up-regulated proteins were found in the four species. Network analysis showed that energy and amino-acid metabolisms, stress response and proteasome were the most important pathways. Basal metabolisms seemed to be negatively impacted on CA for species rarely or never encountered in cheeses compared to technological ones. These results tended to confirm the better adaptative response of technological strains to cheese environment and suggest that mechanisms involved could be species-specific.

(199 words)

Key words: *Mucor*, cheese, technological species, proteome, adaptative response.

1. Introduction

Belonging to the Mucoromycota phylum and Mucorales order, the *Mucor* genus is composed of many basal coenocytic fungi species highly prevalent in the environment (soil, air, dust) and on foodstuffs (meat, fruits, vegetables). A large number of these species are considered as spoilers as they can generate defects as off-flavours [2,3], anomalous textures [4,5] or discolorations [6,7,8], on a wide variety of food products. On the contrary, other species (e.g. *Mucor fuscus* or *Mucor lanceolatus*) correspond to technological microorganisms essential to obtain the typical aspect, texture and sensory qualities of many fermented products like cheese or sufu [9,10,11,12,13,14]. These traits are associated with the capacity of *Mucor* spp. to produce lipolytic and proteolytic enzymes [10,15]. Nevertheless, the precise mechanisms responsible for this technological potential are not fully identified to date.

In a recent work focused on the effect of abiotic factors on *Mucor* spp. growth [1], we observed that, contrary to contaminant or non-cheese *Mucor*, strains of *Mucor* belonging to species regularly used for their cheese technological potential showed higher optimal growth rates on cheese analog and cheese matrices compared to synthetic medium. The preferential growth of technological *Mucor* on cheese could be due to adaptation of these strains to dairy environment i) through genetic acquisition of key metabolic activities and/or loss of functions events [16] in comparison to other *Mucor* species and/or ii) through a better plasticity in gene expression leading to differential expression of proteins allowing for a better use of the dairy substrate. Gene acquisition or loss mechanisms have already been described in other fungal species only known from cheeses such as *P. camemberti*, *F. domesticum*, *Scopulariopsis flava* and *Sporendonema casei* [16] but also in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* in which differentiation has been found according to different food technological processes [17,18,19]. In addition, horizontal gene transfers can possibly play a role in fungal adaptation [20] as shown for *Penicillium* species [21,22]. Concerning the expression aspect, like other organisms, fungi react to environmental signals (e.g. nutrient nature and concentration, pH, temperature) and modulate accordingly the expression of their metabolic potential. In *Aspergillus nidulans*, for example, the adaptability to oxidative stress was shown to be associated with expression shifts of genes related to signaling pathways [23].

In this context, global analysis of the proteome through high-resolution mass spectrometry (MS) provides an in depth view of the molecular events that are differentially regulated depending on the conditions and allows to build a bridge between genomics and physiological behaviors [24]. The conventional approach involves protein extraction from the organism of interest followed by digestion with a suitable endoprotease and subsequent analysis by Liquid Chromatography (LC)-MS/MS. If such method was extensively used to study animal cells [25,26], bacterial [27,28] and fungal [29,30] proteomes as well as Post-Translational Modifications (PTMs) [31] in different contexts, its potential was rarely used in *Mucor* for which only few works were published to date [32,33].

In this study, a proteomic approach was used for the first time to assess the adaptative response of different *Mucor* to growth on cheese. Proteomes of technological, contaminant or non-cheese related (outgroup) *Mucor* strains grown on synthetic or cheese analog media were separated using 2-dimensional gel electrophoresis (2-DE). Proteins significantly up-regulated in each assay were then identified by LC MS/MS coupled with database homology searching and protein network analysis.

2. Materials and Methods

2.1. *Mucor* strains

Based on their known or proposed role in cheese production, 3 *Mucor* strains, *M. lanceolatus* UBOCC-A-109153 (technological), *M. racemosus* UBOCC-A-109155 (technological or contaminant), *M. circinelloides* CBS 277-49 (contaminant) as well as an outgroup *M. endophyticus* CBS 385-95 (endophyte) were selected among those used in our previous study [1]. These strains, originating from either the Université de Bretagne Occidentale Culture Collection (UBOCC, France; <http://www-tmp.univ-brest.fr/souchotheque/>) or the Centraal Bureau Voor Schimmelculture CBS (The Netherlands, <http://www.cbs.knaw.nl>) were maintained in the dark at 25°C on Potato Dextrose Agar (PDA) medium (Difco Laboratories, USA). Spore suspensions of each species were produced as previously described by Morin-Sardin *et al.* [1]. Concentrations were adjusted to 10^7 to 10^8 spores.mL⁻¹ prior to storage at -80°C until use.

2.2. Growth media and preparation of cellophane films

The 4 selected *Mucor* strains were grown on synthetic (Potato Dextrose Agar PDA) and cheese-mimicking (Cheese Agar -CA-) media. PDA medium was produced as described by Sautour *et al.* [34] and exhibited an a_w ranging from 0.992 to 0.993 and a pH of 5.6 ± 0.2 . CA medium, a synthetic preparation with an a_w of 0.970 and a pH of 4.7 ± 0.02 developed especially for the growth of cheese related fungi [35,36], was prepared as described by Morin-Sardin *et al.* [1]. After pouring growth media (25 mL) into 90 mm diameter Petri dishes, a cellulose film was deposited on the surface of each medium ensuring that the film was perfectly in contact with the medium surface. Cellophane sheets were previously cut to a diameter slightly greater than that of the Petri dish, boiled for 20 to 30 min in distilled water with EDTA at 0.37 g/L pH 8 and then autoclaved during 20 min at 121°C.

2.3. Spore inoculation and protein extraction

Spore suspensions were diluted into Potato Dextrose Broth solution (Difco Laboratories, USA) to obtain a final concentration of 10^6 spores.mL⁻¹. The spore suspension (10 μ L) was deposited on the cellulose film in the center of the Petri dish containing either PDA or CA media. Petri dishes were then stored in airtight boxes and incubated 7 days at 14°C during

which the radial growth (in cm; [1]) and the morphological appearance were regularly observed. Macroscopic observations were also done after 15 days of culture.

At the end of the incubation period, each mycelium was recovered and crushed manually using a mortar in presence of liquid nitrogen. One hundred milligrams of the obtained powder was homogenized 2 hours at 4 °C in 10 ml of 75 mM Tris–HCl (pH 7) containing 1 tablet of complete EDTA free protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) and 0.07% of DTT (GE Healthcare, Saclay, France). After centrifugation (9000 rpm, 10 min, 4°C), the supernatants containing the solubilized proteins were enzymatically treated by a nuclease mix (GE Healthcare) to remove the nucleic acids. Samples were then precipitated at 4°C using a mixture of TCA/acetone with 20% trichloroacetic acid and 0.14% DTT (1/1:v/v, overnight). After centrifugation (9000 rpm, 10 min, 4 °C), pellets were washed 4 times by adding 400 µl of a solution of Tris–HCl pH 8,8 (50 mM)/80% acetone containing traces of bromophenol blue, used as a pH indicator. Each washing step was followed by centrifugation (9000 rpm, 10 min, 4 °C). The recovered pellets were dried at room temperature and resuspended in 250 µl of Destreak rehydration solution (GE Healthcare, Saclay, France) before being placed at 4°C during 6 h then transferred to Eppendorf at -80° C for further analysis. Finally, protein concentrations were determined using a modified Bradford assay [37] and all samples were adjusted to 1000 µg of proteins in 250 µl of Destreak containing 1% IPG buffer (pH 3–10) (GE Healthcare, Saclay, France).

2.4. Two-dimensional electrophoresis

Prior to isoelectric focusing, IPG strips (pH 3–10, 13 cm, GE Healthcare, Saclay, France) were passively rehydrated with 250 µl of protein solution for 16 h. Isoelectric focusing was conducted using the following protocol: 250 V for 15 min, 500 V for 2 h, 1000 V for 1 h, gradual voltage increase to 8000 V for 2 h 30, then 8000 V for 3 h, and final reduction to 500 V for a maximum of 20 h, all carried out at 20 °C (Ettan IPGphor 3, GE Healthcare, Saclay, France). To prepare the second dimension, corresponding to a SDS-PAGE, strips were incubated in equilibration buffer (50 mM Tris –HCl pH 8.8, 6 M urea, 30% glycerol, 2% SDS and 0.002% bromophenol blue) for two 15 min-periods, first with 1 g.l⁻¹ of DTT and then with 48 g.l⁻¹ of iodoacetamide [38]. IPG strips were then placed on top of a lab-cast 15 cm × 15 cm SDS-PAGE gel containing 12% polyacrylamide, which were run in 10°C thermo-regulated device (Multitemp IV thermostatic circulator, GE Healthcare, Saclay, France) at 10 mA per gel

for 1 h and then 30 mA per gel until complete migration [39]. Gels were subsequently stained with Coomassie Blue (PhastGel, GE Healthcare, Saclay, France) overnight and unspecific coloration was destained by successive baths in a H₂O/methanol/acetic acid: 70/30/7 solution.

2.5. Gel image analysis

The resulting gels were photographed and observed using G:BOX (SynGene). For image analysis, 16-bit level images of the gels were captured in .tif format. A minimum of 6 gels per condition were analyzed. Images were aligned and spots were detected and quantified with the Progenesis SameSpots software (Nonlinear dynamics, v.4.5, Newcastle upon Tyne, UK) using the automated algorithm. ANOVA statistical analyses using the statistics module of SameSpot was done for spot selection by comparing abundance on synthetic medium PDA versus CA. Significantly differentially expressed proteins at $P < 0.02$ and an absolute fold change ≥ 1.6 were targeted.

2.6. Mass spectrometry

Protein spots for which abundance changed between media were excised from gels and prepared for analysis by MS. The excised spots were washed with milliQ water and destained in 50 mM ammonium bicarbonate (BICAM 100 mM / acetonitrile (ACN) (1:1)), and then dehydrated in 100% ACN. Gel pieces were vacuum-dried rehydrated with BICAM containing 0.25 μ g sequencing grade porcine trypsin (Promega, Madison, USA) and incubated 20 h at 37 °C. Peptides were extracted from the gels by alternative washing with 50 mM BICAM and ACN, and with 5% formic acid and ACN as previously described [26,38]. Between each step, the supernatants were pooled (30 μ L) and finally concentrated by evaporation using a centrifugal evaporator (Concentrator 5301, Eppendorf, Hamburg, Germany).

MS experiments were carried out on an AB Sciex 5800 proteomics analyzer equipped with TOF TOF ion optics and an OptiBeam on-axis laser irradiation with 1000 Hz repetition rate. The system was calibrated immediately before analysis with a mixture of Angiotensin I, Angiotensin II, Neurotensin, ACTH clip (1-17), ACTH clip (18-39) and mass precision was better than 50 ppm. After tryptic digestion, the dry sample was resuspended in 10 μ L of 0.1% trifluoroacetic acid (TFA). A 1 μ L volume of this peptide solution was mixed with 10 μ L of

alpha-cyano-4-hydroxy-cinnamic-acid (CHCA) matrix prepared in a diluant solution of 50% ACN with 0.1% TFA. The mixture was spotted on a stainless steel Opti-TOF 384 targets; the droplet was allowed to evaporate before introducing the target into the mass spectrometer. All acquisitions were taken in automatic mode. A laser intensity of 3400 was typically employed for ionizing. MS spectra were acquired in the positive reflector mode by summarizing 1000 single spectra (5 × 200) in the mass range from 700 to 4000 Da. MS/MS spectra were acquired in the positive MS/MS reflector mode by summarizing a maximum of 2500 single spectra (10 × 250) with a laser intensity of 3900. For the tandem MS experiments, the acceleration voltage applied was 1 kV and air was used as the collision gas. Gas pressure medium was selected as settings. The fragmentation pattern was used to determine the sequence of the peptide.

2.7. Protein identification

Mass spectrometry data were analyzed using the Mascot 2.4.0 program (Matrix Science Ltd). The variable modifications allowed were as follows: C-Carbamidomethyl, K-acetylation, methionine oxidation, and dioxidation. "Trypsin" was selected as enzyme, and 3 miscleavages were also allowed. Mass accuracy was set to 300 ppm and 0.6 Da for MS and MS/MS mode respectively. Three different public (*M. circinelloides*, 97356 entries) or in house (*M. lanceolatus*, 17940 entries; *M. racemosus*, 3380 entries) databases were used. Protein identification was considered as unambiguous when a minimum of two peptides matched. All protein sequences were subjected to homology searches using the Blast algorithm available on NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) and Uniprot (<http://www.uniprot.org>), with default parameters. Assignment of information about the biological function of up-regulated proteins identified was done using Blast2Go (<https://www.blast2go.com>, version 3.2.7) then network analysis was performed by homology with the *Saccharomyces cerevisiae* proteome using the Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins (STRING) algorithm (www.string-db.org, version 10.0). Venn diagram analysis was performed to identify the common (intersection) and specific differentially expressed proteins using the online tool of Venny2.0 (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.htm>).

3. Results and discussion

Mucor is a ubiquitous genus including species with different lifestyles and ecological niches. Among the different *Mucor* species, plant endophytes, animal and human pathogens as well as food related species (technological or spoilers) are encountered. Indeed, as shown by Hermet *et al.* [11,12], several *Mucor* species are found among the major cheese associated species either as culture adjuncts in some cheeses (e.g. Tommes or Saint-Nectaire), other species being common contaminants (e.g. in goat cheeses). *M. fuscus* and *M. lanceolatus* may be considered as technological species, whereas *M. racemosus* might be commonly encountered in the cheese environment. The question of adaptation to the cheese environment of the latter species is of interest. This question was reinforced by the recent results obtained by Morin-Sardin *et al.* [1] who showed that, contrary to other *Mucor* species (*M. circinelloides*, *M. brunneogriseus*, *M. endophyticus*, *M. racemosus* and *M. spinosus*), the *M. fuscus* and *M. lanceolatus* technological species had a better growth on Tomme than on any other media.

In order to investigate *Mucor* metabolisms involved in growth on a cheese medium compared to a regular PDA medium, we chose a 2-DE approach to get an overview of proteome changes between growth on PDA and on a cheese-mimicking medium (CA) in 4 strains representative of 4 *Mucor* species. PDA medium is characterized by its high carbohydrate content (starch, sucrose, dextrose) and traces of B and C vitamins whereas CA contains characteristic components of dairy products, lactose (0.65%), milk proteins (5.1%), anhydrous milk fat (6.7%), lactic acid (0.7%) and salt (1.95%). The 4 selected *Mucor* species included: *M. lanceolatus*, a technological species first described by Hermet *et al.* [11] that might be introduced to cheese manufactures since it has not been described elsewhere; *M. racemosus*, a species that has sometimes been described as technological [11,40] but most often considered as a cheese spoiling agent, *M. circinelloides* sometimes encountered as a dairy product contaminant [41,42] and involved in animal as well human mucormycosis [43,44] and *M. endophyticus*, a plant endophyte, that to our best knowledge has never been reported on cheese and therefore used as an outgroup.

3.1. Radial growth and phenotypes

After 7 and 15 days of culture at 14 °C clear morphological differences in the mycelial appearance were observed both between the various strains and for each strain when comparing growth on PDA vs CA media (**Figure 1**).

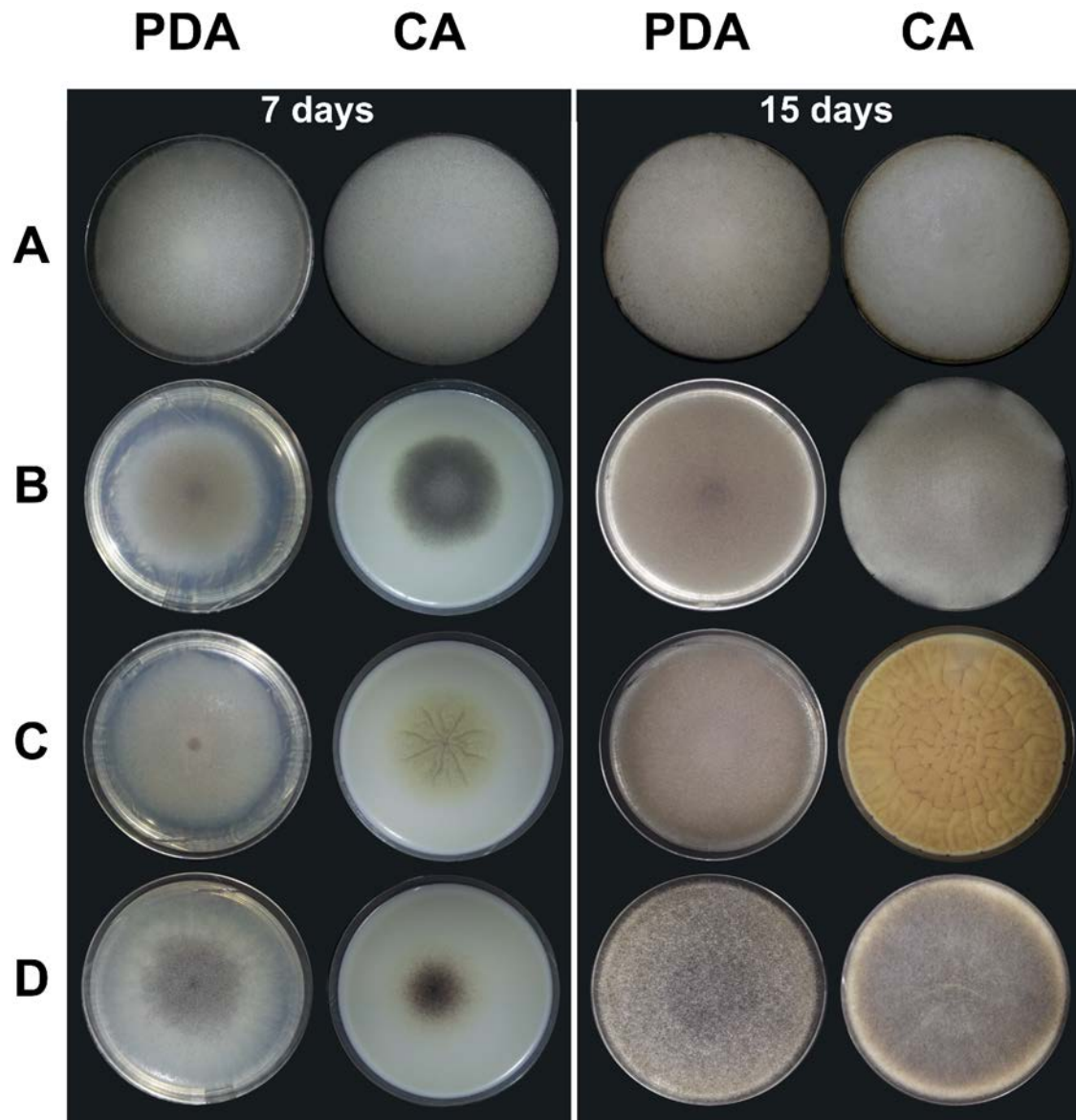


Figure 1. *Mucor* strains grown 7 days (left) and 15 days (right) at 14 °C on potato dextrose agar (PDA) and cheese agar (CA) media. **(A)** *M. racemosus* UBOCC-A-109155; **(B)** *M. lanceolatus* UBOCC-A-109153, **(C)** *M. circinelloides* CBS 277-49, **(D)** *M. endophyticus* CBS 385-95.

Among the 4 tested species, *M. racemosus* UBOC-A-109155 mycelium was the one presenting the weakest morphological differences between the 2 media. Its mycelium was however denser on CA medium. *M. lanceolatus* UBOCC-A-109153 mycelium was greyish yellow on PDA while it was anthracite grey on CA on which it produced a larger amount of asexual spores. *M. circinelloides* CBS 277-49 mycelium displayed a very pale greyish yellow color in PDA, while it produced an intense yellow-orange mycelium with a “toad skin” appearance on CA. Finally, *M. endophyticus* CBS 385-95 produced high amounts of large black zygospores in addition to asexual spores on PDA whereas its zygospore production was strongly reduced on CA. *M. lanceolatus* UBOCC-A-109153 and *M. racemosus* UBOC-A-109155 showed equivalent radial growth on CA and PDA whereas *M. circinelloides* CBS 277-49 and *M. endophyticus* CBS 385-95 had a better development on PDA medium (+23.9 and +51.7% respectively; **Table 1**).

Table 1. Radial Growth of *Mucor* strains tested after 7 days at 14 ° C on PDA and CA media. Values represent the average radial growth (3 repetitions) and standard deviation (SD) in cm.

Strain	Radial growth in mm (SD)	
	PDA	CA
<i>Mucor racemosus</i> UBOCC-A-109155	8,80 ±0,00	8,80 ±0,00
<i>Mucor lanceolatus</i> UBOCC-A-109153	6,44 ±0,05	6,00 ±0,05
<i>Mucor circinelloides</i> CBS 277-49	7,56 ±0,07	6,10 ±0,11
<i>Mucor endophyticus</i> CBS 385-95	8,48 ±0,05	5,59 ±0,04

Based on our recent observations [1], we can estimate that *M. lanceolatus* UBOCC-A-109153 and *M. circinelloides* CBS 277-49 were in exponential growth phase after 7 days in PDA and CA at 14°C. *M. endophyticus* CBS 385-95 was also in exponential phase in CA while it just reached its plateau phase in PDA. Finally, *M. racemosus* UBOCC-A-109155 was in stationary phase in both media. These results were concordant with radial growth measurements

performed by Morin-Sardin *et al.* [1], a study that also highlighted that i) *M. lanceolatus* had a better optimal growth rate on cheese compared to PDA, ii) *M. racemosus*, had the highest growth rate of all the species tested whatever the medium used and iii) *M. circinelloides*, and *M. endophyticus* had lowered optimal growth rates on cheese or CA compared to PDA and *M. endophyticus* exhibited a long lag phase in comparison to the other species. The obtained results confirmed the impact of the medium on fungal physiology both in terms of growth rate and morphology. The ability of the fungus to grow better in a given environment raises once again the question of its adaptation, both in terms of evolutive adaptation and adaptative response.

3.2. Differentially expressed proteins

Consensus 2-DE gels obtained using SameSpots for each strain on PDA medium yielded gels including from 483 to 586 protein spots (**Supplementary Figure 1**). These consensus 2-DE gel were used as references to select from 83 (*M. circinelloides* CBS 277-49) to 103 (*M. endophyticus* CBS 385-95) protein spots (i.e. 15.8 to 19.0% of the proteomes) with a fold change equal or superior to 1.6 on a medium relatively to the other. After trypsin digestion and MALDI TOF-TOF analysis (**Supplementary Tables 1 to 8**), 209 proteins were identified using sequence similarity search on *Mucor* genome databases. When analyzing *M. circinelloides* CBS 277-49 and *M. endophyticus* CBS 385-95 proteomic data, 100% of the sequences were successfully identified using the *M. circinelloides* CBS 277-49 public database. The latter database was also used for the analysis of *M. lanceolatus* UBOCC-A-109153 and *M. racemosus* UBOC-A-109155 datasets, with 82.4 and 90.7% of successful sequence identifications respectively, while specific databases (for which expert annotations are in progress) yielded only 18.6 and 9.3% of sequence match. Some proteins were identified several times in different spots that may correspond to different isoforms or post-translationally modified forms of a single protein.

Number of up-regulated proteins was higher on PDA than on CA media for *M. circinelloides* CBS 277-49 (+95.0%), *M. endophyticus* CBS 385-95 (+40.9%) and *M. racemosus* UBOC-A-109155 (+25.0%) (**Table 2**). For *M. lanceolatus* UBOCC-A-109153, more up-regulated proteins were observed on CA than on PDA (+38.9%).

On PDA medium, 35.9 to 45.2% and 20.0 to 32.3% of the up-regulated proteins were respectively found involved in energy and amino-acid metabolisms, whatever the considered

strain (**Figure 2**). More proteins involved in these metabolic pathways were identified for *M. circinelloides* CBS 277-49 and *M. endophyticus* CBS 385-95 on PDA and for *M. lanceolatus* UBOCC-A-109153 (energy metabolism) and *M. racemosus* UBOC-A-109155 (amino-acid metabolism) on CA (**Figure 2**). One might hypothesize that those basal metabolisms could be significantly affected on CA for species rarely or never encountered in cheeses such as *M. circinelloides* and *M. endophyticus* compared to *M. lanceolatus* and *M. racemosus* often reported in cheeses. This hypothesis might be supported by the fact that the proportion of stress related proteins was significantly higher on CA vs. PDA for *M. circinelloides* CBS 277-49 and *M. endophyticus* CBS 385-95 (25 vs 12.8% and 27.3 vs 0% respectively) which can be considered as “non cheese” related species, whereas it was more balanced in *M. lanceolatus* UBOCC-A-109153 (16.7% in PDA and 20.0% in CA) and *M. racemosus* UBOC-A-109155 (6.7% in PDA and 4.2% in CA). Noteworthy, stress related proteins were observed for all the species on both media, except for *M. endophyticus* on PDA. The temperature used in our study is representative of the ripening conditions observed for semi soft cheese like Tomme de Savoie but does not correspond to the optimum for *Mucor* strains; this might partly explain the stress markers observed even on PDA medium that can be considered as a consensual medium. Indeed, optimal growth temperature in PDA are 24.5 ± 0.2 for *M. lanceolatus* UBOCC-A-109153, 25.7 ± 0.3 for *M. racemosus* UBOCC-A-109155, 26.3 ± 0.8 for *M. endophyticus* CBS 385-95 and 29.2 ± 0.4 for *M. circinelloides* CBS 277-49 [1]. Among other stress factors, the adverse effect of chloride ions associated to the concentration of NaCl in the CA medium can be cited [1]. Details of proteins identified on each media for each strain are given (**Supplementary Tables 1 to 8**).

Whatever the medium, PDA or CA, no proteins were found commonly up-regulated in the 4 studied species, nor in the 3 species that could be found in cheeses. However, *M. circinelloides* CBS 277-49 and *M. endophyticus* CBS 385-95 showed 9 common proteins, whose one, named THOP1 (the homolog of the PRD1 zinc metalloendopeptidase of *S. cerevisiae*), is up-regulated on CA (**Figure 3**). There are very few publications on the role of this enzyme in adaptation mechanisms but this protease, found in the cytoplasm and the intermembrane space of mitochondria, could have a role in proteolytic processing of mitochondrial protein precursors and in cytoplasmic proteins regulation or turnover, in relation to adaptation to cheese medium.

Table 2. Synthetic results of the proteomic analysis in PDA and CA. From the consensus-reference 2-DE obtained in PDA, only protein spots with a fold change ≥ 1.6 and an Anova score $< 0,02$ were sampled. Protein identification using nano LC-MS/MS was considered as unambiguous when a minimum of two peptides matched. For each *Mucor* strains, the corresponding number of proteins up-regulated in PDA and in CA and the proportion of homology with proteome of *Saccharomyces cerevisiae* were indicated.

Strain	Global analysis			PDA			CA		
	Total nb of spots on PDA consensus 2-DE	Spots up-regulated in PDA or CA (%)	Nb of spot up-regulated identified (%)	Nb of spot up-regulated	Corresponding nb of protein	% of homology with <i>S. cerevisiae</i> (nb)	Nb of spot up-regulated	Corresponding nb of protein	% of homology with <i>S. cerevisiae</i> (nb)
<i>M. racemosus</i>	483	92 (19,0%)	75 (81,5%)	41	30	80.0% (24)	34	24	87.5% (21)
<i>M. lanceolatus</i>	571	90 (15,8%)	66 (73,3%)	31	18	100.0% (18)	35	25	76.0% (19)
<i>M. circinelloides</i>	494	83 (16,8%)	78 (94,0%)	51	39	89.7% (35)	27	20	70.0% (14)
<i>M. endophyticus</i>	586	103 (17,6%)	70 (68,0%)	41	31	90.3% (28)	29	22	86.4% (19)

Figure 2. Functional repartition of the up-regulated proteins identified on potato dextrose agar (PDA) (black bars) and cheese agar (CA) (white bars) media and for: **(A)** *M. racemosus* UBOCC-A-109155, **(B)** *M. lanceolatus* UBOCC-A-109153, **(C)** *M. circinelloides* CBS 277-49 and **(D)** *M. endophyticus* CBS 385-95. Proportion (%) of up-regulated proteins is given per family.

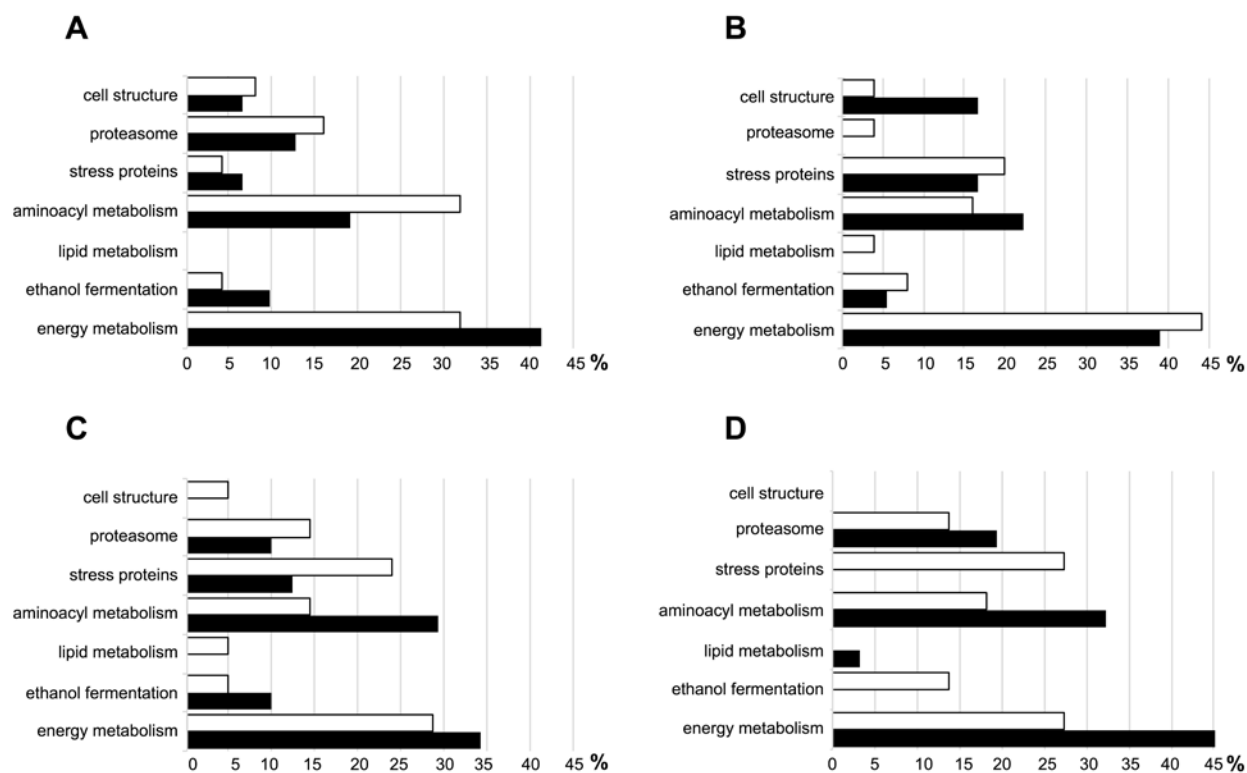
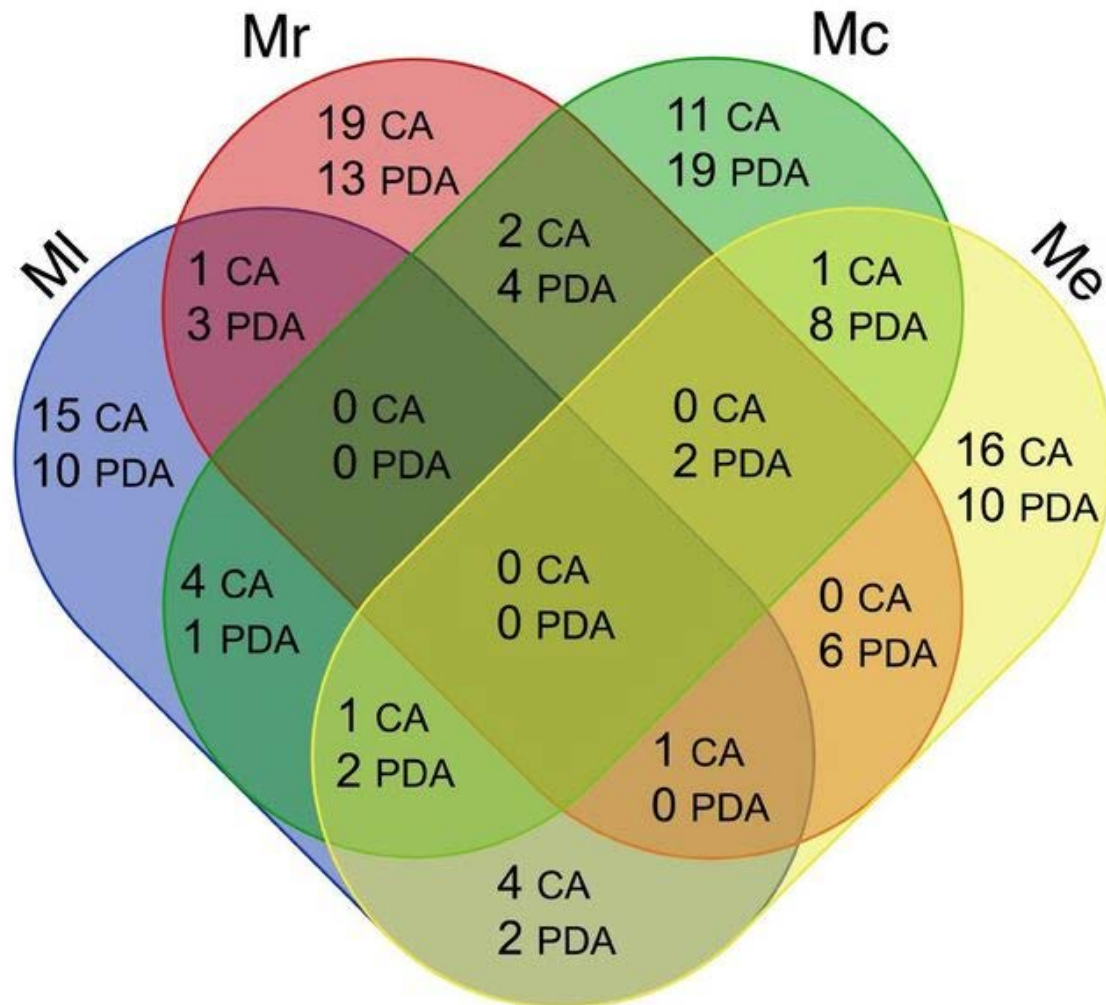


Figure 3. Numbers of upregulated proteins in: *M. lanceolatus* UBOCC-A-109153 (MI, blue set), *M. racemosus* UBOCC-A-109155 (Mr, red set), *M. circinelloides* CBS 277-49 (Mc, green set) and *M. endophyticus* CBS 385-95 (Me, yellow set) on potato dextrose agar (PDA) compared to cheese agar (CA): PDA and on cheese agar (CA) compared to potato dextrose agar (PDA): CA.



Interestingly, on the other hand, the comparison of the cheese strains *M. lanceolatus* UBOCC-A-109153 and *M. racemosus* UBOCC-A-109155 outlines 4 common proteins whose one, named EF-2 Elongation factor 2 (the homolog of the elongation factor 2 EFT1 of *S. cerevisiae*) is up-regulated on CA. In a recent publication, the authors related the central role of EF-2 in the thermal adaptation of Archaea [45]. Considering *M. racemosus* UBOCC-A-109155 growth is lower on CA, we can hypothesize that EF-2 could play a key role in the adaptation of *M. racemosus* to cheese environment. We also noted 6 common proteins

between *M. racemosus* and *M. circinelloides* with two of them being up-regulated on CA (i.e. GLYC2 a serine hydroxymethyltransferase (the homolog of the *S. cerevisiae* SHM2) and PHS1 a glycogen phosphorylase (the homolog of the *S. cerevisiae* GPH1)) required for the mobilization of glycogen in providing energy for metabolism. The latter enzyme could be up-regulated to bring enough nutrient to satisfy the growth of these two *Mucor* and could represent an interesting potential adaptation marker of cheese and non-cheese species. Therefore, a majority of the up-regulated proteins were specific to a given species (52 over 80 for PDA and 61 over 75 for CA) with a maximum of up-regulated specific proteins for *M. racemosus*. These results could be representative for the diversity of adaptation mechanisms developed by different species within the *Mucor* genus. It is nevertheless surprising not identify common up-regulated proteins for technological strains which could be associated to a part of the core proteome.

3.3. Network analysis

Overall, 178 of 209 proteins (85.2%) with homology to *Saccharomyces cerevisiae* proteins were used for a network analysis using STRING DB for each *Mucor* strain and media (**Table 2**, **Figure 3**).

3.3.1. *Mucor racemosus*

A total of 24 up-regulated and 30 down-regulated proteins were identified on CA versus PDA for *Mucor racemosus* UBOC-A-109155.

Among the up-regulated proteins on PDA medium, 24 of the 30 (80%) showed homology with *S. cerevisiae*. The string analysis (**Figure 4A**) shows 6 interaction clusters especially emphasizing an increase of glycolysis proteins, protein degradation and structural proteins. Concerning the glycolysis pathway, 3 important nodes were observed with the 3-phosphoglycerate kinase (PGK1), the triose phosphate isomerase (TPI1), which is an abundant glycolytic enzyme [46], and the fructose 1,6-bisphosphate aldolase (FBA1), required for glycolysis and gluconeogenesis [47]. The 6-phosphogluconate dehydrogenase (GND2), known to be involved in acetaldehyde synthesis [48] and the NADPH regenerating reaction in the pentose phosphate pathway [49], as well as the aconitase (ACO1) required for the TCA cycle [50], also appeared as major nodes. The difference with CA up-regulated proteins was the presence of the actin (ACT1) and 2 other proteins linked to protein

degradation: the SCL1 corresponded to the 20S proteasome alpha1 subunit and BMH2, the ubiquitin regulatory X domain-containing protein that is involved in protein degradation through the ubiquitin/proteasome pathway (cluster 1, **Figure 4B**).

Among the up-regulated proteins on CA, 21 proteins (87.5%) showed homology with *S. cerevisiae*. With the string analysis, 7 interaction clusters were observed especially highlighting an increase of protein and purine synthesis, protein turnover, AMP synthesis, glutathione regulation and energy metabolism with glycolysis, fermentation and pentose phosphate pathways representative proteins (**Figure 4B**). Two clusters involved in protein synthesis were also identified. Cluster 6 (**Figure 4B**) includes the ASC1 ribosomal protein, recently shown to have an essential role in the efficient translation of short mRNAs that encode small proteins playing important housekeeping roles in cells by forming the structural units of ribosomes, for example [51]. ASC1 is linked with the elongation factor 1 (EFT1) known as an essential protein catalyzing ribosomal translocation during protein synthesis [52] and a S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase (SAH1), which plays a key role in purine synthesis [53]. SAH1 is linked with an adenylate kinase (ADO1), itself linked with the ADE12 adenylosuccinate synthase, both catalyzing the biosynthesis of AMP [54]. The second cluster, cluster 4 (**Figure 4B**), contains 2 proteins with a role in protein biosynthesis: the PUT2 mitochondrial protein involved in proline utilization and a glutamate deshydrogenase (GDH3) that synthesizes glutamate from ammonia [55]. Cluster 2 (**Figure 4B**) combines the alanine glyoxylate aminotransferase (AGX1) described in glycine biosynthesis [56]; the metallo-di-peptidase (DUG1) associated with the regulation and homeostasis of glutathione and known to be an anti-oxidant [57,58]; and the cytosolic serine hydroxymethyltransferase (SHM2), a major isoform which catalyzes the synthesis of glycine and 5,10-methylene tetrahydrofolate (5,10-met-THF) from serine and tetrahydrofolate. In turn, 5,10-met-THF and its oxidized or reduced derivatives are required for one-carbon transfer reactions involved in purine, amino acid and *de novo* thymidylate (dTMP) synthesis [59,60]. String analysis also highlighted the presence of the PEP4 protease (cluster 4, **Figure 4B**), an important factor in protein turnover after oxidative damage [61]. Concerning energy metabolism, 2 clusters emphasized important players in glycolysis: cluster 5 (**Figure 4B**) showed the GPH1 glycogen phosphorylase required for the mobilization of glycogen [62] and the PGK1, a key enzyme in glycolysis and gluconeogenesis [63]; cluster 1 (**Figure 4B**) highlighted the 3 proteins LSC1, GAL10 and the important node MDH1 which is a

mitochondrial malate dehydrogenase involved in TCA cycle [64]. The glucose-6-phosphate 1-epimerase YMR099C is also connected with carbohydrate metabolism. Moreover, 2 other proteins, an isoform of pyruvate decarboxylase PDC6, needed for normal growth in galactose and ethanol medium in yeasts [65], and the previous GND2, also appeared as major nodes in cluster 3 (**Figure 4B**).

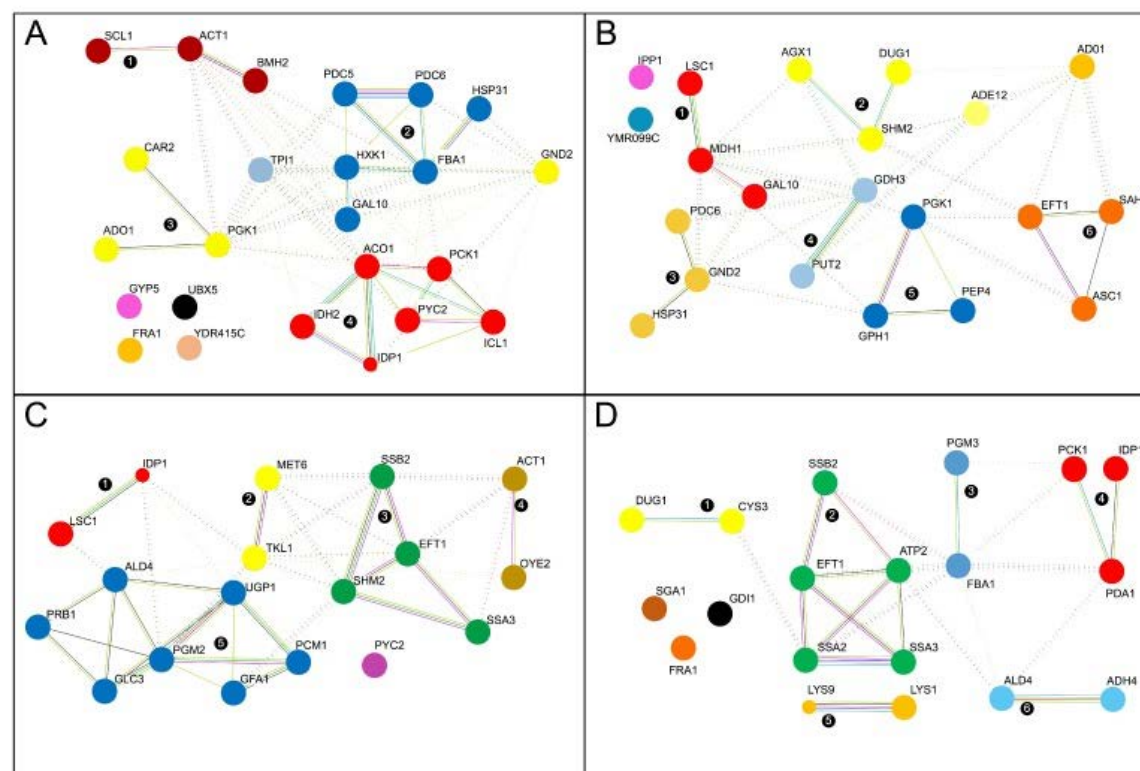
Overall, for this species, there was no significant metabolic differences between the 2 media, thus confirming the observed morphological similarities.

3.3.2. *Mucor lanceolatus*

In *M. lanceolatus* UBOCC-A-109153, 18 proteins were found up-regulated on PDA compared to CA whereas 25 proteins were up-regulated on CA vs PDA.

All of the 18 up-regulated proteins detected on PDA medium showed homology with *S. cerevisiae* proteins and the String analysis (**Figure 4C**) revealed 5 interaction clusters. For the first one, cluster 5 (**Figure 4C**), which corresponded to the carbon metabolism (glycolysis and neoglucogenesis), glutamine-fructose-6-phosphate amidotransferase (GFA1) is involved in the first step of chitin biosynthesis (formation of glucosamine-6-P and glutamate from fructose-6-P and glutamine) [66]. This protein, essential in cell wall biogenesis, is linked with the biosynthesis process cluster (cluster 3, **Figure 4C**), particularly with the cytosolic SHM2 protein described previously. Within cluster 5 (**Figure 4C**), UGP1, PGM2, ALD4 are other up-regulated proteins belonging to the Krebs cycle [67,68] with cluster 1 (**Figure 4C**) LSC1 and IDP1 (Mitochondrial NADP-specific isocitrate dehydrogenase). LSC1 is a mitochondrial enzyme of the TCA cycle catalyzing the nucleotide-dependent conversion of succinyl-CoA to succinate [69] and IDP1 is involved in the oxidation of isocitrate to alpha-ketoglutarate and may regulate flux through the tricarboxylic acid cycle and respiration [70]. MET6 (cobalamin-independent methionine synthase) and TKL1 (transketolase) catalyze conversion of xylulose-5-phosphate and ribose-5-phosphate to sedoheptulose-7-phosphate and glyceraldehyde-3-phosphate in the pentose phosphate pathway; reactions leading to aromatic amino acid synthesis (cluster 2, **Figure 4C**) [71]. Cluster 3 (**Figure 4C**) corresponded to stress proteins (SSB2, SSA3) essential in the ability of cells to maintain proteostasis [72] but also ATPases and EFT1 while cluster 4 (**Figure 4C**) is dedicated to cell metabolism and structure.

Figure 4. String network analysis of proteins up-regulated in *Mucor racemosus* UBOCC-A-109155 grown on: (A) potato dextrose agar (PDA) and (B) cheese agar (CA) and in *Mucor lanceolatus* UBOCC-A-109153 grown on: (A) potato dextrose agar (PDA) and (B) cheese agar (CA). The network analysis was carried out using the interactions known in *Saccharomyces cerevisiae*, using the following parameters: (i) textmining, neighborhood, experiments, gene fusion, databases, co-occurrence and co-expression active interaction sources; (ii) medium confidence as the minimum required interaction source; (iii) no predicted interactors shown. For network edges, line colors indicate the type of interaction evidence. Cluster numbers appear in black discs.



Finally, PYC2 (Pyruvate carboxylase isoform) is a cytoplasmic enzyme that converts pyruvate to oxaloacetate.

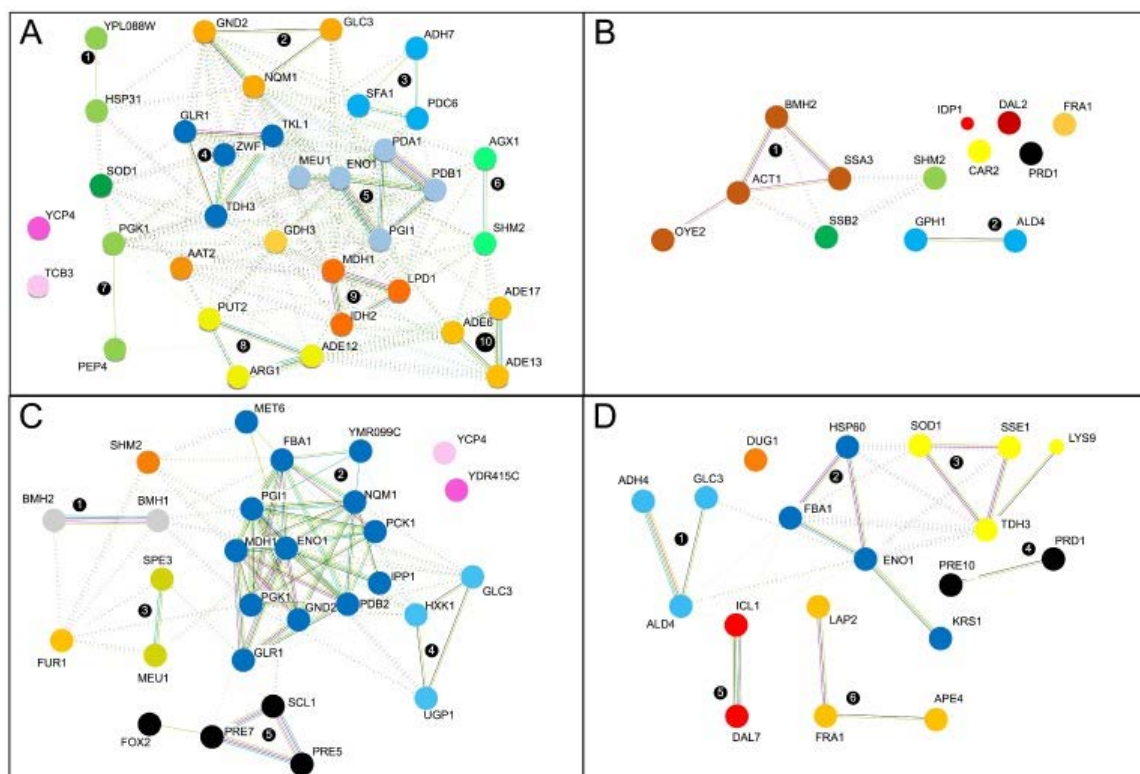
In CA medium, 19 of the 25 up-regulated proteins (76%) showed homology with *S. cerevisiae* and 6 interaction clusters were detected (**Figure 4D**). The major cluster (cluster 2, **Figure 4D**), which corresponded to stress proteins (SSA2) with ATPases (SSA3; SSB2), elongation factor (EFT2) and ATP synthase (ATP2), is linked with mitochondrial aldehyde dehydrogenase (ALD4) corresponding to the alcohol fermentation cluster (cluster 6, **Figure 4D**). Peptidase cluster (cluster 1, **Figure 4D**) including the DUG1 metallo dipeptidase, an enzyme playing an important role in glutathione (GSH) degradation [73] and the cystathionine gamma-lyase CYS3 [74], is also connected with cluster 2 (**Figure 4D**). FBA1, required for glycolysis and gluconeogenesis (cluster 3, **Figure 4D**) with phosphoglucomutase PGM3 [47,75], is connected with the stress proteins, PDA1 and PCK1 in the TCA cycle (cluster 4, **Figure 4D**) and with ALD4 inside the alcohol fermentation cluster (cluster 6, **Figure 4D**). The last cluster (cluster 5, **Figure 4D**) is dedicated to amino acid biosynthesis with 2 saccharopine dehydrogenases (LYS1 and LYS9) [76]. Three proteins are not grouped but were found to be up regulated on CA compared to PDA: FRA1, a protein involved in negative regulation of transcription of iron regulon in response to decreased mitochondrial iron-sulfur cluster synthesis [77]; SGA1, an intracellular sporulation-specific glucoamylase with a role in glycogen degradation [78]; and GDI1 (GDP dissociation inhibitor) which regulates vesicle traffic in secretory pathways by controlling the GDP/GTP exchange reaction [79].

The obtained results showed a few differences in activated proteins related to carbohydrate catabolism. Indeed, *M. lanceolatus* was engaged in TCA cycle on PDA while glycolysis was activated on CA. But overall the metabolic pathways (amino acid biosynthesis, stress proteins linked to turnover proteins) involved in the maintenance of the main biological fungal functions were similar. Consequently, as expected, the technological species *M. lanceolatus* appeared well adapted to the cheese medium as confirmed by its dense aspect and sporulation observed during its growth on CA.

3.3.3 *Mucor circinelloides*

In *M. circinelloides* CBS 277-49, 39 proteins were found up-regulated on PDA compared to CA whereas 20 proteins were up-regulated on CA vs PDA.

Figure 5. String network analysis of proteins up-regulated in *Mucor circinelloides* CBS 277-49 grown on: **(A)** potato dextrose agar (PDA) and **(B)** cheese agar (CA) and in *Mucor endophyticus* CBS 385-95 grown on: **(A)** potato dextrose agar (PDA) and **(B)** cheese agar (CA). The network analysis was carried out using the interactions known in *Saccharomyces cerevisiae*, using the following parameters: (i) textmining, neighborhood, experiments, gene fusion, databases, co-occurrence and co-expression active interaction sources; (ii) medium confidence as the minimum required interaction source; (iii) no predicted interactors shown. For network edges, line colors indicate the type of interaction evidence. Cluster numbers appear in black discs.



A major part of the up-regulated proteins on PDA were found to be involved in energy metabolism. The String analysis showed strong interactions between enzymes involved in the different energy metabolism pathways (**Figure 5A**). Enzymes from different pathways being grouped in single clusters. Indeed, clusters 2, 4 and 9 (**Figure 5A**) include enzymes such as PGK1 (glycolytic 3-phosphoglycerate kinase), TDH3 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), ENO1 (enolase-1) and PGI1 (phosphoglucose isomerase) that participate to the glycolysis/neoglucogenesis; TKL1 (transketolase 1), ZWF1 (glucose-6-phosphate dehydrogenase), GND2 (6-phosphogluconate dehydrogenase), and NQM1 (transaldolase) which are involved in the Pentose Phosphate pathway. Up-regulated enzymes of the pyruvate dehydrogenase enzyme complex such as PDA1 and PDB1 (cluster 5, **Figure 5A**) and LPD1 (dihydrolipoamide dehydrogenase) in combination with glycolysis and Pentose Phosphate pathways feed the TCA cycle that involves two proteins that were found upregulated on PDA in *M. circinelloides*: MDH1 (a mitochondrial malate dehydrogenase) and IDH2 a subunit of the mitochondrial NAD⁺ dependent isocitrate dehydrogenase within the cluster 9 (**Figure 5A**) [80,81]. Interestingly, GLC3 a glycogen branching enzyme was found upregulated possibly leading to glycogen accumulation in *M. circinelloides* on PDA. Clusters 6, 8 and 10 (**Figure 5A**) include different upregulated proteins implicated in the amino acyl metabolism. These aminoacyl biosynthesis enzymes including ARG1 (arginosuccinate synthetase), AGX1 (alanine glyoxylate aminotransferase) or purine biosynthesis enzymes ADE6 (formylglycinamide-ribonucleotide-synthetase), ADE12 (adenylosuccinate synthase), ADE13 (adenylosuccinate lyase), ADE17 (enzyme of “*de novo*” purine biosynthesis containing both 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide transformylase and inosine monophosphate cyclohydrolase activities) and PUT2 (cluster 8, **Figure 5A**), a mitochondrial protein involved in proline utilization [65, 82]. On the non-limiting PDA medium, glucose breakdown, carbon storage under the form of glycogen and aminoacyl synthesis were more important than on CA. PEP4 (cluster 7, **Figure 5A**) a vacuolar aspartyl protease found over expressed on PDA may be involved in a proteasome facilitating the protein turnover. It might also play a role in response to oxidative stress that may occur on PDA given the fact that several stress related proteins such as GLR1 (cluster 4, **Figure 5A**) (cytosolic and mitochondrial glutathione oxydoreductase), SOD1 (cytosolic copper zinc superoxide dismutase) and HSP31 (cluster 1, **Figure 5A**) (possible chaperone and cysteine protease with

similarity to *E.coli* Hsp31) were found overexpressed. Another cluster (cluster 3, **Figure 5A**) showed the overexpression of enzymes participating to alcohol fermentation; i.e. ADH7 (alcohol deshydrogenase), SFA1 (bifunctional enzyme with a alcohol dehydrogenase activity) and PDC6 (pyruvate decarboxylase) allowing for the optimal use of carbohydrates.

