

Study of the genetic diversity of a lactic acid bacteria Carnobacterium maltaromaticum and its adaptation to gastro-intestinal environment of mammals

Abdur Rahman

▶ **To cite this version:**

Abdur Rahman. Study of the genetic diversity of a lactic acid bacteria Carnobacterium maltaromaticum and its adaptation to gastro-intestinal environment of mammals. Food and Nutrition. Université de Lorraine, 2013. English. NNT : 2013LORR0226 . tel-01750521

HAL Id: tel-01750521
https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01750521

Submitted on 29 Mar 2018

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.

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

UNIVERSITE DE LORRAINE

École Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires

Ecole Doctorale Sciences et Ingénierie Ressources Procédés Produits Environment (RP2E)

Laboratoire d'Ingénierie des Biomolécules – LIBio

THÈSE

Présentée à l'Université de Lorraine

Par

Abdur RAHMAN

pour l'obtention du titre de
Docteur de l'Université de Lorraine (UL)
Spécialité : Procédés Biotechnologiques et Alimentaires

Etude de la diversité génétique chez la bactérie lactique *Carnobacterium maltaromaticum* et de son adaptation à l'environnement gastro-intestinal de mammifères

Soutenue publiquement le 11 décembre 2013

Rapporteurs :

M. Jean-François CAVIN	Professeur d'Université, AgroSupDijon, Dijon, France
Mme Catherine SCHOULER	Chargé de Recherche HDR, INRA, Tours, France

Examinateurs :

Mme Anne-Marie REVOL-JUNELLES	Professeur, Université de Lorraine, Nancy, France (Directeur de thèse)
M. Frédéric BORGES	Maître de Conférences, Université de Lorraine, Nancy, France (Co-directeur de thèse)

Invités :

M. Benoît FOLIGNE	Chargé de Recherche HDR, Institut Pasteur Lille, Lille, France
M. Cyril BONTEMPS	Maître de Conférences, Université de Lorraine, Nancy, France
Mme Catherine CAILLIEZ-GRIMAL	Maître de Conférences HDR, UL, Nancy, France (Co-directeur de thèse)

I dedicate this work to my beloved parents

À mes chers parents

Remerciements

Ce travail s'est déroulé au Laboratoire d'Ingénierie des Biomolécules (LIBio) de l'ENSAIA-Université de Lorraine. Je remercie le Professeur Michel LINDER de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire.

J'exprime toute ma reconnaissance à Madame Anne-Marie REVOL-JUNELLES, Professeur à l'ENSAIA, Madame Catherine CAILLIEZ-GRIMAL, Maitre de conférences à l'ENSAIA et Monsieur Frédéric BORGES Maitre de conférences à l'ENSAIA pour avoir accepté de diriger ce travail et je leur exprime toute ma gratitude pour leur patience, leur encadrement, conseils ainsi que pour avoir patiemment corrigé ce document et les articles.

Je remercie HEC (Pakistan) pour avoir financé cette thèse, merci également à SFERE de m'avoir permis de réaliser ce travail dans de bonnes conditions.

Je remercie tous les membres du laboratoire avec lesquels j'ai vécu des moments inoubliables. Je remercie particulièrement Myriam, Sylvie et Arnaud pour leur aide précieuse.

Je voudrais sincerement remercie mes amis Amir Raza, Sohaib Shahid, Malik Khalid, Hasan Riaz, Rizwan ur Rehman, Javaid, Binod et Maira Shehryar pour leur soutien. Un grand remercie au Mariam Flear et Mariam Moussa pour partager du bonheur et la joie qui restra spécial pour moi. Je remercie de tout mon cœur Raza Hussain et Muhammad Imran pour leur soutien et discute phylosophique pour mieux comprendre la vie et pour partager des moments inoubliables. Je tien à remercier du fond de mon cœur Zeeshan Hafeez et Samina Zeeshan pour leur soutien « love and care » et rester à mes acote pendant les beau et les mauvais moments.

Une pensée particulière à mes parents, Sakhawat Hussain et Zainab Bibi, à mes deux soeurs Amna Batool et Marium Batool, mes deux frères Habib ur Rahman, Abdullah Sakhawat mon épouse Atia Rahman et mon fis Talha Rahman pour leur amour à distance et qui ont su rester très proches pendant ces quatre années.

Sommaire

Préambule - 1 -

I Revue bibliographique - 3 -

I.1 *Carnobacterium maltaromaticum* - 3 -

I.1.1 Systématique bactérienne - 3 -

I.1.2 Caractères physiologiques - 4 -

I.1.3 Méthodes de détection et d'isolement de *Carnobacterium* spp. - 4 -

I.1.3.1 Détection des Carnobacterium - 4 -

I.1.3.2 Méthodes d'isolement de Carnobacterium maltaromaticum - 5 -

I.1.4 Habitats - 6 -

I.1.4.1 Environnement - 6 -

I.1.4.2 Aliment - 7 -

I.2 Impact des carnobactéries sur leur environnement - 9 -

I.2.1 Impact sur les propriétés technologiques de l'aliment - 9 -

I.2.1.1 Une flore d'altération - 9 -

I.2.1.2 Une flore positive - 9 -

I.2.1.3 Impact sur les autres flores via la production de bactériocines - 10 -

I.2.2 Virulence - 11 -

I.3 Statut légal en Europe des bactéries utilisées en alimentation humaine et animale - 11 -

I.3.1 L'outil QPS - 13 -

I.3.2 La taxonomie - 13 -

I.3.3 Le socle de connaissances - 13 -

I.3.4 Le pouvoir pathogène - 14 -

I.3.5 Utilisation prévue - 14 -

I.3.6 Liste des organismes QPS - 15 -

I.4 Composantes extracellulaires des bactéries lactiques leur permettant de survivre et d'interagir avec l'hôte - 17 -

I.4.1 Résistance aux stress - 17 -

I.4.2 Survie des bactéries durant le transit gastro-intestinal - 17 -

I.4.3 Acteurs moléculaires de la survie en milieu intestinal - 18 -

I.4.3.1 Résistance au stress acide - 18 -

I.4.3.2 Résistance aux sels biliaires - 19 -

I.4.4 Résistance au système immunitaire - 19 -

I.4.4.1 Résistance au lysozyme - 19 -

I.4.4.2 Résistance aux peptides antimicrobiens - 20 -

I.4.5 Interactions avec l'hôte _____ - 20 -
I.4.5.1 Adhésion _____ - 21 -
I.4.5.2 Immuno-modulation _____ - 21 -
I.5 Typage de souches _____ - 22 -
I.5.1 Taxonomie des bactéries lactiques _____ - 22 -
I.5.2 Restriction Fragment Lentgh Polymorphism ou RFLP _____ - 23 -
I.5.3 Amplified Fragment Length Polymorphism ou AFLP _____ - 24 -
I.5.4 Pulsed-Field Gel Electrophoresis ou PFGE _____ - 25 -
I.5.5 Typage moléculaire par Multiple Loci VNTR Analysis ou MLVA _____ - 26 -
I.6 Utilisation de la MLST pour le typage de souches et l'étude de la structure des populations chez les bactéries lactiques _____ - 28 -
I.6.1 MultiLocus Sequence Typing ou MLST _____ - 28 -
I.6.1.1 Principe _____ - 28 -
I.6.1.2 Choix des gènes _____ - 29 -
I.6.1.3 Traitement des données et génotypage _____ - 30 -
I.6.2 Place de l'analyse de multiple loci dans la taxonomie bactérienne _____ - 30 -
I.6.3 Structure des populations chez les bactéries lactiques _____ - 35 -
I.6.3.1 Etudes MLST chez les bactéries lactiques _____ - 35 -
I.6.3.2 Structure et évolution des populations chez les bactéries lactiques _____ - 36 -
I.6.3.2.1 Sélection de populations et domestication _____ - 36 -
I.6.3.2.2 Existence de sous-populations au niveau intra-espèce _____ - 38 -
I.7 Objectifs _____ - 41 -
II Résultats _____ - 43 -
Article 1 _____ - 43 -
II.1 Séquence génomique complète de *Carnobacterium maltaromaticum* LMA 28 _ - 43 -
II.1.1 Introduction _____ - 44 -
II.1.2 Complete chromosome sequence of *Carnobacterium maltaromaticum* LMA 28- 45 -
II.1.2.1 Abstract _____ - 45 -
II.1.2.3 Acknowledgments _____ - 47 -
II.1.3 Résultats majeurs _____ - 48 -
Article 2 _____ - 49 -

II.2 Adaptation de *Carnobacterium maltaromaticum* au tractus gastro-intestinal de mammifères : de la survie chez la souris aux interactions avec les cellules humaines- 49 -

II.2.1 Introduction _____ - 50 -

II.2.2.3.1 Bacterial strains _____ - 54 -

II.2.2.3.2 Animal experiments _____ - 54 -

II.2.2.3.3 *C. maltaromaticum* species-specific polymerase chain reaction _____ - 55 -

II.2.2.3.4 Cell culture and adhesion *in vitro* _____ - 55 -

II.2.2.4.1. Enumeration of viable *C. maltaromaticum* LMA 28 in mice faeces _____ - 56 -

II.2.2.4.2 Adherence to epithelial intestinal cells _____ - 57 -

II.2.2.4.3 Immunomodulation of PBMC _____ - 58 -

II.2.2.4.4 Genome sequence analysis _____ - 59 -

Acknowledgments _____ - 65 -

II.2.3 Résultats majeurs _____ - 66 -

Article 3 _____ - 68 -

II.3 MultiLocus Sequence Typing de *Carnobacterium maltaromaticum* _____ - 68 -

II.3.1 Introduction _____ - 69 -

II.3 Résultats majeurs _____ - 89 -

III Discussion et perspectives _____ - 90 -

III.1Taille du génome de *C. maltaromaticum* _____ - 91 -

III.2 Implications de la capacité de *C. maltaromaticum* à s'adapter à l'environnement intestinal de mammifères _____ - 92 -

III.2.1 Survie _____ - 92 -

III.2.2 Interaction avec les cellules de l'hôte _____ - 94 -

III.3 Typage et génétique des populations chez *C. maltaromaticum* _____ - 95 -

II.3.1 Performance de la MLST pour le typage chez *C. maltaromaticum* _____ - 95 -

III.3.2 Analyse de diversité _____ - 96 -

III.3.2.1 Une grande diversité des souches laitières _____ - 96 -

III.3.2.2 Les complexes clonaux contenant majoritairement des souches laitières _____ - 97 -

III.3.2.3 Les souches associées à des pathologies _____- 98 -

IV Conclusion générale _____ 100

Références bibliographiques _____ 102

Annexes_____ 126

Abréviations

ADN	: L'acide désoxyribonucléique
ARN	: L'acide ribonucléique
AFLP	: Amplified Fragment Lenth Polymorphism
BSA	: Bovine Serum Albumin
CC	: Clonal Complex
CDS	: Coding sequence
$cfu.g^{-1}$	: colony forming unit per gram
CGH	: comparaison de génomes basée sur l'hybridation
CTAS	: Cresol Red Thallium Acetate Sucrose
CTSI	: Cresol Red Thallium Acetate Sucrose Inulin Agar
DLS	: Double Locus Variant
DNA	: Deoxyribo Nucleic Acid
dn/ds	: The ratio of mean non-synonymous substitutions and mean synonymous substitutions
EFSA	: European Food Safety Authority
ELISA	: Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
FDA	: Food and Drug Administration
G + C	: Guanine and Cytocine
GRAS	: Generally Recognized As Safe
HRM	: Highly Repetitive Motif
IL-10	: Interleukine-10
ISGA	: Integrative Services for Genomic Analysis
KaDH	: α–keto acid dehydrogenase
Kbp	: Kilo base pair
LAB	: Lactic Acid Bacteria
Mbp	: Mega base pairs
MCM	: Milieu *Carnobacterium maltaromaticum*
Min	: minute
MLSA	: MultiLocus Sequence Analysis
MLST	: MultiLocus Sequence Typing

MLVA : Multiple Locus VNTR Analysis

mM : milli Molar

MRS : Man Rogosa Sharp

NSLAB : Non Starter Lactic Acid Bacteria

PBMC : Peripheral blood mononuclear cells

PCR : Polymerase Chain Reaction

PFGE : Pulsed-Field Gel Electrophoresis

QPS : Qualified Presumption of Safety

RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism

TRFLP : Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism

tRNA : transfer Ribosomal Nucleic Acid

TSBYE : Trypticase Soja Broth supplemented with Yeast Extract

TNFα : Tumour Necrosis Factor Alpha

S/A : number of alleles and the number of polymorphic sites

sec : second

SLAB : Starter Lactic Acid Bacteria

SLV : Single Locus Variant

ST : Sequence Type

UFC : Unité Formant Colonie

VNTR : Variable Number Tandem Repeats

π : Nucleotide diversity

ng : nano gram

µL : micro Litre

µM : micro Molar

LISTE DES PUBLICATIONS

1) Cailliez-Grimal, C., Chaillou, S., Anba-Mondoloni, J., Loux, V., Afzal, M.I., **Rahman, A**., Kergourlay, G., Champomier-Verges, M.C., Zagorec, M., Dalgaard, P., Leisner, J.J., Prevost, H., Revol-Junelles, A.M., Borges, F. (2013) Complete Chromosome Sequence of *Carnobacterium maltaromaticum* LMA 28, *Genome Announc*, 1(1)

Contribution

Ma contribution a consisté à préparer les extraits d'ADN utilisés par le prestataire pour réaliser le séquençage. J'ai également contribué à l'analyse préliminaire de la séquence génomique.

2) **Rahman, A**., Gleinser, M., Lanhers, M.C., Riedel, C.U., Foligne, B., Hanse, M., Yen, F.T., Klouj, A., Afzal, M.I., Back, A., Mangavel, C., Cailliez-Grimal, C., Revol-Junelles, A.M., Borges, F. (2014) Adaptation of the lactic acid bacterium *Carnobacterium maltaromaticum* LMA 28 to the mammalian gastrointestinal tract: from survival in mice to interaction with human cells, *International dairy journal*, 34, pp. 93-99.

Contribution

Ma contribution a consisté à réaliser les mesures de survie dans le modèle animal en collaboration avec le laboratoire URAFPA de l'Université de Lorraine. Plus précisément, les manipulations d'animaux était assurées par ce laboratoire et j'ai réalisé la plupart des manipulations microbiologiques. J'ai également contribué à la rédaction de la l'article. Les expériences d'adhésion ont été réalisées par l'***Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie*** (Ulm, Allemagne). L'impact inflammatoire a été évalué par l'unité 1019 UMR8204 de l'Institut Pasteur de Lille.

3) **Abdur RAHMAN**, Cyril BONTEMPS, Sophie PAYOT, Catherine Cailliez-Grimal, Anne Marie REVOL-JUNELLES, Frédéric BORGES. Assessment of genetic diversity in *Carnobacterium maltaromaticum* by MultiLocus Sequence Typing (en préparation)

Contribution

Ma contribution à ce travail est majeure puisque je suis à l'origine de la quasi-totalité des données décrites. L'analyse phylogénétique des données de séquence a été réalisée en collaboration avec le laboratoire Dynamic (Université de Lorraine).

COMMUNICATIONS AFFICHÉES

4) **Abdur Rahman**, Marie-Claire Lanhers, Christian U. Riedel, Benoît Foligné, Frances T. Yen, Alexandre Back, Cécile Mangavel, Benoît Remenant, Hervé Prévost, Monique Zagorec, Stéphane Chaillou, Marie Champomier-Vergès, Jamila Anba-Mondoloni, Valentin Loux, Jørgen J. Leisner, Paw Dalgaard, Catherine Cailliez-Grimal, Anne-Marie Revol-Junelles, et Frédéric Borges **Adaptation de la bactérie psychrotrophe *Carnobacterium maltaromaticum* LMA 28 au tractus digestif de mammifères. 19ème** CBL, 16-18 octobre **2013**, Bordeaux, France.

5) **RAHMAN Abdur**, FAVIER Marion, Patrick LUCAS, Sophie PAYOT, Catherine CAILLIEZ-GRIMAL, Anne-Marie REVOL-JUNELLES et Frédéric BORGES **Antagonistic potential of dairy *Carnobacterium maltaromaticum* strains.** Ecosytem Microbiens et Bioprotection des Aliments, 17-18 November **2011**, ONIRIS, Nantes, Fance.

6) **Abdur RAHMAN**, Sophie PAYOT, Catherine CAILLIEZ-GRIMAL, Anne-Marie REVOL-JUNELLES, Frédéric BORGES. **Antipathogenic potential of *Carnobacterium maltaromaticum* isolated from dairy foods**. Séminaire de l'école doctorale RP2E - Ressources Procédés Produits Environnement **2011**, Nancy, France

7) Prévost H., J.J Leisner, M.A. Hansen, P. Dalgaard, G. Kergourlay, **A. Rahman**, X. Dousset, A.M. Revol-Junelles, C. Cailliez-Grimal, S.J. Sørensen, and F. Borges. **Draft genome sequences of *Carnobacterium maltaromaticum* and *Carnobacterium divergens***. 4th Congress of European Microbiologist, FEMS 26-30 June **2011,** Geneva, Switzeland.

Préambule

Carnobacterium maltaromaticum est une bactérie lactique encore très peu connue et qui pourtant colonise massivement certains aliments. L'existence de cette bactérie est connue depuis 1974 et son identité taxonomique a été déterminée très récemment en 2003. L'étude de souches de cette espèce dans le milieu fromager a révélé leur fort potentiel en tant que flore biopréservatrice, grâce à la production de bactériocines anti-*Listeria monocytogenes*, et en tant que flore d'affinage.

Cependant, l'utilisation de cette bactérie dans la chaîne alimentaire n'est pas recommandée par l'Union Européenne. En effet, en raison de la faible masse de connaissances disponibles sur ce micro-organisme et de sa virulence chez le poisson, elle ne présente pas le statut d'innocuité présomptive QPS. En effet, seule une séquence génomique partielle d'une souche potentiellement pathogène de poisson est décrite et très peu de données sont disponibles quant au devenir de cette bactérie après ingestion par le consommateur : sa capacité à survivre dans le tube digestif et sa capacité à interagir avec l'hôte ne sont en effet pas connues. Enfin, aucune méthode performante de typage n'est décrite dans la littérature. Or la disponibilité de telles méthodes figure dans le cahier des charges QPS, en plus d'être indispensable dans le cadre d'une utilisation industrielle des bactéries de cette espèce.

C'est dans ce cadre que s'inscrivent ces travaux de thèse, dont l'objectif est d'apporter les connaissances nécessaires à la réflexion sur l'utilisation de cette bactérie dans l'alimentation humaine et animale.

Ce manuscrit de thèse est organisé en trois parties.

Dans une première partie, une revue bibliographique fait état des connaissances sur la bactérie *Carnobacterium maltaromaticum* ; l'accent a été mis sur les habitats connus de cette bactérie et l'impact qu'elle peut avoir sur son environnement, qu'il soit l'aliment ou le poisson. Ensuite, afin d'appréhender l'outil QPS, le principe de la démarche et les quatre piliers

fondateurs sont présentés. Puis, les connaissances ayant traits à la survie des bactéries lactiques dans le tube digestif et leurs interactions avec l'hôte sont présentées. La revue bibliographique se termine par un tour d'horizon des méthodes de typage moléculaire utilisées chez les bactéries lactiques. L'accent est mis sur la MLST (MultiLocus Sequence Typing) et son utilisation, laquelle a fait l'objet d'une partie importante de ces travaux de thèse.

La deuxième partie de ce manuscrit présente les résultats obtenus, organisés en trois chapitres, présentés sous la forme d'articles

Le premier chapitre est consacré à la présentation du séquençage du génome de *C. maltaromaticum* LMA28.

Le deuxième chapitre présente les résultats en lien avec la survie de la bactérie durant le transit intestinal chez la souris et les interactions possibles avec l'hôte humain.

Le troisième chapitre est dédié à la mise au point d'une méthode de typage MLST et à l'analyse de la diversité au sein de l'espèce *C. maltaromaticum.*

Dans une dernière partie, les résultats sont discutés et les perspectives qui se dégagent de ce travail sont présentées.

I Revue bibliographique

I.1 *Carnobacterium maltaromaticum*

I.1.1 Systématique bactérienne

Le genre *Carnobacterium* a été proposé pour classer les espèces *Lactobacillus carnis, Lactobacillus divergens* et *Lactobacillus piscicola*, ainsi que des souches, ressemblant à des *Lactobacillus*, isolées de viande (Collins *et al.*, 1987). En utilisant l'analyse de la séquence de l'ARNr 16S, il a été montré que ces espèces possédaient un degré de similitude d'environ 96-98 %; et qu'elles formaient un groupe phylogénétiquement distinct des autres bactéries lactiques (Wallbanks *et al.*, 1990). Ce nouveau genre regroupait les espèces *Carnobacterium piscicola, Carnobacterium divergens, Carnobacterium gallinarum* et *Carnobacterium mobile*. Deux nouvelles espèces, *Carnobacterium funditum* et *Carnobacterium alterfunditum* ont ensuite été isolées de lacs d'eau douce de l'Antarctique (Franzmann *et al.*, 1991). Des carnobactéries ont été mises en évidence dans des fromages à pâte molle et à croûte fleurie où elles constituaient l'une des flores lactiques dominantes en fin d'affinage (Millière et Lefebvre, 1994; Millière *et al.*, 1994). En 2003, il est montré que *C. piscicola* et *Lactobacillus maltaromicus* sont des synonymes hétérotypiques (Mora *et al.*, 2003). L'épithète spécifique *maltaromicus* ayant priorité sur celle de *piscicola*, pour des raisons d'antériorité, les auteurs valident pour ce taxon la nomenclature *C. maltaromaticum*. Actuellement le genre *Carnobacterium* regroupe onze espèces : *C. alterfunditum, C. divergens, C. funditum, C. gallinarum, C. jeotgali, C. iners, C. inhibens, C. maltaromaticum, C. mobile, C. pleistocenium* et *C. viridans.*

I.1.2 Caractères physiologiques

Le genre *Carnobacterium* est constitué de bacilles minces, droits ou légèrement incurvés, à Gram-positif, se présentant de manière isolée ou groupée par deux ou parfois en courte chaîne, non sporulés, mobiles ou immobiles, aéro-anaérobies, catalase négative, à métabolisme fermentatif par production d'acide lactique L(+). Ces bactéries sont incapables de croître en présence de 8% de NaCl et à 45°C, mais donnent des colonies visibles à 10°C et parfois à 0°C. Dans la viande, une croissance a été observée pour *C. maltaromaticum* à des températures allant jusqu'à -1,5°C (Jones, 2004; McMullen et Stiles, 1994; Sakala *et al.*, 2002). A l'aide de tests thermolytiques, il est difficile de distinguer le genre *Carnobacterium* du genre *Lactobacillus*. Toutefois, les *Carnobacterium* spp. ne croissent pas sur le milieu à l'acétate de Rogosa (pH 5,6), sont capables de se développer à des pH plus alcalins que *Lactobacillus* spp. (croissance possible jusqu'à pH 9,5). Certaines espèces sont mobiles (*C. funditum, C. inhibens* et *C. mobile*) ; leur principal acide gras membranaire est l'acide oléique et leur peptidoglycane est du type A1 gamma. Leur contenu en Guanine et Cytosine (G+C) est compris entre 33 et 37 pour 100 moles d'ADN (Collins *et al.*, 1987).

I.1.3 Méthodes de détection et d'isolement de *Carnobacterium* spp.

I.1.3.1 Détection des Carnobacterium

Des méthodes basées sur la PCR ont été mises au point afin de permettre de détecter voire quantifié *Carnobacterium* dans les aliments. Ainsi, des amorces oligonucléotidiques permettant d'amplifier spécifiquement une région de l'ADNr 16S ont été utilisées en combinaison avec des couples d'amorces permettant de cibler d'autres bactéries dans une PCR multiplex (Yost et Nattress, 2000). De façon similaire, des amorces permettant de différencier *C. maltaromaticum* et *C. divergens* des genres *Lactococcus* et *Enterococcus* ont également été décrites (Barakat *et al.*, 2000). D'autres couples d'amorces oligonucléotidiques permettant de discriminer entre les espèces du genre *Carnobacterium*

ciblent la région polymorphe intergénique située entre les séquences codant l'ARN 16S et l'ARN 23S (Kabadjova *et al.*, 2002; Scarpellini *et al.*, 2002). Ces outils ont été complétés par la mise au point de huit amorces spécifiques des huit espèces de *Carnobacterium* connues à l'époque : *C. maltaromaticum, C. divergens, C. gallinarum, C. mobile, C. funditum, C. alterfunditum, C. inhibens et C. viridans* (Rachman *et al.*, 2004). Leur utilisation a été adaptée à la détection et la quantification de ces espèces de *Carnobacterium* dans des matrices fromagères (Cailliez-Grimal *et al.*, 2005).

I.1.3.2 Méthodes d'isolement de Carnobacterium maltaromaticum

La présence des *Carnobacterium* dans les fromages a longtemps été sous-estimée en raison de leur sensibilité à l'acétate, lequel est un constituant des milieux MRS et gélose de Rogosa, deux milieux utilisés lors de l'isolement de bactéries lactiques (de Man *et al.*, 1960). Différents milieux permettent d'isoler de façon non-sélective, semi-sélective ou sélective des bactéries du genre *Carnobacterium* (Hammes et Hertel, 2006). Le milieu Cresol red Thallium Acetate Sucrose (CTAS), couplé à une incubation à 30°C pendant 24-48h ou à 25°C pendant 3-4 jours, a été suggéré pour la détection sélective et l'isolement de bactéries appartenant à ce genre bien qu'il permette aussi la croissance de bactéries des genres *Leuconostoc* et *Enterococcus* (Baird *et al.*, 1989; Holzapfel, 1992). Le milieu sélectif ERBER nécessite un temps long d'incubation de 10 jours à 7 °C (Millière *et al.*, 1994). Le milieu Cresol red Thallium Acetate Sucrose Inulin Agar (CTSI) est difficile à utiliser en raison de sa couleur rouge, de son opacité, de sa complexité et d'un temps d'incubation relativement long de 4 jours (Wasney *et al.*, 2001). Le milieu pour *C. maltaromaticum* (CM) est basé sur l'aptitude de la bactérie à croître à des pH élevés, pouvant aller jusqu'à 9,6, et son profil de résistance aux antibiotiques. Ce milieu présente un niveau de sélectivité suffisamment élevé pour pouvoir être utilisé sans étape préalable d'enrichissement (Edima *et al.*, 2007). L'énumération sélective est également possible par cytométrie en flux et détection spécifique par hybridation ADN-ADN *in situ* (Connil *et al.*, 1998).

I.1.4 Habitats

Des onze espèces du genre *Carnobacterium,* les espèces les plus fréquemment isolées sont *C. maltaromaticum* et *C. divergens* (Leisner *et al.*, 2007). Les bactéries de ce genre peuvent être isolées de l'environnement et d'aliments variés.

I.1.4.1 Environnement

Les espèces du genre *Carnobacterium* ont des habitats aquatiques et ont ainsi été isolées de poissons vivants, d'éponges marines (LietLiu, 2006), de lacs antarctiques (Franzmann *et al.*, 1991), d'eaux des mer arctique et antarctique ainsi que de profondeurs marines (Galkin *et al.*, 1999; Groudieva *et al.*, 2004; Lauro *et al.*, 2007; Newberry *et al.*, 2004; Toffin *et al.*, 2004), de tufs calcaires du Groenland (Schmidt *et al.*, 2006), d'eaux de rivières en Espagne (Gonzalez *et al.*, 1999), de grands lacs aux Etats-Unis (Loch *et al.*, 2008). Même si les carnobactéries semblent particulièrement bien adaptées aux environnements aquatiques polaires, elles peuvent être isolées d'eaux tempérées, comme le montre l'exemple d'une souche de *Carnobacterium* sp., isolée des eaux du lac Vanda en Antarctique à une température de 15-20°C (Bratina *et al.*, 1998).

Les bactéries du genre *Carnobacterium* ont également été isolées d'environnements terrestres, notamment de champs ayant subi un épandage de lactosérum (Coombs et Brenchley, 1999), de sol canadien (Walker *et al.*, 2006), de permafrost (Katayama *et al.*, 2007; Pikuta *et al.*, 2005), de compost de champignons (Ntougias *et al.*, 2004), et de fumier (Simpson *et al.*, 2004).

La présence de *Carnobacterium* dans des habitats froids est corroborée par sa capacité à survivre dans des conditions extrêmes de basses températures. Il a ainsi été montré qu'une souche de *C. maltaromaticum* isolée de sol a une capacité supérieure à celle d'isolats d'*Escherichia coli* et *Enterococcus* sp. à survivre à des cycles répétés de congélation-décongélation (Walker *et al.*, 2006). Par ailleurs, des souches de *Carnobacterium* ont été isolées de glace de permafrost datées de 25000 ans (Katayama *et al.*, 2007). En plus de leur capacité à survivre dans des environnements congelés, les *Carnobacterium* spp. peuvent

croître dans des conditions de très basse pression et d'anoxie. Ces données ont conduit Nicholson *et al.* à considérer que des bactéries terrestres pourraient faire l'objet de contaminations lors de missions d'exploration d'environnements comme ceux de la surface de la planète Mars pour la recherche de l'existence de formes de vie (Nicholson *et al.*, 2013). Les carnobactéries sont aussi piézophiles puisqu'elles peuvent être isolées d'environnements marins où la pression est très élevée (Lauro *et al.*, 2007).

Tableau 1. Produits alimentaires au sein desquels a été isolé *Carnobacterium maltaromaticum* et *C. divergens*

Produits	Références
Produits laitiers	
Lait	(Miller *et al.*, 1974)
Fromages à pâte molle	(Millière *et al.*, 1994)
Mozzarella	(Morea *et al.*, 1999)
Poisson et crustacés	
Saumon[a]	(Emborg *et al.*, 2002)
Saumon fumé	(Leroi *et al.*, 1998)
	(Duffes *et al.*, 1999)
Crevettes décortiquées	(Jaffres *et al.*, 2009)
	(Mejlholm *et al.*, 2005)
Crevettes en saumure	(Mejlholm *et al.*, 2008)
Viande	
Bœuf (muscle)[a]	(Ercolini *et al.*, 2009)
Porc mariné	(Schirmer *et al.*, 2009)
Poulet[a]	(Vihavainen *et al.*, 2007)

[a] produit sous atmosphère modifiée

I.1.4.2 Aliment

Les carnobactéries, en particulier *C. maltaromaticum* et *C. divergens*, ont pour habitat divers aliments incluant les produits laitiers, les produits de la mer et les produits carnés. *C. maltaromaticum* a tout d'abord été isolé de laits crus en 1974 (Miller *et al.*, 1974) puis de

divers fromages à pâtes molles dont des bries, des camemberts, de l'époisse (Cailliez-Grimal *et al.*, 2007; Cailliez-Grimal *et al.*, 2005; Millière *et al.*, 1994) et des mozzarellas (Morea *et al.*, 1999).

C. divergens et *C. maltaromaticum* sont présents dans les produits de la mer dans lesquels ils peuvent croître jusqu'à des concentrations très élevées, que les aliments soient frais ou légèrement préservés. Ainsi, d'importantes concentrations en *Carnobacterium* ont été identifiées dans le saumon et la crevette (tableau 1). Dans les produits carnés, des carnobactéries peuvent être isolées de viandes de bœuf, de porc et de volaille (tableau 1).

Il semble que certaines conditions et caractéristiques de produits favorisent la prolifération des carnobactéries par rapport aux autres flores. Ainsi, il semblerait que ces deux espèces ne soient pas dominantes dans des produits de la mer stockés en aérobie. Inversement, elles seraient dominantes dans les produits de la mer emballés sous atmosphère protectrice (MAP, « Modified Atmosphere-Packed »)(Emborg *et al.*, 2002; Franzetti *et al.*, 2003; Mauguin et Novel, 1994; Rudi *et al.*, 2004). Dans le cas de la viande crue, il semblerait que l'atmosphère de l'aliment n'ait pas d'impact sur la présence de *Carnobacterium* puisque des bactéries des espèces *C. divergens* et *C. maltaromaticum* sont retrouvées que les viandes aient été stockées en aérobie, sous vide, ou en atmosphère protectrice (Barakat *et al.*, 2000; Grant et Patterson, 1991; Jones, 2004; Laursen *et al.*, 2005; McMullen et Stiles, 1993; Shaw et Harding, 1984; Vihavainen *et al.*, 2007). Outre l'atmosphère de l'aliment, des conditions extrêmes de faibles températures et de hautes pressions favorisent les carnobactéries. Ainsi, des stockages aux alentours de -20 et -30°C pendant des périodes de 5 à 8 semaines (Dalgaard *et al.*, 2006; Emborg *et al.*, 2005; Emborg *et al.*, 2002; Guldager *et al.*, 1998), ou des pressions de 200-400 MPa pendant 15-20 min (Lakshmanan et Dalgaard, 2004; Paarup *et al.*, 2002) favorisent leur croissance par rapport aux autres bactéries.

I.2 Impact des carnobactéries sur leur environnement

I.2.1 Impact sur les propriétés technologiques de l'aliment

I.2.1.1 Une flore d'altération

La présence de *C. maltaromaticum* et *C. divergens* peut être associée à des phénomènes d'altération de l'aliment. Il a ainsi été décrit que des odeurs indésirables qualifiées de pied- fromage, aigre fermenté ou encore de malt ou de beurre ont été identifiées dans le saumon fumé (Jaffres *et al.*, 2009; Joffraud *et al.*, 2006; Joffraud *et al.*, 2001; Laursen *et al.*, 2006; Stohr *et al.*, 2001). Toutefois, il ne semble pas que ce soit une caractéristique d'espèce puisque certaines souches de *C. maltaromaticum* n'induisent pas la production d'odeurs indésirables dans le saumon fumé (Brillet *et al.*, 2005; Joffraud *et al.*, 2001; Paludan-Muller *et al.*, 1998; Stohr *et al.*, 2001).

I.2.1.2 Une flore positive

La présence de bactéries à des concentrations supérieures à 10^6-10^7 UFC.g^{-1} est requise pour que l'activité d'un micro-organisme ait un impact sensoriel sur un produit alimentaire (Leisner *et al.*, 2007). *C. maltaromaticum* étant capable de croître à des concentrations pouvant aller jusqu'à 10^8 UFC.g^{-1} dans des fromages à pâte molle, il est attendu que sa présence se traduise par des modifications organoleptiques perceptibles. La fabrication de fromages à l'échelle pilote a montré que la présence de cette bactérie est associée au développement d'odeurs maltées et butyriques jugées agréables (Afzal *et al.*, 2013). Considérant que cette bactérie présente deux voix de biosynthèse du 3-méthylbutanal (Afzal *et al.*, 2012) il est vraisemblable que ces odeurs maltées soient issues d'une production directe par la carnobactérie (Afzal *et al.*, 2012). Il est également possible que ce soit un effet indirect puisque la présence de *C. maltaromaticum* LMA 28 a également été associée à une diminution de la concentration en *Psychrobacter* sp. dans ces mêmes fromages (Afzal *et al.*, 2013). La

souche *C. maltaromaticum* LMA 28 pourrait ainsi être utilisée comme flore d'affinage en fromagerie. Dans ce contexte, la bactérie pourrait être ajoutée directement dans le lait de fabrication puisque sa présence n'induit pas de ralentissement d'une acidification assurée par *Lactococcus lactis* ou *Streptococcus thermophilus* et que les pH acides ne nuisent pas à la survie de la carnobactérie (Edima *et al.*, 2008). Toutefois, il est à noter que certaines souches sont capables de fermenter le lactose et le galactose et pourraient ainsi entraîner des phénomènes indésirables de post-acidification en fermentant le galactose durant l'affinage (Cailliez-Grimal *et al.*, 2007). Il faudra donc prendre ce paramètre en considération lors du choix des souches en vue d'une utilisation comme flore aromatisante.

I.2.1.3 Impact sur les autres flores via la production de bactériocines

Les bactériocines sont des polypeptides issus de la synthèse ribosomique bactérienne. Elles peuvent subir ou non des modifications post-traductionnelles avant d'être secrétées dans le milieu extracellulaire. Leur spectre d'action, dont l'ampleur est variable selon la bactériocine, peut être bactéricide ou bactériostatique et comprend des souches phylogénétiquement proches de la souche productrice. La souche productrice est protégée de l'action de la bactériocine qu'elle produit grâce à une protéine d'immunité.

Certaines souches du genre *Carnobacterium* peuvent produire des bactériocines actives sur d'autres bactéries lactiques et/ou sur d'autres espèces bactériennes. C'est le cas notamment de *C. maltaromaticum* LV17 NCBF 2855 qui excrète trois bactériocines : la carnobactériocine A (codée par le plasmide pCP49), la carnobactériocine BM1 (codée par le chromosome) et la carnobactériocine B2 (codée par le plasmide pCP40) (Quadri *et al.*, 1994). L'action de ces carnobactériocines s'exerce sur de nombreuses bactéries à Gram-positif et notamment sur des souches de *Listeria* spp. et d'*Enterococcus* spp. De manière similaire, la piscicoline, produite par *C. maltaromaticum* JG126, la carnocine CP5, produite par *C. maltaromaticum* CP5 (Mathieu *et al.*, 1993), une bactériocine produite par *C. maltaromaticum* LK5 (Buchanan et Klawitter, 1991), la divergicine M35 produite par *C. divergens* M35 (Tahiri *et al.*, 2004) et la divercine V41 produite par *C. divergens* V41 (Richard *et al.*, 2003; Richard *et al.*, 2004) inhibent la croissance de *L. monocytogenes*.

De nombreuses études ont porté sur l'inhibition de *L. monocytogenes* par diverses carnobactériocines isolées de différents produits frais. Cette problématique représente un réel intérêt dans l'amélioration de la conservation des aliments (Brillet *et al.*, 2004; Brillet *et al.*, 2005; Duffes *et al.*, 1999; Nilsson *et al.*, 2004; Schobitz *et al.*, 2003; Yamazaki *et al.*, 2003; Yamazaki *et al.*, 2005).

I.2.2 Virulence

C. maltaromaticum a rarement été associée à des pathologies humaines. Ainsi, seulement deux isolats cliniques de cette espèces ont été obtenus à Grenoble à partir de sang humain, l'un en 1983 et l'autre en 1984 (souche *C. maltaromaticum* CIP 100481 et CIP 101342, respectivement). Un autre isolat de cette espèce a été obtenu en 2002 (Chmelar *et al.*, 2002). Quelques cas cliniques ont également été associés à des carnobactéries appartenant à d'autres espèces (Hoenigl *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 1997). Par ailleurs, de nombreuses souches de cette espèce ont été isolées de poissons malades. Les souches de *C. maltaromaticum* isolées de poissons malades ne présentent ni d'activité hémolytique ni d'activité phospholipolytique (Hammes et Hertel, 2006). Par ailleurs, de tels isolats peuvent présenter des résistances à des agents couramment utilisés en aquaculture à savoir l'oxytétracycline, les quinolones, les nitrofuranes, les sulfonamides, bien qu'elles soient sensibles à l'érythromycine. Il semblerait que les poissons affectés par de telles infections aient été dans des conditions particulières de stress (Michel *et al.*, 1986; Starliper *et al.*, 1992; Toranzo *et al.*, 1993). L'analyse du génome de la souche *C. maltaromaticum* ATCC 35586 a révélé la présence de gènes typiquement associés à des pathologies chez d'autres bactéries. Notamment, un homologue du gène *prfA*, lequel code un régulateur transcriptionnel de gènes de virulences chez *L. monocytogenes*, a été identifié (Leisner *et al.*, 2012).

I.3 Statut légal en Europe des bactéries utilisées en alimentation humaine et animale

Les bactéries et champignons sont utilisés couramment en alimentation humaine et animale. Certains de ces micro-organismes sont utilisés depuis longtemps, sans risque

apparent pour le consommateur. Les cultures microbiennes ayant un long historique d'utilisation sont considérées comme des ingrédients alimentaires traditionnels et sont légalement autorisés en Europe, sans autorisation préalable de mise sur le marché. D'autres micro-organismes sont moins connus et leur consommation pourrait constituer un risque potentiel pour la santé humaine. La validation de leur utilisation en alimentation nécessite l'élaboration d'un outil simple, ne nécessitant pas de démarche lourde.

Le statut QPS, abréviation de la dénomination anglo-saxonne «Qualified Presumption of Safety » a été adopté en 2007 par l'European Food Safety Authority (EFSA, Autorité Européenne de Sécurité des Aliments). Ce statut se veut être l'équivalent du statut GRAS, abréviation du terme anglo-saxon «Generally Recognized as Safe», défini par la Food and Drug Administration (FDA), en terme d'analyse des risques. Toutefois, des différences conceptuelles les distinguent : le statut GRAS est particulièrement orienté sur l'application alors que le statut QPS est associé à la notion d'espèce.

L'objectif de cette approche QPS est d'évaluer les risques associés à des groupes taxonomiques définis de micro-organismes utilisés en alimentation, qui nécessitent une autorisation de mise sur le marché (EFSA, 2008). Sont concernés les micro-organismes introduits directement dans les aliments et ceux utilisés pour produire des enzymes ou des additifs entrant dans la composition des aliments.

L'évaluation du risque est réalisée par l'EFSA pour un groupe taxonomiquement défini et est indépendante d'une démarche d'autorisation de mise sur le marché. Si une espèce obtient le statut QPS, chaque souche de la même espèce, dont l'identité peut être déterminée de façon non ambigüe, ne nécessitera pas de subir une nouvelle évaluation des risques. Cependant il est important de considérer que cette liste de micro-organismes QPS n'est pas une liste positive. Les micro-organismes appartenant à une espèce non QPS ne représentent pas nécessairement un risque pour le consommateur. Ils doivent faire l'objet d'une évaluation complète des risques.