On CA the main cluster (cluster 1, **Figure 5B**) of overexpressed proteins includes proteins involved in stress response: i.e. SSA3 a cytoplasmic ATPase involved in protein folding in response to stress and OYE2 a conserved NADPH oxydoreductase containing flavin mononucleotide that may be involved in oxidative stress response. Cluster 1 also includes BMH2 (14-3-3 protein minor isoform) and ACT1 (Actin) that also may play a role in stress signaling and response. PRD1 a zinc metalloendopeptidase may also be involved in stress response. Interestingly the overexpression on CA vs PDA of DAL1 (allantoicase) might be consistent with the mobilization of secondary nitrogen sources when primary sources are limiting and the overexpression of GPH1 (cluster 2, **Figure 5B**), a glycogen phosphorylase may indicate a remobilization of glucose from glycogen. Thus, CA would be more limiting for *M. circinelloides* than PDA. Noteworthy, FRA1 a protein playing a role in the regulation of siderophore and ionic iron transporters [77,83] was also found up-regulated on CA.

Finally, the comparison of networks for *M. circinelloides* between PDA and CA media showed very different up-regulated proteins profiles. Indeed, on CA the stress response was more important with overexpression of structural proteins such as actin, of stress proteins such as SSA3. Moreover, very different basal metabolic pathways were observed between the two media. On CA aminoacyl metabolism and glycolysis were deregulated whereas purine degradation enzymes and glycogen mobilization were up-regulated. The lowered metabolic activity on CA could be related to the observed lower growth of this species on cheese.

3.3.4. *Mucor endophyticus*

In *M. endophyticus* CBS 385-95, 31 proteins were found up-regulated on PDA compared to CA whereas 22 proteins were up-regulated on CA vs PDA. A total number of 28 of the 31 up-regulated proteins on PDA medium (90.3%) showed homology with *S. cerevisiae* proteins and the String analysis (**Figure 5C**) revealed five interaction clusters. The major cluster (cluster 2, **Figure 5C**) corresponded to the carbon metabolism (glycolysis and neoglucogenesis) and included 12 proteins (43% of the proteins homology) among which

ENO1, FBA1, PGI1 and PCK1 (glycolytic enzyme phosphoglucose isomerase). It also contains proteins involved in the TCA cycle like MDH1 mitochondrial malate dehydrogenase and in the pentose-phosphate pathway like the NQM1transaldolase [84]. This cluster is linked with a glucose metabolism cluster (cluster 4, **Figure 5C**) composed by glycogen branching enzyme (GLC3) [85], UDP-glucose pyrophosphorylase “UGPase” (UGP1) [86], and hexokinase isoenzyme 1 (HXK1) [87]. Proteasome cluster (cluster 5, **Figure 5C**) includes the alpha1 (SLC1), alpha 6 (PRE5) and beta 6 (PRE7) subunits of the 20S proteasome. These proteins are essential for the regulated turnover of proteins and for the removal of misfolded proteins [88]. PRE7 is linked with a multifunctional enzyme of the peroxisomal fatty acid β -oxidation pathway (FOX1). Cytosolic serine hydroxymethyltransferase (SHM2), uracil phosphoribosyltransferase (FUR1) and cobalamin-independent methionine synthase (MET6) contribute to the generation of precursors for purine, pyrimidine, amino acid and lipid biosynthesis. These 3 proteins are linked with the carbon metabolism cluster (cluster 2, **Figure 5C**) and with the BMH1 and BMH2 14-3-3 proteins (cluster 1, **Figure 5C**) which control proteome at post-transcriptional level, bind proteins and DNA and are involved in regulation of many processes including exocytosis, vesicle transport and rapamycin-sensitive signaling [89]. FUR2 has great interaction with the cluster 3 (**Figure 5C**) composed of the MEU1 methylthioadenosine phosphorylase, an enzyme catalyzing the initial step in the methionine salvage pathway and affecting polyamine biosynthesis [90], and the SPE3 spermidine synthase, involved in biosynthesis of spermidine (required for growth) and also in biosynthesis of pantothenic acid [91]. Two proteins are not grouped, one of unknown function which has sequence and structural similarity to flavodoxins (YCP4) and aminopeptidase (YDRA15C); and two other with no counterpart with *S. cerevisiae*: an extracellular elastinolytic metallo proteinase and a nicotinamidase family protein.

For *M. endophyticus* in CA, 19 of the 22 up-regulated proteins (86.3%) showed homology with *S. cerevisiae*. Six interaction clusters were detected by String analysis (**Figure 5D**). Two major clusters (clusters 2 and 3, **Figure 5D**) were associated with glycolysis and gluconeogenesis with FBA1, ENO1 and TDH3, they are also linked to stress proteins among which ATPases (HSP60; SSE1) and the SOD1 cytosolic copper-zinc superoxide dismutase. These 2 clusters are associated with the biosynthesis of amino acids with the saccharopine dehydrogenase (LYS9) [92] and lysyl-tRNA synthetase (KRS1) [93], respectively. ENO1 is linked with a mitochondrial aldehyde dehydrogenase (ALD4) and a glycogen branching

enzyme (GLC3) corresponding to the alcohol fermentation cluster (cluster 1, **Figure 5D**) with alcohol dehydrogenase (ADH4). ENO1, also named enolase, is a metalloenzyme known to catalyze the conversion of 2-phosphoglyceric acid to phosphoenolpyruvic acid in the glycolytic pathway. Many studies showed its implication in stress responses, in particular in high temperature adaptation, glucose deprivation, and promotion of anaerobic metabolism upon hypoxic stress, exerting a protective effect on cells [94,95]. In fungi, it has been also shown to play an important role in mycelium formation and germination tubes formation [96]. ALD4, ENO1 and FBA1 are linked with isocitrate lyase (ICL1), enzyme catalyzing the formation of succinate and glyoxylate from isocitrate, a key reaction of the glyoxylate cycle, which operates as an anaplerotic route for replenishing the tricarboxylic acid cycle [97]. The expression of ICL1 is required for growth on ethanol or acetate, but dispensable when fermentable carbon sources are available. ICL1 (cluster 5, **Figure 5D**) is linked with the DAL7 malate synthase, involved in the degradation of allantoin (purine catabolism) [98]. Proteasome cluster (cluster 4, **Figure 5D**), including alpha 7 subunit of the 20S proteasome (PRE10) and zinc PRD1 metalloendopeptidase, is essential for the regulated turnover of proteins and for the removal of misfolded proteins. A protein (FRA1) playing a role in the regulation of iron uptake and metabolism [77] was found to be up-regulated on CA compared to PDA. It is connected with 2 aminopeptidases, LAP2 and AP4, (cluster 6, **Figure 5D**) and one ungrouped protein, DUG1 (Cys-Gly metallo-di-peptidase) [57].

Finally, *M. endophyticus* seems to express a more important metabolic activity on PDA medium, with the activation of the major carbon catabolism pathways, amino-acid biosynthesis, proteome regulation and turnover, while on CA, less proteins were up regulated. This is consistent with the growth follow-up that showed a much slower growth on cheese medium associated with lower mycelium density and sporulation on this medium.

3.3.5. Proteins without homology with *S. cerevisiae* proteome

Overall, several differentially expressed proteins (14.8%) did not share homology with *S. cerevisiae* (**Supplementary Tables 1 to 8**). Among them, a glycoside-hydrolase strongly up-regulated in CA (fold from 2.2 to 4.3) in *M. circinelloides* CBS 277-49 could be involved in proper conidial cell wall assembly and thus segregation of conidia during conidiation [99]. In *M. lanceolatus* UBOCC-A-109153, a trehalose synthase was particularly overexpressed in CA (fold of 5.2). Petitjean *et al.* [100] recently showed that this protein is endowed with a

regulatory function in energy homeostasis, which is essential to withstand adverse conditions and maintain cellular integrity. The M factor transporter Mam1 (fold 3.6) seems to be of interest for *M. endophyticus* CBS 385-95, the only one among the 4 strains used in this study able of sexual sporulation, in CA because this protein was reported as responsible for the secretion of the mating pheromone in *Schizosaccharomyces pombe* [101]. Still in *M. endophyticus*, the DNA mismatch repair protein MutT (fold 4.2 in CA) belongs to a protein family which is believed to eliminate toxic nucleotide derivatives from the cell and regulate the levels of important signaling nucleotides and their metabolites [102]. Numerous other proteins are unknown or were assigned to functions which make their role difficult to determine.

3.4. Conclusion

The objective of the present study was to compare 4 different species of *Mucor*, in order to better understand the metabolic pathways brought into play for growth on a cheese-related environment. Morphological observations of the 4 strains representative of technological, contaminant or non-cheese related *Mucor* species used in this study confirmed the apparent adaptation of the technological strain *M. lanceolatus* UBOCC-A-109153 to the cheese environment. A 2-DE approach allowed identifying 209 cellular proteins up or down-regulated in CA or PDA, with a particular high number of overexpressed proteins for this technological strain in CA. Despite the complexity of the two tested conditions we obtained an interesting overview of compared metabolisms (CA vs PDA) of the four *Mucor* species. None of the species displayed the same proteome shifts between the two media. Our results clearly showed that the adaptative response of the four *Mucor* strains to cheese environment involves different protein actors but common metabolic pathways. These specificities may be linked to different abilities in terms of adaptability to the tested media, with metabolisms that appeared overall more intense on PDA than CA for *M. circinelloides* and *M. endophyticus*, quite similar between the two media for *M. racemosus*, and more active on CA for the technological species *M. lanceolatus*. These observations are concordant with the growth follow up and the previous study by Morin-Sardin *et al.* [1]. Proteome comparison among species on a given medium rather than for a given species among media would allow revealing whether or not differences in terms of protein production regulation among species occur. The better adaptation to cheese of *M.*

lanceolatus and to a lesser extent of *M. racemosus* may imply the occurrence of specific proteins produced by genes acquired through an adaptation/domestication process or advantageous regulation of certain protein production that might also be due to gene regulation evolutive adaptation. In this context, a comparative genomic approach would be of interest to appreciate these various aspects of *Mucor* adaptation to a given environment.

Acknowledgements

S. Morin-Sardin acknowledges a salary financing by the Schering Plough company. This study was funded by the "Region Bretagne", through the CBB projet Mufromic.

References:

- [1] Morin-Sardin S, Rigalma K, Coroller L, Jany JL., Coton E.. Effect of temperature, pH, and water activity on *Mucor* spp. growth on synthetic medium, cheese analog and cheese. *Food Microbiol* 2016;56:69-79.
- [2] Foschino R, Garzaroli C, Ottogalli G. Microbial contaminants cause swelling and inward collapse of yoghurt packs. *Le Lait* 1993;73:3956400.
- [3] Bärtschi C, Berthier J, Valla G. Inventaire et évolution des flores fongiques de surface du reblochon de Savoie. *Le Lait* 1994;74:105-14.
- [4] Montagna MT, Santacroce MP, Spilotros G, Napoli C, Minervini F, Papa A., Dragoni I. Investigation of fungal contamination in sheep and goat cheeses in southern Italy. *Mycopathologia* 2004;158:245-9.
- [5] Lugauskas A. Potential toxin producing micromycetes on food raw material and products of plant origin. *Bot Lith* 2005;7:3-16.
- [6] Hayaloglu AA, Kirbag S. Microbial quality and presence of moulds in Kuflu cheese. *Int J Food Microbiol* 2007;115:376-80.
- [7] Sengun I, Yaman D, Gonul S. Mycotoxins and mould contamination in cheese: a review. *World Mycotoxin J* 2008;1:291-8.
- [8] Pitt JI, Hocking AD, Diane A. *Fungi and food spoilage*. Springer; 2009.
- [9] Huang HT, Dooley JG. Enhancement of cheese flavors with microbial esterases. *Biotechnol Bioeng* 1976;18:909-19.
- [10] Zhang N, and Zhao XH. Study of *Mucor* spp. in semi-hard cheese ripening. *J Food Sci Technol* 2010;47:613-9.
- [11] Hermet A, Méheust D, Mounier J, Barbier G, Jany JL. Molecular systematics in the genus *Mucor* with special regards to species encountered in cheese. *Fungal Biol* 2012;116:692-705.
- [12] Hermet A, Mounier J, Keravec M, Vasseur V, Barbier G, Jany JL. Application of capillary electrophoresis single-stranded conformation polymorphism (CE-SSCP) analysis for identification of fungal communities in cheese. *Food Microbiol* 2014;41:82-90.
- [13] Marín P, Palmero D, Juradon M. Effect of solute and matric potential on growth rate of fungal species isolated from cheese. *Int Dairy J* 2014;36:89-94.
- [14] Desmasures N. Mold-Ripened Varieties. *Encycl. Food Microbiol* 2014;409.

- [15] Yegin S, Fernandez-Lahore M, Salgado AJG, Guvenc U, Goksungur Y, Tari C. Aspartic proteinases from *Mucor* spp. in cheese manufacturing. *Appl Microbiol Biotechnol* 2011;89:949-60.
- [16] Ropars J, Cruaud C, Lacoste S, Dupont J. A taxonomic and ecological overview of cheese fungi. *Int J Food Microbiol* 2012;155:199-210.
- [17] Fay JC, Benavides JA. Evidence for domesticated and wild populations of *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genet* 2005;1:66-71.
- [18] Legras JL, Merdinoglu D, Cornuet J, Karst F. Bread, beer and wine: *Saccharomyces cerevisiae* diversity reflects human history. *Mol Ecol* 2007;16:2091-102.
- [19] Sicard D, Legras, JL. Bread, beer and wine: yeast domestication in the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *C R Biol* 2011;334,229-36.
- [20] Gibbons JG, Rinker DC. The genomics of microbial domestication in the fermented food environment. *Curr Opin Genet Dev* 2015;35:168.
- [21] Cheeseman K, Ropars J, Renault P, Dupont J, Gouzy J, Branca A, Abraham AL, Ceppi M, Conseiller E, Debuchy R, et al. Multiple recent horizontal transfers of a large genomic region in cheese making fungi. *Nat Commun* 2014;5.
- [22] Ropars J, de la Vega RCR, López-Villavicencio M, Gouzy J, Sallet E, Dumas É, Lacoste S, Debuchy R, Dupont J, Branca A, et al. Adaptive horizontal gene transfers between multiple cheese-associated fungi. *Curr Biol* 2015;25:2562-9.
- [23] Etxebeste O, Ugalde U, Espeso EA. Adaptive and developmental responses to stress in *Aspergillus nidulans*. *Curr Protein Pept Sci* 2010;11(8):704-18.
- [24] Dove A. Proteomics: translating genomics into products? *Nat Biotechnol* 1999;17:233-6.
- [25] Hardwidge PR, Rodriguez-Escudero I, Goode D, Donohoe S, Eng J, Goodlett DR, Finlay BB. Proteomic analysis of the intestinal epithelial cell response to enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Biol Chemistry* 2004;279(19):20127-36.
- [26] Corporeau C, Tamayo D, Pernet F, Quéré C, Madec S. Proteomic signatures of the oyster metabolic response to herpesvirus OsHV-1 μ Var infection. *J Proteomics* 2014;109:176-87.
- [27] Madec S, Pichereau V, Jacq A, Paillard M, Boisset C, Guérard F, Paillard C, Nicolas JL. Characterization of the secretomes of two *Vibrios* pathogenic to mollusks. *PLoS ONE* 2014;9:e113097.

- [28] Yang XY, Zhang L, Liu J, Li N, Yu G, Cao K, Han J, Zeng G, Pan Y, Sun X, He QY. Proteomic analysis on the antibacterial activity of a Ru(II) complex against *Streptococcus pneumoniae*. *J Proteomics* 2015;115:107-16.
- [29] Li P, Liang H, Lin WT, Feng F, Luo L. Microbiota dynamics associated with environmental conditions and potential roles of cellulolytic communities in traditional Chinese cereal starter solid-state fermentation. *Appl Environ Microbiol* 2015;81:5144-56.
- [30] Manzanares-Miralles L, Sarikaya-Bayram Ö, Smith EB, Dolan SK, Bayram Ö, Jones GW, Doyle S. Quantitative proteomics reveals the mechanism and consequence of gliotoxin-mediated dysregulation of the methionine cycle in *Aspergillus niger*. *J Proteomics* 2016;131:149-62.
- [31] Ravikumar V, Jers C, Mijakovic I. Elucidating Host–pathogen interactions based on post-translational modifications using proteomics approaches. *Frontiers in microbiol* 2015:6.
- [32] Carvalho MB, Martins I, Medeiros J, Tavares S, Planchon S, Renaut J, Núñez O, Gallart-Ayala H, Galceran MT, Hursthouse A, et al. The response of *Mucor plumbeus* to pentachlorophenol: A toxicoproteomics study. *J Proteomics* 2013;78:159-71.
- [33] Tang X, Zan X, Zhao L, Chen H, Chen YQ, Chen W, Song Y, Ratledge C. Proteomics analysis of high lipid-producing strain *Mucor circinelloides* WJ11: an explanation for the mechanism of lipid accumulation at the proteomic level. *Microb Cell Fact* 2016 15:35.
- [34] Sautour M, Mansur CS, Divies C, Bensoussan M, Dantigny P. Comparison of the effects of temperature and water activity on growth rate of food spoilage moulds. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2002;28:311-5.
- [35] Hansen BV, Nielsen PV. Development of a semisynthetic cheese medium for fungi using chemometric methods. *J Dairy Sci* 1997;80:1237-45.
- [36] Nielsen MS, Frisvad JC, Nielsen PV. Protection by fungal starters against growth and secondary metabolite production of fungal spoilers of cheese. *Int J Food Microbiol* 1998;42:91-9.
- [37] Ramagli LS. Quantifying protein in 2-D PAGE solubilization buffers. In *2-D Proteome Analysis Protocols*. Springer, 1999, p. 99-103.
- [38] Galland C, Dupuy C, Capitaine C, Auffret M, Quiniou L, Laroche J, Pichereau V. Comparisons of liver proteomes in the European flounder *Platichthys flesus* from three contrasted estuaries. *J Sea Res* 2013;75:135641.

- [39] Artigaud S, Lavaud R, Thébault J, Jean F, Strand Ø, Strohmeier T, Milan M, Pichereau V. Proteomic-based comparison between populations of the Great Scallop, *Pecten maximus*. *J Proteomics* 2014;105:164-73.
- [40] Le Bars-Bailly, S., Bailly, J.D., and Brugere, H. Accidents de fabrication dus aux moisissures en fromagerie. *Rev Médecine Vét* 1999;150:413–30.
- [41] Lazar SP, Lukaszewicz JM, Persad KA, Reinhardt JF. Rhinocerebral *Mucor circinelloides* infection in immunocompromised patient following yogurt ingestion. *Del Med J* 2014;86:245-8.
- [42] Lee SC, Billmyre RB, Li A, Carson S, Sykes SM, Huh EY, Mieczkowski P, Ko DC, Cuomo CA, Heitman J. Analysis of a food-borne fungal pathogen outbreak: virulence and genome of a *Mucor circinelloides* isolate from yogurt. *MBio* 2014;5:e01390-14.
- [43] Riley TT, Muzny CA, Swiatlo E, Legendre DP. Breaking the Mold: A Review of Mucormycosis and Current Pharmacological Treatment Options. *Ann Pharmacother* 2016;pii: 1060028016655425.
- [44] Snyder AB, Churey JJ, Worobo RW. Characterization and control of *Mucor circinelloides* spoilage in yogurt. *Int J Food Microbiol* 2016;228:14-21.
- [45] Thomas T, Cavicchioli R. Cold adaptation of archaeal elongation factor 2 (EF-2) proteins. *Curr Protein Pept Sci* 2002 Apr;3(2):223-30.
- [46] Compagno C, Brambilla L, Capitanio D, Boschi F, Ranzi BM, Porro D. Alterations of the glucose metabolism in a triose phosphate isomerase-negative *Saccharomyces cerevisiae* mutant. *Yeast* 2001;18(7):663-70.
- [47] Rodaki A, Young T, Brown AJ. Effects of depleting the essential central metabolic enzyme fructose-1,6-bisphosphate aldolase on the growth and viability of *Candida albicans*: implications for antifungal drug target discovery. *Eukaryot Cell* 2006;5(8):1371-7.
- [48] Hohmann S. Characterization of PDC6, a third structural gene for pyruvate decarboxylase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 1991;173(24):7963-9.
- [49] Sinha A, Maitra PK. Induction of specific enzymes of the oxidative pentose phosphate pathway by glucono-delta-lactone in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Gen Microbiol* 1992;138(9):1865-73.

- [50] Gangloff SP, Marguet D, Lauquin GJ. Molecular cloning of the yeast mitochondrial aconitase gene (ACO1) and evidence of a synergistic regulation of expression by glucose plus glutamate. *Mol Cell Biol*. 1990;10(7):3551-61.
- [51] Thompson MK, Rojas-Duran MF, Gangaramani P, Gilbert WV. The ribosomal protein Asc1/RACK1 is required for efficient translation of short mRNAs. *Elife*. 2016;5. pii: e11154.
- [52] Capa L, Mendoza A, Lavandera JL, Gómez de las Heras F, García-Bustos JF. Translation elongation factor 2 is part of the target for a new family of antifungals. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42(10):2694-9.
- [53] Tehlivets O, Malanovic N, Visram M, Pavkov-Keller T, Keller W. S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase and methylation disorders: yeast as a model system. *Biochim Biophys Acta* 2013;1832(1):204-15.
- [54] Lipps G, Krauss G. Adenylosuccinate synthase from *Saccharomyces cerevisiae*: homologous overexpression, purification and characterization of the recombinant protein. *Biochem J* 1999;341:537-43.
- [55] Avendaño A, Deluna A, Olivera H, Valenzuela L, Gonzalez A. GDH3 encodes a glutamate dehydrogenase isozyme, a previously unrecognized route for glutamate biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 1997;179(17):5594-7.
- [56] Schlösser T, Gätgens C, Weber U, Stahmann KP. Alanine: glyoxylate aminotransferase of *Saccharomyces cerevisiae*-encoding gene AGX1 and metabolic significance. *Yeast* 2004;21(1):63-73.
- [57] Kaur H, Kumar C, Junot C, Toledano MB, Bachhawat AK. Dug1p Is a Cys-Gly peptidase of the gamma-glutamyl cycle of *Saccharomyces cerevisiae* and represents a novel family of Cys-Gly peptidases. *J Biol Chem* 2009;284(21):14493-502.
- [58] Singh AK, Singh M, Pandya VK, G L B, Singh V, Ekka MK, Mittal M, Kumaran S. Molecular basis of peptide recognition in metallopeptidase Dug1p from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* 2014;53(50):7870-83.
- [59] McNeil JB, Bognar AL, Pearlman RE. *In vivo* analysis of folate co-enzymes and their compartmentation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 1996;142: 371-8;
- [60] McNeil JB, Flynn J, Tsao N, Monschau N, Stahmann K, Haynes RH, McIntosh EM, Pearlman RE. Glycine metabolism in *Candida albicans*: characterization of the serine

- hydroxymethyltransferase (SHM1, SHM2) and threonine aldolase (GLY1) genes. *Yeast* 2000;16(2):167-75.
- [61] Marques M, Mojzita D, Amorim MA, Almeida T, Hohmann S, Moradas-Ferreira P, Costa V. The Pep4p vacuolar proteinase contributes to the turnover of oxidized proteins but PEP4 overexpression is not sufficient to increase chronological lifespan in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 2006;152(Pt 12):3595-605.
- [62] Hwang PK, Tugendreich S, Fletterick RJ. Molecular analysis of GPH1, the gene encoding glycogen phosphorylase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 1989;9(4):1659-66.
- [63] Takaya N, Yanai K, Horiuchi H, Ohta A, Takagi M. Cloning and characterization of two 3-phosphoglycerate kinase genes of *Rhizopus niveus* and heterologous gene expression using their promoters. *Curr Genet* 1994;25(6):524-30.
- [64] Lo AS, Liew CT, Ngai SM, Tsui SK, Fung KP, Lee CY, Waye MM. Developmental regulation and cellular distribution of human cytosolic malate dehydrogenase (MDH1). *J Cell Biochem* 2005;94(4):763-73.
- [65] Hohmann S. Characterization of PDC6, a third structural gene for pyruvate decarboxylase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 1991;173(24):7963-9.
- [66] Smith RJ, Milewski S, Brown AJ, Gooday GW. Isolation and characterization of the GFA1 gene encoding the glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase of *Candida albicans*. *J Bacteriol* 1996;178(8):2320-7.
- [67] Miyagi H, Kawai S, Murata K. Two sources of mitochondrial NADPH in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 2009;284(12):7553-60.
- [68] Yi DG, Huh WK. UDP-glucose pyrophosphorylase Ugp1 is involved in oxidative stress response and long-term survival during stationary phase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun* 2015;467(4):657-63.
- [69] Przybyla-Zawislak B, Dennis RA, Zakharkin SO, McCammon MT. Genes of succinyl-CoA ligase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* 1998;258(2):736-43.
- [70] Haselbeck RJ, McAlister-Henn L. Function and expression of yeast mitochondrial NAD- and NADP-specific isocitrate dehydrogenases. *J Biol Chem* 1993;268(16):12116-22.
- [71] Kochetov GA. Functional flexibility of the transketolase molecule. *Biochemistry (Mosc)* 2001;66(10):1077-85.

- [72] Kominek J, Marszalek J, Neuvéglise C, Craig EA, Williams BL. The complex evolutionary dynamics of Hsp70s: a genomic and functional perspective. *Genome Biol Evol* 2013;5(12):2460-77.
- [73] Kaur H, Kumar C, Junot C, Toledano MB, Bachhawat AK. Dug1p Is a Cys-Gly peptidase of the gamma-glutamyl cycle of *Saccharomyces cerevisiae* and represents a novel family of Cys-Gly peptidases. *J Biol Chem* 2009;284(21):14493-502.
- [74] Ono BI, Hazu T, Yoshida S, Kawato T, Shinoda S, Brzvwczy J, Paszewski A. Cysteine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: a new outlook on pathway and regulation. *Yeast* 1999;15(13):1365-75.
- [75] Stray-Pedersen A, Backe PH, Sorte HS, Mørkrid L, Chokshi NY, Erichsen HC, Gambin T, Elgstøen KB, Bjørås M, Wlodarski MW, Krüger M, Jhangiani SN, Muzny DM, Patel A, Raymond KM, Sasa GS, Krance RA, Martinez CA, Abraham SM, Speckmann C, Ehl S, Hall P, Forbes LR, Merckoll E, Westvik J, Nishimura G, Rustad CF, Abrahamsen TG, Rønnestad A, Osnes LT, Egeland T, Rødningen OK, Beck CR; Baylor-Johns Hopkins Center for Mendelian Genomics, Boerwinkle EA, Gibbs RA, Lupski JR, Orange JS, Lausch E, Hanson IC. PGM3 mutations cause a congenital disorder of glycosylation with severe immunodeficiency and skeletal dysplasia. *Am J Hum Genet* 2014;3;95(1):96-107.
- [76] Borell CW, Urrestarazu LA, Bhattacharjee JK. Two unlinked lysine genes (LYS9 and LYS14) are required for the synthesis of saccharopine reductase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 1984;159(1):429-32.
- [77] Kumánovics A, Chen OS, Li L, Bagley D, Adkins EM, Lin H, Dingra NN, Outten CE, Keller G, Winge D, Ward DM, Kaplan J. Identification of FRA1 and FRA2 as genes involved in regulating the yeast iron regulon in response to decreased mitochondrial iron-sulfur cluster synthesis. *J Biol Chem* 2008;283(16):10276-86.
- [78] Pretorius IS, Lambrechts MG, Marmur J. The glucoamylase multigene family in *Saccharomyces cerevisiae* var. diastaticus: an overview. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 1991;26(1):53-76.
- [79] Garrett MD, Zahner JE, Cheney CM, Novick PJ. GDI1 encodes a GDP dissociation inhibitor that plays an essential role in the yeast secretory pathway. *EMBO J* 1994;13(7):1718-28.

- [80] Minard KI, McAlister-Henn L. Isolation, nucleotide sequence analysis, and disruption of the MDH2 gene from *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for three isozymes of yeast malate dehydrogenase. *Mol Cell Biol* 1991;11(1):370-80.
- [81] Cupp JR, McAlister-Henn L. NAD(+)-dependent isocitrate dehydrogenase. Cloning, nucleotide sequence, and disruption of the IDH2 gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 1991;266(33):22199-205.
- [82] Brandriss MC. Proline utilization in *Saccharomyces cerevisiae*: analysis of the cloned PUT2 gene. *Mol Cell Biol* 1983;3(10):1846-56.
- [83] Stott K, Saito K, Thiele DJ, Massey V. Old Yellow Enzyme. The discovery of multiple isozymes and a family of related proteins. *J Biol Chem* 1993;268(9):6097-106.
- [84] Matsushika A, Goshima T, Fujii T, Inoue H, Sawayama S, Yano S. Characterization of non-oxidative transaldolase and transketolase enzymes in the pentose phosphate pathway with regard to xylose utilization by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microb Technol* 2012;51(1):16-25.
- [85] Rowen DW, Meinke M, LaPorte DC. GLC3 and GHA1 of *Saccharomyces cerevisiae* are allelic and encode the glycogen branching enzyme. *Mol Cell Biol* 1992;12(1):22-9.
- [86] Daran JM, Dallies N, Thines-Sempoux D, Paquet V, François J. Genetic and biochemical characterization of the UGP1 gene encoding the UDP-glucose pyrophosphorylase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* 1995;233(2):520-30.
- [87] Kopetzki E, Entian KD, Mecke D. Complete nucleotide sequence of the hexokinase PI gene (HXK1) of *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 1985;39(1):95-101.
- [88] Hilt W, Wolf DH. Proteasomes of the yeast *S. cerevisiae*: genes, structure and functions. *Mol Biol Rep* 1995;21(1):3-10.
- [89] van Heusden GP, Griffiths DJ, Ford JC, Chin-A-Woeng TF, Schrader PA, Carr AM, Steensma HY. The 14-3-3 proteins encoded by the BMH1 and BMH2 genes are essential in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and can be replaced by a plant homologue. *Eur J Biochem* 1995;229(1):45-53.
- [90] Chattopadhyay MK, Tabor CW, Tabor H. Methylthioadenosine and polyamine biosynthesis in a *Saccharomyces cerevisiae* meu1delta mutant. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;343(1):203-7.

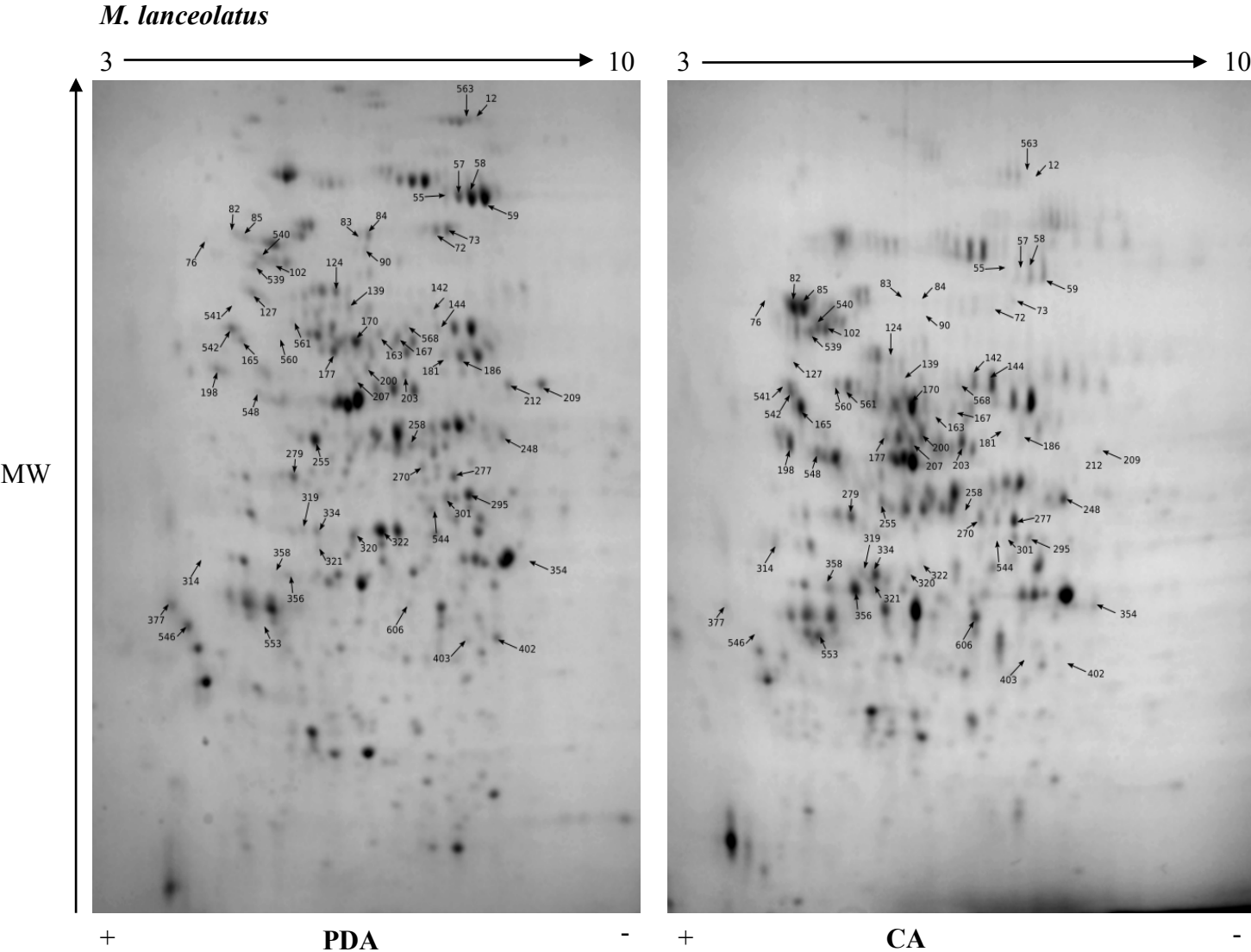
- [91] Hamasaki-Katagiri N, Tabor CW, Tabor H. Spermidine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: polyamine requirement of a null mutant of the SPE3 gene (spermidine synthase). *Gene* 1997;187(1):35-43.
- [92] Winston MK, Bhattacharjee JK. Biosynthetic and regulatory role of lys9 mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 1987;11(5):393-8.
- [93] Freist W, Gauss DH. Lysyl-tRNA synthetase. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1995;376(8):451-72.
- [94] Kornblatt MJ, Richard Albert J, Mattie S, Zakaib J, Dayanandan S, Hanic-Joyce PJ, Joyce PB. The *Saccharomyces cerevisiae* enolase-related regions encode proteins that are active enolases. *Yeast* 2013;30(2):55-69.
- [95] Zheng F, Jang WC, Fung FK, Lo AC, Wong IY. Up-regulation of ENO1 by HIF-1 α in retinal pigment epithelial cells after hypoxic challenge is not involved in the regulation of VEGF secretion. *PLoS One* 2016;11(2):e0147961.
- [96] Decker BL, Wickner WT. Enolase activates homotypic vacuole fusion and protein transport to the vacuole in yeast. *J Biol Chem* 2006;281(20):14523-8.
- [97] Fernández E, Moreno F, Rodicio R. The ICL1 gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* 1992;204(3):983-90.
- [98] Rodriguez D, Ginger RS, Baker A, Northcote DH. Nucleotide sequence analysis of a cDNA clone encoding malate synthase of castor bean (*Ricinus communis*) reveals homology to DAL7, a gene involved in allantoin degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Mol Biol* 1990;15(3):501-4.
- [99] Mouyna I, Amanianda V, Hartl L, Prevost MC, Sismeiro O, Dillies MA, Jagla B, Legendre R, Coppée JY, Latgé JP. GH16 and GH81 family β -(1,3)-glucanases in *Aspergillus fumigatus* are essential for conidial cell wall morphogenesis. *Cell Microbiol* 2016. doi: 10.1111/cmi.12630.
- [100] Petitjean M, Teste MA, François JM, Parrou JL. Yeast Tolerance to various stresses relies on the Trehalose-6P Synthase (Tps1) Protein, not on Trehalose. *J Biol Chem* 2015;290(26):16177-90.
- [101] Christensen PU, Davey J, Nielsen O. The *Schizosaccharomyces pombe* mam1 gene encodes an ABC transporter mediating secretion of M-factor. *Mol Gen Genet* 1997;255(2):226-36.

[102] McLennan AG. The MutT motif family of nucleotide phosphohydrolases in man and human pathogens (review). *Int J Mol Med* 1999;4(1):79-89.

Supplementary figures and tables

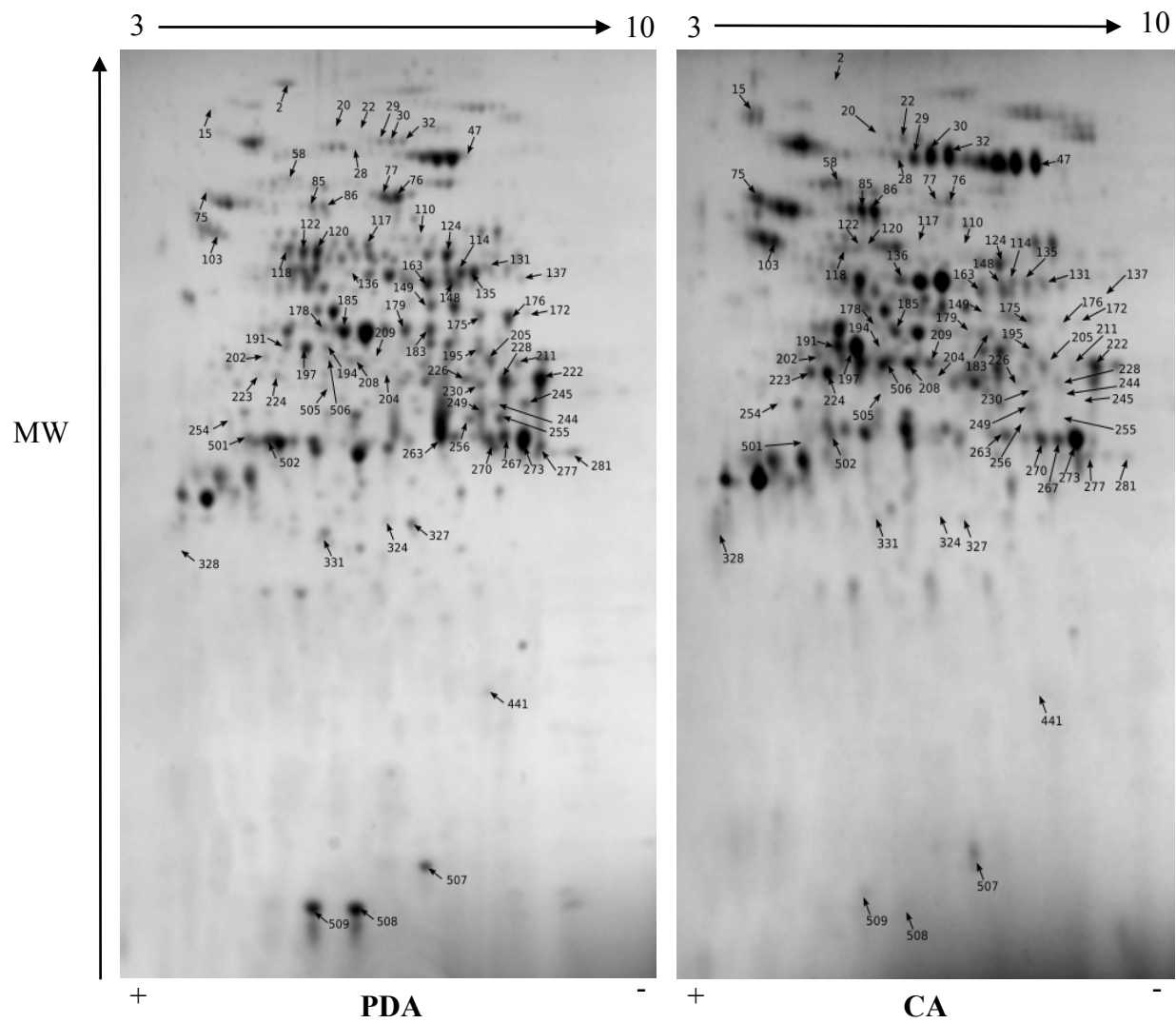
Supplementary figure 1. Consensus bi-dimensional protein gels (pH 3–10, SDS-PAGE 12%) obtained for *M. racemosus* UBOCC-A-109155 (**A**), *M. lanceolatus* UBOCC-A-109153 (**B**), *M. circinelloides* CBS 277-49 (**C**), *M. endophyticus* CBS 385-95 (**D**) in PDA and CA media. Arrows correspond to protein spots differentially expressed (fold ≥ 1.6 ; p value ≤ 0.02) and excised for mass spectrometry analysis. A minimum of 6 repetition was done for each strain and medium.

Supplementary Figure 1B.

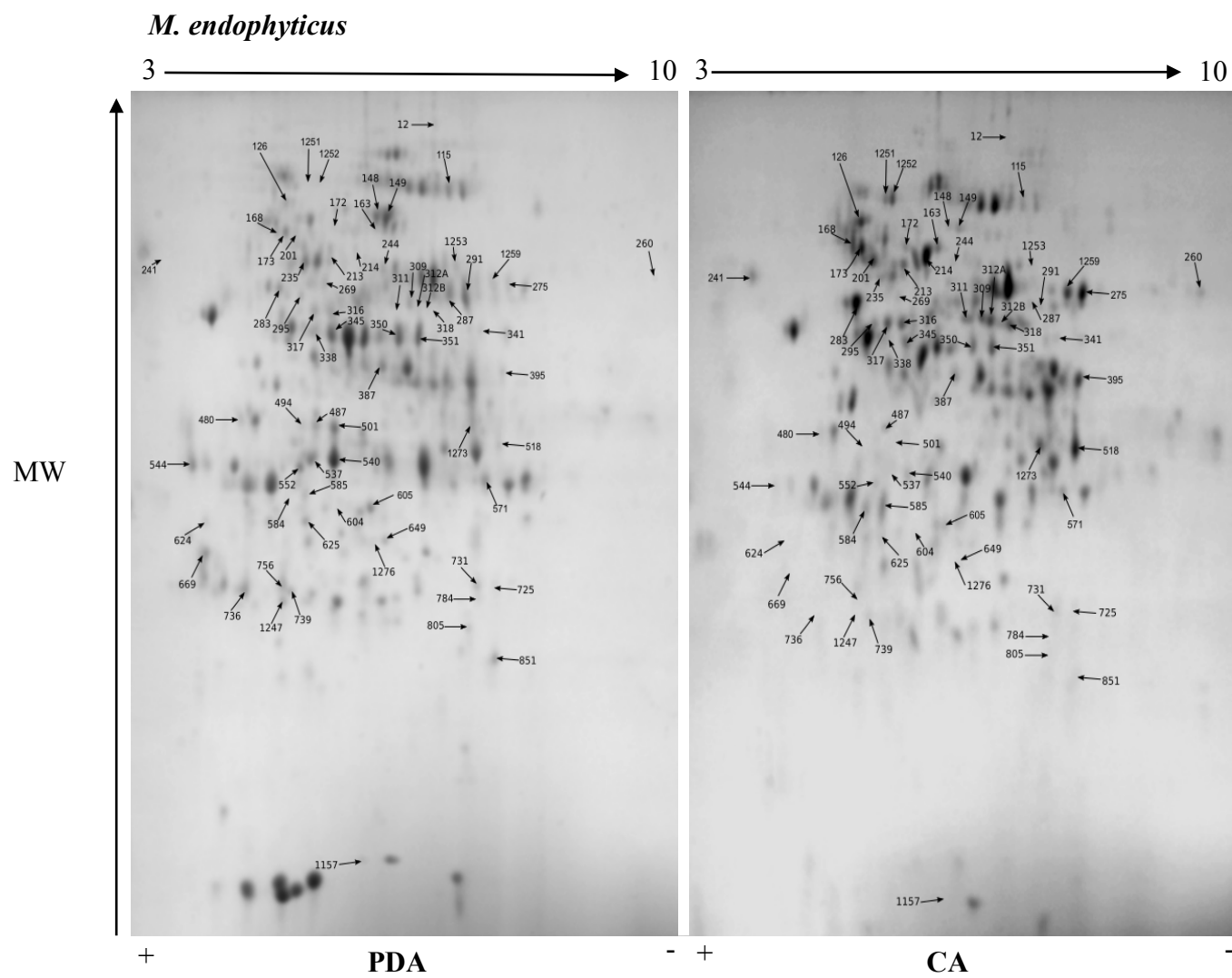


Supplementary Figure 1C.

M. circinelloides



Supplementary Figure 1D.



Supplementary Table 6. Identification of the protein spots showing significant up-regulation in CA media for *M. circinelloides* CBS 277-49.

Crosses indicate the absence of homology with *S. cerevisiae* proteins.

Spot_id	Accession	Blast accession UniProtKB/Swiss-Prot	Blast description UniProtKB/Swiss-Prot	Homology <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Score	Mass	Coverage	#peptides	Anova (p)	Fold	Average Normalised volumes	
											PDA	CA
15	jgi Mucci2 106643 Genemark1.2406_g	gi 128062 sp P08473.2	NEP_HUMAN: Neprilysin; Atrialopeptidase	x	394,76	82362,85	16,18	12	0,001	1,90	3,22E+06	5,98E+06
20	jgi Mucci2 110110 Genemark1.5873_g	gi 298351541 sp B0Y865.1	BGLL_ASFFC: Probable beta-glucosidase L; Beta-D-glucoside	x	214,11	78945,48	8,77	5	1,56E-04	2,20	2,50E+05	5,41E+05
22	jgi Mucci2 110110 Genemark1.5873_g	gi 298351541 sp B0Y865.1	BGLL_ASFFC: Probable beta-glucosidase L; Beta-D-glucoside	x	244,34	78945,48	10,17	6	1,18E-05	3,50	1,38E+05	4,89E+05
28	jgi Mucci2 107036 Genemark1.2799_g	gi 74597130 sp Q589F2.1	BGLL_EMENI: Probable beta-glucosidase L; Beta-D-glucoside	x	396,27	78324,18	13,79	8	1,91E-06	3,40	5,01E+05	1,70E+06
29	jgi Mucci2 127275 gw1.06.1068.1	gi 166208494 sp Q00766.3	PHS1_DICDI: Glycogen phosphorylase 1 (GP1)	GH1: Non-essential glycogen phosphorylase required for the mobilization of glycogen	154,88	94460,72	7,34	6	3,61E-09	4,10	1,69E+06	6,96E+06
30	jgi Mucci2 127275 gw1.06.1068.1	gi 166208494 sp Q00766.3	PHS1_DICDI: Glycogen phosphorylase 1 (GP1)	GH1: Non-essential glycogen phosphorylase required for the mobilization of glycogen	461,23	94460,72	15,85	13	6,51E-06	4,00	6,21E+05	2,49E+06
32	jgi Mucci2 127275 gw1.06.1068.1	gi 166208494 sp Q00766.3	PHS1_DICDI: Glycogen phosphorylase 1 (GP1)	GH1: Non-essential glycogen phosphorylase required for the mobilization of glycogen	158,46	94460,72	6,41	5	7,81E-07	2,70	1,88E+06	5,13E+06
47	jgi Mucci2 110109 Genemark1.5872_g	gi 298351541 sp B0Y865.1	BGLL_ASFFC: Probable beta-glucosidase L; Beta-D-glucoside	x	431,94	78471,38	19,92	12	8,35E-04	4,30	9,34E+05	3,99E+06
58	jgi Mucci2 108229 Genemark1.3992_g	gi 18903885 sp P24155.4	THOP1_RAT: Thimet oligopeptidase; Endo-oligopeptidase	PRD1: Zinc metalloendopeptidase, found in the cytoplasm and intermembrane space of mitochondria	175,70	76615,64	11,35	7	1,14E-06	1,90	9,46E+05	1,78E+06
75	jgi Mucci2 108072 Genemark1.3835_g	gi 2495359 sp Q01877.1	HSPT1_PUCGR: Heat shock protein HSP1	SSA3: ATPase involved in protein folding and the response to stress	495,53	70882,92	16,61	10	1,95E-05	2,90	1,71E+06	4,95E+06
85	jgi Mucci2 113497 Genemark1.9260_g	gi 902951556 sp V5YM83.1	DAPB3_PSEMX: Dipeptidyl aminopeptidase BIII (DAP BIII)	x	232,79	73481,10	6,44	4	5,19E-07	2,90	1,07E+06	3,05E+06
86	jgi Mucci2 112584 Genemark1.8347_g	gi 121735073 sp Q0CD83.1	AMPP1_ASPTN: Probable Xaa-Pro aminopeptidase P (AMPP)	FRA1: Protein involved in negative regulation of transcription of iron regulon	267,61	66659,91	13,06	6	5,73E-07	2,70	1,73E+06	4,60E+06
103	jgi Mucci2 114708 Genemark1.10471_g	gi 1166203663 sp P36415.2	HS7C1_DICDI: Heat shock cognate 70 kDa protein 1 (HSC70-1)	SSB2: Cytoplasmic ATPase that is a ribosome-associated molecular chaperone	691,72	59053,42	35,26	14	1,11E-05	2,30	2,61E+06	5,94E+06
136	jgi Mucci2 114708 Genemark1.10471_g	gi 1169291 sp P41751.1	ALDH_ASPNG: Aldehyde dehydrogenase (ALDDH; ALDH)	ALD4: Mitochondrial aldehyde dehydrogenase, required for growth on ethanol and conversion of acetaldehyde to acetate	148,91	54217,45	9,55	4	1,98E-05	2,00	6,37E+05	1,27E+06
176	jgi Mucci2 106677 Genemark1.2440_g	gi 74851485 sp Q54EW1.1	GLYC2_DICDI: Serine hydroxymethyltransferase 2 (SHMT 2)	SHM2: Cytosolic serine hydroxymethyltransferase, converts serine to glycine plus 5,10-methylenetetrahydrofolate	592,90	51117,11	28,02	12	4,21E-06	4,70	3,90E+06	8,39E+06
191	jgi Mucci2 110105 Genemark1.5868_g	gi 1133229 sp P26197.1	ACT2_ABSGL: Actin-2	ACT1: Actin, structural protein involved in cell polarization, endocytosis, and other cytoskeletal functions	221,00	41709,88	19,53	6	1,00E-03	2,40	1,47E+06	3,53E+06
197	jgi Mucci2 110105 Genemark1.5868_g	gi 1133229 sp P26197.1	ACT2_ABSGL: Actin-2	ACT1: Actin, structural protein involved in cell polarization, endocytosis, and other cytoskeletal functions	83,34	41709,88	11,08	4	2,46E-04	2,10	6,26E+06	1,53E+07
202	jgi Mucci2 115829 Genemark1.11592_g	gi 238686675 sp A5H013.1	URC4_LACKL: Uracil catabolism protein 4; Pyrimidine-degrading	x	105,13	47900,85	9,43	4	8,77E-04	2,80	8,731E+05	2,418E+06
204	jgi Mucci2 104488 Genemark1.251_g	gi 462384 sp P33198.1	IDHP_PIG: Isocitrate dehydrogenase (NADP), mitochondrial	IDP1: Mitochondrial NADP-specific isocitrate dehydrogenase, catalyzes the oxidation of isocitrate to alpha-ketoglutarate	145,18	36100,00	17,07	5	2,852E-04	2,30	3,479E+05	8,027E+05
208	jgi Mucci2 116005 Genemark1.11768_g	gi 1351910 sp Q09913.1	ALLC_SCHPO: Probable allantoinase; Allantoinase	DAL2: Allantoinase, converts allantoin to urea and ureidoglycolate in the second step of allantoin degradation	388,14	38354,33	25,29	7	5,34E-05	1,70	2,07E+06	3,62E+06
209	jgi Mucci2 116010 Genemark1.11773_g	gi 3091346 sp Q9P7L5.1	OAT_SCHPO: Ornithine aminotransferase car2; Ornithine--oxo-acid	CAR2: L-ornithine transaminase (OTase), catalyzes the second step of arginine degradation	111,38	47084,26	9,81	4	0,002	3,50	2,15E+05	7,61E+05
223	jgi Mucci2 114040 Genemark1.9803_g	gi 2492630 sp P70584.1	ACDSB_RAT: Short/branched chain specific acyl-CoA dehydrogenase	x	137,58	45242,16	6,57	3	6,05E-05	2,50	6,91E+05	1,74E+06
224	jgi Mucci2 114873 Genemark1.10636_g	gi 26006698 sp Q30B81.1	ACDSB_MOUSE: Short/branched chain specific acyl-CoA dehydrogenase	x	60,60	46567,69	4,26	2	2,48E-05	3,00	1,76E+06	5,23E+06
328	jgi Mucci2 104368 Genemark1.131_g	gi 20141190 sp O42766.2	1433_CANAL: 14-3-3 protein homolog	BMH2: 14-3-3 protein, minor isoform; controls proteome at post-transcriptional level, binds proteins and DNA	182,34	30015,01	13,97	3	3,61E-04	2,00	3,59E+06	7,03E+06
364	jgi Mucci2 115130 Genemark1.10873_g	gi 3915809 sp P28024.2	PSB4_XENLA: Proteasome subunit beta type-4; Macropain	PRE4: Beta 7 subunit of the 20S proteasome	39,70	29903,77	2,95	1	7,08E-04	1,90	7,92E+05	1,52E+06
505	jgi Mucci2 119945 gw1.02.472.1	gi 75147703 sp Q84QX0.1	OPR1_ORYSI: 12-oxophytodienoate reductase 1; 12-oxophytodienoate-10,11-reductase	OYE2: Conserved NADPH oxidoreductase containing flavin mononucleotide (FMN)	451,12	39898,16	26,80	9	2,66E-04	2,50	7,87E+05	1,99E+06
506	jgi Mucci2 116005 Genemark1.11768_g	gi 1351910 sp Q09913.1	ALLC_SCHPO: Probable allantoinase; Allantoinase	DAL2: Allantoinase, converts allantoin to urea and ureidoglycolate in the second step of allantoin degradation	198,13	38354,33	18,10	5	1,42E-05	2,50	1,13E+06	2,87E+06

Points saillants :

Cette première étude de protéomique a permis :

↳ De confirmer la meilleure adaptation de la souche technologique et de la souche mixte à l'environnement fromager via la comparaison de la croissance radiale et des caractères morphologiques, macroscopiques de 4 souches de *Mucor* (une technologique, une contaminante, une mixte et un endophyte) sur deux milieux (synthétique et mimant le fromage) ;

↳ D'identifier via une approche protéomique, pour les 4 souches, un total de 209 protéines présentant des différences d'expression significatives d'un milieu par rapport à l'autre ;

↳ De décrire les principales voies métaboliques mises en jeu par les différentes souches en fonction du milieu et de mettre en relation profils de croissance et activité métabolique :

- *M. racemosus* UBOCC-A-109155 n'a montré aucune différence significative entre les deux milieux au niveau du métabolisme, de la croissance radiale et de ses caractéristiques morphologiques.

- *M. lanceolatus* UBOCC-A-109153 utilise le cycle du TCA sur milieu PDA alors que c'est la glycolyse qui est activée sur CA. Les voies métaboliques impliquées dans les principales fonctions biologiques sont néanmoins similaires. Cette souche apparait comme mieux adaptée au milieu mimant le fromage, ce qui est confirmé par un mycélium dense et une sporulation intense.

- Chez *M. circinelloides* CBS 277-49, les profils de surexpression sont très différents en fonction du milieu. Sur milieu CA, la réponse au stress est particulièrement importante, le métabolisme des acides aminés et la glycolyse sont réduits alors que la mobilisation du glycogène et le métabolisme des purines est augmenté. Cette plus faible activité métabolique sur milieu mimant le fromage pourrait expliquer la croissance limitée observée.

- *M. endophyticus* CBS 385-95 semble avoir un métabolisme plus actif sur milieu synthétique PDA, avec une forte mise en oeuvre du métabolisme du carbone, de la biosynthèse des acides aminés, de la régulation transcriptionnelle et du turnover protéique. Le métabolisme est plus réduit sur milieu mimant le fromage où la densité du mycélium et la sporulation sont limitées.

↳ De suggérer, globalement, l'existence de mécanismes d'adaptation aux milieux (PDA/CA) spécifiques de chaque souche ;

↳ D'identifier des marqueurs potentiels d'adaptation, comme les protéines THOP1, EF2, PHS1 et GLYC2.

II.2. Analyse interspécifique des modifications du protéome d'une souche technologique et d'une souche contaminante occasionnelle

En complément de l'approche précédente décrivant les voies métaboliques mises en jeu par 4 souches de *Mucor* (une technologique, une contaminante, une mixte et un endophyte) sur deux milieux (synthétique et mimant le fromage), nous avons réalisé une étude transversale visant à comparer pour un même milieu les différences d'expression protéiques inter-espèces entre la souche technologique *Mucor lanceolatus* UBOCC-A-109153 et la souche contaminante *Mucor circinelloides* CBS 277-49, avec l'objectif d'identifier des marqueurs potentiels d'adaptation à l'environnement fromager.

Une partie de ce travail a été réalisé dans le cadre du stage de DUT Génie Biologique option Analyses Biologiques et Biochimiques (2^{ème} année) de Katell JEFFROY intitulé «*Analyse protéomique comparative de *Mucor lanceolatus* et *Mucor circinelloides* en vue d'identifier des marqueurs d'adaptation au milieu fromager*». Les protocoles expérimentaux utilisés sont identiques à ceux détaillés dans l'article n°3.

II.2.a. Identification des protéines exprimées de façon différentielle sur un même milieu

Les gels bidimensionnels consensus correspondant à l'alignement d'un minimum de 6 gels pour chacune des deux souches étudiées (**Figures 17 et 18**) ont été analysés avec le logiciel SameSpot qui a permis de sélectionner, pour chaque milieu testé, le gel de référence à utiliser pour localiser les spots protéiques exprimés de manière différentielle. Le gel consensus de *M. circinelloides* CBS 277-49, constitué d'un total de 887 spots protéiques, a été utilisé comme référence pour le milieu PDA ; et celui *M. lanceolatus* UBOCC-A-109153, avec un total de 741 spots protéiques, pour le milieu CA. Les différences d'expression protéique (surexpression, sous-expression, présence, absence) d'une souche par rapport à l'autre sur un même milieu ont ensuite été déterminées par analyse d'image sur la base des profils de ces gels de référence, en appliquant une différence d'expression d'un facteur égal ou supérieur à 1,6 (p value < 0,02).

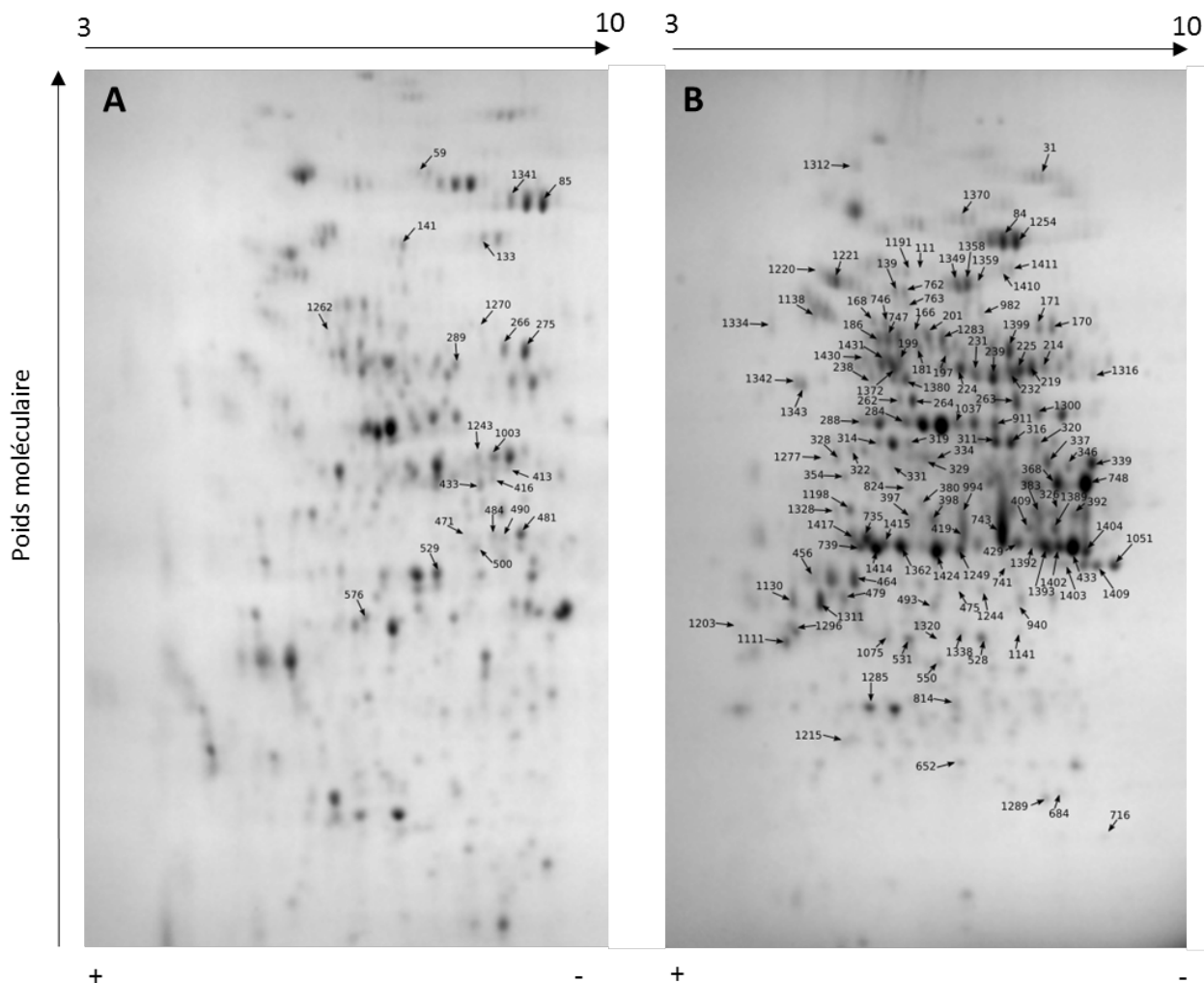


Figure 17 : Protéomes de *M. lanceolatus* UBOCC-A-109153 (A) et *M. circinelloides* CBS 277-49 (B) sur milieu PDA. Les numéros indiqués correspondent aux spots protéiques présentant une différence d'expression égale ou supérieure à 1,6 pour une souche par rapport à l'autre.

Un total de 165 spots protéiques a été sélectionné sur milieu PDA (142 prélevés sur les gels de *M. circinelloides* CBS 277-49 et 23 sur ceux de *M. lanceolatus* UBOCC-A-109153) contre 138 sur milieu CA (71 prélevés sur les gels de *M. circinelloides* CBS 277-49 et 67 sur ceux de *M. lanceolatus* UBOCC-A-109153).

L'ensemble de ces spots a été extrait (même mode opératoire que celui décrit dans l'article n°3) et identifié par LC MALDI TOF-TOF au niveau de la plateforme Proteogen de l'Université de Caen. Afin de pouvoir comparer les profils électrophorétiques inter-souches, 24 spots témoins « de référence » localisés à des emplacements similaires sur les gels 2D de chacune des souches (et non-identifiés comme exprimés de manière différentielle avec le logiciel

SameSpot) ont été extraits et analysés pour chaque milieu en complément des spots correspondant à des protéines exprimées de façon différentielle. Sur ces 24 spots, 14 se sont révélés totalement identiques pour les deux milieux (**Annexe 1**).

Des pourcentages d'identification de 95,8% (158 spots) et 85,5% (105 spots) ont été respectivement obtenus sur milieux PDA et CA en recherchant des similitudes avec les génomes spécifiques disponibles dans la base de données MucorDB (plateforme ABIMS de la Station de Biologie Marine de Roscoff). Certaines protéines ont été identifiées plusieurs fois à partir de différents spots, ce qui peut correspondre à la présence de différentes isoformes ou de formes ayant subi des modifications post-traductionnelles.

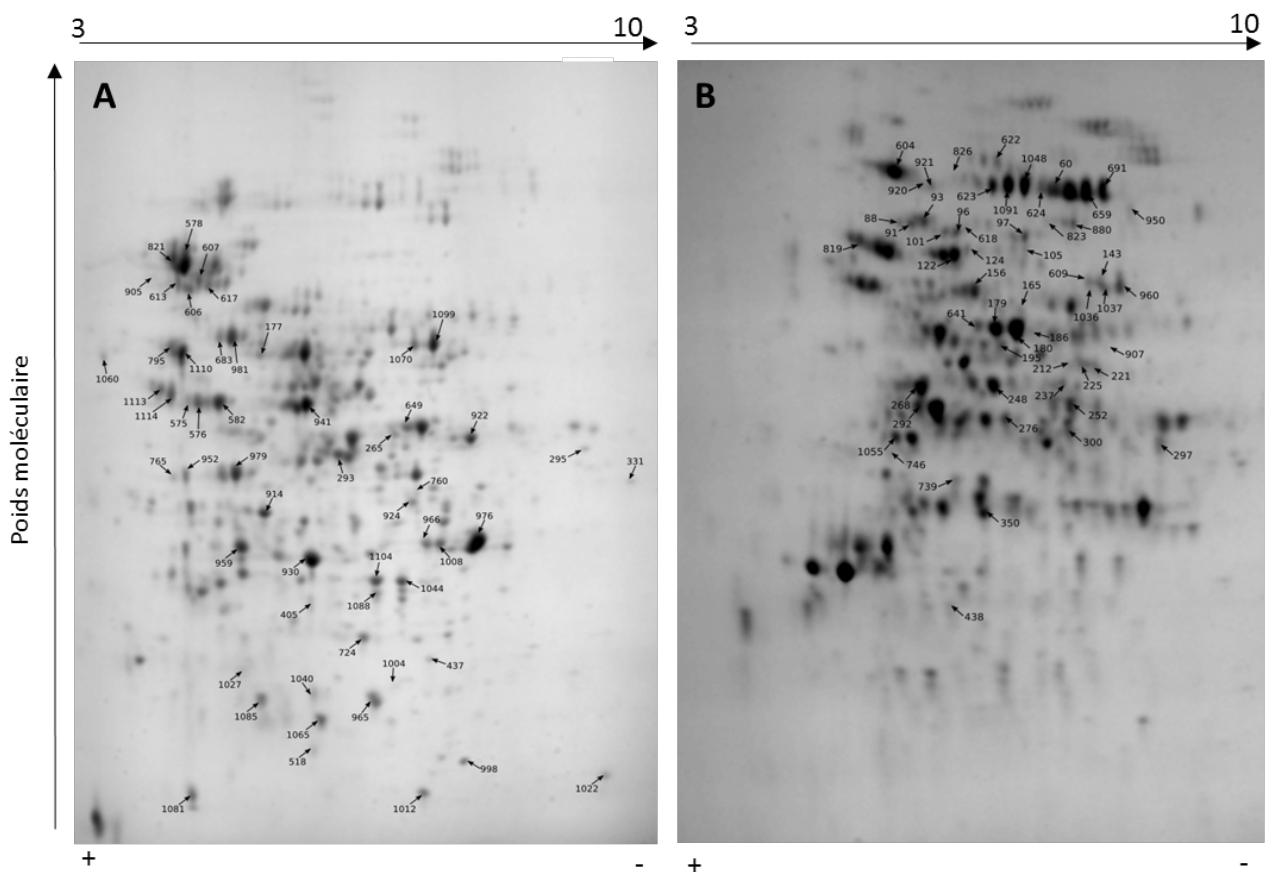


Figure 18 : Protéomes de *M. lanceolatus* UBOCC-A-109153 (A) et *M. circinelloides* CBS 277-49 (B) sur milieu CA. Les numéros indiqués correspondent aux spots protéiques présentant une différence d'expression égale ou supérieure à 1,6 pour une souche par rapport à l'autre.

En intégrant ces observations, 174 protéines différentes (96 sur PDA et 78 sur CA) ont été répertoriées pour un total de 263 spots identifiés. Le **tableau 3** présente une synthèse des résultats obtenus. Son analyse démontre que le nombre de protéines surexprimées pour *M.*

circinelloides CBS 277-49 est réduit de 43,2% sur milieu CA par rapport au milieu PDA alors que le phénomène inverse est observé pour *M. lanceolatus* UBOCC-A-109153 (+ 186,7% de protéines exprimées sur milieu CA par rapport au PDA). Les **tableaux 4 à 7** listent en détail les protéines identifiées pour chacune des souches et chacun des milieux, en intégrant les homologies avec les protéines de *S. cerevisiae*.

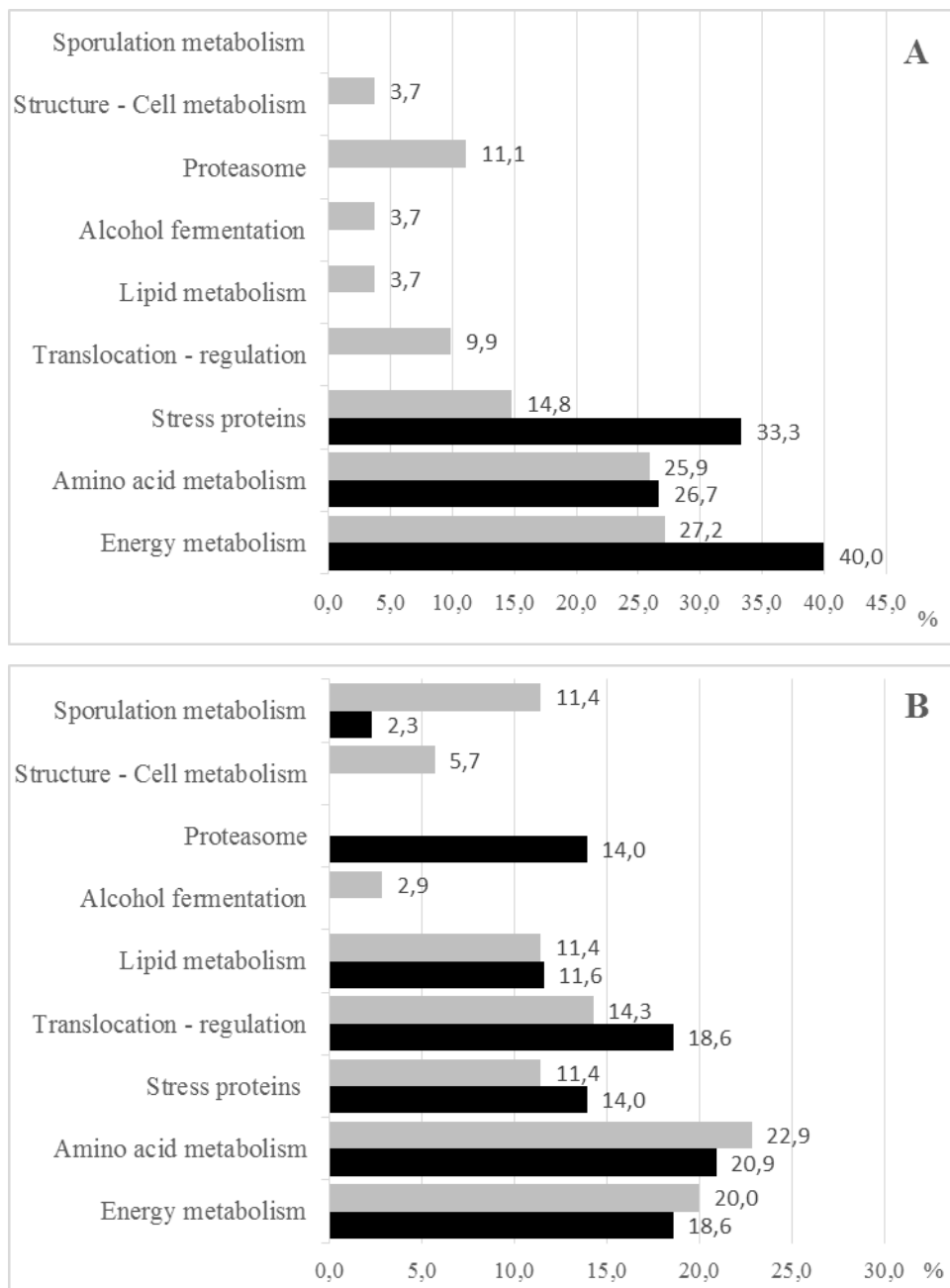


Figure 19 : Répartition fonctionnelle des protéines surexprimées sur milieu PDA (A) et CA (B) pour *M. lanceolatus* UBOCC-A-109153 (en noir) et *M. circinelloides* CBS 277-49 (en gris).

La répartition fonctionnelle des 174 protéines identifiées montre que *M. lanceolatus* UBOCC-

A-109153 présente de nombreuses protéines de stress sur milieu PDA (**Figure 19**) sur lequel son activité est centrée sur le métabolisme des acides aminés et de l'énergie. Ce profil fonctionnel est très différent sur milieu CA où la proportion de protéines de stress diminue (14 contre 33,3%) alors que le métabolisme des lipides, la machinerie d'expression protéique et le protéasome sont fortement mis en jeu.

Pour *M. circinelloides* CBS 277-49, les différences entre les deux milieux sont plus nuancées. On note particulièrement une forte activité du métabolisme lié à la sporulation sur milieu CA, accompagnée d'un fort accroissement du métabolisme des lipides (11,4 versus 3,7%). Le protéasome est uniquement présent sur PDA.

L'étude des protéines exprimées de manière commune ou spécifique par chacune des souches a été réalisée avec le logiciel Venny 2.1.0. (cf Matériels et Méthodes de l'article n°3 ; **Figure 20**).

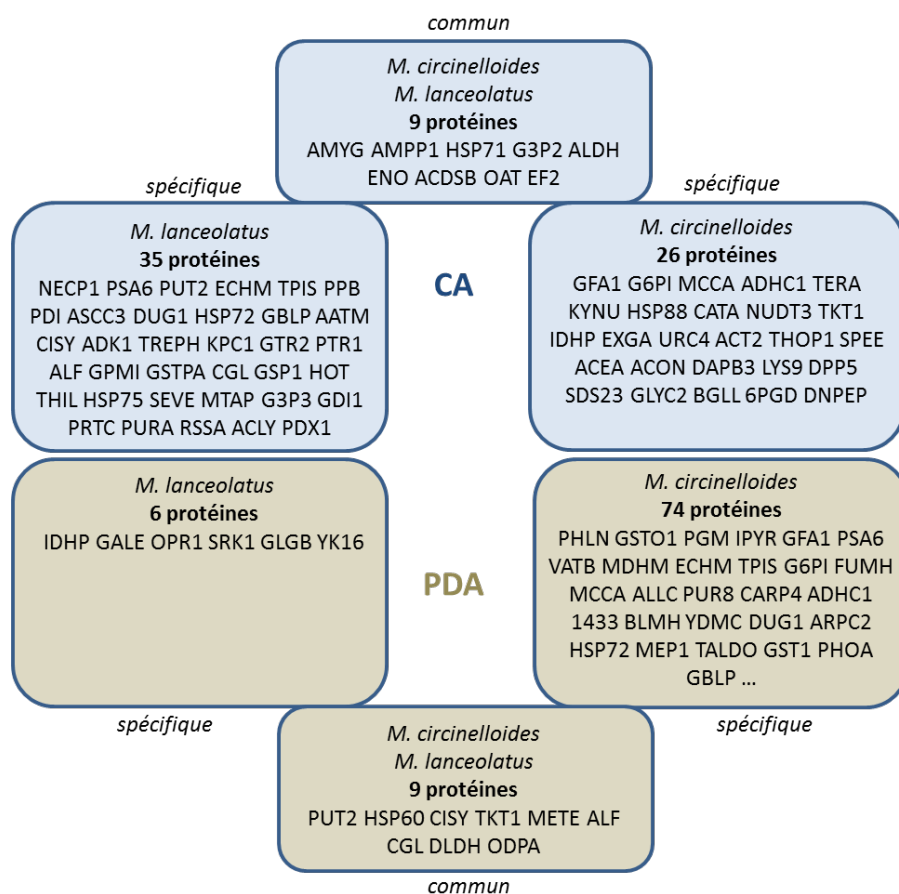


Figure 20 : Etude des protéines communément ou spécifiquement exprimées par *M. lanceolatus* UBOCC-A-109153 et *M. circinelloides* CBS 277-49 sur milieux PDA et CA.

Le nombre de protéines communes aux deux souches pour chacun des milieux est identique (n=9) mais leur nature est totalement différente. D'autre part, pour *M. lanceolatus* UBOCC-

A-109153, 6 protéines sont exprimées spécifiquement sur milieu PDA contre 35 sur milieu CA. Pour *M. circinelloides* CBS 277-49, la situation inverse est observée avec 74 protéines spécifiques sur milieu PDA contre 26 sur CA. Ces éléments vont dans le sens des observations morphologiques et de croissance présentées précédemment. Ils suggèrent i) que la réponse adaptative est espèce-spécifique et ii) que les voies métaboliques varient fortement en fonction du milieu.

Tableau n°3 : Synthèse des résultats de l'analyse des protéomes de *M. circinelloides* CBS 277-49 et *M. lanceolatus* UBOCC-A-109153 sur milieux PDA et CA. Les spots protéiques présentant une différence d'expression égale ou supérieure à 1,6 entre les deux souches étudiées pour un même milieu ont été extraits et identifiés par LC MALDI TOF-TOF. Seules les identifications de protéines pour lesquelles plus d'une séquence peptidique a été obtenu ont été prises en compte. Pour chaque souche, le nombre de protéines surexprimées correspondant au nombre de spots protéiques analysés et la proportion d'homologie avec le protéome de *S. cerevisiae* sont indiqués.

Media	Reference 2DE	Proteome	<i>M. circinelloides</i> CBS 277-49				<i>M. lanceolatus</i> UBOCC-A-109153			
			Nb of spot up-regulated	Nb of spot up-regulated identified	Corresponding nb of protein	% of homology with <i>S. cerevisiae</i> (nb)	Nb of spot up-regulated	Nb of spot up-regulated identified	Corresponding nb of protein	% of homology with <i>S. cerevisiae</i> (nb)
PDA	<i>M. circinelloides</i> CBS 277-49	887	142	136	81	76 (93,8%)	23	22	15	15 (100%)
CA	<i>M. lanceolatus</i> UBOCC-A-109153	741	71	62	35	28 (80%)	67	56	43	36 (83,7%)

Tableau n°4 : Protéines surexprimées par *M. lanceolatus* UBOCC-A-109153 sur milieu PDA.

Blast accession	Blast description	Homology <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Score	Mass	coverage	#peptides	Anova (p)	Fold	Average Normalised Volume	
									PDA	CA
gi 48474648 sp Q9HDV4.1	YK16_SCHPO: Putative ATP-dependent RNA helicase PB1A10.06c	ECM16: Essential DEAH-box ATP-dependent RNA helicase specific to the U3 snRNP, predominantly nucleolar in distribution, required for 18S rRNA synthesis; Probable ATP-binding RNA helicase	51,26	236566,85	1,07	2	0,01797794	2,34	9,45E+004	2,21E+005
gi 30913128 sp Q9UT19.1	METE_SCHPO: Probable 5-methyltetrahydropteroyltryglutamate-homocysteine	MET6: Cobalamin-independent methionine synthase, involved in methionine biosynthesis and regeneration	522,53	286193,24	4,04	8	0,01360967	3,53	5,41E+005	1,91E+006
gi 3024751 sp Q12630.1	TKT1_KLULA: Transketolase (TK)	TKL1: Transketolase, similar to Tkt2p; catalyzes conversion of xylulose-5-phosphate and ribose-5-phosphate to sedoheptulose-7-phosphate and glyceraldehyde-3-phosphate in the pentose phosphate pathway	76,30	279007,73	1,10	3	0,01084592	2,409	2,34E+005	5,65E+005
gi 597439576 sp Q8NWE1.2	GLSB_RHID: 1,4-alpha-glucan-branching enzyme; Glycogen-branching	GLC3: Glycogen branching enzyme, involved in glycogen accumulation	200,59	221268,86	3,28	6	0,00124563	3,71	1,12E+005	4,17E+005
gi 2494072 sp P78568.1	PUT2_AGABI: Delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase	PUT2: Delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase, nuclear-encoded mitochondrial protein involved in utilization of proline as sole nitrogen source	309,32	317872,91	3,25	8	6,03E-005	3,653	3,36E+005	1,23E+006
gi 2494072 sp P78568.1	PUT2_AGABI: Delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase	PUT2: Delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase, nuclear-encoded mitochondrial protein involved in utilization of proline as sole nitrogen source	472,79	317872,91	3,70	9	0,01617326	10,54	2,08E+004	2,20E+005
gi 13124714 sp O00087.2	DLDH_SCHPO: Dihydrolysoyl dehydrogenase, mitochondrial	LPD1: Dihydrolysoamide dehydrogenase, the lipamide dehydrogenase component (E3) of the pyruvate dehydrogenase and 2-oxoglutarate dehydrogenase multi-enzyme complexes	189,35	165166,12	2,86	3	0,01508474	4,298	4,27E+004	1,84E+005
gi 1705871 sp P51044.1	CISY_ASPNG: Citrate synthase, mitochondrial; Flags: Precursor	CIT1: Citrate synthase, catalyzes the condensation of acetyl coenzyme A and oxaloacetate to form citrate; the rate-limiting enzyme of the TCA cycle	629,61	208829,14	6,27	8	0,01836688	3,61	3,52E+005	1,27E+006
gi 158518416 sp P54071.3	IDHP_MOUSE: Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial	IDP2: Cytosolic NADP-specific isocitrate dehydrogenase, catalyzes oxidation of isocitrate to alpha-ketoglutarate	189,38	319835,68	1,65	4	0,00182928	8,22	1,82E+005	1,49E+006
gi 75075872 sp Q4R502.1	IDHP_MACFA: Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial	IDP2: Cytosolic NADP-specific isocitrate dehydrogenase, catalyzes oxidation of isocitrate to alpha-ketoglutarate	52,31	408182,22	0,97	3	0,01835593	2,67	1,36E+005	3,65E+005
gi 17301931 sp P55180.1	GALE_BACSU: UDP-glucose 4-epimerase, Galactowaldenase	GAL10: UDP-glucose-4-epimerase, catalyzes the interconversion of UDP-galactose and UDP-D-glucose in galactose metabolism	137,56	150722,66	4,09	5	0,0052925	3,848	5,08E+004	1,96E+005
gi 75147703 sp Q84QK0.1	OPR1_ORYS1: 12-oxophytodienoate reductase 1; 12-oxophytodienoate	OYE3: Conserved NADPH oxidoreductase containing flavin mononucleotide (FMN), homologous to Oye2p with different ligand binding and catalytic properties	553,89	118160,97	13,97	10	0,01248672	4,489	1,51E+005	6,77E+005
gi 75147703 sp Q84QK0.1	OPR1_ORYS1: 12-oxophytodienoate reductase 1; 12-oxophytodienoate	OYE3: Conserved NADPH oxidoreductase containing flavin mononucleotide (FMN), homologous to Oye2p with different ligand binding and catalytic properties	166,20	118160,97	5,31	5	0,00302167	3,217	8,58E+004	2,76E+005
gi 74858798 sp Q5SDV9.1	CGL_DICD: Cystathionine gamma-lyase; Gamma-cystathionase	CYS3: Cystathionine gamma-lyase, catalyzes one of the two reactions involved in the transsulfuration pathway that yields cysteine from homocysteine with the intermediary formation of cystathionine	71,98	169667,65	1,88	2	0,00593385	4,2	6,53E+004	2,74E+005
gi 730222 sp P16387.2	ODPA_YEAST: Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha	PDH1: E1 alpha subunit of the pyruvate dehydrogenase (PDH) complex, catalyzes the direct oxidative decarboxylation of pyruvate to acetyl-CoA; phosphorylated; regulated by glucose	114,43	248605,90	1,24	3	0,00852135	2,539	1,65E+005	4,19E+005
gi 143955275 sp A1VYV7.1	ALF_CAMU: Fructose-bisphosphate aldolase; FBP aldolase	FBA1: Fructose 1,6-bisphosphate aldolase, required for glycolysis and gluconeogenesis; catalyzes conversion of fructose 1,6-bisphosphate to glyceraldehyde-3-P and dihydroxyacetone-P	139,81	34705,09	15,87	4	0,01139298	3,155	2,04E+005	6,44E+005
gi 127151695 sp O9A547.1	SRK1_SCHPO: Serine/threonine-protein kinase srk1	RCK2: Protein kinase involved in the response to oxidative and osmotic stress; identified as suppressor of <i>S. pombe</i> cell cycle checkpoint mutations; similar to CaM (calmodulin) kinases	350,90	324276,29	2,54	6	0,00969535	4,152	6,63E+004	2,75E+005
gi 1705871 sp P51044.1	CISY_ASPNG: Citrate synthase, mitochondrial; Flags: Precursor	CIT1: Citrate synthase, catalyzes the condensation of acetyl coenzyme A and oxaloacetate to form citrate; the rate-limiting enzyme of the TCA cycle	366,83	208829,14	4,53	6	0,00889798	5,612	4,77E+004	2,68E+005
gi 1705871 sp P51044.1	CISY_ASPNG: Citrate synthase, mitochondrial; Flags: Precursor	CIT1: Citrate synthase, catalyzes the condensation of acetyl coenzyme A and oxaloacetate to form citrate; the rate-limiting enzyme of the TCA cycle	203,00	208829,14	3,27	4	0,01282173	3,619	7,28E+004	2,63E+005
gi 74680843 sp Q5904.1	HSP90_EHEM1: Heat shock protein 90; 90 kDa chaperonin	HSP90: Tetradecameric mitochondrial chaperonin required for ATP-dependent folding of precursor polypeptides and complex assembly; prevents aggregation and mediates protein refolding after heat shock	197,78	195591,1	3,82	5	0,00915139	3,413	6,40E+005	2,19E+006
gi 2494072 sp P78568.1	PUT2_AGABI: Delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase	PUT2: Delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase, nuclear-encoded mitochondrial protein involved in utilization of proline as sole nitrogen source	249,31	317872,91	3,46	8	0,01167616	7,565	3,06E+004	2,34E+005
gi 30913128 sp Q9UT19.1	METE_SCHPO: Probable 5-methyltetrahydropteroyltryglutamate-homocysteine	MET6: Cobalamin-independent methionine synthase, involved in methionine biosynthesis and regeneration	211,21	286193,24	2,04	4	0,00735193	3,023	1,57E+005	4,74E+005

II.2.b. Analyse des protéines surexprimées et des voies métaboliques mises en jeu par homologie avec le protéome de *S. cerevisiae*

→ *M. lanceolatus* UBOCC-A-109153 sur milieu PDA :

Quinze protéines sont surexprimées sur milieu PDA par la souche *M. lanceolatus* UBOCC-A-109153, avec des facteurs allant de 2 à 10,5 (**Tableau 4**). L'homologie avec des protéines de *S. cerevisiae* est de 100%. L'analyse par StringDB des interactions protéiques (**Figure 21**) met en évidence 4 grands clusters fortement liés :

- un premier cluster (en bleu ● sur la figure) composé de trois protéines : MET 6 (Cobalamin-independent methionine synthase ; identifiée 2 fois avec un facteur de surexpression maximum de 3,5), CYS3 (Cystathionine gamma-lyase ; facteur de 4,2) et TKL1 (Transketolase ; facteur de 2,4). Ces protéines, qui interviennent dans la synthèse des acides aminés (Ono *et al.*, 1992 ; Kochetov *et al.*, 2014 ; Wheatley *et al.*, 2016), sont en interaction forte avec des protéines appartenant à 3 autres clusters, notamment FBA1 (Fructose 1,6-bisphosphate aldolase), IDP2 (Cytosolic NADP-specific isocitrate dehydrogenase), CIT1 (Citrate synthase) et LPD1 (Dihydrolipoamide dehydrogenase). Notons que TKL1 intervient également dans la voie des pentoses phosphates et est nécessaire à la synthèse des acides aminés aromatiques.

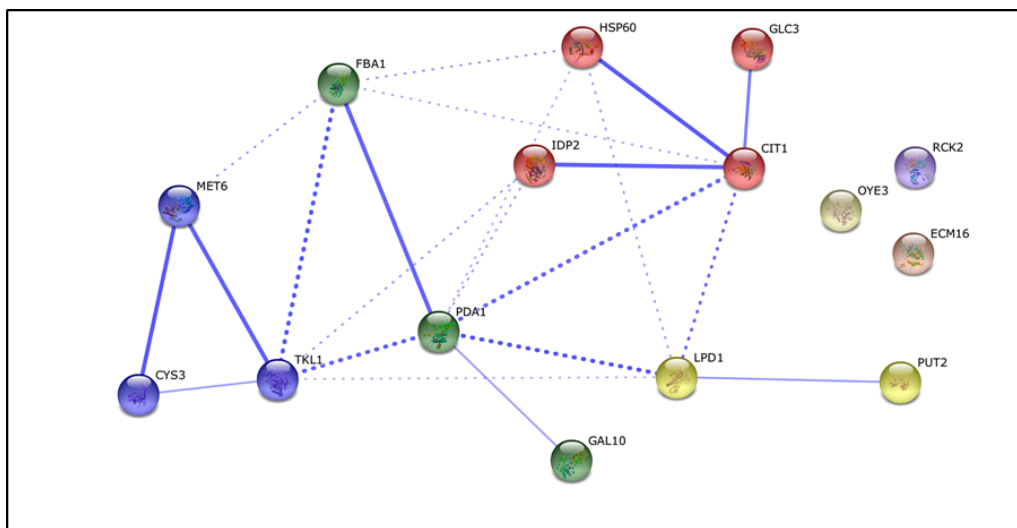


Figure 21 : Analyse String-DB des protéines surexprimées par *M. lanceolatus* UBOCC-A-109153 sur milieu PDA. L'analyse a été menée sur la base des homologies déterminées avec le protéome de *S. cerevisiae*. L'épaisseur des lignes indique la force du support de données (confiance). Paramètres sélectionnés : i) textmining, neighborhood, experiments, gene fusion, databases, co-occurrence and co-expression active interaction sources; ii) medium confidence as the minimum required interaction source et iii) no predicted interactors shown.

- un second cluster (en vert ●) regroupant les protéines FBA1 (Fructose 1,6-bisphosphate aldolase), PDA1 (facteur de surexpression de 2,5) et GAL10 (UDP-glucose-4-epimerase) qui interviennent dans la glycolyse / gluconéogenèse en lien avec LPD1.
- un troisième cluster (en jaune ●) composé de PUT2 (Delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase) et LPD1, protéines qui interviennent dans différentes voies métaboliques. PUT2 est la protéine la plus fortement exprimée dans cette étude (facteur maximum de 10,5 ; retrouvées 2 fois dans les identifications), trois fois plus que LPD1 (facteur de 4,3).
- un dernier cluster (en rouge ●) avec 4 protéines : HSP60 (Tetradecameric mitochondrial chaperonin), IDP2, CIT1 et GLC3 (Glycogen branching enzyme) qui sont impliquées dans différentes voies métaboliques. CIT1 (représentée 3 fois dans l'identification avec un facteur de surexpression élevé - max 5,6) et IDP2 (facteur très élevé de 8,2) interagissent avec LPD1 et PDA1, probablement du fait de leur implication commune dans le cycle de Krebs.

Au total, 60% des protéines surexprimées interviennent dans la biosynthèse de métabolites secondaires (CIT1, FBA1, GAL10, GLC3, IDP2, LPD1, MET6, PDA1 et TKL1).

Finalement, 3 protéines de stress ne présentent pas d'interactions particulières avec les différents clusters précités :

- **OYE3** (Conserved NADPH oxidoreductase containing flavin mononucleotide ; identifiée 2 fois avec un facteur de surexpression maximum de 4,5) et **RCK2** (Protein kinase, facteur de 4,1) qui sont impliquées dans la réponse au stress oxydatif et osmotique (O'Doherty *et al.*, 2013 ; Greetham *et al.*, 2014), mais aussi dans la mort cellulaire programmée (Odat *et al.*, 2007).
- **ECM16** (Essential DEAH-box ATP-dependent RNA helicase, facteur de 2,3), qui est nécessaire pour la synthèse de l'ARN ribosomique 18S et joue un rôle dans la restructuration du pré-ARN ribosomal.

En conclusion, nous constatons que peu de protéines sont surexprimées par *M. lanceolatus* UBOCC-A-109153 par rapport à *M. circinelloides* CBS 277-49 sur milieu PDA. Les protéines identifiées semblent essentielles pour son développement sur ce milieu synthétique. Elles interviennent principalement dans le métabolisme énergétique : glycolyse / gluconéogenèse, voie du cycle de Krebs, métabolisme des acides aminés ou encore la biosynthèse des métabolites secondaires (flavonoïdes, alcaloïdes, ...) et la production de

protéines de stress. Les voies métabolites paraissent globalement peu actives sur milieu synthétique, en adéquation avec la faible densité du mycélium et la production limitée de spores observées au niveau morphologique.

→ *M. lanceolatus* UBOCC-A-109153 sur milieu CA :

Sur les 43 protéines identifiées (**Tableau 5**), 36 présentent une homologie avec *S. cerevisiae*, avec des facteurs de surexpression variant de 1,8 à 8,2 (34 protéines ont un facteur supérieur à 2). La répartition fonctionnelle des protéines, sachant qu'un grand nombre d'entre elles sont impliquées dans différentes voies métaboliques, peut être faite comme suit :

- un total de 20 protéines intervenant dans différentes voies métaboliques : AAT2, ADE12, ADH4, ADO1, ALD4, CAR2, CIT1, CYS3, DUG1, EHD3, ENO1 (nœud majeur en bleu clair ● sur la **Figure 22** ; fortement surexprimé et retrouvé 2 fois dans l'analyse), G10, FBA1, LSC1, MEU1, PHO8, PUT2, SGA1, TDH3, TPI1 ;
- 11 protéines impliquées dans la biosynthèse des métabolites secondaires : AAT2, ADH4, ALD4, CAR2, CIT1, ENO1, ERG10, FBA1, LSC1, TDH3 et TPI1 ;
- 7 protéines qui jouent un rôle dans la biosynthèse des acides aminés : AAT2, CIT1, CYS3, ENO1, FBA1, TDH3 et TPI1 ;
- 6 protéines impliquées dans la glycolyse / gluconéogenèse : ADH4, ALD4, ENO1, FBA1, TDH3 et TPI1 ;
- 3 protéines associées à la dégradation des acides gras : ADH4, ALD4 et ERG10 ;
- 3 protéines ribosomiales intervenant au niveau du spliceosome et des phénomènes d'endocytose : SSA1, SSA3 et SSB2.

L'analyse des interactions (String DB ; **Figure 22**) permet d'identifier 10 clusters qui ont des interactions très fortes entre eux, ainsi que 2 protéines :

- Le cluster gris (●) composé notamment de SCL1 (Alpha 1 subunit of the 20S proteasome) joue un rôle dans la dégradation des protéines poly-ubiquitine dans le cytoplasme et dans le noyau. Il est essentiel pour le maintien du nombre de protéines et pour l'élimination des protéines mal repliées. Le protéasome étant un complexe de protéinases multicatalytiques, il interagit avec SGA1 (Intracellular sporulation-specific glucoamylase, largement

surexprimée avec un facteur de 8,1) qui est impliquée dans la dégradation du glycogène, indispensable pour la sporulation (Pretorius *et al.*, 1991).

La protéine SCL1 est en lien avec ENO1 (Enolase I ; Ko *et al.*, 2013 ; Kornblatt *et al.*, 2013), nœud majeur (facteur de surexpression de 5,7) qui appartient à un cluster (bleu clair ●) composé de protéines impliquées dans la glycolyse / gluconéogenèse comme TPI1 (Triose phosphate isomerase ; facteur de 3,7) et FBA1. Les éléments de ce cluster interagissent avec ASC1 (G-protein β -subunit and guanine nucleotide dissociation ; facteur de 3,3), composante principale de la petite (40S) sous-unité ribosomique qui sert de protéine d'échafaudage et peut recruter d'autres protéines ribosomales, et PKC1 (Protein serine/threonine kinase, facteur de 3,6) qui est essentielle pour le maintien de l'intégrité de la paroi cellulaire au cours de la croissance (Vilella *et al.*, 2005 ; Krause *et al.*, 2008).

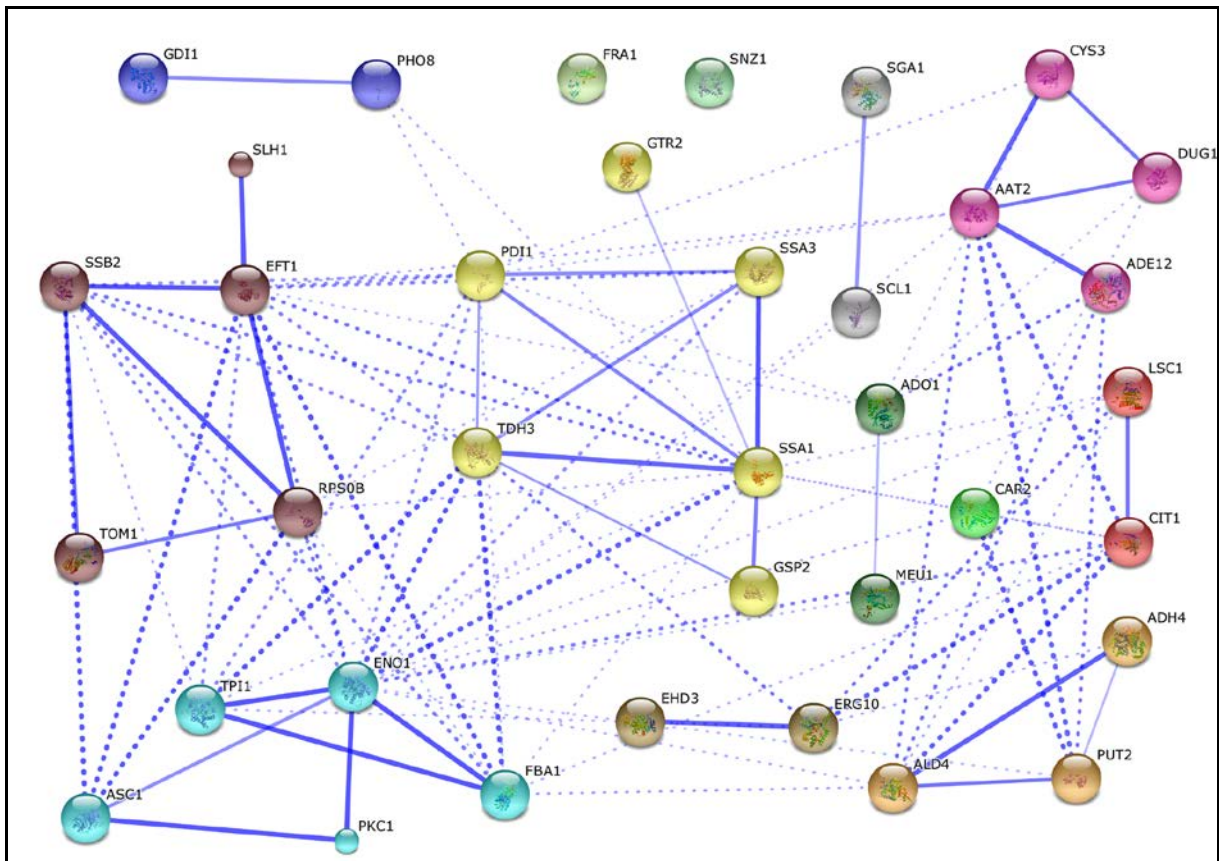


Figure 22 : Analyse String-DB des protéines surexprimées par *M. lanceolatus* UBOCC-A-109153 sur milieu CA. L'analyse a été menée sur la base des homologies déterminées avec le protéome de *S. cerevisiae*. L'épaisseur des lignes indique la force du support de données (confiance). Paramètres sélectionnés : i) textmining, neighborhood, experiments, gene fusion, databases, co-occurrence and co-expression active interaction sources; ii) medium confidence as the minimum required interaction source et iii) no predicted interactors shown.

- Ce cluster est en forte interaction avec un autre cluster (marron foncé ●) composé de TOM1 (E3 ubiquitin ligase ; facteur de 2,5) qui a la capacité d'interagir avec des protéines

marquées par des molécules d'ubiquitine. Cette protéine intervient dans le transport membranaire (endocytose) et joue un rôle dans l'exportation des ARNm à partir du noyau et dans la régulation de la transcription (Kato *et al.*, 2004 ; Wang *et al.*, 2010). Elle interagit avec RPSOB (composant protéique de la sous-unité ribosomale (40S), facteur de 3), EFT1 (Elongation factor 2, représentée 2 fois et fortement surexprimée : facteur maximum de 4,9) qui catalyse la translocation ribosomique au cours de la synthèse des protéines, SSB2 (Cytoplasmic ATPase - ribosome-associated molecular chaperone) qui jouerait le rôle de chaperonne pour les protéines en cours de synthèse (Rakwalska et Rospert, 2004), et SLH1 (putative RNA helicase ; facteur de 2,8) qui est impliquée dans le processus de traduction (Daugeron *et al.*, 2012).

- Ces 2 clusters (bleu clair ● et marron ●), en lien avec la régulation des ribosomes, interagissent fortement avec un cluster jaune (●) composé de TDH3 (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase ; facteur de 2,8 et représentée 2 fois) ; PDI1 (Protein disulfide isomerase ; facteur de 2,4) qui joue un rôle essentiel dans la formation de liaisons disulfure pour les protéines sécrétées et de surface mais qui a également été décrite pour son implication dans l'élimination des glycoprotéines défectueuses (Pfeiffer *et al.*, 2016) ; SSA1 et SSA3, qui sont des ATPase impliquées dans le repliement des protéines et la réponse au stress (membres de la famille des HSP70 ; Hasin *et al.*, 2014) et GSP2 (GTP binding protein, facteur de 2,8) qui intervient dans le maintien de l'organisation nucléaire, le traitement et le transport de l'ARN (Schlenstedt *et al.*, 1995).

- Trois protéines ribosomiales sont associées avec le spliceosome et les mécanismes d'endocytose : SSA1 (représentée 2 fois avec un facteur de 4), SSA3 (représentée 2 fois avec un facteur de 6,2) et SSB2 (représentée 2 fois avec un facteur de 3 ; clusters jaune ● et marron ●). Chez les levures, SSA3 a été décrite comme fortement abondante dans les spores (Werner-Washburne *et al.*, 1989).

- Les protéines PHO8 (Repressible vacuolar alkaline phosphatase ; facteur de 2,4) et GDI1 (GDP dissociation inhibitor, facteur de 3,3) jouent un rôle de régulation du transport vésiculaire important dans la voie sécrétoire (cluster bleu foncé ● ; Garrett *et al.*, 1994). PHO8 interagit avec des protéines ribosomiales comme SSA1 et PDI1 qui interviennent dans la transformation des protéines dans le réticulum endoplasmique (cluster jaune ●). Sa surexpression chez *S. cerevisiae* a été décrite récemment comme un facteur d'accroissement

de la production d'éthanol des souches utilisées pour la production de biofuel (Semkiv *et al.*, 2014).

- 3 protéines sont responsables de la dégradation des acides gras : ADH4 (Alcohol dehydrogenase isoenzyme type IV ; facteur de 2,7), ALD4 (Mitochondrial aldehyde dehydrogenase ; nœud majeur avec un facteur de 2,4), ERG10 (Acetyl-CoA C-acetyltransferase, facteur de 2,3). Elles catalysent la formation de l'acétoacétyl-CoA réductase dans les premières étapes de la biosynthèse du mévalonate, un intermédiaire nécessaire pour la biosynthèse des stérols et des isoprénoïdes des non stérols. Ces protéines appartiennent au même cluster que les protéines ALD4 et ADH4 (en orange ●) et sont en forte interaction avec PUT2 (nœud majeur, représentée 2 fois, facteur de 2,1) qui est impliquée dans l'utilisation de la proline et dans l'homéostasie du glutathion (Kaur *et al.*, 2012). PUT2 et ALD4 sont en lien avec le cluster rose (●) composé de ATT2 (Cytosolic aspartate aminotransferase ; nœud majeur avec un facteur de 2,1), protéine impliquée dans le métabolisme de l'azote et jouant un rôle essentiel dans le métabolisme des acides aminés ; ADE12 (Adenylosuccinate synthase, facteur de 2) qui intervient dans la voie de récupération des purines et la biosynthèse des nucléotides ; DUG1 (Cys-Gly metallo-di-peptidase, facteur de 5,8), décrite dans la dégradation du glutathion (GSH) et d'autres peptides contenant une liaison gamma-glu-X (Kaur *et al.*, 2012) et CYS3 (Cystathionine gamma-lyase, facteur de 2,6), qui catalyse une des deux réactions impliquées dans la voie de trans-sulfuration générant des intermédiaires de la cystathionine.

- Le cluster rose (●) est en lien avec ADO1 (Adenosine kinase, représentée 2 fois avec un facteur maximum de 2,6), dont un des rôles physiologiques majeurs est le recyclage de l'adénosine produite par le cycle du méthyle, et MEU1 (Methylthioadenosine phosphorylase, facteur de 2,5) qui catalyse la première étape de la voie de la méthionine. Ces 2 protéines forment le cluster vert foncé (●).

- Les clusters rose (●) et orange (●) sont en lien avec le cluster rouge (●) qui est composé de CIT1 (Citrate synthase ; facteur de 2,3) qui catalyse la condensation de l'acétyl-coenzyme A et de l'oxaloacétate pour former le citrate (enzyme limitante du cycle de Krebs) ; et LCS1 (Alpha subunit of succinyl-CoA ligase, facteur de 2,1) qui est une enzyme mitochondriale du cycle de Krebs. Ce cluster interagit avec le cluster marron clair (●) composé des protéines ERG10 et EHD3 (3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase, représentée 2 fois avec un facteur maximum de 3,3) qui interviennent dans la β -oxydation des acides gras insaturés. Chez les

mammifères, EHD3 a récemment été décrite comme intervenant dans le processus de recyclage par endocytose (Bahl *et al.*, 2016).

- Les clusters rose (●), rouge (●), orange (●) sont en interactions avec la protéine CAR2 (L-ornithine transaminase, représentée 2 fois avec un facteur de 2,8, en vert clair ●), qui catalyse la deuxième étape de la dégradation de l'arginine. Une étude récente suggère que certains gènes impliqués dans le métabolisme de l'azote (*car2*, *put1*, ...) seraient présents en plus grand nombre de copies chez les souches de *S. cerevisiae* impliquées dans des fermentations alcooliques, ce qui représenterait une évolution adaptative caractéristique (Ibáñez *et al.*, 2014). CAR2 est aussi en lien avec le cluster jaune (●), notamment avec la SSA3 ATPase impliquée dans le repliement des protéines et la réponse au stress.

Les 2 protéines sans interaction avec les autres sont :

- la protéine **SNZ1**, impliquée dans la biosynthèse de la pyridoxine (vitamine B6). Membre d'une famille de protéines induite lors de la phase stationnaire de croissance, elle peut intervenir dans l'arrêt de la croissance et la réponse cellulaire associée à l'appauvrissement nutritif du milieu. Chez *S. cerevisiae*, Stambuck *et al.* (2009) ont montré l'existence d'un nombre élevé de copies des gènes SNZ et SNO (codant la vitamine B1 ou thiamine) chez des souches utilisées pour la production de bioéthanol. Cette caractéristique adaptative leur conférerait une capacité à croître plus efficacement dans des milieux riches en sucre.

- la protéine **FRA1** (très surexprimée, facteur de 8,2) qui est décrite dans la régulation négative de la transcription du régulon de fer (Kumánovics *et al.*, 2008).

Sept protéines ne présentant pas d'homologie avec *S. cerevisiae* et fortement surexprimées dans cette étude pourraient être des marqueurs potentiels d'adaptation de la souche technologique à l'environnement fromager. Parmi elles, deux protéines interviennent dans le métabolisme énergétique : **TREPH** (Trehalose phosphorylase, facteur de surexpression de 6,9) et **GPMI** (2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate (facteur de 7,8 ; Elbein *et al.*, 2003). Une troisième protéine a été décrite dans le métabolisme des acides aminés, **PRTC** (Streptogrisin-C (facteur de 2,1). Elle présente une spécificité primaire pour les grands acides aminés aliphatiques ou aromatiques (similaire à la chymotrypsine) et hydrolyse des protéines comme la chitine (Sidhu *et al.*, 1994). La protéine **GSTPA** (Glutathione S-transferase P 10, facteur de 3,5) a une activité de détoxification des

composés endogènes tels que les lipides pré-oxydés (Calmes *et al.*, 2015 ; Shen *et al.*, 2015). La protéine **SEVE** (Severin, facteur de 7,4) bloque les extrémités et provoque la fragmentation et à la dépolymérisation des filaments d'actine de manière calcium-dépendante (Summerscales et Dawson, 2004). La dernière protéine **NECP1** (Adaptin ear-binding coat-associated protein 1 ; facteur de 2,1) est en lien avec les mécanismes d'endocytose (Ritter *et al.*, 2003). Ce pourrait être une ATPase (membre de la superfamille ATP-binding) impliquée dans les mouvements transmembranaires de substances / transporteurs.

En conclusion, nous constatons que de nombreuses protéines sont surexprimées sur milieu CA, avec parfois des facteurs très élevés, chez *M. lanceolatus* UBOCC-A-109153 par rapport à *M. circinelloides* CBS 277-49. Ces protéines comme DUG1 ou CAR2 semblent essentielles pour la synthèse de métabolites secondaires (mévalonate, pyridoxine, ...) et des acides aminés. Le champignon exprime de nombreuses protéines du protéasome et du spliceosome et met en place des mécanismes spécifiques d'endocytose et de transports vésiculaires régulant, entre autres, la sporulation et la synthèse ribosomiale. Le métabolisme énergétique avec la glycolyse / gluconéogenèse, la voie du cycle de Krebs et la voie des pentoses phosphates, est directement intégré dans les différents clusters couvrant la biosynthèse des acides aminés et des métabolites secondaires. Nous retrouvons également de nombreuses protéines intervenant dans la dégradation des acides gras et même dans la détoxification des composés endogènes tels que les lipides pré-oxydés. Cette activité métabolique intense est en lien avec la morphologie de la souche sur milieu fromager, avec un mycélium plus dense que sur milieu synthétique et une forte activité de sporulation, favorable à une diffusion naturelle ou assistée par l'homme des spores en atelier de production.