I.3.1 L'outil QPS

La détermination du statut QPS est basée sur la connaissance de la taxonomie, le socle de connaissances, le pouvoir pathogène ainsi que l'utilisation prévue. Une brève introduction détaille l'habitat, l'utilisation et les caractéristiques majeures du micro-organisme.

I.3.2 La taxonomie

Les nomenclatures anciennes et actuelles sont valides. Par exemple, dans le cas des *Lactobacillus*, la classification traditionnelle les scinde en trois groupes : les lactobacilles du groupe I, II, et III. Toutefois, la nomenclature actuelle et les méthodes d'identification les plus récentes sont à privilégier. Le niveau taxonomique est adapté en fonction du micro-organisme et peut correspondre au genre ou à l'espèce. Ainsi, pour les souches appartenant au genre *Lactobacillus* l'évaluation QPS est réalisée au niveau du genre bactérien. Pour les micro-organismes appartenant au genre *Aspergillus* l'évaluation QPS est réalisée espèce par espèce car certaines produisent des toxines.

Sont précisés l'identité phylogénétique (branche, *phylum*) ainsi que les caractéristiques phénotypiques majeures telles que la morphologie cellulaire, la présence de spores, le type respiratoire et fermentaire, la mobilité éventuelle, le métabolisme carboné (fermentation sucres) et la température de croissance.

Il est à noter que la reclassification d'un micro-organisme n'implique pas automatiquement la perte du statut QPS, la sélection de variants d'une souche n'est pas réputée changer l'identité du micro-organisme et son statut.

I.3.3 Le socle de connaissances

Le socle de connaissances, recouvre l'ensemble des connaissances générales relatives aux organismes du groupe taxonomique considéré. Cette masse de connaissance est issue de la littérature scientifique et des bases de données, de l'historique d'utilisation et des

applications industrielles. Elle comprend aussi des données disponibles sur l'aspect clinique et l'écologie de la souche ainsi que tout autre aspect jugé utile. Le socle de connaissances doit être suffisant pour garantir une prédiction fiable des risques pour la santé.

I.3.4 Le pouvoir pathogène

L'absence de cas cliniques répertoriés pour le micro-organisme considéré peut être utile afin d'établir l'innocuité. Cependant, occasionnellement, certaines souches peuvent être responsables de cas cliniques. Certaines souches de *Lactobacillus* ont été isolées de cas cliniques, mais aucun facteur de virulence n'a été identifié. Ceci peut être lié soit à une présence accidentelle, soit au fait que la production de tels facteurs ne se fait que dans des conditions particulières. Ceci illustre le fait qu'il est nécessaire de bien connaitre le micro-organisme. Il faut de même prendre en compte le micro-organisme dans son contexte alimentaire. Ainsi, *Penicillium roquefortii* ne produit pas suffisamment de toxines dans le fromage pour être toxique. Il en produit suffisamment quand il est un contaminant du pain, d'où la nécessité d'intégrer l'application ciblée dans la démarche.

Initialement, il était établi que si certaines souches d'un groupe de micro-organismes étaient pathogènes, alors l'ensemble des souches de ce groupe ne pouvait pas avoir le statut QPS. Cette règle est maintenant moins stricte. Si la pathogénie est limitée à certaines souches et que le mécanisme de pathogénie est connu et testable, alors le groupe taxonomique peut être éligible au statut QPS. Les souches pathogènes seront alors exclues.

I.3.5 Utilisation prévue

En fonction de l'utilisation prévue, l'étendue des connaissances requises ne sera pas la même. Ceci est le cas en particulier pour des espèces de champignons autorisées à être utilisées en protection végétale et pour lesquelles les connaissances sont insuffisantes pour pouvoir permettre une utilisation plus large. L'ensemble de ces données permet de statuer sur le statut QPS ou non d'un micro-organisme (Figure 1).

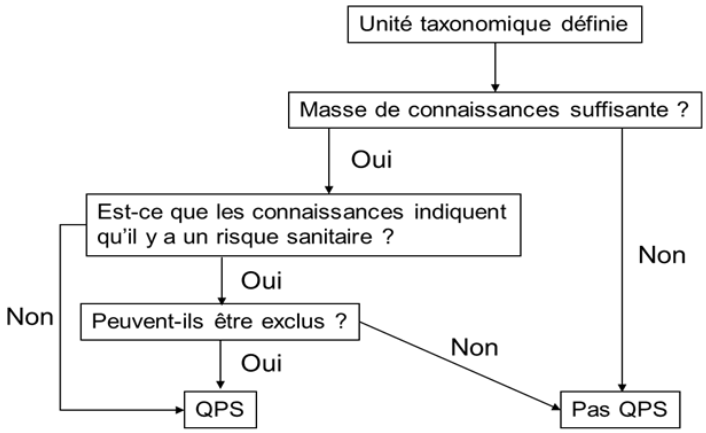


Figure 1. Arbre décisionnel de la démarche QPS pour un microorganisme

I.3.6 Liste des organismes QPS

Actuellement, une centaine d'espèces de micro-organismes ont été évaluées par l'EFSA (EFSA, 2008; EFSA, 2009; EFSA, 2012). Ces espèces appartiennent majoritairement aux quatre groupes que sont les bactéries à Gram positif non sporulantes, les bactéries du genre *Bacillus*, les levures et les champignons filamenteux (tableau 2). La liste des micro-organismes reconnus QPS par l'EFSA est en évolution permanente, elle est mise à jour régulièrement.

C. maltaromaticum a été évalué pour la première fois en 2012 (EFSA, 2012) et n'a pas été retenue dans la liste des bactéries QPS. Les arguments mis en avant sont le caractère pathogène de cette espèce vis-à-vis des poissons (Loch *et al.*, 2011; Schaffer *et al.*, 2013) et le fait que des *Carnobacterium* aitent été isolés de pus et de cultures de sang humain (Hoenigl *et al.*, 2010). Par ailleurs, Leisner *et al.* (2012) ont identifié dans le génome de *C. maltaromaticum* ATCC 35586 des gènes potentiels de virulence. Le rapport de l'EFSA conclue que la masse de connaissances relatives à *C. maltaromaticum* est insuffisante actuellement pour permettre une utilisation intentionnelle dans la chaîne alimentaire et la reconnaissance d'un statut QPS.

Tableau 2. Bactéries à Gram positif non sporulées QPS

Bactéries Gram positive non sporulées		
Bifidobacterium adolescentis *Bifidobacterium animalis*	*Bifidobacterium bifidum* *Bifidobacterium breve*	*Bifidobacterium longum*
*Corynebacterium glutamicum**		
Lactobacillus acidophilus *Lactobacillus amyloliticus* *Lactobacillus amylovorus* *Lactobacillus alimentarius* *Lactobacillus aviaries* *Lactobacillus brevis* *Lactobacillus buchneri* *Lactobacillus casei* *Lactobacillus cellobiosus* *Lactobacillus coryneformis* *Lactobacillus crispatus* *Lactobacillus curvatus*	*Lactobacillus delbrueckii* *Lactobacillus farciminis* *Lactobacillus fermentum* *Lactobacillus gallinarum* *Lactobacillus gasseri* *Lactobacillus helveticus* *Lactobacillus hilgardii* *Lactobacillus johnsonii* *Lactobacillus kefiranofaciens* *Lactobacillus kefiri* *Lactobacillus mucosae* *Lactobacillus panis*	*Lactobacillus collinoides* *Lactobacillus paracasei* *Lactobacillus paraplantarum* *Lactobacillus pentosus* *Lactobacillus plantarum* *Lactobacillus pontis* *Lactobacillus reuteri* *Lactobacillus rhamnosus* *Lactobacillus sakei* *Lactobacillus salivarius* *Lactobacillus sanfranciscensis*
Lactococcus lactis		
Leuconostoc citreum *Leuconostoc lactis*	*Leuconostoc pseudomesenteroides* *Leuconostoc mesenteroides*	
Pediococcus acidilactici	*Pediococcus dextrinicus*	*Pediococcus pentosaceus*
Propionibacterium freundenreichii *Propionibacterium acidipropionici*		
Streptococcus thermophilus		

*uniquement pour la production d'acides aminés

I.4 Composantes extracellulaires des bactéries lactiques leur permettant de survivre et d'interagir avec l'hôte

I.4.1 Résistance aux stress

La biologie extracellulaire des bactéries est cruciale pour leur capacité à survivre et à interagir avec l'hôte dans l'environnement intestinal. Dans cet environnement hostile, les bactéries doivent faire face à un grand nombre de stress avant de pouvoir être en mesure d'exercer un effet positif ou néfaste sur l'hôte.

I.4.2 Survie des bactéries durant le transit gastro-intestinal

La détermination de l'aptitude d'une bactérie de l'alimentation à survivre dans le tractus gastro-intestinal est une question fondamentale car son impact sur l'hôte en dépendra directement. En effet, si la bactérie est capable de survivre elle pourra d'une part interagir de façon dynamique avec l'hôte et d'autre part, la surface cellulaire et les molécules secrétées pourront entrer en interaction. En revanche, lorsque la cellule bactérienne est lysée, les composants intracellulaires sont libérés dans l'environnement intestinal et peuvent potentiellement agir sur l'hôte.

L'intérêt pour les probiotiques a fortement dynamisé les études des bactéries dans un contexte intestinal. Il a ainsi été montré que le probiotique *Lactobacillus rhamnosus* GG survit durant le transit gastro-intestinal humain et que la bactérie peut encore être détectée dans les fèces quatre jours après ingestion (Goldin *et al.*, 1992). De même, *L. lactis* peut survivre durant le transit intestinal humain lorsqu'il est ingéré sous la forme d'une suspension dans du lait et du jus d'orange pendant 4 jours. L'analyse des fèces récoltés a permis de détecter spécifiquement *L. lactis* par culture sur boîte de Petri attestant de l'état de survie de ces lactocoques (Klijn *et al.*, 1995). Un taux de survie d'environ 0,1-2% et un déclin prématuré de la population de *L. lactis* par rapport au marqueur de transit intestinal suggèrent qu'un taux de mortalité non négligeable affecte *L. lactis* durant le transit chez l'humain (Klijn *et al.*, 1995).

De plus, l'utilisation de souches de *L. lactis* marquées dans un modèle murin a permis de révéler que la bactérie est métaboliquement active dans chacun des compartiments du tube digestif bien qu'une part significative de la population meure par lyse cellulaire (Drouault *et al.*, 1999). *Lactobacillus casei* est également métaboliquement actif puisqu'il est capable d'initier la synthèse de protéines dans l'intestin de souris présentant une flore digestive de type humaine (Oozeer *et al.*, 2002).

Dans un modèle de cochon miniature il a été montré que *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii* sbsp. *bulgaricus* peuvent être énumérés à hauteur de 10^6 à 10^7 UFC.g^{-1} de contenu intestinal au niveau de l'iléon lorsqu'ils sont ingérés sous la forme de yaourt. Toutefois, lorsque ces mêmes bactéries sont ingérées par le biais d'une diète semi-synthétique, les bactéries ne survivent pas, montrant l'importance de la matrice dans laquelle les bactéries sont incluses pour leur survie (Lick *et al.*, 2001). De nombreuses autres bactéries lactiques telles que *Lactobacillus plantarum* (Goossens *et al.*, 2005), *Lactobacillus pentosus* (KlingbergetBudde, 2006), *Lactobacillus salivarius* (KlingbergetBudde, 2006), *Lactobacillus sakei* (Chiaramonte *et al.*, 2009), *Streptococcus macedonicus* (Maragkoudakis *et al.*, 2009) sont également capable de survivre durant le transit gastro-intestinal.

I.4.3 Acteurs moléculaires de la survie en milieu intestinal

I.4.3.1 Résistance au stress acide

Après ingestion, les bactéries alimentaires doivent faire face à l'acidité de l'estomac, laquelle oscille entre 2 et 5 (Audia *et al.*, 2001). Chez *Lactobacillus reuteri*, un stress acide entraine la modulation de l'expression de gènes impliqués dans l'état de la fluidité membranaire et la synthèse du peptidoglycane (Wall *et al.*, 2007). Il a été montré qu'un mutant inactivé pour un gène codant l'hydrolase du peptidoglycane Acm2 montre une sensibilité accrue au stress acide chez *L plantarum* et se traduit par une incapacité à coloniser le tractus digestif (Palumbo *et al.*, 2006).

I.4.3.2 Résistance aux sels biliaires

Dans le tractus gastro-intestinal, les bactéries sont au contact des sécrétions gastriques et biliaires en plus des enzymes digestives. La bile joue un rôle majeur dans l'émulsification des lipides et facilite ainsi leur digestion. Elle est également capable d'affecter l'intégrité cellulaire des bactéries en agissant sur leur membrane plasmique (Begley *et al.*, 2005). Pour survivre aux effets délétères de la bile, des bactéries lactiques présentent des hydrolases de sels biliaires, lesquels ont par ailleurs été suggérées comme étant des marqueurs spécifiques témoignant d'une adaptation à la niche intestinale (O'Sullivan *et al.*, 2009). Ces enzymes sont indispensables à la tolérance à la bile chez *L. plantarum* et *L. salivarius* (Fang *et al.*, 2009; Lambert *et al.*, 2008). Par ailleurs, *Lactobacillus acidophilus* et *L. plantarum* sont capables de percevoir la présence de bile dans leur environnement et de répondre en induisant la synthèse de protéines de surface (Bron *et al.*, 2004; Bron *et al.*, 2006; Pfeiler *et al.*, 2007).

I.4.4 Résistance au système immunitaire

I.4.4.1 Résistance au lysozyme

Certaines bactéries pathogènes comme *L. monocytogenes* sont capables de modifier le peptidoglycane afin que celui-ci ne soit plus reconnu par le lysozyme, lequel est une muramidase hydrolysant la liaison β-1,4 entre l'acide N-acétylmuramique et la N-acétyl-D-glucosamine (Boneca *et al.*, 2007). Chez les lactobacilles, la N-déacétylation et la 6-O-acétylation des groupements N-acétylmuramique- β-1,4-N-acétyl-D-glucosamine permettent également d'augmenter le niveau de résistance au lysozyme (Delcour *et al.*, 1999; Vollmer, 2008b). Pourtant, l'analyse des génomes de lactobacilles n'a pas révélé la présence d'homologue de *pgdA*. En revanche, tous semblent contenir au moins un homologue de *oatA* laquelle code une acétyltransférase capable d'acétyler le peptidoglycane (Bernard *et al.*, 2011).

I.4.4.2 Résistance aux peptides antimicrobiens

Outre les désacétylations, le peptidoglycane peut également être additionné d'aspartate par D-Asp amidation. Cette modification est assurée chez *L. lactis* par le gène *asnH* lequel code une asparagine synthétase (Veiga *et al.*, 2009). La mutation de ce gène se traduit par une sensibilité accrue aux peptides antimicrobiens cationiques du système immunitaire (Veiga *et al.*, 2009).

En plus du peptidoglycane, la paroi cellulaire est composée d'autres molécules appelées polymères secondaires lesquels comprennent notamment les acides téichoïques et les acides lipotéichoïques. Les acides téichoïques et lipotéichoïques sont des polymères anioniques constitués de poly-glycérol phosphate, poly-ribitol phosphate, ou poly-glucosyl phosphate. (Navarre et Schneewind, 1999). Les acides téichoïques et lipoteichoïques peuvent être modifiés par D-alanylation. L'ajout de ce résidu alanine entraine une augmentation de la quantité de charges positives portées par ces polymères secondaires de la paroi. Cette augmentation de la densité de charges positives à la surface des cellules bactériennes permet aux bactéries de résister aux défensines, lesquelles sont des peptides antimicrobiens du système immunitaire (Peschel *et al.*, 1999). Chez les lactobacilles, l'opéron *dlt,* qui est présent dans tous les génomes séquencés du genre, est responsable de cette D-alanylation (Kleerebezem *et al.*, 2010; Neuhaus et Baddiley, 2003).

I.4.5 Interactions avec l'hôte

Les cellules de l'hôte interagissant le plus avec les bactéries sont d'une part les cellules épithéliales de l'intestin, si les bactéries peuvent accéder à la couche de mucus de la surface de l'épithélium, et d'autre part les cellules dendritiques intestinales. Les bactéries peuvent être capables d'adhérer à ces cellules et coloniser leur surface. Leur présence peut être reconnue spécifiquement par les cellules dendritiques lesquelles peuvent en réponse produire des cytokines, des molécules antibactériennes, des facteurs de protection cellulaires ou des molécules de stimulation (Lebeer *et al.*, 2010).

I.4.5.1 Adhésion

L'adhésion à l'épithélium intestinal a été très étudiée chez les bactéries lactiques puisqu'elle constitue un critère associé à l'aptitude d'un micro-organisme à présenter des propriétés probiotiques (Lebeer *et al.*, 2008). Les acteurs majoritaires de l'adhésion chez les bactéries sont les protéines de surface. Chez les bactéries lactiques, les protéines peuvent être associées à la surface cellulaire de 4 façons différentes. Les protéines peuvent être ancrées dans la membrane plasmique *via* une extrémité N- ou C-terminale hydrophobe, elles peuvent également être associées de façon covalente à la membrane plasmique et sont dans ce cas des lipoprotéines. Elles peuvent aussi être associées à la paroi. Plus précisément, les protéines présentant un motif de type LPXTG sont associées de façon covalente au peptidoglycane grâce à des sortases (Navarre et Schneewind, 1999). D'autres protéines peuvent être associées à des éléments de la paroi de façon non covalente grâce à des domaines de liaison tels que les domaines LysM, GW et WxL (Brinster *et al.*, 2007; Lebeer *et al.*, 2008).

I.4.5.2 Immuno-modulation

La question de l'impact des bactéries lactiques sur l'inflammation a été activement étudiée dans le but d'identifier des candidats probiotiques permettant d'atténuer les symptômes d'inflammation chez des patients atteints de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (Borchers *et al.*, 2009). En effet, des patients atteints par ces maladies produisent au niveau des muqueuses du colon de hauts niveaux de cytokines inflammatoires TNF-α, IL-1β et IL-8 (Borchers *et al.*, 2009). Des bactéries lactiques ont été évaluées pour leur impact sur la production de cytokines, et des bactéries dont l'effet immuno-modulateur *in vitro* est corrélé à l'atténuation des symptômes inflammatoires *in vivo* ont été identifiées (Borchers *et al.*, 2009). Ainsi, les bactéries *Lactobacillus acidophilus* LA 201, *L. plantarum* LA 301 et *L. salivarius* LA 302 ont révélé leur capacité à induire fortement la production de l'interleukine anti-inflammatoire IL-10 et à indure faiblement la production d'interleukine pro-inflammatoire IL-12. L'administration de ces souches en modèle murin de colite inflammatoire se traduit par une réduction de la gravité des symptômes (Drouault-Holowacz *et al.*, 2006). D'autres études menées sur des bactéries du genre *Lactobacillus* et d'autres genres tels que

Leuconostoc, Oenococcus, Pediococcus, Streptococcus, et *Tetragenococcus* ont montré le pouvoir immuno-modulateur de nombreuses bactéries lactiques (Carroll *et al.*, 2007; Foligne *et al.*, 2010b; Kang *et al.*, 2009a; Kang *et al.*, 2009b; Masuda *et al.*, 2008; Menard *et al.*, 2004; Zoumpopoulou *et al.*, 2008). Il est à noter que le pouvoir immuno-modulateur est une caractéristique très variable et que le niveau de variabilité se situe au niveau intra-espèce.

I.5 Typage de souches

I.5.1 Taxonomie des bactéries lactiques

La taxonomie est la classification des organismes dans un système de taxons ordonnés permettant de révéler les relations phylogénétiques entre ces organismes. La taxonomie bactérienne constitue un des piliers fondamentaux de la microbiologie. C'est particulièrement vrai dans le cas des bactéries lactiques, où l'outil taxonomique est notamment utilisé pour cibler les secteurs d'application dans lesquels une souche nouvellement identifiée présentera un intérêt. Ainsi, l'identification d'une souche comme appartement à l'espèce *Lactococcus lactis* fera de cette souche un candidat comme levain d'acidification en fromagerie car il est connu que les bactéries de cette espèce sont performantes pour ce type d'application. L'outil taxonomique est également utilisé dans les cas où l'utilisation de multiples souches microbiennes à des fins fondamentales ou industrielles nécessite de pouvoir différencier ces souches, on parle dans ce cas de typage.

Les méthodes les plus performantes pour le typage de souches sont basées sur la génétique, les méthodes phénotypiques étant insuffisamment résolutives. Pour le typage de souches visant à distinguer des souches très proches phylogénétiquement, il est nécessaire de cibler des régions du génome dont la vitesse d'évolution est suffisamment élevée. Plusieurs méthodes ont été utilisées avec succès chez les bactéries lactiques, il s'agit de la MLST pour MultiLocus Sequence Typing, le MLVA pour Multiple Locus VNTR Analysis, la RFLP pour Restriction Fragment Length Polymorphism, de l'AFLP pour Amplified Fragment Lenth Polymorphism, du PFGE pour Pulsed-Field Gel Electrophoresis et de diverses autres méthodes

basées sur l'utilisation de la polymérisation en chaine (PCR). Parmi ces méthodes l'accent a été mis sur la MLST puisqu'elle a fait l'objet de ce travail de thèse.

I.5.2 Restriction Fragment Lentgh Polymorphism ou RFLP

La Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) est une méthode de typage basée sur l'hybridation différentielle d'une sonde ADN sur des fragments de l'ADN de la souche d'intérêt, lesquels ont été produits grâce à une ou des enzymes de restriction (figure 2). Après digestion par les enzymes de restriction, les fragments d'ADN sont séparés par migration électrophorétique. Suite à la migration, les ADN sont transférés sur membrane et sont soumis à hybridation avec une sonde marquée ciblant une région connue comme par exemple les régions conservées de l'ARN 16S et 23S ; on parle dans ce cas de ribotypage. Le ribotype obtenu est comparé pour identification à une base de données de ribotypes obtenus pour des souches de référence (Bjorkroth et Korkeala, 1997). Cette méthode a été utilisée avec succès pour le typage de souches de *L. lactis* (Kohler *et al.*, 1991). Toutefois la RFLP est aujourd'hui principalement utilisée sous la forme de TRFLP (Terminal RFLP) pour étudier les communautés bactériennes (Marzorati *et al.*, 2008). De plus, dans le cas de *Carnobacterium* le pouvoir résolutif de la RFLP se situe à l'échelle inter-espèce. En effet, un unique profil a été identifié pour l'ensemble des 41 souches testées de *Carnobacterium maltaromaticum* (Laursen *et al.*, 2005).

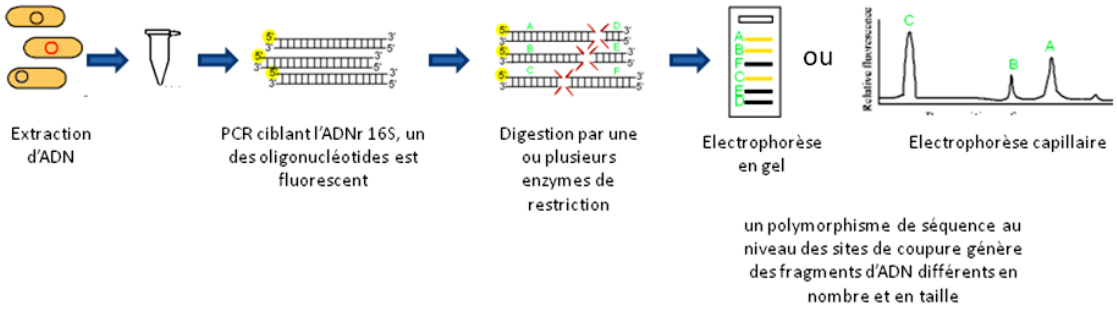


Figure 2. Restriction Fragment Length Polymorphism RFLP

I.5.3 Amplified Fragment Length Polymorphism ou AFLP

Une méthode beaucoup plus utilisée pour les investigations à l'échelle intra-espèce est l'Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) (Vos *et al.*, 1995). Une analyse AFLP débute par une digestion de l'ADN de la souche cible par une ou des enzymes de restriction (figure 3). Des ADN adaptateurs sont ligués aux fragments générés. Ces adaptateurs présentent d'une part des extrémités compatibles avec les enzymes de restriction utilisées et d'autre part une séquence qui sera ciblée par les amorces oligonucléotidiques utilisées à l'étape suivante de réaction de PCR. Lors de la PCR, un critère sélectif permettant d'amplifier sélectivement certains fragments de restriction est utilisé : en effet en plus de présenter une extrémité 5' ciblant la séquence des adaptateurs, l'extrémité 3' présente une séquence de trois nucléotides. Seuls les fragments présentant ces trois nucléotides seront amplifiés. Les produits de PCR sont ensuite séparés par électrophorèse en gel de séquençage ou par électrophorèse capillaire. Les profils obtenus peuvent être utilisés pour alimenter une base de données. Une étude pionnière utilisant cette méthode a été réalisée pour *Lactobacillus johnsonii* et a permis de discerner 7 génotypes différents parmi 16 souches (Ventura et Zink, 2002). De façon similaire, l'AFLP a notamment montré sa performance pour le typage de souches de *Streptococcus thermophilus* (Lazzi *et al.*, 2009), *Lactococcus garvieae* (Foschino *et al.*, 2008), *Oenococcus oeni* (Cappello *et al.*, 2008), *Lactobacillus paracasei* (Sisto *et al.*, 2009), *Lactobacillus delbrueckii* (TanigawaetWatanabe, 2011), *Lactobacillus helveticus* (Beganovic *et al.*, 2013). Cette méthode a également été utilisée pour *Carnobacterium,* cependant celle-ci n'a permis de scinder les 30 souches de *Carnobacterium divergens* qu'en deux groupes et n'a

révélé qu'un unique génotype pour les 4 souches de *Carnobacterium mobile* et les 25 souches de *C. maltaromaticum* (Laursen *et al.*, 2005).

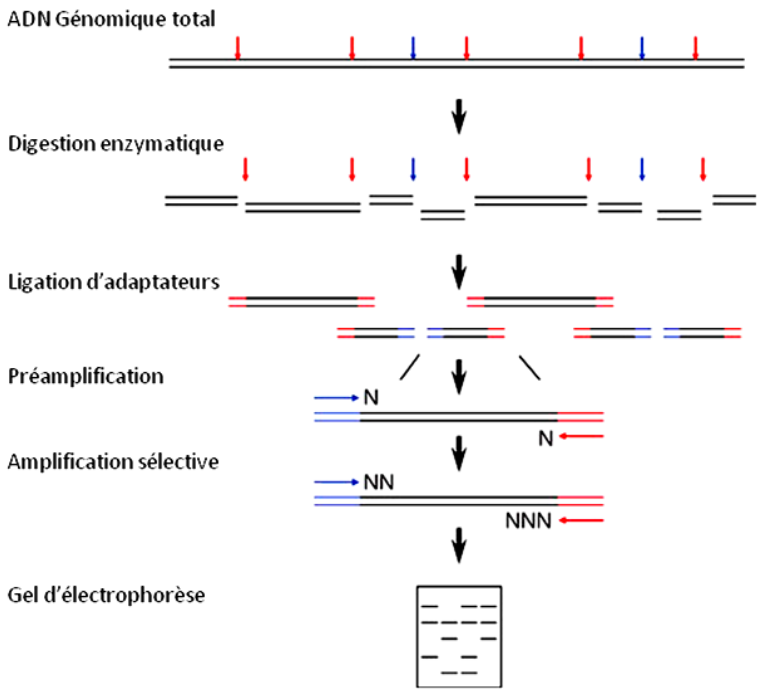


Figure 3. Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)

I.5.4 Pulsed-Field Gel Electrophoresis ou PFGE

L'électrophorèse en champs pulsé (PFGE) a pour objectif de produire un profil de restriction de l'ensemble du génome d'une souche comprenant quelques dizaines de bandes. C'est une méthode de typage très performante et très utilisée en microbiologie clinique (Tenover *et al.*, 1995). L'ADN total de la souche est extrait dans un gel d'agarose afin d'éviter la dégradation de l'ADN sous l'action des forces de cisaillement, puis est digéré par des enzymes de restriction dont les sites de coupure sont rares dans le génome de la souche d'intérêt (Figure 4). Les fragments de grande taille pouvant aller jusqu'à plusieurs mégabases sont ensuite séparés grâce à une méthode d'électrophorèse spécifique, durant laquelle l'orientation du champ électrique est alternativement modifiée afin de faciliter la migration des grands fragments d'ADN dans le gel. Chez les bactéries lactiques, la première étude de référence comparative réalisée avec des souches de *Lactobacillus casei* et *L. rhamnosus* a

montré que des trois méthodes RFLP, AFLP et PFGE, le PFGE est la plus performante avec une capacité à discerner 17 génotypes parmi 24 souches (Tynkkynen *et al.*, 1999). Depuis, cette méthode a largement été utilisée chez les bactéries lactiques (Bjorkroth *et al.*, 1996; Kelly *et al.*, 1993; Picozzi *et al.*, 2010; Sanchez *et al.*, 2004; Simpson *et al.*, 2002; VenturaetZink, 2002).

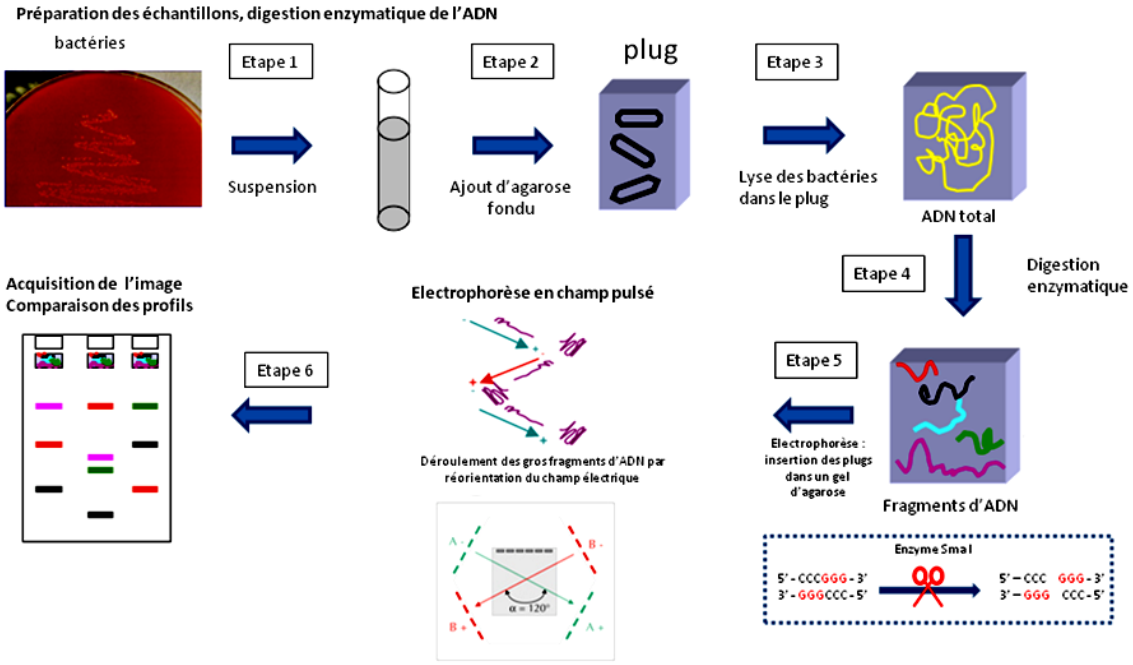


Figure 4. Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)

I.5.5 Typage moléculaire par Multiple Loci VNTR Analysis ou MLVA

La présence de séquences répétées est un caractère ubiquitaire des génomes bactériens. Certaines répétitions sont très abondantes comme le motif HRM (pour Highly Repetitive Motif) de 13 pb qui est représenté environ 1000 fois dans le génome de 2,4 Mpb de *L. lactis* (Mrazek *et al.*, 2002). Toutefois, le contenu en répétitions peut varier considérablement d'une espèce bactérienne à l'autre (Romero *et al.*, 1999).

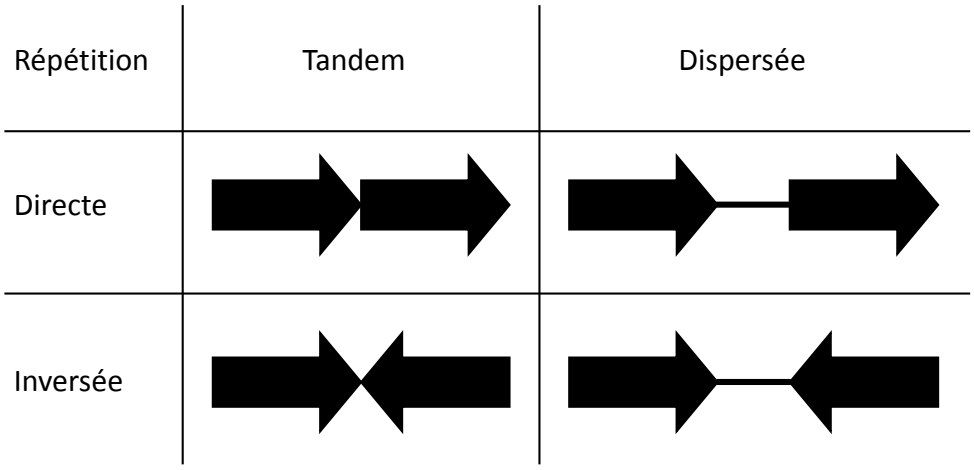


Figure 5: Tableau présentant la variété de disposition des motifs répétés les uns par rapport aux autres
Les flèches représentent les unités répétées, les traits noirs épais les séquences d'ADN non répétées.

Les motifs d'ADN répétés peuvent avoir une taille mesurant entre 1 nucléotide (Hallet, 2001; Henderson *et al.*, 1999) et plusieurs méga paires de bases (Wenner *et al.*, 2003). Les motifs peuvent être répétés de façon directe ou inversée, et être positionnés en tandem ou de façon dispersée (Figure 5). Si des motifs répétés sont localisés à l'intérieur de gènes, et qu'ils sont positionnés dans la même phase de lecture les uns par rapport aux autres, alors la séquence des protéines codées par ces gènes contiendra des motifs protéiques répétés.

Dans le cas des répétitions en tandem, trois grandes classes peuvent être distinguées selon la taille du motif : les régions constituées d'unités répétées mesurant plus de 100 pb sont appelées satellites, celles dont les unités répétées ont une taille allant de 6 à 100 pb sont des minisatellites, et celles dont les unités répétées mesurent de 1 à 5 pb sont des microsatellites (Charlesworth *et al.*, 1994).

L'utilisation de loci VNTR pour le typage de souches bactériennes a été réalisée la première fois par van Belkum en 1997 sur *Haemophilus influenzae* et *Staphylococcus aureus* sous la forme d'une analyse de multiple loci variables en nombre de répétitions (MLVA pour MultiLocus Variable number of tandem repeat Analysis)(Van Belkum *et al.*, 1997a; van Belkum *et al.*, 1997b). L'horloge moléculaire de ces différents loci est considérablement variable d'un locus à l'autre. Ainsi, il est nécessaire d'identifier les loci caractérisés par une vitesse d'évolution suffisamment élevée pour entrainer des modifications génétiques à l'échelle

phylogénétique d'intérêt et suffisamment basse pour ne pas entrainer de modifications à l'échelle clonale considérée.

Chez les bactéries lactiques, cette méthode a été utilisée la première fois avec *L. lactis* (Quenee *et al.*, 2005).Le génome de *L. lactis* IL1403 contient 34 régions minisatellites, des unités répétées de 6 nucléotides ou plus. Les deux tiers des loci minisatellites sont peu ou pas variables d'après la comparaison de 10 souches étroitement apparentées de *L. lactis*, bien que les unités répétées au sein de ces loci soient identiques à plus de 90%. Les 7 loci les plus variables sont localisés dans des gènes codant des protéines secrétés ou dans des régions intergéniques. Le dendrogramme obtenu sur la base de la variabilité génétique au sein des loci VNTR est similaire à celui obtenu à l'aide de données de RAPD. Les loci les plus variables sont constitués d'unités répétées longues, allant de 21 à 285pb (Quenee *et al.*, 2005).

Chez *O. oeni,* 5 marqueurs ont été utilisés pour typer 236 souches. Un total de 205 génotypes différents ont été identifiés, faisant du MLVA la méthode la plus résolutive chez *O. oeni* (Claisse et Lonvaud-Funel, 2012). Toutefois, cette règle n'est pas forcément vraie pour toutes les espèces puisque chez *L. casei* les régions riches en répétitions testée se sont révélées être peu variables (Diancourt *et al.*, 2007).

I.6 Utilisation de la MLST pour le typage de souches et l'étude de la structure des populations chez les bactéries lactiques

I.6.1 MultiLocus Sequence Typing ou MLST

I.6.1.1 Principe

La MLST, pour MuliLocus Sequence Typing, est une méthode de typage moléculaire basée sur l'analyse de séquences de plusieurs gènes de ménage, en général 5 à 7 (Maiden *et al.*, 1998; Urwin et Maiden, 2003) qui a été appliquée à plus de 48 taxons bactériens (Achtman, 2008). Grâce à la variabilité génétique issue de l'apparition de mutations ponctuelles dans la

séquence de ces gènes, il est possible de différencier des souches voire d'inférer leurs parentés phylogénétiques. Cette méthode a été initialement proposée comme outil d'épidémiologie et a notamment permis de révéler le caractère clonal de certaines lignées hypervirulentes chez les bactéries pathogènes. Elle a ensuite été étendue à des bactéries non pathogènes et notamment à des bactéries d'intérêt industriel.

I.6.1.2 Choix des gènes

Les auteurs ne sont pas tous d'accord sur le type de gènes adaptés à l'analyse MLST. Il a tout d'abord été proposé de n'inclure que les gènes de ménage (Maiden *et al.*, 1998), puis d'autres auteurs ont proposé d'élargir à d'autres gènes (Cooper et Feil, 2006) et plus particulièrement aux gènes retrouvés de façon constante chez toutes les souches d'une même espèce. Les gènes choisis sont répartis uniformément sur le chromosome (figure 6). En effet, les phénomènes de transferts horizontaux pouvant fausser les inférences phylogénétiques des organismes, l'utilisation de plusieurs loci présente l'avantage de diminuer le poids d'un ou plusieurs gènes dont l'histoire est caractérisée par des événements de recombinaison. Au total, chez les bactéries lactiques, 57 gènes ont été utilisés en analyse MLST (tableau 3). Parmi ces gènes, seuls 16 ont été utilisés pour au moins deux espèces de bactéries lactiques différentes. La conséquence est qu'il est difficile de comparer les résultats de typage au niveau inter-espèce car il est vraisemblable que ces gènes n'évoluent pas de la même façon. Ceci est illustré par l'exemple de *L. casei* pour laquelle deux schémas MLST ont été décrit (Cai *et al.*, 2007; Diancourt *et al.*, 2007). Les gènes utilisés dans ces deux études sont distincts : ainsi Cai *et al.* ont utilisés les gènes *polA, nrdD, metRD, mutL,* et *ftsZ* alors que Diancourt *et al.* ont utilisé les gènes *fusA, ileS, lepA, leuS, pyrG, recA* et *recG*. Ces études ont révélé des niveaux différents d'une part de diversité et d'autre part de la contribution de la recombinaison homologue dans la structuration des populations chez cette espèce. Ces différences semblent révéler que le choix des gènes est déterminant lors de la mise en place d'un schéma MLST. Il est à noter que ces études ont été réalisées avec des collections de souches différentes et qu'il est par conséquent possible que les différences observées soient aussi liées à un biais d'échantillonnage.

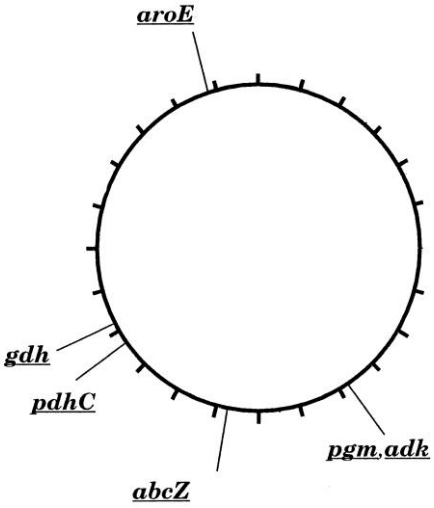


Figure 6. Localisation chromosomique des gènes utilisés en MLST chez *Neisseria meningitidis* (d'après Maiden *et al.*, 1998)

I.6.1.3 Traitement des données et génotypage

L'ADN de chaque souche de la collection considérée est soumis à une amplification par PCR des loci choisis pour la MLST et chaque produit de PCR est séquencé. Les séquences obtenues peuvent être utilisées pour établir les relations phylogénétiques entre les souches (Maiden *et al.*, 1998). Une autre façon d'analyser les données consiste à déterminer combien d'allèles différents ont été obtenus pour chaque gène et à assigner un numéro à chaque allèle. Il est ensuite possible d'assigner une combinaison d'allèles pour chaque souche et à chaque combinaison d'allèles sera assigné un numéro de ST (pour « Sequence Type »). Ainsi, si deux souches présentent la même combinaison d'allèles, ces souches présenteront le même numéro de ST. Les analyses de population seront réalisées sur la base de ces ST en prenant en compte la représentation relative de ces ST au sein de la collection de souches. Ces données peuvent ainsi être utilisées pour rassembler les souches sous la forme de groupes de souches présentant le même génotype. Ces groupes peuvent être mis en relation sur le critère de ressemblance : deux ST présentant une combinaison d'allèles ne divergeant que pour un ou deux allèles seront considérés comme appartenant au même complexe clonal (Feil *et al.*, 2004; Spratt *et al.*, 2004). Les souches appartenant au même complexe clonal sont considérées comme étant très étroitement apparentées. La force de cette approche est

qu'elle permet de diminuer le poids des événements de recombinaison issus des phénomènes de transferts horizontaux (Spratt *et al.*, 2004)

I.6.2 Place de l'analyse de multiple loci dans la taxonomie bactérienne

Les bactéries ont deux modes de transmission de gènes : le mode vertical, dans lequel les gènes présents dans une cellule mère sont transmis aux cellules filles et le mode horizontal caractérisé par le transfert de gènes entre génomes. Les barrières allant à l'encontre du transfert horizontal étant diffuses, celui-ci ne peut pas être utilisé de façon simple pour définir une espèce bactérienne, comme c'est le cas chez les animaux et les plantes avec la barrière sexuelle. La définition aujourd'hui acceptée, même si elle est contestable, repose sur le principe de l'analyse polyphasique. Selon cette définition des micro-organismes sont considérés comme faisant partie de la même espèce si la valeur de réassociation dans les expériences standardisées d'hybridation ADN-ADN est d'au moins 70% et que le delta-Tm est inférieur ou égal à 5°C (Wayne *et al.*, 1987). De plus, les souches appartenant à une même espèce doivent présenter un niveau suffisant d'homogénéité phénotypique et la description de l'espèce devrait être réalisée sur plusieurs souches en plus de la souche type (Stackebrandt *et al.*, 2002). Par ailleurs, des souches dont l'ARN ribosomique 16S présente une identité inférieure ou égale à 98,7% sont toujours considérées comme des membres d'espèces différentes car cette valeur correspond au seuil de 70% de similarité sur le critère d'hybridation ADN-ADN (Achtman, 2008). Il est à noter que la réciproque n'est pas forcément vraie. En effet, des souches dont l'ARN 16S présente plus de 98,7% d'identité ne sont pas forcément de la même espèce. Selon cette approche polyphasique plus de 7000 espèces bactériennes différentes ont été identifiées (Achtman, 2008).

Récemment, des approches alternatives basées sur la génomique et sur les analyses de type MLST ont été utilisées (Achtman, 2008). Puisque le terme « typage » est dédié à l'étude au niveau intra-espèce, la dénomination de MultiLocus Sequence Analysis (MLSA) est dans ce cas préférée à MLST (Hanage *et al.*, 2006). Cette méthode a tout d'abord été utilisée pour déterminer la position phylogénétique de nouvelles espèces à partir de petits effectifs (Christensen *et al.*, 2004; Holmes *et al.*, 2004). Des études ultérieures réalisées avec des effectifs plus grands ont par la suite été réalisées chez *Burkholderia*. Ainsi, 421 souches

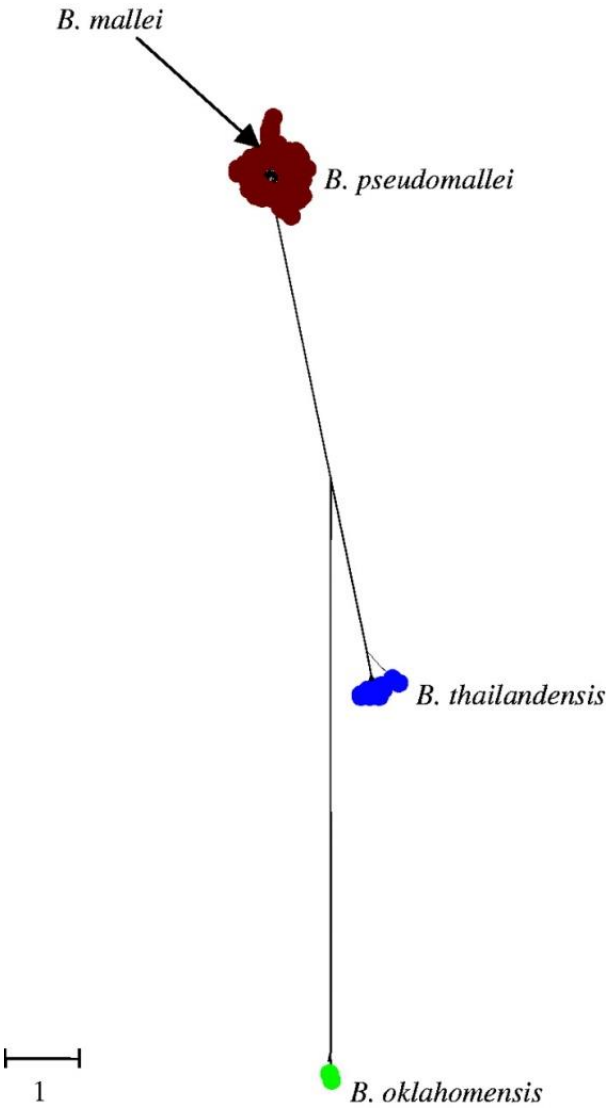


Figure 7. Résolution des populations de *B. pseudomallei, B. mallei, B. thailandensis* et *B. oklahomensis* (d'après Hanage *et al.,* 2006).
L'alignement des séquences concaténées a été utilisé pour construire un arbre à l'aide de MrBayes. Un total de 400 souches représentant chacune un génotype ST différent de *B. pseudomallei,* 17 de *B. thailandensis*, et 2 de chacune des espèces *B. mallei* et *B. oklahomensis* ont été incluses dans l'analyse. L'échelle indique la distance génétique.

différentes ont été utilisées pour résoudre les populations des trois espèces *Burkholderia pseudomallei*, *B. mallei, B. thailandensis* et *B. oklahomensis*. L'arbre obtenu à partir de l'alignement des séquences concaténées montre que bien qu'il n'y ait que 3% de divergence nucléotidique entre *B. pseudomallei, B. oklahomensis* et *B. thailandensis*, la MLSA soutient l'idée selon laquelle ces trois populations doivent être considérées comme trois espèces différentes (figure 7). Les isolats de l'espèce *B. mallei* en revanche sont regroupés avec les isolats de *B. pseudomallei*. Ainsi, d'après la MLSA les souches de *B. mallei* ne formeraient pas

une espèce distincte de *B. pseudomallei* ce qui ne concorde pas avec les caractéristiques cliniques qui ont historiquement conduit à considérer *B. mallei* comme une espèce propre (Godoy *et al.*, 2003). Une étude comparative a montré que 70% d'hybridation ADN-ADN total correspondrait à 95% d'identité nucléotidique moyenne (Goris *et al.*, 2007).

Tableau 3. Gènes utilisés en MLST chez les bactéries lactiques

Les gènes surlignés en gris ont été utilisés pour au moins deux espèces différentes.

	O. oeni	*O. oeni*	*L. casei*	*L. casei*	*L. plantarum*	*L. delbrueckii*	*L. johsonnii*	*L. paracasei*	*L. salivarius*	*L. sanfranciscensis*	*L. lactis*	*P. parvulus*	*P. damnosus*	*P. pentosaceus*	*S. thermophilus*
	De las Rivas *et al.*, 2004	Bilhère *et al.*, 2009	Cai *et al.*, 2007	Diancourt *et al.*, 2007	De las Rivas *et al.*, 2006	Tanigawa *et al.*, 2011	Buhnik-Rosenblau *et al.*, 2011	Parolo *et al.*, 2011	Raftis *et al.*, 2011	Picozzi *et al.*, 2010	Passerini *et al.*, 2010	Calmin *et al.*, 2008	Calmin *et al.*, 2008	Martino *et al.*, 2013	Delorme *et al.*, 2009
gyrA										x					
gyrB	x	x			x	x								x	
ddl	x	x			x										x
pgm	x	x	x		x									x	
pgmA										x					
recP	x	x													
mleA	x														
g6pd		x													
dnaE		x													x
purK		x			x										
rpoB		x													
polA			x												
nrdD			x												
metRS			x												
mutL			x												
ftsZ			x												
fusA				x		x		x							
ileS				x		x		x							
lepA				x				x							
leuS				x				x				x	x	x	
pyrE															x
pyrG				x		x		x				x	x		
recA				x		x		x				x	x		
recG				x		x		x							
recN											x				
gdh					x					x					
mutS					x										
hsp60						x									
LJ0017							x								
LJ0648							x								
LJ1632							x								
parB									x						
pstB									x						
rpsB									x						
pheS									x						
ftsQ									x						
nrdB									x						
rpoA									x						
mapA										x					
nox										x					
pta										x					
bcaT											x				
pgk											x				
glyA											x				
pdp											x				
pepXP											x				
rplb												x	x		
mle												x	x		
glcK															x
pepO															x
ilvC															x
thrS															x
tkt															x

I.6.3 Structure des populations chez les bactéries lactiques

I.6.3.1 Etudes MLST chez les bactéries lactiques

La MLST a été appliquée à 14 espèces de bactéries lactiques à savoir *Enterococcus faecalis* (Buhnik-Rosenblau *et al.*, 2013)*, L. lactis* (Passerini *et al.*, 2010; Rademaker *et al.*, 2007)*, L. delbrueckii* (TanigawaetWatanabe, 2011), *L. casei* (Cai *et al.*, 2007; Diancourt *et al.*, 2007), *L. johnsonni* (Buhnik-Rosenblau *et al.*, 2012), *Lactobacillus paracasei* (Parolo *et al.*, 2011), *L. plantarum* (de Las Rivas *et al.*, 2006), *L. salivarius* (Raftis *et al.*, 2011)*, L. sanfransciscensis* (Picozzi *et al.*, 2010), *O. oeni,*(de Las Rivas *et al*., 2004; Bilhere *et al*., 2009; Bridier *et al*., 2010), *Pediococcus damnosus* (Calmin *et al.*, 2008), *Pediococcus parvulus* (Calmin *et al.*, 2008)*, Pediococcus pentosaceus* (Martino *et al.*) et *S. thermophilus* (Delorme *et al.*, 2010).

Les gènes utilisés chez les bactéries lactiques en analyse MLST sont caractérisés par des valeurs de *dN/dS* (nombre de mutations non synonymes, c'est-à-dire qui conduisent à un changement de l'acide aminés codé, divisé par le nombre de mutations synonymes) proche de 0, indiquant que la plupart des gènes sont soumis à une sélection négative, laquelle entraine l'élimination de la population de la plupart des mutations entrainant une modification dans la séquence protéique (Tanigawa et Watanabe, 2011). Une exception est *L. sanfranciscensis* pour laquelle deux gènes parmi les 6 du schéma MLST présentent des valeurs supérieures à 1 ouvrant la possibilité pour que ceux-ci soient sous l'influence d'une sélection positive (Picozzi *et al.*, 2010). Cette force sélective se traduirait par une tendance à fixer plus rapidement des mutations engendrant des modifications de la séquence protéique que des mutations synonymes et que cette sélection serait par conséquent atypique.

En cela, ces gènes pourraient ne pas refléter l'évolution des populations au sein de cette espèce. Un autre cas d'hétérogénéité concernant les forces sélectives auxquelles sont soumis les gènes choisis pour la MLST a été observé chez *L. casei* (Cai *et al.*, 2007). En effet, les gènes *polA, metRS* et *nrdD* sont caractérisés par des valeurs *D* de Tajima positives, suggérant que ces gènes sont sous l'effet d'une sélection balancée (Cai *et al.*, 2007), laquelle

favorise le maintien de multiples allèles dans la population. Des valeurs positives de *D* peuvent aussi signifier que la taille de la population est en déclin (Lemey *et al.*, 2009).

I.6.3.2 Structure et évolution des populations chez les bactéries lactiques

I.6.3.2.1 Sélection de populations et domestication

Le niveau de diversité peut être estimé grâce à l'indice de diversité nucléotidique π, lequel correspond au nombre moyen de nucléotides différents entre deux séquences d'ADN. Chez *S. thermophilus,* la diversité est faible par rapport aux espèces apparentées du groupe *salivarius* (Delorme *et al.*, 2010). Chez *L. lactis,* une faible diversité est également observée, cependant celle-ci se situe au niveau intra-espèce et concerne une sous-population constituée par les souches issues des fromages (Passerini *et al.*, 2010). Les autres souches issues d'environnements alimentaires (le lait cru) et non alimentaires sont caractérisées par une importante diversité (Passerini *et al.*, 2010). Ce phénomène de faible diversité ne semble pas être restreint aux bactéries de type « Starter Lactic Acid Bacteria » (SLAB) que sont *S. thermophilus* et *L. lactis.* En effet, une faible diversité a été observée également pour la bactérie « Non Starter Lactic Acid Bacteria » NSLAB *L. casei* (Diancourt *et al.*, 2007). Il a été proposé chez *L. lactis* que ce phénomène de réduction de la diversité est la conséquence du phénomène de domestication (Passerini *et al.*, 2010). En effet, la domestication est le processus selon lequel une espèce élevée en captivité subit des modifications la rendant plus utile à l'homme, lequel contrôle sa reproduction et son apport nutritif (Douglas et Klaenhammer, 2010). Cette définition s'applique aux bactéries lactiques alimentaires puisqu'elles ont été propagées *via* la pratique traditionnelle du report de culture et de l'utilisation de ferments à l'échelle industrielle (Douglas et Klaenhammer, 2010). Ainsi, les souches de *L. lactis* sont sub-divisées en deux groupes : les souches « environnementales » et les souches « domestiquées » (Passerini *et al.*, 2010) (figure 8). Une autre hypothèse non exclusive permettant d'expliquer cette réduction de la diversité implique de considérer le fromage comme un environnement sélectif. En effet, le fromage est un environnement dans lequel la concentration en sels est élevée, les variations de pH sont importantes, la

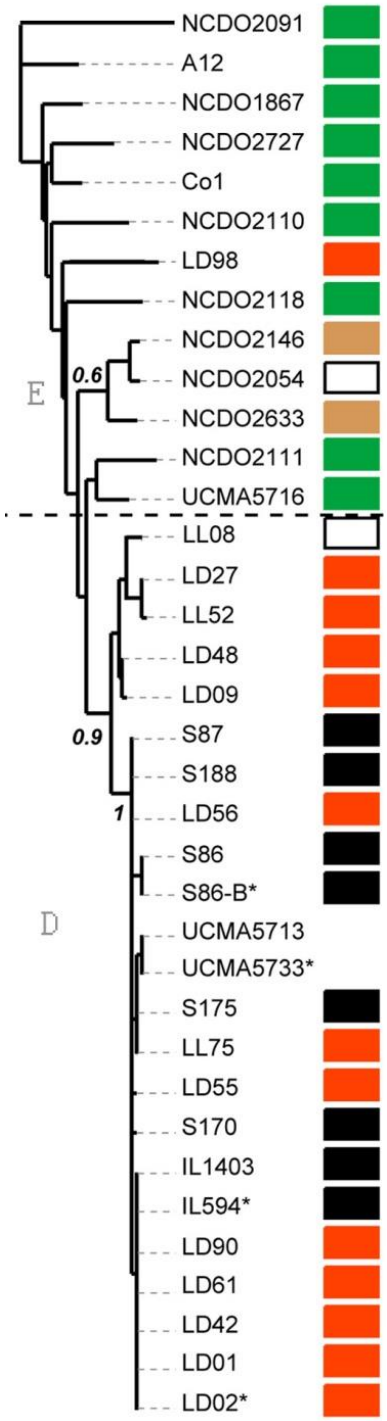


Figure 8. Phylogénie de *L. lactis* basée sur une analyse MLST (d'après Passerini *et al.,* 2010)

La reconstruction phylogénétique a été réalisée selon la méthode du plus proche voisin. La longueur des branches est proportionnelle à la distance génétique. L'origine des souches est indiquée en couleur : vert pour les isolats de plantes, marron pour les isolats de la peau d'animaux, blanc pour les isolats de laits, rouge pour les levains d'acidification, noir pour les isolats de fromages, sans couleur pour les isolats dont l'origine est incertaine. Les souches E sont issues de l'environnement et les souches D sont domestiquées.

température est faible et les carences nutritionnelles peuvent être importantes. Ces conditions imposées aux micro-organismes pourraient constituer une forte pression de sélection qui aboutirait à la survie d'un nombre restreint de génotypes adaptés.

I.6.3.2.2 Existence de sous-populations au niveau intra-espèce

Outre *L. lactis* (Passerini *et al.*, 2010), l'existence de sous-populations a également été décrite pour les espèces *L. johnsonni* (Buhnik-Rosenblau *et al.*, 2012), *O. oeni* (Bilhere *et al.*, 2009; Bridier *et al.*, 2010), *L. salivarius* (Raftis *et al.*, 2011), *E. faecalis* (Buhnik-Rosenblau *et al.*, 2013) et *L. delbrueckii* (Tanigawa et Watanabe, 2011).

- *Lactobacillus johnsonnii*

L'espèce *L. johnsonni* est scindée en trois groupes. Chaque groupe contient des souches provenant d'un hôte spécifique : le poulet, l'humain ou la souris. L'ancêtre de *L. johnsonii* colonisait donc probablement le tube digestif de l'ancêtre de ces trois animaux. Cette relation stricte entre la proximité phylogénétique et l'origine des souches suggère que l'espèce *L. johnsonii* a co-évolué avec son hôte (Buhnik-Rosenblau *et al.*, 2012). Cette hypothèse est en accord avec la théorie de l'hologénome, laquelle considère que l'holobionte, formé de l'animal ou la plante et de l'ensemble des micro-organismes qui leur sont associés, constituent une unité de sélection évolutive (Zilber-Rosenberg et Rosenberg, 2008).

- *Oenococcus oeni*

Chez *O. oeni,* le dendrogramme obtenu basé sur l'alignement des séquences concaténées n'a pas montré de relation monophylétique avec l'origine géographique des souches (de Las Rivas *et al.*, 2004). Cependant une analyse ultérieure, basée sur l'utilisation des mêmes gènes *gyrB, ddl, pgm,* et *recP* ainsi que des gènes *g6pd, dnaE, purK* et *rpoB,* a montré qu'il existe deux sous-populations parmi les 258 souches testées, au lieu de 18 souches pour l'étude précédente (Bilhere *et al.*, 2009; Bridier *et al.*, 2010). Ces études montrent ainsi l'importance de la collection de souches testées et des gènes utilisés pour une analyse de diversité via la méthode de MLST. Toutefois, même si deux sous-populations ont été identifiées, aucun lien

n'a été mis en évidence entre l'origine des souches et leur sous-population d'appartenance (Bilhere *et al.*, 2009)(Bridier *et al.*, 2010).

- *Lactobacillus salivarius*

L. salivarius est une bactérie utilisée comme probiotique chez l'homme et l'animal. Chez cette espèce, trois clades majeurs ont été identifiés grâce à une étude par comparaison de génomes basée sur l'hybridation (CGH) et par MLST (Raftis *et al.*, 2011). Les relations phylogénétiques montrent que certaines souches cliniques sont étroitement apparentées à des souches à fort potentiel probiotique. Deux hypothèses peuvent expliquer ce résultat. La première impliquerait qu'il n'existerait pas de lignée virulente au sein de l'espèce *L. salivarius* et que les rares cas de septicémie soient dus à l'état affaibli des patients. La seconde hypothèse impliquerait l'existence, au sein de cette espèce, de lignées relativement plus virulentes auquel cas les souches apparentées aux souches cliniques pourraient présenter un risque plus important pour le consommateur dans le cadre de l'utilisation de cette espèce comme probiotique. Dans le cadre de cette hypothèse, cela impliquerait que ces souches présenteraient des caractéristiques génétiques différentes comme par exemple la présence de gènes de virulence absents des autres lignées (Raftis *et al.*, 2011). Si tel était le cas, il pourrait alors être pertinent d'éviter les souches appartenant à ces lignées lors du choix de souches probiotiques.

- *Enterococcus faecalis*

E. faecalis est une bactérie aux multiples facettes : c'est un commensal du tube digestif, un pathogène nosocomial où elle pose des problèmes de multi-résistances aux antibiotiques, une bactérie d'intérêt technologique en fromagerie où elle contribue à l'affinage des fromages ou encore une bactérie d'intérêt probiotique (Buhnik-Rosenblau *et al.*). Une analyse de type MLST révèle que deux complexes clonaux contiennent presque exclusivement des souches cliniques (Ruiz-Garbajosa *et al.*, 2006). Dans une autre analyse réalisée avec une collection différente, il est montré que l'espèce est divisée en trois groupes dont un contient les souches d'origine laitière et les souches probiotiques. Par ailleurs, les souches cliniques humaines et animales ne sont pas réparties en groupes spécifiques (Buhnik-Rosenblau *et al.*, 2013).

- *Lactobacillus delbrueckii*

Dans le cas de *L. delbrueckii*, les analyses de MSLT ont confirmé l'existence de 4 sous-populations, lesquelles avaient préalablement été identifiées comme les sous-espèces *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. delbrueckii* subsp. *indicus* et *L. delbrueckii* subsp. *lactis* (Tanigawa et Watanabe, 2011).

- Conclusion

Les sous-populations identifiées chez les bactéries lactiques pourraient constituer des sous-espèces caractérisées par des génotypes et par conséquent, pour les espèces alimentaires, des groupes aux propriétés technologiques différentes. Ainsi les phénomènes de domestication et/ou de sélection naturelle ayant lieu dans l'aliment pourraient se traduire de façon massive par des phénomènes de sous-spéciation, voire de spéciation comme cela a vraisemblablement été le cas pour *S. thermophilus* (Bolotin *et al.*, 2004).

I.7 Objectifs

Les objectifs de la thèse ont pour contexte l'utilisation de *C. maltaromaticum* en alimentation humaine à l'échelle industrielle. Or l'utilisation massive d'une bactérie nécessite de s'assurer au préalable de son innocuité pour l'alimentation animale et humaine. Bien que cette bactérie soit considérée comme GRAS aux Etats-Unis et qu'elle figure dans la liste des micro-organismes à intérêt technologique en Europe (Bourdichon *et al.*, 2012), celle-ci ne présente pas le statut QPS (EFSA, 2012). En effet, cette bactérie est connue comme pathogène de poisson (Loch *et al.*, 2011; Schaffer *et al.*, 2013; Toranzo *et al.*, 1993) et l'analyse du génome d'une souche isolée de poisson malade a révélé la présence potentielle de gènes de virulence (Leisner *et al.*, 2012). De plus, quelques isolats associés à des pathologies humaines existent en plus des isolats cliniques présents chez d'autres espèces du genre (Leisner *et al.*, 2007). Par ailleurs, les connaissances sur cette bactérie sont insuffisantes pour considérer qu'elle puisse être ajoutée volontairement dans la chaîne alimentaire sans évaluation sanitaire approfondie (EFSA, 2012).

L'objectif de cette thèse est de déterminer si cette bactérie peut être utilisée de façon sûre en alimentation humaine et animale. Bien qu'un génome d'une souche de cette espèce soit séquencé, la souche choisie est un pathogène de poisson et de plus la séquence génomique n'est pas complète (Leisner *et al.*, 2012). La première étape de la thèse était de participer au séquençage complet du génome d'une souche d'origine fromagère : la souche *C. maltaromaticum* LMA 28. La séquence complète donnera une information exhaustive sur les caractéristiques génétiques de cette souche en lien avec la virulence et de façon plus générale avec la biologie des bactéries de cette espèce.

Dans le contexte d'une évaluation sanitaire, la présence d'un micro-organisme vivant dans un aliment pose en premier lieu la question du devenir de ce micro-organisme après ingestion par le consommateur. Cette bactérie est naturellement retrouvée dans le tube digestif de poissons vivants et d'insectes et serait ainsi un membre du microbiote intestinal de ces animaux (Leisner *et al.*, 2007). Toutefois, le tube digestif de mammifères étant très différent de celui des poissons, la capacité de la bactérie à survivre durant le transit intestinal de mammifères n'est pas implicite. La seconde étape de cette thèse a consisté à déterminer

si la bactérie est capable de survivre dans le tractus digestif d'un animal modèle et le cas échéant à déterminer si elle est capable d'interagir avec l'hôte.

C. maltaromaticum est une bactérie aux multiples habitats tels que l'aliment, le tube digestif d'animaux et le sol. Or aucune information n'est disponible à ce jour quant à la structure des populations bactériennes au sein de cette espèce. Par ailleurs, aucun outil performant de typage n'est disponible pour cette espèce. Pourtant cet outil pourrait permettre par exemple de différencier les souches associées à des pathologies de poissons de celles issues de produits alimentaires, ou serait utilisable dans le cadre d'une utilisation industrielle pour différencier des souches aux propriétés technologiques différentes. Ainsi, la troisième étape de cette thèse consistait à mettre au point un outil de typage basé sur la MLST.

II. Résultats

Article 1

II.1 Séquence génomique complète de *Carnobacterium maltaromaticum* LMA 28

II.1.1 Introduction

Les séquences génomiques de trois souches de *Carnobacterium* sont publiquement disponibles. Les souches *Carnobacterium* sp. AT7 et *Carnobacterium* sp. 17-4 (Voget *et al.*, 2011) sont des espèces éloignées phylogénétiquement. La troisième souche est *C. maltaromaticum* ATCC 35586, laquelle est une souche pathogène de poissons. De ces trois séquences, seule celle de la souche *Carnobacterium* sp. 17-4 est complète, par ailleurs aucune séquence génomique d'une souche issue d'un environnement alimentaire présentant un intérêt technologique n'est disponible. L'objectif était de déterminer la séquence complète de la souche *C. maltaromaticum* LMA 28, souche ayant été isolée en 1994 d'un fromage brie (Millière *et al.*, 1994). La présence de cette bactérie a été associée à des caractéristiques organoleptiques positives (Afzal *et al.*, 2013).

II.1.2 **Complete chromosome sequence of *Carnobacterium maltaromaticum* LMA 28**

Catherine Cailliez-Grimal[1]*, Stéphane Chaillou[2,3], Jamila Anba-Mondoloni[2,3], Valentin Loux[4], Muhammad Inam Afzal[1], Abdur Rahman[1], Gilles Kergourlay[5,6], Marie-Christine Champomier-Vergès[2,3], Monique Zagorec[2,3,5,6], Paw Dalgaard[7], Jorgen J. Leisner[8], Hervé Prévost[5,6], Anne-Marie Revol-Junelles[1], Frédéric Borges[1]

Université de Lorraine, Laboratoire d'Ingénierie des Biomolécules LIBio, 2 avenue de la Forêt de Haye B.P. 172, 54505 Vandoeuvre-lès-Nancy, France[1] ; INRA, UMR1319 Micalis, 78350 Jouy-en-Josas, France[2]; AgroParisTech, UMR Micalis, 78350 Jouy-en-Josas, France[3] ; Unité de Mathématique, Informatique et Génome, INRA, Jouy-en-Josas, France[4] ; INRA, 44307 Nantes, France[5] ; LUNAM Université, Oniris, UMR 1014 Secalim, Nantes, 44307, France[6] ; National Food Institute (DTU Food), Technical University of Denmark, Kgs. Lyngby, Denmark[7], Department of Veterinary Disease Biology, Faculty of Health and Medical Sciences, University of Copenhagen, Denmark[8]

*Corresponding author. Mailing address :Université de Lorraine, Laboratoire d'ingénierie des Biomolécules, 2 avenue de la Forêt de Haye B.P. 172, F-54505 Vandoeuvre-lès-Nancy, France. Phone : +33 (0)3 83 59 58 84. Fax : +33 (0)3 83 59 57 72. E-mail: catherine.cailliez@univ-lorraine.fr

II.1.**2.1 Abstract**

Within the lactic acid bacteria genus *Carnobacterium, Carnobacterium maltaromaticum* is one of the species most frequently isolated from natural environments and food. It could potentially play a major role in food products biopreservation. We report on the 3.649-Mb chromosome sequence of *C. maltaromaticum* LMA 28, isolated from ripened soft cheese.

The genus *Carnobacterium* belongs to the Lactic Acid Bacteria, and consists currently of 11 species. *Carnobacterium maltaromaticum* strains are widely found in foods including dairy products (Afzal *et al.*, 2010). This species has potential for application as protective cultures in foods. Most research has focused on the production of bacteriocins, their roles in inhibition of *Listeria monocytogenes* as well as the regulation of metabolic pathways of sensory importance (Leisner *et al.*, 2007). *Carnobacterium maltaromaticum* LMA 28 was isolated from a soft ripened cheese (Millière *et al.*, 1994).

The genome sequence of *C. maltaromaticum* LMA 28 was determined by using 454 pyrosequencing (GS-FLX system Roche 454 Life Science, Mannheim, Germany) and Illumina sequencing. Pyrosequencing runs, including shotgun and paired-end runs, resulted in 15 scaffolds containing 123 contigs and 55-fold coverage. A subsequent illumina sequencing run performed with a paired-end library allowed to correct 923 indels. PCR-base techniques and Sanger sequencing of the products were used to close the remaining gaps. The manually curated sequence of LMA 28 comprises one chromosome of 3,649,737bp with an overall G+C content of 34.5%. Coding sequence (CDS) prediction and annotation were performed with ISGA (Hemmerich *et al.*, 2010) and provided 3,933 predicted CDSs, 59 tRNA genes, 6 rRNA operons and 1 single 5S rRNA gene.

So far, three genomic sequences of *Carnobacterium* have been published: the complete genome sequence of *Carnobacterium* sp. 17-4 (Voget *et al.*, 2011) isolated from permanent cold seawater, and the draft genome sequences of *C. maltaromaticum* ATCC 35586, isolated from a diseased salmon (Leisner *et al.*, 2012), and of *Carnobacterium* sp. AT7 a piezophilic strain isolated from the Aleutian trench (Lauro *et al.*, 2007). The genome size of the strain ATCC 35586 (3.5 Mbp) is similar to that of LMA 28 and both are approximately 1 Mbp larger than the genomes of *Carnobacterium* sp. 17-4 and AT7 (2.6 Mbp and 2.4 Mbp, respectively). The larger chromosomal size of *C. maltaromaticum* might explain the ability of this species to adapt to multiple and very diverse environments compared to the other carnobacterial species. This genomic trait is illustrated by the presence of genes involved in the metabolism of branched chain aminoacids.

Indeed the species *C. maltaromaticum* is well known for its ability to produce the flavor compound 3-methylbutanal which is the result of leucine catabolism. In lactic acid bacteria, the more prevalent pathway is the α–keto acid dehydrogenase (KaDH) pathway (Liu *et al.*, 2008). A less common alternative pathway is the α–keto acid decarboxylase pathway, encoded by *kdcA*. This gene is indeed only described for two strains of *L. lactis* (Liu *et al.*, 2008). In the genome sequence of *C. maltaromaticum* LMA 28 and ATCC 35586, an orthologous gene of *kdcA* was found which is absent from the genome of the other *Carnobacterium* strains.

II.1.2.2 Nucleotide sequence accession numbers. The complete chromosome sequence of *Carnobacterium maltaromaticum* LMA 28 has been deposited at EMBL/ GenBank under the accession number no. HE999757.

II.1.2.3 Acknowledgments

We thank Myriam Michel and Arnaud Khemisti for providing excellent technical assistance. This work was supported partly by the FABELOR Competence Cluster, Nancy, France

II.1.3 Résultats majeurs

Deux stratégies de séquençage ont été choisies. La séquence a été déterminée par pyroséquençage 454 ainsi que par Illumina. Dans les deux cas une librairie de type paired-ends a été construite au préalable. L'ordonnancement des 15 scaffolds a été déterminé par PCR et la séquence des gaps entre contigs et scaffolds a été déterminée par séquençage selon la méthode de Sanger. Les séquences homopolymériques ont été validées grâce aux données de séquençage obtenues par Illumina. La séquence obtenue comprend ainsi un chromosome de 3,7 Mpb ainsi que trois plasmides de 90 kbp, 64 kbp et 12 kpb et a été annotée automatiquement grâce à la plateforme d'annotation automatique ISGA (Integrative Services for Genomic Analysis). D'après l'analyse de la séquence génomique partielle, le génome de la souche *C. maltaromaticum* ATCC 35586 mesurerait au moins 3,5 Mpb (Leisner *et al.*, 2012). Or, la taille des génomes des souches *Carnobacterium* sp. 17-4 et AT7 mesurerait 2,6 Mpb et 2,4 Mpb respectivement, indiquant que les deux génomes des souches de *C. maltaromaticum* serait 1 Mpb plus grands.

Article 2

II.2 Adaptation de *Carnobacterium maltaromaticum* au tractus gastro-intestinal de mammifères : de la survie chez la souris aux interactions avec les cellules humaines

II.2.1 Introduction

Très peu de données sont disponibles concernant le devenir de *C. maltaromaticum* après ingestion par le consommateur. *C. maltaromaticum* est connu comme un membre de la flore intestinale de poissons et d'insectes (Leisner *et al.*, 2007). Des données de métagénomique ont permis d'associer cette bactérie avec les mammifères. Ainsi, il semblerait qu'elle ait été identifiée dans des fèces d'un ours polaire et d'un guépard du zoo de St Louis aux Etats-Unis (Ley *et al.*, 2008) ainsi que de fèces humains (Li *et al.*, 2012)(tableau 4). Cette bactérie serait également capable de coloniser la peau humaine (Kong *et al.*, 2012). D'autres *Carnobacterium* auraient été identifiés dans des fèces d'enfants (Roger *et al.*, 2010) et du rumen de bovins (Brulc *et al.*, 2009). Bien que ces données soient peu nombreuses, elles suggèrent que la bactérie est capable de survivre dans le tube digestif de mammifères.

Tableau 4. Données métagénomiques témoignant d'une association entre *Carnobacterium* et mammifères

Origine	Numéro d'accession (GenBank)	Identité (%)	Espèce la plus proche	Reference
Peau humaine	GQ076203	99	*C. maltaromaticum*	(Grice *et al.*, 2009)
	GQ076377	99	*C. maltaromaticum*	
	GQ076153	99	*C. maltaromaticum*	
Peau humaine	HM272644	99	*C. maltaromaticum*	(Kong *et al.*, 2012)
	HM257475	99	*C. maltaromaticum*	
Peau humaine	JF108172	99	*C. maltaromaticum*	(Kong *et al.*, 2012)
fèces ours polaire	EU460395	99	*C. maltaromaticum*	(Ley *et al.*, 2008)
	EU460380	99	*C. maltaromaticum*	
	EU460246	99	*C. maltaromaticum*	
Fèces guépard	EU468052	99	*C. maltaromaticum*	(Ley *et al.*, 2008)
Fèces humain	HQ817954	99	*C. maltaromaticum*	(Li *et al.*, 2012)
	HQ817350	99		
Fèces enfant	HQ259724	99	*C. divergens*	(Roger *et al.*, 2010)
Rumen	EU845357	98	*Carnobacterium* sp.	(Brulc *et al.*, 2009)

II.2.2 Adaptation of the lactic acid bacterium *Carnobacterium maltaromaticum* LMA 28 to the mammalian gastrointestinal tract: from survival in mice to interaction with human cells

Abdur Rahman[1], Marita Gleinser[2], Marie-Claire Lanhers[3], Christian U. Riedel[2], Benoît Foligné[4], Marine Hanse[3], Frances T. Yen[5], Amira Klouj[1], Muhammad Inam Afzal[1], Alexandre Back[1], Cécile Mangavel[1], Catherine Cailliez-Grimal[1], Anne-Marie Revol-Junelles[1], and Frédéric Borges[1]*

[1] Laboratoire d'Ingénierie des Biomolécules (LIBio), E.N.S.A.I.A.- Université de Lorraine, 2 avenue de la Forêt de Haye TSA 40602, F-54518 - VANDOEUVRE CEDEX, France ; [2] Institute of Microbiology and Biotechnology, University of Ulm, Albert-Einstein-Allee 11, D-89081 Ulm, Germany ; [3] Université de Lorraine, BFLA, EA 3998 - 0340 UR AFPA (USC INRA), Vandoeuvre-lès-Nancy, F-54518, France ; [4] Institut Pasteur de Lille, Lactic Acid Bacteria and Mucosal Immunity, Center for Infection and Immunity of Lille, 1, rue du Pr Calmette, BP 245, F-59019 Lille, France ; [5]INSERM, BFLA, EA 3998 - 0340 UR AFPA (USC INRA), Vandoeuvre-lès-Nancy, F-54518, France ; *Corresponding author : frederic.borges@univ-lorraine.fr, +33 3 83 59 58 83

II.2.2.1Abstract

Carnobacterium maltaromaticum is a non starter lactic acid bacterium frequently isolated from food products. While this bacterium has been extensively studied in food background, very little is known about its fate once ingested. In this study the strain *C. maltaromaticum* LMA 28 was given to mice by intragastric gavage. Selective enumeration in the feces showed that the bacterium is able to survive during the transit. In addition, experiments show that *C. maltaromaticum* is able to adhere to Caco-2, HT29, and T84 cell lines. Moreover, the measurement of four cytokines produced by human peripheral blood mononuclear cells after incubation with the bacterium suggested that *C. maltaromaticum* LMA 28 exhibit either a neutral or a slightly anti-inflammatory behavior. The analysis of the genome of *C. maltaromaticum* LMA 28 revealed it contains genes for adaptation to the gastrointestinal tract.

II.2.2.2. Introduction

Carnobacterium maltaromaticum is a non starter lactic acid bacterium frequently colonizing food products, i.e. meat, sea and dairy food (Afzal *et al.*, 2010). Its relevance has been underestimated for a long time due to its inability to grow on acetate containing media, i.e. Man Rogosa Sharp (MRS) and Rogosa. This explains the relative late identification of this bacterium in 1974 as *Lactobacillus maltaromicus* (Miller *et al.*, 1974), which was subsequently reclassified as *C. maltaromaticum* (Mora *et al.*, 2003).

The presence of this bacterium is not negligible since it can grow to high concentrations in food, up 10^9 cfu.$g^{-1,}$ and can colonize soft cheeses (Cailliez-Grimal *et al.*, 2007). This psychrophilic bacterium can grow at temperature as low as 2-4°C in meat and cheese (Cailliez-Grimal *et al.*, 2007; Sakala *et al.*, 2002) and at alkaline pH up to 9.6 (Cailliez-Grimal *et al.*, 2007). It can thus colonize efficiently soft-cheeses after the increase of pH occurring during ripening (Cailliez-Grimal *et al.*, 2007). In addition, *C. maltaromaticum* does not interfere with the acidification process and can sustain low pH values when co-cultivated with commercial starters (Edima *et al.*, 2008). The beneficial effect of this bacterium on ripened soft cheese enable this bacterium to be proposed as an adjunct cultures for soft and semi-hard cheese manufacture (Afzal *et al.*, 2010; Briggiler-Marco *et al.*, 2007; Edima *et al.*, 2008).

C. maltaromaticum has been extensively studied as protective cultures; some strains are thus able to inhibit the growth of *Listeria monocytogenes* by producing bacteriocins (Mathieu *et al.*, 1994; Wan *et al.*, 1997) or because of other still unknown mechanisms (Leroi *et al.*, 1996).

C. maltaromaticum is able to produce the biogenic amine tyramine, which is the product of decarboxylation of tyrosine, and in this regard could be a cause of food safety concern (Leisner *et al.*, 2007). However, tyramine is produced at levels well tolerated in healthy subjects (Leisner *et al.*, 2007), and moreover not all strains exhibit this metabolic property since strains of a particular phylogenetic cluster do not cause spoilage of shrimps (Laursen *et al.*, 2006). In addition to interspecies variability, the production of biogenic amines is food dependent (Leisner *et al.*, 2007). Thus, the strain *C. maltaromaticum* LMA 28 does not produce detectable amounts of tyramine and histamine in soft cheeses (Afzal *et al.*, 2010).

C. maltaromaticum has been associated with bacterial infection rather rarely with only one case report of the species from human pus (Chmelar *et al.*, 2002). For these reasons, the strain *C. maltaromaticum* CB1 has been Generally Recognized As Safe (GRAS) in the USA for use in ready to eat meat products since 2005 (FDA, 2005). In addition, it has been added in the updated list of microorganisms with technological beneficial use in 2012 (Bourdichon *et al.*, 2012).

After food consumption, the ability of food bacteria to survive the gastrointestinal varies considerably between strains and species (Bouhnik *et al.*, 1992; Conway *et al.*, 1987; Klijn *et al.*, 1995). Once they are able to survive, bacteria can actively interact with the gastrointestinal milieu, and these interactions can be beneficial or detrimental for the host when considering probiotics or pathogens, respectively, or can be neutral. In the case of *C. maltaromaticum* very little is known about its fate in the gastroinstestinal tract of mammals and its potential interactions with the hosts. *C. maltaromaticum* is well known as a normal inhabitant of fish and insect digestive tract (Leisner *et al.*, 2007). It has been lately associated with mammals as a result of metagenomic studies; according to these data, *C. maltaromaticum* could be an inhabitant of human skin. The ability of *C. maltaromaticum* to deal with the high salt concentration found in cheese is in agreement with this since it is well known that high amount of salt can be found on the surface of the skin. DNA from *C. maltaromaticum* was also found in the faeces of polar bears, cheetahs and humans (Grice *et al.*, 2009; Ley *et al.*, 2008), and DNA from other *Carnobacterium* species, including *Carnobacterium divergens,* was found in human infant feces and in cow rumen. Although data are scarce, they suggest that *Carnobacterium* can survive in the intestinal milieu of mammals.

The aim of the present study was to investigate on the ability of *C. maltaromaticum* to survive in the gastrointestinal tract of mice, to assess its ability to adhere to intestinal cells, and to get insight on its immunomodulatory potential. Genomic data mining was also performed in order to see if genes indicative of an intestinal habitat for *C. maltaromaticum* LMA 28 are present in its genome.

II.2.2.3 Material and methods

II.2.2.3.1 Bacterial strains

C. maltaromaticum LMA 28 was cultured in TSBYE (Tryptone Soy Broth (Biomérieux, Craponne, France) 30 $g.L^{-1}$, Yeast Extract (Biokar, Beauvais, France) 6 $g.L^{-1}$) at 30°C as standing cultures. *Lactobacillus* (Foligne et al., 2007b) were grown at 37°C in MRS medium (Difco™, Beckton Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) and *Bifidobacterium sp.* strains (Preising *et al.*, 2010) were grown anaerobically at 37°C in MRS supplemented with 0.05% L-cysteine hydrochloride. *L. lactis* MG1363 was grown at 30°C in M17 (Difco™, Beckton Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) medium supplemented with 0.5% glucose.