→ *M. circinelloides* CBS 277-49 sur milieu PDA :

L'analyse StringDB des interactions des 76 protéines surexprimées sur milieu PDA présentant une homologie avec *S. cerevisiae* (sur 81 protéines identifiées) avec des facteurs allant de 1,7 à 7,3 (dont 68 protéines avec un facteur supérieur 2). Elle permet de définir 15 clusters,

parmi lesquels deux sont particulièrement visibles (cluster gris (●) avec 28 protéines et rose clair (●) avec 16 protéines ; **Figure 23**).

Un total de 49 protéines sont impliquées dans différentes voies métaboliques (ADE12, ADE13, ADH7, ADO1, AGX1, ALD4, ARG1, ATP2, CIT1, CYS3, DAL2, DUG1, DUR1,2, EHD3, ENO1, FBA1, FUM1, GAL10, GCY1, GDH3, GFA1, GLN1, GND2, GPH1, HOM6, ICL1, LAP2, LPD1, MDH1, MET6, MEU1, NQM1, PDA1, PDB1, PDC6, PGI1, PGK1, PGM2, PUT2, PYC2, SAH1, SHM2, TDH2, TDH3, TKL1, TPI1, UGP1, VMA2, YMR099C), dont 31 interviennent dans la biosynthèse de métabolites secondaires (ADE13, ADH7, AGX1, ALD4, ARG1, CIT1, ENO1, FBA1, FUM1, GAL10, GFA1, GND2, GPH1, HOM6, LPD1, MDH1, MET6, NQM1, PDA1, PDB1, PDC6, PGI1, PGK1, PGM2, SHM2, TDH2, TDH3, TKL1, TPI1, UGP1, YMR099C) et 16 dans la biosynthèse des acides aminés (ARG1, CIT1, CYS3, ENO1, FBA1, GLN1, HOM6, MET6, NQM1, PGK1, PYC2, SHM2, TDH2, TDH3, TKL1, TPI1).

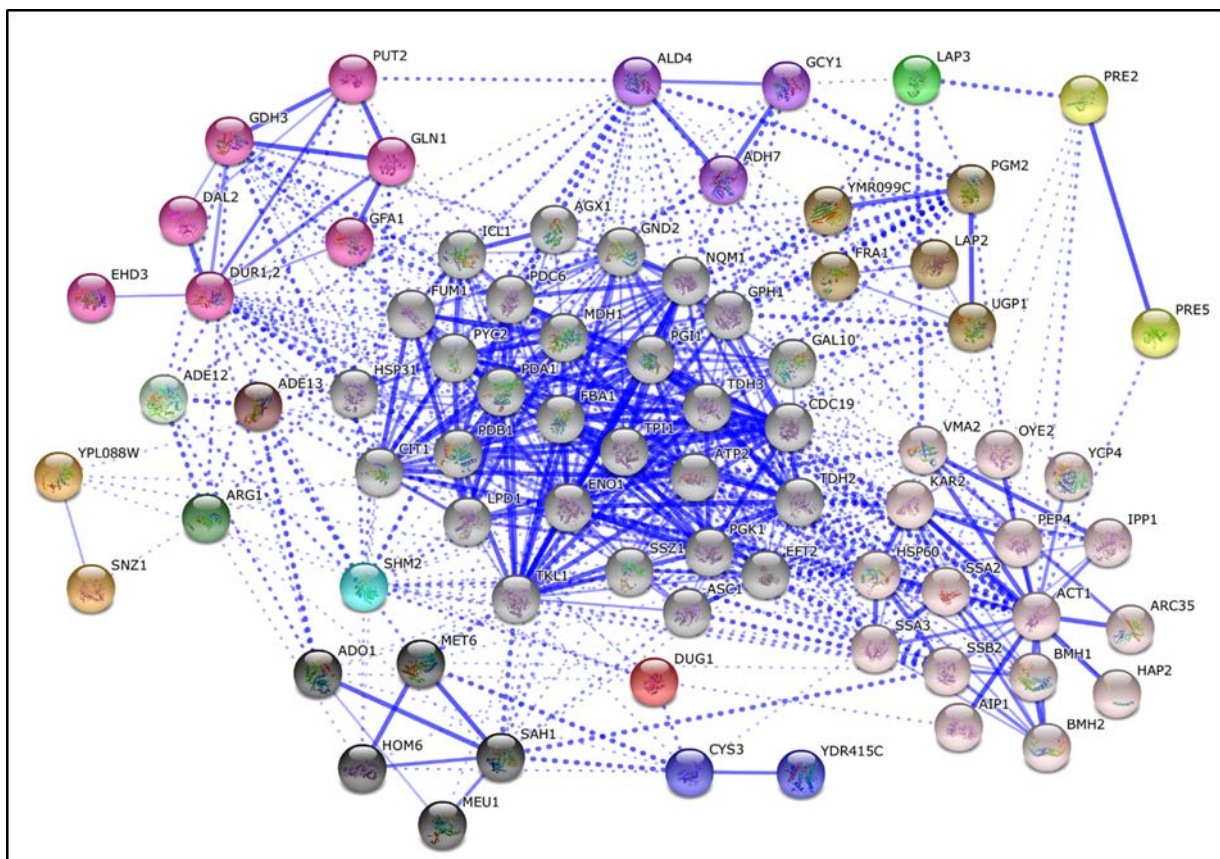


Figure 23 : Analyse String-DB des protéines surexprimées par *M. circinelloides* CBS 277-49 sur milieu PDA. L'analyse a été menée sur la base des homologies déterminées avec le protéome de *S. cerevisiae*. L'épaisseur des lignes indique la force du support de données (confiance). Paramètres sélectionnés : i) textmining, neighborhood, experiments, gene fusion, databases, co-occurrence and co-expression active interaction sources; ii) medium confidence as the minimum required interaction source et iii) no predicted interactors shown.

- Un total de 5 protéines intervient dans le métabolisme de la cystéine et de la méthionine : HOM6 (Homoserine dehydrogenase, facteur de surexpression de 2), décrite récemment chez *C. albicans* comme intervenant également dans l'adhésion aux matériaux médicaux (Tsai *et al.*, 2016) ; MDH1 (Mitochondrial malate dehydrogenase, représentée 5 fois avec un facteur maximum de 3,3), qui catalyse, dans le cycle de Krebs, la transformation du malate en d'oxaloacétate ; MET6 (Cobalamin-independent methionine synthase, facteur de 3,2), impliquée dans la biosynthèse et la régénération de la méthionine ; MEU1 (Methylthioadenosine phosphorylase (retrouvée 2 fois avec un facteur maximum de 2,4), qui catalyse la première étape dans la voie de la récupération de la méthionine ; et SAH1 (S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase ; facteur de 7,5). Ces 5 protéines, qui appartiennent au cluster noir (●), ont une forte interaction avec la protéine CYS3 (Cystathionine gamma-lyase, facteur de 3,2) du cluster bleu foncé (●) qui est elle-même en lien avec YDR415C (Putative aminopeptidase, facteur de 3,1).

- Le cluster orange (●) est composé de SNZ1, protéine impliquée dans la biosynthèse de la vitamine B6 (facteur de 2,6). Celle-ci est en interaction forte avec YPL088 (W Putative aryl alcohol dehydrogenase (facteur de 2), protéine dont la fonction est inconnue (Kusch *et al.*, 2004). Ce cluster est en lien avec ARG1 (Arginosuccinate synthetase (facteur de 3,2, nœud vert foncé ●), enzyme impliquée dans la huitième étape de la biosynthèse de l'arginine. ARG1 est en interaction avec 3 autres nœuds majeurs : ADO1 (Adenosine kinase, représentée 2 fois avec un facteur maximum de 3,3, cluster noir ●), qui catalyse la phosphorylation de l'adénosine en AMP (Lecoq *et al.*, 2001) ; ADE12 (Adenylosuccinate synthase, facteur de 1,7 ; couleur argent ●) et ADE13 (Adenylosuccinate lyase, facteur de 2,4, couleur marron foncé ●), qui jouent un rôle important dans la biosynthèse des purines. Les nœuds majeurs ADE12, ADE13 sont en relation avec ADO1 (cluster noir ●) et DAL2 (Allantoicase, facteur de 1,7 ; cluster rose foncé ●), enzyme qui intervient dans la dégradation de l'allantoïne, permettant l'utilisation des purines comme sources secondaires d'azote lorsque les sources primaires sont limitantes. Ils sont également liés à PGM2 (Dihydrolipoamide dehydrogenase ; facteur de 2,1 ; appartenant au cluster marron ●) qui contribue à la dégradation de la glycine. Toutes ces protéines interviennent dans le métabolisme des purines.

- Autre nœud majeur, ARG1 est en interaction avec le cluster rose foncé (●) qui intervient dans différentes voies métaboliques dont celle de l'arginine et de la proline avec la protéine mitochondriale PUT2 (Delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase, facteur de 4,3). Sont aussi présentes les protéines GDH3 (NADP(+)-dependent glutamate dehydrogenase, facteur de 4,4), qui synthétise le glutamate à partir d'ammoniac et d'alpha-cétoglutarate ; DUR 1,2 (Urea amidolyase), qui a un rôle de carboxylase vis à vis l'urée et d'hydrolase de l'allophanate (facteur de 2), et GLN1 (Glutamine synthetase ; facteur de 1,7) qui synthétise la glutamine à partir du glutamate et de l'ammoniac.

Les protéines de ce cluster rose foncé interviennent aussi dans le métabolisme de l'alanine, de l'aspartate et du glutamate avec GFA1 (Glutamine-fructose-6-phosphate amidotransferase ; facteur de 2,6) et EHD3 (3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase ; facteur de 2,4), qui a une fonction dans la biosynthèse des protéines et un rôle indirect dans le transport membranaire d'endocytose (Bahl *et al.*, 2016). Ces protéines sont en interactions fortes avec les protéines ADE12, AD13, GDH3, GLN1 et PUT2 et AGX1 (Alanine glyoxylate aminotransferase, représentée 2 fois avec un facteur de 2, cluster gris ●)

- Le nœud majeur SHM2 (Cytosolic serine hydroxymethyltransferase, facteur de 1,8 ; bleu turquoise ●), isoforme majeure impliquée dans la génération des précurseurs de la purine, de la pyrimidine, des acides aminés et intervenant dans la biosynthèse des lipides ; a des interactions fortes avec les protéines du cluster gris (●) AGX1 et LPD1 (Dihydrolipoamide dehydrogenase, facteur de 2,1), cette dernière faisant partie du complexe pyruvate-déshydrogénase qui catalyse la conversion globale du pyruvate en acétyl-CoA. Cette protéine agit aussi comme composant du système de clivage de la glycine. SHM2 interagit avec HOM6 (cluster noir ●) et CYS3 (cluster bleu foncé ●). Tout ce regroupement participe au métabolisme de la glycine, de la sérine et de la thréonine. Ces protéines sont en interaction forte avec un nœud majeur DUG1 (Cys-Gly metallo-di-peptidase (facteur de 2,8 ; couleur rouge ●)

- Le cluster violet (●) intervient dans le métabolisme des glycéro-lipides. Il est composé de 3 protéines : ADH7 (NADPH-dependent medium chain alcohol dehydrogenase, retrouvée 3 fois avec un facteur maximum de 4,2), ALD4 (Mitochondrial aldehyde dehydrogenase, facteur de 2,9) et GCY1 (Putative NADP(+) coupled glycerol dehydrogenase, facteur de 1,8). Les glycérolipides sont des esters d'acides gras et de glycérol plus ou moins estérifiés possédant trois fonctions alcool. Ils servent de réserves énergétiques chez les animaux et les végétaux

et sont également impliqués dans le transport cellulaire, la signalisation cellulaire et l'ancrage de protéines membranaires (Henry *et al.*, 2012).

- Un des clusters majeurs (16 protéines, en rose clair ●) comprend essentiellement des protéines intervenant dans :

- La circulation et la transformation (import, repliement, export) des protéines dans le réticulum endoplasmique (RE). C'est le cas de KAR2 (facteur de 2,5), SSA2 (facteur de 2,1), SSA3 (ATPase, facteur de 2,8) et SSB2 (Cytoplasmic ATPase, facteur de 2,5). Ces 3 dernières jouent également un rôle dans les processus d'endocytose. Ces protéines ont une forte interaction avec HSP60 (ATPase, facteur de 7,2), protéine chaperonne qui participe à l'assemblage et / ou à la dégradation des protéines importées dans la mitochondrie. Cette protéine est liée à EFT2 (Elongation factor 2, représentée 2 fois avec un facteur de 5,6) qui catalyse la translocation ribosomique au cours de la synthèse protéique.
- La structure des cellules, comme ACT1 (Actin, retrouvée 2 fois avec un facteur de 2,8), AIP1 (Actin cortical patch component, retrouvée 2 fois avec un facteur de 3,3) et ARC35 (Subunit of the ARP2/3 complex, facteur de 2,1), qui est nécessaire pour l'intégrité de l'actine.
- La dégradation des protéines lors de différents stress, comme PEP4 (Vacuolar aspartyl protease proteinase A, retrouvée 3 fois avec un facteur de 2,8), protéine requise pour la maturation post-traductionnelle du précurseur des protéinases vacuolaires. Cette enzyme est importante pour permettre le renouvellement des protéines après des dommages oxydatifs. On retrouve également BMH1 (14-3-3 protein, facteur de 3,5), protéine impliquée dans la régulation post-transcriptionnelle de nombreux processus comme l'exocytose, le transport vésiculaire, ou la croissance, et BMH2 (14-3-3 protein), isoforme mineure ; et HAP2 (facteur de 2,3), activateur de transcription et régulateur global de l'expression génique des voies respiratoires chez la levure.

- En jaune (●), un cluster composé de 2 protéines responsables de l'activité chymotrypsique du protéasome : PRE2 (Beta 5 subunit of the 20S proteasome, facteur de 2) et PRE5 (Alpha 6 subunit, facteur de 2,2). Le protéasome dégrade les protéines marquées avec des molécules d'ubiquitine dans le cytoplasme et dans le noyau. Elles sont en interaction très fortes avec

les protéines du réticulum endoplasmique SSB2, SSA2, KAR2 et les protéines de structure ACT1 et PEP4, toutes appartenant au cluster rose clair (●).

- Le cluster marron (●) est composé de 5 protéines (PGM2, LAP2, UGP1, FRA1, YMR099C) qui sont en interactions fortes avec différents clusters (violet●, gris●, vert●, jaune● et rose●). PGM2 (Phosphoglucomutase, facteur de 1,8) catalyse la transformation du glucose-1-phosphate en glucose-6-phosphate, étape clé dans le métabolisme des hexoses. LAP2 (Leucyl aminopeptidase yscIV, facteur de 2,4) clive préférentiellement les tripeptides. Elle possède également une activité époxyde hydrolase. UGP1 (UDP-glucose pyrophosphorylase, facteur de 2,9) est une enzyme jouant un rôle central dans la production de Glucose-UDP et décrite comme impliquée dans la réponse au stress oxydatif et la survie chez *S. cerevisiae* (Yi et Huh, 2015). Enfin, FRA1 (facteur de 5,5) intervient dans la régulation négative de la transcription du régulon de fer alors que YMR099C (Glucose-6-phosphate 1-épimérase (hexose-6-phosphate mutarotase); facteur de 2,6) est probablement impliquée dans le métabolisme des glucides (Graille *et al.*, 2006).

- Un nœud majeur est représenté par LAP3 (aminopeptidase cystéine avec une activité homocystéine-thiolactonase, facteur de 2,1; couleur vert clair ●). Son rôle physiologique est inconnu, mais elle serait essentielle pour la viabilité des cellules de levure en les protégeant contre la toxicité de l'homocystéine. Cette protéine aurait également une activité aminopeptidase et une activité d'hydrolase de la bléomycine (antibiotique). Elle est en lien avec 4 clusters, le protéasome ● (PRE2), le métabolisme des glycérolipides ● (GCY1), les protéines du cluster marron ● (PGM2, LAP2, UGP1, FRA1, YMR099C), mais aussi avec VMA2 (ATPase vacuolaire, facteur de 2,1, cluster rose clair ●), une pompe à protons omniprésente dans le système endomembranaire.

- Le cluster gris (●) comporte 28 protéines qui interviennent dans différentes voies métaboliques, en interactions avec les autres clusters :

- 16 protéines sont impliquées dans la glycolyse / gluconéogenèse : ENO1 (énolase I), FBA1 (Fructose aldolase 1,6-bisphosphate, facteur de 2), GAL10, LPD1, PDA1 (E1 sous-unité alpha du complexe pyruvate déshydrogénase, facteur de 5,8), PDB1 (sous-unité β E1 du complexe pyruvate déshydrogénase, facteur de 4,6), PDC6, PG11, PGK1, TDH2, TDH3, TPI1, en lien avec ADH7 et ALD4 du cluster violet (●), et PGM2 et YMR099C du cluster marron (●).

- 7 protéines interviennent dans le métabolisme du cycle de Krebs : CIT1 (Citrate synthase ; facteur de 3,8), FUM1 (Fumarase, facteur de 2,2), MDH1 (Malate déshydrogénase mitochondrial (représentée 5 fois, facteur maximum de 3,3), PDA1, PDB1, PYC2 (Isoforme pyruvate carboxylase ; facteur de 2,1) et LPD1.
- 6 protéines ont un rôle dans la voie des pentoses phosphates : FBA1, GND2 (6-phosphogluconate dehydrogenase, représentée 2 fois avec un facteur de 2,7), NQM1 (transaldolase, facteur de 5,3), PGI1 (enzyme glycolytique de la phosphoglucose isomérase, facteur de 3,5), TKL1 (Transketolase, représentée 4 fois avec un facteur de 2,8 ; nœud majeur), nécessaire à la synthèse des acides aminés aromatiques, avec PGM2 du cluster marron (●).

D'autre part, 5 protéines ne présentent pas d'homologie avec *S. cerevisiae* :

- **GPMI** (2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate ; facteur de 3,3), qui catalyse la 8^{ème} étape de la glycolyse (production de 2-phospho-D-glycérate ; 2PG ; Jedrzejak *et al.*, 2000).
- **GST1** (Glutathione S-transferase 1, retrouvée 2 fois avec un facteur maximum de 3,3) : Cette famille de protéine est essentielle pour certains processus biologiques et intervient dans les mécanismes de détoxification et de toxicité (Nebert et Vasiliou, 2004).
- **MEP1** (Extracellular metalloproteinase (Elastinolytic metalloproteinase), facteur de 4,2), métalloprotéinase sécrétée qui permet l'assimilation de substrats protéiniques (Sriranganadane, 2011).
- **PHOA** (Acid phosphatase, représentée 4 fois avec un facteur maximum de 3,9). Il s'agit d'une hydrolase qui déphosphoryle de nombreux types de molécules (nucléotides, protéines, alcaloïdes, ... ; Ehrlich *et al.*, 1994).
- **PHLN** (Non-hemolytic phospholipase C, retrouvée 3 fois, facteur maximum de 4), dont la fonction est inconnue.

En conclusion, nous constatons qu'un nombre très important de protéines est surexprimé, parfois à des niveaux élevés, par *M. circinelloides* CBS 277-49 par rapport à *M. lanceolatus* UBOCC-A-109153 sur milieu PDA. Ces protéines interviennent dans différentes voies métaboliques primaires importantes pour la croissance du champignon, comme la

biosynthèse des acides aminés, la glycolyse / gluconéogenèse, le cycle de Krebs et la voie des pentoses phosphates. Des protéines impliquées dans la biosynthèse de métabolites secondaires (alcaloïdes, caroténoïdes, ...), le métabolisme des glycérolipides, le transport cellulaire, les modifications post-traductionnelles et à la dégradation (protéasome) sont également fortement représentées. Le profil métabolique de *Mucor circinelloides* CBS 277-49 sur milieu non-fromager, qui est reflété par sa croissance rapide, est en fait relativement similaire, même si l'identité précise des protéines est différente, de celui observé pour *M. lanceolatus* UBOCC-A-109153 sur milieu CA.

→ *M. circinelloides* CBS 277-49 sur milieu CA :

Parmi les 35 protéines identifiées sur milieu CA, 28 présentent des homologies avec le protéome de *S. cerevisiae*, avec des facteurs allant de 1,6 à 12,7 (dont 32 protéines avec un facteur supérieur à 2). La représentation String DB (**Figure 24**) met en évidence 7 clusters dont un majoritaire constitué de 14 protéines. Trois protéines n'ont pas d'interactions entre elles.

- Le cluster orange (●) est composé de 2 protéines très fortement surexprimées, ALD4 (Mitochondrial aldehyde dehydrogenase, retrouvée 5 fois avec un facteur de surexpression maximum de 9) et ADH7 (NADPH-dependent medium chain alcohol dehydrogenase, retrouvée 2 fois avec un facteur maximum de 4,4). ALD4 permet la conversion de l'acétaldéhyde en acétate et, comme ADH7, intervient dans le métabolisme de l'éthanol. Ces 2 protéines, également sur-exprimées sur milieu PDA, interviennent dans différentes voies métaboliques dont celle du métabolisme des glycérolipides. ADH7 est également impliquée dans la biosynthèse de l'acide rétinoïque (vitamine A ; Zgombić-Knight *et al.*, 1995). Ce cluster a une interaction forte avec la protéine anti-oxydante CTA1 (Catalase A, en marron ●, facteur de 2,4 ; Nishimoto *et al.*, 2015).

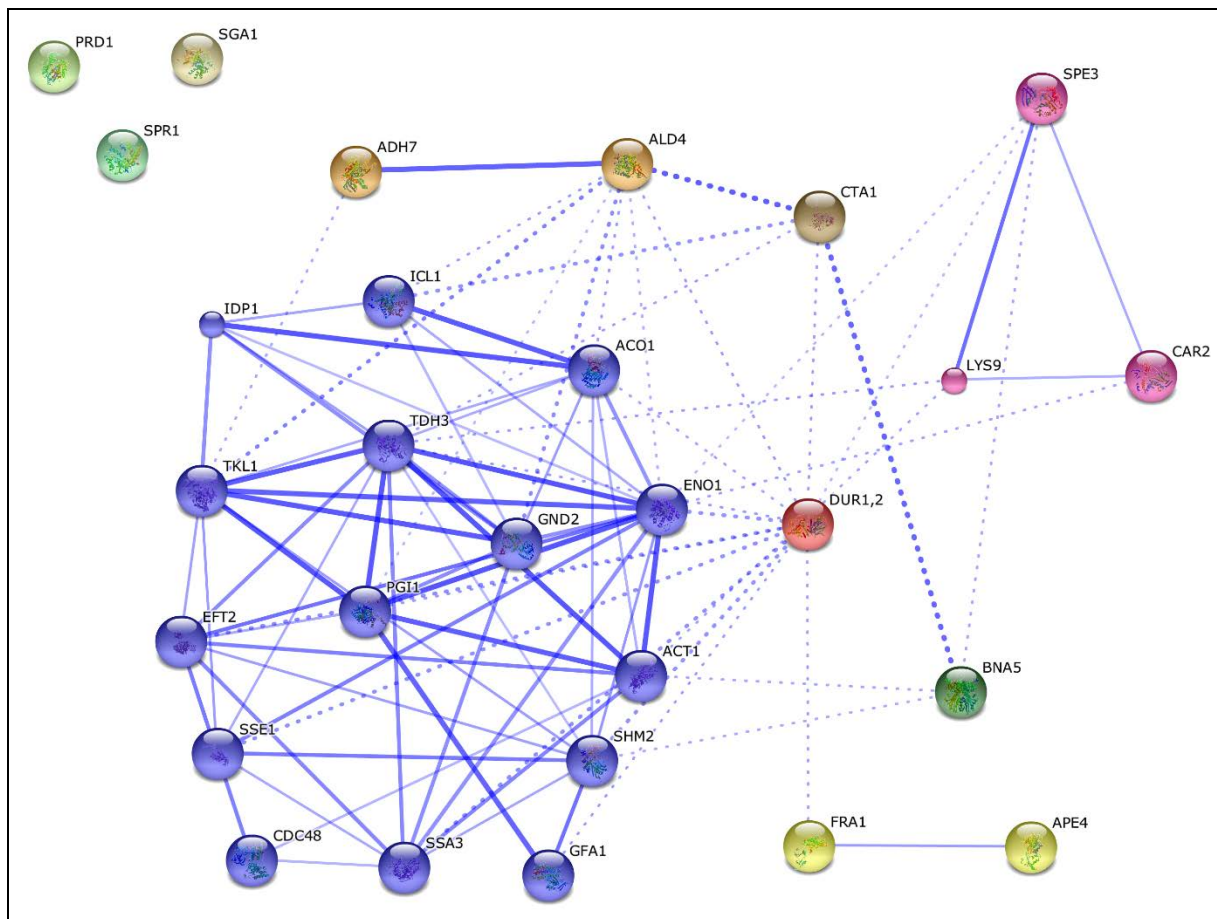


Figure 24 : Analyse String-DB des protéines surexprimées par *M. circinelloides* CBS 277-49 sur milieu CA. L'analyse a été menée sur la base des homologies déterminées avec le protéome de *S. cerevisiae*. L'épaisseur des lignes indique la force du support de données (confiance). Paramètres sélectionnés : i) textmining, neighborhood, experiments, gene fusion, databases, co-occurrence and co-expression active interaction sources; ii) medium confidence as the minimum required interaction source et iii) no predicted interactors shown.

CTA1 a une forte interaction avec BNA5 (kynureninase, facteur de 4,2 ; en vert foncé ●), protéine requise pour la biosynthèse de novo de NAD à partir du tryptophane par l'intermédiaire de la kynurénine. BNA5 est également en interaction avec les clusters bleu (●) et rose (●).

- **DUR1, 2** (Urea amidolyase, facteur de 6,6 ; en rouge ●) est un nœud majeur en interaction avec les différents clusters, particulièrement le cluster bleu (●). Elle dégrade l'urée en CO₂ et NH₃.

Elle est en interaction avec le cluster jaune (●) dont la protéine FRA1 (retrouvée 4 fois avec un facteur maximum de 5,3) régule négativement la transcription du régulon de fer (Kumánovics *et al.*, 2008). Ce cluster contient aussi la protéine APE4 (Cytoplasmic aspartyl aminopeptidase, retrouvée 2 fois avec un facteur maximum de 3,4), de la famille des

métalloprotéases M18. Cette aspartyl aminopeptidase est une protéine « cargo » intervenant dans le transport vacuolaire d'hydrolases dégradant des composés cytoplasmiques et des organelles cellulaires (mécanisme appelé macro-autophagie ; Yuga *et al.*, 2011) .

- Le cluster rose (●) comporte 3 protéines. La première est SPE3 (Spermidine synthase, facteur de 2,4), protéine impliquée dans la biosynthèse de la spermidine et de l'acide pantothénique (vitamine B5). Nécessaire pour la croissance cellulaire, cette protéine a été décrite comme augmentant la tolérance de *S. cerevisiae* aux inhibiteurs de la fermentation (furanes, acides carboxyliques, composés phénoliques, ... ; Almeida *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2015). Elle interagit avec CAR2 (L-ornithine transaminase, facteur de 2,4), qui catalyse la deuxième étape de la dégradation de l'arginine (Ibáñez *et al.*, 2014), elle-même en relation avec LYS9 (Saccharopine dehydrogenase, facteur de 3,1) qui est impliquée dans la formation de saccharopine à partir d'alpha-amino adipate-semialdéhyde 6 (septième étape dans la voie de biosynthèse de la lysine ; Xu *et al.*, 2006). Ces différentes protéines ALD4, CAR2, DUR1-2, SPE3 interviennent dans le métabolisme de l'arginine et de la proline.

- Le cluster bleu (●) comprend 14 protéines présentant de très fortes interactions. Trois sont en lien avec la voie des pentoses phosphates : GND2 (6-phosphogluconate dehydrogenase, facteur de 12,3) qui catalyse la régénération du NADPH ; PGI1 (Glycolytic enzyme phosphoglucose isomerase, retrouvée 2 fois avec un facteur maximum de 3,8) qui participe à l'interconversion du glucose-6-phosphate et du fructose-6-phosphate nécessaire à la progression du cycle cellulaire et à l'achèvement des événements de néoglucogénèse pour la sporulation ; et TKL1 (Transketolase, retrouvée 4 fois avec un facteur maximum de 8,6) qui intervient dans la synthèse des acides aminés aromatiques (Schaaff-Gerstenschläger *et al.*, 1993). Deux protéines du cycle de Krebs sont également présentes : ACO1 (Aconitase, facteur de 5,3), nécessaire pour la maintenance du génome mitochondrial, et IDP1 (Mitochondrial NADP-specific isocitrate dehydrogenase) qui catalyse l'oxydation de l'isocitrate en l'alpha-cétoglutarate et contribue à la production de NADPH. IDP1 est en interaction avec CTA1 (facteur de 2,4). Ces 2 protéines interviennent dans la formation du peroxysome, organite cellulaire entouré par une membrane simple et ne contenant pas de matériel génétique. Contrairement à la mitochondrie ou au chloroplaste, toutes les protéines qui le constituent sont codées par des gènes nucléaires et proviennent du cytosol. Les peroxysomes sont impliqués dans la catalyse des acides gras et des acides aminés, la

réduction de dérivés réactifs de l'oxygène et la synthèse des plasmalogènes. Ils font partie d'une classe d'organites appelés « microbodies » (Gabaldón *et al.*, 2014).

GND2 et IDP1 sont en interaction forte avec SPE3. Ces trois protéines interviennent dans le métabolisme du glutathion (GSH), important système antioxydant. Le GSH est capable d'empêcher la détérioration des composants cellulaires par les espèces réactives de l'oxygène tels que les radicaux libres ou les peroxydes.

CDC48 (ATPase, facteur de 5,1) est une protéine importante pour le maintien de l'intégrité de la paroi cellulaire lors d'un stress. Elle peut être impliquée dans la dégradation des protéines marquées par l'ubiquitine au niveau du protéasome (Xia *et al.*, 2016). SSA3 (facteur de 2,9) et SSE1 (facteur de 2,4), décrites pour *M. lanceolatus*, sont des ATPases cytoplasmiques membres de la famille Hsp70.

Cinq protéines retrouvées dans ce cluster sont impliquées dans la glycolyse / gluconéogenèse : ENO1 (Enolase I, nœud majeur, représentée 2 fois avec un facteur maximal de 12,3), en interaction forte avec TDH3 (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, facteur de 3,2), PGI1, ADH7 et ALD4.

Dans ce cluster bleu (●), EFT (Elongation factor 2, représentée 2 fois avec un facteur maximum de 3,2) catalyse la translocation ribosomique pendant la synthèse protéique. Elle est en interaction avec ACT1 (Actin, facteur de 12,7), protéine structurale impliquée dans la polarisation de la cellule, l'endocytose et d'autres fonctions du cytosquelette ; et la protéine SHM2 (Cytosolic serine hydroxymethyltransferase, facteur de 2,8) qui convertit la serine en glycine. Cette protéine est liée à GFA1 (Glutamine-fructose-6-phosphate amidotransferase, représentée 2 fois avec un facteur maximum de 2,7) qui agit notamment au niveau de la première étape de la biosynthèse de la chitine. Toutes ces protéines ont une interaction forte avec le nœud majeur DUR 1,2.

Les protéines ne présentant pas d'interaction avec les autres sont :

- PRD1 (Zinc metalloendopeptidase, facteur de surexpression de 8,2). C'est une protéine présente dans le cytoplasme et dans l'espace inter-membranaire des mitochondries, impliquée dans la dégradation avancée des protéines (Büchler *et al.*, 1994).
- SPR1 (Sporulation-specific exo-1,3-beta-glucanase, facteur de 3,2) : une protéine impliquée dans les processus de formation des spores et qui contribue à la thermorésistance des ascospores en participant à la morphogénèse de leurs parois (Muthukumar *et al.*, 1993).

- SGA1 (Intracellular sporulation-specific glucoamylase, facteur de 2,9). Il s'agit d'une protéine intervenant dans la dégradation du glycogène, indispensable pour la sporulation.

Sept protéines n'ont pas d'homologie avec *S. cerevisiae* et interviennent dans différentes voies métaboliques :

- Au niveau du métabolisme énergétique, une β -glucosidase L (**BGLL**, représentée 7 fois, facteur de 3,7), intervient dans la dégradation de la cellulose. Il s'agit d'une protéine d'intérêt qui pourrait permettre de diminuer le coût d'exploitation du procédé industriel d'hydrolyse (Zhao *et al.*, 2013).

- Au niveau de la synthèse / dégradation des acides aminés : une dipeptidyl aminopeptidase BIII (**DAPB3**, représentée 2 fois avec un facteur de 5,9), impliquée dans le catabolisme des protéines intra-cellulaires (Ogasawara *et al.*, 1996). Ce type de protéines universelles contribue à plusieurs fonctions physiologiques importantes comme l'absorption des nutriments (Mierau *et al.*, 1995) ou l'immunité chez les mammifères. On retrouve également une dipeptidyl-peptidase 5 (**DPP5**, représentée 2 fois avec un facteur de 6,8), qui libèrerait des dipeptides décrits comme indispensables à la croissance chez la bactérie *Porphyromonas endodontalis* (Nishimita *et al.*, 2014).

- Au niveau de la dégradation des lipides, une short/branched chain specific acyl-CoA dehydrogenase (**ACDSB**, facteur de 4,2), dont le rôle exact n'a pas encore été très clairement élucidé, a été mise en évidence.

- Au niveau de la transcription / régulation / signalisation des ADN/ ARN : trois protéines sont rencontrées. La première est une uracil catabolism protein 4 (URC4, facteur de 1,6), qui interviendrait dans la dégradation de la pyrimidine, précurseur des acides nucléiques (Andersen *et al.*, 2008). La seconde est une nudix hydrolase 3 (**NUDT3**,) qui serait impliquée dans le process de dégradation des ARNm (Grudzien-Nogalska *et al.*, 2016). La troisième est la protéine **SDS23** (facteur de 6,1) qui a été décrite pour son rôle dans la réplication de l'ADN et la séparation cellulaire (Jones *et al.*, 2000 ; Goldar *et al.*, 2005). Cette protéine est nécessaire pour la tolérance au glucose limitée.

En conclusion, nous constatons que moins de protéines sont surexprimées par *M. circinelloides* CBS 277-49 par rapport à *M. lanceolatus* UBOCC-A-109153 sur milieu CA. Le

métabolisme énergétique avec la glycolyse / gluconéogenèse, la voie du cycle de Krebs et la voie des pentoses phosphates, est directement en lien avec les différents réseaux couvrant la biosynthèse des acides aminés et des métabolites secondaires (acide pantothénique (vitamine B5),...). Le champignon développe également des mécanismes spécifiques d'endocytose et de transports vésiculaires régulant, entre autres, la formation des spores et la synthèse ribosomiale. De nombreuses protéines intervenant dans la dégradation des acides gras et même dans la détoxification de composés endogènes tels que les lipides pré-oxydés sont surexprimées. Le protéasome est limité à la présence de la protéine CDC48 qui pourrait être impliquée dans la dégradation des protéines marquées par l'ubiquitine. Ce métabolisme moins dynamique que sur milieu non-fromager et là encore en relation avec la morphologie du champignon (mycélium peu dense, faible sporulation, croissance ralentie, pigmentation orange avec une surface en « peau de crapaud »).

II.2.c. Etude des métabolites produits

L'étude de protéomique comparative a été enrichie par une approche de métabolomique visant à détecter de manière non-ciblée les métabolites présents chez les deux souches étudiées et sur chacun des milieux utilisés par LC-MS/MS, selon un protocole adapté de Kokkonen *et al.* (2005)

II.2.c.1. Extraction des échantillons

M. lanceolatus UBOCC-A-109153 et *M. circinelloides* CBS 277-49 ont été mis en culture en triplicat durant 7 jours à 14°C sur milieu CA et PDA. L'inoculum initial était constitué de 10⁷ spores dans un volume de 10 µL (cf Article n°3). Au terme de cette période d'incubation, la totalité du mycélium (ainsi que la gélose) présent sur la surface de la boîte de pétri a été repris dans un volume de 25 mL d'acétonitrile. Ce mélange a été homogénéisé avec un ultraturax T25 Basic (IKA, Heidelberg, Allemagne) durant 10 min puis 4 g de l'homogénat obtenu ont été transférés dans un tube Falcon de 50 mL contenant 25 mL d'acétonitrile. Le mélange a été vortexé 30 sec, homogénéisé par plusieurs passages à l'ultraturax, vortexé à nouveau 30 sec avant d'être soumis à une étape de sonication de 15 min. Après un dernier vortexage de 30 sec, une centrifugation (ALC-Thermo, Italie) a été réalisée à 5000 rpm durant 10 min à 4°C puis 10 mL de surnageant ont été filtrés à 0,45 µm (Millex HV syringe filter 13-mm unit, Millipore, Irlande). L'extrait a ensuite été transféré dans un tube Falcon de 15 mL entouré d'une feuille d'aluminium pour analyse directe ou congélation à -20 °C jusqu'à traitement.

II.2.c.2. Analyse LC-MS/MS

Au moment de l'analyse, les extraits ont été filtrés à 0,2 µm (filtre PTFE, GE Healthcare Life Sciences, Royaume-Uni) puis transférés dans des flacons ambrés. La séparation et la détection des métabolites extraits ont été effectuées en utilisant une chaîne HPLC Infinity Binary combinée à un spectromètre de masse LC-QToF LC/MS (Agilent 6530 - Technology Binary pump). Le système HPLC comprenait une pompe binaire 1200, un dégazeur, un système d'échantillonnage automatique et un four thermostaté pour colonnes. Trois échantillons par condition ont été injectés, à raison de 10 µL / échantillon, dans le système

et la séparation a été effectuée en utilisant une colonne ZORBAX Extend-C18 (2,1 x 50 mm, 1,8 µm, la pression maximale de 600 bars, Agilent). La colonne a été maintenue à 35 °C, avec un débit de 0,3 mL.min⁻¹ en utilisant comme phase mobile un solvant A (eau milli-Q + 0,1% d'acide formique + 10 mM de formate d'ammonium) et un solvant B (acétonitrile + 0.1 % acide formique), avec une variation de 15% à 100% de solvant B sur 25 minutes (**Tableau n°8**), suivie de 5 min supplémentaires pour ré-équilibrer la colonne aux conditions initiales.

Tableau n°8 : Programme de chromatographie en phase liquide.

Étapes	Temps	Solvant A	Solvant B	Débit	Pression
1	4,00 min	85,0%	15,0%	300 µL/min	600 bar
2	22,00 min	0,0%	100,0%	300 µL/min	600 bar
3	27,00 min	0,0%	100,0%	300 µL/min	600 bar

Les composés ont été détectés en utilisant un spectromètre de masse Agilent 6530 Series Accurate-Mass Quadrupole Time-of-Flight (QToF) en ionisant les analytes en modes ESI+ et ESI- (« negative and positive electrospray ionization »). L'analyse des spectres LC-ESI-MS obtenus, effectuée avec le logiciel MassHunter Qualitative Analysis par détermination des rapports masse/charge (m/z), a permis d'identifier des métabolites d'intérêt. Grâce au logiciel MassHunter, il a été possible de générer les formules brutes des composés détectés. Les formules chimiques susceptibles de leur correspondre ont été ensuite recherchées en utilisant la base de données Human Metabolome DataBase (HMDB, <http://www.hmdb.ca/>, version 3.6). Les comparaisons de spectres ont été faites à l'aide du logiciel MassHunter Mass Profiler. Les métabolites détectés sur les milieux témoins PDA et CA ont été soustraits aux métabolites obtenus avec les souches étudiées.

II.2.c.3. Principaux métabolites identifiés

L'analyse préliminaire des spectres LC-ESI-MS a permis de mettre en évidence différents métabolites retrouvés spécifiquement chez *M. lanceolatus* UBOCC-A-109153 et *M. circinelloides* CBS 277-49 (**Tableau n°9, figure n°25**).

Les 3 métabolites de la souche technologique (2 sur milieu CA et un sur PDA) n'ont pas pu être caractérisés à ce stade.

Tableau n°9 : Principaux métabolites identifiés chez *M. lanceolatus* UBOCC-A-109153 et *M. circinelloides* CBS 277-49 après 7 jours à 14°C sur milieu CA et PDA. Les formules brutes des composés détectés ont été générées en utilisant le logiciel MassHunter. Les formules chimiques développées susceptibles de correspondre ont ensuite été recherchées avec la base de données Human Metabolome Database. TR correspond au temps de rétention en minutes. La masse est indiquée en g/Moles (m/z). La fréquence correspond au nombre de détection positive par triplicat.

Espèce	Milieu	ESI	Formule brute	TR (min)	Masse	Abondance	Frequence	Diff.Score	Formule chimique	Nom
<i>M. lanceolatus</i>	PDA	+	C20 H43 N11	20.863	437.3717	132536	3	99.987	/	/
	CA	+	C25 H44 O5	24.050	424.3188	294702	3	99.889	/	/
	CA	+	C25 H49 N O6	26.090	459.3557	257807	3	99.875	/	/
<i>M. circinelloides</i>	PDA	-	C16 H32 O2	23.407	256.2397	34636	3	99.938	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	Palmitic acid
	PDA	-	C18 H34 O2	23.620	282.2552	27879	3	99.939	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	Oleic acid
	PDA	+	C28 H51 N O6	17.367	497.3715	88021	3	99.872	/	/
	PDA	+	C28 H53 N O6	18.480	499.3871	78537	3	99.986	/	/
	PDA	+	C21 H36 O4	19.630	352.2612	91812	3	99.939	C ₂₁ H ₃₆ O ₄	MG : monoacylglyceride
	PDA	+	C21 H38 O4	20.600	354.2768	106117	3	99.953	C ₂₁ H ₃₈ O ₄	MG : monoacylglyceride
	PDA	+	C21 H40 O4	22.030	356.2924	120951	3	99.944	C ₂₁ H ₄₀ O ₄	MG : monoacylglyceride
	PDA	+	C28 H42 O5	21.843	458.3032	108198	3	100.000	C ₂₈ H ₄₂ O ₅	Pubesenolide
	CA	-	C29 H62 N2 O6	23.410	534.4612	50368	3	99.530	C ₃₅ H ₆₆ O ₃	Reticulatamol
	CA	-	C17 H30 N6 O2	23.620	350.2427	38399	3	99.927	C ₂₁ H ₃₄ O ₄	MG : monoacylglyceride
	CA	-	C16 H26 N12 O2	23.630	418.2302	42004	3	100.000	C ₂₁ H ₃₉ O ₆ P	CPA : cyclic phosphatidic acid
	CA	+	C22 H41 N13 S	16.363	519.3326	106027	3	99.263	/	/

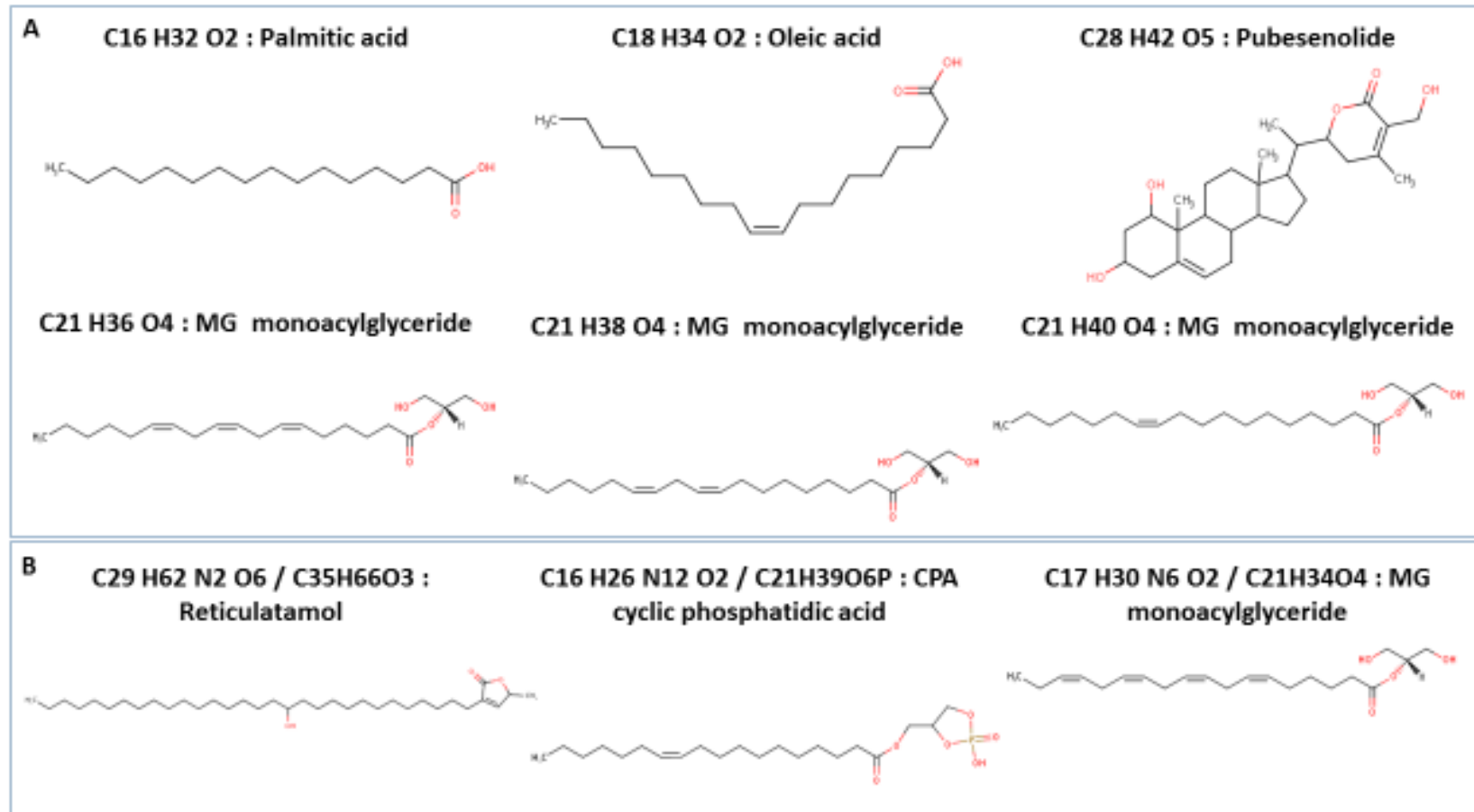


Figure 25 : Structures chimiques développées des métabolites potentiels détectés chez *M. lanceolatus* UBOCC-A-109153 et *M. circinelloides* CBS 277-49 après 7 jours à 14°C sur milieu PDA (A) et CA (B).

Les molécules identifiées chez *M. circinelloides* CBS 277-49, plus diverses et abondantes sur milieu PDA que sur CA, seraient majoritairement de nature lipidique. Bien que considérée comme faible productrice en comparaison d'autres souches comme la WJ11 (15% de lipides (poids sec total) contre 36%), la présence d'acide palmitique, d'acide oléique, d'acide α -linoléique, de triacylgycéride, ou encore d'acide phosphatidique n'est pas surprenante pour la souche CBS 277-49 (Jackson *et al.*, 1998 ; Carvalho *et al.*, 2015 ; Tang *et al.*, 2016 ; article n°1). Deux composés non-lipidiques détectés pourraient être : la pubesenolide, composé aliphatique polycyclique décrit chez *Physalis pubescens* (cerise), et le reticulatamol, qui a été retrouvé dans des fruits et des graines, notamment chez *Annona reticulata* (pomme ; source HMDB). Une étude plus fine des résultats obtenus, en intégrant les données générées et disponibles pour *M. racemosus* UBOCC-A-109155 et *M. endophyticus* CBS 385-95 dans les mêmes conditions, sera nécessaire pour conforter cette analyse et éventuellement permettre de mettre en évidence d'autres molécules d'intérêt.

Les résultats de cette étude interspécifique, couplée aux données de métabolomique, donneront lieu à une quatrième publication, en cours de rédaction.

Publication n° 4 :

Interspecific comparison of metabolic responses of *Mucor circinelloides* CBS 277-49 and *Mucor lanceolatus* UBOCC-A-109153 in synthetic and cheese mimicking media

Morin-Sardin S., Jany J.L., Jeffroy K., Artigaud S., Berney B., Pichereau V., Meslet-Cladière L.,
Coton E., Madec S.

Points saillants :

Cette deuxième étude de protéomique a permis :

- ↳ De mettre en œuvre, pour la première fois chez les *Mucor*, une comparaison interspécifique de 2 souches cultivées dans des conditions identiques ;
- ↳ D'identifier un total de 174 protéines exprimées différemment entre les deux souches selon qu'elles soient sur un milieu synthétique PDA ou sur un milieu mimant le fromage (CA) ;
- ↳ De confirmer le caractère fortement spécifique des protéines produites par les deux souches sur les deux types de milieu, même si les voies métaboliques impliquées sont globalement identiques ;
- ↳ De mettre en évidence une forte augmentation du métabolisme de la souche technologique sur milieu mimant le fromage par rapport au milieu non fromager, et inversement pour la souche non-technologique ;
- ↳ De proposer une liste de 35 protéines potentiellement impliquées dans la meilleure adaptation de *M. lanceolatus* à l'environnement fromager ;
- ↳ De procéder à l'identification préliminaire de 15 métabolites produits par *M. circinelloides* CBS 277-49 (80%) ou *M. lanceolatus* UBOCC-A-109153 (20%) sur milieu fromager ou non-fromager.

CHAPITRE III. Discussion, conclusions et perspectives

Le genre *Mucor* regroupe une grande diversité d'espèces décrites dans une multitude de contextes. La revue proposée dans la partie introductive de ce manuscrit (**publication n°1**) a permis de réaliser un inventaire des caractéristiques, de l'impact et du potentiel de ces champignons filamenteux, démontrant leur importance dans l'industrie agroalimentaire, leur implication grandissante dans les pathologies humaines ; avec une réelle problématique de santé publique ; mais également leur remarquable potentiel biotechnologique.

Dans le secteur agroalimentaire, de nombreuses espèces de ce genre ubiquiste sont retrouvées sur une grande variété de matières premières et de produits transformés (Hermet *et al.*, 2012, 2014 ; Snyder *et al.*, 2016). Parmi elles, un certain nombre participent activement à la production de produits fermentés. A l'opposé, d'autres sont responsables de contaminations, générant des défauts d'apparence et/ou organoleptiques à l'origine de pertes économiques. Un cas de toxi-infection associée à la présence de *M. circinelloides* dans du yaourt (Lee *et al.*, 2014) a également été récemment rapporté, soulevant la question de l'évaluation du risque réel pour le consommateur associé à l'ingestion d'aliments contaminés. Un élément complémentaire à considérer à ce niveau est la production potentielle de mycotoxines par certaines espèces de *Mucor*. Les études actuellement disponibles sur le sujet, peu nombreuses, suggèrent, chez certaines espèces, l'existence de gènes impliqués dans la synthèse de métabolites secondaires qui ne seraient pas regroupés en clusters (Hermet, 2013). Des études plus poussées sont actuellement en cours, notamment au sein du LUBEM, pour confirmer ce potentiel et caractériser, le cas échéant, les mycotoxines détectées et leurs effets.

Dans cette thèse, notre intérêt s'est porté plus particulièrement sur les espèces utilisées, bien souvent de manière empirique, pour leur rôle dans le processus de fabrication de produits fermentés et l'affinage de certains types de fromages. Sur la base de la diversité génétique et « fonctionnelle » du genre *Mucor*, nous avons souhaité i) confirmer et objectiver la dichotomie classiquement faite en industrie fromagère entre espèces technologiques et espèces contaminantes et ii) investiguer les mécanismes d'adaptation potentiels mis en oeuvre chez les espèces technologiques.

Physiologie et modélisation : des approches couplées suggérant l'adaptation des souches technologiques à l'environnement fromager

L'approche de physiologie comparée avait pour objectifs de mettre en évidence des différences morphologiques et de croissance entre des souches décrites, en environnement fromager, comme technologiques et d'autres dites contaminantes ou d'altération. Un choix de souches d'intérêt a été effectué en se basant principalement sur les travaux issus de la thèse d'Antoine Hermet (LUBEM, 2010-2013), qui a réalisé un bilan de la diversité des espèces de *Mucor* retrouvés en milieu fromager (Hermet *et al.*, 2012, 2014). Les phénotypes et les cinétiques de croissance d'un total de sept souches (deux souches technologiques, trois souches contaminantes, une souche mixte et une souche non-fromagère endophyte comme « outgroup »), représentatives de 7 espèces ont été suivis sur un milieu synthétique PDA en fonction de paramètres abiotiques majeurs en industrie fromagère (température, a_w , pH). Les résultats obtenus ont permis de déterminer les valeurs cardinales de croissance pour l'ensemble des souches et de mettre en place un modèle prévisionnel dont la robustesse a pu être démontrée en comparant, pour le facteur température et pour différents types de matrices [milieu cheese agar mimant le fromage, fromage de chèvre (matrice fréquemment contaminée par les *Mucor*) et tomme de savoie non-affinée (matrice où les *Mucor* participent à l'affinage)], des valeurs de croissance prédites à des valeurs mesurées (**publication n°2**). Des différences morphologiques et de croissance significatives ont ainsi pu être mises en évidence, en relation directe avec l'appartenance des souches à la flore dite technologique ou contaminante. Les souches technologiques se sont montrées physiologiquement mieux adaptées à la Tomme de Savoie alors que leur croissance et leur aspect sur milieu PDA ou bûche de chèvre suggèrent que ces environnements sont stressants. L'observation inverse a pu être faite pour les souches contaminantes. L'examen des profils de croissance de *M. endophyticus* et *M. lanceolatus* sur Tomme de Savoie permet d'illustrer ces propos, en mettant en évidence la différence importante de temps de latence entre la souche technologique, physiologiquement adaptée, et l'endophyte (**Figure 26**). Pour ce dernier, on observe un temps de latence plus long mais suivi d'une croissance proche de la souche technologique. Ces comportements sont possiblement associés à des phénomènes d'adaptation évolutive et/ou de réponse adaptative des *Mucor* à leur environnement.