II.2.2.3.2 Animal experiments

Adult male C57BL/6J mice (15 weeks) were purchased from Charles River (St Germain sur l'Arbresle, France). Animals were housed in a room of an accredited establishment (n° A54-547-24), with a 12h light/dark cycle, a mean temperature of 22 °C ± 2 and a relative humidity of 50 ± 20%. They were provided rodent chow diet and water *ad libitum*. After a one-week acclimatization period, experiments were initiated.

Overnight cultures of *C. maltaromaticum* were washed once with sterile physiological water (0.9% NaCl) and suspended in the same solution at a bacterial concentration of 5 x $10^7 cfu.mL^{-1}$. Mice (n=6) were orally intubated with the bacterial suspension (250µL/mouse). Faeces were collected at different time intervals from 0 to 72h and suspended in a tryptone-NaCl (1 $g.L^{-1}$ and 8.5 $g.L^{-1}$ respectively) solution and subsequently subjected to serial dilutions. One hundred microliters of cell suspension were spread on medium for *C. maltaromaticum* (MCM) plates, which are selective for *C. maltaromaticum* (Edima *et al.*, 2007), followed by incubation at 22°C for 3 days. Colonies were counted to determine the number of colony forming units (cfu) present in the samples.

This investigation was conducted in accordance with ethical guidelines as defined by the European Community guiding principles in the care and use of animals (no. 86/609/CEE) and French decree no. 87/848.

II.2.2.3.3 *C. maltaromaticum* species-specific polymerase chain reaction

Species-specific polymerase chain reaction (PCR) was used to confirm the selectivity of the MCM medium. The PCR was performed as previously described (Rachman *et al.*, 2004) with the following modifications. The oligonucleotide primers Cpis and 23S7 (0.5 µM each) were mixed with 1X PCR reaction buffer, 200 µM of each dNTP, 2.5 mM of $MgCl_2$, and 1.25 U of Taq polymerase (MP Biomedicals, Illkirch, France). Bacterial colonies were used as DNA template in PCR mix. The PCR programme began with a step at 95°C for 5 min, followed by 35 cycles of 95°C for 30 sec, 53°C for 30 sec and 72°C for 30 sec, and ended with a final extension step at 72°C for 7 min. The PCR products were analyzed by agarose gel electrophoresis.

II.2.2.3.4 Cell culture and adhesion *in vitro*

Epithelial cell lines were cultivated, and adhesion assays were performed, as previously described (Gleinser *et al.*, 2012). Adhesion was calculated as percent of adherent bacteria relative to the initial inoculum. All adhesion experiments were performed three times independently.

II.2.2.3.5 Peripheral blood mononuclear cells isolation and induction of cytokine release

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from blood of healthy donors and cytokines were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) as previously described (Foligne *et al.*, 2007a; Foligne *et al.*, 2007b). The results are means and standard errors of four experiments. For Interleukine-10 (IL-10) and the ratio tumour necrosis factor alpha (TNFα)/IL-10, the percentages were calculated by taking the mean value obtained for the strains *B. longum* BB536 and *L. lactis* M1363, respectively, as 100%.

II.2.2.4 Results

II.2.2.4.1. Enumeration of viable *C. maltaromaticum* LMA 28 in mice faeces

Following the oral administration of the bacterial suspension (250µL; 1.25x10^7 cfu per mouse), faecal material was collected from 0 to 72 hours and subjected to serial dilutions and plate counting on MCM medium, which is selective for *C. maltaromaticum* (Edima *et al.*, 2007). The selectivity of MCM was assessed with faeces prior to gavage, and no colony was observed on MCM plates. In addition, ten colonies obtained from faeces collected were investigated by PCR using selective primers for *C. maltaromaticum* (Rachman *et al.*, 2004). A PCR product of the expected size was obtained for every colony (data not shown), indicating that the MCM medium is suitable for selective enumeration of *C. maltaromaticum* LMA 28 from mouse faeces. The results show that the number of faecal carnobacteria started to increase two hours after ingestion (Figure 1). It reached a maximum of approximately 10^6 cfu at 6 hours of the time-course and started to decrease between 14 and 24h. Bacterial counts reached a value of approximately 2.4 x 10^0 cfu, 72h after ingestion. These results show that *C. maltaromaticum* LMA 28 can survive during the transit through the digestive tract of mice but suggest that it is not able to persist.

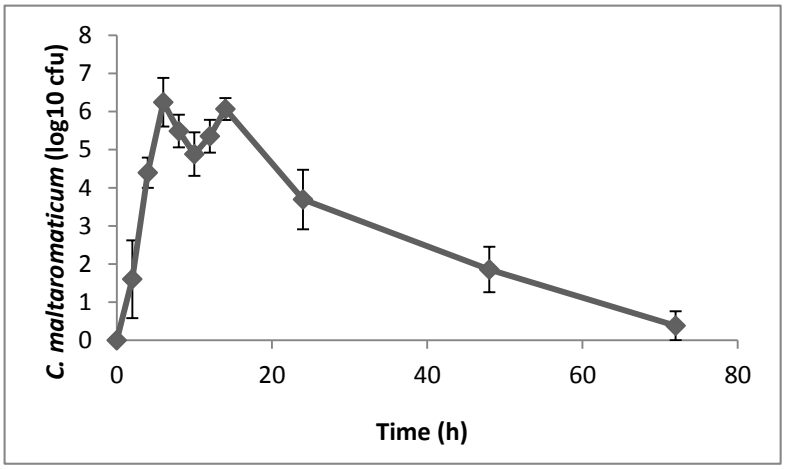


Figure 1. Enumeration of *Carnobacterium maltaromaticum* LMA 28 in mice faeces. At time zero, mice were orally intubated with 1 x 10^7 cfu of *C. maltaromaticum* LMA 28, previously cultured overnight in TSBYE. The mean and standard error of *C. maltaromaticum* LMA 28 colony count originating from faeces collected at different time points from 6 mice are represented.

II.2.2.4.2 Adherence to epithelial intestinal cells

The ability of *C. maltaromaticum* LMA 28 to adhere to three intestinal cell lines was compared to the two strains *B. longum* S17 and *B. longum* E18, which were previously described as adherent and non-adherent strains, respectively (Preising *et al.*, 2010).

The adherence of *C. maltaromaticum* was varying in the range of 1 to 5% approximately, depending on the cell line (Figure 2). It is thus more than 10 times more adherent than the non-adherent *B. longum* E18 strain. Compared to the adherent strain *B. longum* S17, *C. maltaromaticum* binds less to epithelial cells, by a factor of 10 or 2.6 times depending on the cell line, Caco-2 or T84, respectively (Figure 2). Interestingly, adhesion to HT-29 cells was 1.7 fold higher than *Bifidobacterium bifidum* S17 (Figure 2). This results show *C. maltaromaticum* LMA 28 is able to adhere *in vitro* to the epithelial intestinal cells Caco-2, HT29, and T84.

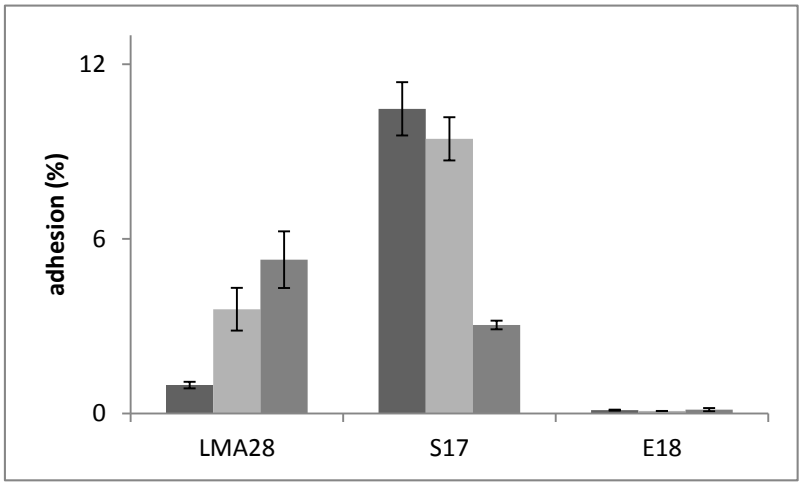


Figure 2. Adhesion of *Carnobacterium maltaromaticum* LMA 28, *B; longum* S17 and *B. longum* E18 to epithelial intestinal cells: , Caco-2; T84; , HT-29. The epithelial cells were infected with equal amounts of bacteria of each strain, and the number of adherent bacteria was related to the number of input bacteria. The strains *B. longum* S17 and *B. longum* E18 were used as adherent and non-adherent control strains, respectively. The adhesion experiments were performed in triplicate. Bars represent the mean ± standard error values.

II.2.2.4.3 Immunomodulation of PBMC

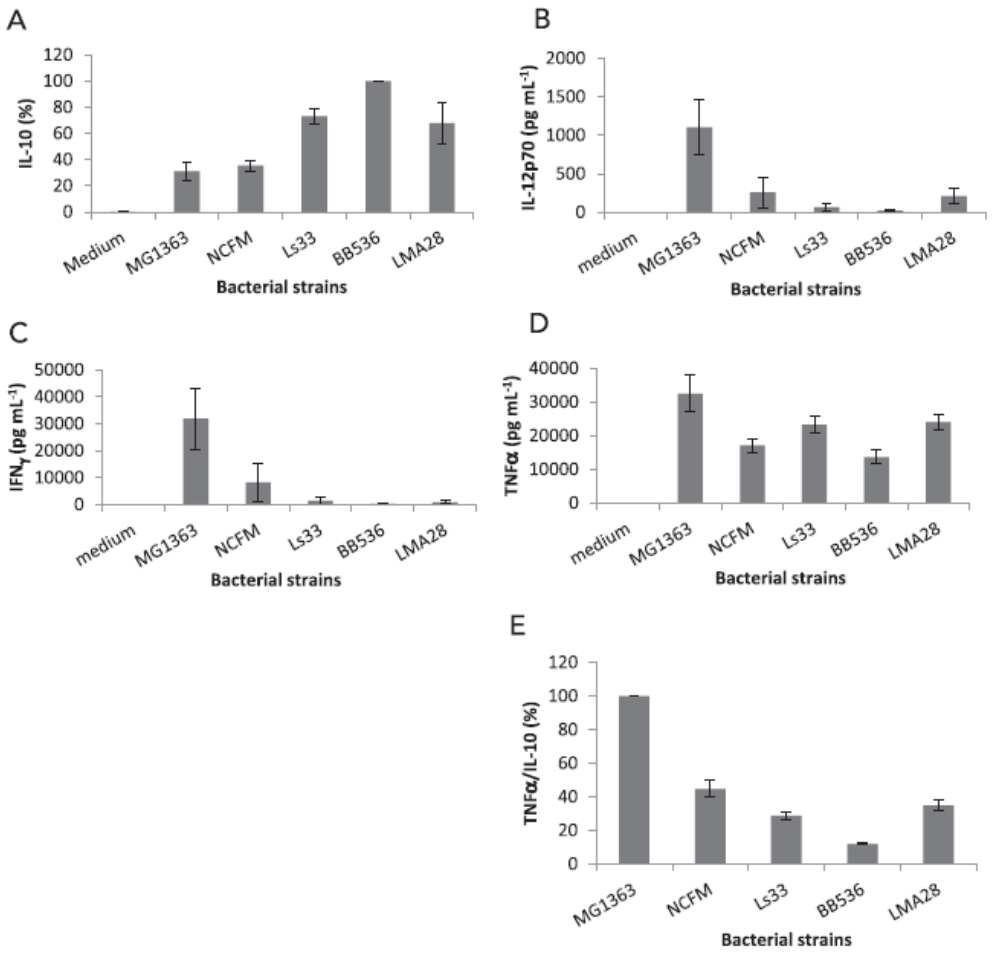


Figure 3. Immunomodulation of PBMC. Bacterial suspension of *Lactococcus lactis* MG1363, *Lactobacillus acidophilus* NCFM, *Lactobacillus salivarius* Ls33, *Bifidobacterium longum* BB536, and *Carnobacterium maltaromaticum* LMA 28 were incubated with cultured PBMC at a multiplicity of infection of 10. After 24h stimulation, supernatants were collected for the measurement of the following cytokines: IL-10 (A), IL-12p70 (B), IFNγ (C), and TNFα (D). The TNFα/IL-10 ratio is presented in panel (E). The values of IL-10 and TNFα/IL-10 are expressed as percentages by taking the values of *B. longum* and *L. lactis* MG1363 as 100%, respectively. The results are means and standard errors of the data obtained from 4 blood donors.

The impact of *C. maltaromaticum* LMA 28 on the secretion of cytokines by human PBMC was investigated. Four reference strains were compared to *C. maltaromaticum* LMA 28: *L. lactis* MG1363 and *Lactobacillus acidophilus* NCFM, which are slightly pro-inflammatory, and *B. longum* BB536 and *Lactobacillus salivarius* Ls33 which are more anti-inflammatory. *C. maltaromaticum* LMA 28 exhibited a behavior similar to that of strain *Lb. salivarius* Ls33

(Figure 3). Thus, these strains indeed induced similar amounts of IL-10 and TNF-α. However, when considering the TNF-α/IL-10 ratio, which reflects the ratio between pro- and anti-inflammatory, *C. maltaromaticum* LMA 28 is intermediary between the strain *L. salivarius* Ls33 and the slightly pro-inflammatory strain *L. acidophilus* NCFM (Figure 3E). These results suggest that *C. maltaromaticum* would have either neutral or slightly anti-inflammatory properties.

II.2.2.4.4 Genome sequence analysis

Intestinal bacteria have to face multiple intestinal stresses, including the immune system and bile salts. In lactic acid bacteria, several genes involved in the resistance to such stresses have previously been identified (Kleerebezem *et al.*, 2010). Analysis of the genome sequence of *C. maltaromaticum* LMA 28 revealed that it contained genes involved in the resistance to components of the immune system. Indeed, genes homologous to *mprF* and the *dlt* gene cluster, which are involved in phospholipid lysinylation and D-alanylation of teichoic acids, respectively, were found (Table 1). These genes have been demonstrated to confer resistance to antimicrobial peptides. Indeed, both MprF and the four proteins encoded by the *dlt* gene cluster lead to an increase of the density of positive charges on the surface of the plasma membrane and of teichoic acids, respectively. The positive charges are believed to be responsible for a decreased affinity to cationic antimicrobial peptides including animal defensins and bacteriocins (Collins *et al.*, 2002; Peschel *et al.*, 2001). In *Lactobacillus reuteri*, a *dlt* mutant is impaired in the colonization of the intestinal tract of mice (Walter *et al.*, 2007). In addition to *mprF* and *dlt*, the genome of *C. maltaromaticum* LMA 28 contains homologues of *asnH*, *oatA,* and *pgdA* (table 1) which are involved in amidation, O-acetylation, and N-deacetylation of peptidoglycan, respectively (Kleerebezem *et al.*, 2010; Veiga *et al.*, 2009). Deacetylated sugars in the peptidoglycan strongly reduce the activity of lysozyme, an important component of the innate immune system (Vollmer, 2008a).

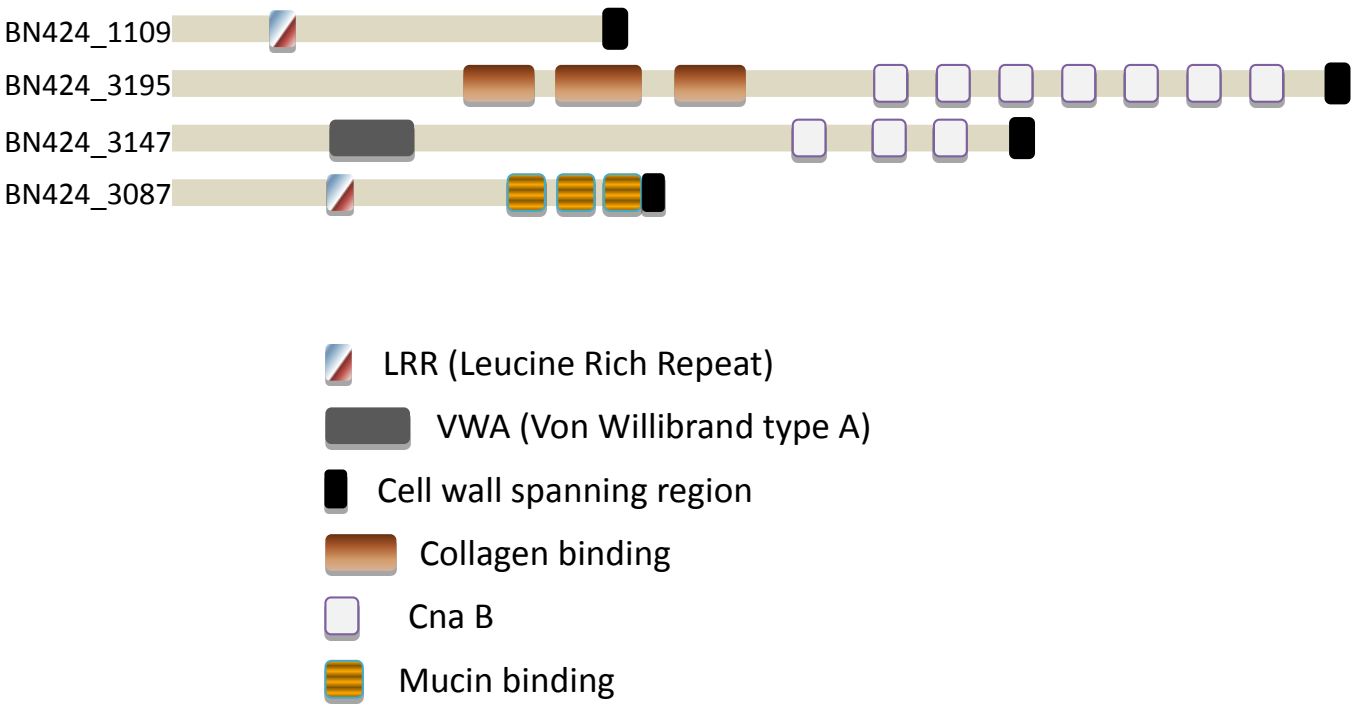
Table 1. Genes potentially involved in resistance to immunity and bile salts

Gene name	Locus tag	Encoded Function	Resistance
mprF	*bn424_2074*	Phospholipid lysinylation	Antimicrobial peptides
asnH	*bn424_2404*	Amidation of peptidoglycan	Antimicrobial peptides
***dlt* gene cluster**	*bn424_2242 to bn424_2246*	D-alanylation of teichoic acids	Antimicrobial peptides
oatA	*bn424_1149*	O-acetylation of peptidoglycan	Lysozyme
pgdA	*bn424_2841* *bn424_2407*	N-deacetylation of peptidoglycan	Lysozyme, Inflammation down-regulation
bsh	*bn424_2909* *bn424_1618* *bn424_344* *bn424_349* *bn424_2770* *bn424_3599*	Bile salt hydrolase	Bile salts

The genome of *C. maltaromaticum* LMA 28 also contains 6 genes homologous to the paralogous bile salt hydrolases *bshA* and *bshB* of *Lactobacillus acidophilus* NCFM (table 1). These bile salts hydrolases have been proposed to be niche-specific markers of gut in lactobacilli (O'Sullivan *et al.*, 2009). They are essential for bile tolerance of *Lactobacillus plantarum* (Lambert *et al.*, 2008).

Besides genes involved in intestinal stress resistance, intestinal lactic acid bacteria produces several surface components involved in adhesion with intestinal mucosa. Adherence to intestinal epithelial cells in lactobacilli is conferred by surface proteins covalently anchored to the cell-wall peptidoglycan by a sortase (Velez *et al.*, 2007). The analysis of the genome of *C. maltaromaticum* LMA 28 revealed that it contains 5 homologues of *L. lactis* sortase A (Dieye *et al.*, 2010). In line with this, 30 proteins potentially covalently anchored to the cell wall were predicted to be encoded by the genome of *C. maltaromaticum* LMA 28. Among these proteins, four are predicted to contain LRR domains, VWA domains, collagen- and mucin-binding domains (Figure 4). These domains are described as actors of physical interaction with a host conferring the ability to adhere to host tissues. In addition, the putative surface proteins *bn424_3347, bn424_3346*, and *bn424_3345* are predicted to form pili on the surface of the cells ; more precisely, these proteins are homologous to putative pilus tip protein, putative minor pilin protein and major pilin protein of *Enterococcus faecium,* respectively (accession numbers: GenBank : ACI49667, ACI49666, and ACI49665). Pili are multisubunit hairlike

structures extending from the bacterial cell surface that are involved in adhesion to host tissues (Telford *et al.*, 2006).



Figur 4. Putative surface proteins of *C. maltaromaticum* LMA 28 involved in cellular adhesion**.** The genome of *C. maltaromaticum* LMA 28 was mined to predict genes encoding proteins covalently anchored to the cell wall. The proteins containing potential domain with a predicted function reminiscent of adhesion are represented.

Exopolysaccharides are described to play multiple roles in the interaction with the host, e.g. shielding other cell surface effector molecules and protection from antimicrobial factors of the lower regions of the gastrointestinal tract (Lebeer *et al.*, 2010). The analysis of the genome of *C. maltaromaticum* LMA 28 revealed the presence of two loci potentially involved in the synthesis of exopolysaccharides. The *eps* locus 1 and *eps* locus 2 would contain 12 and 13 genes *bn424_3057* to *bn424_3068*, and *bn424_2753* to *bn424_2765*, respectively. Those loci contain homologues to genes typically involved in exopolysaccharides in other bacteria. Thus, homologues to *epsABDGK*, which are involved in exopolysaccarides synthesis in *L. lactis* NIZO B40 (van Kranenburg *et al.*, 1997), were found. Other genes, annotated as involved in capsular exopolysaccharide family, O-antigen polymerase family, and

glycosyltransfer, as well as genes that would encode enzymes involved in sugars modifications (e.g. epimerases, dehydratases, and reductases) were also found in these two loci.

Thus, the analysis of the genome sequence of *C. maltaromaticum* LMA 28 suggests it contains genes conferring resistance to bile and to components of the immune system, that it produces adhesion factors and exopolysaccharides on the surface of its cells. Altogether, it supports the hypothesis of an intestinal life of *C. maltaromaticum* LMA 28.

II.2.2.5 Discussion

The fate of bacteria during the intestinal transit highly depends on the considered bacteria. Thus, the ability to survive the adverse conditions of the gut is highly variable as observed for the genus *Bifidobacterium* (Kailasapathy et Chin, 2000). It can be assumed that the ability of a microorganism to survive the transit is a prerequisite for a bacterium to be able to exert a beneficial or detrimental effect on the host. In this study, *C. maltaromaticum* LMA 28 was given to mice as a saline suspension. Enumeration of *C. maltaromaticum* LMA 28 cfu revealed that the bacterium is recovered in the faeces showing that it is able to survive during the transit through the digestive tract. The rate of recovery was high since the amount of bacteria recovered in the feces was approximately equal to the given bacteria. Genome analysis of the strain *C. maltaromaticum* LMA 28 revealed the presence of genes that could explain its ability to resist to the adverse conditions encountered in the digestive tract. Indeed, homologues involved in resistance to bile salts and the components of the immune system were found. More precisely, homologues to *bshA* and *bshB* encoding hydrolases able to inactivate bile salts in the probiotic lactobacilli are present (Lambert *et al.*, 2008; O'Sullivan *et al.*, 2009). In addition, genes potentially responsible for the modification of the surface components of the bacterial cells comprising the plasmic membrane, teichoic acids and peptidoglycan were found. These modifications were described as important determinants of resistance to cationic antimicrobial peptides and lysozyme, two components of the innate immune system.

C. maltaromaticum is well known as a normal flora of fish intestine. This bacterium has been indeed isolated from diverse fish including charr, cod, salmon and trout (Leisner *et al.*,

2007). On the other hand, this bacterium is less frequently associated to the intestine of mammals. Our findings suggest that *C. maltaromaticum* could be transient, rather than permanent, inhabitants of mammal's intestine.

If *C. maltaromaticum* is able to survive during the transit, then it opens the possibility for the bacterium to interact with the host. Thus, adherence to intestinal epithelial cells was investigated. Adherence experiments were performed with three cell lines and the adherence ability was compared to one adherent and one non-adherent *Bifidobacterium* strains. Results showed that the strain *C. maltaromaticum* LMA 28 is able to adhere to these three cell lines. This suggests that *C. maltaromaticum* LMA 28 could have the ability to come in intimate contact with the intestinal mucosa. In non pathogenic bacteria, adherence ability is reported to play several roles. Adherence would be an important factor of intestinal mucosa colonization, it contributes to intestinal barrier function against pathogens invasion (OhlandetMacnaughton, 2010), and is correlated to the anti-inflammatory properties of probiotics (Preising *et al.*, 2010).

Our results revealed that the adhesion profiles of *C. maltaromaticum* LMA 28 and *B. bifidum* S17 are different. Indeed, the highest adherence values for *C. maltaromaticum* LMA 28 were obtained with T84 and HT29, while for *B. bifidum* the highest scores were obtained with Caco-2 and T84 (Figure 2). Caco-2 and T84 cells were used as differentiated monolayers, while HT-29 cells do not differentiate into columnar epithelial cells. In consequence, our data suggest that the mechanism of adhesion of *C. maltaromaticum* LMA 28 to intestinal epithelial cells is different than the one of *B. bifidum* S17.

To get an insight on the impact of *C. maltaromaticum* on inflammation, the strain *C. maltaromaticum* LMA 28 was incubated with human PBMC and the cytokine production was monitored. The results suggest that *C. maltaromaticum* could have neutral or slightly anti-inflammatory properties. The molecular mechanism underlying the inflammatory properties of gut microorganisms includes the interaction between surface components of the bacterial cell and pattern recognition receptors of the host. The recognition is followed by a signalling cascade that can end with the production of immunomodulatory cytokines, chemokines, antimicrobial or cytoprotective factors and co-stimulatory molecules (Lebeer *et al.*, 2010). The analysis of the genome of *C. maltaromaticum* LMA 28 suggests it encodes several surface

components including pili, surface proteins, and exopolysaccharides that are described as molecules acting directly or indirectly in this recognization process in other bacteria (Lebeer *et al.*, 2010).

In fish, *C. maltaromaticum* and *C. divergens* are described to induce the expression of genes encoding IL-1b and TNF-α of head kidney leucocytes of rainbow trout suggesting that these bacteria can stimulate the innate immunity of this fish species (Kim et Austin, 2006a). In addition, feeding rainbow trout with these bacteria enhances the cellular and humoral immune response in rainbow trout (Kim et Austin, 2006b). Our results suggest that the immunomodulatory properties of *Carnobacterium* are not restricted to interaction with fish and could be extended to mammals.

Within the species *C. maltaromaticum*, some strains are described as fish pathogens (Leisner et al., 2007). The genome analysis of the strain *C. maltaromaticum* ATCC 35586 allowed identifying potential virulence factors including genes encoding putative adhesion proteins, cell wall modification enzymes, bile salt hydrolases, and capsule synthesis (Leisner *et al*., 2012). Whether these genes are involved in virulence in fish is still unkown. However, regarding our results, a non exclusive hypothesis would be that these genes could also be reminiscent of the ability of the strain *C. maltaromaticum* ATCC 35586 to survive during the transit in mammal's intestine and to interact with the host. Further investigations are needed to answer this question.

II.2.2.6 Conclusions

Here we show that *C. maltaromaticum* is able to survive in the gastrointestinal tract of mice and that it is able to interact with human cells. *C. maltaromaticum* thus seems to exhibit some prerequisite features to be considered as a probiotic candidate. Future investigations will be required to evaluate the beneficial potential of this bacterium, in particular in the field of bacteria-host cross-talk and the potential effect on the immune system.

Acknowledgments

We are grateful to Frédéric Choulet for his help in genomic data analysis. We are also grateful to Christel Rousseaux for useful advices about mice experiments. We thank Myriam Michel, Sylvie Wolff, Arnaud Khemisti and Nicolas Blaise for technical assistance.

II.2.3 Résultats majeurs

L'analyse de la séquence du génome de la souche *C. maltaromaticum* LMA 28 a révélé la présence de gènes typiquement présents chez des bactéries adaptées à l'environnement digestif. Ainsi, des gènes conférant typiquement une résistance à des composants du système immunitaire inné, à savoir le lysozyme et les peptides antimicrobiens comme les défensines, ont été identifiés. De plus, le génome contiendrait également des gènes codant des adhésines de surface et suggère que la bactérie est capable d'adhérer à des épithéliums. Par ailleurs, et même s'il s'agit de gènes dont l'association au tube digestif n'est pas une spécificité, le génome contiendrait des gènes codant la synthèse d'exopolysacharides, lesquels ont été démontrés chez d'autres bactéries comme servant à camoufler certains composants de surfaces et à protéger la bactérie de facteurs antimicrobiens produits dans la région basse du tractus gastro-intestinal (Lebeer *et al.*, 2010). De plus, des gènes homologues de gènes codant des hydrolases de sels biliaires ont également été identifiés. Ces hydrolases pourraient permettre à la bactérie de résister à ces sels bilaires, lesquels sont capables d'affecter la survie des micro-organismes. La présence de ces gènes a par ailleurs été clairement associée à un habitat gastro-intestinal (Kleerebezem *et al.*, 2010). Les résultats de ces analyses génomiques sont en accord avec un mode de vie intestinal chez le poisson, d'où les *Carnobacterium* sont fréquemment isolés. Cela ouvre également la possibilité pour que *C. maltaromaticum* soit capable de survivre et d'interagir avec le tube digestif de mammifères.

Afin de tester cette hypothèse, la souche *C. maltaromaticum* LMA 28 a été administrée par voie orale à des souris. La numération à l'aide d'un milieu sélectif de *C. maltaromaticum* a révélé que la bactérie est capable de survivre durant le transit chez la souris, ouvrant la possibilité d'une interaction entre la bactérie et l'hôte. Ainsi, le pouvoir adhésif de cette même souche a été évalué et les résultats montrent qu'elle est capable d'adhérer significativement *in vitro* à des cellules intestinales HT29, T84 et Caco-2. Ces résultats suggèrent que la souche *C. maltaromaticum* LMA 28 pourrait entrer en contact physique intime avec les cellules de l'épithélium intestinal. Pour cette raison, l'impact immunitaire de cette bactérie a été évalué *in vitro* en incubant *C. maltaromaticum* LMA 28 en présence de cellule PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cell). La mesure de cytokines produites par ces cellules PBMC indiquerait

que la souche *C. maltaromaticum* LMA 28 aurait un impact neutre voire légèrement anti-inflammatoire.

Article 3

II.3 MultiLocus Sequence Typing de *Carnobacterium maltaromaticum*

II.3.1 Introduction

L'utilisation de *C. maltaromaticum* à l'échelle industrielle nécessite de pouvoir typer les souches de cette espèce. Par ailleurs, très peu de données sont disponibles concernant la structure des populations au sein de cette espèce. Chez les bactéries lactiques, une réduction de la diversité en lien avec l'habitat alimentaire a été observée (Delorme *et al.*, 2010; Passerini *et al.*, 2010) suggérant que la domestication et la sélection naturelle ont conduit à la sélection d'un nombre réduit de génotypes. Très peu d'informations sont disponibles quant à la diversité des bactéries de l'espèce *C. maltaromaticum* dans l'aliment, en particulier dans les produits laitiers

II.3.2 Assessment of genetic diversity in *Carnobacterium maltaromaticum* by MultiLocus Sequence Typing

Abdur RAHMAN[1], Cyril BONTEMPS[2,3], Sophie PAYOT[2,3],
Catherine Cailliez-Grimal[1], Anne Marie REVOL-JUNELLES[1], *Frédéric BORGES[1]

[1] Laboratoire d'Ingénierie des Biomolécules (LIBio), E.N.S.A.I.A.- Université de Lorraine, 2 avenue de la Forêt de Haye TSA 40602, F-54518 - VANDOEUVRE CEDEX, France. [2]INRA, DynAMic, UMR1128, Vandœuvre-lès-Nancy, F-54506, France, [3]Université de Lorraine, DynAMic, UMR1128, Vandœuvre-lès-Nancy, F-54506, France *Corresponding author : frederic.borges@univ-lorraine.fr, +33 3 83 59 58 83

II.3.2.1 ABSTRACT

Carnobacterium maltaromaticum is a lactic acid bacterium with high potential as adjunct culture in the dairy industry. The industrial use of this bacterium necessitates the availability of powerful strain typing tools. Moreover, although this bacterium is also frequently colonizing non-dairy food products and can be isolated from diverse environments, little is known about its population structure. An MLST scheme based on the analysis of fragments of the genes *dapE, ddlA, glpQ, ilvE*, *pyc, pyrE*, and *leuS* was applied to a collection of 47 strains, including 16 newly isolated strains obtained from raw milk and soft cheeses. The scheme allowed detecting 36 sequence types (STs) in the collection with a discriminatory index of 0.98. The genes *dapE* and *pyrE* could be deleted without resolution loss. Eighty percent of the STs were represented by a unique strain. Among the remaining STs, several are represented by strains from very diverse biotopes. Besides, eBURST analysis revealed 15 singletons and six clonal complexes. The two major clonal complexes CC1 and CC2 contained 11 and 7 strains, and connected 7 and 2 STs, respectively. The phylogenetic consistency of these clonal complexes was confirmed by sequence-based phylogenetic reconstruction. The nucleotide diversity π of the dairy strains was approximately as high as strains isolated from diverse other biotopes including other food product types and environmental isolates. These results suggest that milk and soft cheeses are weakly selective for *C. maltaromaticum*.

II.3.2.2 INTRODUCTION

Carnobacterium maltaromaticum is a lactic acid bacterium with high technological potential for sea, meat and dairy products. In dairy products, this psychrotrophic and alkaliphilic bacterium can predominate after cold storage and at the end of ripening in soft cheeses when the pH increases (Cailliez-Grimal *et al.*, 2007; Millière et Lefebvre, 1994). Thus, it has been detected in pasteurized and raw milk soft cheeses, and in soft cheeses manufactured with ewe, cow and goat's milk. The cheeses containing *C. maltaromaticum* are: Perail, Brique de Jussac, Picodon, Petit Munster, Epoisse, Brie, Camembert, and Petit Livarot (Cailliez-Grimal *et al.*, 2007; Millière et Lefebvre, 1994). This weak milk acidifying bacterium can sustain low pH values and does not interfere with the acidifying activity of LAB starters (Edima *et al.*, 2008). The presence of this bacterium can be associated with the development of malty flavors in milk (Miller *et al.*, 1974) and cheese (Afzal *et al.*, 2013) indicating that it contributes to aroma production during the ripening process. Assuming that *C. maltaromaticum* is generally recognized as safe (GRAS) in the USA (FDA, 2005) and is on the list of microorganisms with technological beneficial use (Bourdichon *et al.*, 2012) it can be used as adjunct cultures in the dairy industry. In addition, recent investigation about the fate of this bacterium after consumption revealed it can survive during the transit in the gastrointestinal tract and that it would be able to interact with the host. It would therefore exhibit prerequisite features to be considered as a probiotic candidate (Rahman *et al*., 2014)

The industrial use of *C. maltaromaticum* strains necessitates the availability of tools that enable distinguishing the members within this species for strain tracking, collection management, traceability, and strain isolation. In addition, nothing is known about the population genetics in this species. The method of choice for strain recognition and population genetics studies is MultiLocus Sequence Typing (MLST). MLST is based on the analysis and the comparison of the sequence of internal fragments of housekeeping genes, in most cases 7 genes are chosen (Maiden *et al.*, 1998). It has been widely used for pathogenic bacteria (UrwinetMaiden, 2003) and, within the last decade, revealed a high discriminatory power the lactic acid bacteria including *Enterococcus faecalis* (Buhnik-Rosenblau *et al.*, 2013)*, Lactococcus lactis* (Passerini *et al.*, 2010; Rademaker *et al.*, 2007)*, Lb. delbrueckii* (Tanigawa et Watanabe, 2011), *Lb. casei* (Cai *et al.*, 2007; Diancourt *et al.*, 2007), *Lb. johnsonni* (Buhnik-

Rosenblau *et al.*, 2012), *Lb. paracasei* (Parolo *et al.*, 2011), *Lb. plantarum* (de Las Rivas *et al.*, 2006), *Lb. salivarius* (Raftis *et al.*, 2011)*, Lb. sanfransciscensis* (Picozzi *et al.*, 2010), *Oenococcus oeni,* (Bilhere *et al.*, 2009; Bridier *et al.*, 2010; de Las Rivas *et al.*, 2004), *Pediococcus parvulus* and *P. damnosus* (Calmin *et al.*, 2008), and *Streptococcus thermophilus* (Delorme *et al.*, 2010). Within the species *S. thermophilus* for which the only habitat is the dairy product, a low diversity was recorded compared to the closely related species of the salivarius group (Delorme *et al.*, 2010). Similarly, *L. lactis* strains originating from cheeses exhibit a low diversity compared to the strains isolated either from raw milk and non dairy environments (Passerini *et al.*, 2010) suggesting that the domestication and the natural selection processes in starter lactic acid bacteria led to the selection of a relatively low range of genotypes. The relative low level of diversity is however not restricted to starter lactic bacteria since the Non Starter Lactic Acid Bacteria (NSLAB) species *Lb. casei* exhibit a relatively low level of diversity as well (Diancourt *et al.*, 2007). The population structure of LAB can also be characterized by the existence of sub-populations (Bilhere *et al.*, 2009; Bridier *et al.*, 2010) for which a relationship with the habitat can be found for some species (Buhnik-Rosenblau *et al.*, 2012). Thus, the species *Lb. johnsonni* is divided in three clusters of strains, each cluster grouping strains from common host, *i.e.* chicken, human, and mice (Buhnik-Rosenblau *et al.*, 2012). However, the relationship between strain clusters and their origin is not true for all the LABs, as exemplified by *O. oeni* (Bilhere *et al.*, 2009; Bridier *et al.*, 2010)*, Lb. sanfranciscensis* (Picozzi *et al.*, 2010)*, S. thermophilus* (Delorme *et al.*, 2010)*,* and *Lb. delbrueckii* (TanigawaetWatanabe, 2011). Thus, very diverse population structures were identified so far in LAB. Even though some keys LAB species were investigated data about the population structure of other relevant species remains scarce.

The aim of this study was to establish an MLST scheme for strain typing in *C. maltaromaticum* and to investigate on the population structure of this species with a special focus on the dairy environment.

II.2.3 MATERIALS AND METHODS

II.2.3.1 Bacterial strains and culture conditions

The *C. maltaromaticum* strains used in this study are described in table 1 and were cultured in TSB-YE and MCM (Edima *et al.*, 2007)

Table 1. Characteristics of the *C. maltaromaticum* strain collection

			Allele no.										
Strain code	ST[a]	CC[b]	ilvE	dapE	pyre	pyc	ddlA	glpQ	Leus	Origin	Year	Location	Reference
F7	4	1	4	8	4	4	7	3	4	Halloum	2010	Lebanon	This study
F44	4	1	4	8	4	4	7	3	4	Mont D'or	2010	France	This study
LMA28	4	1	4	8	4	4	7	3	4	Brie	1994	France	(Millière *et al.*, 1994)
F29-1	4	1	4	8	4	4	7	3	4	Lumpfish roe	-	Denmark	(Laursen *et al.*, 2005)
DSM20342[T]	4	1	4	8	4	4	7	3	4	Raw milk	1974	USA	(Miller *et al.*, 1974)
F33	6	1	4	8	4	4	7	3	6	St Maure de Touraine	2010	France	This study
F86	11	1	4	8	4	4	3	3	4	Cabrales	2010	Spain	This study
L1	13	1	4	8	4	6	7	3	4	Raw milk	2010	France	This study
CP5	15	1	4	8	4	4	7	3	20	Brie	1994	France	(Millière *et al.*, 1994)
CP23	16	1	4	8	4	4	3	9	10	Brie	1994	France	(Millière *et al.*, 1994)
CP32	17	1	4	8	4	4	4	3	4	Brie	1994	France	(Millière *et al.*, 1994)
F4	3	2	3	3	3	3	3	2	3	Le Montagnard	2010	France	This study
F84	3	2	3	3	3	3	3	2	3	Kernhemmer	2010	Holland	This study
CP14	3	2	3	3	3	3	3	2	3	Brie	1994	France	(Millière *et al.*, 1994)
F87	3	2	3	3	3	3	3	2	3	Tynjethaler	2010	Holland	This study
CP7	3	2	3	3	3	3	3	2	3	Brie	1994	France	(Millière *et al.*, 1994)
F42	7	2	3	3	3	3	4	2	3	Rocamadour	2010	France	This study
N15	7	2	3	3	3	3	4	2	3	Halibut-sugar salted	1990's	Denmark	(Laursen *et al.*, 2005)
F43	8	3	2	4	8	6	7	8	7	St. Marcellin	2010	France	This study
CIP100481	18	3	2	4	8	6	4	3	7	Human blood	1983	France	
ATCC 35586	36	4	5	15	6	11	4	12	5	Diseased rainbow trout	1987	USA	(Hiu *et al.*, 1984)
9.4	30	3	2	17	8	6	4	3	14	Beef MAP	2003-4	Denmark	(Laursen *et al.*, 2005)
710	35	3	12	4	8	6	4	3	7	Pig Meat	2009	France	(FeureretEllouze, 2010)
CIP102035	21	4	5	15	6	11	4	3	5	Cow raw milk	1985	France	
SF1189	27	4	5	15	6	11	4	10	5	Smoked salmon	1996	France	(Leroi *et al.*, 1998)
F2	2	5	2	2	2	2	2	1	2	Raw milk camembert	2010	France	This study
DSM20344	12	5	2	2	2	2	2	5	2	Raw milk	1974	USA	(Miller *et al.*, 1974)
F88	12	5	2	2	2	2	2	5	2	Pérail	2005	France	(Cailliez-Grimal *et al.*, 2007)
F48	9	6	7	10	9	9	5	4	7	Gormas (Gorgonzola au mascarpone)	2010	Italy	This study
F73	10	6	7	10	9	9	5	4	3	Selles-sur-cher	2010	France	This study
F1	1		1	1	1	1	1	1	1	Raw milk camembert	2010	France	This study
C4	1		1	1	1	1	1	1	1	Soil	2005	Canada	(Walker *et al.*, 2006)
F14	5		13	9	5	5	4	3	5	Morbier de Bizerte	2010	Tunisia	This study
L11	14		2	5	10	6	4	5	8	Raw milk	2010	France	This study
CIP101342	19		4	11	2	4	7	3	2	Human blood	1984	France	
CIP101354	20		8	11	6	7	4	9	11	Deer	1984	France	
DSM20590	22		9	12	9	8	4	7	17	Vaccum packaged beef	1985	-	(ShawetHarding, 1985)
DSM20624	23		5	6	7	2	4	3	17	Vaccum packaged minced meat	1983	-	(HolzapfeletGerber, 1983)
SF692	24		10	6	6	6	6	7	21	Smoked salmon	1995	France	(Leroi *et al.*, 1998)
SF800	25		6	13	1	1	4	7	18	Smoked salmon	1995	France	(Leroi *et al.*, 1998)
SF834	26		14	14	3	10	4	3	12	Smoked salmon	1995	France	(Leroi *et al.*, 1998)
5.27	28		2	16	9	12	4	6	13	Beef aerob	2003-4	Denmark	(Laursen *et al.*, 2005)
6.2	29		11	7	9	6	9	9	9	Beef aerob	2003-4	Denmark	(Laursen *et al.*, 2005)
3BO4	31		4	8	9	1	4	11	3	Sphagnum	2005	Denmark	(Laursen *et al.*, 2005)
1A4II	32		15	11	11	6	4	7	19	Sphagnum	2005	Denmark	(Laursen *et al.*, 2005)
G97	33		9	5	9	4	8	7	15	Raw milk	2004-05	Israel	(Hantsis-ZacharovetHalpern, 2007)
G117	34		9	18	9	6	4	7	16	Raw milk	2004-05	Israel	(Hantsis-ZacharovetHalpern, 2007)

[a]ST: sequence type, [b]CC: clonal complex

II.2.3.2 Isolation of C*. maltaromaticum* strains

A collection built with 72 cheese and 26 milk samples were screened for the presence of *C. maltaromaticum*. To do so, an enrichment step was performed by independently inoculating 90mL of TSB-YE pH8.8 with 10 g of each sample and subsequent incubation at 7°C for 7 days. An aliquote was then submitted to DNA extraction (Leblond *et al.*, 1996), and the resulting DNA was used as matrix for *C. maltaromaticum* species-specific PCR as previously described (Rachman *et al.*, 2004) with the following modifications. The PCRs were performed in a final volume of 50 µL and contained 3-5ng of bacterial genomic DNA solution, 10 mM Tris-HCl pH 9.0, 50 mM KCl, 0.1 % Tritin X100, 0.2 mg/ml BSA, 200 µM of each dNTP, 2.5mM of MgCl2, 0.5 µM of each primers (Cpis and 23S-7) and 1.25U of Taq polymerase (MP biomedicals). The amplification program started with a denaturation step at 95°C for 5 min, followed by 35 cycles of 95°C for 30 sec, 53°C for 30 sec, and 72°C for 30 sec and a final extension step at 72°C for 7 min. The PCR products were analyzed by agarose gel electrophoresis. The enrichment mixtures for which a PCR product of the expected size was obtained was submitted to isolation on Medium for *C. maltaromaticum* (MCM) and subsequent incubation at 25°C for 2-3 days (Edima, 2007). The colonies obtained were screened by species-specific PCR to identify candidate strains belonging to *C. maltaromaticum* species. The DNA of the candidate strains were subsequently subjected to PCR amplification of the 16S rDNA comprising the V3 region or the 16S-23S rRNA spacer region. The V3 region of the 16S rDNA was amplified with the primers HDA-1-GC and HDA2 as previously described (Ogier *et al.*, 2002) and subsequently modified (Serhan *et al.*, 2009). For some strains rD1 and fD1 primers were used for 16S amplification with Emerald Amp GT PCR master mix. For 50 µL of reaction mix 0.4µM of each primer along with xx of DNA template was used. The PCR cycles were 94 °C for 5 min followed by 35 cycles of 94°C for 1min, 55°C for 1min and 72°C for 1min with a fnal extension at 72°C for 7 min. The 16S-23S spacer region was amplified with primers 16-sp2 and 23S-7 as previously described (Rachman *et al.*, 2004) with the following modifications. The PCR reactions were performed in a volume of 50 µL containing: 1 µL of bacterial genomic DNA solution, 10 mM Tris-HCl pH 9.0 , 50 mM KCl, 0.1 % Tritin X100, 0.2 mg/ml BSA, 200 µM of each dNTP, 2.5 mM of MgCl2, 0.5 µM of each primer and 1.25U of Taq polymerase (MP biomedicals). The obtained PCR products were sequenced according to the

Sanger method (GATC biotec) and the resulting sequence was used to request the non redundant database with BLASTn for species assignment.

II.2.3.3 MultiLocus Sequencing

The primers used to amplify the MLST loci are presented in table 2. They consist of a 3' region targeting the targeted locus, and the following 5' tail regions: 5'-GTTTTCCCAGTCACGACGTTGT-3' for the forward MLST primers, and the 5'-TTGTGAGCGGATAACAATTTC-3' for the reverse MLST primers, which are the sequence of the sequencing primers. This allowed sequencing the PCR products of all MLST loci with only two sequencing primers. The DNA was extracted as previously described (Leblond *et al.*, 1996). The PCR reactions were performed in a volume of 50 µL containing: 10 mM Tris-HCl pH 9.0 , 50 mM KCl, 0.1 % Tritin X100, 0.2 mg/ml BSA, 1 µL of bacterial genomic DNA solution, , 200 µM of each dNTP, 2.5mM of Mgcl2, 0.5 µM of each primer and 1.25U of Taq polymerase (MP biomedicals). The PCR conditions for *dapE*, *ddlA*, *pyrE*, *leuS* and *ilvE* genes were initiated with a denaturation step at 94°C for 5min, followed by 35 cycles of 94°C for 1 min, 52°C for 1min and 72°C for 1 min, and a final extension step at 72 °C for 5 min. The loci *pyC* and *glpQ* were amplified using initial denaturation at 94 °C for 4 min, followed by 35 cycles of 95 °C for 30 sec, 56 °C for 30 sec and 72 °C for 1min. A themocycler T100 was used for the purpose. Both strands of the PCR products were sequenced according to the Sanger method (Eurofins).

II.2.3.4 Data analysis

Sequence handling, including sequencing electropherograms, sequence alignments by using the integrated CLUSTAL W program, was performed with Bioedit. Split decompositions were performed with SplitsTree4 V4.12.8 by selecting the network parameter SplitDecomposition (HusonetBryant, 2006). Allele number assignments were performed by sequentially building a local nucleotide local database requested with BLAST in Bioedit (Hall, 1999). Sequence concatenation was performed with START2 (Jolley *et al.*, 2001). Sequence types were manually defined and the absence of redundancy was checked with eBURST. The dN/dS ratio, the π and the Tajima's D values were calculated with DnaSp v5.1 (LibradoetRozas, 2009). The discriminatory index was calculated using the Simpson's index of diversity

(HunteretGaston, 1988). Clonal complex analysis was performed with eBURST (Feil *et al.*, 2004). Neighbor-joining based phylogeny reconstruction was performed with MEGAv 5.1 (Tamura *et al.*) by using the Kimura 2-parameter model including transitions and transversions. The candidate tree was statistically tested with 1000 bootstrap replications.

II.2.3.5 Nucleotide sequence

The MLST sequence data are hosted at Genebank under the following accession numbers:

KF636971 to KF637017 for *pyrE*, KF637018 to KF637064 for *pyc*, KF637065 to KF637111 for *leuS*, KF637112 to KF637158 for *ilvE*, KF637159 to KF637205 for *glpQ*, KF637206 to KF637250 for *ddlA*, and KF637251 to KF637297 for *dapE.*

Table 2. Genes and primer sequences used for MLST

Gene	Enzyme function	Primer	Sequence (5'-3')
DdlA	D-Ala-D-Ala ligase	ddl-f ddl-r	GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTTAGAATCGCTGGACCGTGA TTGTGAGCGGATAACAATTTCGCCCATTCTTGAAACTAATTTGATCG
LeuS	Leucyl tRNA synthetase	leus-f leus-r	GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTAGCTATTGCTTGGAGCGAAA TTGTGAGCGGATAACAATTTCCTTCAACTTCAGATTCAACTAGGAAA
IlvE	Branched-chain aminotransferase	ilve-f ilve-r	GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTATTGCATTATGGGCAGACG TTGTGAGCGGATAACAATTTCACTTTGTAATGCTCGGCAAA
PyrE	Orotate phosphoribosyltransferase	pyre-f pyre-r	GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTACCTTTCACATGGGCTAGTG TTGTGAGCGGATAACAATTTCCTCCGCTTTAATTGAACCCATTTC
DapE	N-succinyl-L-L-diaminopimelic acid desuccinylase	dape-f dape-r	GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTCGGAGAAGAAACTTCTGCAA TTGTGAGCGGATAACAATTTCCTCAATAGATTGTAAATAGGCCTCAA
Pyc	Pyruvate carboxylase	pyc-f pyc-r	GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTCAGATTTTAGGCGATACTCATG TTGTGAGCGGATAACAATTTCCTCTGGAGATGTATCAATAAAAGTTGTTT
GlpQ	Glycerophosphodiester phosphodiesterase	glpq-f glpq-r	GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTAATAATTGCCCATCGAGGAA TTGTGAGCGGATAACAATTTCTCATTAATGCTATCTCTGGATAATCTG

II.2.4 RESULTS

II.2.4.1 Strain collection

The collection of *C. maltaromaticum* strains used in this study contained 47 strains (table 1). Sixteen of these strains were isolated during this study from dairy products. The

screening was performed from 72 cheese- and 26 raw milk-samples, among which 15 and 10 were found to contain *C. maltaromaticum* according to species-specific PCR results, respectively (data not shown). From the positive samples, an overall of 16 strains (one isolate per sample) were isolated during the year 2010, of which 14 and 2 originated from cheese and raw milk, respectively. The identity of newly isolated strains was confirmed by partial sequencing of either 16S rDNA or the 16S-23S spacer region. Besides, the six dairy strains LMA 28, CP5, CP23, CP32, CP14, and CP7, were previously isolated in 1994 from 6 different Brie cheeses sampled in the same manufacture; in addition the strains CP5 and CP7 were isolated from the same cheese sample. Although these strains were isolated from the same manufacture, PFGE analyses previously revealed they belong to different pulsotypes and therefore that they are different strains (Afzal *et al.*, 2013) Altogether with strains from other collections, the study was performed with 28 strains from dairy origin.

The remaining 19 strains of the collection were provided from public and laboratory collections and were isolated from other food products such as sea and meat products or from the environment, more precisely from sphagnum and soil. Among these strains, the SF692, SF800, and SF834 strains were isolated from the same industrial smoked salmon lot although they exhibit different PFGE pulsotypes (Françoise Leroi, personal communication). In addition, three strains associated with animal pathologies were included: one fish pathogen (ATCC35586), and two human blood isolates (CIP 100481 and CIP 101342). The 47 strains were isolated from 1974 to 2010, and originated from 9 different countries.

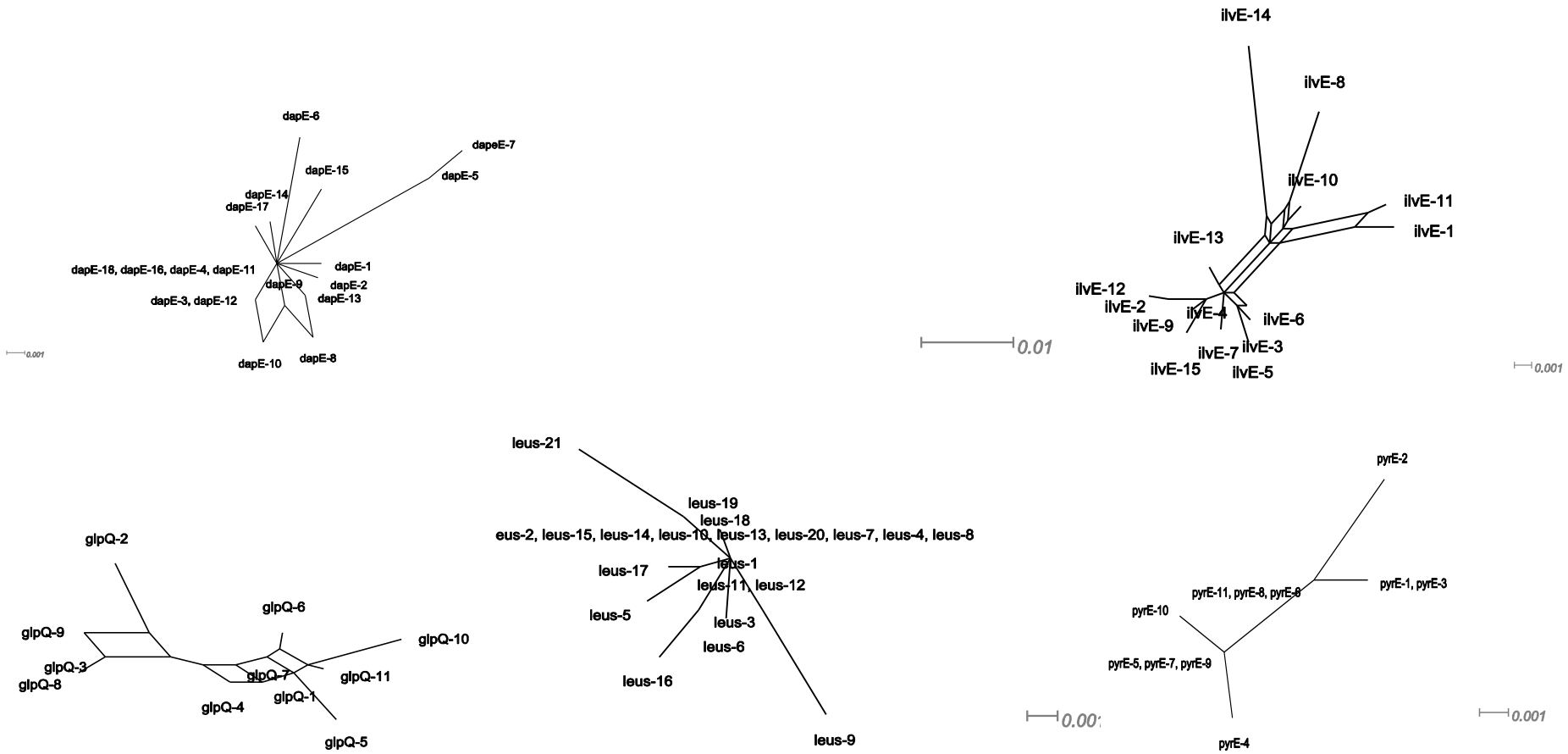


Figure 1(a). Split graph obtained by SPLITS TREE V4.1.2

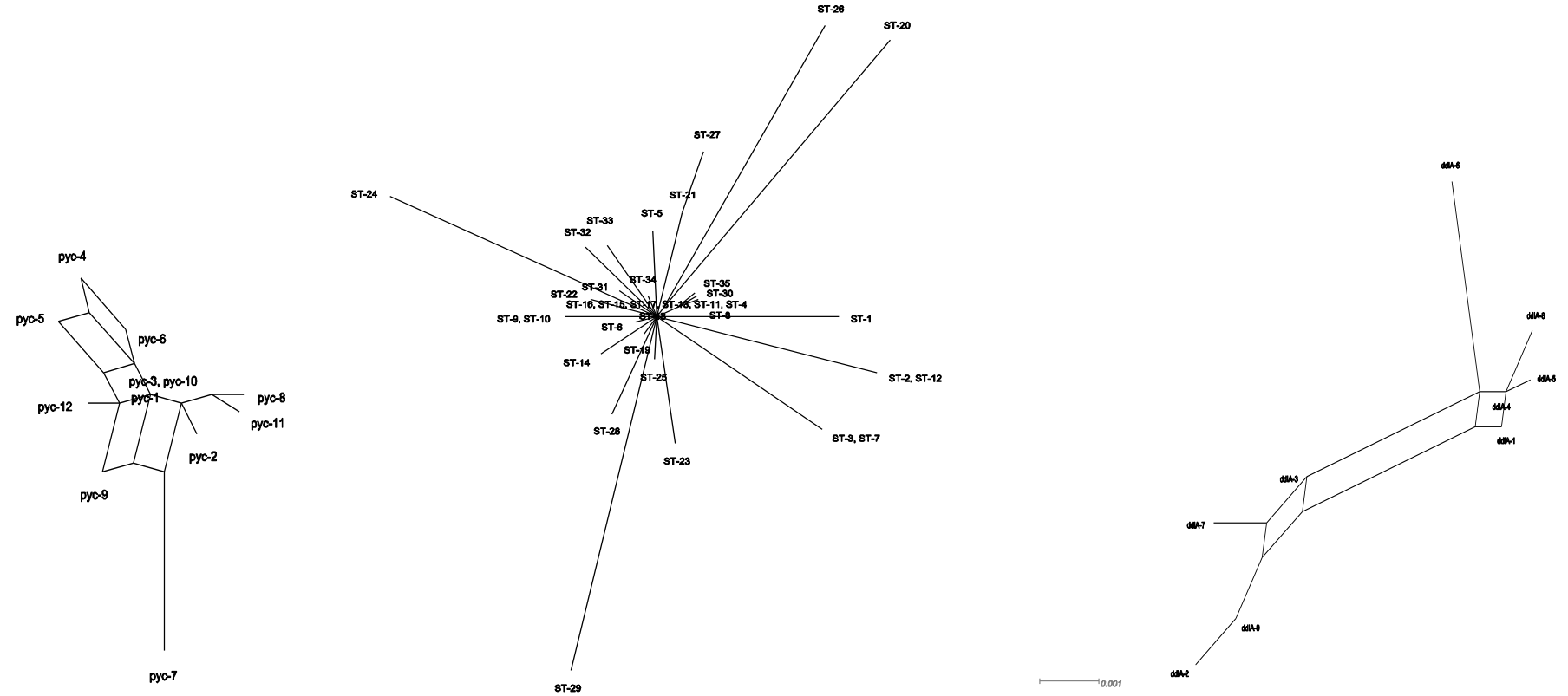


Figure 1(b). Split graph obtained by Splits Tree V4.1.

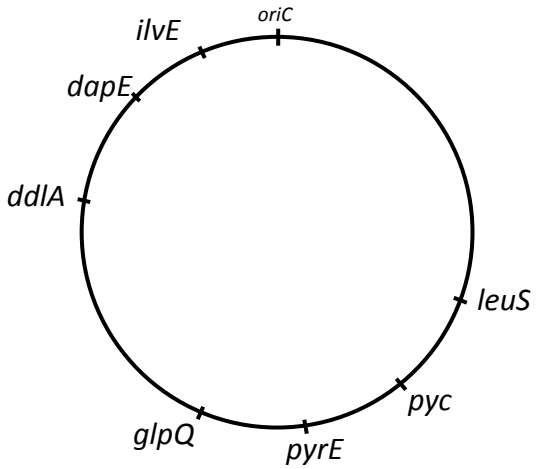


Figure 2. Localization of the MLST *loci* on the chromosome of *C. maltaromaticum* LMA 28. Besides the 7 MLST gene fragments, the localization of the putative replication origin *oriC* of thechromosome is represented

II.2.4.2 Descriptive analysis of MLST loci and allelic diversity

Seven genes were selected from the complete chromosome sequence of *C. maltaromaticum* LMA 28 (Cailliez-Grimal *et al.*, 2013)(Figure 2). The selected genes encode functions associated to cell wall biosynthesis (*ddlA*), amino acid metabolism (*dapE,*and *ilvE*), nucleotide metabolism (*pyrE*), sugar metabolism (*pyc*, and *glpQ*), and translation (*leuS*, table 2). The length of the sequences for the MLST scheme is comprised between 309 bp (*ddlA*) and 522 bp (*glpQ,* table 3). The individual analysis of each gene by split decomposition (HusonetBryant, 2006) revealed that the genes *dapE*, *ddlA, glpQ, ilvE,* and *pyc* exhibited a limited network structure (figure 1a&b), indicating that incompatibilities were identified in the sequence alignments. However, once the concatenated sequences of the seven genes were analyzed, no network structure was detected, showing that this gene set is suitable for MLST analysis.

The ratio of mean non-synonymous substitutions and mean synonymous substitutions (dN/dS) was calculated, and remain <0.1 for all loci except *ddlA* and *glpQ*, for which values are of 0.2387 and 0.2782, respectively. Yet, these latter values remain low, indicating higher amount of synonymous substitutions over non-synonymous substitutions, which is a typical for housekeeping genes. Consistently, the Tajima's *D* values ranged between -1.09 to 0.64, and since they are comprised between -2 and 2 (Robinson *et al.*, 2010), the evolution of these

genes was likely driven by neutral selection (Robinson *et al.*, 2010). The number of alleles ranged from 9 to 21 and the number of polymorphic sites ranged from 13 to 42. Considering the 2,985 nucleotides obtained after the concatenation of the 7 gene fragments, an overall of 154 polymorphic sites were identified. The nucleotide diversity (π) is defined as the average number of nucleotide differences per site between two randomly selected sequences. The π values ranged from 0.011 for *glpQ* to 0.023 for *ilvE*. The same balance between the number of alleles and the number of polymorphic sites (expressed as the S/A ratio) is expected when genes experienced the same evolution history. When the 6 genes *dapE, ddlA, glpQ, leuS, pyc*, and *pyrE* are considered, the mean S/A ratio obtained is 1.4 with a rather low standard deviation value of 0.33, suggesting that these genes have similar histories. On the other hand, the S/A ratio for the *ilvE* locus is of 2.8, and is twice as much higher than the mean obtained for the other genes. However, the dN/dS value for *ilvE* is one of the lowest among the 7 genes. This indicates that the nucleotide substitutions in *ilvE* are mainly synonymous, and consequently that the alleles of this genes are likely orthologues encoding the same function. Therefore, the anomaly found for *ilvE* suggests that it may have experienced an evolution history different from the other genes. This would imply that the *ilvE* gene phylogeny might not reflect the *C. maltaromaticum* species phylogeny

II.2.4.3 Genotyping through sequence type definition

The allele combination for the 7 MLST gene fragments was determined for each strain, and for each original combination a unique Sequence Type (ST) was assigned (Maiden *et al.*, 1998) (table 1). The results show that 36 different STs could be distinguished among the 47 *C. maltaromaticum* strains (table 1). The discriminatory index obtained was of 0.98 revealing the high resolution displayed by the MLST scheme. Approximately 80% of the STs were represented by only one strain, while 4 STs embedded at least 2 strains. For instance, the two strains associated with animal pathologies CIP 100481 and ATCC35586 were distinguished as ST18 and ST36 respectively. The allele sequences for ATCC35586 were obtained by blast search from its genome. The most represented STs were ST3 and ST4 for which 5 strains were identified as exhibiting these genotypes.

Strains belonging to the same ST were either isolated from similar environment, or originated from very diverse ones. For instance, the strain F1, which was isolated from raw

milk camembert, was indistinguishable from the strain C4, which was isolated from Canadian soil after repeated freeze-thawing cycles (table 1)(Walker *et al.*, 2006). Another example is strain F42, from Rocamadour cheese, which exhibited the same ST as N15 which was isolated from halibut-sugar salted. On the other hand, strains isolated from the same food lot can exhibit a high diversity: strains SF692, SF800 and SF834 thus exhibited different STs.

The mean nucleotide diversity (π) for the overall population based on ST sequences was of 0.012. When the sub-population consisting of the non dairy strains, which covers a large diversity of origins, was considered, the π obtained was of 0.012. Surprisingly, when the dairy strain sub-population was considered, the π value obtained was of 0.011, indicating that no significant diversity reduction was recorded compared to the other π values. This result suggests that the *C. maltaromaticum* dairy strains exhibit a high genetic diversity.

II.2.4.4 MLST scheme optimization for strain typing purpose

In order to optimize the MLST scheme for future use, the discriminatory redundancy of the genes was estimated by omitting each gene from the scheme and determining the resulting allelic profiles. When *ilvE* was deleted, ST18 was no more distinguished from ST35 and therefore the sequence type number was reduced from 36 to 35Similarly, when either *ddlA, glpQ, leuS,* or *pyc* was deleted, the ST number was reduced to 33, 33, 33, or 35, respectively. However, when *dapE* and *pyrE* were together deleted, no reduction of the ST number was observed. This suggests that the MLST scheme can be reduced to the five gene fragments *ilvE, ddlA, glpQ, leuS,* and *pyc* without resolution loss.

II.2.4.5 Clonal complexes and phylogenetic analysis

The allelic profiles of the 36 STs were compared by clonal complex analysis in order to reveal their relatedness (Feil *et al.*, 2004). A clonal complex is defined as a group of STs in which two connected STs differ by one locus (Single Locus Variant, SLV) or by two loci (Double Locus Variant, DLV) (Feil *et al.*, 2004). The results revealed that among the 36 STs identified, 16 STs are singletons (figure 3) Most of the singletons were isolated from non dairy origin. The remaining 21 STs split up into 6 clonal complexes. Among 30 strains belonging to clonal

complexes, 23 were isolated from a dairy product. Among the clonal complexes, CC1 is the most extended with 11 strains included and 7 STs. The founder (ancestral) genotype of CC1 would likely be the sequence type 4, and accordingly the 5 STs connected to ST4 would be derived from this genotype.

The clonal complex CC3 mainly contain strains from non dairy origin and contain 5 strains. The founder genotype would likely be ST18, which contain the strain CIP 100481, a strain that was isolated from human blood. The other strains of the clonal complex CC3 were isolated from dairy and meat products. Phylogenetic construction was performed on the basis of the concatenated sequences of all STs (figure 4). The strains that belong to clonal complexes CC1, CC2, CC4, CC5, and CC6 are well-supported in the tree with bootstrap values above 85. In CC3, the cluster including ST35, ST18 and ST30 is also well-supported (99% bootstrap). The remaining sequence type ST8 is suggested to be closely related to the singleton ST19. However this branch is not statistically supported since the bootstrap value is of 49%. Altogether, these results show that the clonal complex analysis, which is based on allelic profiles comparison, and the phylogenetic tree, which was constructed on the basis of sequence data, is highly congruent.

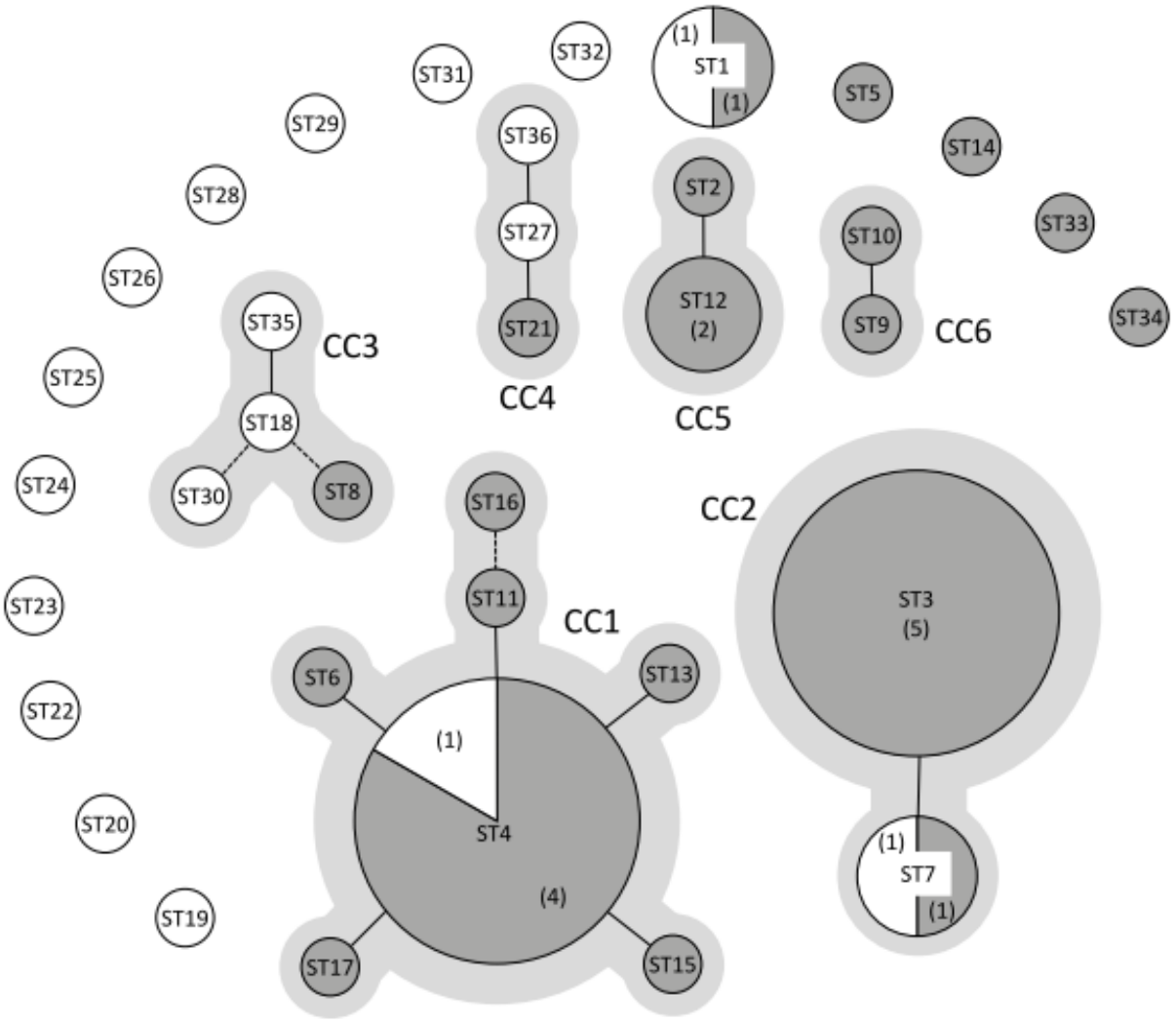


Figure 3. Clonal complexes analysis of 47 *C. maltaromaticum* strains
White and grey circles correspond to strains of non dairy and d airy origin, respectively. The size of the circles is proportional to the number of strains covered by a given Sequence Type (ST). The numbers of strains per ST is indicated in brackets except for singletons for which no number is given. Clonal Complexes (CC) are shaded in light grey. Solid lines link Single Locus Variants (SLV), and dotted lines link Double Locus Variants (DLV).

II.2.5 DISCUSSION

In this study, an MLST scheme based on the analysis of 7 gene fragments is described. The discriminatory power of the scheme is high since 36 different genotypes were distinguished among the 47 strains. A typing tool for *C. maltaromaticum* based on 114 phenotypic unit characters is already available (Laursen *et al.*, 2005). It allowed distinguishing 46 *C. maltaromaticum* strains into 10 clusters with one major cluster containing 37 strains. Among these strains, the two strains 6.2 and F29-1, which are indistinguishable on the basis of the phenotypic traits (Laursen *et al.*, 2005), could be distinguished here by MLST as

exhibiting two unrelated STs, ST4 and ST29 (table 1). This suggests that the MLST scheme might be more adapted for strain typing, and that phenotyping might be well suited to technological surveys of *C. maltaromaticum* strains.

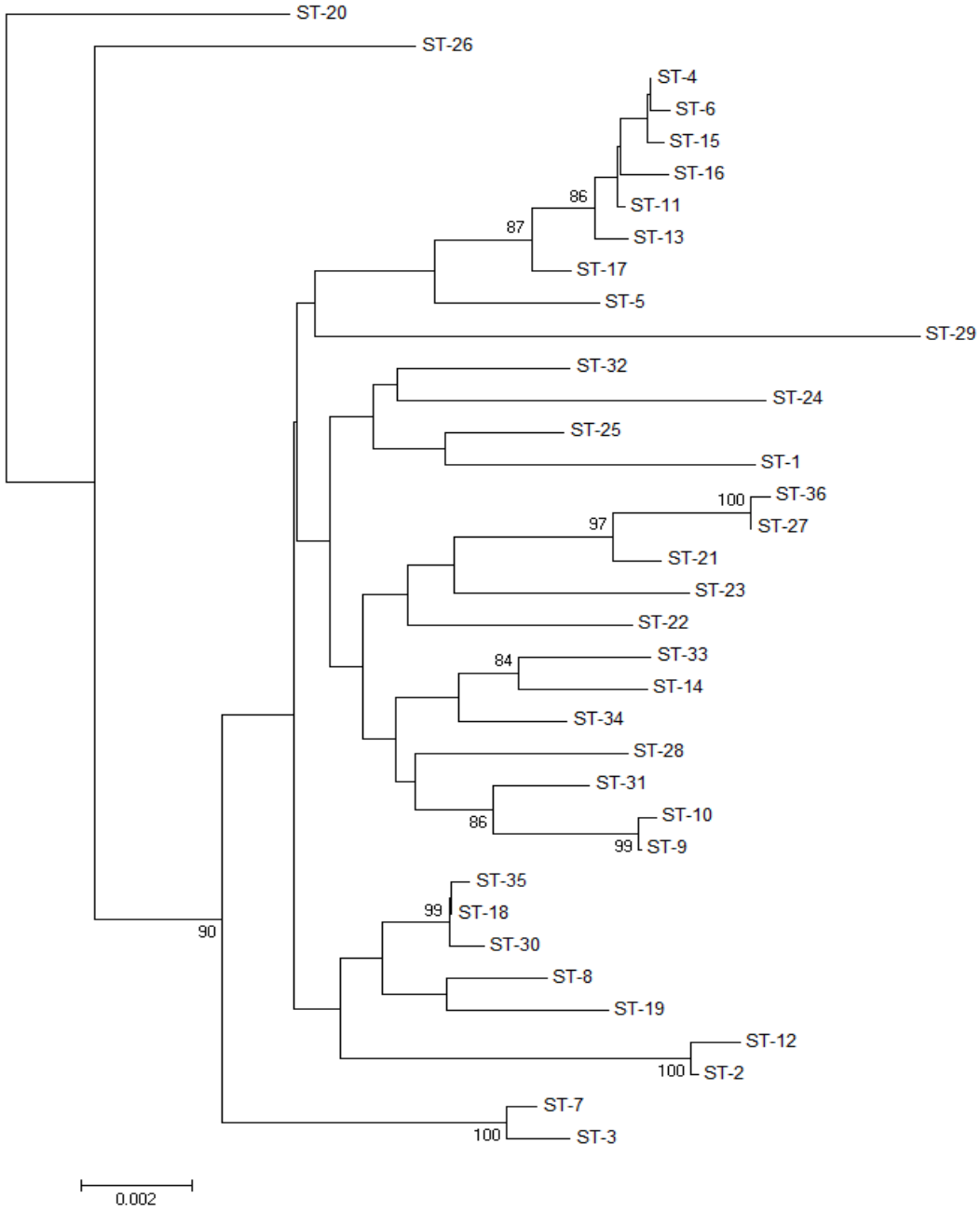


Figure 4. Phylogenetic tree constructed based on the alignement of the concatened sequences of the 36 STs. The construction was performed with the neighbour joining method and statistically tested with 1000 bootstrap replications which are given as percentages. Bootstrap percentages below 70 are not shown. The branch indicated with a * was not supported in a phylogenetic tree that was constructed when the locus *ilvE* was omitted

The MLST scheme could be reduced to 5 gene fragments: *ilvE, ddlA, glpQ, leuS,* and *pyc*, since the deletion of *dapE* and *pyrE* did not lead to the decrease in sequence type number. Similarly, one gene was removed from the MLST scheme in *Lb. plantarum* without discriminatory loss (Diancourt *et al.*, 2007). However, since the majority of the mutations are synonymous in these fragments, *i.e.* does not lead to amino acid change, it can't be ruled out that still unknown sub-populations of *C. maltaromaticum* require *dapE, pyrE* or both gene fragments for typing. It might be consequently relevant for future strain typing to use the five genes *ilvE, ddlA, glpQ, leuS,* and *pyc* as first choice and then *dapE* and *pyrE* in cases where isolates would be indistinguishable thanks to the five genes.

Although the MLST scheme presented here is highly powerful, some strains exhibited the same genotype. Thus, the strains CP7 and CP14 exhibit different pulsotypes as revealed by PFGE (Afzal *et al.*, 2013) and both exhibited the same sequence type. Therefore, it seems that PFGE is more suited when closely related strains are subjected to typing. Similar results were obtained for *Klebsiella pneumoniae* for which 63 strains were differentiated as 39 MLST STs and 56 PFGE pulsotypes (Vimont *et al.*, 2008). It was then suggested that MLST and PFGE are complementary methods that are adapted to large-scale and fine-scale investigations, respectively (Vimont *et al.*, 2008). It should be noticed that, although powerful, PFGE is technically demanding and not easily transportable. Consequently, it might be relevant to initiate strain typing by using MSLT for *C. maltaromaticum* and then using PFGE when higher resolution is required.

This MLST analysis revealed a high diversity within the dairy population of *C. maltaromaticum*. Indeed, approximately the same nucleotide diversity (π) was found between the dairy strains and the strains originating from all other environments, including other food product categories, soil, live fish and human blood. This suggests that, even if *C. maltaromaticum* is a weak milk acidifying bacterium (Edima *et al.*, 2008), milk is weakly selective for this species. Among the genus *Carnobacterium*, the species *C. maltaromaticum* is one of the most frequently isolated which suggests that it is genetically equipped to be able to adapt to very diverse environments. This ability might be due to its large genome size of 3.7 Mbp (Cailliez-Grimal *et al.*, 2013; Leisner *et al.*, 2012), which is rather uncommon for a lactic acid bacterium. Thus, these results suggest that instead of having a specialized sub-

population able to colonize milk, a wide range of *C. maltaromaticum* strains might be able to colonize milk and soft cheeses.

Although a high diversity was revealed, some clusters exhibited a reduced diversity. Thus, two main clonal complexes were identified: CC1 and CC2 which are represented by an overall of 19 strains. Among the 5 ST3 strains from CC2, the two strains CP7 and CP14 were isolated from different cheese samples originating from the same manufacture. Strains F84 and F87 were isolated from cheeses that were sampled in a market where cheeses are not necessarily sold in their entirety but are instead cut and handled by the cheesemonger. This suggests that the phylogenetic relatedness of the strains CP7 and CP14 and of F84 and F87 might be the result of their environmental connection and therefore a very limited number of generations could separate them from their common ancestor. On the other hand, the strains that belong to ST4 were isolated from diverse environments: raw milk, cheeses and lumpfish roe. In addition, the cheese isolates that exhibit ST4 from CC1 were obtained from sealed cheeses that were manufactured in different factories, and all originated from diverse countries (Lebanon, France, Denmark, and USA). This environmental diversity suggests that the phylogenetic relatedness of the strains from ST4 is not due to a very limited number of generations. In addition, ST4 would be the founder genotype of CC1, which connect 7 different STs and represent 11 strains among the 47 studied. One hypothesis to explain this over-representation would be that strains from CC1 are particularly well adapted to the dairy environment and would therefore highly proliferate in this environment. Another hypothesis would be that *C. maltaromaticum* is subjected to a domestication process which qualifies a process in which a “species bred in captivity and thereby modified from its wild ancestor in ways making it more useful to humans who control its reproduction and its food supply” (DouglasetKlaenhammer, 2010). This definition fits well with food lactic acid bacteria which were selected via ancient backslopping practices and now via the use of isolated starter and adjunct cultures. In *L. lactis*, the domestication process led to the drastic reduction of genetic diversity (Passerini *et al.*, 2010). Indeed, an MLST analysis of this LAB revealed the species can be sub-divided as “environmental” strains, and as “domesticated” strains. The domesticated strains were exclusively isolated from cheese products (excluding strains from raw milk), are closely related and form a major clonal complex (Passerini *et al.*, 2010). Further investigations

are required to know if, and to what extent, domestication took part in population structuring within the species *C. maltaromaticum*.

Acknowledgements:

We are grateful to Jorgen J. Leisner, Malka Halpern, Françoise Leroi, Carole Feurer, and Dr Virginia K Walker for providing the strains for this study. We are thankful to Myriam Michelle, Sylvie Wolff and Arnaud Khemisti for their technical support during this study.

II.3 Résultats majeurs

Un outil de typage basé sur la MLST a été conçu pour *C. maltaromaticum.* Pour cela, les fragments des 7 gènes conservés *dapE, ddlA, glpQ, ilvE*, *pyc, pyrE*, and *leuS* ont été choisis. Ces gènes ont été utilisés pour typer une collection de 47 souches, laquelle est majoritairement constituée de souches d'origine laitière mais contient également des souches d'origines diverses. Ainsi, au sein de cette collection, 28 souches sont d'origine laitière (7 de laits crus et 21 de fromages à pâte molle), 6 sont issues de produits de la mer, 6 sont issues de produits carnés, 3 sont associées à des pathologies (2 isolats de sang humain, 1 isolat pathogène de poisson) et 4 sont d'origine environnementale (étang de sphaigne et sol). Les résultats montrent que 36 génotypes différents peuvent être distingués parmi les 47 souches, révélant le haut pouvoir discriminatoire de cette méthode pour le typage de souches au sein de cette espèce. Les données révèlent également que des génotypes très proches peuvent être représentés par des souches issues d'environnements différents. Ainsi, la souche isolée de sol présente le même ST qu'une souche de fromage. Inversement, des génotypes très différents peuvent être représentés par des souches isolées d'un même lot d'aliments comme c'est le cas des souches SF692, SF800 et SF834, lesquelles ont été isolées du même lot de saumon fumé. Par ailleurs, des mesures de diversité montrent que les souches laitières présentent un niveau de diversité aussi important que les souches non laitières. Ces résultats suggèrent que le lait et les fromages à pâte molle sont peu sélectifs pour les souches de *C. maltaromaticum.* Malgré cette diversité chez les souches d'origine laitière, deux complexes clonaux contenant majoritairement des souches issues de laits crus et fromages ont été identifiés. L'existence de complexes clonaux posent la question de l'existence d'une lignée particulièrement bien adaptées à l'environnement laitier. Une autre possibilité serait que l'existence de ces complexes, et en particulier le complexe CC1, soit le fruit d'un phénomène de domestication.