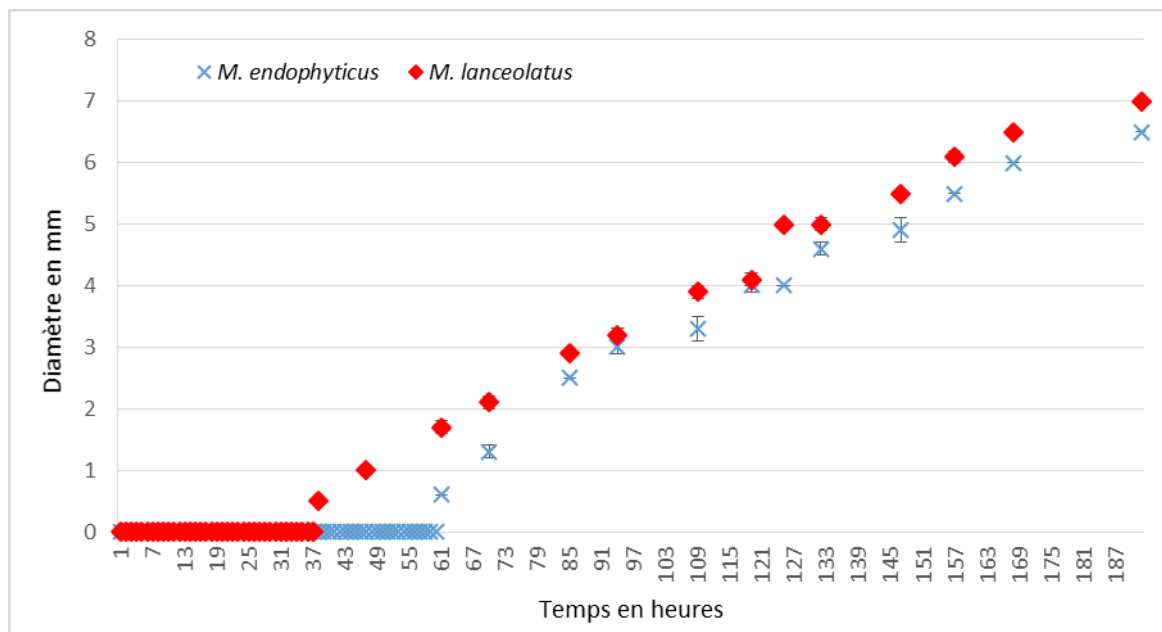


Figure 26 : Croissance de *M. endophyticus* CBS 385-95 et de *M. lanceolatus* UBOCC-A-109153 sur Tomme de Savoie à 15°C. Les points correspondent à la moyenne de trois mesures.

Le modèle prédictif développé, basé sur les études de Rosso (1993, 1995) et Pinon (2004), est performant mais pourrait être optimisé par une meilleure prise en compte du temps de latence (lag time). En effet, celui-ci est probablement sous-estimé dans notre approche du fait de l'importance quantitative des inocula qui génère une cinétique initiale de croissance (germination puis élongation hyphale) accélérée au regard des conditions réelles où la colonisation est associée à un nombre de spores plus réduit. Ces optimisations pourraient permettre de disposer d'un indicateur simple et informatif permettant d'apprécier le niveau global d'adaptation des souches de *Mucor* à un environnement donné, basé sur la mesure de la réactivité à initier une croissance exponentielle.

Les souches de *Mucor* testées se caractérisent par des vitesses de croissance dans des conditions optimales (6,5 à 18 mm/jour en milieu PDA en fonction de la température) significativement plus élevées que celles rapportées pour d'autres champignons filamenteux comme les ascomycètes *Penicillium camemberti* ou *roqueforti* (K. Rigalma, LUBEM, communication personnelle). Cette croissance particulièrement rapide est probablement en relation avec un métabolisme différent. Elle est peut-être aussi, comme suggéré par Pitt et Hocking (1999), en lien avec l'organisation cenocytique de leurs hyphes qui font des *Mucor* des colonisateurs primaires performants avec une stratégie de développement rudérale privilégiant une croissance et une reproduction rapides basées sur l'assimilation de

nutriments facilement assimilables. Les *Mucor* spp. persistent toutefois dans des contextes particuliers comme les matrices fromagères au sein desquelles les interactions avec les autres composantes du microbiote doivent jouer un rôle majeur. Le développement des approches génomiques et leur application aux surfaces fromagères ces dix dernières années a permis à ce niveau de réaliser d'importants progrès sur la caractérisation des flores de surface et même l'identification de certaines voies métaboliques mises en jeu lors de l'affinage (Wolfe *et al.*, 2014 ; Lessard *et al.*, 2014).

Les valeurs cardinales déterminées dans notre étude pour le paramètre température démontrent le caractère mésophile de la majorité des souches étudiées. Deux éléments complémentaires sont d'intérêt : i) la capacité de croissance à des températures physiologiques humaines et animales de certaines souches contaminantes comme *M. circinelloides* ou *M. spinosus* et ii) la capacité des souches étudiées à croître à des niveaux de température particulièrement bas (même négatives), élément de risque à intégrer pour les produits alimentaires conservés au froid. Contrairement au pH, l' a_w est, en comparaison avec de nombreuses espèces d'ascomycètes, un facteur limitant pour la croissance des *Mucor* qui restreint leur capacité à coloniser des produits à faible activité de l'eau comme les produits panifiés. L'évaluation de l'impact de l' a_w en utilisant un soluté ionique (NaCl) et un non-ionique (glycérol) a permis de mettre en évidence l'effet toxiques des ions Cl⁻, probablement du fait de phénomènes de compétition au niveau membranaire (Rengel, 1992; Niu *et al.*, 1996; Gomez *et al.*, 1996; Prista *et al.*, 1997).

Outre la démonstration d'une meilleure aptitude physiologique des souches technologiques de *Mucor* à l'environnement fromager, cette étude propose un modèle prédictif qu'il serait intéressant d'utiliser, dans un contexte de production fromagère donné, pour tenter d'apporter des optimisations des facteurs abiotiques visant à favoriser la croissance et le métabolisme des souches technologiques et à limiter la colonisation des matrices par des souches contaminantes.

Apport de l'analyse comparative des protéomes dans l'identification des marqueurs de l'adaptation aux matrices fromagères

Les modes de vie variés observés dans le genre *Mucor* (**publication n°1**) et les résultats de l'étude physiologique (**publication n°2**) suggèrent qu'il existe des capacités de réponse et des comportements métaboliques différents entre espèces lors de la colonisation du fromage. Dans une seconde étape, nous avons tenté d'identifier, par une approche de protéomique comparative, les différences en termes d'adaptabilité et de réponse métabolique entre *M. lanceolatus* et *M. racemosus*, deux espèces communes dans l'environnement fromager, *M. circinelloides*, une espèce qui peut être considérée comme contaminant occasionnel des fromages et enfin *M. endophyticus*, à notre connaissance jamais rencontrée sur fromage (**publication n°3**). L'approche protéomique vise à livrer une vision globale du protéome et donc indirectement des activités métaboliques mises en œuvre dans une condition donnée (De Angelis *et al.*, 2016 ; Moya-Alvarado *et al.*, 2016). Elle a montré son efficacité dans différents contextes comme l'étude de l'adaptation à l'environnement salé de *Photobacterium damsela subsp. piscicida*, une bactérie pathogène de certaines espèces de poissons marins (Chuang *et al.*, 2016), ou encore l'investigation des mécanismes de domestication au sein des végétaux du genre *Opuntia* (Pichereaux *et al.*, 2016). Chez *Mucor*, à notre connaissance, seules deux publications ont utilisé des techniques de protéomique. La première s'est intéressée aux capacités de *M. plumbeus* à dégrader le pentachlorophénol (Carvalho *et al.*, 2013) et la seconde a porté sur l'examen du potentiel de production d'acide γ -linoléique par *M. circinelloides* (Tang *et al.*, 2016). Cette phase descriptive des réponses métaboliques a été complétée par une étude comparative interspécifique des protéines différenciellement exprimées par la souche technologique UBOCC-A-109153 de *M. lanceolatus* et la souche contaminante occasionnelle CBS 277-49 de *M. circinelloides* sur milieu fromager et non-fromager (**publication n°4**), avec l'objectif d'identifier des marqueurs potentiels d'adaptation à l'environnement fromager.

Certaines des 35 protéines exprimées chez la souche de *M. lanceolatus* UBOCC-A-109153 sur milieu mimant le fromage et absentes chez *M. circinelloides* pourraient correspondre à des produits de gènes acquis au cours d'un processus d'adaptation au fromage. La surexpression/sous-expression protéique elle même peut être le résultat d'une sélection

positive ayant pris place durant l'évolution de la régulation des gènes (Gilad *et al.*, 2006, Fay et Wittkopp, 2008).

Sur la base des données actuellement disponibles dans la littérature, un certain nombre de ces protéines pourraient conférer à la souche technologique un avantage compétitif en lui permettant de s'adapter rapidement à l'environnement fromager et/ou en facilitant l'accès et l'assimilation de nutriments :

- La protéine **TREPH** (Trehalose phosphorylase), fortement surexprimée (facteur de 6,9) sur milieu mimant le fromage, intervient dans la synthèse (réversible) du trehalose, molécule bioprotectrice mise en évidence en fortes quantités chez plusieurs espèces de champignons en réponse à des stress abiotiques (Wiemken, 1990 ; Hottiger *et al.*, 1994 ; Hounsa *et al.*, 1998 ; Fillinger *et al.*, 2001 ; Doehlemann *et al.*, 2006 ; Al-Bader *et al.*, 2010 ; Uyar *et al.*, 2010). Elle pourrait contribuer à limiter le stress associé à l'environnement fromager et à réduire le temps d'adaptation (temps de latence).

- Deux protéines impliquées dans le métabolisme du glutathion, antioxydant essentiel pour le maintien de l'homéostasie cellulaire, seraient susceptibles de jouer un rôle protecteur similaire : **DUG1** (Cys-Gly metalloendopeptidase, facteur de 5,8 ; également surexprimée par *M. racemosus* sur milieu CA), et **GSTPA** (Glutathion S transferase, facteur de 3,5 ; Baudouin-Cornu *et al.*, 2012).

- La protéine **NECP1** (adaptin-ear-binding coat-associated protein, facteur de 2,1), décrite chez le rat comme étant l'une des composantes de la machinerie d'endocytose faisant intervenir des vésicules de chathrine (clathrin-coated vesicles – CCVs), pourrait améliorer l'assimilation des nutriments (Ritter *et al.*, 2003).

- Les protéines **PPB** (Alkaline phosphatase, PHO8 chez *S. cerevisiae*, facteur de 2,4), régulateur de l'expression de la nicotinamide mononucleotide (NmR), molécule qui permet de maintenir le pool cellulaire de NAD⁺ (Nicotinamide adenine dinucleotide), et **MTAP** (MEU1 chez *S. cerevisiae*), qui catalyse la synthèse de nicotinamide (forme de vitamine B3) à partir du NmR et est également nécessaire pour la production de NAD⁺ (Canto *et al.*, 2015). La NAD est une molécule impliquée dans une multitude de réactions biologiques (Lin et Guarente, 2003) qui intervient également comme régulateur transcriptionnel. Elle a été très étudiée pour son rôle dans la longévité et l'accroissement de la durée de vie en conditions de restrictions caloriques chez *S. cerevisiae* (Lin *et al.*, 2000 ; Lu et Lin, 2010).

Des investigations plus poussées seront nécessaires pour évaluer les rôles des 35 protéines surexprimées et identifier, parmi elles, les marqueurs d'adaptation les plus pertinents.

La comparaison des protéomes de la souche technologique et la souche contaminante sur milieu fromager et non fromager nous permet d'aborder la notion de Core proteome. Si le nombre de protéines surexprimées communes aux deux souches est identique sur les deux milieux, leur nature est par contre totalement différente. Il serait intéressant de compléter cette approche dans le futur en élargissant ces observations à de nouvelles souches technologiques, contaminantes ou out-group.

Relativement peu d'études se sont intéressées aux mécanismes d'adaptation/domestication chez les champignons, et celles qui ont été réalisées ont généralement été faites chez les levures. Parmi ces dernières, *Saccharomyces cerevisiae* est probablement l'espèce qui a fait l'objet du processus de sélection orienté par l'homme le plus complet, portant sur plusieurs générations et visant à optimiser progressivement son utilisation industrielle (Fay et Benavides, 2005). Cette « évolution orientée » dans laquelle l'homme a un rôle actif dépasse le stade de l'adaptation et est assimilable à une domestication, telle que celles menées chez un grand nombre d'animaux « domestiques » ou de végétaux (Lin *et al.*, 2014 ; Bosse *et al.*, 2014). L'étude des séquences génomiques totales de différentes souches de *S. cerevisiae* utilisées industriellement a récemment permis de mettre en évidence des signatures génétiques spécifiques des secteurs dans lesquels ces souches étaient utilisées (brasserie, panification, vinification, ... ; Novo *et al.*, 2009 ; Borneman *et al.*, 2011 ; Marsit *et al.*, 2015). Les variations génétiques observées sont principalement des polymorphismes nucléotidiques (SNPs) mais également des délétions et des insertions associées à des intégrations répétées à différents endroits du génome de regroupement de gènes inconnus ou impliqués dans des fonctions clés comme la fermentation. Cet « enrichissement » est lié à des apports exogènes, principalement via des échanges avec des souches et/ou espèces partageant des niches écologiques similaires, comme *Torulaspota microellipsoides* ou *Zygosaccharomyces bailii* (Novo *et al.*, 2009 ; Marsit *et al.*, 2015, 2016).

Chez les champignons filamenteux, les souches appartenant aux espèces *Penicillium roqueforti* et *camemberti* ont été sélectionnées pour leur apport dans l'affinage et les caractéristiques organoleptiques du Roquefort et du Camembert. A l'identique de ce qui a pu être observé chez *S. cerevisiae*, ces adaptations aux matrices fromagères semblent associées à des modifications génétiques, notamment à des transferts horizontaux de larges

régions génomiques (> 10Kb, dénommées HTRs pour « horizontally transferred regions ») contenant des gènes codant pour des protéines favorisant l'utilisation de nutriments présents dans le fromage ou intervenant dans des mécanismes de compétition (Ropars *et al.*, 2015). Ces modifications semblent conférer aux souches industrielles une croissance améliorée en environnement fromager, des capacités de colonisation accrues et une expression protéique plus rapide et intense initiée dès les premiers stades de l'affinage.

Les études de protéomique comparative que nous avons menées durant ce travail ont été ambitieuses en termes de nombre et de diversité de souches mais également de milieux. Cet environnement d'étude, que nous avons voulu représentatif de la réalité du terrain, a pour inconvénient majeur de complexifier considérablement l'analyse des résultats obtenus, qui sont associés à la variation de plusieurs paramètres. Il serait intéressant de compléter ces approches globales par des études ciblées visant à mesurer l'impact individuel sur les voies métaboliques de la variation de quelques paramètres d'intérêt particulier en milieu fromager comme la concentration en lactose ou en sels. Enfin, il faut noter que la présence/absence des protéines et leur niveau de production ne reflètent pas forcément la présence/absence des gènes ou leur niveau d'expression. La validation de l'acquisition de gènes dans le cadre d'une adaptation voire domestication passe donc par une analyse de génomique comparative.

Perspectives apportées par la génomique

La comparaison des génomes des différentes espèces de *Mucor* étudiées ici constitue la perspective immédiate logique de ce travail. C'est la raison pour laquelle nous avons procédé, en sus des travaux réalisés en amont par Hermet (Hermet, 2013), au séquençage total du génome de *M. endophyticus* CBS 385-95 ainsi qu'aux séquençages des ARN totaux de *M. endophyticus* CBS 385-95, *M. racemosus* UBOCC-A-109155, *M. fuscus* UBOCC-A-109160, *M. lanceolatus* UBOCC-A-109153 et *M. circinelloides* CBS 277-49 après culture sur milieu PDA par une approche de RNA seq (Whole Transcriptome Shotgun Sequencing) (cf **Annexe 2**). L'obtention des données de RNA seq a un double intérêt : i) permettre une meilleure annotation structurale et fonctionnelle des génomes désormais disponibles, en

cernant de manière plus fine les introns peu ou pas identifiés chez *Mucor* et ii) réaliser une étude de transcriptomique comparative permettant d’approcher les notions de core transcriptome et de transcriptome spécifique. Ces éléments sont actuellement en cours d’analyse dans le cadre de la thèse initiée par A. Lebreton en septembre 2016, en lien avec la plateforme ABIMS – FR2424 CNRS – Université Pierre et Marie Curie de la station biologique de Roscoff (projet MUCORSCOPE). Les premiers résultats des analyses bioinformatiques faites par A. Lebreton ont d’ores et déjà permis de déterminer que 6390 gènes étaient communs aux cinq souches que nous avons étudiées (**Tableau n°10**), et que 438 étaient spécifiques des souches appartenant à des espèces technologiques.

Tableau n°10 : Génomes de *Mucor* actuellement disponibles.

Espèce	Référence	Taille du génome (Mb)	Source
<i>Mucor fuscus</i>	UBOCC-A-109160	40,6	Lubem
<i>M. lanceolatus</i>	UBOCC-A-109153	43,4	
<i>M. racemosus</i>	UBOCC-A-109155	46,9	
<i>M. endophyticus</i>	CBS 385-95	35,2	Tang <i>et al.</i> , 2015
<i>M. circinelloides</i>	CBS 277-49	36.6	

L’annotation experte des génomes sera couplée à une analyse d’orthologie (lien évolutif entre deux gènes présents chez deux espèces différentes). Cela devrait permettre de dresser les limites d’un « *core genome* » chez *Mucor* mais aussi, potentiellement, de mettre en évidence des gènes spécifiques à chacune des souches analysées provenant d’expansions/contractions de certaines familles de gènes, peut-être sous la forme de régions transférées horizontalement comme cela est le cas chez les *Penicillium* (Ropars *et al.*, 2015). Des analyses de populations complémentaires (après avoir amplifié des régions d’intérêt chez plusieurs souches des espèces technologiques) devraient également permettre de vérifier par le biais de l’utilisation du rapport dN/dS (substitutions nucléotidiques non synonymes / substitutions nucléotidiques synonymes) si certains des gènes identifiés comme potentiellement impliqués dans l’adaptabilité au milieu fromager sont soumis ou non à une sélection positive forte qui serait dû à de l’adaptation évolutive et même à un phénomène de domestication.

L'ensemble de ces résultats sera d'intérêt pour proposer des marqueurs d'adaptation évolutive chez les espèces technologiques ou les contaminants fréquents, qui pourront faire l'objet d'investigations ciblées visant à vérifier que ces gènes candidats et leurs produits offrent bien un avantage compétitif (et donc évolutif) sur milieu fromager. Parmi les approches utilisables, la RT-qPCR permettrait de réaliser un suivi d'expression de gènes sur milieux fromagers et non-fromagers (Monnet *et al.*, 2013 ; Cusick *et al.*, 2014 ; Paolinelli-Alfonso *et al.*, 2016 ; Fuentes *et al.*, 2016). Une approche plus exhaustive telle que le RNAseq à partir de transcrits sur milieux fromager et non fromager serait également envisageable. Le recours au séquençage RNAseq chez des souches cultivées dans les mêmes conditions (température, milieu, ...) permettrait en effet de compléter les résultats de protéomiques obtenus en intégrant les phénomènes de régulation post-transcriptionnelle, particulièrement ceux associés aux RNAi décrits récemment chez *Mucor circinelloides* (Nicolás *et al.*, 2015 ; Ruiz-Vázquez *et al.*, 2015 ; Torres- Martínez *et al.*, 2016). La neutralisation de l'expression de certains gènes candidats pourrait être également envisagée afin de vérifier que l'absence de la protéine correspondante pénalise la souche manipulée sur milieu fromage par rapport à une autre souche. Cela pourrait-être réalisé par RNA interférence (RNAi ou « post-transcriptional gene silencing »), stratégie très utilisée pour décrypter les processus de cancérogénèse chez l'homme (Villalobos-Escobedo *et al.*, 2016 ; Hu *et al.*, 2016 ; Liu *et al.*, 2016) et qui été mise en place récemment chez *P. roqueforti* (Kosalková *et al.*, 2015 ; Gil-Durán *et al.*, 2015) ; mais plus avantageusement par « clustered, regularly interspaced, short palindromic repeat » (CRISPR), couplé à l'endonucléase Cas9 (pour CRISPR associated protein 9). CRISPR-CAS9 est un outil de génie génétique à fort potentiel permettant d'inactiver ou au contraire d'introduire un gène présentant un intérêt majeur dans un organisme (Nødvig *et al.*, 2015 ; Ceasar *et al.*, 2016). Il commence à être développé et utilisé chez les levures et certains champignons filamenteux comme *S. cerevisiae*, *Aspergillus fumigatus* ou *Aspergillus oryzae* (Ronda *et al.*, 2015 ; Zhang *et al.*, 2016 ; Katayama *et al.*, 2016).

Postface :

Cette thèse m'a donné l'opportunité de me replonger avec plaisir dans le monde de la recherche en m'intéressant aux champignons filamenteux impliqués dans l'affinage du fromage, domaine bien différent du secteur pharmaceutique dans lequel j'ai évolué durant plus de 10 années. J'ai beaucoup apprécié cette période intense qui m'a permis de mener un projet d'intérêt en découvrant et développant de nombreuses approches (physiologie, modélisation, protéomique, métabolomique, génomique), et en valorisant mon expérience et mes acquis précédents. J'ai également eu la chance de participer à de nombreux congrès nationaux et internationaux (**Annexe 3**), de réaliser des formations pointues (qPCR, bioinformatique, ... ; **Annexe 4**) et d'effectuer des cours magistraux dans le domaine du management de la qualité. Ces années ont passé vite et ont généré un grand nombre de résultats qui apporteront, je l'espère, des éléments d'intérêt pour l'élucidation de mécanismes précis d'adaptation des souches technologiques de *Mucor* à l'environnement fromager. Au terme de ce congé de reconversion, je suis motivée pour tenter de poursuivre ma route dans le domaine de la recherche académique et de l'enseignement dans la logique de travail d'équipe collaboratif et d'ouverture qui m'a toujours guidée.

BIBLIOGRAPHIE

Cette partie bibliographique ne liste que les références non-citées dans les articles présentés dans ce manuscrit.

A

Ainsworth GC. Introduction and keys to higher taxa, in: Ainsworth, G.C., Sparrow, F.K., Sussman, A.S. (Eds.), *The Fungi: An Advanced Treatise*. Academic Press, London, 1973, pp. 1–7.

Al-Bader N, Vanier G, Liu H, Gravelat FN, Urb M, Hoareau CM, Campoli P, Chabot J, Filler SG, Sheppard DC. Role of trehalose biosynthesis in *Aspergillus fumigatus* development, stress response, and virulence. *Infect. Immun.* 2010 78(7), 3007-3018.

Al Mogbel MS. Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry for identification of *Clostridium* species isolated from Saudi Arabia. *Braz. J. Microbiol.* 2016 S1517-8382(16), 00078-2.

Almeida JRM, Modig T, Petersson A, Hähn-Hägerdal B, Lidén G, Gorwa-Grauslund MF. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 2007 82, 340-349.

Alves M, de Campos-Takaki GM, Okada K, Pessoa IHF, Milanez AI. Detection of extracellular protease in *Mucor* species. *Rev. Iberoam Micol.* 2005 22, 114-117.

Alves MH, Campos-Takaki GM, Porto ALF, Milanez AI. Screening of *Mucor spp.* for the production of amylase, lipase, polygalacturonase and protease. *Braz. J. Microbiol.* 2002 33, 325-330.

Andersen G, Björnberg O, Polakova S, Pynyaha Y, Rasmussen A, Møller K, Compagno C. A second pathway to degrade pyrimidine nucleic acid precursors in eukaryotes. *J. Molecular Biol.* 2008 380(4), 656-666.

Araujo-Palomares CL, Castro-Longoria E, Riquelme M. Ontogeny of the Spitzenkörper in germlings of *Neurospora crassa*. *Fungal Genet Biol.* 2007 44(6), 492-503.

Ardö YM. Blue mold cheese, in: *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 2nd ed., Vol. 1, J. Fuquay, P.F. Fox and P.L.H. McSwweeney, eds., Academic Press, San Diego. 2011, 767-772.

Arteau M, Labrie S, Roy D. Terminal-restriction fragment length polymorphism and automated ribosomal intergenic spacer analysis profiling of fungal communities in Camembert cheese. *Int. Dairy J.* 2010 20, 545–554.

Atanassova MR, Fernández-Otero C, Rodríguez-Alonso P, Fernández-No IC, Garabal JJ, Centeno JA. Characterization of yeasts isolated from artisanal short-ripened cows' cheeses produced in Galicia (NW Spain). *Food Microbiol.* 2016 53, 172-181.

Avonce N, Mendoza-Vargas A, Morett E, Iturriaga G. Insights on the evolution of trehalose biosynthesis. *BMC Evol. Biol.* 2006 6, 109.

B

Bachmann H, Starrenburg MJC, Molenaar D, Kleerebezem M, van Hylckama Vlieg JET. Microbial domestication signatures of *Lactococcus lactis* can be reproduced by experimental evolution. *Genome Res.* 2012 22, 115-124.

Bahl K, Xie S, Spagnol G, Sorgen P, Naslavsky N, Caplan S. EHD3 Protein is required for tubular recycling endosome stabilization, and an asparagine-glutamic acid residue pair within its Eps15 Homology (EH) domain dictates its selective binding to NPF peptides. *J. Biol. Chem.* 2016 291(26), 13465-13478.

Baldauf SL. An overview of the phylogeny and diversity of eukaryotes. *J. Syst. Evol.* 2008 46, 263–273.

Baroiller C, Schmidt JL. Contribution à l'étude de l'origine des levures du fromage de camembert. *Lait.* 1990 70, 67-84.

- Barrios MJ, Medina LM, Lopez MC, Jordano R. Fungal biota isolated from Spanish cheeses. *J. Food Saf.* 1998 18, 151–157.
- Bärtschi C, Berthier J, Valla G. Inventaire et évolution des flores fongiques de surface du reblochon de Savoie. *Le Lait.* 1994 74(2), 105-114.
- Baudouin-Cornu P, Lagniel G, Kumar C, Huang ME, Labarre J. Glutathione degradation is a key determinant of glutathione homeostasis. *J. Biol. Chem.* 2012 287(7), 4552-4561.
- Beers JM, Jayasundara N. Antarctic notothenioid fish: what are the future consequences of 'losses' and 'gains' acquired during long-term evolution at cold and stable temperatures? *J. Exp. Biol.* 2015 218(12), 1834-1845.
- Berger DK, Carstens M, Korsman JN, Middleton F, Kloppers FJ, Tongoona P, Myburg AA. Mapping QTL conferring resistance in maize to gray leaf spot disease caused by *Cercospora zeina*. *BMC Genet.* 2014 15: 60.
- Bergere JL., Lenoir J. Les accidents de fromagerie et les défauts des fromages. *Le fromage.* Edited by A. Eck and J.-C. Gillis. Lavoisier Tec and Doc, Paris, France. 1997, 509-543.
- Blackwell M. The Fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? *Americ. J. Botany.* 2011 98(3), 426-438.
- Bokulich NA, Mills DA. Facility-specific "House" microbiome drives microbial landscapes of artisan cheesemaking plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 2013 79, 5214–5223.
- Borneman AR, Desany BA, Riches D, Affourtit JP, Forgan AH, Pretorius IS, Egholm M, Chambers PJ. Whole-genome comparison reveals novel genetic elements that characterize the genome of industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genet.* 2011 7(2).
- Bosse M, Megens HJ, Frantz LA, Madsen O, Larson G, Paudel Y, Duijvesteijn N, Harlizius B, Hagemeyer Y, Crooijmans RP, Groenen MA. Genomic analysis reveals selection for Asian genes in European pigs following human-mediated introgression. *Nat. Commun.* 2014 5, 4392.
- Bouchet P, Guignard JL, Pouchus YF, Villard J. *Les champignons : Mycologie fondamentale et appliquée.* Abrégés, 2nde édition 2000, Masson.
- Bouteille R, Gaudet M, Lecanu B, This H. Monitoring lactic acid production during milk fermentation by *in situ* quantitative proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Dairy Sci.* 2013 96(4), 2071-2080.
- Bourdichon N, Boyaval P, Casaregola S, Dupont J, Farrokh C, Frisvad JC, Hammes WP, Huys G, Jany JL, Laulund S, Ouwehand A, Seto Y, Zgoda A, Hansen EB. The 2012 Inventory of Microbial Species with technological beneficial role in fermented food products. Safety Demonstration of Microbial Food Cultures (MFC) in Fermented Food Products. *Bull. Inter. Dairy Federation.* 2012 455.
- Boutrou R, Guéguen M. Interests in *Geotrichum candidum* for cheese technology. *Int. J. Food Microbiol.* 2005 102, 1-20.
- Bouvier I, Brygoo Y, Lima O. Cheese-forming and "antimucor" *Penicillium caseicolum* strains. Patent: EP0527070 A1. February, 1993.
- Brenet M, Centeleghe JL, Milliere JB, Ramet JP, Weber F. Etude d'un accident en fromagerie de type " Camembert " causé par des mucorales. *Le Lait.* 1972 52 (513 514), 141-148.
- Breuer U, Harms H. *Debaryomyces hansenii* - an extremophilic yeast with biotechnological potential. *Yeast.* 2006 23, 415–437.
- Büchler M, Tisljar U, Wolf DH. Proteinase yscD (oligopeptidase yscD). Structure, function and relationship of the yeast enzyme with mammalian thimet oligopeptidase (metalloendopeptidase, EP 24.15). *Eur. J. Biochem.* 1994 219(1-2), 627-639.

C

- Cakmakci S, Dagdemir E, Hayaloglu AA, Gurses M, Cetin B, Tahmas-Kahyaoglu D. Effect of *Penicillium roqueforti* and incorporation of whey cheese on volatile profiles and sensory characteristics of mould-ripened Civil cheese. *Int. J. Dairy Tech.* 2013 66, 512-526.
- Calmes B, Morel-Rouhier M, Bataillé-Simoneau N, Gelhaye E, Guillemette T, Simoneau P. Characterization of glutathione transferases involved in the pathogenicity of *Alternaria brassicicola*. *BMC Microbiol.* 2015 15, 123.

- Canto C, Menzies KJ, Auwerx J. NAD⁺ metabolism and the control of energy homeostasis: a balancing act between mitochondria and the nucleus *Cell. Metab.* 2015 22, 31-53.
- Cantor MD, Van Den Tempel T, Hansen TK, Ardö YM. Blue cheese, in, *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, 3rd edn., Vol 2, P.F. Fox, P.L. McSweeney, T.M. Cogan and T.P. Guinee, eds, Academic Press, San Diego. 2004, 175-198.
- Carvalho MB, Martins I, Medeiros J, Tavares S, Planchon S, Renaut J, Núñez O, Gallart-Ayala H, Galceran MT, Hursthouse A, Silva Pereira C. The response of *Mucor plumbeus* to pentachlorophenol: a toxicoproteomics study. *J. Proteomics.* 2013 78,159-171.
- Carvalho AK, Rivaldi JD, Barbosa JC, de Castro HF. Biosynthesis, characterization and enzymatic transesterification of single cell oil of *Mucor circinelloides*--a sustainable pathway for biofuel production. *Bioresour. Technol.* 2015 181, 47-53.
- Cesar SA, Rajan V, Prykhozhij SV, Berman JN, Ignacimuthu S. Insert, remove or replace: A highly advanced genome editing system using CRISPR/Cas9. *Biochim. Biophys. Acta.* 2016 1863(9), 2333-2344.
- Cenci-Goga BT, Karama M, Sechi P, Iulietto MF, Novelli S, Mattei S. Evolution under different storage conditions of anomalous blue coloration of Mozzarella cheese intentionally contaminated with a pigment-producing strain of *Pseudomonas fluorescens*. *J. Dairy Sci.* 2014 97(11), 6708-6718.
- Cerbulis J, Farrell HM. Composition of milks of dairy cattle. I. Protein, lactose, and fat contents and distribution of protein fraction. *J. Dairy Sci.* 1975 58(6), 817-827.
- Cerning J, Gripon JC, Lamberet G, Lenoir J. Les activités biochimiques des *Penicillium* utilisés en fromagerie. *Lait.* 1987 67, 3-39.
- Chagnon PL. Ecological and evolutionary implications of hyphal anastomosis in arbuscular mycorrhizal fungi. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2014 88(3), 437-444.
- Chamba JF, Irlinger F. Secondary and adjunct cultures. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Vol 2, P.F. Fox, P.L. McSweeney, T.M. Cogan and T.P. Guinee, eds, Academic Press, San Diego. 2004, 191-206.
- Chávez R, Fierro F, Garcia-Rico RO, Laich F. Mold-fermented foods: *Penicillium* spp. as ripening agents in the elaboration of cheese and meat products. In *Mycofactories* (Leitã A.L., Ed.). 2011, 73-98. Bentham Science Publishers.
- Chitarra GS, Abee T, Rombouts FM, Dijksterhuis J. 1-octen-3-ol inhibits conidia germination of *Penicillium paneum* despite of mild effects on membrane permeability, respiration, intracellular pH, and changes the protein composition. *Microbiol. Ecol.* 2005 54, 67-75.
- Chowdhary A, Kathuria S, Singh PK, Sharma B, Dolatabadi S, Hagen F, Meis JF. Molecular characterization and *in vitro* antifungal susceptibility of 80 clinical isolates of mucormycetes in Delhi, India. *Mycoses.* 2014 57 Suppl 3, 97-107.
- Chuang MY, Tsai WC, Kuo TY, Chen HM, Chen WJ. Comparative proteome analysis reveals proteins involved in salt adaptation in *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *J Basic Microbiol.* 2016. In press.
- Ciccarelli FD, Doerks T, Mering C von, Creevey CJ, Snel B, Bork P., Toward automatic reconstruction of a highly resolved tree of life. *Science* 2006 311, 1283–1287.
- Cocolin L, Nucera D, Alessandria V, Rantsiou K, Dolci P, Grassi MA, Lomonaco S, Civera T. Microbial ecology of Gorgonzola rinds and occurrence of different biotypes of *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* 2009 133, 200-205.
- Cogan TM, Jamet E, Beduhn R, Bora N, Chamba JF, Irlinger F, Sebastian H, Desmasures N, Hohenegger M, Mounier J, Ward AC, Goodfellow M, Goerges S, Guéguen M, Larpin S, Swings J, Vancanneyt M, Gelsomino R, Rea MC, Scherer S. Biodiversity of the surface microbial consortia from Limburger, Reblochon, Livarot, Tilsit, and Gubbeen Cheeses. *Microbiol. Spectr.* 2014, 2(1).
- Cole GT. Basic Biology of Fungi. In: Baron S, editor. *Medical Microbiology*. 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996. Chapter 73.
- Collins YF, McSweeney TM, Wilkinson MG. Lipolysis and catabolism of fatty acids in cheese. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, 3rd ed., Vol 1, P.F. Fox, P.L. McSweeney, T.M. Cogan and T.P. Guinee, eds, Academic Press, San Diego. 2004, 373-389.

Coton M, Delbés-Paus C, Irlinger F, Desmasures N, Le Fleche A, Stahl V, Montel MC, Coton E. Diversity and assessment of potential risk factors of Gram-negative isolates associated with French cheeses. *Food Microbiol.* 2012 29(1), 88-98.

Coton E, Desmouts MH, Leroy S, Coton M, Jamet E, Christieans S, Donnio PY, Lebert I, Talon R. Biodiversity of coagulase-negative *Staphylococci* in French cheeses, dry fermented sausages, processing environments and clinical samples. *Int. J. Food Microbiol.* 2010 137(2-3), 221-229.

Curioni PMG, Bosset JO. Key odorants in various cheese types as determined by gas chromatography-olfactometry. *Int. Dairy J.* 2002 12, 959-984.

Cusick KD, Fitzgerald LA, Pirlo RK, Cockrell AL, Petersen ER, Biffinger JC. Selection and evaluation of reference genes for expression studies with quantitative PCR in the model fungus *Neurospora crassa* under different environmental conditions in continuous culture. *PLoS One.* 2014 9(12).

D

Dantigny P, Bensoussan M. The logarithmic transformation should be avoided for stabilising the variance of mould growth rate. *Int. J. Food Microbiol.* 2008 121, 225-228.

Daugeron MC, Prouteau M, Lacroute F, Séraphin B. The highly conserved eukaryotic DRG factors are required for efficient translation in a manner redundant with the putative RNA helicase Slh1. *Nucleic Acids Res.* 2011 39(6), 2221-2233.

Deacon JW. *Fungal biology*, 4th ed, 2006. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK.

Dean R, Van Kan JA, Pretorius ZA, Hammond-Kosack KE, Di Pietro A, Spanu PD, Rudd JJ, Dickman M, Kahmann R, Ellis J, Foster GD. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* 2012 13(4), 414-430.

De Angelis M, Calasso M, Cavallo N, Di Cagno R, Gobbetti M. Functional proteomics within the genus *Lactobacillus*. *Proteomics.* 2016 16(6), 946-962.

Decker M, Nielsen PV. The inhibitory effect of *Penicillium camemberti* and *Geotrichum candidum* on the associated fungi of white mould cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 2005 104, 51-60.

Décret n°2007-628 du 27 avril 2007 relatif aux fromages et spécialités fromagères. https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do;jsessionid=5672A98FD79EA286CC63C995F7276B0E.tp dila16v_3?cidTexte=JORFTEXT000000644875&dateTexte=20070601

De Freitas I, Pinon N, Maubois JL, Lortal S, Thierry A. The addition of a cocktail of yeast species to Cantalet cheese changes bacterial survival and enhances aroma compound formation. *Int. J. Food Microbiol.* 2009 129(1), 37-42.

Dejmek P, Walstra P. The syneresis of rennet-coagulated curd. In *Cheese: chemistry, physics and microbiology* (Fox PF, McSweeney PLH, Cogan TM, Guinee TD Eds). 2004 Vol1; 71-103. Academic press.

Desmasures N. Cheese. Mold-ripened varieties. *Encyclopedia of Food Microbiology*, second edition. 2014. pp. 409-415.

Devle H, Vetti I, Naess-Andresen CF, Rukke EO, Vegarud G, Ekeberg D. A comparative study of fatty acid profiles in ruminant and non-ruminant milk. *European J. Lipid Sci. Technol.* 2012 114, 1036-1043.

Dieuleveux V, van der Pyl D, Chataud J, Gueguen M. Purification and characterization of anti-*Listeria* compounds produced by *Geotrichum candidum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1998 64, 800-803.

Dolatabadi S, Kolecka A, Versteeg M, de Hoog SG, Boekhout T. Differentiation of clinically relevant *Mucorales Rhizopus* microsporus and *R. arrhizus* by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *J Med Microbiol.* 2015 64(7), 694-701.

Dugat-Bony E, Sarthou AS, Perello MC, de Revel G, Bonnarme P, Helinck S. The effect of reduced sodium chloride content on the microbiological and biochemical properties of a soft surface-ripened cheese. *J. Dairy Sci.* 2016 99(4), 2502-2511.

E

Ehrlich KC, Montalbano BG, Mullaney EJ, Dischinger HC, Ullah AH. An acid phosphatase from *Aspergillus ficuum* has homology to *Penicillium chrysogenum* PHOA. Biochemical and biophysical research communications. 1994 204(1), 63-68.

Elbein AD, Pan YT, Pastuszak I, Carroll D. New insights on trehalose: a multifunctional molecule. Glycobiology. 2003 13(4), 17R-27R.

F

FAO/OMS n°6-A. Joint FAO/WHO Committee of government experts on the code of principles concerning milk and milk products. Codex Alimentarius. 1978.

Fay JC, Benavides JA. Evidence for domesticated and wild populations of *Saccharomyces cerevisiae*. PLoS Genet. 2005 1(1), 66-71.

Fernández-Bodega MA, Mauriz E, Gómez A, Martín JF. Proteolytic activity, mycotoxins and andrastin A in *Penicillium roqueforti* strains isolated from Cabrales, Valdeón and Bejes-Tresviso local varieties of blue-veined cheeses. Int. J. Food Microbiol. 2009 136(1), 18-25.

Fillinger S, Chaverroche MK, van Dijck P, de Vries R, Ruijter G, Thevelein J, d'Enfert C. Trehalose is required for the acquisition of tolerance to a variety of stresses in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. Microbiology. 2001 147, 1851-1862.

Fisher KE, Roberson RW. Hyphal tip cytoplasmic organization in four zygomycetous fungi. Mycologia. 2016 pii: 15-226. In press.

Foltmann B, Pedersen VB, Kauffman D, Wybrandt G. The primary structure of calf chymosin. J. Biol.Chem. 1979 254(17), 8447-8456.

Fontaine K, Hymery N, Lacroix MZ, Puel S, Puel O, Rigalma K, Gaydou V, Coton E, Mounier J. Influence of intraspecific variability and abiotic factors on mycotoxin production in *Penicillium roqueforti*. Int. J. Food Microbiol. 2015 215, 187-193.

Fonseca GG, Heinzle E, Wittmann C, Gombert AK. The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2008 79(3), 339-354.

Fox PF, McSweeney PL, Cogan TM, Guinee TP (Eds). Cheese: chemistry, physics and microbiology. General aspects. 2004, vol 1. Academic Pres.

Free SJ. Fungal cell wall organization and biosynthesis. Adv Genet. 2013 81, 33-82.

Fuentes A, Ortiz J, Saavedra N, Salazar LA, Meneses C, Arriagada C. Reference gene selection for quantitative real-time PCR in *Solanum lycopersicum* L. inoculated with the mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis*. Plant Physiol. Biochem. 2016 101, 124-131.

G

Gabaldón T. A metabolic scenario for the evolutionary origin of peroxisomes from the endomembranous system. Cellular and Molecular Life Sciences. 2014 71(13), 2373.

Garrett MD, Zahner JE, Cheney CM, Novick PJ. GDI1 encodes a GDP dissociation inhibitor that plays an essential role in the yeast secretory pathway. EMBO J. 1994 13(7), 1718-1728.

Gil-Durán C, Rojas-Aedo JF, Medina E, Vaca I, García-Rico RO, Villagrán S, Levicán G, Chávez R. The *pcz1* gene, which encodes a Zn(II)₂Cys₆ protein, is involved in the control of growth, conidiation, and conidial germination in the filamentous fungus *Penicillium roqueforti*. PLoS One. 2015 10(3).

Gillot G, Decourcelle N, Dauer G, Barbier G, Coton E, Delmail D, Mounier J. 1-Octanol, a self-inhibitor of spore germination in *Penicillium camemberti*. Food Microbiol. 2016 57, 1-7.

Giraud F, Giraud T, Aguilera G, Fournier E, Samson R, Cruaud C, Lacoste S, Ropars J, Tellier A, Dupont J. Microsatellite loci to recognize species for the cheese starter and contaminating strains associated with cheese manufacturing. Int. J. Food Microbiol. 2010 137, 204-213.

Gkatzionis K, Yunita D, Linforth RST, Dickinson M, Dodd CER. Diversity and activities of yeasts from different parts of a Stilton cheese. Int. J. Food Microbiol. 2014 177, 109–116.

Goerges S, Aigner U, Silakowski B, Scherer S. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by food-borne yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006 72, 313–318.

Goldar MM, Nishie T, Ishikura Y, Fukuda T, Takegawa K, Kawamukai M. Functional conservation between fission yeast *moc1/sds23* and its two orthologs, budding yeast *SDS23* and *SDS24*, and phenotypic differences in their disruptants. *Bioscience, Biotechnology, Biochemistry.* 2005 69(7), 1422-1426.

Gomez MJ, Luyten K, Ramos J. The capacity to transport potassium influences sodium tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 1996 135, 157-160.

Gonen S, Baranski M, Thorland I, Norris A, Grove H, Arnesen P, Bakke H, Lien S, Bishop SC, Houston RD. Mapping and validation of a major QTL affecting resistance to pancreas disease (salmonid alphavirus) in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Heredity (Edinb)* 2015 115(5), 405–414.

Graille M, Baltaze JP, Leulliot N, Liger D, Quevillon-Cheruel S, van Tilbeurgh H. Structure-based functional annotation: yeast *ymr099c* codes for a D-hexose-6-phosphate mutarotase. *J. Biol. Chem.* 2006 281(40), 30175-30185.

Greetham D, Wimalasena TT, Leung K, Marvin ME, Chandelia Y, Hart AJ, Phister TG, Tucker GA, Louis EJ, Smart KA. The genetic basis of variation in clean lineages of *Saccharomyces cerevisiae* in response to stresses encountered during bioethanol fermentations. *PLoS One.* 2014 12, 9(8).

Gripon J, Desmazeaud MJ, Le Bars D, Bergere J. Role of Proteolytic Enzymes of *Streptococcus lactis*, *Penicillium roqueforti* and *Penicillium caseicolum* during Cheese Ripening. *J. Dairy Sci.* 1977 60, 1532-1538.

Gripon JC. Mould-ripened cheeses. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, 2nd ed., Vol. 2, P.F. Fox, ed., Chapman & Hall, London. 1993, 111-136.

Grobet L, Martin LJ, Poncelet D, Pirottin D, Brouwers B, Riquet J, Schoeberlein A, Dunner S, Ménéssier F, Massabanda J, Fries R, Hanset R, Georges M. A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscling phenotype in cattle. *Nat Genet.* 1997 17(1), 71-74.

Groenewald M, Boekhout T, Neuvéglise C, Gaillardin C, van Dijck PWM, Wyss M. *Yarrowia lipolytica*: safety assessment of an oleaginous yeast with a great industrial potential. *Crit. Rev. Microbiol.* 2014 40, 187-206.

Grudzien-Nogalska E, Jiao X, Song MG, Hart RP, Kiledjian M. Nudt3 is an mRNA decapping enzyme that modulates cell migration. *RNA.* 2016 22(5), 773-781.

Guinee TP. Mould-ripened cheeses. In *Cheese: chemistry, physics and microbiology* (Fox PF, McSweeney PLH, Cogan TM, Guinee TD Eds). 2004 Vol1; 71-103. Academic press.

H

Han BZ, Kuijpers AF, Thanh NV, Nout MJ. Mucoraceous moulds involved in the commercial fermentation of Sufu Pehtze. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2004 85(3), 253-257.

Hasin N, Cusack SA, Ali SS, Fitzpatrick DA, Jones GW. Global transcript and phenotypic analysis of yeast cells expressing *Ssa1*, *Ssa2*, *Ssa3* or *Ssa4* as sole source of cytosolic Hsp70-Ssa chaperone activity. *BMC Genomics.* 2014 15, 194.

Henry SA, Kohlwein SD, Carman GM. Metabolism and regulation of glycerolipids in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 2012 190(2), 317-349.

Hermet A, Meheust D, Mounier J, Barbier G, Jany JL. Molecular systematics in the genus *Mucor* with special regards to species encountered in cheese. *Fungal Biol.* 2012 116, 692-705.

Hermet A. Caractérisation des communautés fongiques et étude des *Mucor* associés aux fromages. Thèse d'université soutenue le 5 février 2013 à l'Université de Bretagne Occidentale.

Hermet A, Mounier J, Keravec M, Vasseur V, Barbier G, Jany JL. Application of capillary electrophoresis single-stranded conformation polymorphism (CE-SSCP) analysis for identification of fungal communities in cheese. *Food Microbiol.* 2014 41, 82-90.

Hibbett DS, Binder M, Bischoff JF, *et al.* A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycol. Res.* 2007 111, 509–547.

Horio T, Oakley BR. The role of microtubules in rapid hyphal tip growth of *Aspergillus nidulans*. *Mol. Biol. Cell.* 2005 16(2), 918-926.

Hounsa CG, Brandt EV, Thevelein J, Hohmann S, Prior BA. Role of trehalose in survival of *Saccharomyces cerevisiae* under osmotic stress. *Microbiology*. 1998 144, 671-680.

Hottiger T, De Virgilio C, Hall MN, Boller T, Wiemken A. The role of trehalose synthesis for the acquisition of thermotolerance in yeast. II. Physiological concentrations of trehalose increase the thermal stability of proteins *in vitro*. *Eur. J. Biochem*. 1994 219(1-2), 187-193.

Hu X, Guo W, Chen S, Xu Y, Li P, Wang H, Chu H, Li J, DU Y, Chen X, Zhang G, Zhao G. Silencing of AP-4 inhibits proliferation, induces cell cycle arrest and promotes apoptosis in human lung cancer cells. *Oncol. Lett.* 2016 11(6), 3735-3742.

I

Ibáñez C, Pérez-Torrado R, Chiva R, Guillamón JM, Barrio E, Querol A. Comparative genomic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* yeasts isolated from fermentations of traditional beverages unveils different adaptive strategies. *Int J Food Microbiol*. 2014 171, 129-135.

Irlinger F, Layec S, Hélinck, Dugat-Bony E. Cheese rind microbial communities: diversity, composition and origin. *FEMS Microbiol. Lett.* 2015 362(2), 1-11.

J

Jackson FM, Michaelson L, Fraser TC, Stobart AK, Griffiths G. Biosynthesis of triacylglycerol in the filamentous fungus *Mucor circinelloides*. *Microbiology*. 1998 144, 2639-2645.

Jandal JM. Comparative aspects of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*. 1996 22, 177-185.

Jany JL, Barbier G. Culture-independent methods for identifying microbial communities in cheese. *Food Microbiol*. 2008 25(7), 839-848.

Jedrzejak MJ, Chander M, Setlow P, Krishnasamy G. Mechanism of catalysis of the cofactor-independent phosphoglycerate mutase from *Bacillus stearothermophilus* crystal structure of the complex with 2-phosphoglycerate. *Journal of Biological Chemistry*. 2000 275(30), 23146-23153.

Johnson M, Law BA. The origins, development and basic operations of cheesemaking technology. *Technology of Cheesemaking*. 1999, 1-32.

Jollivet N, Belin JM, Vayssier Y. Comparison of volatile flavor compounds produced by ten strains of *Penicillium camemberti*. *Thom. J. Dairy Sci*. 1993 76, 1837-1844.

Jones AL, Quimby BB, Hood JK, Ferrigno P, Keshava PH, Silver PA, Corbett AH. SAC3 may link nuclear protein export to cell cycle progression. *PNAS*. 2000 97(7), 3224-3229.

K

Katayama T, Tanaka Y, Okabe T, Nakamura H, Fujii W, Kitamoto K, Maruyama J. Development of a genome editing technique using the CRISPR/Cas9 system in the industrial filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *Biotechnol. Lett.* 2016 38(4), 637-642.

Katoh Y, Shiba Y, Mitsunashi H, Yanagida Y, Takatsu H, Nakayama K. Tollip and Tom1 form a complex and recruit ubiquitin-conjugated proteins onto early endosomes. *J. Biol. Chem*. 2004 279(23), 24435-24443.

Kaur H, Ganguli D, Bachhawat AK. Glutathione degradation by the alternative pathway (DUG pathway) in *Saccharomyces cerevisiae* is initiated by (Dug2p-Dug3p)₂ complex, a novel glutamine amidotransferase (GATase) enzyme acting on glutathione. *J. Biol. Chem*. 2012 287(12), 8920-8931.

Kempken F. Plasmid DNA in mycelial fungi. In : *Genetics and Biotechnology*. Springer Berlin Heidelberg. Kück U, ed. *The Mycota II*. 1995, 169-187.

Kim SK, Jin YS, Choi IG, Park YC, Seo JH. Enhanced tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* to multiple lignocellulose-derived inhibitors through modulation of spermidine contents. *Metab. Eng*. 2015 29, 46-55.

King R, Urban M, Hammond-Kosack MC, Hassani-Pak K, Hammond-Kosack KE. The completed genome sequence of the pathogenic ascomycete fungus *Fusarium graminearum*. *BMC Genomics*. 2015 16, 544.

Ko HC, Hsiao TY, Chen CT, Yang YL. *Candida albicans* ENO1 null mutants exhibit altered drug susceptibility, hyphal formation, and virulence. *J. Microbiol.* 2013 51(3), 345-351.

Kochetov GA, Solovjeva ON. Structure and functioning mechanism of transketolase. *Biochim. Biophys. Acta.* 2014 1844(9), 1608-1618.

Köhli M, Galati V, Boudier K, Roberson RW, Philippsen P. Growth-speed-correlated localization of exocyst and polarisome components in growth zones of *Ashbya gossypii* hyphal tips. *J. Cell Science.* 2008 121, 3878-3889.

Kornblatt MJ, Richard Albert J, Mattie S, Zakaib J, Dayanandan S, Hanic-Joyce PJ, Joyce PB. The *Saccharomyces cerevisiae* enolase-related regions encode proteins that are active enolases. *Yeast.* 2013 30(2), 55-69.

Kosalková K, Domínguez-Santos R, Coton M, Coton E, García-Estrada C, Liras P, Martín JF. A natural short pathway synthesizes roquefortine C but not meleagrín in three different *Penicillium roqueforti* strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2015 99(18), 7601-7612.

Krause SA, Xu H, Gray JV. The synthetic genetic network around PKC1 identifies novel modulators and components of protein kinase C signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot. Cell.* 2008 7(11), 1880-1887.

Kumánovics A, Chen OS, Li L, Bagley D, Adkins EM, Lin H, Dingra NN, Outten CE, Keller G, Winge D, Ward DM, Kaplan J. Identification of FRA1 and FRA2 as genes involved in regulating the yeast iron regulon in response to decreased mitochondrial iron-sulfur cluster synthesis. *J. Biol. Chem.* 2008 283(16), 10276-10286.

Kusch H, Biswas K, Schwanfelder S, Engelmann S, Rogers PD, Hecker M, Morschhäuser J. A proteomic approach to understanding the development of multidrug-resistant *Candida albicans* strains. *Mol. Genet. Genomics.* 2004 271(5), 554-565.

L

Lahouar A, Marin S, Crespo-Sempere A, Saïd S, Sanchis V. Effects of temperature, water activity and incubation time on fungal growth and aflatoxin B1 production by toxinogenic *Aspergillus flavus* isolates on sorghum seeds. *Rev. Argent. Microbiol.* 2016 48(1), 78-85.

Lanciotti R, Vannini L, Lopez CC, Gobbetti M, Guerzoni ME. Evaluation of the ability of *Yarrowia lipolytica* to impart strain-dependent characteristics to cheese when used as a ripening adjunct. *Int. J. Dairy Technol.* 2005 58, 89-99.

Larpin-Laborde S, Imran M, Bonaïti C, Bora N, Gelsomino R, Goerges S, Irlinger F, Goodfellow M, Ward AC, Vancanneyt M, Swings J, Scherer S, Guéguen M, Desmasures N. Surface microbial consortia from Livarot, a French smear-ripened cheese. *Can. J. Microbiol.* 2011 57, 651-660.

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

Larsen AG, Knechel S. Antimicrobial activity of food-related *Penicillium* sp. against pathogenic bacteria in laboratory media and a cheese model system. *J. Appl. Microbiol.* 1997 83(1), 111-119.

Larsen MD, Jensen KT. The effects of environmental conditions on the lipolytic activity of strains of *Penicillium roqueforti*. *Int. J. Food Microbiol.* 1999 46, 159-166.

Latgé JP. The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. *Mol Microbiol.* 2007 66(2), 279-290.

Lavoie K, Touchette M, St-Gelais D, Labrie S. Characterization of the fungal microflora in raw milk and specialty cheeses of the province of Quebec. *Dairy Sci. Technol.* 2012 92, 455-468.

Lazar SP, Lukaszewicz JM, Persad KA, Reinhardt. Rhinocerebral *Mucor circinelloides* infection in immunocompromised patient following yogurt ingestion. *Del. Med. J.* 2014 86, 245-248.

Le Bars-Bailly S, Bailly JD, Brugère H. Accidents de fabrication dus aux moisissures en fromagerie. *Rev. Med. Vet.* 1999 150, 413-430.