III. Discussion et perspectives

III.1Taille du génome de *C. maltaromaticum*

La taille du génome de *C. maltaromaticum* LMA 28 obtenue suite au séquençage complet est de 3,85 Mpb. Celle de la souche pathogène de poisson *C. maltaromaticum* ATCC 35586 est de 3,5 Mbp alors que le génome des souches appartenant à d'autres espèces, les souches *Carnobacterium* sp 17-4 (Voget *et al.*, 2011) et AT7, serait respectivement de 2,6 Mpb et 2,4 Mpb. Ainsi, entre le plus petit et le plus grand génome connu de *Carnobacterium* il y aurait environ 1,45 Mpb de différence. L'espèce *C. maltaromaticum* figure parmi les deux espèces les plus fréquemment isolées au sein du genre *Carnobacterium* (Leisner *et al.*, 2007), suggérant que cette espèce présenterait un pouvoir adaptatif plus grand que les autres espèces du genre. Ce pouvoir adaptatif pourrait être conféré par des gènes que présenteraient les bactéries de l'espèce *C. maltaromaticum* et qui seraient absents chez les autres espèces de *Carnobacterium.* D'importantes variations de tailles de génomes ont été mises en évidence chez lactobacilles. En effet, sur une sélection de 20 génomes complets, les génomes varient de 1,8 Mpb à 3,3 Mpb. En conséquence, le nombre de gènes peut varier entre 1721 et 3100. Par ailleurs, une grande diversité de contenu en base G et C a été observée, lequel peut varier en effet entre 33% et 51% (Kant *et al.*, 2010). Ces résultats confortent l'idée selon laquelle la définition du genre *Lactobacillus* est erronée et que les espèces aujourd'hui rassemblées au sein du genre *Lactobacillus* devraient être regroupées dans plusieurs genres distincts (Fujisawa *et al.*, 1992). Toutefois, il semblerait que le cas de *Carnobacterium* soit différent puisque la taille des génomes chez *Lactobacillus* varie selon un continuum alors que chez *Carnobacterium*, il semblerait que ce soit l'espèce *C. maltaromaticum* qui se démarque des autres avec un génome plus grand (ces observations semblent corroborées par de récents résultats obtenus par ailleurs au laboratoire et qui ne sont pas présentés ici). De plus, le pourcentage en bases G et C est homogène chez *Carnobacterium* et oscille entre 34,5% et 35,3%. Une piste, qui est en cours d'exploration au laboratoire, consisterait à séquencer d'autres souches de *C. maltaromaticum* afin de déterminer si c'est un phénomène général au sein de l'espèce. Les génomes d'autres espèces de *C. maltaromaticum,* et en particulier des espèces proches de l'espèce *C. maltaromaticum*, pourraient également être séquencés afin de déterminer si les événements de gains ou de pertes de gènes sont récents. Des analyses et comparaisons de génomes pourraient permettre

de déterminer quels sont les gènes spécifiques de l'espèce *C. maltaromaticum.* L'analyse de la fonction de ces gènes pourrait permettre de déterminer quelle est l'origine du succès évolutif de l'espèce *C. maltaromaticum*.

III.2 Implications de la capacité de *C. maltaromaticum* à s'adapter à l'environnement intestinal de mammifères

Le devenir d'une bactérie durant le transit intestinal est considérablement variable d'une bactérie à l'autre. Un cas représentatif de cette diversité est le genre *Bifidobacterium* dans lequel une grande diversité est observée (Kailasapathy et Chin, 2000). Si une bactérie est capable de survivre, il est alors possible que celle-ci puisse interagir avec l'hôte.

III.2.1 Survie

Il a été montré ici que *C. maltaromaticum* est capable de survivre durant le transit gastro-intestinal de la souris. Le taux de bactéries recouvrées est élevé et correspond approximativement à la quantité de bactéries ayant été administrée aux souris. Deux hypothèses peuvent expliquer ce résultat. Dans la première, il est supposé que la bactérie ne peut pas se diviser durant le transit. Dans ce cas, cela impliquerait que le taux de survie est d'environ 100% et que la bactérie n'est pas capable de s'implanter massivement dans le tube digestif de la souris. Dans la seconde hypothèse, il est supposé que la bactérie est capable de se diviser durant le transit. Ceci impliquerait que la quantité de *C. maltaromaticum* LMA 28 obtenue dans les fèces soit le résultat de la mort cellulaire et de la division et cela ouvrerait la possibilité pour que la bactérie ait pu s'implanter. Il serait pour cela pertinent de réitérer des expériences similaires d'administration de la bactérie à des souris et de déterminer s'il est possible de la retrouver associée aux différentes parties du tube digestif de la souris.

La capacité de la bactérie à survivre au transit gastro-intestinal implique qu'elle est capable de survire à des nombreux stress associés. Ainsi, l'estomac est un environnement très sélectif puisque le pH peut y être très acide et peut atteindre des valeurs de 2 à jeun. C'est

d'ailleurs une problématique très étudiée pour certains micro-organismes sensibles à l'environnement intestinal tels que les *Bifidobacterium* ou certains *Lactobacillus* probiotiques (Corcoran *et al.*, 2008). A la sortie de l'intestin, la bactérie doit ensuite résister aux sels biliaires, lesquels jouent un rôle dans l'assimilation des lipides, et à de nombreux autres stress dont les composants du système immunitaire inné et adaptatif (Ellis, 2001). D'après nos résultats, il est vraisemblable que *C. maltaromaticum* LMA 28 soit capable de résister à nombre de ces stress.

L'analyse du génome de la bactérie semble corroborer ces résultats. En effet, des gènes homologues de gènes responsables de la résistance aux sels biliaires chez d'autres bactéries (Lambert *et al.*, 2008; O'Sullivan *et al.*, 2009) ont été identifiés. De plus, le génome de *C. maltaromaticum* LMA 28 contiendrait des gènes impliqués dans la modification de composants de l'enveloppe cellulaire tels que la membrane plasmique, les acides téichoïques et le peptidoglycane. Ces modifications ont été décrites comme permettant à la bactérie qui les réalise de résister à des peptides antimicrobiens et au lysozyme, deux composants du système immunitaire inné.

Afin de tester ces hypothèses, la bactérie pourrait être exposée à des sels biliaires et à des peptides antimicrobiens tels que les défensines et le taux de survie de la bactérie pourrait être comparé à ceux typiquement observés pour des bactéries connues pour être résistantes ou sensibles à ces composants. De plus, la capacité à hydrolyser les sels biliaires pourrait être mesurée. Il serait par ailleurs intéressant de confirmer que les gènes identifiés sont réellement impliqués dans ces phénomènes et pour cela deux approches pourraient être envisagées : soit complémenter par expression hétérologue des bactéries mutées pour les homologues de ces gènes avec les gènes de *C. maltaromaticum,* soit les gènes pourraient être mutés chez *C. maltaromaticum* et leur phénotype de résistance aux stress associés pourrait être analysé.

Ces résultats de survie de la bactérie dans le tube digestif de la souris ouvrent la possibilité pour qu'elle soit capable de survivre dans celui d'autres mammifères dont celui de l'homme. La recherche de la séquence de l'ARN 16S de *C. maltaromaticum* a révélé la présence probable de bactéries de cette espèce dans les fèces d'animaux tels l'ours polaire et le guépard (Ley *et al.*, 2008). La présence de cette bactérie chez l'humain a été détectée dans une étude dont l'objectif était de comparer la flore intestinale d'individus sains à celle

d'individus dans différents contextes : affection par une maladie inflammatoire chronique de l'intestin, infection à *Clostridium difficile* ou génotype NOD2 (Li *et al.*, 2012). Toutefois, il n'est aujourd'hui pas possible de savoir dans quel lot la bactérie a été identifiées. Il serait pour cela intéressant de rechercher spécifiquement si la bactérie peut être isolée de fèces humaines. La détection effective de cette bactérie pourrait permettre d'apporter un élément supplémentaire en faveur d'un risque sanitaire faible associé à l'ingestion de cette bactérie par l'homme.

III.2.2 Interaction avec les cellules de l'hôte

Des expériences *in vitro* ont révélé que *C. maltaromaticum* est capable d'adhérer à des cellules épithéliales intestinales humaines. L'adhésion est reconnue comme étant un facteur important pour les bactéries bénéfiques et les bactéries pathogènes (Jenkinson et Lamont, 1997; Lebeer *et al.*, 2008). Dans le cas des bactéries bénéfiques, elle permettrait de protéger l'organisme contre certains pathogènes par exclusion compétitive en occupant les sites de fixation bactériens disponibles à la surface de l'épithélium intestinal. L'adhésion permettrait également à la bactérie d'être à proximité de l'épithélium pour moduler l'immunité (Lebeer *et al.*, 2008). Des essais *in vitro* suggèreraient que *C. maltaromaticum* LMA 28 aurait un effet neutre voire légèrement anti-inflammatoire. Cependant, l'ensemble de ces résultats doit être considéré avec précaution. En effet, les cellules modèles intestinales utilisées sont des cellules cancéreuses, bien qu'elles soient encore capables de se différencier, et en cela pourraient introduire un biais important. De plus, l'épithélium intestinal n'est pas stérile or cette composante microbienne est omise du système expérimental utilisé. Par ailleurs, il est décrit que le mucus produit à la surface de l'épithélium intestinal est une matrice très importante pour les interactions avec les bactéries (Lebeer *et al.*, 2008) et qu'il faut le considérer lors de l'étude de l'adhésion bactériennes aux cellules hôtes. Les cellules utilisées dans cette étude produisent peu de mucus. Pour pallier à ce problème, une lignée cellulaire telle que la lignée HT29-MTX surproduisant du mucus pourrait être testée en adhésion (Gopal *et al.*, 2001; Lesuffleur *et al.*, 1990). Des expériences d'adhésion à des tissus obtenus par biopsie pourraient être réalisées. Ce type de modèle étant difficile à mettre en place, des souris dont

la flore digestive serait contrôlée (axéniques ou colonisée avec une flore humaine) pourraient être utilisées pour rechercher si *C. maltaromaticum* peut s'associer physiquement avec l'épithélium.

Concernant le pouvoir immuno-modulateur de la bactérie, il est décrit qu'une grande variabilité au niveau intraspécifique peut être observée. En effet, chez *Propionibacterium* ou *O. oeni* les profils de production de cytokines pro-inflammatoires et anti-inflammatoires sont très variables d'une souche à l'autre (Foligne *et al.*, 2010a; Foligne *et al.*, 2010b). Des essais *in vivo* en modèle murin de colite inflammatoire ont révélé le pouvoir anti-inflammatoire prometteur des souches qui avaient révélées préalablement les propriétés le plus intéressantes à l'issu des tests *in vitro* (Foligne *et al.*, 2010a; Foligne *et al.*, 2010b). Dans notre étude, une seule souche a été décrite, il serait par conséquent intéressant de tester une collection de souches de *C. maltaromaticum* pour déterminer si des variations du potentiel immuno-modulateur pourraient caractériser cette espèce. Ces données permettraient de donner des indications supplémentaires sur les aspects sanitaires liés à la présence de cette bactérie dans l'alimentation humaine. En effet, dans l'hypothèse où des souches pro-inflammatoires existeraient chez cette espèce, cela poserait la question de l'impact inflammatoire de certains aliments naturellement contaminés en *C. maltaromaticum.* A l'inverse, dans l'hypothèse où des souches anti-inflammatoires existeraient, cela suggérerait que des souches de *C. maltaromaticum* pourraient présenter un potentiel probiotique chez l'humain comme c'est déjà décrit chez le poisson (Leisner *et al.*, 2007).

III.3 Typage et génétique des populations chez *C. maltaromaticum*

II.3.1 Performance de la MLST pour le typage chez *C. maltaromaticum*

L'utilisation de la MLST pour le typage de *C. maltaromaticum* a révélé un niveau de performance élevé. En effet, sur les 47 souches de la collection, 36 génotypes différents ont pu être identifiés. Ce niveau de discrimination est similaire à celui qui a été obtenu pour d'autres bactéries lactiques. Par exemple, chez *O. oeni,* l'étude de Bilhère *et al.* (2008) a

montré qu'il existait 34 génotypes différents au sein d'une population constituée de 43 souches. Cependant, il est prévisible qu'en augmentant la taille de la collection, le niveau de résolution diminue. En effet, une étude ultérieure sur *O. oeni* menée par le même laboratoire n'a révélé que 127 génotypes différents au sein d'une collection de 258 souches (Bridier *et al.*, 2010). Par la suite, une méthode de typage basée sur la plasticité des régions riches en répétitions de séquences d'ADN a été établie chez *O. oeni* par Claisse et Lonvaud-Funel (2012) du même laboratoire. Leur méthode est basée sur l'analyse de 5 loci VNTR, lesquels ont permis d'atteindre un niveau de résolution plus élevé à partir d'une collection de 236 souches d'*O. oeni* (ClaisseetLonvaud-Funel, 2012). Dans l'étude décrite ici, certains génotypes tels que les génotypes ST4 ou ST3 sont représentés par un nombre important de souches. Il est probable que certaines de ces souches soient différentes. En effet, pour les souches *C. maltaromaticum* CP7 et CP14, lesquelles présentent le même génotype en MLST, deux pulsotypes différents avaient été observés en PFGE (Afzal *et al.*, 2013). Dans un contexte d'utilisation industrielle de ces souches, il pourrait s'avérer utile de pouvoir les différencier à l'aide d'une méthode simple. Pour cela, une méthode basée sur le polymorphisme de régions VNTR pourrait être utilisée chez *C. maltaromaticum*. Une inspection de la séquence du chromosome de la souche *C. maltaromaticum* LMA 28 grâce au logiciel tandem repeat finder a révélé la présence de 121 motifs répétés en tandem, parmi lesquels 3 pourraient faire l'objet d'une évaluation du niveau de variabilité.

III.3.2 Analyse de diversité

III.3.2.1 Une grande diversité des souches laitières

Les résultats majeurs issus de l'analyse MLST montrent que les souches d'origine laitière présentent une grande diversité, approximativement aussi grande que celle de la population de souches venant d'origines diverses. Ce résultat suggère que le lait cru et les fromages à pâte molle sont peu sélectifs pour *C. maltaromaticum*. Cette diversité génotypique observée dans l'environnement laitier pourrait se traduire par une diversité des propriétés technologiques des fromages contenant ces bactéries. Il a en effet été montré que *C.*

maltaromaticum LMA 28 pouvait avoir un impact positif sur les fromages affinés à croûte fleurie (Afzal *et al.*, 2013). Il est vraisemblable que d'autres souches puisse avoir un impact différents qui pourrait se traduire par des effets neutres voir indésirables, comme cela a déjà été observé pour les produits carnés et les produits de la mer (voir la partie revue bibliographique). Il pourrait être intéressant d'évaluer l'impact d'autres souches en technologie fromagère et, le cas échéant, de déterminer quels sont les gènes responsables. La connaissance de ces gènes pourrait faciliter l'identification rapide de souches d'intérêt technologique.

III.3.2.2 Les complexes clonaux contenant majoritairement des souches laitières

Bien que les souches d'origine laitière arborent un niveau de diversité important, deux complexes clonaux majeurs se dégagent de l'analyse MLST. Parmi ces complexes, le complexe CC1 rassemble un nombre important de ST différents. Trois hypothèses peuvent expliquer l'existence de ce complexe.

Dans la première hypothèse, un biais d'échantillonnage aurait entraîné la surreprésentation artificielle des souches de cette lignée. Toutefois, les souches du complexe clonal 1 ont été isolées de fromages pré-emballés en usine (ce qui permet de réduire les problèmes de contaminations croisées), et les souches ont été isolées d'environnements différents à savoir le lait cru, les fromages et les œufs de lump. Par ailleurs, les échantillons sont issus de pays différents (Danemark, France, Liban et USA), et les isolements ont été réalisés entre 1974, 1994 et 2010. Il est donc peu probable que l'existence de ce complexe soit due à un biais expérimental.

Une deuxième hypothèse serait que les souches de cette lignée soient particulièrement adaptées à l'environnement laitier et auraient tendance à se multiplier et survivre plus favorablement que les autres lignées. Pour tester cette hypothèse des mesures de fitness pourraient être réalisées à partir d'une sélection souches de *C. maltaromaticum* dans un contexte fromager.

Une troisième hypothèse serait liée aux pratiques employées par les fromagers pour contrôler les flores microbiennes présentes dans leurs fromages. En effet, en plus de résulter d'une contamination opportuniste par des micro-organismes présents dans l'environnement de production, la présence d'une bactérie dans un fromage peut résulter d'un ajout volontaire par l'homme ; les micro-organismes sont alors qualifiés de levains d'acidification ou d'affinage selon les cas. Ces levains peuvent être soit issus des collections privées des fromagers, soit fournis par des sociétés spécialisées dans la sélection et la commercialisation de ces micro-organismes d'intérêt industriel. A notre connaissance, *C. maltaromaticum* n'est aujourd'hui pas proposée à la commercialisation par les industriels en Europe, en raison d'un avis négatif de l'EFSA vis-à-vis de l'utilisation de cette bactérie dans la chaîne alimentaire (EFSA, 2012). Toutefois, on ne peut pas exclure que cette bactérie ne soit pas ajoutée volontairement par les industriels de la transformation laitière. En faveur de cette hypothèse est le fait que la souche type *C. maltaromaticum* est présente au sein du génotype ST4. Cette souche est distribuée par l'American Type Culture Collection (ATCC) et la Deutsche Dammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSM) sous les dénominations respectives ATCC 27865 et DSM 20342. Sa fiche spécifie qu'elle confère un arôme malté lorsqu'elle est présente dans le lait, une caractéristique d'intérêt dans le secteur de la fromagerie. Une hypothèse séduisante pour expliquer l'existence du complexe clonal 1 serait qu'il est issu de la souche type de *C. maltaromaticum*, laquelle présente le génotype 4 qui est de surcroit le génotype fondateur du complexe clonal 1. Dans le cadre de cette hypothèse, cela signifierait que le complexe clonal serait le résultat d'un phénomène de domestication en cours. Dans ce cas, cela pourrait impliquerait que les souches du complexe clonal 1 ne seraient pas nécessairement plus adaptées que les autres au milieu laitier.

III.3.2.3 Les souches associées à des pathologies

Trois souches associées à des pathologies ont été incluses dans l'étude MLST. Les résultats montrent que les trois isolats présentent des génotypes différents. L'isolat clinique CIP 100481 présente le génotype ST18 lequel est le génotype fondateur du complexe clonal CC3. La souche CIP 101342 présente le génotype singleton ST19 et la souche pathogène de

poisson ATCC 35586 présente le génotype ST36, lequel appartient au complexe clonal 4 (article 3, figure 3). Le fait que les trois souches ne forment pas de cluster est en défaveur de l'existence d'une lignée particulièrement virulente au sein de l'espèce. Toutefois, il pourrait être recommandé d'éviter l'utilisation de souches appartenant aux complexes clonaux CC3 et CC4 dans la chaîne alimentaire.

IV Conclusion générale

La démarche QPS visant à évaluer les risques sanitaires associés à des micro-organismes dans le contexte alimentaire repose sur les quatre piliers fondateurs suivants : connaissance taxonomique, socle de connaissances, pouvoir pathogène et utilisation prévue. L'utilisation de *Carnobacterium maltaromaticum* dans l'alimentation humaine et animale n'est aujourd'hui pas recommandée par l'EFSA en raison du faible niveau de connaissances disponibles sur ce micro-organisme et des pathologies qu'il peut provoquer chez le poisson. Les objectifs de ces travaux de thèse étaient de renforcer le socle de connaissances sur ce micro-organisme en déterminant la séquence complète d'une souche alimentaire de *C. maltaromaticum* et en évaluant le devenir de la bactérie après ingestion par le consommateur. Un autre objectif visait aussi à améliorer les connaissances taxonomiques au sein de l'espèce *C. maltaromaticum* grâce à la mise au point d'un schéma MLST.

La séquence complète de la souche *C. maltaromaticum* LMA 28 a révélé une taille de génome importante de 3,8 Mpb ce qui semble atypique dans le genre *Carnobacterium*. L'analyse du génome de cette souche indique qu'il contiendrait des gènes d'adaptation à l'environnement intestinal qui corroborent des résultats montrant que cette même souche est capable de survivre durant le transit intestinal chez la souris. Cette souche est également capable d'adhérer à des cellules intestinales humaines et présenterait des propriétés neutres voire anti-inflammatoires. L'ensemble de ces informations suggère que la bactérie est capable de survivre durant le tractus gastro-intestinal et qu'elle est capable d'interagir avec l'hôte. Au niveau taxonomique, il a été montré que la MLST chez l'espèce *C. maltaromaticum* permet d'atteindre un haut niveau de résolution. En outre, les résultats de MLST suggèrent que le lait et les fromages à pâte molle sont peu sélectifs pour les souches de cette espèce.

L'ensemble de ces résultats de thèse soulève la question du devenir de la bactérie durant le transit gastro-intestinal, ainsi que de sa capacité à interagir avec l'hôte dans le contexte humain. L'origine de la virulence chez le poisson est encore inconnue. La confrontation des résultats des analyses comparées de génomes entre souches alimentaires et souches pathogènes avec les résultats d'analyses approfondies en MLST permettra de

déterminer si les souches pathogènes et alimentaires forment des sous-populations distinctes. Ces éléments permettront de déterminer si certaines sous-populations de cette espèce peuvent être utilisées dans la chaîne alimentaire de façon sûre.

Références bibliographiques

Achtman, M. (2008) Evolution, population structure, and phylogeography of genetically monomorphic bacterial pathogens, *Annu Rev Microbiol*, 62, pp. 53-70.

Afzal, M.I., Delaunay, S., Paris, C., Borges, F., Revol-Junelles, A.M., Cailliez-Grimal, C. (2012) Identification of metabolic pathways involved in the biosynthesis of flavor compound 3-methylbutanal from leucine catabolism by Carnobacterium maltaromaticum LMA 28, *Int J Food Microbiol*, 157(3), pp. 332-339.

Afzal, M.I., Gonzalez Ariceaga, C.C., Lhomme, E., Kamel Ali, N., Payot, S., Burgain, J., Gaiani, C., Borges, F., Revol-Junelles, A.M., Delaunay, S., Cailliez-Grimal, C. (2013) Characterization of *Carnobacterium maltaromaticum* LMA 28 for its positive technological role in soft cheese making, *Food Microbiol*, 36, pp. 223-230.

Afzal, M.I., Jacquet, T., Delaunay, S., Borges, F., Milliere, J.B., Revol-Junelles, A.M., Cailliez-Grimal, C. (2010) *Carnobacterium maltaromaticum*: identification, isolation tools, ecology and technological aspects in dairy products, *Food Microbiol*, 27(5), pp. 573-579.

Audia, J.P., Webb, C.C., Foster, J.W. (2001) Breaking through the acid barrier: an orchestrated response to proton stress by enteric bacteria, *International journal of medical microbiology*, 291(2), pp. 97-106.

Baird, R.M., Corry, J.E.L., Curtis, G.W., Mossel, D.A., Skovgaard, N. (1989) Pharmacopoeia of culture media for food microbiology: additional monographs, *Int J Food Microbiol*, 9, pp. 85-144.

Barakat, R.K., Griffiths, M.W., Harris, L.J. (2000) Isolation and characterization of *Carnobacterium*, *Lactococcus*, and *Enterococcus* spp. from cooked, modified atmosphere packaged, refrigerated, poultry meat, *Int J Food Microbiol*, 62(1-2), pp. 83-94.

Beganovic, J., Kos, B., Lebos Pavunc, A., Uroic, K., Dzidara, P., Suskovic, J. (2013) Proteolytic activity of probiotic strain *Lactobacillus helveticus* M92, *Anaerobe*, 20, pp. 58-64.

Begley, M., Gahan, C.G., Hill, C. (2005) The interaction between bacteria and bile, *FEMS Microbiol Rev*, 29(4), pp. 625-651.

Bernard, E., Rolain, T., Courtin, P., Guillot, A., Langella, P., Hols, P., Chapot-Chartier, M.P. (2011) Characterization of O-acetylation of N-acetylglucosamine: a novel structural variation of bacterial peptidoglycan, *J Biol Chem*, 286(27), pp. 23950-23958.

Bilhere, E., Lucas, P.M., Claisse, O., Lonvaud-Funel, A. (2009) Multilocus sequence typing of *Oenococcus oeni*: detection of two subpopulations shaped by intergenic recombination, *Appl Environ Microbiol*, 75(5), pp. 1291-1300.

Bjorkroth, J., Ridell, J., Korkeala, H. (1996) Characterization of *Lactobacillus sake* strains associating with production of ropy slime by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) patterns, *Int J Food Microbiol*, 31(1-3), pp. 59-68.

Bjorkroth, K.J., Korkeala, H.J. (1997) Use of rRNA gene restriction patterns to evaluate lactic acid bacterium contamination of vacuum-packaged sliced cooked whole-meat product in a meat processing plant, *Appl Environ Microbiol*, 63(2), pp. 448-453.

Bolotin, A., Quinquis, B., Renault, P., Sorokin, A., Ehrlich, S.D., Kulakauskas, S., Lapidus, A., Goltsman, E., Mazur, M., Pusch, G.D., Fonstein, M., Overbeek, R., Kyprides, N., Purnelle, B., Prozzi, D., Ngui, K., Masuy, D., Hancy, F., Burteau, S., Boutry, M., Delcour, J., Goffeau, A., Hols, P. (2004) Complete sequence and comparative genome analysis of the dairy bacterium *Streptococcus thermophilus*, *Nat Biotechnol*, 22(12), pp. 1554-1558.

Boneca, I.G., Dussurget, O., Cabanes, D., Nahori, M.A., Sousa, S., Lecuit, M., Psylinakis, E., Bouriotis, V., Hugot, J.P., Giovannini, M., Coyle, A., Bertin, J., Namane, A., Rousselle, J.C., Cayet, N., Prevost, M.C., Balloy, V., Chignard, M., Philpott, D.J., Cossart, P., Girardin, S.E. (2007) A critical role for peptidoglycan N-deacetylation in *Listeria* evasion from the host innate immune system, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(3), pp. 997-1002.

Borchers, A.T., Selmi, C., Meyers, F.J., Keen, C.L., Gershwin, M.E. (2009) Probiotics and immunity, *J Gastroenterol*, 44(1), pp. 26-46.

Bouhnik, Y., Pochart, P., Marteau, P., Arlet, G., Goderel, I., Rambaud, J.C. (1992) Fecal recovery in humans of viable Bifidobacterium sp ingested in fermented milk, *Gastroenterology*, 102(3), pp. 875-878.

Bourdichon, F., Casaregola, S., Farrokh, C., Frisvad, J.C., Gerds, M.L., Hammes, W.P., Harnett, J., Huys, G., Laulund, S., Ouwehand, A., Powell, I.B., Prajapati, J.B., Seto, Y., Schure, E.T., Van Boven, A., Vankerckhoven, V., Zgoda, A., Tuijtelaars, S., Hansen, E.B. (2012) Food fermentations: microorganisms with technological beneficial use, *Int J Food Microbiol*, 154, pp. 87-97.

Bratina, B.J., Stevenson, B.S., Green, W.J., Schmidt, T.M. (1998) Manganese reduction by microbes from oxic regions of the lake vanda (Antarctica) water column, *Appl Environ Microbiol*, 64(10), pp. 3791-3797.

Bridier, J., Claisse, O., Coton, M., Coton, E., Lonvaud-Funel, A. (2010) Evidence of distinct populations and specific subpopulations within the species *Oenococcus oeni*, *Appl Environ Microbiol*, 76(23), pp. 7754-7764.

Briggiler-Marco, M., Capra, M.L., Quiberoni, A., Vinderola, G., Reinheimer, J.A., Hynes, E. (2007) Nonstarter *Lactobacillus* strains as adjunct cultures for cheese making: in vitro characterization and performance in two model cheeses, *J Dairy Sci*, 90(10), pp. 4532-4542.

Brillet, A., Pilet, M.F., Prevost, H., Bouttefroy, A., Leroi, F. (2004) Biodiversity of *Listeria monocytogenes* sensitivity to bacteriocin-producing *Carnobacterium* strains and application in sterile cold-smoked salmon, *J Appl Microbiol*, 97(5), pp. 1029-1037.

Brillet, A., Pilet, M.F., Prevost, H., Cardinal, M., Leroi, F. (2005) Effect of inoculation of *Carnobacterium divergens* V41, a biopreservative strain against *Listeria monocytogenes* risk, on the microbiological, chemical and sensory quality of cold-smoked salmon, *Int J Food Microbiol*, 104(3), pp. 309-324.

Brinster, S., Furlan, S., Serror, P. (2007) C-terminal WxL domain mediates cell wall binding in *Enterococcus faecalis* and other gram-positive bacteria, *J Bacteriol*, 189(4), pp. 1244-1253.

Bron, P.A., Marco, M., Hoffer, S.M., Van Mullekom, E., de Vos, W.M., Kleerebezem, M. (2004) Genetic characterization of the bile salt response in *Lactobacillus plantarum* and analysis of responsive promoters in vitro and in situ in the gastrointestinal tract, *J Bacteriol*, 186(23), pp. 7829-7835.

Bron, P.A., Molenaar, D., de Vos, W.M., Kleerebezem, M. (2006) DNA micro-array-based identification of bile-responsive genes in *Lactobacillus plantarum*, *J Appl Microbiol*, 100(4), pp. 728-738.

Brulc, J.M., Antonopoulos, D.A., Miller, M.E., Wilson, M.K., Yannarell, A.C., Dinsdale, E.A., Edwards, R.E., Frank, E.D., Emerson, J.B., Wacklin, P., Coutinho, P.M., Henrissat, B., Nelson, K.E., White, B.A. (2009) Gene-centric metagenomics of the fiber-adherent bovine rumen microbiome reveals forage specific glycoside hydrolases, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(6), pp. 1948-1953.

Buchanan, R.L., Klawitter, L.A. (1991) Effectiveness of *Carnobacterium piscicola* LK5 for controlling the growth of *Listeria monocytogenes* Scott A in refrigerated food. , *Journal of food safety*.

Buhnik-Rosenblau, K., Matsko-Efimov, V., Danin-Poleg, Y., Franz, C.M., Klein, G., Kashi, Y. (2013) Biodiversity of *Enterococcus faecalis* based on genomic typing, *Int J Food Microbiol*, 165(1), pp. 27-34.

Buhnik-Rosenblau, K., Matsko-Efimov, V., Jung, M., Shin, H., Danin-Poleg, Y., Kashi, Y. (2012) Indication for Co-evolution of *Lactobacillus johnsonii* with its hosts, *BMC Microbiol*, 12, p. 149.

Cai, H., Rodriguez, B.T., Zhang, W., Broadbent, J.R., Steele, J.L. (2007) Genotypic and phenotypic characterization of *Lactobacillus casei* strains isolated from different ecological niches suggests frequent recombination and niche specificity, *Microbiology*, 153(Pt 8), pp. 2655-2665.

Cailliez-Grimal, C., Chaillou, S., Anba-Mondoloni, J., Loux, V., Afzal, M.I., Rahman, A., Kergourlay, G., Champomier-Verges, M.C., Zagorec, M., Dalgaard, P., Leisner, J.J., Prevost, H., Revol-Junelles, A.M., Borges, F. (2013) Complete Chromosome Sequence of *Carnobacterium maltaromaticum* LMA 28, *Genome Announc*, 1(1).

Cailliez-Grimal, C., Edima, H.C., Revol-Junelles, A.M., Millière, J.B. (2007) Short communication: *Carnobacterium maltaromaticum*: the only *Carnobacterium* species in French ripened soft cheeses as revealed by polymerase chain reaction detection, *J Dairy Sci*, 90(3), pp. 1133-1138.

Cailliez-Grimal, C., Miguindou-Mabiala, R., Leseine, M., Revol-Junelles, A.M., Millière, J.B. (2005) Quantitative polymerase chain reaction used for the rapid detection of *Carnobacterium* species from French soft cheeses, *FEMS Microbiol Lett*, 250(1), pp. 163-169.

Calmin, G., Lefort, F., Belbahri, L. (2008) Multi-loci sequence typing (MLST) for two lacto-acid bacteria (LAB) species: *Pediococcus parvulus* and *P. damnosus*, *Mol Biotechnol*, 40(2), pp. 170-179.

Cappello, M.S., Stefani, D., Grieco, F., Logrieco, A., Zapparoli, G. (2008) Genotyping by Amplified Fragment Length Polymorphism and malate metabolism performances of indigenous *Oenococcus oeni* strains isolated from Primitivo wine, *Int J Food Microbiol*, 127(3), pp. 241-245.

Carroll, I.M., Andrus, J.M., Bruno-Barcena, J.M., Klaenhammer, T.R., Hassan, H.M., Threadgill, D.S. (2007) Anti-inflammatory properties of *Lactobacillus gasseri* expressing manganese superoxide dismutase using the interleukin 10-deficient mouse model of colitis, *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 293(4), pp. G729-738.

Charlesworth, B., Sniegowski, P., Stephan, W. (1994) The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes, *Nature*, 371(6494), pp. 215-220.

Chiaramonte, F., Blugeon, S., Chaillou, S., Langella, P., Zagorec, M. (2009) Behavior of the meat-borne bacterium *Lactobacillus sakei* during its transit through the gastrointestinal tracts of axenic and conventional mice, *Appl Environ Microbiol*, 75(13), pp. 4498-4505.

Chmelar, D., Matusek, A., Korger, J., Durnova, E., Steffen, M., Chmelarova, E. (2002) Isolation of Carnobacterium piscicola from human pus--case report, *Folia Microbiol (Praha)*, 47(4), pp. 455-457.

Christensen, H., Kuhnert, P., Olsen, J.E., Bisgaard, M. (2004) Comparative phylogenies of the housekeeping genes *atpD*, *infB* and *rpoB* and the 16S rRNA gene within the Pasteurellaceae, *Int J Syst Evol Microbiol*, 54(Pt 5), pp. 1601-1609.

Claisse, O., Lonvaud-Funel, A. (2012) Development of a multilocus variable number of tandem repeat typing method for *Oenococcus oeni*, *Food Microbiol*, 30(2), pp. 340-347.

Collins, L.V., Kristian, S.A., Weidenmaier, C., Faigle, M., Van Kessel, K.P., Van Strijp, J.A., Gotz, F., Neumeister, B., Peschel, A. (2002) *Staphylococcus aureus* strains lacking D-alanine modifications of teichoic acids are highly susceptible to human neutrophil killing and are virulence attenuated in mice, *J Infect Dis*, 186(2), pp. 214-219.

Collins, M.D., Farrow, J.A.E., Phillips, B.A., Ferusu, S., Jones, D. (1987) Classification of *Lactobacillus divergens*, *Lactobacillus piscicola*, and some catalase-negative, asporogenous, rod-shaped bacteria from poultry in a new genus *Carnobacterium*, *International journal of systematic bacteriology*, 37(04), pp. 310-316.

Connil, N., Dousset, X., Onno, B., Pilet, M.F., Breuil, M.F., Montel, M.C. (1998) Enumeration of *Carnobacterium divergens* V41, *Carnobacterium piscicola* V1 and *Lactobacillus brevis* LB62 by in situ hybridization-flow cytometry, *Lett Appl Microbiol*, 27(5), pp. 302-306.

Conway, P.L., Gorbach, S.L., Goldin, B.R. (1987) Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells, *J Dairy Sci*, 70(1), pp. 1-12.

Coombs, J.M., Brenchley, J.E. (1999) Biochemical and phylogenetic analyses of a cold-active beta-galactosidase from the lactic acid bacterium *Carnobacterium piscicola* BA, *Appl Environ Microbiol*, 65(12), pp. 5443-5450.

Cooper, J.E., Feil, E.J. (2006) The phylogeny of *Staphylococcus aureus* - which genes make the best intra-species markers?, *Microbiology*, 152(Pt 5), pp. 1297-1305.

Corcoran, B.M., Stanton, C., Fitzgerald, G., Ross, R.P. (2008) Life under stress: the probiotic stress response and how it may be manipulated, *Curr Pharm Des*, 14(14), pp. 1382-1399.

Dalgaard, P., Madsen, H.L., Samieian, N., Emborg, J. (2006) Biogenic amine formation and microbial spoilage in chilled garfish (Belone belone belone)--effect of modified atmosphere packaging and previous frozen storage, *J Appl Microbiol*, 101(1), pp. 80-95.

de Las Rivas, B., Marcobal, A., Munoz, R. (2004) Allelic diversity and population structure in *Oenococcus oeni* as determined from sequence analysis of housekeeping genes, *Appl Environ Microbiol*, 70(12), pp. 7210-7219.

de Las Rivas, B., Marcobal, A., Munoz, R. (2006) Development of a multilocus sequence typing method for analysis of *Lactobacillus plantarum* strains, *Microbiology*, 152(Pt 1), pp. 85-93.

de Man, J.C., Rogosa, M., M.E., S. (1960) A medium for the cultivation of Lactobacilli, *Journal of applied bacteriology*.

Delcour, J., Ferain, T., Deghorain, M., Palumbo, E., Hols, P. (1999) The biosynthesis and functionality of the cell-wall of lactic acid bacteria, *Antonie Van Leeuwenhoek*, 76(1-4), pp. 159-184.

Delorme, C., Bartholini, C., Bolotine, A., Ehrlich, S.D., Renault, P. (2010) Emergence of a cell wall protease in the *Streptococcus thermophilus* population, *Appl Environ Microbiol*, 76(2), pp. 451-460.

Diancourt, L., Passet, V., Chervaux, C., Garault, P., Smokvina, T., Brisse, S. (2007) Multilocus sequence typing of *Lactobacillus casei* reveals a clonal population structure with low levels of homologous recombination, *Appl Environ Microbiol*, 73(20), pp. 6601-6611.

Dieye, Y., Oxaran, V., Ledue-Clier, F., Alkhalaf, W., Buist, G., Juillard, V., Lee, C.W., Piard, J.C. (2010) Functionality of sortase A in *Lactococcus lactis*, *Appl Environ Microbiol*, 76(21), pp. 7332-7337.

Douglas, G.L., Klaenhammer, T.R. (2010) Genomic evolution of domesticated microorganisms, *Annu Rev Food Sci Technol*, 1, pp. 397-414.

Drouault-Holowacz, S., Foligne, B., Dennin, V., Goudercourt, D., Terpend, K., Burckel, A., Pot, B. (2006) Anti-inflammatory potential of the probiotic dietary supplement Lactibiane Tolerance: *in vitro* and *in vivo* considerations, *Clin Nutr*, 25(6), pp. 994-1003.

Drouault, S., Corthier, G., Ehrlich, S.D., Renault, P. (1999) Survival, physiology, and lysis of *Lactococcus lactis* in the digestive tract, *Appl Environ Microbiol*, 65(11), pp. 4881-4886.

Duffes, F., Corre, C., Leroi, F., Dousset, X., Boyaval, P. (1999) Inhibition of *Listeria monocytogenes* by in situ produced and semipurified bacteriocins of *Carnobacterium* spp. on vacuum-packed, refrigerated cold-smoked salmon, *J Food Prot*, 62(12), pp. 1394-1403.

Edima, C. 2007 In Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires (ENSAIA), laboratoire de Science et Génie Alimentaires (LSGA)Institut National Polytechnique de Lorraine (INPL).

Edima, H.C., Cailliez-Grimal, C., Revol-Junelles, A.M., Rondags, E., Milliere, J.B. (2008) Short communication: impact of pH and temperature on the acidifying activity of *Carnobacterium maltaromaticum*, *J Dairy Sci*, 91(10), pp. 3806-3813.

Edima, H.C., Cailliez-Grimal, C., Revol-Junelles, A.M., Tonti, L., Linder, M., Millière, J.B. (2007) A selective enumeration medium for *Carnobacterium maltaromaticum*, *J Microbiol Methods*, 68(3), pp. 516-521.

EFSA (2008) The maintenance of the list of QPS microorganisms intentionally added to food or feed *The EFSA journal*, 923, pp. 1-48.

EFSA (2009) Scientific opinion on the maintenance of the list of QPS microorganisms intentionally added to food or feed (2009 update), *EFSA Journal*, 7(12), pp. 1-92.

EFSA, P.o.B.H.B. (2012) Scientific opinion on the maintenance of the list of QPS biological agents intentionally added to food or feed (2012 update), *EFSA Journal*, 10(12), pp. 1-84.

Ellis, A.E. (2001) Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria, *Dev Comp Immunol*, 25(8-9), pp. 827-839.

Emborg, J., Laursen, B.G., Dalgaard, P. (2005) Significant histamine formation in tuna (*Thunnus albacares*) at 2 degrees C--effect of vacuum- and modified atmosphere-packaging on psychrotolerant bacteria, *Int J Food Microbiol*, 101(3), pp. 263-279.

Emborg, J., Laursen, B.G., Rathjen, T., Dalgaard, P. (2002) Microbial spoilage and formation of biogenic amines in fresh and thawed modified atmosphere-packed salmon (Salmo salar) at 2 degrees C, *J Appl Microbiol*, 92(4), pp. 790-799.

Ercolini, D., Russo, F., Nasi, A., Ferranti, P., Villani, F. (2009) Mesophilic and psychrotrophic bacteria from meat and their spoilage potential in vitro and in beef, *Appl Environ Microbiol*.