Leclercq-Perlat MN, Picque D, Martin Del Campo Barba ST, Monnet C. Dynamics of *Penicillium camemberti* growth quantified by real-time PCR on Camembert-type cheeses under different conditions of temperature and relative humidity. *J Dairy Sci.* 2013 96(6), 4031-4040.

Leclercq-Perlat MN, Corrieu G, Spinnier HE. Controlled production of Camembert-type cheeses: part III – Role of the ripening flora on free fatty acid concentrations. *J. Dairy Res.* 2007 74(0), 218-225.

Leclercq-Perlat MN, Latrille E, Corrieu G, Spinnier HE. Controlled production of Camembert-type cheeses. Part II. Changes in the concentration of the more volatile compounds. *J Dairy Res.* 2004 71(3), 355-366.

Lecoq K, Belloc I, Desgranges C, Daignan-Fornier B. Role of adenosine kinase in *Saccharomyces cerevisiae*: identification of the ADO1 gene and study of the mutant phenotypes. *Yeast.* 2001 8(4), 335-342.

Le Dréan G, Mounier J, Vasseur V, Arzur D, Habrylo O, Barbier G. Quantification of *Penicillium camemberti* and *P. roqueforti* mycelium by real-time PCR to assess their growth dynamics during ripening cheese. *Int. J. Food. Microbiol.* 2010 138, 100-107.

Lee SC, Heitman J. Sex in the Mucoralean fungi. *Mycoses.* 2014 57 Suppl 3, 18-24.

Lee SC, Billimyre RB, Li A, Carson S, Sykes SM, Huh EY, Mieczkowski P, Ko DC, Cuomo CA, Heitman J. Analysis of a food-borne fungal pathogen outbreak: virulence and genome of a *Mucor circinelloides* isolate from yogurt. *Mbio.* 2014, 5e01390-14.

Lee SC, Ni M, Li W, Shertz C, Heitman J. The evolution of sex: a perspective from the fungal kingdom. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2010 74(2), 298-340.

Les éditions des Journaux Officiels. Collecte de lait cru et fabrication de produits laitiers. Législation et réglementation – Guides de bonnes pratiques d'hygiène. Novembre 2012.

Lessard MH, Viel C, Boyle B, St-Gelais D, Labrie S. Metatranscriptome analysis of fungal strains *Penicillium camemberti* and *Geotrichum candidum* reveal cheese matrix breakdown and potential development of sensory properties of ripened Camembert-type cheese. *BMC genomics.* 2014 15, 235.

Lin T, Zhu G, Zhang J, Xu X, Yu Q, Zheng Z, Zhang Z, Lun Y, Li S, Wang X, Huang Z, Li J, Zhang C, Wang T, Zhang Y, Wang A, Zhang Y, Lin K, Li C, Xiong G, Xue Y, Mazzucato A, Causse M, Fei Z, Giovannoni JJ, Chetelat RT, Zamir D, Städler T, Li J, Ye Z, Du Y, Huang S. Genomic analyses provide insights into the history of tomato breeding. *Nat. Genet.* 2014 46(11), 1220-1126.

Lin SJ, Guarente L. Nicotinamide adenine dinucleotide, a metabolic regulator of transcription, longevity and disease. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 2003 15(2), 241-246.

Lin SJ, Defossez PA, Guarente L. Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science.* 2000 289(5487), 2126-2128.

Linné C. (1753). *Species Plantarum*. Tomus I. <http://www.botanicus.org/title/b12069590>.

Liu Y, Li T, Xu Y, Xu E, Zhou M, Wang B, Shen J. Effects of TLR4 gene silencing on the proliferation and apoptosis of hepatocarcinoma HEPG2 cells. *Oncol. Lett.* 2016 11(5), 3054-3060.

Lopez del Castillo-Lozano M. Production d'arômes soufrés par les flores d'affinage: catabolisme de la l-cysteine. 2007. AgroParisTech.

Lu SP, Lin SJ. Regulation of yeast sirtuins by NAD(+) metabolism and calorie restriction. *Biochim. Biophys. Acta.* 2010 1804(8), 1567-1575.

Luo PC, Li H, Wang SG. Effect of arbuscular mycorrhiza (AM) on tolerance of Cattail to Cd stress in aquatic environment. *Huan Jing Ke Xue.* 2016 37(2), 750-755.

M

Ma L, Chen Z, Huang da W, Kutty G, Ishihara M, Wang H, Abouelleil A, Bishop L, Davey E, Deng R, Deng X, Fan L, Fantoni G, Fitzgerald M, Gogineni E, Goldberg JM, Handley G, Hu X, Huber C, Jiao X, Jones K, Levin JZ, Liu Y, Macdonald P, Melnikov A, Raley C, Sassi M, Sherman BT, Song X, Sykes S, Tran B, Walsh L, Xia Y, Yang J, Young S, Zeng Q, Zheng X, Stephens R, Nusbaum C, Birren BW, Azadi P, Lempicki RA, Cuomo CA, Kovacs JA. Genome analysis of three *Pneumocystis* species reveals adaptation mechanisms to life exclusively in mammalian hosts. *Nat. Commun.* 2016 7, 10740.

Makarova K, Slesarev A, Wolf Y, Sorokin A, Mirkin B, Koonin E, Pavlov A, Pavlova N, Karamychev V, Polouchine N, *et al.* 2006. Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proc Natl Acad Sci.* 2006 103, 15611-15616.

Manocha MS, Colvin JR. Structure and composition of the cell wall of *Neurospora crassa*. J Bacteriol. 1967 94(1), 202-212.

Mansour S, Beckerich JM, Bonnarme P. Lactate and amino acid catabolism in the cheese-ripening yeast *Yarrowia lipolytica*. Appl. Environ. Microbiol. 2008 74(21), 6505-6512.

Mansour S, Bailly J, Delettre J, Bonnarme P. A proteomic and transcriptomic view of amino acids catabolism in the yeast *Yarrowia lipolytica*. Proteomics. 2009 9(20), 4714-4725.

Marín P, Palmero D, Jurado M. Effect of solute and matric potential on growth rate of fungal species isolated from cheese. Int. Dairy J. 2014 36, 89-94.

Marsit S, Mena A, Bigey F, Sauvage FX, Couloux A, Guy J, Legras JL, Barrio E, Dequin S, Galeote V. Evolutionary advantage conferred by an eukaryote-to-eukaryote gene transfer event in wine yeasts. Mol. Biol. Evol. 2015 32(7), 1695-1707.

Marsit S, Sanchez I, Galeote V, Dequin S. Horizontally acquired oligopeptide transporters favour adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast to oenological environment. Environ Microbiol. 2016 18(4), 1148-1161.

Martins I, Hartmann DO, Alves PC, Martins C, Garcia H, Leclercq CC, Ferreira R, He J, Renaut J, Becker JD, Silva Pereira C. Elucidating how the saprophytic fungus *Aspergillus nidulans* uses the plant polyester suberin as carbon source. BMC Genomics. 2014 15, 613.

Martin N, Berger C, Spinnler HE. Sensory and instrumental flavor analyses of cheese curd cocultured with selected yeast and bacteria. J. Sens. Stud. 2002 17, 1-17.

Martínez-Cuesta Mdel C, Peláez C, Requena T. Methionine metabolism: major pathways and enzymes involved and strategies for control and diversification of volatile sulfur compounds in cheese. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 2013 53(4), 366-385.

Medhammar E, Wijesinha-Bettoni R, Stadlmayr B, Nilsson E, Charrondiere UR, Burlingame B. Composition of milk from minor dairy animals and buffalo breeds: a biodiversity perspective. J. Sci. Food Agric. 2012 92(3), 445-474.

Menassa A, Lamberet G. Contribution à l'étude du système lipolytique de *Penicillium roqueforti*. Caractères comparés de deux activités exocellulaires. Le Lait. 1982 62(611-612), 32-43.

Mierau I, Kunji ER, Leenhouts KJ, Hellendoorn MA, Haandrikman AJ, Poolman B, Konings WN, Venema G, Kok J. Multiple-peptidase mutants of *Lactococcus lactis* are severely impaired in their ability to grow in milk. J. Bacteriol. 1996 178(10), 2794-2803.

Moen T, Torgersen J, Santi N, Davidson WS, Baranski M, Ødegård J, Isdal E. Epithelial cadherin determines resistance to infectious pancreatic necrosis virus in atlantic salmon. Genetics. 2015 200(4), 1313-1326.

Molimard P, Lesschaeve I, Bouvier J, Vassal L, Schlich P, Issanchou S, Spinnler HE. Amertume et fractions azotées de fromages à pâte molle de type Camembert: rôle de l'association de *Penicillium camemberti* avec *Geotrichum candidum*. Lait. 1994 74, 361-374.

Molimard P, Spinnler HE. Review: compounds involved in the flavor of surface mold-ripened cheeses: origins and properties. J. Dairy Sci. 1996 79, 169-184.

Monnet C, Loux V, Gibrat JF, Spinnler E, Barbe V, Vacherie B, Gavory F, Gourbeyre E, Siguier P, Chandler M, Elleuch R, Irlinger F, Vallaey T. The *Arthrobacter arilaitensis* Re117 genome sequence reveals its genetic adaptation to the surface of cheese. PLoS One. 2010 5(11).

Monnet C, Straub C, Castellote J, et al. Quantification of yeast and bacterial gene transcripts in retail cheeses by reverse transcription-quantitative PCR. Appl. Environ. Microb. 2013 79, 469-477.

Montel MC, Buchin S, Mallet A, Delbes-Paus C, Vuitton DA, Desmasures N, Berthier F. Traditional cheeses: Rich and diverse microbiota with associated benefits. Int. J. Food Microbiol. 2014 177, 136-154.

Montagna MT, Santacroce MP, Spilotros G, Napoli C, Minervini F, Papa A, Dragoni I. Investigation of fungal contamination in sheep and goat cheeses in southern Italy. Mycopathologia. 2004 158(2), 245-249.

Morin-Sardin S, Rigalma K, Coroller L, Jany JL, Coton E. Effect of temperature, pH, and water activity on *Mucor* spp. growth on synthetic medium, cheese analog and cheese. Food Microbiol. 2016 56, 69-79.

Mounier J, Rea MC, O'Connor PM, Fitzgerald GF, Cogan TM. Growth characteristics of *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Microbacterium*, and *Staphylococcus* spp. isolated from surface-ripened cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007 73(23), 7732-7739.

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

Moya-Alvarado G, Gershoni-Emek N, Perlson E, Bronfman FC. Neurodegeneration and Alzheimer's disease (AD). What Can Proteomics Tell Us About the Alzheimer's Brain? *Mol. Cell. Proteomics.* 2016 15(2), 409-425.

Muthukumar G, Suhng SH, Magee PT, Jewell RD, Primerano DA. The *Saccharomyces cerevisiae* SPR1 gene encodes a sporulation-specific exo-1,3-beta-glucanase which contributes to ascospore thermoresistance. *J. Bacteriol.* 1993 175(2), 386-394.

N

Nagaoka K, Yamada Y, Koaze Y. Studies on *Mucor* Lipases, *Agricultural and Biological Chemistry.* 1969 33:3, 299-305.

Naz S, Gueguen-Minerbe M, Cretenet M, Vernoux JP. Aromatic amino acids as precursors of antimicrobial metabolites in *Geotrichum candidum*. *FEMS Microbiol. Lett.* 2013 344, 39-47.

Nebert DW, Vasiliou V. Analysis of the glutathione S-transferase (GST) gene family. *Human genomics.* 2004 1(6), 1.

Nicolás FE, Vila A, Moxon S, Cascales MD, Torres-Martínez S, Ruiz-Vázquez RM, Garre V. The RNAi machinery controls distinct responses to environmental signals in the basal fungus *Mucor circinelloides*. *BMC Genomics.* 2015 16, 237.

Nielsen MS, Frisvad JC, Nielsen PV. Protection by fungal starters against growth and secondary metabolite production of fungal spoilers of cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 1998 42: 91-99.

Nishimata H, Ohara-Nemoto Y, Baba TT, Hoshino T, Fujiwara T, Shimoyama Y, Nemoto TK. Identification of Dipeptidyl-Peptidase (DPP) 5 and DPP7 in *Porphyromonas endodontalis*, distinct from those in *Porphyromonas gingivalis*. *PloS One.* 2014 9(12).

Nishimoto T, Furuta M, Kataoka M, Kishida M. Important role of catalase in the cellular response of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* exposed to ionizing radiation. *Curr. Microbiol.* 2015 70(3), 404-407.

Niu X, Damsz B, Kononowicz AK, Bressan RA, Hasegawa PM. NaCl-induced alterations in both cell structure and tissue-specific plasma membrane H⁺-ATPase gene expression. *Plant Physiol.* 1996 111, 679-686.

Nørdvig CS, Nielsen JB, Kogle ME, Mortensen UH. A CRISPR-Cas9 system for genetic engineering of filamentous fungi. *PLoS One.* 2015 10(7).

Novo M, Bigey F, Beyne E, Galeote V, Gavory F, Mallet S, Cambon B, Legras JL, Wincker P, Casaregola S, Dequin S. Eukaryote-to-eukaryote gene transfer events revealed by the genome sequence of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae* EC1118. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009 106, 16333-16338.

O

Odat O, Matta S, Khalil H, Kampranis SC, Pfau R, Tschlis PN, Makris AM. Old yellow enzymes, highly homologous FMN oxidoreductases with modulating roles in oxidative stress and programmed cell death in yeast. *J. Biol. Chem.* 2007 282(49), 36010-36023.

Ogasawara W, Kobayashi G, Okada H, & Morikawa Y. Two types of novel dipeptidyl aminopeptidases from *Pseudomonas* sp. strain WO24. *J. Bacteriol.* 1996 178(21), 6288-6295.

O'Doherty PJ, Lyons V, Higgins VJ, Rogers PJ, Bailey TD, Wu MJ. Transcriptomic insights into the molecular response of *Saccharomyces cerevisiae* to linoleic acid hydroperoxide. *Free Radic. Res.* 2013 47(12), 1054-1065.

Ono B, Tanaka K, Naito K, Heike C, Shinoda S, Yamamoto S, Ohmori S, Oshima T, Toh-e A. Cloning and characterization of the CYS3 (CY11) gene of *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol. 1992 174(10), 3339-3347.

P

Papp T, Nagy G, Csernetics A, Szekeres A, Vagvölgyi C. Beta-carotene production by mucoralean fungi. Ann. Faculty Engg. Hunedoara. 2009 4, 173-176.

Paolinelli-Alfonso M, Galindo-Sánchez CE, Hernandez-Martinez R. Quantitative real-time PCR normalization for gene expression studies in the plant pathogenic fungi *Lasiodiplodia theobromae*. J. Microbiol. Methods. 2016 127, 82-88.

Pelham HR. SNAREs and the secretory pathway-lessons from yeast. Exp Cell Res. 1999 247(1), 1-8.

Pennisi E. A lichen ménage à trois. Science. 2016 353(6297), 337-337.

Pfeiffer A, Stephanowitz H, Krause E, Volkwein C, Hirsch C, Jarosch E, Sommer T. A Complex of Htm1 and the oxidoreductase Pdi1 accelerates degradation of misfolded glycoproteins. J. Biol. Chem. 2016 291(23), 12195-12207.

Pichereaux C, Hernández-Domínguez EE, Santos-Díaz MD, Reyes-Agüero A, Astello-García M, Guéraud F, Negre-Salvayre A, Schiltz O, Rossignol M, Barba de la Rosa AP. Comparative shotgun proteomic analysis of wild and domesticated *Opuntia* spp. species shows a metabolic adaptation through domestication. J. Proteomics. 2016. In press.

Pinon A, Zwietering M, Perrier L, Membré JM, Leporq B, Mettler E, Thuault D, Coroller L, Stahl V, Vialette M. Development and validation of experimental protocols for use of cardinal models for prediction of microorganism growth in food products. Appl. Environ. Microbiol. 2004 70(2), 1081-1087.

Pitt JL, Hocking AD. Fungi and food spoilage. Springer Science Third Edition. 2009, pp. 1-503.

Polineni P, Aragonda P, Xavier SR, Furuta R, Adelson DL. The bovine QTL viewer: a web accessible database of bovine Quantitative Trait Loci. BMC Bioinformatics. 2006 7, 283.

Pose G, Patriarca A, Kyanko V, Pardo A, Fernández Pinto V. Effect of water activity and temperature on growth of *Alternaria alternata* on a synthetic tomato medium. Int. J. Food Microbiol. 2009 135(1), 60-63.

Pretorius IS, Lambrechts MG, Marmur J. The glucoamylase multigene family in *Saccharomyces cerevisiae* var. *diastaticus*: an overview. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 1991 26(1), 53-76.

Prista C, Almagro A, Loureiro-Dias MC, Ramos J. Physiological basis for the high salt tolerance of *Debaryomyces hansenii*. Appl. Environ. Microbiol. 1997 63, 4005-4009.

Q

Quigley L, O'Sullivan O, Stanton C, Beresford TP, Ross RP, Fitzgerald GF, Cotter PD. The complex microbiota of raw milk. FEMS Microbiol. Rev. 2013 37, 664-698.

R

Rakwalska M, Rospert S. The ribosome-bound chaperones RAC and Ssb1/2p are required for accurate translation in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell Biol. 2004 24(20), 9186-9197.

Ray P, Craven KD. *Sebacina vermifera*: a unique root symbiont with vast agronomic potential. World J. Microbiol. Biotechnol. 2016 32(1), 16.

Read ND, Kalkman ER. Does endocytosis occur in fungal hyphae? Fungal Genet. Biol. 2003 39(3), 199-203.

Rengel Z. The role of calcium in salt toxicity. Plant Cell Env. 1992 15, 625-632.

Ritter B, Philie J, Girard M, Tung EC, Blondeau F, McPherson PS. Identification of a family of endocytic proteins that define a new alpha-adaptin ear-binding motif. EMBO Rep. 2003 4(11), 1089-1095.

Rola B, Pawlik A, Frąc M, Małek W, Targoński Z, Rogalski J, Janusz G. The phenotypic and genomic diversity of *Aspergillus* strains producing glucose dehydrogenase. *Acta Biochim. Pol.* 2015 62(4), 747-755.

Romano P, Ricciardi A, Salzano G, Suzzi G. Yeasts from Water Buffalo Mozzarella, a traditional cheese of the Mediterranean area. *Int. J. Food Microbiol.* 2001 69(1-2), 45-51.

Ronda C, Maury J, Jakočiunas T, Jacobsen SA, Germann SM, Harrison SJ, Borodina I, Keasling JD, Jensen MK, Nielsen AT. CrEdit: CRISPR mediated multi-loci gene integration in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb. Cell Fact.* 2015 14, 97.

Ronez F. Exploration fonctionnelle et valorisation industrielle de la protéine de choc thermique bactérienne Lo18. Thèse d'université. Soutenue le 24-04-2012 dans le cadre de l'École doctorale Environnements-Santé (Dijon).

Ropars J, Cruaud C, Lacoste S, Dupont J. A taxonomic and ecological overview of cheese fungi. *Int. J. Food Microbiol.* 2012 155, 199-210.

Ropars J, Rodríguez de la Vega RC, López-Villavicencio M, Gouzy J, Sallet E, Dumas E, Lacoste S, Debuchy R, Dupont J, Branca A, Giraud T. Adaptive Horizontal gene transfers between multiple cheese-associated fungi. *Curr. Biol.* 2015 25(19), 2562-2569.

Rosenberg M, Altemueller A. Accumulation of free L-glutamic acid in full- and reduced-fat Cheddar cheese ripened at different time/temperature conditions. *LWT-Food Sci. Technol.* 2001 34, 279-287.

Rosso L. Convenient model to describe the combined effects of temperature and pH on microbial growth. *Appl. Environ. Microbiol.* 1995 61, 610-616.

Rosso L, Lobry JR, Flandrois JP. An unexpected correlation between cardinal temperatures of microbial growth highlighted by a new model. *J. Theor. Biol.* 1993 162, 447-463.

Ruiz-Vázquez RM, Nicolás FE, Torres-Martínez S, Garre V. Distinct RNAi pathways in the regulation of physiology and development in the fungus *Mucor circinelloides*. *Adv. Genet.* 2015 91, 55-102.

RuYong Z, Hong J. *Rhizomucor endophyticus* sp. Nov., an endophytic zygomycetes from higher plants. *Mycotaxon.* 1995 56, 455-466.

S

Sacristán N, Mayo B, Fernández E, Fresno JM, Tornadijo ME, Castro JM. Molecular study of *Geotrichum* strains isolated from Armada cheese. *Food Microbiol.* 2013 36(2), 481-487.

Schaaff-Gerstenschläger I, Zimmermann FK. Pentose-phosphate pathway in *Saccharomyces cerevisiae*: analysis of deletion mutants for transketolase, transaldolase, and glucose 6-phosphate dehydrogenase. *Curr. Genet.* 1993 24(5), 373-376.

Schachtschabel D, Arentshorst M, Lagendijk EL, Ram AF. Vacuolar H(+)-ATPase plays a key role in cell wall biosynthesis of *Aspergillus niger*. *Fungal Genet. Biol.* 2012 49(4), 284-293.

Sharma R, Chisti Y, Banerjee, UC. Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotech. Adv.* 2001 19, 627-662.

Schimek C, Kleppe K, Saleem AR, Voigt K, Burmester A, Wöstemeyer J. Sexual reactions in *Mortierellales* are mediated by the trisporic acid system. *Mycol. Res.* 2003 107(Pt 6), 736-747.

Schlenstedt G, Saavedra C, Loeb JD, Cole CN, Silver PA. The GTP-bound form of the yeast Ran/TC4 homologue blocks nuclear protein import and appearance of poly(A)⁺ RNA in the cytoplasm. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1995 92(1), 225-229.

Schmidt JL, Lenoir J. Contribution à l'étude de la flore levure du fromage de camembert. *Lait* 1980 60, 272-282.

Schmidt JL, Rouger C, Diez M, Lenoir J. Activités biochimiques de levures du genre *Candida* isolés de fromages de chèvre. *Microbiol. Aliment. Nutr.* 1993 11, 165-182.

Schornteiner E, Mann E, Bereuter O, Wagner M, Schmitz-Esser S. Cultivation-independent analysis of microbial communities on Austrian raw milk hard cheese rinds. *Int. J. Food Microbiol.* 2014 180, 88-97.

Semkiv MV, Dmytruk KV, Abbas CA, Sibirny AA. Increased ethanol accumulation from glucose via reduction of ATP level in a recombinant strain of *Saccharomyces cerevisiae* overexpressing alkaline phosphatase. *BMC Biotechnol.* 2014 14, 42.

Shen M, Zhao DK, Qiao Q, Liu L, Wang JL, Cao GH, Li T, Zhao ZW. Identification of glutathione S-transferase (GST) genes from a dark septate endophytic fungus (*Exophiala pisciphila*) and their expression patterns under varied metals stress. *PLoS One.* 2015 10(4).

Sidhu SS, Kalmar GB, Willis LG, Borgford TJ. *Streptomyces griseus* protease C. A novel enzyme of the chymotrypsin superfamily. *J. Biol. Chem.* 1994 269(31), 20167-20171.

Sierro N, Battey JN, Ouadi S, Bakaher N, Bovet L, Willig A, Goepfert S, Peitsch MC, Ivanov NV. The tobacco genome sequence and its comparison with those of tomato and potato. *Nat. Commun.* 2014 5, 3833.

Siezen RJ, Renckens B, van Swam I, Peters S, van Kranenburg R, Kleerebezem M, de Vos WM. Sequences of four plasmids of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK11 reveal extensive adaptation to the dairy environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005 71, 8371-8382.

Sørensen LM, Gori K, Petersen MA, Jespersen L, Arneborg N. Flavour compound production by *Yarrowia lipolytica*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Debaryomyces hansenii* in a cheese-surface model. *Int. Dairy J.* 2011 21(12), 970-978.

Sourabié AM, Spinnler HE, Bonnarme P, Saint-Eve A, Landaud S. Identification of a powerful aroma compound in munster and camembert cheeses: ethyl 3-mercaptopropionate. *J. Agric. Food Chem.* 2008 56, 4674-4680.

Sousa MJ, Ardö Y, McSweeney PLH. Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. *Int. Dairy J.* 2001 11, 327-345.

Spinnler HE, Gripon JC. Surface mould-ripened cheese. In *Cheese: chemistry, physics and microbiology* (Fox PF, McSweeney PLH, Cogan TM, Guinee TD Eds). 2004 Vol2; 157-174. Academic press.

Sriranganadane D. Comparison of proteolytic system secreted in dermatophytes and '*Aspergillus fumigatus*', used as a reference (Doctoral dissertation, Université de Neuchâtel). 2011.

Stambuk BU, Dunn B, Alves SL Jr, Duval EH, Sherlock G. Industrial fuel ethanol yeasts contain adaptive copy number changes in genes involved in vitamin B1 and B6 biosynthesis. *Genome Res.* 2009 19(12), 2271-2278.

Summerscales J, Dawson JF. Probing Dictyostelium severin structure and function by cross linking to actin. *Biochem. Cell Biol.* 2004 82(2), 343-350.

Šuranská H, Raspor P, Uroić K, Golić N, Kos B, Mihajlović S, Begović J, Šušković J, Topisirović L, Čadež N. Characterisation of the yeast and mould biota in traditional white pickled cheeses by culture-dependent and independent molecular techniques. *Folia Microbiol (Praha)*. 2016 In press.

T

Tabla R, Gómez A, Rebollo JE, Roa I. Salt influence on surface microorganisms and ripening of soft ewe cheese. *J. Dairy Res.* 2015 82(2), 215-221.

Taheri-Talesh N, Horio T, Araujo-Bazán L, Dou X, Espeso EA, Peñalva MA, Osmani SA, Oakley BR. The Tip Growth Apparatus of *Aspergillus nidulans*. *Mol. Biol. Cell.* 2008 19(4), 1439-1449.

Takeuchi Y, Schmid J, Caldwell JH, Harold FM. Transcellular ion currents and extension of *Neurospora crassa* hyphae. *J. Membr. Biol.* 1988 101(1), 33-41.

Tang X, Zhao L, Chen H, Chen YQ, Chen W, Song Y, Ratledge C. Complete genome sequence of a high lipid-producing strain of *Mucor circinelloides* WJ11 and comparative genome analysis with a low lipid-producing strain CBS 277.49. *PLoS One.* 2015 10(9).

Tang X, Zan X, Zhao L, Chen H, Chen YQ, Chen W, Song Y, Ratledge C. Proteomics analysis of high lipid-producing strain *Mucor circinelloides* WJ11: an explanation for the mechanism of lipid accumulation at the proteomic level. *Microb. Cell. Fact.* 2016 15, 35.

Taylor K, Wick C, Castada H, Kent K, Harper WJ. Discrimination of Swiss cheese from 5 different factories by high impact volatile organic compound profiles determined by odor activity

value using selected ion flow tube mass spectrometry and odor threshold. *J. Food Sci.* 2013 78, 1509-1515.

Terrer C, Vicca S, Hungate BA, Phillips RP, Prentice IC. Mycorrhizal association as a primary control of the CO₂ fertilization effect. *Science.* 2016 353(6294), 72-74.

Torres-Martínez S, Ruiz-Vázquez RM. RNAi pathways in *Mucor*: A tale of proteins, small RNAs and functional diversity. *Fungal Genet. Biol.* 2016 90, 44-52.

Tsai PW, Chien CY, Yeh YC, Tung L, Chen HF, Chang TH, Lan CY. *Candida albicans* Hom6 is a homoserine dehydrogenase involved in protein synthesis and cell adhesion. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 2016. In press.

Tytgat HL, Douillard FP, Laine PK, Paulin L, Willems RJ, de Vos WM. Complete genome sequence of *Enterococcus faecium* Commensal Isolate E1002. *Genome Announc.* 2016 4(2).

U

Ulker S, Karaoğlu SA. Purification and characterization of an extracellular lipase from *Mucor hiemalis* f. *corticola* isolated from soil. *J. Biosci. Bioeng.* 2012 114(4), 385-390.

Upadhyaya VK, McSweeney PLH, Magboul AAA, Fox PF. Proteoin cheese during ripening. In *Cheese: chemistry, physics and microbiology* (Fox PF, McSweeney PLH, Cogan TM, Guinee TD Eds). 2004 Vol1; 391-443. Academic press.

Uyar EO, Hamamci H, Türkel S. Effect of different stresses on trehalose levels in *Rhizopus oryzae*. *J. Basic Microbiol.* 2010 50(4), 368-372.

V

Van der Heijden MG, Martin FM, Selosse MA, Sanders IR. Mycorrhizal ecology and evolution: the past, the present, and the future. *New Phytol.* 2015 205(4), 1406-1423.

Verdín J, Bartnicki-Garcia S, Riquelme M. Functional stratification of the Spitzenkörper of *Neurospora crassa*. *Mol. Microbiol.* 2009 74(5), 1044-1053.

Vannini L, Baldi D, Lanciotti R. Use of Fourier transform infrared spectroscopy to evaluate the proteolytic activity of *Yarrowia lipolytica* and its contribution to cheese ripening. *Int. J. Food Microbiol.* 2001 69, 113-123.

Vilella F, Herrero E, Torres J, de la Torre-Ruiz MA. Pkc1 and the upstream elements of the cell integrity pathway in *Saccharomyces cerevisiae*, Rom2 and Mtl1, are required for cellular responses to oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 2005 280(10), 9149-9159.

Villalobos-Escobedo JM, Herrera-Estrella A, Carreras-Villaseñor N. The interaction of fungi with the environment orchestrated by RNAi. *Mycologia.* 2016 108(3), 556-571.

W

Walther G, Pawlowska J, Alastruey-Izquierdo A, Wrzosek M, Rodriguez-Tudela JL, Dolatabadi S, Chakrabarti A, de Hoog GS. DNA barcoding in Mucorales: an inventory of biodiversity. *Persoonia – Mol. Phylogeny Evol. Fungi.* 2013 30, 11-47.

Wang T, Liu NS, Seet LF, Hong W. The emerging role of VHS domain-containing Tom1, Tom1L1 and Tom1L2 in membrane trafficking. *Traffic.* 2010 11(9), 1119-1128.

Werner-Washburne M, Becker J, Kosic-Smithers J, Craig EA. Yeast Hsp70 RNA levels vary in response to the physiological status of the cell. *J. Bacteriol.* 1989 171(5), 2680-2688.

Wheatley RW, Ng KK, Kapoor M. Fungal cobalamin-independent methionine synthase: Insights from the model organism, *Neurospora crassa*. *Arch. Biochem. Biophys.* 2016 590, 125-137.

Whittaker R. New concepts of kingdoms of organisms. *Science* 1969 163, 150-160.

Wiemken A. Trehalose in yeast, stress protectant rather than reserve carbohydrate. *Antonie van Leeuwenhoek.* 1990 58, 209-217.

Woese CR, Kandler O, Wheelis ML. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1990 87, 4576-4579.

Wolfe BE, Button JE, Santarelli M, Dutton RJ. Cheese rind communities provide tractable systems for *in situ* and *in vitro* studies of microbial diversity. *Cell* 2014 158, 422-433.

X

Xia D, Tang WK, Ye Y. Structure and function of the AAA+ ATPase p97/Cdc48p. *Gene*. 2016 583(1), 64-77.

Xu H, Andi B, Qian J, West AH, Cook PF. The alpha-aminoadipate pathway for lysine biosynthesis in fungi. *Cell. Biochem. Biophys.* 2006 46(1), 43-64.

Y

Yi DG, Huh WK. UDP-glucose pyrophosphorylase Ugp1 is involved in oxidative stress response and long-term survival during stationary phase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2015 467(4), 657-663.

You L, Simmons DR, Bateman CC, Short DP, Kasson MT, Rabaglia RJ, Hulcr J. New fungus-insect symbiosis: culturing, molecular, and histological methods determine saprophytic polyporales mutualists of *Ambrosiodmus ambrosia* Beetles. *PLoS One*. 2015 10(9).

Yuga M, Gomi K, Klionsky DJ, Shintani T. Aspartyl aminopeptidase is imported from the cytoplasm to the vacuole by selective autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 2011 286(15), 13704-13713.

Z

Zgombić-Knight M, Foglio MH, Duester G. Genomic structure and expression of the ADH7 gene encoding human class IV alcohol dehydrogenase, the form most efficient for retinol metabolism *in vitro*. *J. Biol. Chem.* 1995 270(9), 4305-4311.

Zhang J Yang H, Yu Q, Wu M, Yang L, Zhuang WY, Chen W, Li GQ. *Botrytis pyriformis* sp. nov., a novel and likely saprophytic species of *Botrytis*. *Mycologia*. 2016 15, 340.

Zhang N, Zhao XH. Study of *Mucor* spp. in semi-hard cheese ripening. *J. Food Sci. Technol.* 2010 47(6), 613-619.

Zhang C, Meng X, Wei X, Lu L. Highly efficient CRISPR mutagenesis by microhomology-mediated end joining in *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genet. Biol.* 2016 86, 47-57.

Zhao L, Pang Q, Xie J, Pei J, Wang F, Fan S. Enzymatic properties of *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* β -glucosidase fused to *Clostridium cellulovorans* cellulose binding domain and its application in hydrolysis of microcrystalline cellulose. *BMC biotechnology*. 2013 13(1), 1.

Zimmer A, Durand C, Loira N, Durrens P, Sherman DJ, Marullo P. QTL dissection of Lag phase in wine fermentation reveals a new translocation responsible for *Saccharomyces cerevisiae* adaptation to sulfite. *PLoS One*. 2014 29(1).

Zinser E, Sperka-Gottlieb CD, Fasch EV, Kohlwein SD, Paltauf F, Daum G. Phospholipid synthesis and lipid composition of subcellular membranes in the unicellular eukaryote *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 1991 173(6), 2026-2034.

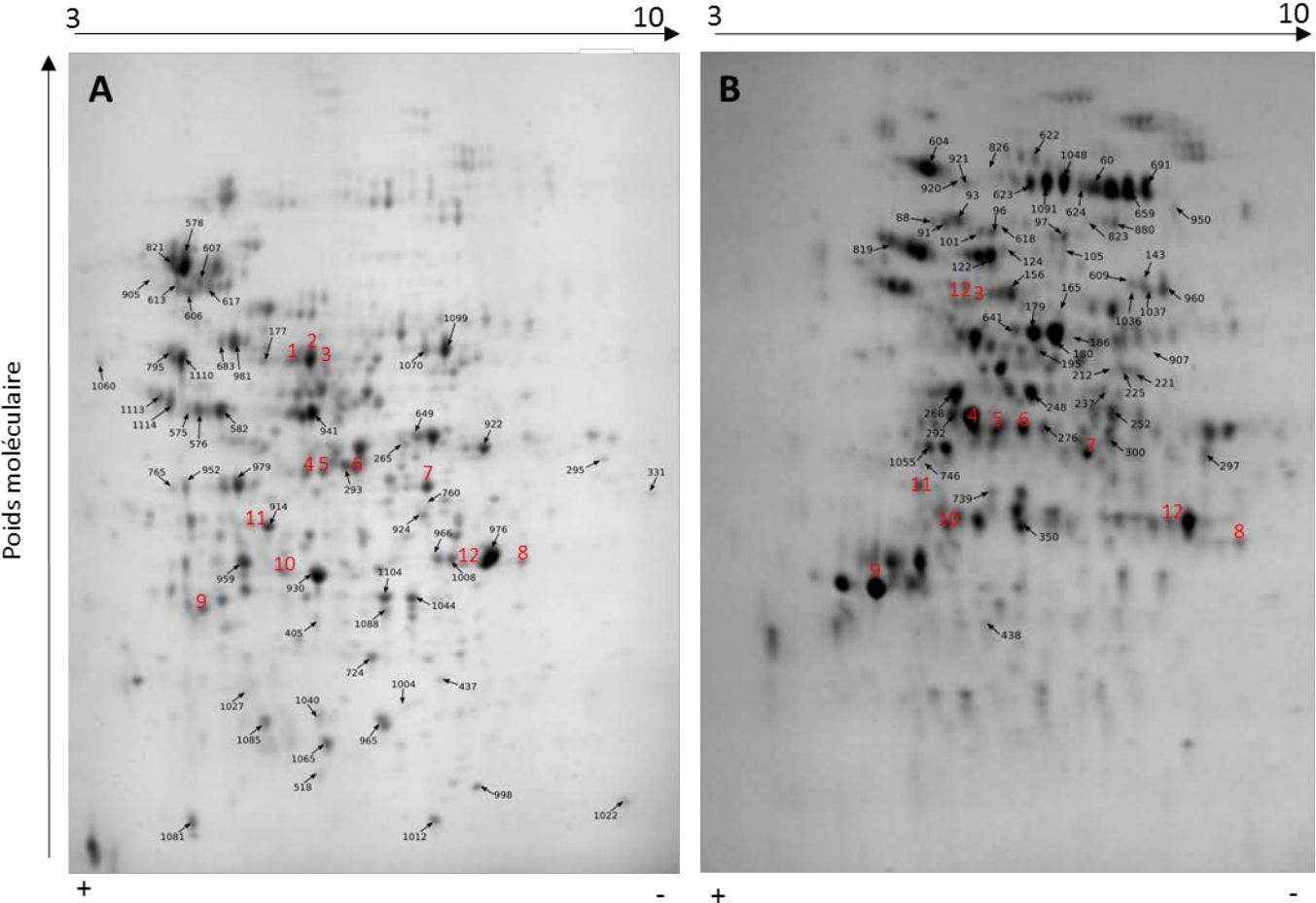
ANNEXES

<p>Annexe 1 : Liste et identification des spots témoins utilisés pour l'étude protéomique inter-spécifique</p>

A. Correspondance entre les 12 spots protéiques utilisés comme témoins pour *Mucor lanceolatus* UBOCC-A-109153 et *Mucor circinelloides* CBS 277-49 sur milieu CA. Les lignes en gras correspondent aux protéines dont l'identification est identique pour les deux souches (7 spots sur les 12).

spot_id	Accession	Blast accession	Blast description	Homology <i>S. cerevisiae</i>	Score	Mass	Coverage	#peptides
<i>M. lanceolatus</i>								
C1	jgi Mucci2 129510 gw1.04.1565.1	gi 74581921 sp O13907.1	ACL2_SCHPO: Probable ATP-citrate synthase subunit 2	X	105,57	53192,81	3,93	3
C2	contig_1854	gi 3334226 sp Q27203.1	HPPD_TETTH: 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase; 4-hydroxyphenylpyruvic	X	206,53	560543,32	0,86	4
C3	jgi Mucci2 116185 Genemark1.11948_g	gi 119779 sp P25093.1	FAAA_RAT: Fumarylacetoacetase (FAA; Beta-diketonase)	X	139,74	46962,94	13,85	4
C4	contig_8906	gi 74858798 sp Q55DV9.1	CGL_DICDI: Cystathionine gamma-lyase; Gamma-cystathionase	CYS3	566,83	169657,65	8,69	8
C5	contig_62	gi 75075872 sp Q4R502.1	IDHP_MACFA: Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial	IDP2	377,67	408182,22	2,59	9
C6	jgi Mucci2 104071 Mucci1.FSI_estExt_fg	gi 30580445 sp Q96UF1.1	G3P3_MUCCL: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 3 (GAPDH)	TDH3	169,26	36154,62	10,67	3
C7	jgi Mucci2 107041 Genemark1.2804_g	gi 12229635 sp O60037.1	6PGD_CUNEL: 6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	GND2	262,72	52725,60	10,86	4
C8	jgi Mucci2 112170 Genemark1.7933_g	gi 74670431 sp Q4WLN1.1	ACON_ASPFU: Aconitate hydratase, mitochondrial; Aconitase	ACO1	65,65	85366,14	4,25	3
C9	jgi Mucci2 114955 Genemark1.10718_g	gi 121805180 sp Q2UPZ7.1	DNPEP_ASPOR: Aspartyl aminopeptidase (DAP)	APE4	58,71	52488,05	4,40	2
C10	jgi Mucci2 108959 Genemark1.4722_g	gi 44888975 sp P53444.2	ALF_NEUCR: Fructose-bisphosphate aldolase; FBP aldolase	FBA1	394,91	39348,54	18,77	5
C11	jgi Mucci2 107314 Genemark1.3077_g	gi 68565909 sp Q8L831.1	NUDT3_ARATH: Nudix hydrolase 3 (AtNUDT3)	X	181,46	60078,67	7,69	5
C12	jgi Mucci2 115965 Genemark1.11728_g	gi 152032428 sp A5DI11.1	EF2_PICGU: Elongation factor 2 (EF-2)	EFT1	79,17	94522,12	3,14	3
<i>M. circinelloides</i>								
C1	jgi Mucci2 129510 gw1.04.1565.1	gi 74581921 sp O13907.1	ACL2_SCHPO: Probable ATP-citrate synthase subunit 2	x	108,74	53192,81	9,73	4
C2	jgi Mucci2 119751 gw1.02.436.1	gi 3334226 sp Q27203.1	HPPD_TETTH: 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase; 4-hydroxyphenylpyruvic	x	116,55	42137,32	9,92	4
C3	jgi Mucci2 116185 Genemark1.11948_g	gi 119779 sp P25093.1	FAAA_RAT: Fumarylacetoacetase; (FAA; Beta-diketonase)	x	84,99	46962,94	12,68	4
C4	jgi Mucci2 119875 gw1.08.180.1	gi 74858798 sp Q55DV9.1	CGL_DICDI: Cystathionine gamma-lyase; Gamma-cystathionase	CYS3	219,39	40850,83	25,27	6
C5	jgi Mucci2 115934 Genemark1.11697_g	gi 74626323 sp Q9Y7R8.1	MDHM_SCHPO: Malate dehydrogenase, mitochondrial; Flags: Precursor	MDH1	540,48	35652,82	37,96	9
C6	jgi Mucci2 104068 Mucci1.FSI_estExt_fg	gi 30580446 sp Q96UF2.1	G3P2_MUCCL: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 2 (GAPDH)	TDH3	124,76	35841,44	8,00	2
C7	jgi Mucci2 113638 Genemark1.9401_g	gi 51701859 sp Q9UT44.1	PROA_SCHPO: Probable gamma-glutamyl phosphate reductase (GPR)	PRO2	591,43	49864,91	26,75	11
C8	jgi Mucci2 108684 Genemark1.4447_g	gi 51701713 sp Q9HES8.1	PYC_ASPNG: Pyruvate carboxylase; Pyruvic carboxylase;	PYC2	129,80	129447,56	5,02	4
C9	jgi Mucci2 110754 Genemark1.6517_g	gi 1168767 sp Q03700.1	CARP4_RHINI: Rhizopuspepsin-4; Aspartate protease	PEP4	472,31	41976,18	33,42	8
C10	jgi Mucci2 108959 Genemark1.4722_g	gi 44888975 sp P53444.2	ALF_NEUCR: Fructose-bisphosphate aldolase; FBP aldolase	FBA1	301,10	39348,54	23,81	6
C11	jgi Mucci2 116244 Genemark1.12007_g	gi 6831528 sp O94760.3	DDAH1_HUMAN: N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase	x	172,75	30841,69	17,86	4
C12	jgi Mucci2 108072 Genemark1.3835_g	gi 2495359 sp Q01877.1	HSP71_PUCGR: Heat shock protein HSS1	SSA3	439,02	70882,92	16,77	9

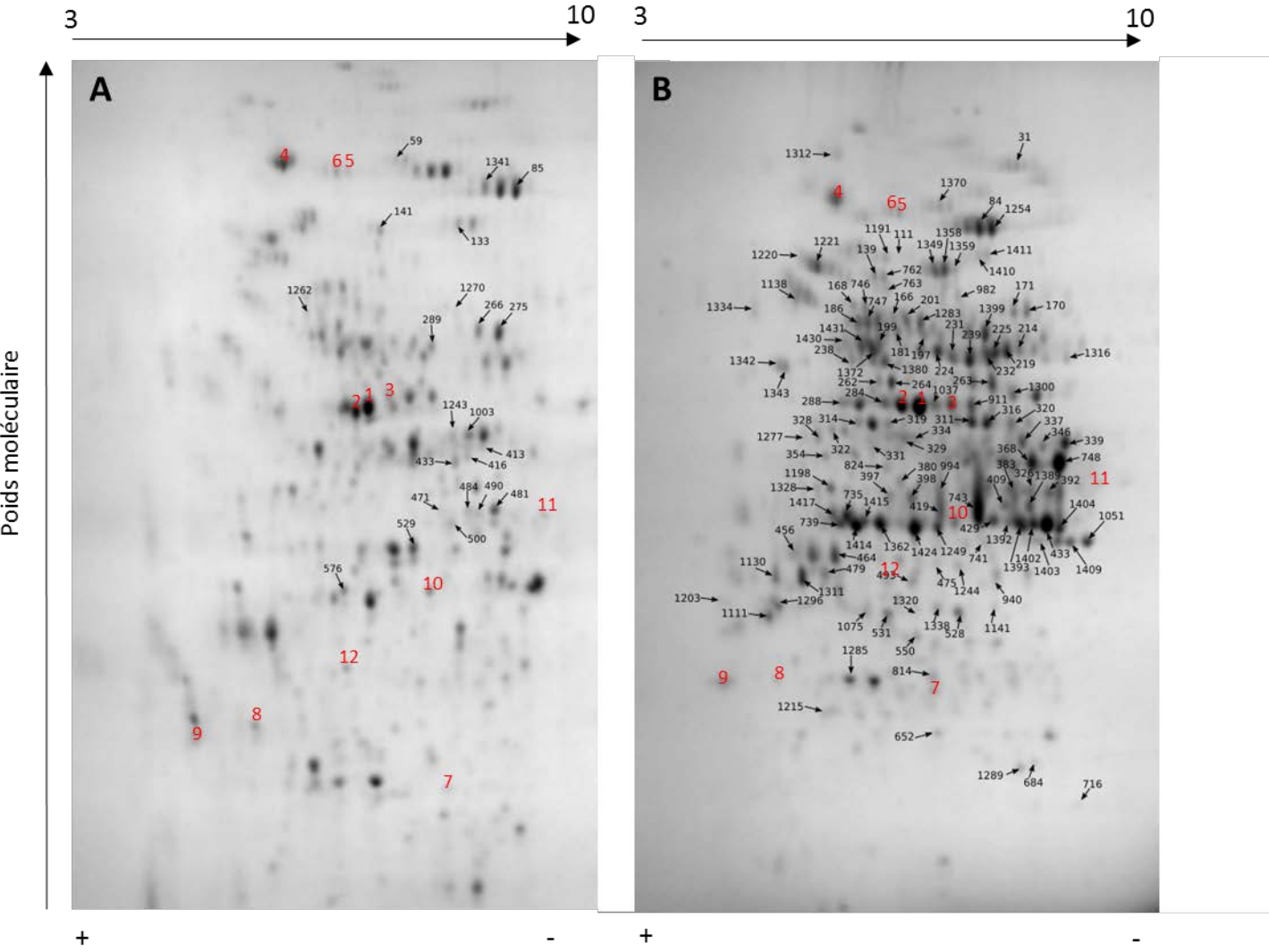
Gels 2D obtenus pour *Mucor lanceolatus* UBOCC-A-109153 et *Mucor circinelloides* CBS 277-49 sur milieu CA. Les témoins listés dans le tableau page précédente sont indiqués en rouge.



B. Correspondance entre les 12 spots protéiques utilisés comme témoins pour *Mucor lanceolatus* UBOCC-A-109153 et *Mucor circinelloides* CBS 277-49 sur milieu PDA. Les lignes en gras correspondent aux protéines dont l'identification est identique pour les deux souches (7 spots sur les 12).

spot_id	Accession	Blast accession	Blast description	Homology <i>S. cerevisiae</i>	Score	Mass	Coverage	#peptides
<i>M. lanceolatus</i>								
C1	contig_7668	gi 12230023 sp O74286.1	ENO_CUNEL: Enolase; 2-phospho-D-glycerate hydro-lyase	ENO1	714,23	177922,17	9,65	10
C2	contig_7668	gi 12230023 sp O74286.1	ENO_CUNEL: Enolase; 2-phospho-D-glycerate hydro-lyase	ENO1	69,44	177872,35	2,10	2
C3	contig_2578	gi 12229635 sp O60037.1	6PGD_CUNEL: 6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	GND2	98,92	197761,81	2,23	3
C4	contig_5195	gi 14285475 sp O74225.1	HSP88_NEUCR: Heat shock protein hsp88	SSE2	197,33	312747,34	2,08	5
C5	contig_2874	gi 2492504 sp Q96372.1	CDC48_CAPAN: Cell division cycle protein 48 homolog	CDC48	83,58	295080,07	1,45	3
C6	contig_2761	gi 74591280 sp Q5AF03.1	HSP31_CANAL: Glyoxalase 3; Glutathione-independent	HSP31	115,90	82166,40	3,08	2
C7	contig_3857	gi 26454609 sp P93212.2	14337_SOLL: 14-3-3 protein 7	BMH2	246,66	317576,34	2,01	5
C8	contig_7048	gi 189036755 sp A9WFT9.1	PDXS_CHLAA: Pyridoxal 5'-phosphate synthase subunit PdxS (PLP)	SNZ1	74,52	211857,94	1,14	2
C9	contig_7160	gi 46576851 sp Q9NL98.1	PRDX_ASCSU: Peroxiredoxin (AsPrx; Thioredoxin)	TSA1	90,89	285473,07	0,85	2
C10	contig_3900	gi 121924008 sp Q0GYU4.1	GLD2_HYPJE: Glycerol 2-dehydrogenase (NADP(+))	GCY1	293,53	283569,69	3,18	7
C11	contig_1084	gi 81884012 sp Q63487.1	RRAGB_RAT: Ras-related GTP-binding protein B (Rag B)	GTR1	176,58	566211,26	1,20	5
C12	contig_3674	gi 48474648 sp Q9HDY4.1	YK16_SCHPO: Putative ATP-dependent RNA helicase PB1A10.06c	ECM16	44,17	236566,85	0,56	1
<i>M. circinelloides</i>								
C1	jgi Mucci2 114397 Genemark1.10160_g	gi 12230023 sp O74286.1	ENO_CUNEL: Enolase; 2-phospho-D-glycerate hydro-lyase	ENO1	584,76	46963,25	38,11	10
C2	jgi Mucci2 114397 Genemark1.10160_g	gi 12230023 sp O74286.1	ENO_CUNEL: Enolase; 2-phospho-D-glycerate hydro-lyase	ENO1	854,45	46963,25	41,11	11
C3	jgi Mucci2 107041 Genemark1.2804_g	gi 12229635 sp O60037.1	6PGD_CUNEL: 6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	GND2	480,90	52725,60	23,38	9
C4	jgi Mucci2 108573 Genemark1.4336_g	gi 14285475 sp O74225.1	HSP88_NEUCR: Heat shock protein hsp88	SSE1	184,71	85100,67	8,80	5
C5	jgi Mucci2 113864 Genemark1.9627_g	gi 257051069 sp P23787.3	TERA_XENLA: Transitional endoplasmic reticulum ATPase (TER)	CDC48	83,17	104657,41	4,10	3
C6	jgi Mucci2 106976 Genemark1.2739_g	gi 146345370 sp Q00083.2	APSA_EMENI: Anucleate primary sterigmata protein A	NUM1	7,67	174282,32	1,52	1
C7	jgi Mucci2 113266 Genemark1.9029_g	gi 1729883 sp Q10344.1	TCTP_SCHPO: Translationally-controlled tumor protein homolog	TMA19	56,08	18846,28	16,37	2
C8	jgi Mucci2 106052 Genemark1.1815_g	gi 3123099 sp O14027.1	PDX1_SCHPO: Probable pyridoxal 5'-phosphate synthase subunit	SNZ1	50,09	33447,07	9,21	2
C9	jgi Mucci2 123326 gw1.05.623.1	gi 46576851 sp Q9NL98.1	PRDX_ASCSU: Peroxiredoxin (AsPrx; Thioredoxin)	TSA1	102,45	20968,80	17,37	3
C10	jgi Mucci2 114446 Genemark1.10209_g	gi 44888975 sp P53444.2	ALF_NEUCR: Fructose-bisphosphate aldolase; FBP aldolase	FBA1	669,67	39604,87	38,61	12
C11	jgi Mucci2 109231 Genemark1.4994_g	gi 2495359 sp Q01877.1	HSP71_PUCGR: Heat shock protein HSS1	SSA3	225,45	70509,77	15,47	8
C12	jgi Mucci2 114600 Genemark1.10363_g	gi 82209499 sp Q7ZTP2.1	ARP2A_XENLA: Actin-related protein 2-A; Actin-like	ARP2	129,90	44518,70	15,35	4

Gels 2D obtenus pour *Mucor lanceolatus* UBOCC-A-109153 et *Mucor circinelloides* CBS 277-49 sur milieu PDA. Les témoins listés dans le tableau page précédente sont indiqués en rouge.



Annexe 2 : Protocoles utilisés pour la contribution à l'étude génomique - Principaux résultats

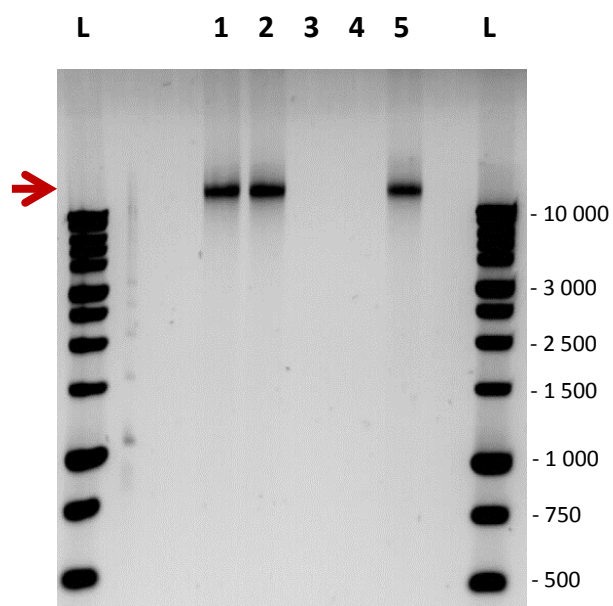
Etape 1. Obtention des mycéliums des souches d'intérêt

Les spores des souches CBS 385-95 de *M. endophyticus*, UBOCC-A-109155 de *M. racemosus*, UBOCC-A-109160 de *M. fuscus*, UBOCC-A-109153 de *M. lanceolatus*, CBS 277-49 de *M. circinelloides* utilisées pour les études physiologiques et protéomiques ont été utilisées pour inoculer des milieux gélosés PDA sur lesquels avaient été disposés des films de cellophanes (cf protocole décrit dans le matériel et méthodes de l'article n°3). Après 4 jours (extraction d'ARN) et 7 jours (extraction d'ADN) de culture à 25°C, les mycéliums ont été détachés des films de cellophanes avec des spatules stériles et broyés dans des mortiers en présence d'azote liquide.