Fang, F., Li, Y., Bumann, M., Raftis, E.J., Casey, P.G., Cooney, J.C., Walsh, M.A., O'Toole, P.W. (2009) Allelic variation of bile salt hydrolase genes in *Lactobacillus salivarius* does not determine bile resistance levels, *J Bacteriol*, 191(18), pp. 5743-5757.

FDA (2005) Agency Response Letter GRAS Notice No. GRN 000159.

Feil, E.J., Li, B.C., Aanensen, D.M., Hanage, W.P., Spratt, B.G. (2004) eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data, *J Bacteriol*, 186(5), pp. 1518-1530.

Feurer, C., Ellouze, M. (2010) Utilisation raisonnée de la flore naturelle de viande de porc fraîche pour améliorer sa qualité sanitaire, *Bilan d'activité de l'IFIP-Institut du porc*, p. 125.

Foligne, B., Dessein, R., Marceau, M., Poiret, S., Chamaillard, M., Pot, B., Simonet, M., Daniel, C. (2007a) Prevention and treatment of colitis with *Lactococcus lactis* secreting the immunomodulatory *Yersinia* LcrV protein, *Gastroenterology*, 133(3), pp. 862-874.

Foligne, B., Deutsch, S.M., Breton, J., Cousin, F.J., Dewulf, J., Samson, M., Pot, B., Jan, G. (2010a) Promising immunomodulatory effects of selected strains of dairy propionibacteria as evidenced in vitro and in vivo, *Applied and Environmental Microbiology*
76(24), pp. 8259-8264.

Foligne, B., Dewulf, J., Breton, J., Claisse, O., Lonvaud-Funel, A., Pot, B. (2010b) Probiotic properties of non-conventional lactic acid bacteria: immunomodulation by *Oenococcus oeni*, *Int J Food Microbiol*, 140(2-3), pp. 136-145.

Foligne, B., Nutten, S., Grangette, C., Dennin, V., Goudercourt, D., Poiret, S., Dewulf, J., Brassart, D., Mercenier, A., Pot, B. (2007b) Correlation between in vitro and in vivo immunomodulatory properties of lactic acid bacteria, *World journal of gastroenterology*, 13(2), pp. 236-243.

Foschino, R., Nucera, D., Volponi, G., Picozzi, C., Ortoffi, M., Bottero, M.T. (2008) Comparison of *Lactococcus garvieae* strains isolated in northern Italy from dairy products and fishes through molecular typing, *J Appl Microbiol*, 105(3), pp. 652-662.

Franzetti, L., Scarpellini, M., Mora, D., Galli, A. (2003) Carnobacterium spp. in seafood packaged in modified atmosphere, *Annals of microbiology*, 53, pp. 189-198.

Franzmann, P.D., Hopfl, P., Weiss, N., Tindall, B.J. (1991) Psychrotrophic, lactic acid-producing bacteria from anoxic waters in Ace Lake, Antarctica; *Carnobacterium funditum* sp. nov. and *Carnobacterium alterfunditum* sp. nov, *Archives of Microbiology*, 156(4), pp. 255-262.

Fujisawa, T., Benno, Y., Yaeshima, T., Mitsuoka, T. (1992) Taxonomic study of the *Lactobacillus acidophilus* group, with recognition of *Lactobacillus gallinarum* sp. nov. and *Lactobacillus johnsonii* sp. nov. and synonymy of *Lactobacillus acidophilus* group A3 (Johnson et al. 1980) with the type strain of *Lactobacillus amylovorus* (Nakamura 1981), *International journal of systematic bacteriology*, 42(3), pp. 487-491.

Galkin, A., Kulakova, L., Ashida, H., Sawa, Y., Esaki, N. (1999) Cold-adapted alanine dehydrogenases from two antarctic bacterial strains: gene cloning, protein characterization, and comparison with mesophilic and thermophilic counterparts, *Appl Environ Microbiol*, 65(9), pp. 4014-4020.

Gleinser, M., Grimm, V., Zhurina, D., Yuan, J., Riedel, C.U. (2012) Improved adhesive properties of recombinant bifidobacteria expressing the *Bifidobacterium bifidum*-specific lipoprotein BopA, *Microb Cell Fact*, 11, p. 80.

Godoy, D., Randle, G., Simpson, A.J., Aanensen, D.M., Pitt, T.L., Kinoshita, R., Spratt, B.G. (2003) Multilocus sequence typing and evolutionary relationships among the causative agents of melioidosis and glanders, *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*, *J Clin Microbiol*, 41(5), pp. 2068-2079.

Goldin, B.R., Gorbach, S.L., Saxelin, M., Barakat, S., Gualtieri, L., Salminen, S. (1992) Survival of *Lactobacillus* species (strain GG) in human gastrointestinal tract, *Dig Dis Sci*, 37(1), pp. 121-128.

Gonzalez, C.J., Lopez-Diaz, T.M., Garcia-Lopez, M.L., Prieto, M., Otero, A. (1999) Bacterial microflora of wild brown trout (Salmo trutta), wild pike (Esox lucius), and aquacultured rainbow trout (Oncorhynchus mykiss), *J Food Prot*, 62(11), pp. 1270-1277.

Goossens, D., Jonkers, D., Russel, M., Thijs, A., van den Bogaard, A., Stobberingh, E., Stockbrugger, R. (2005) Survival of the probiotic, *L. plantarum* 299v and its effects on the faecal bacterial flora, with and without gastric acid inhibition, *Digestive and liver disease*, 37(1), pp. 44-50.

Gopal, P.K., Prasad, J., Smart, J., Gill, H.S. (2001) In vitro adherence properties of *Lactobacillus rhamnosus* DR20 and *Bifidobacterium lactis* DR10 strains and their antagonistic activity against an enterotoxigenic *Escherichia coli*, *Int J Food Microbiol*, 67(3), pp. 207-216.

Goris, J., Konstantinidis, K.T., Klappenbach, J.A., Coenye, T., Vandamme, P., Tiedje, J.M. (2007) DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities, *Int J Syst Evol Microbiol*, 57(Pt 1), pp. 81-91.

Grant, I.R., Patterson, M.F. (1991) A numerical taxonomic study of lactic acid bacteria isolated from irradiated pork and chicken packaged under various gas atmospheres, *Journal of applied bacteriology*, 70(4), pp. 302-307.

Grice, E.A., Kong, H.H., Conlan, S., Deming, C.B., Davis, J., Young, A.C., Bouffard, G.G., Blakesley, R.W., Murray, P.R., Green, E.D., Turner, M.L., Segre, J.A. (2009) Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome, *Science*, 324(5931), pp. 1190-1192.

Groudieva, T., Kambourova, M., Yusef, H., Royter, M., Grote, R., Trinks, H., Antranikian, G. (2004) Diversity and cold-active hydrolytic enzymes of culturable bacteria associated with Arctic sea ice, Spitzbergen, *Extremophiles*, 8(6), pp. 475-488.

Guldager, H.S., Boknaes, N., Osterberg, C., Nielsen, J., Dalgaard, P. (1998) Thawed cod fillets spoil less rapidly than unfrozen fillets when stored under modified atmosphere at 2 degrees C, *J Food Prot*, 61(9), pp. 1129-1136.

Hall, T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT, *Nucleic acids symposium series*, 41, pp. 95-98.

Hallet, B. (2001) Playing Dr Jekyll and Mr Hyde: combined mechanisms of phase variation in bacteria, *Curr Opin Microbiol*, 4(5), pp. 570-581.

Hammes, W.P., Hertel, C. (2006) In The prokaryotes(Eds, Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H. and Stackebrandt, E.) Springer-Verlag, pp. 320-403.

Hanage, W.P., Fraser, C., Spratt, B.G. (2006) Sequences, sequence clusters and bacterial species, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 361(1475), pp. 1917-1927.

Hantsis-Zacharov, E., Halpern, M. (2007) Culturable psychrotrophic bacterial communities in raw milk and their proteolytic and lipolytic traits, *Appl Environ Microbiol*, 73(22), pp. 7162-7168.

Hemmerich, C., Buechlein, A., Podicheti, R., Revanna, K.V., Dong, Q. (2010) An Ergatis-based prokaryotic genome annotation web server, *Bioinformatics*, 26(8), pp. 1122-1124.

Henderson, I.R., Owen, P., Nataro, J.P. (1999) Molecular switches--the ON and OFF of bacterial phase variation, *Mol Microbiol*, 33(5), pp. 919-932.

Hiu, S.F., Holt, R.A., Sriranganathan, N., Seidler, R.J., Fryer, J.L. (1984) *Lactobacillus piscicola*, a new species from salmonid fish, *International journal of systematic bacteriology*, 34(4), pp. 393-400.

Hoenigl, M., Grisold, A.J., Valentin, T., Leitner, E., Zarfel, G., Renner, H., Krause, R. (2010) Isolation of *Carnobacterium* sp. from a human blood culture, *J Med Microbiol*, 59(Pt 4), pp. 493-495.

Holmes, D.E., Nevin, K.P., Lovley, D.R. (2004) Comparison of 16S rRNA, *nifD*, *recA*, *gyrB*, *rpoB* and *fusA* genes within the family Geobacteraceae fam. nov, *Int J Syst Evol Microbiol*, 54(Pt 5), pp. 1591-1599.

Holzapfel, W.H. (1992) Culture media for non-sporulating gram-positive food spoilage bacteria, *Int J Food Microbiol*, 17(2), pp. 113-133.

Holzapfel, W.H., Gerber, E.S. (1983) *Lactobacillus divergens* sp. nov., a new heterofermentative *Lactobacillus* species producing L(-)-Lactate, *Syst Appl Microbiol*, 4, pp. 522-534.

Hunter, P.R., Gaston, M.A. (1988) Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity, *J Clin Microbiol*, 26(11), pp. 2465-2466.

Huson, D.H., Bryant, D. (2006) Application of phylogenetic networks in evolutionary studies, *Mol Biol Evol*, 23(2), pp. 254-267.

Jaffres, E., Sohier, D., Leroi, F., Pilet, M.F., Prevost, H., Joffraud, J.J., Dousset, X. (2009) Study of the bacterial ecosystem in tropical cooked and peeled shrimps using a polyphasic approach, *Int J Food Microbiol*, 131, pp. 20-29.

Jenkinson, H.F., Lamont, R.J. (1997) Streptococcal adhesion and colonization, *Critical reviews in oral biology and medicine*, 8(2), pp. 175-200.

Joffraud, J.J., Cardinal, M., Cornet, J., Chasles, J.S., Leon, S., Gigout, F., Leroi, F. (2006) Effect of bacterial interactions on the spoilage of cold-smoked salmon, *Int J Food Microbiol*, 112(1), pp. 51-61.

Joffraud, J.J., Leroi, F., Roy, C., Berdague, J.L. (2001) Characterisation of volatile compounds produced by bacteria isolated from the spoilage flora of cold-smoked salmon, *Int J Food Microbiol*, 66(3), pp. 175-184.

Jolley, K.A., Feil, E.J., Chan, M.S., Maiden, M.C. (2001) Sequence type analysis and recombinational tests (START), *Bioinformatics*, 17(12), pp. 1230-1231.

Jones, R.J. (2004) Observations on the succession dynamics of lactic acid bacteria populations in chill-stored vacuum-packaged beef, *Int J Food Microbiol*, 90(3), pp. 273-282.

Kabadjova, P., Dousset, X., Le Cam, V., Prevost, H. (2002) Differentiation of closely related *Carnobacterium* food isolates based on 16S-23S ribosomal DNA intergenic spacer region polymorphism, *Appl Environ Microbiol*, 68(11), pp. 5358-5366.

Kailasapathy, K., Chin, J. (2000) Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp, *Immunol Cell Biol*, 78(1), pp. 80-88.

Kang, H., Myung, E.J., Ahn, K.S., Eom, H.J., Han, N.S., Kim, Y.B., Kim, Y.J., Sohn, N.W. (2009a) Induction of Th1 cytokines by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* (KCTC 3100) under Th2-type conditions and the requirement of NF-kappaB and p38/JNK, *Cytokine*, 46(2), pp. 283-289.

Kang, H., Oh, Y.J., Ahn, K.S., Eom, H.J., Han, N., Kim, Y.B., Sohn, N.W. (2009b) *Leuconostoc citreum* HJ-P4 (KACC 91035) regulates immunoglobulin E in an ovalbumin-induced allergy model and induces interleukin-12 through nuclear factor-kappa B and p38/c-Jun N-terminal kinases signaling in macrophages, *Microbiol Immunol*, 53(6), pp. 331-339.

Kant, R., Blom, J., Palva, A., Siezen, R.J., de Vos, W.M. (2010) Comparative genomics of *Lactobacillus*, *Microb Biotechnol*, 4(3), pp. 323-332.

Katayama, T., Tanaka, M., Moriizumi, J., Nakamura, T., Brouchkov, A., Douglas, T.A., Fukuda, M., Tomita, F., Asano, K. (2007) Phylogenetic analysis of bacteria preserved in a permafrost ice wedge for 25,000 years, *Appl Environ Microbiol*, 73(7), pp. 2360-2363.

Kelly, W.J., Huang, C.M., Asmundson, R.V. (1993) Comparison of *Leuconostoc oenos* Strains by Pulsed-Field Gel Electrophoresis, *Appl Environ Microbiol*, 59(11), pp. 3969-3972.

Kim, D.H., Austin, B. (2006a) Cytokine expression in leucocytes and gut cells of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* Walbaum, induced by probiotics, *Vet Immunol Immunopathol*, 114(3-4), pp. 297-304.

Kim, D.H., Austin, B. (2006b) Innate immune responses in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss, Walbaum) induced by probiotics, *Fish and shellfish immunology*, 21(5), pp. 513-524.

Kleerebezem, M., Hols, P., Bernard, E., Rolain, T., Zhou, M., Siezen, R.J., Bron, P.A. (2010) The extracellular biology of the *lactobacilli*, *FEMS Microbiol Rev*, 34(2), pp. 199-230.

Klijn, N., Weerkamp, A.H., de Vos, W.M. (1995) Genetic marking of Lactococcus lactis shows its survival in the human gastrointestinal tract, *Appl Environ Microbiol*, 61(7), pp. 2771-2774.

Klingberg, T.D., Budde, B.B. (2006) The survival and persistence in the human gastrointestinal tract of five potential probiotic lactobacilli consumed as freeze-dried cultures or as probiotic sausage, *Int J Food Microbiol*, 109(1-2), pp. 157-159.

Kohler, G., Ludwig, W., Schleifer, K.H. (1991) Differentiation of lactococci by rRNA gene restriction analysis, *FEMS Microbiol Lett*, 68(3), pp. 307-312.

Kong, H.H., Oh, J., Deming, C., Conlan, S., Grice, E.A., Beatson, M.A., Nomicos, E., Polley, E.C., Komarow, H.D., Murray, P.R., Turner, M.L., Segre, J.A. (2012) Temporal shifts in the skin microbiome associated with disease flares and treatment in children with atopic dermatitis, *Genome Res*, 22(5), pp. 850-859.

Lakshmanan, R., Dalgaard, P. (2004) Effects of high-pressure processing on *Listeria monocytogenes*, spoilage microflora and multiple compound quality indices in chilled cold-smoked salmon, *J Appl Microbiol*, 96(2), pp. 398-408.

Lambert, J.M., Bongers, R.S., de Vos, W.M., Kleerebezem, M. (2008) Functional analysis of four bile salt hydrolase and penicillin acylase family members in *Lactobacillus plantarum* WCFS1, *Appl Environ Microbiol*, 74(15), pp. 4719-4726.

Lauro, F.M., Chastain, R.A., Blankenship, L.E., Yayanos, A.A., Bartlett, D.H. (2007) Theunique 16S rRNA genes of piezophiles reflect both phylogeny and adaptation, *Appl Environ Microbiol*, 73(3), pp. 838-845.

Laursen, B.G., Bay, L., Cleenwerck, I., Vancanneyt, M., Swings, J., Dalgaard, P., Leisner, J.J. (2005) *Carnobacterium divergens* and *Carnobacterium maltaromaticum* as spoilers or protective cultures in meat and seafood: phenotypic and genotypic characterization, *Syst Appl Microbiol*, 28(2), pp. 151-164.

Laursen, B.G., Leisner, J.J., Dalgaard, P. (2006) *Carnobacterium* species: Effect of Metabolic Activity and Interaction with *Brochothrix thermosphacta* on Sensory Characteristics of Modified Atmopshere Packed Shrimp, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, pp. 3604-3611.

Lazzi, C., Bove, C.G., Sgarbi, E., Gatti, M., La Gioia, F., Torriani, S., Neviani, E. (2009) Application of AFLP fingerprint analysis for studying the biodiversity of *Streptococcus thermophilus*, *J Microbiol Methods*, 79(1), pp. 48-54.

Lebeer, S., Vanderleyden, J., De Keersmaecker, S.C. (2008) Genes and molecules of *lactobacilli* supporting probiotic action, *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 72(4), pp. 728-764, Table of Contents.

Lebeer, S., Vanderleyden, J., De Keersmaecker, S.C. (2010) Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens, *Nature reviews Microbiology*, 8(3), pp. 171-184.

Leblond, P., Fischer, G., Francou, F.X., Berger, F., Guerineau, M., Decaris, B. (1996) The unstable region of Streptomyces ambofaciens includes 210 kb terminal inverted repeats flanking the extremities of the linear chromosomal DNA, *Mol Microbiol*, 19(2), pp. 261-271.

Leisner, J.J., Hansen, M.A., Larsen, M.H., Hansen, L., Ingmer, H., Sorensen, S.J. (2012) The genome sequence of the lactic acid bacterium, *Carnobacterium maltaromaticum* ATCC 35586 encodes potential virulence factors, *Int J Food Microbiol*, 152(3), pp. 107-115.

Leisner, J.J., Laursen, B.G., Prevost, H., Drider, D., Dalgaard, P. (2007) *Carnobacterium:* positive and negative effects in the environment and in foods, *FEMS Microbiol Rev*, 31(5), pp. 592-613.

Lemey, P., Salemi, M., Vandamme, A.M. (2009) The phylogenetic handbook, Cambridge University Press, p. 723.

Leroi, F., Arbey, N., Joffraud, J.J., Chevalier, F. (1996) Effect of inoculation with lactic acid bacteria on extending the shelf-life of vacuum-packed cold smoked salmon, *International Journal of Food Science and Technology*, 31(6), pp. 497-504.

Leroi, F., Joffraud, J.J., Chevalier, F., Cardinal, M. (1998) Study of the microbial ecology of cold-smoked salmon during storage at 8 degrees C, *Int J Food Microbiol*, 39(1-2), pp. 111-121.

Lesuffleur, T., Barbat, A., Dussaulx, E., Zweibaum, A. (1990) Growth adaptation to methotrexate of HT-29 human colon carcinoma cells is associated with their ability to differentiate into columnar absorptive and mucus-secreting cells, *Cancer Res*, 50(19), pp. 6334-6343.

Ley, R.E., Hamady, M., Lozupone, C., Turnbaugh, P.J., Ramey, R.R., Bircher, J.S., Schlegel, M.L., Tucker, T.A., Schrenzel, M.D., Knight, R., Gordon, J.I. (2008) Evolution of mammals and their gut microbes, *Science*, 320(5883), pp. 1647-1651.

Li, E., Hamm, C.M., Gulati, A.S., Sartor, R.B., Chen, H., Wu, X., Zhang, T., Rohlf, F.J., Zhu, W., Gu, C., Robertson, C.E., Pace, N.R., Boedeker, E.C., Harpaz, N., Yuan, J., Weinstock,

G.M., Sodergren, E., Frank, D.N. (2012) Inflammatory bowel diseases phenotype, *C. difficile* and NOD2 genotype are associated with shifts in human ileum associated microbial composition, *PLoS One*, 7(6), p. e26284.

Li, Z.Y., Liu, Y. (2006) Marine sponge *Craniella austrialiensis*-associated bacterial diversity revelation based on 16S rDNA library and biologically active Actinomycetes screening, phylogenetic analysis, *Lett Appl Microbiol*, 43(4), pp. 410-416.

Librado, P., Rozas, J. (2009) DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data, *Bioinformatics*, 25(11), pp. 1451-1452.

Lick, S., Drescher, K., Heller, K.J. (2001) Survival of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* in the terminal ileum of fistulated Gottingen minipigs, *Appl Environ Microbiol*, 67(9), pp. 4137-4143.

Liu, M., Nauta, A., Francke, C., Siezen, R.J. (2008) Comparative genomics of enzymes in flavor-forming pathways from amino acids in lactic acid bacteria, *Appl Environ Microbiol*, 74(15), pp. 4590-4600.

Loch, T.P., Kumar, R., Xu, W., Faisal, M. (2011) *Carnobacterium maltaromaticum* infections in feral *Oncorhynchus* spp. (Family Salmonidae) in Michigan, *Journal of microbiology*, 49(5), pp. 703-713.

Loch, T.P., Xu, W., Fitzgerald, S.M., Faisal, M. (2008) Isolation of a *Carnobacterium maltaromaticum*- like bacterium from systemically infected lake whitefish (Coregonus clupeaformis), *FEMS Microbiol Lett*, 288(1), pp. 76-84.

Maiden, M.C., Bygraves, J.A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J.E., Urwin, R., Zhang, Q., Zhou, J., Zurth, K., Caugant, D.A., Feavers, I.M., Achtman, M., Spratt, B.G. (1998) Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(6), pp. 3140-3145.

Maragkoudakis, P.A., Papadelli, M., Georgalaki, M., Panayotopoulou, E.G., Martinez-Gonzalez, B., Mentis, A.F., Petraki, K., Sgouras, D.N., Tsakalidou, E. (2009) *In vitro* and *in vivo* safety evaluation of the bacteriocin producer *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198, *Int J Food Microbiol*, 133(1-2), pp. 141-147.

Martino, M.E., Maifreni, M., Marino, M., Bartolomeoli, I., Carraro, L., Fasolato, L., Cardazzo, B. Genotypic and phenotypic diversity of *Pediococcus pentosaceus* strains isolated from food matrices and characterisation of the penocin operon, *Antonie Van Leeuwenhoek*, 103(5), pp. 1149-1163.

Marzorati, M., Wittebolle, L., Boon, N., Daffonchio, D., Verstraete, W. (2008) How to get more out of molecular fingerprints: practical tools for microbial ecology, *Environ Microbiol*, 10(6), pp. 1571-1581.

Masuda, S., Yamaguchi, H., Kurokawa, T., Shirakami, T., Tsuji, R.F., Nishimura, I. (2008) Immunomodulatory effect of halophilic lactic acid bacterium *Tetragenococcus halophilus* Th221 from soy sauce moromi grown in high-salt medium, *Int J Food Microbiol*, 121(3), pp. 245-252.

Mathieu, F., Michel, M., Lebrihi, A., Lefebvre, G. (1994) Effect of the bacteriocin carnocin CP5 and of the producing strain *Carnobacterium piscicola* CP5 on the viability of *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 in salt solution, broth and skimmed milk, at various incubation temperatures, *Int J Food Microbiol*, 22(2-3), pp. 155-172.

Mathieu, F., Michel, M., Lefebvre, G. (1993) Properties of a bacteriocin produced by *Carnobacterium piscicola* CP5, *Biotechnology Letters*, 6, pp. 587-590.

Mauguin, S., Novel, G. (1994) Characterization of lactic acid bacteria isolated from seafood, *Journal of applied bacteriology*, 76(6), pp. 616-625.

McMullen, L.M., Stiles, M.E. (1993) Microbial ecology of fresh pork stored under modified atmosphere at -1, 4.4 and 10 degrees C, *Int J Food Microbiol*, 18(1), pp. 1-14.

McMullen, L.M., Stiles, M.E. (1994) Quality of fresh retail pork cuts stored in modified atmosphere under temperature conditions simulating export to distant markets, *Meat Sciences*, 38(1), pp. 163-177.

Mejlholm, O., Boknaes, N., Dalgaard, P. (2005) Shelf life and safety aspects of chilled cooked and peeled shrimps (Pandalus borealis) in modified atmosphere packaging, *J Appl Microbiol*, 99(1), pp. 66-76.

Mejlholm, O., Kjeldgaard, J., Modberg, A., Vest, M.B., Boknaes, N., Koort, J., Bjorkroth, J., Dalgaard, P. (2008) Microbial changes and growth of *Listeria monocytogenes* during chilled storage of brined shrimp (Pandalus borealis), *Int J Food Microbiol*, 124(3), pp. 250-259.

Menard, S., Candalh, C., Bambou, J.C., Terpend, K., Cerf-Bensussan, N., Heyman, M. (2004) Lactic acid bacteria secrete metabolites retaining anti-inflammatory properties after intestinal transport, *Gut*, 53(6), pp. 821-828.

Michel, C., Faivre, B., Kerouault, B. (1986) Biochemical identification of *Lactobacillus piscicola* strains from France and Belgium, *Diseases of aquatic organisms*, 2, pp. 27-30.

Miller, A., Morgan, M.E., Libbey, L.M. (1974) *Lactobacillus maltaromicus*, a new species producing a malty aroma, *International journal of systematic bacteriology*, 24(3), pp. 346-354.

Millière, J.B., Lefebvre, G. (1994) *Carnobacterium piscicola*, a common species of French soft cheeses from cow's raw milk, *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 48, pp. 19-30.

Millière, J.B., Michel, M., Mathieu, F., Lefebvre, G. (1994) Presence of *Carnobacterium* spp. in French surface mould-ripened soft-cheese, *Journal of applied bacteriology*, 76, pp. 264-269.

Mora, D., Scarpellini, M., Franzetti, L., Colombo, S., Galli, A. (2003) Reclassification of *Lactobacillus maltaromicus* (Miller et al. 1974) DSM 20342(T) and DSM 20344 and *Carnobacterium piscicola* (Collins et al. 1987) DSM 20730(T) and DSM 20722 as *Carnobacterium maltaromaticum* comb. nov, *Int J Syst Evol Microbiol*, 53(Pt 3), pp. 675-678.

Morea, M., Baruzzi, F., Cocconcelli, P.S. (1999) Molecular and physiological characterization of dominant bacterial populations in traditional mozzarella cheese processing, *J Appl Microbiol*, 87(4), pp. 574-582.

Mrazek, J., Gaynon, L.H., Karlin, S. (2002) Frequent oligonucleotide motifs in genomes of three streptococci, *Nucleic Acids Res*, 30(19), pp. 4216-4221.

Navarre, W.W., Schneewind, O. (1999) Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(1), pp. 174-229.

Neuhaus, F.C., Baddiley, J. (2003) A continuum of anionic charge: structures and functions of D-alanyl-teichoic acids in gram-positive bacteria, *icrobiology and molecular biology reviews* 67(4), pp. 686-723.

Newberry, C.J., Webster, G., Cragg, B.A., Parkes, R.J., Weightman, A.J., Fry, J.C. (2004) Diversity of prokaryotes and methanogenesis in deep subsurface sediments from the Nankai Trough, Ocean Drilling Program Leg 190, *Environ Microbiol*, 6(3), pp. 274-287.

Nicholson, W.L., Krivushin, K., Gilichinsky, D., Schuerger, A.C. (2013) Growth of Carnobacterium spp. from permafrost under low pressure, temperature, and anoxic atmosphere has implications for Earth microbes on Mars, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(2), pp. 666-671.

Nilsson, L., Ng, Y.Y., Christiansen, J.N., Jorgensen, B.L., Grotinum, D., Gram, L. (2004) The contribution of bacteriocin to inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Carnobacterium piscicola* strains in cold-smoked salmon systems, *J Appl Microbiol*, 96(1), pp. 133-143.

Ntougias, S., Zervakis, G.I., Kavroulakis, N., Ehaliotis, C., Papadopoulou, K.K. (2004) Bacterial diversity in spent mushroom compost assessed by amplified rDNA restriction analysis and sequencing of cultivated isolates, *Syst Appl Microbiol*, 27(6), pp. 746-754.

O'Sullivan, O., O'Callaghan, J., Sangrador-Vegas, A., McAuliffe, O., Slattery, L., Kaleta, P., Callanan, M., Fitzgerald, G.F., Ross, R.P., Beresford, T. (2009) Comparative genomics of lactic acid bacteria reveals a niche-specific gene set, *BMC Microbiol*, 9, p. 50.

Ogier, J.C., Son, O., Gruss, A., Tailliez, P., Delacroix-Buchet, A. (2002) Identification of the bacterial microflora in dairy products by temporal temperature gradient gel electrophoresis, *Appl Environ Microbiol*, 68(8), pp. 3691-3701.

Ohland, C.L., Macnaughton, W.K. (2010) Probiotic bacteria and intestinal epithelial barrier function, *American journal of physiology gastrointestinal and liver physiology*, 298(6), pp. G807-819.

Oozeer, R., Goupil-Feuillerat, N., Alpert, C.A., van de Guchte, M., Anba, J., Mengaud, J., Corthier, G. (2002) *Lactobacillus casei* is able to survive and initiate protein synthesis during its transit in the digestive tract of human flora-associated mice, *Appl Environ Microbiol*, 68(7), pp. 3570-3574.

Paarup, T., Sanchez, J.A., Pelaez, C., Moral, A. (2002) Sensory, chemical and bacteriological changes in vacuum-packed pressurised squid mantle (Todaropsis eblanae) stored at 4 degrees C, *Int J Food Microbiol*, 74(1-2), pp. 1-12.

Paludan-Muller, C., Dalgaard, P., Huss, H.H., Gram, L. (1998) Evaluation of the role of *Carnobacterium piscicola* in spoilage of vacuum- and modified-atmosphere-packed cold-smoked salmon stored at 5 degrees C, *Int J Food Microbiol*, 39(3), pp. 155-166.

Palumbo, E., Deghorain, M., Cocconcelli, P.S., Kleerebezem, M., Geyer, A., Hartung, T., Morath, S., Hols, P. (2006) D-alanyl ester depletion of teichoic acids in *Lactobacillus plantarum* results in a major modification of lipoteichoic acid composition and cell wall perforations at the septum mediated by the Acm2 autolysin, *J Bacteriol*, 188(10), pp. 3709-3715.

Parolo, C.C., Do, T., Henssge, U., Alves, L.S., de Santana Giongo, F.C., Corcao, G., Maltz, M., Beighton, D. (2011) Genetic diversity of *Lactobacillus paracasei* isolated from in situ human oral biofilms, *J Appl Microbiol*, 111(1), pp. 105-113.

Passerini, D., Beltramo, C., Coddeville, M., Quentin, Y., Ritzenthaler, P., Daveran-Mingot, M.L., Le Bourgeois, P. (2010) Genes but not genomes reveal bacterial domestication of *Lactococcus lactis*, *PLoS One*, 5(12), p. e15306.

Peschel, A., Jack, R.W., Otto, M., Collins, L.V., Staubitz, P., Nicholson, G., Kalbacher, H., Nieuwenhuizen, W.F., Jung, G., Tarkowski, A., van Kessel, K.P., van Strijp, J.A. (2001) *Staphylococcus aureus* resistance to human defensins and evasion of neutrophil killing via the novel virulence factor MprF is based on modification of membrane lipids with l-lysine, *J Exp Med*, 193(9), pp. 1067-1076.

Peschel, A., Otto, M., Jack, R.W., Kalbacher, H., Jung, G., Gotz, F. (1999) Inactivation of the dlt operon in *Staphylococcus aureus* confers sensitivity to defensins, protegrins, and other antimicrobial peptides, *J Biol Chem*, 274(13), pp. 8405-8410.

Pfeiler, E.A., Azcarate-Peril, M.A., Klaenhammer, T.R. (2007) Characterization of a novel bile-inducible operon encoding a two-component regulatory system in *Lactobacillus acidophilus*, *J Bacteriol*, 189(13), pp. 4624-4634.

Picozzi, C., Bonacina, G., Vigentini, I., Foschino, R. (2010) Genetic diversity in Italian *Lactobacillus sanfranciscensis* strains assessed by multilocus sequence typing and pulsed-field gel electrophoresis analyses, *Microbiology*, 156(Pt 7), pp. 2035-2045.

Pikuta, E.V., Marsic, D., Bej, A., Tang, J., Krader, P., Hoover, R.B. (2005) *Carnobacterium pleistocenium* sp. nov., a novel psychrotolerant, facultative anaerobe isolated from permafrost of the Fox Tunnel in Alaska, *Int J Syst Evol Microbiol*, 55(Pt 1), pp. 473-478.

Preising, J., Philippe, D., Gleinser, M., Wei, H., Blum, S., Eikmanns, B.J., Niess, J.H., Riedel, C.U. (2010) Selection of bifidobacteria based on adhesion and anti-inflammatory capacity in vitro for amelioration of murine colitis, *Appl Environ Microbiol*, 76(9), pp. 3048-3051.

Quadri, L.E., Sailer, M., Roy, K.L., Vederas, J.C., Stiles, M.E. (1994) Chemical and genetic characterization of bacteriocins produced by *Carnobacterium piscicola* LV17B, *Journal of Biological Chemistry*, 269(16), pp. 12204-12211.

Quenee, P., Lepage, E., Kim, W.S., Vergnaud, G., Gruss, A. (2005) Minisatellite polymorphism as a tool to distinguish closely related *Lactococcus lactis* strains, *FEMS Microbiol Lett*, 248(1), pp. 101-109.

Rachman, C., Kabadjova, P., Valcheva, R., Prevost, H., Dousset, X. (2004) Identification of *Carnobacterium* species by restriction fragment length polymorphism of the 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region and species-specific PCR, *Appl Environ Microbiol*, 70(8), pp. 4468-4477.

Rademaker, J.L., Herbet, H., Starrenburg, M.J., Naser, S.M., Gevers, D., Kelly, W.J., Hugenholtz, J., Swings, J., van Hylckama Vlieg, J.E. (2007) Diversity analysis of dairy and nondairy *Lactococcus lactis* isolates, using a novel multilocus sequence analysis scheme and (GTG)5-PCR fingerprinting, *Appl Environ Microbiol*, 73(22), pp. 7128-7137.

Raftis, E.J., Salvetti, E., Torriani, S., Felis, G.E., O'Toole, P.W. (2011) Genomic diversity of *Lactobacillus salivarius*, *Appl Environ Microbiol*, 77(3), pp. 954-965.

Rahman, A., Gleinser, M., Lanhers, M.C., Riedel, C.U., Foligne, B., Hanse, M., Yen, F.T., Klouj, A., Afzal, M.I., Back, A., Mangavel, C., Cailliez-Grimal, C., Revol-Junelles, A.M., Borges, F. (2014) Adaptation of the lactic acid bacterium *Carnobacterium maltaromaticum* LMA 28 to the mammalian gastrointestinal tract: from survival in mice to interaction with human cells *International dairy journal*, 34, pp. 93-99

Richard, C., Brillet, A., Pilet, M.F., Prevost, H., Drider, D. (2003) Evidence on inhibition of *Listeria monocytogenes* by divercin V41 action, *Lett Appl Microbiol*, 36(5), pp. 288-292.

Richard, C., Drider, D., Elmorjani, K., Marion, D., Prevost, H. (2004) Heterologous expression and purification of active divercin V41, a class IIa bacteriocin encoded by a synthetic gene in *Escherichia coli*, *J Bacteriol*, 186(13), pp. 4276-4284.

Robinson, D.A., Falush, D., Feil, E.J. (2010) Bacterial population genetics in infectious disease, John Wiley and sons, Inc., p. 420.

Roger, L.C., Costabile, A., Holland, D.T., Hoyles, L., McCartney, A.L. (2010) Examination of faecal *Bifidobacterium* populations in breast- and formula-fed infants during the first 18 months of life, *Microbiology*, 156(Pt 11), pp. 3329-3341.

Romero, D., Martinez-Salazar, J., Ortiz, E., Rodriguez, C., Valencia-Morales, E. (1999) Repeated sequences in bacterial chromosomes and plasmids: a glimpse from sequenced genomes, *Res Microbiol*, 150(9-10), pp. 735-743.

Rudi, K., Maugesten, T., Hannevik, S.E., Nissen, H. (2004) Explorative multivariate analyses of 16S rRNA gene data from microbial communities in modified-atmosphere-packed salmon and coalfish, *Appl Environ Microbiol*, 70(8), pp. 5010-5018.

Ruiz-Garbajosa, P., Bonten, M.J., Robinson, D.A., Top, J., Nallapareddy, S.R., Torres, C., Coque, T.M., Canton, R., Baquero, F., Murray, B.E., del Campo, R., Willems, R.J. (2006) Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecalis* reveals hospital-adapted genetic complexes in a background of high rates of recombination, *J Clin Microbiol*, 44(6), pp. 2220-2228.

Sakala, R.M., Hayashidani, H., Kato, Y., Hirata, T., Makino, Y., Fukushima, A., Yamada, T., Kaneuchi, C., Ogawa, M. (2002) Change in the composition of the microflora on vacuum-packaged beef during chiller storage, *Int J Food Microbiol*, 74(1-2), pp. 87-99.

Sanchez, I., Sesena, S., Palop, L.L. (2004) Polyphasic study of the genetic diversity of lactobacilli associated with 'Almagro' eggplants spontaneous fermentation, based on combined numerical analysis of randomly amplified polymorphic DNA and pulsed-field gel electrophoresis patterns, *J Appl Microbiol*, 97(2), pp. 446-458.

Scarpellini, M., Mora, D., Colombo, S., Franzetti, L. (2002) Development of genus/species-specific PCR analysis for identification of *Carnobacterium* strains, *Current Microbiology*, 45(1), pp. 24-29.

Schaffer, P.A., Lifland, B., Van Sommeran, S., Casper, D.R., Davis, C.R. (2013) Meningoencephalitis associated with *Carnobacterium maltaromaticum*-like bacteria in stranded juvenile salmon sharks (Lamna ditropis), *Vet Pathol*, 50(3), pp. 412-417.

Schirmer, B.C., Heiberg, R., Eie, T., Moretro, T., Maugesten, T., Carlehog, M., Langsrud, S. (2009) A novel packaging method with a dissolving CO(2) headspace combined with organic acids prolongs the shelf life of fresh salmon, *Int J Food Microbiol*, 133(1-2), pp. 154-160.

Schmidt, M., Prieme, A., Stougaard, P. (2006) Bacterial diversity in permanently cold and alkaline ikaite columns from Greenland, *Extremophiles*, 10(6), pp. 551-562.

Schobitz, R., Suazo, V., Costa, M., Ciampi, L. (2003) Effects of a bacteriocin-like inhibitory substance from *Carnobacterium piscicola* against human and salmon isolates of *Listeria monocytogenes*, *Int J Food Microbiol*, 84(2), pp. 237-244.

Serhan, M., Cailliez-Grimal, C., Borges, F., Revol-Junelles, A.M., Hosri, C., Fanni, J. (2009) Bacterial diversity of Darfiyeh, a Lebanese artisanal raw goat's milk cheese, *Food Microbiol*.

Shaw, B.G., Harding, C.D. (1984) A numerical taxonomic study of lactic acid bacteria from vacuum-packed beef, pork, lamb and bacon, *Journal of applied bacteriology*, 56(1), pp. 25-40.

Shaw, B.G., Harding, C.D. (1985) Atypical Lactobacilli from vacuum-packeaged meats: comparison by DNA hybridization, cell composition and biochemical test with a description of *Lactobacillus carnis* sp. nov., *Syst Appl Microbiol*, 6, pp. 291-297.

Simpson, J.M., Santo Domingo, J.W., Reasoner, D.J. (2004) Assessment of equine fecal contamination: the search for alternative bacterial source-tracking targets, *FEMS Microbiol Ecol*, 47(1), pp. 65-75.

Simpson, P.J., Stanton, C., Fitzgerald, G.F., Ross, R.P. (2002) Genomic diversity within the genus *Pediococcus* as revealed by randomly amplified polymorphic DNA PCR and pulsed-field gel electrophoresis, *Appl Environ Microbiol*, 68(2), pp. 765-771.

Sisto, A., De Bellis, P., Visconti, A., Morelli, L., Lavermicocca, P. (2009) Development of a PCR assay for the strain-specific identification of probiotic strain *Lactobacillus paracasei* IMPC2.1, *Int J Food Microbiol*, 136(1), pp. 59-65.

Spratt, B.G., Hanage, W.P., Li, B., Aanensen, D.M., Feil, E.J. (2004) Displaying the relatedness among isolates of bacterial species -- the eBURST approach, *FEMS Microbiol Lett*, 241(2), pp. 129-134.

Stackebrandt, E., Frederiksen, W., Garrity, G.M., Grimont, P.A., Kampfer, P., Maiden, M.C., Nesme, X., Rossello-Mora, R., Swings, J., Truper, H.G., Vauterin, L., Ward, A.C., Whitman, W.B. (2002) Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology, *Int J Syst Evol Microbiol*, 52(Pt 3), pp. 1043-1047.

Starliper, C.E., Shotts, E.B., Brown, J. (1992) Isolation of *Carnobacterium piscicola* and an unidentified Gram-positive bacillus from sexually mature and post-spawning rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, *Diseases of aquatic organisms*, 13, pp. 181-187.

Stohr, V., Joffraud, J.J., Cardinal, M., Leroi, F. (2001) Spoilage potential and sensory profile associated with bacteria isolated from cold-smoked salmon, *Food research international*, 34, pp. 797-806.

Tahiri, I., Desbiens, M., Benech, R., Kheadr, E., Lacroix, C., Thibault, S., Ouellet, D., Fliss, I. (2004) Purification, characterization and amino acid sequencing of divergicin M35: a novel class IIa bacteriocin produced by *Carnobacterium divergens* M35, *Int J Food Microbiol*, 97(2), pp. 123-136.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods, *Mol Biol Evol*, 28(10), pp. 2731-2739.

Tanigawa, K., Watanabe, K. (2011) Multilocus sequence typing reveals a novel subspeciation of *Lactobacillus delbrueckii*, *Microbiology*, 157(Pt 3), pp. 727-738.