Etape 2. Extraction d'ADN de haute qualité pour séquençage total

L'extraction d'ADN génomique de la souche CBS 385-95 de *M. endophyticus* a été réalisée en utilisant 500 mg de poudre de mycélium selon le protocole adapté fourni par l'INRA de Nancy (Kohler *et al.*, 2001) décrit dans le **protocole 1** ci-après. Afin d'éliminer au maximum les pigments présents, deux filtrations successives complémentaires sur colonne Chroma Spin ont été effectuées avant une vérification sur gel d'électrophorèse (**Figure A**). Un total de 6155 ng d'ADN dans un volume de 230 μ L a été obtenu au terme des étapes d'extraction et de purification. Cette suspension a été concentrée environ 5 fois par passage au Speedvac (volume final de 60 μ L à 150 ng/ μ L), puis envoyée à la société Macrogen pour séquençage sur HiSeq 2000. La taille estimée du génome au terme du séquençage varie de 37 110 899 à 37 443 856 paires de bases, avec un GC pourcent de 34,54%. Un total de 882 contigs a été obtenu (longueur moyenne de 36 891 pb).

Figure A : Electrophorèse sur gel d'agarose à 1% de l'ADN génomique total de la souche CBS 385-95 de *M. endophyticus*. Dépôt de 5 μ l / puits : d'ADN génomique extrait (colonnes n° 1, 2 et 5), de l'éluat 1 (colonne n°3) et de l'éluat 2 (colonne n°4). L = échelle moléculaire (tailles exprimées en nombre de paires de bases). Migration à 90 V pendant 45 min.



Etape 3. Extraction des ARN totaux pour RNAseq

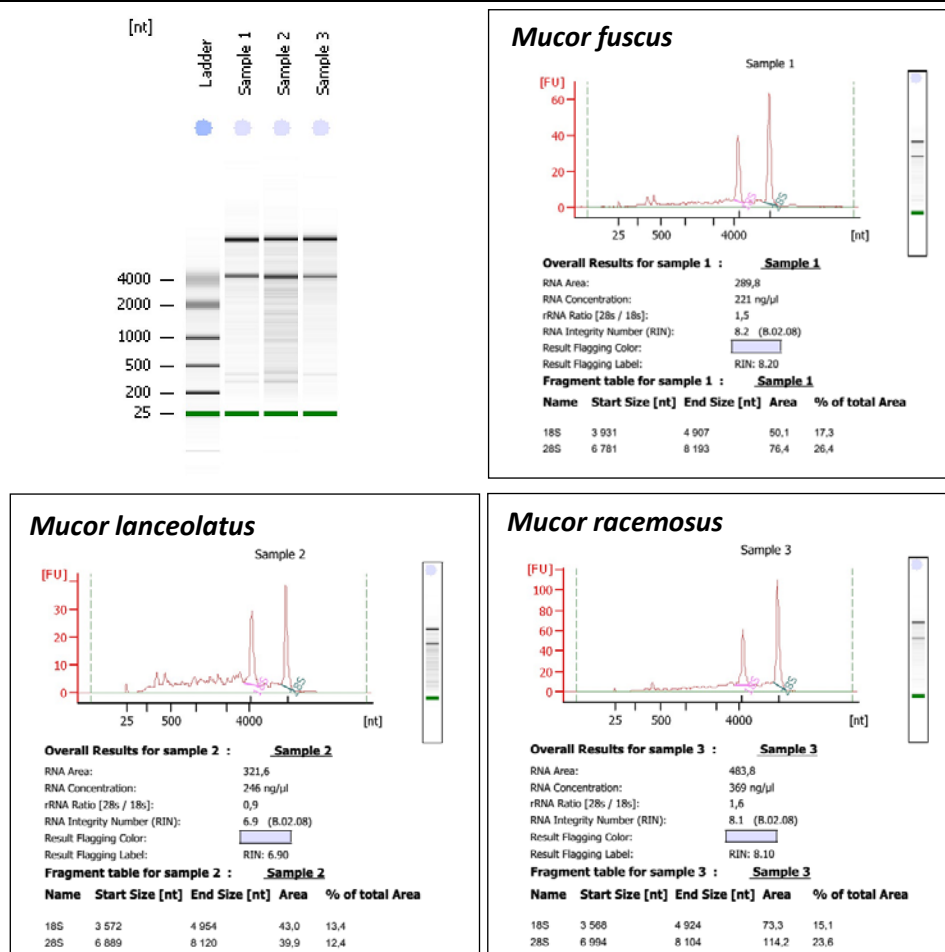
Les ARN totaux des souches CBS 385-95 de *M. endophyticus*, UBOCC-A-109155 de *M. racemosus*, UBOCC-A-109160 de *M. fuscus*, UBOCC-A-109153 de *M. lanceolatus* et CBS 277-49 de *M. circinelloides* ont été extraits en utilisant le protocole RNeasy® Plant Mini Kit de Qiagen (**Protocole 2** - partie 1 ci-après,) puis ont subi un traitement DNase avec le kit RTS DNase de MOBIO. Les puretés et les quantités d'ARN produits pour chacune des souches ont été mesurées par spectrophotométrie au terme du protocole d'extraction et se sont avérées correspondre aux exigences des plateformes de séquençage. Les suspensions ont ensuite été envoyées à la plateforme BiogenOuest de Nantes ou à la société MacroGen pour la réalisation du séquençage sur Illumina HiSeq 1500 ou HiSeq 2000 (**Protocole 2** - partie 2 ci-après). La **figure B** présente les résultats des contrôles de pureté qui ont été réalisés au laboratoire avant envoi puis par les plateformes à réception des échantillons.

Figure B : Résultats des contrôles qualité réalisés sur les ARN extraits. A. Analyses par spectrophotométrie avant envoi aux plateformes. B. Analyses réalisées à réception avec un bioanalyseur Agilent par la plateforme BiogenOuest de Nantes.

A.

Espèce	<i>M. fuscus</i> UBOCC-A-109160	<i>M. lanceolatus</i> UBOCC-A-109153	<i>M. racemosus</i> UBOCC-A-109155	<i>M. endophyticus</i> CBS 385-95	<i>M. circinelloides</i> CBS 277-49
260/280	2.23	2.11	2.10	2.22	2.15
260/230	2.33	2.29	2.28	1.56	2.08
Dosage ARN µg/µl	1674	2103.1	2907.1	209.1	1710.9

B.



Protocole 1 : Extraction de l'ADN génomique de haute qualité :

Protocole de l'INRA de Nancy – Equipe Ecogénomique (Kohlet A, Murat C, Costa M – version 2 du 17/01/2001), modifié à partir des protocoles du Professeur Spanu P (Imperial College, Londres) et Fulton TM, Chunwongse J, Tanksley SD (Pl Mol Biol Rep 13, 207 (1995)).

I. Réactifs nécessaires :

TAMPON A :

	Cf (M)	Vi (ml)	
0,35 M sorbitol	Sorbitol 1M	0.35	10.5
0,1 M de Tris-HCl, pH 9	Tris HCL1M	0.1	3
5 mM d'EDTA, pH 8	EDTA 0.5 M	0.005	0.3
	H2O		Qsp 30

TAMPON B :

	Cf (M)	Vi (ml)	
0,2 M de Tris-HCl, pH 9	Tris 1 M	0.2	6
50 mM EDTA , pH 8	EDTA 0.5M	0.05	3
2 M NaCl	NaCl 5M	2	12
2% CTAB (Cétyl Triméthylammonium Bromide)	CTAB 10 %	2%	6
	H2O		Qsp30

TAMPON C :

5% SARKOSYL (sel de N-lauroylsarcosine sodium SIGMA L5125)

Tampon de lyse : Pour 17,5 ml

2,5 volume de tampon A : 6,5 ml

2,5 volume de tampon B : 6,5 ml

1,0 volume de tampon C : 2,6 ml

PVP 0,1% : 1,75 ml

Protéinase K : 125 µl

TE : Tris 1M pH8

EDTA 0.5M PH8

	Cf (M)	Vi (ml)
Tris 1M	0.01	0.5
EDTA 0.5M	0.001	0.1
H2O		Qsp 50

Acétate de potassium 5M à pH 7,5

RNase A (10 mg/ml)

Proteinase K (20 mg/ml)

Polyvinylpyrrolidone (PVP) 1 %

Chloroforme:Isoamylalcool (24:1)

Sodium Acetate (NaAc) 3M

Isopropanol 100%

Ethanol 70%

Qiagen Genome-tip 500/G (ref #10262) et tampons Qiagen QC (ref #19055), QBT (ref #19059) et QF (ref #19056)

II. Mode opératoire

Phase 1 :

- Préchauffer le tampon B à 65 ° C

- Préparer le tampon de lyse : utiliser 17,5 ml pour 500 mg de produit de départ

- Broyer très finement et rapidement le mycélium dans de l'azote liquide en utilisant un mortier stérile, et transférer 500 mg de poudre dans un Falcon de 50 ml. Tout se fait sur la glace !

- Ajouter 17,5 ml de tampon de lyse dans le tube et mélanger au vortex

- Incuber 30 min à 65 ° C, mélanger fréquemment en inversant le tube

- Ajouter 5,75 ml (0,33 vol) d'acétate de potassium (5M), mélanger en inversant le tube et incuber 30 min sur la glace

- Centrifuger pendant **20 min à 5000 g à 4 ° C**
- Transférer le surnageant dans un nouveau tube Falcon de 50 ml et ajouter 1 vol de Chloroforme:Isoamylalcool (24:1)
- Centrifuger pendant 10 min à **5000g à 4 ° C** (phase aqueuse trouble = présence de protéines)
- Transférer la phase aqueuse dans un tube Falcon de 50 ml
- **Re-centrifuger 10 min à 8000g à 4°C pour prélever le reste de la phase aqueuse**
- Ajouter 100 µl de RNase A (10 mg / ml) et incubé 90 à **120 min à 37 ° C**
- Ajouter 1/10^{ème} (1.75ml) en volume d'Acétate de sodium et 1 volume d'isopropanol (17.5 ml) et incubé 5 min à température ambiante
- Centrifuger **45 min à 8000g à 4°C**
- Jeter le surnageant
- Laver le culot avec **2 ml d'éthanol (70%)** et centrifuger **15 min à 8000g à 4°C**
- Jeter le surnageant et sécher le culot pendant 5 min à température ambiante
- Reprendre le culot dans **500 µl de TE à 65 ° C**, transférer dans un Eppendorf de 1.5 ml et conserver à -80 ° C

Phase 2 :

Utilisez 4 extractions de 500 mg de matériel de départ pour une 1 colonne Qiagen Genomic Tip 500G :

- Mélanger **500 µl ADN *4** (dans le TE) de quatre extractions et ajouter **8 ml** tampon QBT
- Equilibrer la Qiagen Genomic-tip 500 / G avec **10 ml** de tampon QBT
- Placez la colonne sur un nouveau tube Falcon de 50 ml et charger l'ADN extrait. Gardez l'éluat 1
- Laver les colonnes deux fois avec **15 ml** de tampon QC. Récupérer l'éluat 2
- Placer la colonne sur un tube Falcon de 50 ml et éluer l'ADN avec **15 ml de tampon QF** préchauffé (50 ° C)
- Ajouter un 1/10^{ème} (**1.5 ml**) de volume d'acétate de sodium et 1 volume d'isopropanol (**15 ml**) et incubé 5 min à température ambiante
- Centrifuger **45 min à 8000g à 4°C**
- Jeter le surnageant
- Laver le culot avec **2 ml d'éthanol (70%)** et centrifuger pendant **10 min à 8000g à 4°C**
- Jeter le surnageant et sécher le culot pendant 5 à **20 min** à température ambiante
- Reprendre le culot dans **250 µl de TE à 65 ° C** et conserver à -80 ° C
- Préparer un gel d'agarose à 1% et charger 5µl de : l'échantillon d'ADN génomique, de l'éluat 1 (purification 1) et de l'éluat 2 (purification 2).
- **OPTION : Un second passage à travers des colonnes Qiagen Genomic Tip OU (recommandé si la solution reste colorée par des pigments) une filtration en utilisant CHROMA SPIN + TE-1000 colonnes (Clontech)**

Remarques :

* Pour les espèces de *Pisolithus* et de nombreux autres champignons, le mieux est d'utiliser des cultures de mycélium jeunes. Les cultures ne doivent pas dépasser 30 jours ou la production de nombreux pigments autres poseront problèmes.

* Utiliser des gants tout le temps.

* Utilisation de la hotte chimique lors de l'utilisation du chloroforme: isoamylalcool mélangé.

- Le mycélium doit être broyé dans l'azote liquide de façon à obtenir une poudre très fine, sinon le rendement de l'ADN est pauvre (faible) !
- Ne jamais laisser les échantillons décongeler.
- Une fois pesé, les échantillons sont conservés sur de la glace jusqu'à ce que les tampons d'extraction aient été ajoutés.
- Sauf indication contraire et explicite dans le protocole, les tubes sont toujours conservés sur de la glace.
- Utilisation de Qiagen Genomic-tip 500 / G colonnes : souvent mieux que d'utiliser les colonnes 100 / G, notamment pour éliminer les contaminants et les pigments résiduels.

En commençant avec 4 X 500 mg de mycélium, risque de dépasser la capacité de 100 µg de la colonne. Il faut donc presque toujours prévoir des éluations supplémentaires pour récupérer l'ADN qui n'a pas été retenu dans la colonne.

Phase optionnelle : Protocole d'utilisation des colonnes CHROMA SPIN (Clontech) :

- Inverser plusieurs fois la colonne pour remettre en suspension la matrice.
- En tenant la colonne CHROMA SPIN debout, casser le bout de la colonne.
- Placer la colonne sur tube collecteur de 2 ml et soulevez le couvercle supérieur.
- Centrifuger à 700g pendant 5 min.
- Placer la colonne sur un nouveau tube de 2 ml.
- Déposer lentement et soigneusement l'échantillon au centre de la colonne (70 µl à 100 µl)
- Centrifuger à 700 g pendant 5 min.
- Stocker l'échantillon purifié à -80°C

Protocole 2 : Extraction d'ARN pour RNAseq

Partie 1 : Extraction d'ARN avec le RNeasy® Plant Mini Kit de Qiagen

I. Réactifs nécessaires / recommandations :

Avant de commencer :

-Ce Kit offre plusieurs choix de tampons de lyse. Le tampon RLT, généralement utilisé, peut provoquer la solidification de certains échantillons, en fonction de la quantité et du type de métabolites secondaires dans le tissu. Dans ces cas, le tampon RLC doit être utilisé en remplacement.

-Ajouter 10 µl soit de β-mercaptoéthanol (β-ME), ou 20 µl de dithiothréitol 2 M (TNT) *, à 1 ml du tampon RLT ou RLC avant utilisation. Les tampons avec du TNT ou du β-ME peuvent être conservés à température ambiante pendant 1 mois.

-Ajouter 4 volumes d'éthanol (96-100%) au tampon RPE d'une solution de travail.

-Préparer un bac de glace afin d'y réaliser l'ensemble des opérations.

II. Mode opératoire

1a. Placer 100 mg de mycélium dans un mortier et un pilon et recouvrir immédiatement d'azote liquide. Broyer soigneusement. Décanter la poudre du tissu mycélien et l'azote liquide dans le microtube de 2 ml RNase-free préalablement refroidi (non fourni).

Laisser l'azote liquide s'évaporer mais ne pas permettre au tissu de décongeler.

Procéder immédiatement à l'étape 2.

2. Ajouter 450 µl du tampon RLT ou RLC à un maximum de poudre de tissu. Vortexer vigoureusement.

3. Transférer le lysat dans une colonne QIAshredder (couleur lilas), placé dans un tube de 2 ml. Centrifuger pendant 2 min à pleine vitesse. Transférer l'éluat dans un nouveau tube (non fourni) sans perturber le culot de débris cellulaires.

4. Ajouter 0,5 volume d'éthanol (96-100%) au lysat clarifié, et mélanger immédiatement par pipetage. Ne pas centrifuger. Procéder immédiatement à l'étape 5.

5. Transférer l'échantillon, avec le précipité, sur une RNeasy Colonne spin Mini (rose) mise sur un tube collecteur de 2 ml (fourni). Fermez le couvercle du tube, et centrifuger pendant 15 s à ≥ 8000 g (≥ 10000 rpm). Jeter l'éluat.

6. Ajouter 700 µl de tampon RW1 à la colonne RNeasy. Fermez le couvercle du tube et centrifuger pendant 15 s à ≥ 8000 g. Jeter l'éluat.

7. Ajouter 500 µl de tampon RPE à la colonne RNeasy. Fermez le couvercle et centrifuger pendant 15 s à ≥ 8000 g. Jeter l'éluat.

8. Ajouter 500 µl de tampon RPE à la colonne RNeasy. Fermez le couvercle et centrifuger pendant 2 min à ≥ 8000 x g.

Facultatif: Placer la colonne RNeasy dans un nouveau tube collecteur de 2 ml (Fourni). Centrifuger à pleine vitesse pendant 1 min pour sécher la membrane.

9. Placer la colonne RNeasy dans un nouveau tube de 1,5 ml collecteur (fourni).

Ajouter 30 à 50 µl d'eau RNase free directement sur la membrane de la colonne.

Fermez le couvercle du tube et centrifuger pendant 1 min à ≥ 8000 g pour éluer l'ARN = Eluat 1 (**premier tube : dosage**).

10. Si le rendement de l'ARN attendu est > 30 pg, répétez l'étape 9 en utilisant une autre quantité de 30-50 µl d'eau RNase free (2^{ème} élution / décrochage) (**deuxième tube : dosage**).

Il est également possible d'utiliser l'éluat de l'étape 9 (si une grande concentration en ARN est nécessaire). Réutiliser le tube de collecte de l'étape 9 (**concentration de l'éluat : hyper concentrée, un seul dosage**).

11. Faire un traitement DNase adapté sur l'extrait d'ARN (environ 50 µl d'extrait) en suivant précisément le protocole RTS DNase Kit de MOBIO.

Partie 2 : Protocole RNAseq

- **Séquenceur** : HiSeq 1500 ou 2000 Illumina
- **Lecture** : Paired-end (run 2*100 paires de bases), c'est-à-dire à partir des deux extrémités
- **Dosages des ARN** : Bioanalyseur Agilent
- **Kit utilisé pour la préparation des librairies** :

Pour *M. racemosus* UBOCC-A-109155, *M. fuscus* UBOCC-A-109160 et *M. lanceolatus* UBOCC-A-109153 :
Kit NEB : NEBNext Ultra RNA Library Prep Kit for Illumina (ref NEB#E7530G). Utilisation d'1 µg d'ARN. Contrôle de la qualité des librairies par TapeStation (Agilent), cassettes D1K, puis quantification par qPCR (kapa sybr fast qPCR kit et ADN standard kapa) avec des oligos spécifiques des séquences P5 and P7 d'Illumina (seuls les fragments d'ADN qui ont les primers P5 et P7 seront séquencés puisque ces séquences sont indispensables à la fixation des ADN sur le support de séquençage (flowcell)).

Pour *M. endophyticus* CBS 385-95:
Ribo-Zero rRNA Removal Kit (Bacteria) et TruSeq RNA Sample Prep Kit (v2).

Étapes du processus de séquençage HiSeq Illumina:



Le séquençage comprend 4 étapes :

1) Library Preparation

The sequencing library is prepared by random fragmentation of the DNA or cDNA sample, followed by 5' and 3' adapter ligation. Alternatively, "tagmentation" combines the fragmentation and ligation reactions into a single step that greatly increases the efficiency of the library preparation process. Adapter-ligated fragments are then PCR amplified and gel purified.

2) Cluster Generation

For cluster generation, the library is loaded into a flow cell where fragments are captured on a lawn of surface-bound oligos complementary to the library adapters. Each fragment is then amplified into distinct, clonal clusters through bridge amplification. When cluster generation is complete, the templates are ready for sequencing.

3) Sequencing

Illumina SBS technology utilizes a proprietary reversible terminator-based method that detects single bases as they are incorporated into DNA template strands. As all 4 reversible, terminator-bound dNTPs are present during each sequencing cycle, natural competition minimizes incorporation bias and greatly reduces raw error rates compared to other technologies. The result is highly accurate base-by-base sequencing that virtually eliminates sequence-context-specific errors, even within repetitive sequence regions and homopolymers.

4) Data Analysis


During data analysis and alignment, the newly identified sequence reads are then aligned to a reference genome. Following alignment, many variations of analysis are possible such as single nucleotide polymorphism (SNP) or insertion-deletion (indel) identification, read counting for RNA methods, phylogenetic or metagenomic analysis, and more.

Annexe 3 : Valorisations scientifiques


1) Articles dans revues internationales à comité de lecture :

① Morin-Sardin S, Rigalma K, Coroller L, Jany JL, Coton E. (2016). Determination of seven *Mucor* spp. growth behavior in relation to cheesemaking conditions. *Food Microbiology* 56: 69-79.

Food Microbiology 56 (2016) 69–79




Contents lists available at ScienceDirect



Food Microbiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/fm

Effect of temperature, pH, and water activity on *Mucor* spp. growth on synthetic medium, cheese analog and cheese

 CrossMark

Stéphanie Morin-Sardin ^a, Karim Rigalma ^a, Louis Coroller ^b, Jean-Luc Jany ^a, Emmanuel Coton ^{a,*}

^a Université de Brest, EA 3882, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne, ESAB, Technopôle Brest Irrois, 29280 Houlwané, France
^b Université de Brest, EA3882, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne, UMT Spore Risk, IUT Quimper, 6 Rue de l'Université, 29934 Quimper, France

ARTICLE INFO <hr/> <p><i>Article history:</i> Received 25 June 2015 Received in revised form 10 November 2015 Accepted 30 November 2015 Available online 10 December 2015</p> <hr/> <p><i>Keywords:</i> Mucor Growth Abiotic factors Cheese Adaptation Predictive model</p>	ABSTRACT <hr/> <p>The <i>Mucor</i> genus includes a large number of ubiquitous fungal species. In the dairy environment, some of them play a technological role providing typical organoleptic qualities to some cheeses while others can cause spoilage. In this study, we compared the effect of relevant abiotic factors for cheese production on the growth of six strains representative of dairy technological and contaminant species as well as of a non cheese related strain (plant endophyte). Growth kinetics were determined for each strain in function of temperature, water activity and pH on synthetic Potato Dextrose Agar (PDA), and secondary models were fitted to calculate the corresponding specific cardinal values. Using these values and growth kinetics acquired at 15°C on cheese agar medium (CA) along with three different cheese types, optimal growth rates (μ_{opt}) were estimated and consequently used to establish a predictive model. Contrarily to contaminant strains, technological strains showed higher μ_{opt} on cheese matrices than on PDA. Interestingly, lag times of the endophyte strain were strongly extended on cheese related matrices. This study offers a relevant predictive model of growth that may be used for better cheese production control but also raises the question of adaptation of some <i>Mucor</i> strains to the cheese.</p> <p style="text-align: right;">© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.</p>
--	--

② Morin-Sardin S, Nodet P, Coton E and Jany JL. *Mucor*: a janus-faced fungal genus with human health impact and industrial applications. *Soumis à Mycologia le 29 Juillet 2016*.

③ Morin-Sardin S, Jany JL, Artigaud S, Pichereau V, Bernay B, Coton E, Madec S. Proteomic analysis of the adaptation of *Mucor* spp. to cheese environment. *Soumis à Journal of proteomics le 25 Juillet 2016*.

2) Présentations orales lors de congrès internationaux :

① Morin-Sardin S, Rigalma K, Coroller L, Jany JL, Coton E. Growth abilities of *Mucor* spp. in dairy environment: from experimental data to predictive modeling. International Conference on Predictive Modeling in Food, Rio de Janeiro, Brésil, 8 au 12 septembre **2015**.



The *Mucor* genus includes ubiquitous species regularly encountered as contaminants of foodstuffs where they induce undesirable effects including off-flavours, anomalous textures or discolorations. In the cheesemaking context, some *Mucor* spp. are used as technological microorganisms contributing to the texture and the sensory characteristics of cheeses such as Tommes while, on other cheeses, they can cause spoilage. To date, growth abilities but also positive and negative impacts of *Mucor* spp. on cheese are poorly known.

The aim of this study was to investigate the behavior of contaminant and technological *Mucor* strains under different physicochemical conditions encountered in the dairy industry. The impact of abiotic factors (temperature: 0 to 50 °C; water activity: 0.84 to 0.99; pH 1.8 to 13.6) on the growth of strains pertaining to different species commonly encountered in cheeses (*M. circinelloides*, *M. racemosus*, *M. lanceolatus*, *M. fuscus*, *M. spinosus*, *M. brunneogriseus*), as well as of a plant endophyte (*M. endophyticus*, as an outgroup), were determined on synthetic Potato Dextrose Agar medium (PDA). Assessment of radial growth kinetics including a lag phase followed by a constant radial growth of the mycelium allowed to estimate cardinal values for each species and abiotic factor. These data were consequently used to design and validate a model to predict the growth rate of the different species on Cheese Agar medium and actual cheeses (Tomme de Savoie and goat cheese). Comparison of experimental and modeling growth rates on cheese matrices showed that our model is relevant for process optimization in the cheese industry. Optimal growth rate values estimated on cheese matrices were generally lower than those obtained on PDA except for technological strains which seem to be adapted to the cheese environment. For some conditions exhibiting major phenotypic differences, a proteomic approach is currently carried out to identify proteins potentially involved in this adaptation.

© Morin-Sardin S, Rigalma K, Coroller L, Jany JL, Coton E. Determination of seven *Mucor spp.* growth behavior in relation to cheesemaking conditions. VI International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology – BioMicroWorld 2015, Barcelona, Espagne, 29 au 30 octobre 2015.



Determination of seven *Mucor spp.* growth behavior in relation to cheesemaking conditions

S. Morin-Sardin¹, K. Rigalma¹, L. Coroller², S. Madec¹, J.L. Jany¹, E. Coton¹

¹Université de Brest, EA 3882, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne (LUBEM), ESIAB, Technopôle Brest Iroise, 29 280 Plouzané, France

²Université de Brest, EA 3882, LUBEM, UMT Spore Risk, IUT, 6 rue de l'Université, 29 334 Quimper, France

The genus *Mucor* belongs to the Mucoromycotina subphylum and Mucorales order [1]. This genus includes a large number of ubiquitous fungal species. In the dairy environment, some of them play a technological role providing typical organoleptic qualities to some cheeses while others can cause undesirable effects including off-flavours, anomalous textures or discolorations [2, 3, 4]. To investigate whether various *Mucor* species exhibit different growth behaviors, we studied the impact of abiotic factors (temperature ranging from 0 to 50 °C, water activity from 0.84 to 0.99 and pH from 1.8 to 13.6) on the growth of *Mucor* strains on Potato Dextrose Agar (PDA) medium. The selected strains were representative of dairy technological and contaminant species (*M. circinelloides*, *M. racemosus*, *M. lanceolatus*, *M. fuscus*, *M. spinosus*, *M. brunneogriseus*), as well as of a plant endophyte (*M. endophyticus*, integrated as an outgroup). Data collected were used to estimate the temperature, pH and water activity growth limits for each species on PDA medium. Growth kinetics were then acquired at 15°C on cheese agar medium and actual cheeses (Tomme de Savoie and goat cheese). Interestingly, a preferential growth behavior was observed on Tomme matrices for *M. fuscus* and *M. lanceolatus*, suggesting a potential adaptation of these technological species to this specific habitat [5]. Based on published studies, an integrated model was adapted to predict the radial growth of the seven *Mucor* species on cheese matrices [6, 7, 8]. Relevant predictions were obtained in most cases, showing the potential of this model to be used in cheese industry for process optimization. For some conditions exhibiting major phenotypic differences, a proteomic approach is currently carried out to identify proteins potentially involved in this adaptation.

Keywords: Fungal growth, *Mucor*, Cheese, Spoilage, Technological species, Predictive model, Adaptation

References:

- [1] Walther, G., Pawlowska, J., Alastruey-Izquierdo, A., Wrzosek, M., Rodriguez-Tudela, J.L., Dolatabadi, S., Chakrabarti, A., de Hoog, G.S., 2013. DNA barcoding in Mucorales: an inventory of biodiversity. *Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi* 30, 11-47.
- [2] Zhang, N., Zhao, X.H., 2010. Study of *Mucor spp.* in semi-hard cheese ripening. *J. Food Sci. Tech.* 47, 1-7.
- [3] Hermet, A., Meheust, D., Mounier, J., Barbier, G., Jany, J.L., 2012. Molecular systematics in the genus *Mucor* with a special regards to species encountered in cheese. *Fungal Biol.* 116, 692-705.
- [4] Desmasures N., 2014. CHEESE. Mold-Ripened Varieties. *Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)*: 409–415.
- [5] Ropars, J., Cruaud, C., Lacoste, S., Dupont, J., 2012. A taxonomic and ecological overview of cheese fungi. *Int. J. Food Microbiol.* 155, 199-210.
- [6] Rosso, L., 1995. Convenient model to describe the combined effects of temperature and pH on microbial growth. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 610-616.
- [7] Pinon, A., Zwietering, M., Perrier, L., Membré, J.M., Leporq, B., Mettler, E., Thuault, D., Coroller, L., Stahl, V., Vialette, M., 2004. Development and validation of experimental protocols for use of cardinal models for prediction of microorganism growth in food products. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 1081-1087.
- [8] Dagnas, S., Onno, B., Membré, J.M., 2014. Modeling growth of three bakery product spoilage molds as a function of water activity, temperature and pH. *Int. J. Food Microbiol.* 186, 95-104.

3) Présentations orales lors de congrès nationaux :

① Morin-Sardin S, Rigalma K, Coroller L, Jany JL, Coton E. Impact de facteurs abiotiques sur la croissance de *Mucor* spp. 11^{ème} Congrès National de la SFM, Institut Pasteur, Paris, 23 au 25 mars 2015.



Le genre *Mucor* regroupe des espèces de champignons basaux ubiquistes présentes dans l'environnement mais aussi dans des matières premières et/ou des produits transformés. Dans le contexte fromager, et en fonction du fromage considéré, les *Mucor* n'ont pas le même rôle. Dans les fromages frais et à pâte molle (bûche de chèvre, Camembert), ils peuvent être assimilés à des microorganismes d'altération responsables de défauts de type « poil de chat ». Au contraire, dans les Tomme et Saint-Nectaire, ils correspondent à des microorganismes technologiques producteurs de lipases et de protéases participant au développement des qualités organoleptiques et nutritionnelles des produits. L'objectif de ce travail consistait i) à évaluer, pour différents facteurs abiotiques clés de la production fromagère, l'existence de différences de comportement entre espèces technologiques et contaminantes mais aussi ii) d'élaborer des modèles mathématiques prévisionnels de croissance spécifiques. Ces modèles sont d'intérêt pour un meilleur contrôle du processus de production. Les valeurs cardinales de croissance et les caractéristiques morphologiques de six souches fromagères, appartenant à six espèces technologiques et/ou contaminantes (*M. brunneogriseus*, *M. circinelloides*, *M. fuscus*, *M. lanceolatus*, *M. racemosus* et *M. spinosus*) et d'une souche de l'espèce endophyte *M. endophyticus* ont été déterminées sur un milieu artificiel standard Potato Dextrose Agar (PDA) en fonction de différents paramètres environnementaux (teneur en NaCl de 0 à 20% ; températures de 0 à 50°C, a_w de 0,85 à 0,99 et pH de 1,8 à 8,7). Les données générées ont été utilisées pour élaborer des modèles prévisionnels de croissance pour chacune des espèces. La validation de ces modèles a été effectuée au moyen de l'étude de la croissance fongique sur deux matrices fromagères (bûche de chèvre et Tomme de Savoie non affinée) et un milieu synthétique mimant le fromage (*cheese agar*). Des différences phénotypiques marquées ont été observées au sein d'une même espèce en fonction des variations d'un paramètre abiotique et du milieu de culture ainsi qu'entre espèces soumises à des conditions identiques. Les résultats obtenus suggèrent que les espèces technologiques présentent une meilleure adaptation aux matrices fromagères que les espèces contaminantes ou endophyte qui se développent peu et/ou après une phase de latence importante. Une approche protéomique est en cours afin d'identifier les protéines témoignant de l'adaptation à la matrice fromagère.

Mots clés : *Mucor* ; Fromages ; Flore d'altération ; Flore technologique ; Physiologie ; Modèle prévisionnel de croissance ; Protéomique.

© Morin-Sardin S, Jany JL, Artigaud S, Bernay B, Pichereau V, Coton E, Madec S. Etude de protéomique des marqueurs d'adaptation de *Mucor* spp. à l'environnement laitier. Colloque SFR ScInBioS_IBSAM, Brest, 3 juin 2016.

Etude protéomique des marqueurs d'adaptation de *Mucor* spp. à l'environnement laitier

Stéphanie MORIN-SARDIN¹, Jean-Luc JANY¹, Sébastien ARTIGAUD², Benoît BERNAY³, Vianney PICHEREAU², Emmanuel COTON¹, Stéphanie MADEC¹

¹Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne (LUBEM), EA 3882, Université de Bretagne Occidentale, Plouzané, France

²Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin (LEMAR), UMR 6539, CNRS/UBO/IRD/Ifremer, Institut Universitaire Européen de la Mer, Université de Bretagne Occidentale, Plouzané, France

³Plateforme Proteogen, SFR ICORE, Université de Caen Basse-Normandie, Caen, France

Le genre *Mucor* est composé d'espèces fongiques ubiquistes fréquemment associées à des contaminations de produits alimentaires dans lesquels elles peuvent être à l'origine d'altération des propriétés organoleptiques, engendrant de ce fait des pertes économiques. Par ailleurs, plusieurs espèces présentent un intérêt technologique, contribuant au développement des caractéristiques sensorielles de produits fermentés, comme c'est le cas pour certains fromages français (Tomme, St Nectaire...). Cette dichotomie soulève la question d'une adaptation et potentiellement d'un processus de domestication de certaines espèces à cet environnement particulier.

Nous avons récemment montré que des souches de *Mucor* appartenant aux espèces technologiques ont des taux de croissance optimaux supérieurs à ceux des souches contaminantes, mais aussi à ceux d'une souche associée au domaine végétal (endophyte), sur milieu mimant le fromage ou sur matrices fromagères, en comparaison à un milieu synthétique (Morin-Sardin *et al.*, 2016).

Dans le contexte de cette étude, nous avons étudié les mécanismes moléculaires impliqués dans l'adaptation des espèces technologiques à l'environnement fromager. Quatre souches de *Mucor* sélectionnées parmi des espèces technologiques, contaminantes ou non-associées aux fromages ont été mises en culture durant 7 jours à 14°C sur milieu synthétique Potato Dextrose Agar (PDA) ou sur milieu mimant le fromage (Cheese Agar - CA) et leurs protéomes ont été comparés par électrophorèse bidimensionnelle. Les protéines exprimées de manière différente sur milieu PDA versus CA ont été analysées par nanoLC-MALDI TOF/TOF puis identifiées avec le programme Mascot en utilisant des génomes de *M. racemosus*, *M. fuscus*, et *M. lanceolatus* séquencés par notre laboratoire et des bases de données publiques. En comparant un milieu par rapport à l'autre, une proportion de 15.8 à 19% des protéomes (entre 83 et 103 « spots » selon les souches) a montré une différence d'expression d'un facteur 1,6 au minimum et 209 protéines putatives ont pu être identifiées. Une phase de caractérisation fonctionnelle de ces protéines a été réalisée en utilisant les logiciels Blast2GO et String DB afin de déterminer les voies métaboliques impliquées dans l'adaptation aux matrices fromagères.

Morin-Sardin *et al.*, 2016. Food Micro. 56: 69-79.

4) Posters lors de congrès internationaux :

① Morin-Sardin S, Rigalma K, Coroller L, Jany JL, Coton E. Predictive modeling of the impact of abiotic factors on the growth of *Mucor* spp. associated with cheese. The 10th International Mycological Congress, Bangkok, Thaïlande, 3-8 août 2014. *Obtention du Best Student Poster Award*.

Predictive modeling of the impact of abiotic factors on the growth of *Mucor* spp. associated with cheese

Stéphanie MORIN-SARDIN, Karim RIGALMA, Louis COROLLER,
Jean-Luc JANY, Emmanuel COTON

Université de Brest, EA 3882, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et d'Ecologie Microbienne (LUBEM) - ESIAB - Technopôle Brest Iroise, 29280 Plouzané

The *Mucor* genus includes ubiquitous species found in the environment, but also in raw materials and foodstuffs. In the cheesemaking context, some *Mucor* spp. are used as technological microorganisms due to the organoleptic qualities they provide to some cheese (e.g. Tomme and St Nectaire cheeses), while on other cheeses they can cause spoilage. To date, the behavior but also the positive and negative impact of technological and contaminant *Mucor* on cheese are poorly known. In this study, the impact of abiotic factors (NaCl content, temperature, a_w , pH) on the growth and morphology of *Mucor* representative strains of species commonly encountered in cheeses (*M. circinelloides*, *M. racemosus*, *M. lanceolatus*, *M. fuscus*, *M. spinosus*, *M. brunneogriseus*), as well as of a plant endophyte (*M. endophyticus*, used as an outgroup), were determined on PDA medium. The collected data are being used to develop a predictive model for each species and abiotic parameter. Moreover, a monitoring of the growth of the studied strains at different temperatures on a medium mimicking cheese as well as on unripened cheeses is being carried out in order to validate the model. Growth profiles and morphological significant differences were observed on PDA medium, according to the considered *Mucor* species and abiotic conditions. The derived growth models could lead to an improvement of the industrial use of the technological species and a better control of the contaminating ones. The mechanisms underlying the observed fungal behaviours require further investigations through molecular and proteomic approaches.



Predictive modeling of the impact of abiotic factors on the growth of *Mucor* spp. associated with cheese

Morin-Sardin S., Rigalma K., Coroller L., Jany JL., Coton E.

Université de Brest, EA3882, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et d'Ecologie Microbienne, ESIAB, Technopôle Brest Iroise, 29280 Plouzané, France.

E-mail: stephanie.morin-sardin@univ-brest.fr

Phone: +33 (0)6 84 30 03 98



Introduction

In the cheese making context, some *Mucor* spp. are used as technological microorganisms due to the organoleptic qualities they provide to some cheeses (e.g. Tomme and St Neactaire, Fig 1a), while on other cheeses these fungi can be responsible for spoilage (e.g. goat cheese, Fig 1b).

The aims of this work were:

- to elaborate, on a synthetic medium, a mathematical model predicting the impact of several abiotic factors on the growth of *Mucor* representative strains of species commonly encountered in cheeses as well as of a plant endophyte (as an outgroup);
- to validate this predictive model on a medium mimicking cheese as well as on unripened cheeses;
- to identify differential behaviors among *Mucor* species.



Figure 1. a) Tomme de Savoie, b) Spoilage defect observed on soft cheeses.

Materials & Methods

7 *Mucor* spp.

Technological / Mixed / Alteration / Endophyte

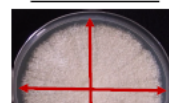
- M. fuscus* (UBOCC-A-109 160)
- M. lanceolatus* (UBOCC-A-109 153)
- M. racemosus* (UBOCC-A-109 155)
- M. brunneogriseus* (UBOCC-A-109 207)
- M. spinosus* (CBS 228-32)
- M. circinelloides* (CBS 277-49)
- M. endophyticus* (CBS 385-95)

4 ABIOTIC PARAMETERS

PDA (Potato Dextrose Agar)

T° (0 à 50°C)	pH (1,8 à 8,7)
NaCl (0% à 20%)	a_w (0,99 à 0,85)

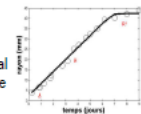
MEASURE OF THE RADIAL GROWTH



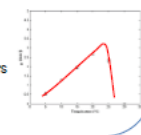
2 perpendicular diameters
At least 3 replicates
About 25 measurements
/ conditions / species

MODELING (MATLAB):

Primary sigmoidal model (derived from Rosso et al., 1995): radial growth function of time



Cardinal models: influence of environmental factors on growth rates



Cheese mimicking medium (Cheese Agar)



Tomme de Savoie



Goat cheese

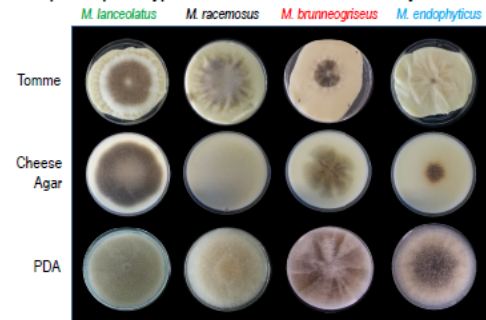
VALIDATION ON 3 « NATURAL » MATRICES / 4 TEMPERATURES (5, 10, 15 and 20°C)

Main results

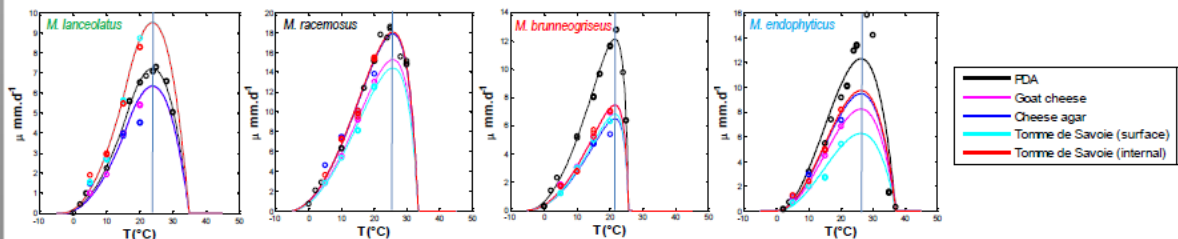
- Examples of Cardinal values of growth (minimum, optimum, maximum) and optimal growth speed (μ_{opt}) obtained for the temperature parameter on PDA medium (μ_{opt} determined using cheese matrices were indicated)

Species	Temperature on PDA				μ_{opt} (±SD) on cheese matrices			
	Tmin (±SD)	Topt (±SD)	Tmax (±SD)	μ_{opt} (±SD)	Cheese agar	Goat cheese	Tomme (surface)	Tomme (internal)
<i>M. fuscus</i>	4.97 (1,21)	24.49 (0,52)	32.83 (0,90)	6.45 (0,26)	9.89 (2,54)	6.55 (1,08)	10.05 (2,14)	11.18 (2,55)
<i>M. lanceolatus</i>	-2.35 (0,35)	24.76 (0,26)	33,12 (0,56)	7.25 (0,15)	6,35 (0,51)	6,29 (0,16)	9,47 (0,34)	9,46 (0,43)
<i>M. racemosus</i>	-5.65 (0,49)	25,77 (0,25)	33,53 (0,77)	17,84 (0,34)	17,89 (0,88)	15,26 (0,08)	14,41 (0,25)	18,03 (0,47)
<i>M. brunneogriseus</i>	-4,99 (0,45)	21,55 (0,24)	25,76 (0,15)	12,13 (0,26)	6,48 (0,33)	7,46 (0,21)	6,81 (0,12)	7,44 (0,21)
<i>M. spinosus</i>	-1,91 (0,22)	26,88 (0,30)	37,32 (1,19)	14,67 (0,17)	11,30 (0,73)	10,09 (0,42)	6,80 (0,27)	10,20 (0,47)
<i>M. circinelloides</i>	-1,12 (0,36)	29,33 (0,33)	40,73 (0,63)	11,64 (0,28)	11,90 (0,92)	11,15 (0,35)	10,04 (0,15)	10,73 (0,43)
<i>M. endophyticus</i>	0,47 (0,94)	26,30 (0,83)	37,08 (0,08)	12,31 (0,63)	9,48 (0,50)	8,23 (0,31)	6,25 (0,37)	9,73 (0,83)

- Examples of phenotypic differences observed after 4 days at 15°C



- Cardinal models obtained experimentally for the temperature factor for *M. lanceolatus*, *M. racemosus*, *M. brunneogriseus*, *M. endophyticus*



Conclusions & Perspectives

- Growth data obtained for "natural" matrices will be used to optimize a predictive tool. This tool may serve to improve technological use of ripening cultures and to better control undesirable species.
- Differences of behavior were observed among the 7 *Mucor* species. Technological species were more adapted to cheese matrices than other species.
- Complementary proteomic and genomic analyses are in course to identify proteins/genes potentially involved in the adaptation of *Mucor* species to the cheese matrix.



The 10th International Mycological Congress, Bangkok, Thailand 3-8 August 2014

② Morin-Sardin S, Rigalma K, Coroller L, Jany JL, Coton E. Predictive modeling of the impact of abiotic factors on the growth of *Mucor* spp. associated with cheese. 24th International ICFMH Conference FOOD MICRO 2014, Nantes, France, 1 au 4 septembre **2014**.

The *Mucor* genus includes ubiquitous species found in the environment but also in raw materials and processed foodstuffs. Some species serve as technological microorganisms in various fermented products. In France, some *Mucor* spp. are used for the production of St. Nectaire and Tomme cheeses due to the typical organoleptic qualities they provide; while other species can cause cheese spoilage. In this context, the question of the adaptation of cheese technological and contaminant *Mucor* representative species to the cheese matrix is of interest. To date, the growth potential but also the positive and negative impacts of these species on cheese are still poorly known.

The aim of this work was to develop an integrated model for predicting the impact of abiotic factors on the growth of different *Mucor* species (contaminant or technological) on cheese matrices.

Radial growth as well as different morphological criteria of seven *Mucor* strains pertaining to: *M. circinelloides*, *M. racemosus*, *M. lanceolatus*, *M. fuscus*, *M. spinosus*, *M. brunneogriseus* commonly encountered in cheeses and *M. endophyticus*, a plant endophyte, were determined on a standard PDA medium in several abiotic conditions (0 to 20% NaCl; 0 to 50 °C, a_w from 0.84 to 0.99 and pH 1.8 to 13.6). Data collected were used to develop a predictive model for each species and abiotic parameters. The model accuracy was evaluated for the temperature factor by monitoring the growth of the seven species on a medium mimicking cheese but also on unripened cheeses.

Consistent predictions were obtained in most cases, underlining the robustness of the integrated model. Growth profiles obtained on PDA medium show significant differences, depending on the *Mucor* species and abiotic conditions. For some conditions exhibiting major phenotypic differences, a proteomic approach will be carried out to identify proteins potentially involved in the adaptation to the cheese matrix.

Keywords: *Mucor*, cheese, alteration flora, technological flora, predictive model.

Predictive modeling of the impact of abiotic factors on the growth of *Mucor* spp. associated with cheese

Morin-Sardin S, Rigalma K, Coroller L, Jany JL, Coton E.

Université de Brest, EA3882, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et d'Ecologie Microbienne, ESIB, Technopôle Brest Iroise, 29280 Plouzané, France.

E-mail: stephanie.morin-sardin@univ-brest.fr

Phone: +33 (0)6 84 30 03 98



Introduction

In the cheese making context, some *Mucor* spp. are used as technological microorganisms due to the organoleptic qualities they provide to some cheeses (e.g. Tomme and St Neactaire, Fig 1a), while on other cheeses these fungi can be responsible for spoilage (e.g. goat cheese, Fig 1b).

The aims of this work were:

- to elaborate, on a synthetic medium, a mathematical model predicting the impact of several abiotic factors on the growth of *Mucor* representative strains of species commonly encountered in cheeses as well as of a plant endophyte (as an outgroup);
- to validate this predictive model on a medium mimicking cheese as well as on unripened cheeses;
- to identify differential behaviors among *Mucor* species.

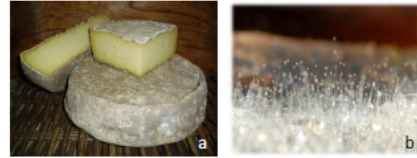
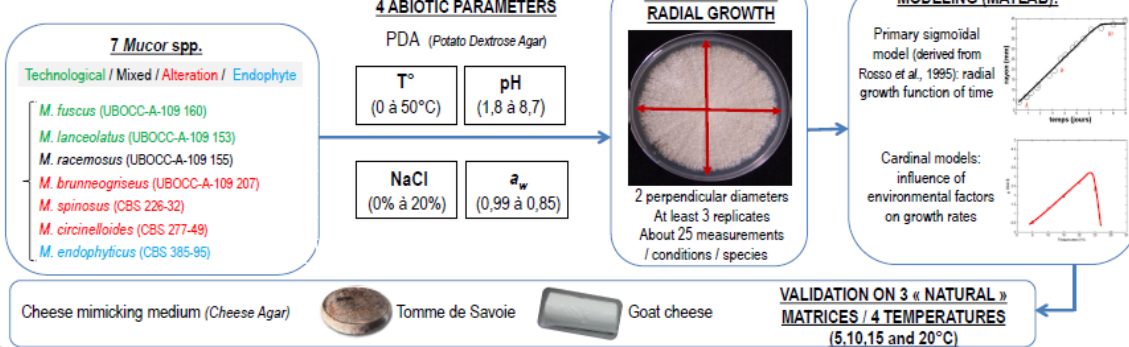


Figure 1. a) Tomme de Savoie, b) Spoilage defect observed on soft cheeses.

Materials & Methods

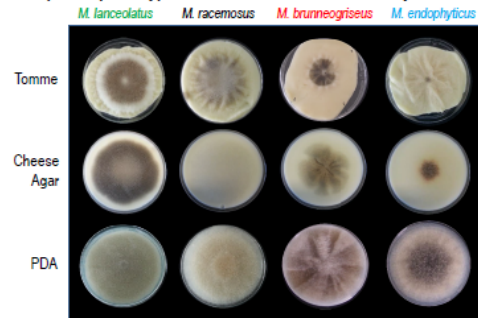


Main results

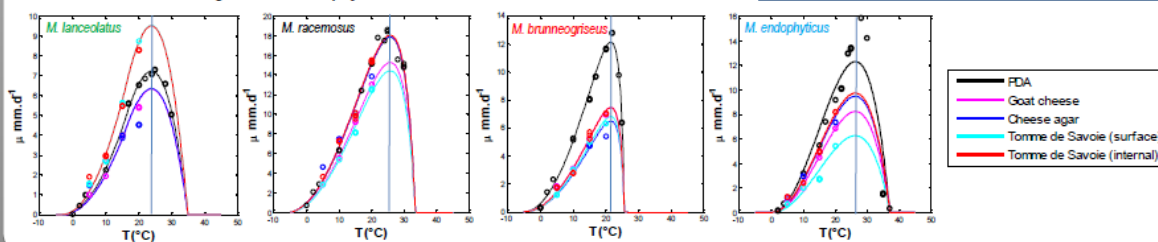
- Examples of Cardinal values of growth (minimum, optimum, maximum) and optimal growth speed (μ_{opt}) obtained for the temperature parameter on PDA medium (μ_{opt} determined using cheese matrices were indicated)

Species	Temperature on PDA				μ_{opt} (\pm SD) on cheese matrices			
	Tmin (\pm SD)	Topt (\pm SD)	Tmax (\pm SD)	μ_{opt} (\pm SD)	Cheese agar	Goat cheese	Tomme (surface)	Tomme (internal)
<i>M. fuscus</i>	4,97 (1,21)	24,49 (0,52)	32,83 (0,90)	6,45 (0,26)	9,89 (2,54)	6,55 (1,08)	10,05 (2,14)	11,18 (2,55)
<i>M. lanceolatus</i>	-2,35 (0,35)	24,76 (0,26)	33,12 (0,56)	7,25 (0,15)	6,35 (0,51)	6,29 (0,16)	9,47 (0,34)	9,46 (0,43)
<i>M. racemosus</i>	-5,65 (0,49)	25,77 (0,25)	33,53 (0,77)	17,84 (0,34)	17,89 (0,88)	15,26 (0,08)	14,41 (0,25)	18,03 (0,47)
<i>M. brunneogriseus</i>	-4,99 (0,45)	21,55 (0,24)	25,76 (0,15)	12,13 (0,26)	6,48 (0,33)	7,46 (0,21)	6,81 (0,12)	7,44 (0,21)
<i>M. spinosus</i>	-1,91 (0,22)	26,88 (0,30)	37,32 (1,19)	14,67 (0,17)	11,30 (0,73)	10,09 (0,42)	6,80 (0,27)	10,20 (0,47)
<i>M. circinelloides</i>	-1,12 (0,36)	29,33 (0,33)	40,73 (0,63)	11,64 (0,28)	11,90 (0,92)	11,15 (0,35)	10,04 (0,15)	10,73 (0,43)
<i>M. endophyticus</i>	0,47 (0,94)	26,30 (0,83)	37,08 (0,08)	12,31 (0,63)	9,48 (0,50)	8,23 (0,31)	6,25 (0,37)	9,73 (0,53)

- Examples of phenotypic differences observed after 4 days at 15°C



- Cardinal models obtained experimentally for the temperature factor for *M. lanceolatus*, *M. racemosus*, *M. brunneogriseus*, *M. endophyticus*



Conclusions & Perspectives

- Growth data obtained for "natural" matrices will be used to optimize a predictive tool. This tool may serve to improve technological use of ripening cultures and to better control undesirable species.
- Differences of behavior were observed among the 7 *Mucor* species. Technological species were more adapted to cheese matrices than other species.
- Complementary proteomic and genomic analyses are in progress to identify proteins/genes potentially involved in the adaptation of *Mucor* species to the cheese matrix.



The 24th International ICFMH Conference, Nantes, France, 1st - 4th september 2014

Photos © Stéphanie MORIN SARDIN / Laboratoire LUBEM
Except fig. 1b: Mucor Source: <http://fr.academic.ru/dic.nsf/frwiki/1197386>

③ Morin-Sardin S, Jany JL, Artigaud S, Bernay B, Pichereau V, Coton E, Madec S. Use of a proteomic approach for the determination of *Mucor* spp. adaptation markers to dairy environment. 13^{ème} European Conference on Fungal Genetics - Bridging fungal genetics, evolution and ecology (ECFG13), Paris, 3-6 avril **2016**.

Use of a proteomic approach for the determination of *Mucor* spp. adaptation markers to dairy environment

Stéphanie MORIN-SARDIN¹, Jean-Luc JANY¹, Sébastien ARTIGAUD², Benoît BERNAY³, Vianney PICHEREAU², Emmanuel COTON¹, Stéphanie MADEC¹

¹Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne (LUBEM), EA 3882, Université de Bretagne Occidentale, Plouzané, France

²Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin (LEMAR), UMR 6539, CNRS/UBO/IRD/Ifremer, Institut Universitaire Européen de la Mer, Université de Bretagne Occidentale, Plouzané, France

³Plateforme Proteogen, SFR ICORE, Université de Caen Basse-Normandie, Caen, France

The *Mucor* genus includes a large number of ubiquitous fungal species found in the environment, on raw materials or foodstuffs. These species are regularly encountered as contaminants of meat, fruits, vegetables or processed products, such as dairy products. In these contexts, their uncontrolled growth may induce undesirable effects including off-flavours, anomalous textures or discolorations. On the other hand, several *Mucor* species also present a technological interest, highly contributing to the texture and the sensory characteristics of many fermented products such as cheeses. This dichotomy raises the question of the adaptation of some species and potentially of domestication processes. A recent work focusing on the effect of abiotic factors on *Mucor* spp. growth (Morin-Sardin *et al.*, 2016) reported that *Mucor* strains belonging to species regularly used for their technological potential showed higher optimal growth rates than contaminant strains on cheese analog and cheese compared to synthetic medium. In this context, we studied the molecular mechanisms involved in the adaptation of technological species to dairy environment. Four technological, contaminant or non-cheese related *Mucor* species were grown on synthetic Potato Dextrose Agar (PDA) or cheese analog (Cheese Agar - CA) media during 7 days at 14°C and proteomes were compared using bidimensional gel electrophoresis. Differentially expressed proteins on PDA *versus* CA medium were analyzed by nanoLC-MALDI TOF/TOF followed by database searching using the Mascot program. Out of the 438 targeted proteins, 80% (351) were identified. Functional characterization steps are under progress in order to determine the main metabolic pathways involved in the adaptation to cheese matrices.

Morin-Sardin *et al.*, 2016. Food Micro. In press.

Use of a proteomic approach for the determination of *Mucor* spp. adaptation markers to dairy environment

Morin-Sardin S¹, Jany JL¹, Artigaud S², Bernay B³, Pichereau V², Coton E¹, Madec S¹.

¹ Université de Brest, EA3882, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et d'Écologie Microbienne, ESIAE, Technopôle Brest Iroise, 29280 Plouzané. ² Institut Universitaire Européen de la Mer (IUEM) - Laboratoire des sciences de l'environnement marin (LEMAR) - UMR 6539 CNRS/UBO/IRD/Ifremer, Technopôle Brest-Iroise, 29280 Plouzané. ³ Plateforme Proteogen, SFR ICORE, Université de Caen Basse-Normandie, 14 000 Caen.

E-mail: stephanie.morin-sardin@univ-brest.fr / Phone: +33 (0)6 84 30 03 98



Introduction

In the cheese making context, some *Mucor* spp. are used as technological microorganisms due to the organoleptic qualities they provide to some cheeses (e.g. Tomme and St Neactaire, Fig 1a), while on other cheeses these fungi can be responsible for spoilage (e.g. goat cheese, Fig 1b). This dichotomy raises both adaptation and domestication questions within this genus. A recent work focusing on the effect of abiotic factors on *Mucor* spp. growth (Morin-Sardin et al., 2016) reported that *Mucor* strains belonging to species regularly used for their technological potential showed higher optimal growth rates than contaminant strains on cheese analog and cheese compared to synthetic medium. The aim of this work was to study the molecular mechanisms involved in the adaptation of technological species to dairy environment.



Figure 1. a) Tomme de Savoie, b) Spoilage defect observed on soft cheeses.

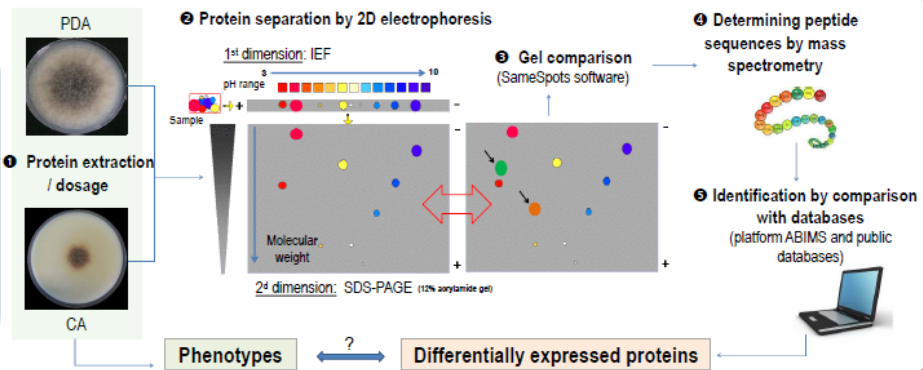
Materials & Methods

Two media:
Potato Dextrose Agar (PDA)
Cheese Agar (CA, mimicking cheese)

Four *Mucor* species:
M. lanceolatus UBOCC-A-109 153
M. racemosus UBOCC-A-109 155
M. circinelloides CBS 277-49
M. endophyticus CBS 385-95

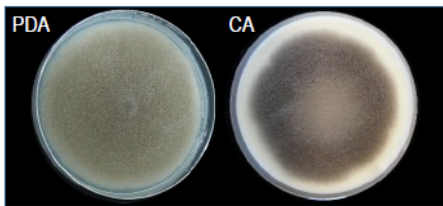
Technological / Mixed / Alteration / Endophyte

Parameter:
Temperature (14°C)



Examples of results

① Phenotypic differences observed for *M. lanceolatus* after 7 days at 14°C



⇒ *M. lanceolatus* showed a better growth in CA versus PDA while *M. circinelloides* and *M. endophyticus* growth was better on PDA medium. *M. racemosus* had a similar development on both media.

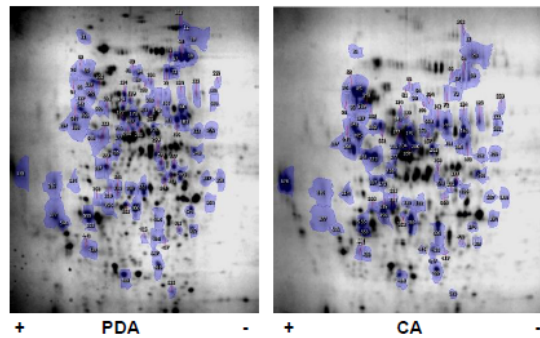
② Number of protein spots differentially expressed and identified in PDA/CA

Species	Putative Role	UP	DOWN
<i>M. lanceolatus</i> UBOCC-A-109153	Technological	46 / 35	56 / 40
<i>M. racemosus</i> UBOCC-A-109155	Technological &/or Contaminant	65 / 48	42 / 34
<i>M. circinelloides</i> CBS 277-49	Contaminant	68 / 67	28 / 27
<i>M. endophyticus</i> CBS 385-95	Endophyte (outgroup)	100 / 69	33 / 31

⇒ Differentially expressed proteins on PDA versus CA medium were analyzed by nanoLC-MALDI TOF/TOF followed by database searching using the Mascot program. Out of the 438 targeted proteins, 351 (80%) were identified.

③ 2D gels obtained after optimisation of the extraction and separation parameters for *M. lanceolatus* (after 7 days at 14°C)

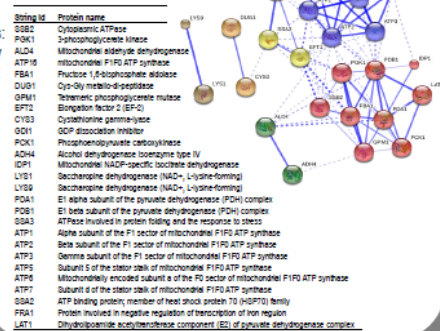
[Blue areas correspond to protein spots differentially expressed (Anova: p -value ≤ 0.02 ; fold > 1.5)]



④ Example of protein-protein interactions between proteins of *M. lanceolatus* up-regulated in CA medium.

[Network visualized using STRING DB (<http://string-db.org/>) by homology with database of *S. cerevisiae*. This is the confidence view.

Stronger associations are represented by thicker lines. Blue bubbles: proteins involved in energy metabolism; Red bubbles: gluconeogenesis / glycolysis.]



Conclusions & Perspectives

- Various phenotypic differences confirmed among the 4 *Mucor* species studied (color, density, sporulation).
- Successful use for the first time of a proteomic approach to study *Mucor* adaptation to cheese matrices, yielding to the identification of 351 differentially expressed proteins.
- Functional characterization steps and metabolomics analyses under progress in order to determine the main metabolic pathways involved in the cheese matrices adaptation.



Morin-Sardin S. et al. (2016) Food Microbiology 56: 69 - 79.
Photos © Stéphanie MORIN SARDIN / Laboratoire LUBEM.
Except fig.1b. *Mucor* Source: <http://academic.oup.com/nf/mfwiki/1197386>



5) Présentations écrites lors de congrès nationaux :

① Morin-Sardin S, Madec S, Artigaud S, Pichereau V, Jany JL, Coton E. Approche protéomique pour l'étude de l'adaptation des *Mucor* aux fromages. 11^{ème} Congrès National de la SFM, Institut Pasteur, Paris, 23 au 25 mars **2015**.

Le genre *Mucor* regroupe des espèces de champignons basaux ubiquistes présentes dans l'environnement et dans certaines matières premières et produits transformés. Dans le contexte fromager et en fonction du fromage considéré, les *Mucor* peuvent correspondre à des microorganismes d'altération (fromages frais et à pâte molle) ou à des microorganismes technologiques (Tomme, St Nectaire). Dans ce dernier cas, leur production d'enzymes lipolytiques et protéolytiques contribue aux qualités organoleptiques et nutritionnelles attendues des produits finis. Une étude récemment menée sur l'impact de paramètres abiotiques (température, pH, aw, teneur en NaCl) sur différentes souches fromagères technologiques et/ou contaminantes ainsi qu'une souche endophyte de *Mucor* a permis de mettre en évidence des différences marquées de croissance et de phénotype entre les souches testées. Ces différences suggèrent l'existence d'une adaptation des souches technologiques aux matrices fromagères. Dans ce contexte, l'objectif de ce travail a été de mettre en place une approche protéomique permettant d'identifier les principales protéines intracellulaires potentiellement impliquées dans l'adaptation à la matrice fromagère de souches technologiques. L'étude du protéome de 3 souches fromagères technologiques et/ou contaminantes, *M. circinelloides* (CBS 277-49), *M. lanceolatus* (UBOCC-A-109 153), *M. racemosus* (UBOCC-A-109 155) et d'une souche endophyte [*M. endophyticus* (CBS 385-95)] a été réalisée sur milieu artificiel standard Potato Dextrose Agar (PDA) et sur matrice synthétique mimant le fromage « cheese agar » en fonction du facteur abiotique température. Une valeur de 14°C, représentative des procédés de fabrication des fromages, a été sélectionnée pour l'étude. Après une étape d'optimisation de l'extraction protéique, de l'isoélectrofocalisation et de la SDS-page, des différences d'expression de protéines ont pu être mises en évidence pour une même souche en fonction du milieu, ainsi qu'entre différentes souches pour un même milieu. Ces protéines sont en cours d'identification par spectrométrie de masse. Cette étude est, à notre connaissance, la première à proposer une approche protéomique pour l'étude des *Mucor*.

Mots clés : *Mucor* ; Fromages ; Flore d'altération ; Flore technologique ; Adaptation ; Protéome.

A proteomic approach to study the adaptation of *Mucor* spp. to cheeses



Morin-Sardin S¹, Jany JL¹, Artigaud S², Pichereau V², Coton E¹, Madec S¹.
¹ Université de Brest, EA3882, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et d'Ecologie Microbienne, ESIB, Technopôle Brest Iroise, 29280 Plouzané. ² Institut Universitaire Européen de la Mer (IUEM) - Laboratoire des sciences de l'environnement marin (LEMAR) - UMR 6539 CNRS/UBO/IRD/Ifremer, Technopôle Brest-Iroise, 29280 Plouzané.
 E-mail: stephanie.morin-sardin@univ-brest.fr / Phone: +33 (0)6 84 30 03 98



Introduction

In the cheese making context, some *Mucor* spp. are used as technological microorganisms due to the organoleptic qualities they provide to some cheeses (e.g. Tomme and St Nectaire, Fig 1a), while on other cheeses these fungi can be responsible for spoilage (e.g. goat cheese, Fig 1b). A recent study made in our laboratory on technological and contaminant representative strains of *Mucor* (Sardin et al., submitted) showed that high growth and phenotype variabilities can be observed for a same strain placed in different environments but also between different strains in identical conditions. The aim of this work was to develop and use a proteomic approach to identify the main intracellular proteins involved in these variations, with a special interest on the mechanisms of adaptation of technological strains to cheese matrices.

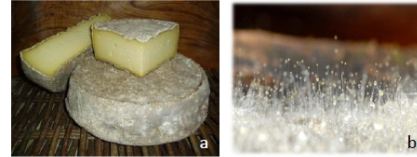
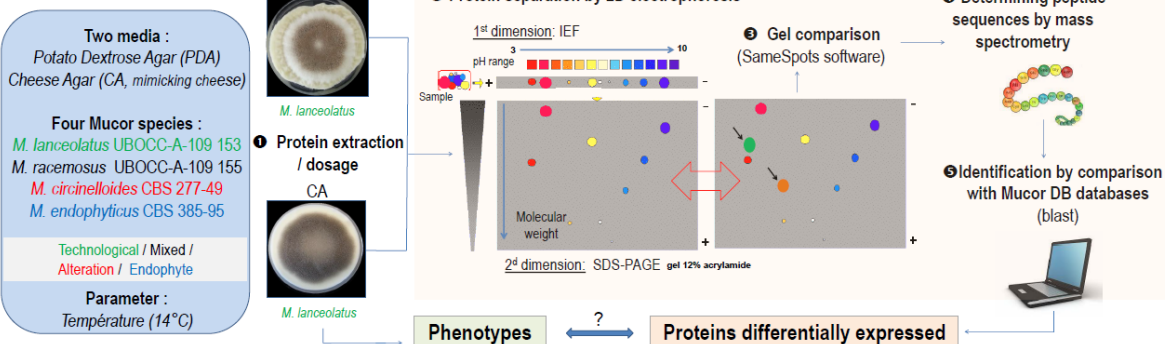


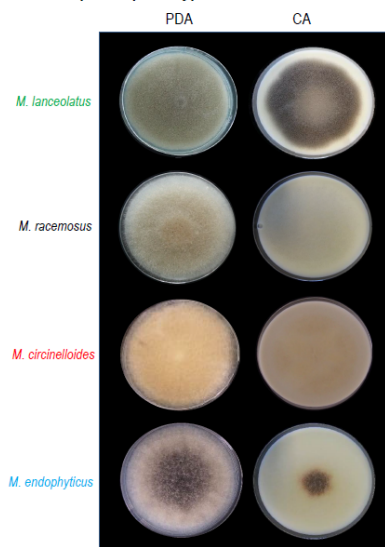
Figure 1. a) Tomme de Savoie, b) Spoilage defect observed on soft cheeses.

Materials & Methods



Main results

➤ Examples of phenotypic differences observed after 7 days at 14°C

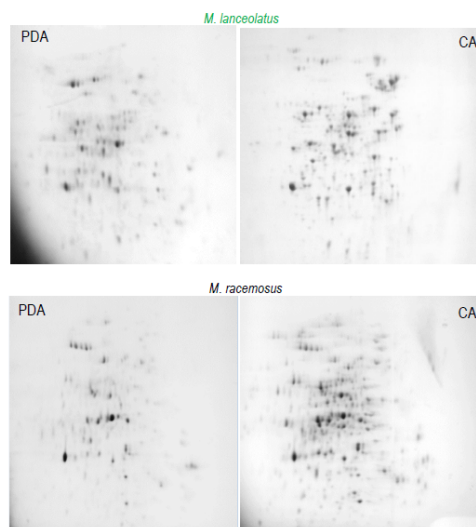


M. Lanceolatus shows a better growth in CA versus PDA while *M. circinelloides* and *M. encyphiticus* prefer PDA medium. *M. racemosus* has a similar development in both media.

Proteins involved in these phenotype differences were extracted adding several steps in the classical protocole to optimize the protein recovery and allow an accurate separation (precipitation with Acetone-TCA, nuclease and anti-protease treatment, ...).

A higher quantity and variety of proteins was produced in CA versus PDA for all *Mucor* representative strains tested. Intra and inter-specific differences of expression were observed. Identification of these proteins/functions will allow to understand the mechanism of adaptation of *Mucor* species to cheese matrices.

➤ Examples of 2D gels obtained after optimisation of the extraction and separation parameters for *M. lanceolatus* and *M. racemosus* (after 7 days at 14°C)



Conclusions & Perspectives

- Many phenotypic differences were confirmed among the 4 *Mucor* species studied (color, density, sporulation).
- Use for the first time of a proteomic approach to study the adaptation of *Mucor* to cheese matrices. Identification of proteins differentially expressed extracted from 2D gels is in progress.
- Complementary metabolomic and genomic analyses are in progress to identify proteins/genes/metabolites potentially involved in the adaptation of *Mucor* species to the cheese matrix.



11^{ème} Congrès de la Sfm
 23 au 25 mars 2015 – Institut Pasteur, Paris

Photos © Stéphanie MORIN SARDIN / Laboratoire LUBEM
 Except fig. 1b: Mucor Source: <http://fr.academic.ru/dic.nst/frwiki/1197386>

© Morin-Sardin S, Rigalma K, Coroller L, Jany JL, Coton E Impact de facteurs abiotiques sur la croissance de *Mucor* spp. en environnement fromager. Colloque SFR ScInBioS_IBSAM, Brest, mai 2015.

Le genre *Mucor* regroupe des espèces de champignons basaux ubiquistes présentes dans l'environnement mais aussi dans des matières premières et/ou des produits transformés. Dans le contexte fromager, et en fonction du fromage considéré, les *Mucor* n'ont pas le même rôle. Dans les fromages frais et à pâte molle (bûche de chèvre, Camembert), ils peuvent être assimilés à des microorganismes d'altération responsables de défauts de type « poil de chat ». Au contraire, dans les Tomme et Saint-Nectaire, ils correspondent à des microorganismes technologiques producteurs de lipases et de protéases participant au développement des qualités organoleptiques et nutritionnelles des produits. L'objectif de ce travail était de comprendre et d'évaluer le comportement d'espèces technologiques et d'espèces contaminantes pour différents facteurs abiotiques clés de la production fromagère. La croissance radiale et les caractéristiques morphologiques de six souches fromagères appartenant à six espèces technologiques et/ou contaminantes (*M. brunneogriseus* (CBS 129-41), *M. circinelloides* (CBS 277-49), *M. fuscus* (UBOCC-A-109 160), *M. lanceolatus* (UBOCC-A-109 153), *M. racemosus* (UBOCC-A-109 155), *M. spinosus* (CBS 226-32)) et d'une souche de l'espèce endophyte *M. endophyticus* (CBS 385-95) ont été déterminées sur un milieu artificiel standard Potato Dextrose Agar (PDA) en fonction de différents paramètres environnementaux (teneur en NaCl de 0 à 20% ; températures de 0 à 50°C, a_w de 0,85 à 0,99 et pH de 1,8 à 8,7). Les cinétiques de croissance radiales ont été ajustées et le taux de croissance a été modélisé en fonction des quatre facteurs abiotiques pour chacune des espèces. A partir des limites de croissance estimées en PDA, des prévisions de croissance sur deux matrices fromagères (bûche de chèvre et Tomme de Savoie non affinées) et un milieu synthétique mimant le fromage (*cheese agar*) ont été réalisées à différentes températures. Ces prévisions sont en accord avec les valeurs expérimentales obtenues. Des différences phénotypiques marquées ont été observées au sein d'une même espèce en fonction des variations d'un paramètre abiotique et du milieu de culture ainsi qu'entre espèces soumises à des conditions identiques. Les résultats obtenus suggèrent que les espèces technologiques présentent une meilleure adaptation aux matrices fromagères que les espèces contaminantes ou l'espèce endophyte qui se développent peu et/ou après une phase de latence importante. Une approche protéomique est en cours afin d'identifier les protéines témoignant de l'adaptation à la matrice fromagère.

Mots clés : *Mucor* ; Fromages ; Flore d'altération ; Flore technologique ; Physiologie ; Modèle prévisionnel de croissance ; Protéomique.

③ Morin-Sardin S, J, any JL, Artigaud S, Pichereau V, Coton E, Madec S. Use of a proteomic approach for the determination of *Mucor* spp. adaptation markers to dairy environment. Gen2Bio, Saint-Brieuc, 31 mars 2016.

Utilisation d'une approche protéomique pour déterminer les marqueurs d'adaptation de *Mucor* spp. à l'environnement laitier

Stéphanie MORIN-SARDIN¹, Jean-Luc JANY¹, Sébastien ARTIGAUD², Benoît BERNAY³, Vianney PICHEREAU², Emmanuel COTON¹, Stéphanie MADEC¹

¹Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne (LUBEM), EA 3882, Université de Bretagne Occidentale, Plouzané, France

²Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin (LEMAR), UMR 6539, CNRS/UBO/IRD/Ifremer, Institut Universitaire Européen de la Mer, Université de Bretagne Occidentale, Plouzané, France

³Plateforme Proteogen, SFR ICORE, Université de Caen Basse-Normandie, Caen, France

Le genre *Mucor* est composé d'espèces fongiques ubiquistes fréquemment rencontrées comme contaminantes sur les produits alimentaires où elles peuvent être à l'origine d'effets indésirables. Plusieurs espèces présentent également un intérêt technologique, contribuant au développement de la texture et des caractéristiques sensorielles de produits fermentés.

Cette dichotomie soulève la question d'une adaptation de certaines espèces à cet environnement particulier au travers de processus de domestication. Nous avons récemment montré que des souches de *Mucor* appartenant aux espèces à potentiel technologique ont des taux de croissance optimaux supérieurs à ceux des souches contaminantes sur milieu mimant le fromage ou matrices fromagères, en comparaison à un milieu synthétique.

Dans ce contexte, nous avons étudié les mécanismes moléculaires impliqués dans l'adaptation des espèces technologiques à l'environnement fromager. Quatre souches de *Mucor* sélectionnées parmi des espèces technologiques, contaminantes ou non-associées aux fromages ont été mises en culture durant 7 jours à 14°C sur milieu synthétique Potato Dextrose Agar (PDA) ou milieu mimant le fromage (Cheese Agar - CA) et leurs protéomes ont été comparés par électrophorèse bidimensionnelle. Les protéines exprimées de manières différentes sur milieu PDA versus CA ont été analysées par nanoLC-MALDI TOF/TOF et identifiées avec le programme Mascot en utilisant des génomes de référence séquencés par notre laboratoire et disponibles sur la plateforme ABIMS de Roscoff ainsi que des bases de données publiques. Ces génomes de *Mucor* sont en cours d'annotation, aidée notamment par une approche RNAseq impliquant la plateforme BiogenOuest de Nantes. Parmi les 438 protéines présentant des variations d'expression, 80% (351) ont été identifiées. Une phase de caractérisation fonctionnelle de ces protéines est actuellement en cours pour tenter de déterminer les voies métaboliques impliquées dans l'adaptation aux matrices fromagères.

Morin-Sardin *et al.*, 2016. Food Micro. In press.

Use of a proteomic approach for the determination of *Mucor* spp. adaptation markers to dairy environment

Morin-Sardin S¹, Jany JL¹, Artigaud S², Bernay B³, Pichereau V², Coton E¹, Madec S¹.

¹ Université de Brest, EA3882, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et d'Ecologie Microbienne, ESIB, Technopôle Brest-Iroise, 29280 Plouzané. ² Institut Universitaire Européen de la Mer (IUEM) - Laboratoire des sciences de l'environnement marin (LEMAR) - UMR 6539 CNRS/UBO/IRD/Ifremer, Technopôle Brest-Iroise, 29280 Plouzané. ³ Plateforme Proteogen, SFR ICORE, Université de Caen Basse-Normandie, 14 000 Caen.

E-mail: stephanie.morin-sardin@univ-brest.fr / Phone: +33 (0)6 84 30 03 98



Introduction

In the cheese making context, some *Mucor* spp. are used as technological microorganisms due to the organoleptic qualities they provide to some cheeses (e.g. Tomme and St Neactaire, Fig 1a), while on other cheeses these fungi can be responsible for spoilage (e.g. goat cheese, Fig 1b). This dichotomy raises both adaptation and domestication questions within this genus. A recent work focusing on the effect of abiotic factors on *Mucor* spp. growth (Morin-Sardin *et al.*, 2016) reported that *Mucor* strains belonging to species regularly used for their technological potential showed higher optimal growth rates than contaminant strains on cheese analog and cheese compared to synthetic medium. The aim of this work was to study the molecular mechanisms involved in the adaptation of technological species to dairy environment.

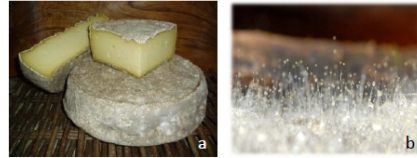


Figure 1. a) Tomme de Savoie, b) Spoilage defect observed on soft cheeses.

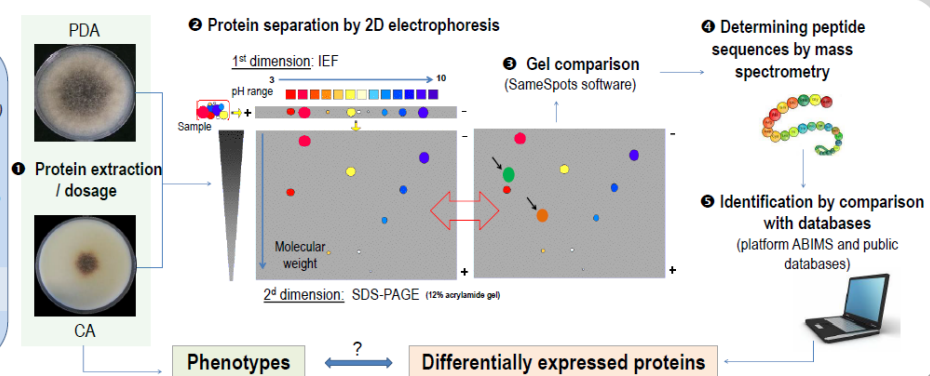
Materials & Methods

Two media:
Potato Dextrose Agar (PDA)
Cheese Agar (CA, mimicking cheese)

Four *Mucor* species:
M. lanceolatus UBOCC-A-109 153
M. racemosus UBOCC-A-109 155
M. circinelloides CBS 277-49
M. endophyticus CBS 385-95

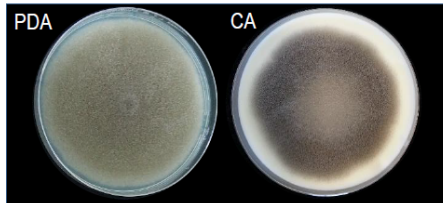
Technological / Mixed / Alteration / Endophyte

Parameter:
Temperature (14°C)



Examples of results

① Phenotypic differences observed for *M. lanceolatus* after 7 days at 14°C



⇒ *M. lanceolatus* showed a better growth in CA versus PDA while *M. circinelloides* and *M. endophyticus* growth was better on PDA medium. *M. racemosus* had a similar development on both media.

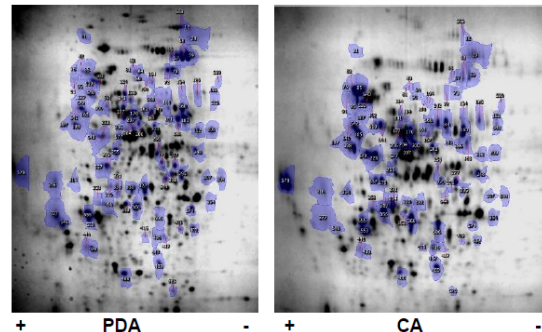
③ Number of protein spots differentially expressed and identified in PDA/CA

Species	Putative Role	UP	DOWN
<i>M. lanceolatus</i> UBOCC-A-109153	Technological	46 / 35	56 / 40
<i>M. racemosus</i> UBOCC-A-109155	Technological &/or Contaminant	65 / 48	42 / 34
<i>M. circinelloides</i> CBS 277-49	Contaminant	68 / 67	28 / 27
<i>M. endophyticus</i> CBS 385-95	Endophyte (outgroup)	100 / 69	33 / 31

⇒ Differentially expressed proteins on PDA versus CA medium were analyzed by nanoLC-MALDI TOF/TOF followed by database searching using the Mascot program. Out of the 438 targeted proteins, 351 (80%) were identified.

② 2D gels obtained after optimisation of the extraction and separation parameters for *M. lanceolatus* (after 7 days at 14°C)

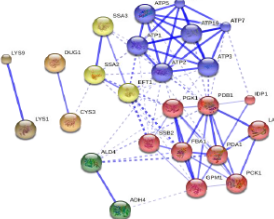
[Blue areas correspond to protein spots differentially expressed (Anova: *p*-value ≤ 0.02 ; fold > 1.5)]



④ Example of investigation of protein interactions obtained for *M. lanceolatus* in CA medium.

[Network visualized using STRING DB by homology with database of *S. cerevisiae*]

⇒ Blue and red bubbles correspond to proteins involved in energy metabolism and gluconeogenesis / glycolysis respectively.



Conclusions & Perspectives

- Various phenotypic differences confirmed among the 4 *Mucor* species studied (color, density, sporulation).
- Successful use for the first time of a proteomic approach to study *Mucor* adaptation to cheese matrices, yielding to the identification of 351 differentially expressed proteins.
- Functional characterization steps and metabolomics analyses under progress in order to determine the main metabolic pathways involved in the cheese matrices adaptation.



Gen2Bio 2016
31 mars 2016 – Palais des Congrès, Saint-Brieuc



Photos © Stéphanie MORIN SARDIN / Laboratoire LUBEM.
Except fig. 1b: Mucor Source: <http://fr.academic.ru/dic.nst/fr/wiki/1197386>

Morin-Sardin S., Rigalma K., Coroller L., Jany JL., Coton E. (2016). Determination of seven *Mucor* spp. growth behavior in relation to cheesemaking conditions. *Food Microbiology* 56, 69 - 79.

6) Présentations lors de journées de l'ED SICMA :

① Morin-Sardin S, Rigalma K, Coroller L, Jany JL, Coton E. Impact de facteurs abiotiques sur la croissance de *Mucor* spp. Associés aux fromages. 3^{ème} Journée des Doctorants de l'École Doctorale SICMA, Brest, septembre **2013**.

Le genre *Mucor* appartient au sous-phylum des Mucoromycotina, un groupe de champignons basaux par rapport aux champignons supérieurs. Ce genre regroupe des espèces ubiquistes puisqu'on les retrouve dans l'environnement, dans des prélèvements de sol (Farrow, 1954 ; Pandey & al., 1990 ; Domsch & al., 2007), d'air et de poussière (Bagy & Gohar 1988 ; Bokhary & Parvez 1995) mais aussi dans des matières premières et/ou des produits transformés. De nombreuses espèces de *Mucor* sont susceptibles de provoquer des altérations sur les denrées alimentaires comme les viandes, les fruits ou les légumes frais (Lugauskas et al., 2005 ; Hocking, 2009) ou encore les produits élaborés comme les produits laitiers (Foschino et al., 1993; Hayaloglu & Kirbag, 2007; Hocking, 2009). Dans le contexte fromager, et en fonction du fromage considéré, les *Mucor* seront considérés soit comme des microorganismes d'altération, du fait par exemple de la formation du défaut « poils de chat » observé sur les fromages à pâte molle (Bärtschi & Berthier 1994), soit comme des microorganismes technologiques (Tomme, St nectaire). En effet, plusieurs espèces de *Mucor* produisent des enzymes d'intérêt technologique comme des lipases (Huang et al., 1976) et des protéases (Zhang & Zhao, 2010) qui participent au développement des qualités organoleptiques et nutritionnelles des fromages (Fox & Mc Sweeney, 2004).

Si les *Mucor* sont rencontrés dans différents environnements, certaines espèces semblent donc particulièrement adaptées à la niche fromagère (Hermet & al., 2012). Se pose alors la question de l'adaptation des dites espèces à cette matrice ainsi qu'aux technologies de production. D'autre part, des données concernant leurs potentialités, positives ou négatives, dans ces conditions font défaut. Dans ce contexte, les objectifs du projet MUCOROMIC sont i) de comparer l'impact de facteurs abiotiques (T° , a_w , [NaCl], pH, milieu de culture) sur la croissance de *Mucor* d'origine fromagère et d'autres origines puis d'identifier, par des approches génomiques et protéomiques complémentaires, les supports de cette adaptation à la matrice fromagère.

Dans un premier temps, les valeurs cardinales de croissance ainsi que divers critères morphologiques de souches fromagères (technologues et/ou contaminantes) de *M. circinelloides* (CBS 277-49), *M. racemosus* (UBOCC-A-109 155), *M. lanceolatus* (UBOCC-A-109 153), *M. fuscus* (UBOCC-A-109 160), *M. spinosus* (CBS 226.32), *M. brunneogriseus* (UBOCC-A-109 207), et d'une souche non fromagère de *M. endophyticus* (CBS 385-95) ont été déterminés dans différentes conditions de cultures (milieu standard PDA, milieu YES et milieu mimant le fromage) en incluant des variations de facteurs d'environnement (teneur en NaCl de 0% à 20% ; températures de 0°C à 50°C, a_w de 0,98 à 0,82 et pH de 3 à 10).

Les résultats obtenus mettent en évidence des différences notables de comportement. L'ensemble des données recueillies est actuellement utilisé pour l'élaboration de modèles de croissance. Pour les conditions où des différences phénotypiques majeures sont observées, l'approche physiologique est couplée à une approche protéomique visant à identifier les protéines exprimées de façon différentielle, et donc potentiellement marqueurs d'adaptation.

Mots clés : *Mucor* ; Fromages ; Flore d'altération ; Flore technologique ; Physiologie ; Protéomique ; Génomique.

IMPACT DE FACTEURS ABIOTIQUES SUR LA CROISSANCE DE MUCOR spp. ASSOCIÉS AUX FROMAGES



Morin-Sardin S, Jany JL, Rigalma K, Coroller L, Cotton E.

Université de Brest, UEB, EA3882, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et d'Ecologie Microbienne, ESIAB, Technopôle Brest Iroise, 29 280 Plouzané, France.
E-mail : stephanie.sardin-morin@univ-brest.fr



Introduction

Dans le **contexte fromager**, les moisissures du genre *Mucor* peuvent être considérées soit comme des microorganismes **technologiques** (Tomme, Saint-Nectaire ; Fig 1), soit comme des microorganismes d'**altération** (apparition de défauts comme le « poil de chat » ; Bärtschi & Berthier 1994). Les objectifs de cette étude sont i) de comparer l'**impact de facteurs abiotiques** (T° , a_w , [NaCl], pH, milieu de culture) sur la croissance de *Mucor* d'origine fromagère et d'autres origines et ii) d'identifier, par des approches génomiques et protéomiques complémentaires, les supports de cette **adaptation** à la matrice fromagère.

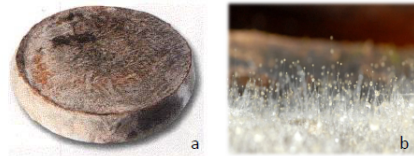


Figure 1. a) Tomme de Savoie, b) « poil de chat » observé sur les fromages à pâte molle

Matériel & Méthodes

7 ESPÈCES DE MUCOR :

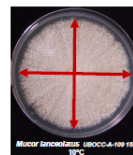
Technologique / Altération
Mixte / Non-fromagère

- M. circinelloides* (CBS 277-49)
- M. spinosus* (CBS 226.32)
- M. brunneogriseus* (UBOCC-A-109 207)
- M. racemosus* (UBOCC-A-109 155)
- M. lanceolatus* (UBOCC-A-109 153)
- M. fuscus* (UBOCC-A-109 160)
- M. endophyticus* (CBS 385-95)

5 FACTEURS :

T° (0 à 50°C)	pH (3 à 10)
Milieux	
- PDA (Potato Dextrose Agar)	
- mimant le fromage	
NaCl (0% à 20%)	a_w (0,99 à 0,85)

MESURES DE LA CROISSANCE RADIALE :



- mesures de 2 diamètres perpendiculaires
- mesures sur 3 réplicats
- environ 25 mesures / condition / espèce

Modélisation (MATLAB)

- ✓ Modèle sigmoïdal primaire (dérivé de Rosso, 1995) : évolution du diamètre du thalle fongique en fonction du temps.
- ✓ Modèles secondaires : modèles cardinaux décrivant l'influence de facteurs environnementaux sur le taux de croissance.

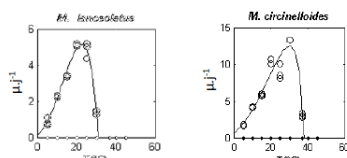
TRAITEMENT DES RÉSULTATS :

- Traitement des données (Excel)
- croissance / espèce / facteur

Résultats

Température :

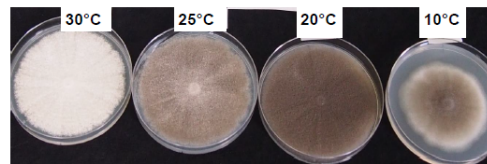
Effets de la température sur le taux de croissance. Exemple de profils obtenus pour *M. lanceolatus* et *M. circinelloides* :



Valeurs cardinales obtenues sur milieu PDA (premières approches, modélisation en cours) :

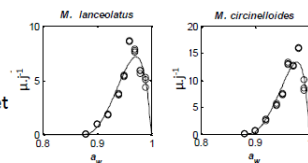
	Minimale	Optimale	Maximale
<i>Mucor fuscus</i>	... < 4°C	22°C	30°C
<i>M. racemosus</i>	... < 0°C	25°C	30°C
<i>M. lanceolatus</i>	0°C	25°C	30°C
<i>M. circinelloides</i>	0°C	25°C	37°C
<i>M. brunneogriseus</i>	... < 0°C	22°C	28°C
<i>M. spinosus</i>	0°C	24°C	30°C
<i>M. endophyticus</i>	2°C	30°C	37°C

Différences morphologiques chez *M. lanceolatus* sur milieu PDA en fonction de la température.

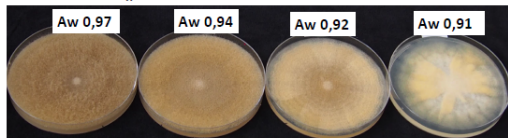


a_w :

Effets de l' a_w sur le taux de croissance. Exemple de profils obtenus pour *M. lanceolatus* et *M. circinelloides*.



Différences morphologiques chez *M. circinelloides* sur milieu PDA en fonction de l' a_w .



Conclusion & Perspectives

Les résultats obtenus mettent en évidence des différences notables de comportement en fonction des conditions testées. Des modèles de croissance sont en cours d'élaboration sur la base de ces résultats. Pour les conditions conduisant à des différences phénotypiques majeures, une approche protéomique, visant à identifier les protéines exprimées de façon différentielle et donc potentiellement marqueurs d'adaptation, sera employée.

② Morin-Sardin S, Rigalma K, Coroller L, Jany JL, Coton E. Modélisation prévisionnelle de l'impact de facteurs abiotiques sur la croissance de différentes espèces de *Mucor* associés aux matrices fromagères. 4^{ème} Journée des Doctorants de l'Ecole Doctorale SICMA, Brest, septembre 2014.

Modélisation prévisionnelle de l'impact de facteurs abiotiques sur la croissance de différentes espèces de *Mucor* associés aux matrices fromagères

Stéphanie MORIN-SARDIN, Karim RIGALMA, Louis COROLLER,
Jean-Luc JANY, Emmanuel COTON

Laboratoire Universitaire de Biodiversité et d'Ecologie Microbienne (LUBEM) - EA 3882 – ESIAB -
Technopole Brest Iroise – 29 280 Plouzané

Le genre *Mucor* regroupe des espèces de champignons basaux ubiquistes présentes dans l'environnement mais aussi dans des matières premières et/ou des produits transformés. Dans le contexte fromager, et en fonction du fromage considéré, les *Mucor* peuvent être assimilés à des microorganismes d'altération, du fait par exemple de la formation de défauts de type « poil de chat » observés sur les fromages frais et à pâte molle (bûche de chèvre, Camembert), ou à des microorganismes technologiques (Tomme, St Nectaire), producteurs de lipases et de protéases participant au développement des qualités organoleptiques et nutritionnelles des produits.

Ce projet intitulé MUCOROMIC a pour objectifs :

- i) d'investiguer, pour différents facteurs abiotiques clés de la production fromagère, les différences de comportement existants entre espèces technologiques et contaminantes et d'élaborer des modèles mathématiques prévisionnels de croissance spécifiques permettant à terme un meilleur contrôle du processus de production ;
- ii) d'identifier, par des approches protéomiques et génomiques complémentaires, les supports de l'adaptation à la matrice fromagère et les potentialités positives et négatives des espèces testées.

Les valeurs cardinales de croissance et les caractéristiques morphologiques de six souches fromagères technologiques et/ou contaminantes [*M. brunneogriseus* (UBOCC-A-109 207), *M. circinelloides* (CBS 277-49), *M. fuscus* (UBOCC-A-109 160), *M. lanceolatus* (UBOCC-A-109 153), *M. racemosus* (UBOCC-A-109 155), *M. spinosus* (CBS 226-32)] et d'une souche endophyte [*M. endophyticus* (CBS 385-95)] ont été déterminées sur un milieu artificiel standard Potato Dextrose Agar (PDA) en fonction de différents paramètres environnementaux (teneur en NaCl de 0% à 20% ; températures de 0°C à 50°C, a_w de 0,85 à 0,99 et pH de 1.8 à 8.7). Les résultats obtenus suggèrent que les espèces technologiques présentes une meilleure adaptation aux matrices fromagères que les espèces contaminantes ou endophytes qui se développent peu et/ou après une phase de latence importante. Les données générées ont été utilisées pour élaborer des modèles prévisionnels de croissance pour chacune des espèces dont la robustesse a été évaluée par comparaison avec les valeurs expérimentales obtenues pour le facteur abiotique « température », sur deux matrices fromagères (bûche de chèvre et Tomme de Savoie non affinées) et une matrice synthétique mimant le fromage « cheese agar ». Des différences phénotypiques marquées au sein d'une même espèce en fonction des variations d'un paramètre abiotique et du milieu de culture, et entre espèces soumises à des conditions identiques ont pu être observées. Pour certaines conditions importantes lors du procédé de fabrication du fromage, une approche protéomique visant à identifier les protéines exprimées de façon différentielle entre espèces contaminantes / endophytes et technologiques a été initiée.

Mots clés : *Mucor* ; Fromages ; Flore d'altération ; Flore technologique ; Physiologie ; Modèle prévisionnel de croissance ; Protéomique.

Predictive modeling of the impact of abiotic factors on the growth of *Mucor* spp. associated with cheese

Morin-Sardin S, Rigalma K, Coroller L, Jany JL, Coton E.

Université de Brest, EA3882, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et d'Ecologie Microbienne, ESAB, Technopôle Brest Iroise, 29280 Plouzané, France.

E-mail: stephanie.morin-sardin@univ-brest.fr

Phone: +33 (0)6 84 30 03 98



Introduction

During cheesemaking, some *Mucor* spp. are used as technological microorganisms due to the organoleptic qualities they provide to some cheeses (e.g. Tomme and St Nectaire, Fig 1a), while on other cheeses these fungi can be responsible for spoilage (e.g. goat cheese, Fig 1b).

The aims of this work were:

- elaborate, on a synthetic medium, a mathematical model predicting the impact of several abiotic factors on the growth of *Mucor* strains representative of species commonly encountered in cheeses and of a plant endophyte (as an outgroup);
- validate the predictions on a medium mimicking cheese as well as on unripened cheeses;
- evaluate the existence of different behaviors among *Mucor* species.

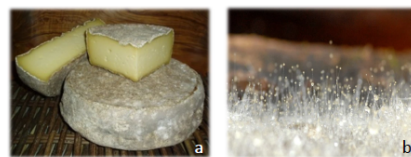


Figure 1. a) Tomme de Savoie, b) Spoilage observed on soft cheeses.

Materials & Methods

7 *Mucor* spp.

Technological / Mixed / Alteration / Endophyte

- M. fuscus* (UBOCC-A-109 160)
- M. lanceolatus* (UBOCC-A-109 153)
- M. racemosus* (UBOCC-A-109 155)
- M. brunneogriseus* (UBOCC-A-109 207)
- M. spinosus* (CBS 226-32)
- M. circinelloides* (CBS 277-49)
- M. endophyticus* (CBS 385-95)

4 ABIOTIC PARAMETERS

PDA (Potato Dextrose Agar)

T°

(0 to 50°C)

pH

(1,8 to 8,7)

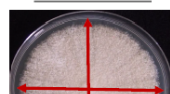
NaCl

(0% to 20%)

a_w

(0,99 to 0,85)

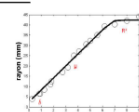
RADIAL GROWTH MEASUREMENT



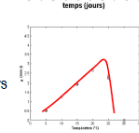
2 perpendicular diameters
At least 3 replicates
About 25 measurements / condition / species

MODELING :

Primary sigmoidal model (derived from Rosso *et al.*, 1995): radial growth as a function of time



Cardinal models: influence of environmental factors on growth rates



Cheese mimicking medium (Cheese Agar)



Tomme de Savoie



Goat cheese

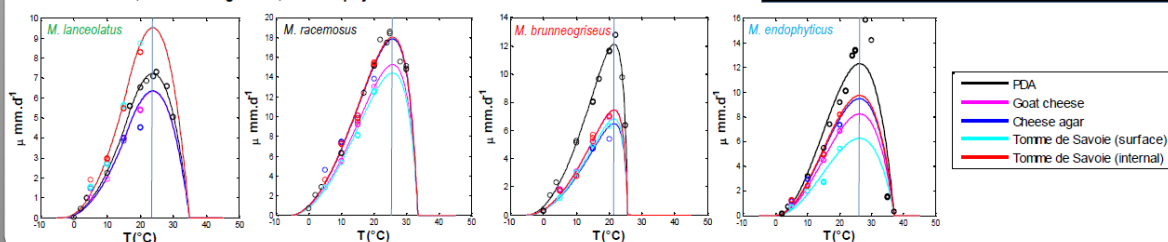
VALIDATION ON 3 TYPES OF CHEESE / 4 TEMPERATURES (5, 10, 15 and 20°C)

Main Results

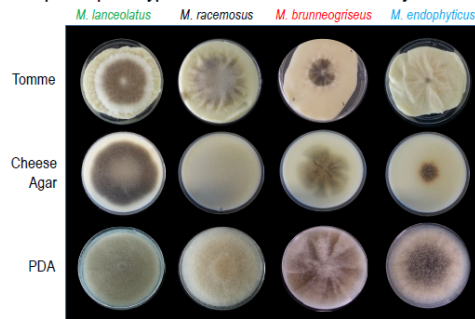
- Examples of cardinal values for growth (minimum, optimum, maximum) and optimal growth speed (μ_{opt}) obtained for temperature on PDA medium (μ_{opt} determined using cheese matrices were indicated)

Species	Temperature on PDA				μ_{opt} (±SD) on cheese matrices			
	Tmin (±SD)	Topt (±SD)	Tmax (±SD)	μ_{opt} (±SD)	Cheese agar	Goat cheese	Tomme (surface)	Tomme (internal)
<i>M. fuscus</i>	4,98 (1,22)	24,49 (0,52)	32,83 (0,90)	6,45 (0,26)	9,89 (2,54)	6,55 (1,08)	10,06 (2,14)	11,18 (2,55)
<i>M. lanceolatus</i>	-2,35 (0,35)	24,76 (0,26)	33,12 (0,56)	7,25 (0,15)	6,35 (0,51)	6,29 (0,16)	9,47 (0,34)	9,46 (0,43)
<i>M. racemosus</i>	-5,85 (0,49)	25,77 (0,25)	33,53 (0,77)	17,84 (0,34)	17,89 (0,88)	15,26 (0,08)	14,41 (0,25)	18,03 (0,47)
<i>M. brunneogriseus</i>	-4,99 (0,45)	21,55 (0,24)	25,76 (0,15)	12,13 (0,26)	6,48 (0,33)	7,46 (0,21)	6,81 (0,12)	7,44 (0,21)
<i>M. spinosus</i>	-1,91 (0,22)	26,88 (0,30)	37,32 (1,19)	14,67 (0,17)	11,30 (0,73)	10,09 (0,42)	6,80 (0,27)	10,20 (0,47)
<i>M. circinelloides</i>	-1,12 (0,36)	29,33 (0,33)	40,73 (0,63)	11,64 (0,28)	11,90 (0,92)	11,15 (0,35)	10,04 (0,15)	10,73 (0,43)
<i>M. endophyticus</i>	0,47 (0,94)	26,30 (0,83)	37,08 (0,08)	12,31 (0,63)	9,48 (0,50)	8,23 (0,31)	6,25 (0,37)	9,73 (0,53)

- Cardinal models experimentally obtained for the temperature factor for *M. lanceolatus*, *M. racemosus*, *M. brunneogriseus*, *M. endophyticus*



- Examples of phenotypic differences observed after 4 days at 15°C



Conclusions & Perspectives

- Growth data obtained for 3 types of cheese will be used to optimize the predictive tool. This tool may serve to improve technological uses of ripening cultures and to better control undesirable species.
- Differences of behavior were observed among the 7 *Mucor* species. Technological species were more adapted to cheese matrices than other species.
- Complementary proteomic and genomic analyses are in progress to identify proteins/genes potentially involved in *Mucor* species adaptation to cheese matrices.

Photos © S. Naphané MORIN SARDIN / Laboratoire LUBEM
Except fig. 1b: Mucor Source: <http://fr.academic.ru/dic.nsf/frwiki/1197396>

Annexe 4 : Formations continues

1) Formations financées par le groupe Merck – Schering Plough

↳ **PCR quantitative**

Du 11 au 13 mai 2015 (3 jours). FC3BIO, Lyon.

Objectifs :

- Connaitre tous les paramètres des cinétiques d'amplification et de dissociation et souligner leur importance dans les calculs de quantification
- Savoir designer des amorces / sondes et connaître l'impact de leur choix sur les résultats
- Trouver une bonne stratégie pour gagner beaucoup de temps et d'efficacité
- Comprendre l'importance de la rigueur extrême nécessaire dans cette technique à chaque étape afin d'obtenir reproductibilité et fiabilité des résultats

↳ **Anglais intensif**

Juin 2015 (5 jours). English Apart, Brest.

↳ **Analyse bioinformatique des séquences nucléiques et protéiques**

Du 23 au 25 septembre 2015 (3 jours). CNRS Formation, Paris.

Objectifs : Appréhender l'outil informatique dans le domaine de la biologie moléculaire, en particulier pour l'utilisation des bases de données et l'identification de caractéristiques biologiques simples

↳ **Bioinformatique : perfectionnement dans la recherche de similitudes entre séquences et identification**

Du 10 au 11 décembre 2015 (2 jours). CNRS Formation, Paris.

Objectifs :

- Approfondir ses connaissances théoriques et pratiques en bioinformatique
- Maîtriser le paramétrage et l'exploitation des résultats dans les programmes de comparaison de séquences

↳ **ISO 17 025 – Métrologie – Management et assurance de la qualité dans les laboratoires**

Du 16 au 18 février 2016 (3 jours). IMPLEX, Lyon.

Objectifs :

- Comprendre et mettre en œuvre l'ISO 17025 et les exigences du COFRAC dans les laboratoires
- Acquérir une méthodologie simple et efficace de construction d'un système de management de la qualité
- Adopter des logiques de simplification de systèmes de management de la qualité

2) Autres formations / participations à des manifestations

↳ Ateliers « End Note Web » le 17 mai 2013 ; « Faire une recherche dans une base de données scientifiques : Science Direct » le 6 janvier 2014 ; « Trouver l'information scientifique sur internet » le 17 janvier 2014 - Bibliothèque La Pérouse, Plouzané.

↳ Conférence du Dr Geneviève HERY-ARNAUD, « Microbiote et Homme, je t'aime moi non plus. Le modèle mucoviscidose », SFR ScInBioS le 31 mai 2013.

↳ Suivi des conférences et des posters présentés lors de la 3^{ème} journée des doctorants et Post-doctorants en Biologie-Santé en Bretagne - 21 juin 2013, Faculté de médecine de Brest.

↳ Présentation orale de l'avancement des travaux de Thèse lors de la journée des Doctorants du LUBEM. « Etude comparative de *Mucor* associés aux fromages : aspects taxonomique, génomique et fonctionnel », juillet 2013, juillet 2014 et juillet 2015.

↳ Présentation orale (en anglais) du projet de thèse « Comparative study of Mucor associated to cheese: taxonomic, genomic and functional aspects » à des collègues Roumains en visite au laboratoire, 9 juillet 2013.

↳ Présentation d'un poster à la Journée des doctorants de l'école doctorale SICMA, septembre 2013 à Télécom Bretagne - Plouzané et à Brest, septembre 2014.

↳ Formation de l'école doctorale SICMA : ZOTERO - session doctorants à Brest, 13 janvier 2014.

↳ Formation de l'école doctorale SICMA : Formation en bioinformatique sur la plate-forme bioinformatique de Rennes « Biogenouest », 10 juin 2014

Objectif : acquérir une vision d'ensemble de la bioinformatique afin de savoir quelle ressource ou outil utiliser de la manière la plus adaptée à un contexte particulier.

↳ Formation de l'école doctorale SICMA : stage intensif d'anglais (5 jours), 19 mai au 23 mai 2014 - UFR Sciences et Techniques à Brest.

Résumé

Dans le contexte fromager, les champignons filamenteux du genre *Mucor* ont un rôle ambivalent. En fonction du fromage considéré, ils peuvent être assimilés à des micro-organismes d'altération responsables de défauts de fabrication ou au contraire contribuer au développement des qualités organoleptiques des produits. Dans le cadre de ce travail, nous avons souhaité confirmer et objectiver la dichotomie classiquement faite en industrie fromagère entre espèces technologiques et espèces contaminantes, et investiguer les mécanismes d'adaptation potentiels mis en œuvre chez les espèces technologiques. La morphologie et la croissance radiale de 7 souches représentatives d'espèces technologiques, contaminantes et non-fromagères (endophyte) de *Mucor* ont été étudiées sur différents milieux (synthétique, mimant le fromage et fromager) en fonction de facteurs clés du processus de production des fromages (température, a_w , pH). Les valeurs cardinales de croissance ont été déterminées sur milieu synthétique, un modèle prédictif été proposé et validé sur matrices fromagères pour le facteur température et la meilleure faculté de croissance des souches technologiques sur milieux fromagers par rapport au milieu synthétique a été démontrée. Une approche de protéomique comparée a permis de décrire les voies métaboliques mises en jeu par 4 de ces souches dans les deux types d'environnement, fromager et non-fromager, et 35 protéines spécifiquement surexprimées par la souche technologique *M. lanceolatus* UBOCC-A-109153 sur milieu mimant le fromage ont été identifiées. Les avantages compétitifs associés à ces potentiels marqueurs d'adaptation vont faire l'objet d'investigations complémentaires.

Mots clés :

Mucor ; Fromages ; Flore technologique ; Flore d'altération ; Adaptation ; Physiologie ; Voies métaboliques ; Protéomique ; Métabolomique.

Abstract

In the cheese industry context, *Mucor* species exhibit an ambivalent behavior, as some species are essential technological organisms contributing to the required organoleptic characteristics of some cheeses while some others can be spoiling agents. The present study aimed at better understanding this ambivalence and investigating the putative adaptation mechanisms to cheese existing in *Mucor* technological species. Morphology and radial growth of 7 representative *Mucor* species: technological, contaminant and non-cheese related (plant endophyte) species were monitored on different media (synthetic, cheese-mimicking media and cheese) in function of key parameters for cheese manufacture (temperature, a_w , pH). Cardinal values were determined on synthetic medium and as a result a predictive model was proposed and validated on cheese matrices for the temperature parameter. Interestingly, cheese technological species exhibited higher optimal growth rates on cheese related matrices than on synthetic media, while the opposite was observed for non-technological species. A comparative proteomic approach allowed unraveling the main metabolic pathways playing a role in growth of 4 of the 7 studied strains on both synthetic medium and cheese-mimicking medium. This proteomic study also highlighted the occurrence of 35 proteins specifically expressed by the technological strains *M. lanceolatus* UBOCC-A-109153 on the cheese-mimicking medium. Putative competitive and adaptative advantages of these hypothetical adaptation markers will be tested through additional investigations.

Key words:

Mucor ; Cheese ; Spoilage ; Technological species ; Adaptation ; Physiology ; Metabolic pathways ; Proteomics ; Metabolomics.



Université de Bretagne Occidentale

3 rue des Archives - CS 93837 - F29238 Brest cedex 3