Telford, J.L., Barocchi, M.A., Margarit, I., Rappuoli, R., Grandi, G. (2006) Pili in gram-positive pathogens, *Nature reviews microbiology*, 4(7), pp. 509-519.

Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Goering, R.V., Mickelsen, P.A., Murray, B.E., Persing, D.H., Swaminathan, B. (1995) Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing, *J Clin Microbiol*, 33(9), pp. 2233-2239.

Toffin, L., Webster, G., Weightman, A.J., Fry, J.C., Prieur, D. (2004) Molecular monitoring of culturable bacteria from deep-sea sediment of the Nankai Trough, Leg 190 Ocean Drilling Program, *FEMS Microbiol Ecol*, 48(3), pp. 357-367.

Toranzo, A.E., Romalde, J.L., Nuñez, S., Figueras, A., Barja, J.L. (1993) An epizootic in farmed, market-size rainbow trout in Spain caused by a strain of *Carnobacterium piscicola* of unusual virulence, *Diseases of aquatic organisms*, 17, pp. 87-99.

Tynkkynen, S., Satokari, R., Saarela, M., Mattila-Sandholm, T., Saxelin, M. (1999) Comparison of ribotyping, randomly amplified polymorphic DNA analysis, and pulsed-field gel electrophoresis in typing of *Lactobacillus rhamnosus* and *L. casei* strains, *Appl Environ Microbiol*, 65(9), pp. 3908-3914.

Urwin, R., Maiden, M.C. (2003) Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology, *Trends Microbiol*, 11(10), pp. 479-487.

Van Belkum, A., Riewarts Eriksen, N.H., Sijmons, M., Van Leeuwen, W., Van den Bergh, M., Kluytmans, J., Espersen, F., Verbrugh, H. (1997a) Coagulase and protein A polymorphisms do not contribute to persistence of nasal colonisation by *Staphylococcus aureus*, *J Med Microbiol*, 46(3), pp. 222-232.

van Belkum, A., Scherer, S., van Leeuwen, W., Willemse, D., van Alphen, L., Verbrugh, H. (1997b) Variable number of tandem repeats in clinical strains of *Haemophilus influenzae*, *Infect Immun*, 65(12), pp. 5017-5027.

van Kranenburg, R., Marugg, J.D., van, S., II, Willem, N.J., de Vos, W.M. (1997) Molecular characterization of the plasmid-encoded eps gene cluster essential for exopolysaccharide biosynthesis in *Lactococcus lactis*, *Mol Microbiol*, 24(2), pp. 387-397.

Veiga, P., Erkelenz, M., Bernard, E., Courtin, P., Kulakauskas, S., Chapot-Chartier, M.P. (2009) Identification of the asparagine synthase responsible for D-Asp amidation in the *Lactococcus lactis* peptidoglycan interpeptide crossbridge, *J Bacteriol*, 191(11), pp. 3752-3757.

Velez, M.P., De Keersmaecker, S.C., Vanderleyden, J. (2007) Adherence factors of *Lactobacillus* in the human gastrointestinal tract, *FEMS Microbiol Lett*, 276(2), pp. 140-148.

Ventura, M., Zink, R. (2002) Specific identification and molecular typing analysis of *Lactobacillus johnsonii* by using PCR-based methods and pulsed-field gel electrophoresis, *FEMS Microbiol Lett*, 217(2), pp. 141-154.

Vihavainen, E., Lundstrom, H.S., Susiluoto, T., Koort, J., Paulin, L., Auvinen, P., Bjorkroth, K.J. (2007) Role of broiler carcasses and processing plant air in contamination of modified-atmosphere-packaged broiler products with psychrotrophic lactic acid bacteria, *Appl Environ Microbiol*, 73(4), pp. 1136-1145.

Vimont, S., Mnif, B., Fevre, C., Brisse, S. (2008) Comparison of PFGE and multilocus sequence typing for analysis of *Klebsiella pneumoniae* isolates, *J Med Microbiol*, 57(Pt 10), pp. 1308-1310.

Voget, S., Klippel, B., Daniel, R., Antranikian, G. (2011) Complete genome sequence of *Carnobacterium* sp. 17-4, *J Bacteriol*, 193(13), pp. 3403-3404.

Vollmer, W. (2008a) Structural variation in the glycan strands of bacterial peptidoglycan, *FEMS Microbiol Rev*, 32(2), pp. 287-306.

Vollmer, W. (2008b) Structural variation in the glycan strands of bacterial peptidoglycan, *FEMS Microbiol Rev*, 32(2), pp. 287-306.

Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., et al. (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting, *Nucleic Acids Res*, 23(21), pp. 4407-4414.

Walker, V.K., Palmer, G.R., Voordouw, G. (2006) Freeze-thaw tolerance and clues to the winter survival of a soil community, *Appl Environ Microbiol*, 72(3), pp. 1784-1792.

Wall, T., Bath, K., Britton, R.A., Jonsson, H., Versalovic, J., Roos, S. (2007) The early response to acid shock in *Lactobacillus reuteri* involves the ClpL chaperone and a putative cell wall-altering esterase, *Appl Environ Microbiol*, 73(12), pp. 3924-3935.

Wallbanks, S., Martinez-Murcia, A.J., Fryer, J.L., Phillips, B.A., Collins, M.D. (1990) 16S rRNA sequence determination for members of the genus *Carnobacterium* and related lactic acid bacteria and description of *Vagococcus salmoninarum* sp. nov, *International journal of systematic bacteriology*, 40(3), pp. 224-230.

Walter, J., Loach, D.M., Alqumber, M., Rockel, C., Hermann, C., Pfitzenmaier, M., Tannock, G.W. (2007) D-alanyl ester depletion of teichoic acids in Lactobacillus reuteri 100-23 results in impaired colonization of the mouse gastrointestinal tract, *Environ Microbiol*, 9(7), pp. 1750-1760.

Wan, J., Harmark, K., Davidson, B.E., Hillier, A.J., Gordon, J.B., Wilcock, A., Hickey, M.W., Coventry, M.J. (1997) Inhibition of *Listeria monocytogenes* by piscicolin 126 in milk and Camembert cheese manufactured with a thermophilic starter, *J Appl Microbiol*, 82(3), pp. 273-280.

Wasney, M.A., Holley, R.A., Jayas, D.S. (2001) Cresol red thallium acetate sucrose inulin (CTSI) agar for the selective recovery of *Carnobacterium* spp, *Int J Food Microbiol*, 64(1-2), pp. 167-174.

Wayne, L.G., Brenner, D.J., Colwell, R.R., Grimont, P.A.D., Kandler, O., Krichevski, M.I., Moore, L.H., Moore, W.E.C., Murray, R.G.E., Stackebrandt, E., Starr, M.P., Trüper, H.G. (1987) Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics, *International journal of systematic bacteriology*, 37(4), pp. 463-464.

Wenner, T., Roth, V., Fischer, G., Fourrier, C., Aigle, B., Decaris, B., Leblond, P. (2003) End-to-end fusion of linear deleted chromosomes initiates a cycle of genome instability in *Streptomyces ambofaciens*, *Mol Microbiol*, 50(2), pp. 411-425.

Xu, J., Yang, H., Lai, X., Fu, X., Wu, J., Huang, L., Yu, X., Wu, Y., Wu, Y., Liu, B. (1997) Etiological study for a case of multi-bacterial synergistic gangrene, *Chinese science bulletin*.

Yamazaki, K., Suzuki, M., Kawai, Y., Inoue, N., Montville, T.J. (2003) Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cold-smoked salmon by *Carnobacterium piscicola* CS526 isolated from frozen surimi, *J Food Prot*, 66(8), pp. 1420-1425.

Yamazaki, K., Suzuki, M., Kawai, Y., Inoue, N., Montville, T.J. (2005) Purification and characterization of a novel class IIa bacteriocin, piscicocin CS526, from surimi-associated *Carnobacterium piscicola* CS526, *Appl Environ Microbiol*, 71(1), pp. 554-557.

Yost, C.K., Nattress, F.M. (2000) The use of multiplex PCR reactions to characterize populations of lactic acid bacteria associated with meat spoilage, *Lett Appl Microbiol*, 31(2), pp. 129-133.

Zilber-Rosenberg, I., Rosenberg, E. (2008) Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: the hologenome theory of evolution, *FEMS Microbiol Rev*, 32(5), pp. 723-735.

Zoumpopoulou, G., Foligne, B., Christodoulou, K., Grangette, C., Pot, B., Tsakalidou, E. (2008) *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 displays probiotic potential in vitro and protects against trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)-induced colitis and *Salmonella* infection in murine models, *Int J Food Microbiol*, 121(1), pp. 18-26.

Annexes

genomeA
Journals.ASM.org

Complete Chromosome Sequence of *Carnobacterium maltaromaticum* LMA 28

Catherine Cailliez-Grimal,[a] Stéphane Chaillou,[b,c] Jamila Anba-Mondoloni,[b,c] Valentin Loux,[d] Muhammad Inam Afzal,[a] Abdur Rahman,[a] Gilles Kergourlay,[e,f] Marie-Christine Champomier-Vergès,[b,c] Monique Zagorec,[b,c,e,f] Paw Dalgaard,[g] Jorgen J. Leisner,[h] Hervé Prévost,[e,f] Anne-Marie Revol-Junelles,[a] Frédéric Borges[a]

Université de Lorraine, Laboratoire d'Ingénierie des Biomolécules (LIBio), Vandoeuvre-lès-Nancy, France[a]; INRA, UMR1319 Micalis, Jouy-en-Josas, France[b]; AgroParisTech, UMR Micalis, Jouy-en-Josas, France[c]; Unité de Mathématique, Informatique et Génome, INRA, Jouy-en-Josas, France[d]; INRA, Nantes, France[e]; L'Université Nantes Angers Le Mans (L'UNAM), Oniris, UMR 1014 Secalim, Nantes, France[f]; National Food Institute (DTU Food), Technical University of Denmark, Kgs. Lyngby, Denmark[g]; Department of Veterinary Disease Biology, Faculty of Health and Medical Sciences, University of Copenhagen, Copenhagen, Denmark[h]

Within the lactic acid bacterium genus *Carnobacterium, Carnobacterium maltaromaticum* is one of the most frequently isolated species from natural environments and food. It potentially plays a major role in food product biopreservation. We report here on the 3.649-Mb chromosome sequence of *C. maltaromaticum* LMA 28, which was isolated from ripened soft cheese.

Received 8 November 2012 **Accepted** 19 November 2012 **Published** 31 January 2013

Citation Cailliez-Grimal C, Chaillou S, Anba-Mondoloni J, Loux V, Afzal MI, Rahman A, Kergourlay G, Champomier-Vergès MC, Zagorec M, Dalgaard P, Leisner JJ, Prévost H, Revol-Junelles AM, Borges F. 2013. Complete chromosome sequence of *Carnobacterium maltaromaticum* LMA 28. Genome Announc. 1(1):e00115-12. doi:10.1128/genomeA.00115-12.

Copyright © 2013 Cailliez-Grimal et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Attribution 3.0 Unported Creative Commons License.

Address correspondence to Catherine Cailliez-Grimal, catherine.cailliez@univ-lorraine.fr.

The genus *Carnobacterium* belongs to the lactic acid bacteria, and currently consists of 11 species. *Carnobacterium maltaromaticum* strains are widely found in foods, including dairy products (1). This species has potential for application as a protective culture in foods. Most research has focused on the production of bacteriocins, on their roles in the inhibition of *Listeria monocytogenes*, and on the regulation of metabolic pathways of sensory importance (2). *C. maltaromaticum* LMA 28 was isolated from a soft ripened cheese (3).

The genome sequence of *C. maltaromaticum* LMA 28 was determined using 454 pyrosequencing GS-FLX system (Roche 454 Life Sciences, Mannheim, Germany) and Illumina sequencing. Pyrosequencing runs, including shotgun and paired-end runs, resulted in 15 scaffolds containing 123 contigs and 55-fold coverage. A subsequent Illumina sequencing run performed with a paired-end library corrected 923 indels. PCR-base techniques and Sanger sequencing of the products were used to close the remaining gaps. The manually curated sequence of LMA 28 comprises one chromosome of 3,649,737 bp with an overall G+C content of 34.5%. Coding sequence (CDS) predictions and annotations were performed with Integrative Services for Genomics Analysis (ISGA) (4) and provided 3,933 predicted CDSs, 59 tRNA genes, 6 rRNA operons, and a single 5S rRNA gene.

So far, three genomic sequences of *Carnobacterium* have been published: the complete genome sequence of *Carnobacterium* sp. 17-4 (5) isolated from permanent cold seawater; the draft genome sequences of *C. maltaromaticum* ATCC 35586, isolated from a diseased salmon (6); and the draft genome of *Carnobacterium* sp. AT7, a piezophilic strain isolated from the Aleutian trench (7). The genome size of the strain ATCC 35586 (3.5 Mbp) is similar to that of LMA 28, and both are approximately 1 Mbp larger than the genomes of *Carnobacterium* sp. 17-4 and AT7 (2.6 Mbp and 2.4 Mbp, respectively). The larger chromosomal size of *C. maltaromaticum* might explain the ability of this species to adapt to multiple and diverse environments compared to the other carnobacterial species. This genomic trait is illustrated by the presence of genes involved in the metabolism of branched-chain amino acids.

Indeed, the species *C. maltaromaticum* is well known for its ability to produce the flavor compound 3-methylbutanal, which is the result of leucine catabolism. In lactic acid bacteria, the more prevalent pathway is the α–keto acid dehydrogenase (KaDH) pathway (8). A less common alternative pathway is the α–keto acid decarboxylase pathway, encoded by gene *kdcA*. This gene is only described for two strains of *L. lactis* (8). In the genome sequences of *C. maltaromaticum* LMA 28 and ATCC 35586, an orthologous gene of *kdcA* was found (2) that is absent from the genomes of the other *Carnobacterium* strains.

Nucleotide sequence accession number. The complete chromosome sequence of *Carnobacterium maltaromaticum* LMA 28 has been deposited at EMBL/GenBank under the accession number no. HE999757.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Myriam Michel and Arnaud Khemisti for providing excellent technical assistance.

This work was supported partly by the Fabelor Competence Cluster, Nancy, France.

REFERENCES

1. **Afzal MI, Jacquet T, Delaunay S, Borges F, Millière JB, Revol-Junelles AM, Cailliez-Grimal C.** 2010. Carnobacterium maltaromaticum: identification, isolation tools, ecology and technological aspects in dairy products. Food Microbiol. **27**:573–579.
2. **Leisner JJ, Laursen BG, Prévost H, Drider D, Dalgaard P.** 2007. *Carnobacterium*: Positive and negative effects in the environment and in foods. FEMS Microbiol. Rev. **31**:592–613.

3. **Millière JB, Michel M, Mathieu F, Lefebvre G.** 1994. Presence of *Carnobacterium* spp. in French surface mould-ripened soft-cheese. J. Appl. Bacteriol. **76**(3):264–269.
4. **Hemmerich C, Buechlein A, Podicheti R, Revanna KV, Dong Q.** 2010. An Ergatis-based prokaryotic genome annotation web server. Bioinformatics **26**:1122–1124.
5. **Voget S, Klippel B, Daniel R, Antranikian G.** 2011. Complete genome sequence of *Carnobacterium* sp. 17-4. J. Bacteriol. **193**:3403–3404.
6. **Leisner JJ, Hansen MA, Larsen MH, Hansen L, Ingmer H, Sørensen SJ.** 2012. The genome sequence of the lactic acid bacterium, *Carnobacterium maltaromaticum* ATCC 35586 encodes potential virulence factors. Int. J. Food Microbiol. **152**:107–115.
7. **Lauro FM, Chastain RA, Blankenship LE, Yayanos AA, Bartlett DH.** 2007. The unique 16S rRNA genes of piezophiles reflect both phylogeny and adaptation. Appl. Environ. Microbiol. **73**:838–845.
8. **Liu M, Nauta A, Francke C, Siezen RJ.** 2008. Comparative genomics of enzymes in flavor-forming pathways from amino acids in lactic acid bacteria. Appl. Environ. Microbiol. **74**:4590–4600.

International Dairy Journal 34 (2014) 93–99

Contents lists available at ScienceDirect

International Dairy Journal

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

Adaptation of the lactic acid bacterium *Carnobacterium maltaromaticum* LMA 28 to the mammalian gastrointestinal tract: From survival in mice to interaction with human cells

Abdur Rahman [a], Marita Gleinser [b], Marie-Claire Lanhers [c], Christian U. Riedel [b], Benoît Foligné [d], Marine Hanse [c], Frances T. Yen [e], Amira Klouj [a], Muhammad Inam Afzal [a], Alexandre Back [a], Cécile Mangavel [a], Catherine Cailliez-Grimal [a], Anne-Marie Revol-Junelles [a], Frédéric Borges [a,*]

[a] Université de Lorraine, Laboratoire d'Ingénierie des Biomolécules (LIBio), E.N.S.A.I.A., 2 avenue de la Forêt de Haye TSA 40602, F-54518 Vandoeuvre Cedex, France
[b] Institute of Microbiology and Biotechnology, University of Ulm, Albert-Einstein-Allee 11, D-89081 Ulm, Germany
[c] Université de Lorraine, BFLA, EA 3998 – 0340 UR AFPA (USC INRA), Vandoeuvre-lès-Nancy F-54518, France
[d] Institut Pasteur de Lille, Lactic Acid Bacteria and Mucosal Immunity, Center for Infection and Immunity of Lille, 1, rue du Pr Calmette, BP 245, F-59019 Lille, France
[e] INSERM, BFLA, EA 3998 – 0340 UR AFPA (USC INRA), Vandoeuvre-lès-Nancy F-54518, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 6 May 2013
Received in revised form
5 June 2013
Accepted 1 July 2013

ABSTRACT

Carnobacterium maltaromaticum is a non-starter lactic acid bacterium frequently isolated from food products. While this bacterium has been extensively studied in foods, very little is known about its fate once ingested. In this study the strain *C. maltaromaticum* LMA 28 was given to mice by intragastric gavage. Selective enumeration of *C. maltaromaticum* in the faeces showed that the bacterium is able to survive through transit of the gut. In addition, experiments showed that *C. maltaromaticum* is able to adhere to Caco-2, HT29, and T84 cell lines. Moreover, the measurement of four cytokines produced by human peripheral blood mononuclear cells after incubation with the bacterium suggested that *C. maltaromaticum* LMA 28 exhibit either a neutral or a slightly anti-inflammatory behaviour. The analysis of the genome of *C. maltaromaticum* LMA 28 revealed it contains genes for adaptation to the gastrointestinal tract.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Carnobacterium maltaromaticum is a non-starter lactic acid bacterium frequently colonising food products, i.e., meat, sea and dairy food (Afzal et al., 2010). Its relevance has been underestimated for a long time due to its inability to grow on acetate containing media, i.e., Man Rogosa Sharpe (MRS) and Rogosa. This explains the relative late identification of this bacterium in 1974 as *Lactobacillus maltaromicus* (Miller, Morgan, & Libbey, 1974), which was subsequently reclassified as *C. maltaromaticum* (Mora, Scarpellini, Franzetti, Colombo, & Galli, 2003).

The presence of this bacterium is not negligible since it can grow to high concentrations in food, up to 10^9 cfu g^{-1}, and can colonise soft cheeses (Cailliez-Grimal, Edima, Revol-Junelles, & Millière, 2007). This psychrophilic bacterium can grow at temperature as low as 2–4 °C in meat and cheese (Cailliez-Grimal et al., 2007; Sakala et al., 2002) and at alkaline pH up to 9.6 (Cailliez-Grimal et al., 2007). It can thus efficiently colonise soft cheeses after the increase in pH that occurs during ripening (Cailliez-Grimal et al., 2007). In addition, *C. maltaromaticum* does not interfere with the acidification process and can sustain low pH values when co-cultivated with commercial starters (Edima, Cailliez-Grimal, Revol-Junelles, Rondags, & Milliere, 2008). The beneficial effect of this bacterium on ripened soft cheese enabled this bacterium to be proposed as an adjunct culture for soft and semi-hard cheese manufacture (Afzal et al., 2010; Briggiler-Marco et al., 2007; Edima et al., 2008).

C. maltaromaticum has been extensively studied as a protective culture; some strains are able to inhibit the growth of *Listeria monocytogenes* by producing bacteriocins (Mathieu, Michel, Lebrihi, & Lefebvre, 1994; Wan et al., 1997) or because of other still unknown mechanisms (Leroi, Arbey, Joffraud, & Chevalier, 1996).

* Corresponding author. Tel.: +33 3 83 59 58 83.
E-mail address: frederic.borges@univ-lorraine.fr (F. Borges).

0958-6946/$ – see front matter © 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.
http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2013.07.003

C. maltaromaticum is able to produce the biogenic amine tyramine, which is the product of decarboxylation of tyrosine, and in this regard could be a cause of food safety concern (Leisner, Laursen, Prevost, Drider, & Dalgaard, 2007). However, tyramine is produced at levels well tolerated in healthy subjects (Leisner et al., 2007), and moreover not all strains exhibit this metabolic property since strains of a particular phylogenetic cluster do not cause spoilage of shrimps (Laursen, Leisner, & Dalgaard, 2006). In addition to interspecies variability, the production of biogenic amines is food dependent (Leisner et al., 2007). Thus, the strain *C. maltaromaticum* LMA 28 does not produce detectable amounts of tyramine and histamine in soft cheeses (Afzal et al., 2010).

C. maltaromaticum has been associated with bacterial infection rather rarely with only one case report of the species from human pus (Chmelar et al., 2002). For these reasons, the strain *C. maltaromaticum* CB1 has been generally recognised as safe (GRAS) in the USA for use in ready to eat meat products since 2005 (FDA, 2005). In addition, it has been added to the updated list of microorganisms with technologically beneficial use (Bourdichon et al., 2012).

After food consumption, the ability of food bacteria to survive the gastrointestinal varies considerably between strains and species (Bouhnik et al., 1992; Conway, Gorbach, & Goldin, 1987; Klijn, Weerkamp, & de Vos, 1995). Once they are able to survive, bacteria can actively interact with the gastrointestinal milieu, and these interactions can be beneficial or detrimental for the host when considering probiotics or pathogens, respectively, or can be neutral. In the case of *C. maltaromaticum* very little is known about its fate in the gastrointestinal tract of mammals and its potential interactions with the host. *C. maltaromaticum* is well known as a normal inhabitant of fish and insect digestive tract (Leisner et al., 2007). It has been recently associated with mammals as a result of metagenomic studies; according to these data, *C. maltaromaticum* could be an inhabitant of human skin. The ability of *C. maltaromaticum* to deal with the high salt concentration found in cheese is in agreement with this since it is well known that high amount of salt can be found on the surface of the skin. DNA from *C. maltaromaticum* was also found in the faeces of polar bears, cheetahs and humans (Grice et al., 2009; Ley et al., 2008), and DNA from other *Carnobacterium* species, including *Carnobacterium divergens*, was found in human infant faeces and in cow rumen (Brulc et al., 2009; Roger, Costabile, Holland, Hoyles, & McCartney, 2010). Although data are scarce, they suggest that *Carnobacterium* can survive in the intestinal milieu of mammals.

The aim of the present study was to investigate the ability of *C. maltaromaticum* to survive in the gastrointestinal tract of mice, to assess its ability to adhere to intestinal cells, and to get insight on its immunomodulatory potential. Genomic data mining was also performed to see if genes indicative of an intestinal habitat for *C. maltaromaticum* LMA 28 are present in its genome.

2. Material and methods

2.1. Bacterial strains

C. maltaromaticum LMA 28 was cultured in TSBYE (tryptone soy broth (Biomérieux, Craponne, France) 30 g L^{-1}, yeast extract (Biokar, Beauvais, France) 6 g L^{-1}) at 30 °C as standing cultures. *Lactobacillus* (Foligne et al., 2007b) were grown at 37 °C in MRS medium (Difco™, Beckton Dickinson and Compagny, Sparks, MD, USA) and *Bifidobacterium* sp. strains (Preising et al., 2010) were grown anaerobically at 37 °C in MRS supplemented with 0.05% L-cysteine hydrochloride. *Lactococcus lactis* MG1363 was grown at 30 °C in M17 (Difco™, Beckton Dickinson and Compagny, Sparks, MD, USA) medium supplemented with 0.5% glucose.

2.2. Animal experiments

Adult male C57BL/6J mice (15 weeks) were purchased from Charles River (St Germain sur l'Arbresle, France). Animals were housed in a room of an accredited establishment (n° A54-547-24), with a 12 h light/dark cycle, a mean temperature of 22 °C ± 2 and a relative humidity of 50 ± 20%. They were provided rodent chow diet and water ad libitum. After a one-week acclimatisation period, experiments were initiated.

Overnight cultures of *C. maltaromaticum* were washed once with sterile physiological water (0.9% NaCl) and suspended in the same solution at a bacterial concentration of 5×10^7 cfu mL^{-1}. Mice ($n = 6$) were orally intubated with the bacterial suspension (250 µL per mouse). Faeces were collected at different time intervals from 0 to 72 h and suspended in a tryptone–NaCl (1 g L^{-1} and 8.5 g L^{-1}, respectively) solution and subsequently subjected to serial dilutions. One hundred microlitres of cell suspension were spread on Medium for *C. maltaromaticum* (MCM) plates, which are selective for *C. maltaromaticum* (Edima et al., 2007), followed by incubation at 22 °C for 3 days. Colonies were counted to determine the number of colony forming units (cfu) present in the samples.

This investigation was conducted in accordance with ethical guidelines as defined by the European Community guiding principles in the care and use of animals (no. 86/609/CEE) and French decree no. 87/848.

2.3. C. maltaromaticum *species-specific polymerase chain reaction*

Species-specific polymerase chain reaction (PCR) was used to confirm the selectivity of the MCM medium. The PCR was performed as previously described (Rachman, Kabadjova, Valcheva, Prevost, & Dousset, 2004) with the following modifications. The oligonucleotide primers Cpis and 23S7 (0.5 µM each) were mixed with 1× PCR reaction buffer, 200 µM of each dNTP, 2.5 mM $MgCl_2$, and 1.25 U of Taq polymerase (MPBiomedicals, Illkirch, France). Bacterial colonies were used as DNA template in the PCR mix. The PCR programme began with a step at 95 °C for 5 min, followed by 35 cycles of 95 °C for 30 s, 53 °C for 30 s and 72 °C for 30 s, and ended with a final extension step at 72 °C for 7 min. The PCR products were analysed by agarose gel electrophoresis.

2.4. Cell culture and adhesion in vitro

Epithelial cell lines were cultivated, and adhesion assays were performed, as previously described (Gleinser, Grimm, Zhurina, Yuan, & Riedel, 2012). Adhesion was calculated as percent of adherent bacteria relative to the initial inoculum. All adhesion experiments were performed three times independently.

2.5. Peripheral blood mononuclear cell isolation and induction of cytokine release

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from the blood of healthy donors and cytokines were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) as previously described (Foligne et al., 2007a, 2007b). The results are means and standard errors of four experiments. For interleukin-10 (IL-10) and the ratio tumour necrosis factor alpha (TNFα)/IL-10, the percentages were calculated by taking the mean value obtained for the strains *Bifidobacterium longum* BB536 and *Lc. lactis* MG1363, respectively, as 100%.

3. Results

3.1. Enumeration of viable C. maltaromaticum LMA 28 in mice faeces

Following the oral administration of the bacterial suspension (250 μL; 1.25×10^7 cfu per mouse), faecal material was collected from 0 to 72 h and subjected to serial dilutions and plate counting on MCM medium, which is selective for *C. maltaromaticum* (Edima et al., 2007). The selectivity of MCM was assessed with faeces prior to gavage, and no colony was observed on MCM plates. In addition, ten colonies obtained from faeces collected were investigated by PCR using selective primers for *C. maltaromaticum* (Rachman et al., 2004). A PCR product of the expected size was obtained for every colony (data not shown), indicating that the MCM medium is suitable for selective enumeration of *C. maltaromaticum* LMA 28 from mouse faeces. The results show that the number of faecal carnobacteria started to increase 2 h after ingestion (Fig. 1). It reached a maximum of approximately 10^6 cfu at 6 h of the time-course and started to decrease between 14 and 24 h. Bacterial counts reached a value of approximately 2.4×10^0 cfu, 72 h after ingestion. These results show that *C. maltaromaticum* LMA 28 can survive during the transit through the digestive tract of mice but suggest that it is not able to persist.

3.2. Adherence to epithelial intestinal cells

The ability of *C. maltaromaticum* LMA 28 to adhere to three intestinal cell lines was compared with the two strains *B. longum* S17 and *B. longum* E18, which were previously described as adherent and non-adherent strains, respectively (Preising et al., 2010). The adherence of *C. maltaromaticum* was varying in the range of 1–5% approximately, depending on the cell line (Fig. 2). It is thus more than 10 times more adherent than the non-adherent *B. longum* E18 strain. Compared with the adherent strain *B. longum* S17, *C. maltaromaticum* binds less to epithelial cells, by a factor of 10 or 2.6 times depending on the cell line, Caco-2 or T84, respectively (Fig. 2). Interestingly, adhesion to HT29 cells was 1.7 fold higher than *Bifidobacterium bifidum* S17 (Fig. 2). These results show *C. maltaromaticum* LMA 28 is able to adhere in vitro to the epithelial intestinal cells Caco-2, HT29, and T84.

3.3. Immunomodulation of PBMC

The impact of *C. maltaromaticum* LMA 28 on the secretion of cytokines by human PBMC was investigated. Four reference strains

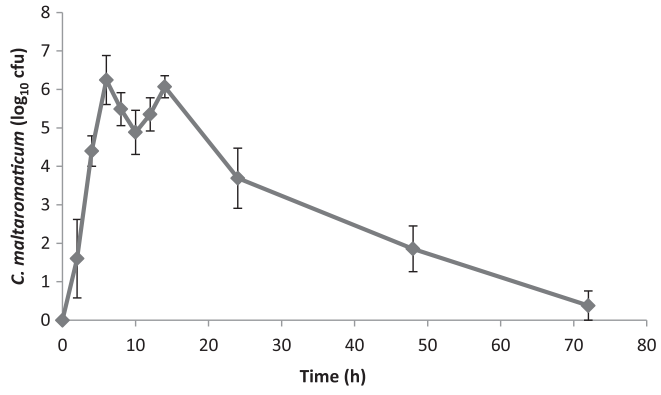


Fig. 1. Enumeration of *Carnobacterium maltaromaticum* LMA 28 in mouse faeces. At time zero, mice were orally intubated with 1×10^7 cfu of *C. maltaromaticum* LMA 28, previously cultured overnight in TSBYE. The mean and standard error of *C. maltaromaticum* LMA 28 colony count originating from faeces collected at different time points from 6 mice are represented.

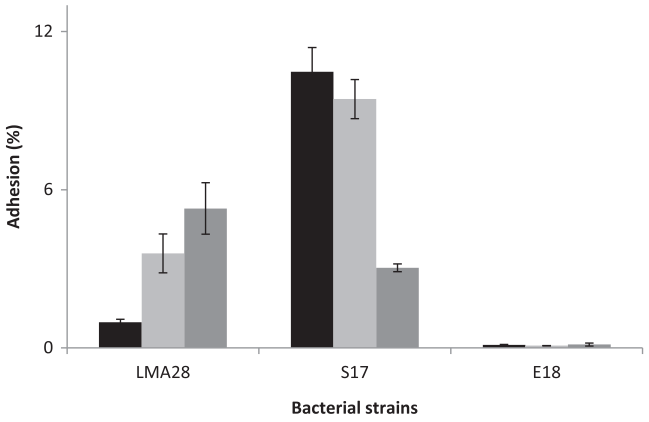


Fig. 2. Adhesion of *Carnobacterium maltaromaticum* LMA 28, *Bifidobacterium longum* S17 and *B. longum* E18 to epithelial intestinal cells: ■, Caco-2; ■, T84; ■, HT29. The epithelial cells were infected with equal amounts of bacteria of each strain, and the number of adherent bacteria was related to the number of input bacteria. *B. longum* S17 and *B. longum* E18 were used as adherent and non-adherent control strains, respectively. The adhesion experiments were performed in triplicate. Bars represent the mean ± standard error values.

were compared with *C. maltaromaticum* LMA 28: *Lc. lactis* MG1363 and *Lactobacillus acidophilus* NCFM, which are slightly pro-inflammatory, and *B. longum* BB536 and *Lactobacillus salivarius* Ls33 which are more anti-inflammatory. *C. maltaromaticum* LMA 28 exhibited behaviour similar to that of strain *Lb. salivarius* Ls33 (Fig. 3). Thus, these strains indeed induced similar amounts of IL-10 and TNFα. However, when considering the TNFα/IL-10 ratio, which reflects the ratio between pro- and anti-inflammatory, *C. maltaromaticum* LMA 28 is intermediary between the strain *Lb. salivarius* Ls33 and the slightly pro-inflammatory strain *Lb. acidophilus* NCFM (Fig. 3E). These results suggest that *C. maltaromaticum* would have either neutral or slightly anti-inflammatory properties.

3.4. Genome sequence analysis

Intestinal bacteria have to face multiple intestinal stresses, including the immune system and bile salts. In lactic acid bacteria, several genes involved in the resistance to such stresses have previously been identified (Kleerebezem et al., 2010). Analysis of the genome sequence of *C. maltaromaticum* LMA 28 revealed that it contained genes involved in the resistance to components of the immune system. Indeed, genes homologous to *mprF* and the *dlt* gene cluster, which are involved in phospholipid lysinylation and D-alanylation of teichoic acids, respectively, were found (Table 1). These genes have been demonstrated to confer resistance to antimicrobial peptides. Indeed, both MprF and the four proteins encoded by the *dlt* gene cluster lead to an increase of the density of positive charges on the surface of the plasma membrane and of teichoic acids, respectively. The positive charges are believed to be responsible for a decreased affinity to cationic antimicrobial peptides including animal defensins and bacteriocins (Collins et al., 2002; Peschel et al., 1999, 2001). In *Lactobacillus reuteri*, a *dlt* mutant is impaired in the colonisation of the intestinal tract of mice (Walter et al., 2007). In addition to *mprF* and *dlt*, the genome of *C. maltaromaticum* LMA 28 contains homologues of *asnH*, *oatA*, and *pgdA* (Table 1), which are involved in amidation, O-acetylation, and N-deacetylation of peptidoglycan, respectively (Kleerebezem et al., 2010; Veiga et al., 2009). Deacetylated sugars in the peptidoglycan strongly reduce the activity of lysozyme, an important component of the innate immune system (Vollmer, 2008).

The genome of *C. maltaromaticum* LMA 28 also contains 6 genes homologous to the paralogous bile salt hydrolases *bshA* and *bshB* of

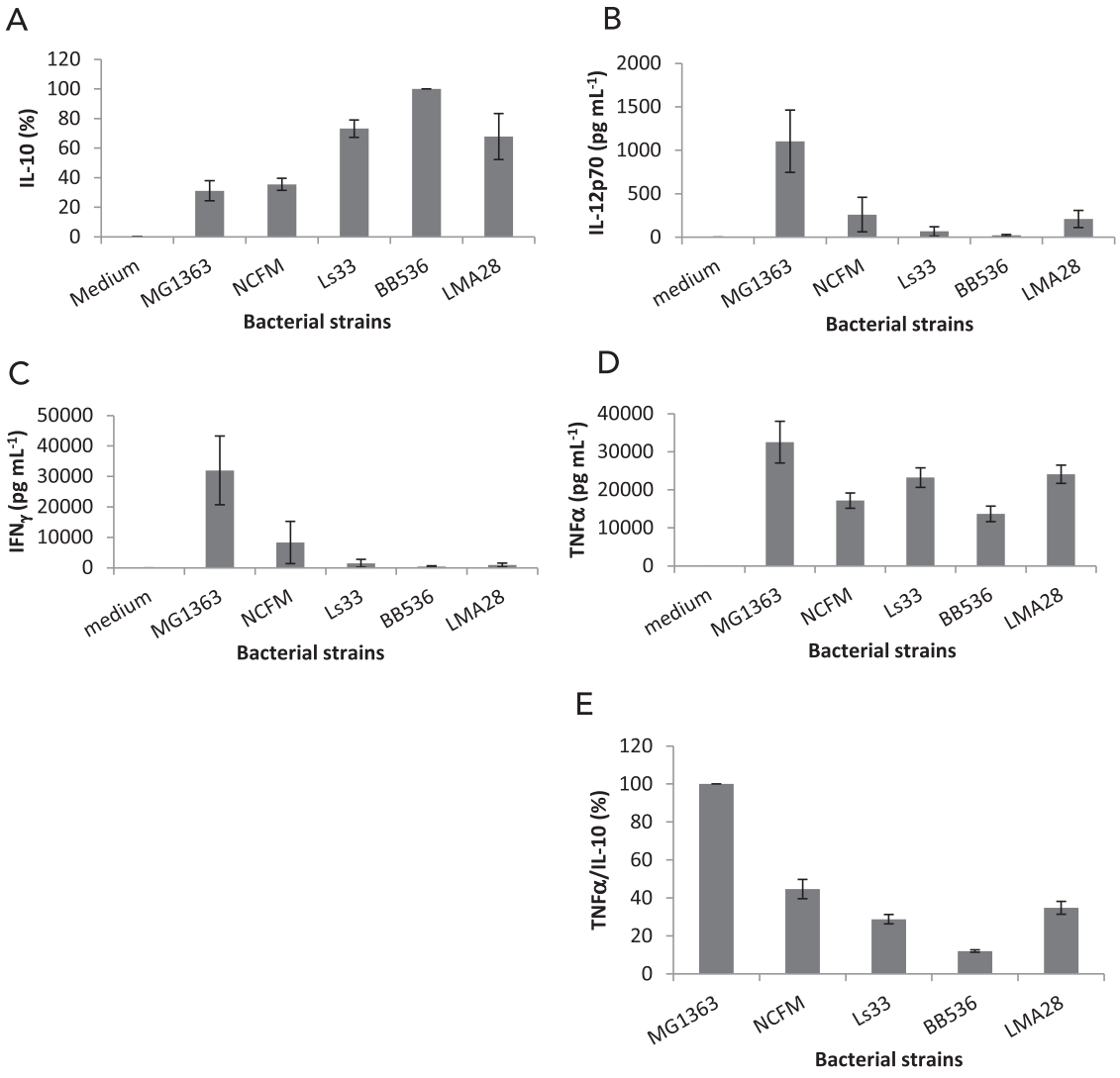


Fig. 3. Immunomodulation of PBMC. Bacterial suspension of *Lactococcus lactis* MG1363, *Lactobacillus acidophilus* NCFM, *Lactobacillus salivarius* Ls33, *Bifidobacterium longum* BB536, and *Carnobacterium maltaromaticum* LMA 28 were incubated with cultured PBMC at a multiplicity of infection of 10. After 24 h stimulation, supernatants were collected for the measurement of the following cytokines: panel A, IL-10; panel B, IL-12p70: panel C, IFNγ; panel D, TNFα. The TNFα/IL-10 ratio is presented in panel E. The values of IL-10 and TNFα/IL-10 are expressed as percentages by taking the values of *B. longum* and *L. lactis* MG1363 as 100%, respectively. The results are means and standard errors of the data obtained from 4 blood donors.

Table 1
Genes potentially involved in resistance to innate immunity and bile salts.

Gene name	Locus tag	Encoded function	Resistance
mprF	*bn424_2074*	Phospholipid lysinylation	Antimicrobial peptides
asnH	*bn424_2404*	Amidation of peptidoglycan	Antimicrobial peptides
dlt gene cluster	*bn424_2242* to *bn424_2246*	D-Alanylation of teichoic acids	Antimicrobial peptides
oatA	*bn424_1149*	O-acetylation of peptidoglycan	Lysozyme
pgdA	*bn424_2841* *bn424_2407*	N-deacetylation of peptidoglycan	Lysozyme, inflammation down-regulation
bsh	*bn424_2909* *bn424_1618* *bn424_344* *bn424_349* *bn424_2770* *bn424_3599*	Bile salt hydrolase	Bile salts

Lb. acidophilus NCFM (Table 1). These bile salts hydrolases have been proposed to be niche-specific markers of gut in lactobacilli (O'Sullivan et al., 2009). They are essential for bile tolerance of *Lactobacillus plantarum* (Lambert, Bongers, de Vos, & Kleerebezem, 2008).

Besides genes involved in intestinal stress resistance, intestinal lactic acid bacteria produces several surface components involved in adhesion with intestinal mucosa. Adherence to intestinal epithelial cells in lactobacilli is conferred by surface proteins covalently anchored to the cell-wall peptidoglycan by a sortase (Velez, De Keersmaecker, & Vanderleyden, 2007). The analysis of the genome of *C. maltaromaticum* LMA 28 revealed that it contains 5 homologues of *Lc. lactis* sortase A (Dieye et al., 2010). In line with this, 30 proteins potentially covalently anchored to the cell wall were predicted to be encoded by the genome of *C. maltaromaticum* LMA 28. Among these proteins, four are predicted to contain Leucine-Rich Repeat (LRR) domains, Von Willebrand factor type A (VWA) domains, collagen- and mucin-binding domains (Fig. 4). These domains are described as actors of physical interaction with a

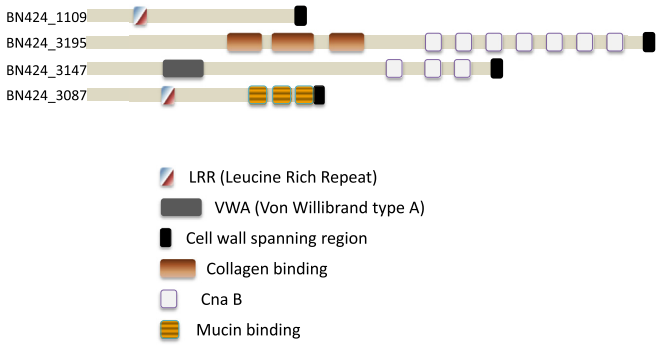


Fig. 4. Putative surface proteins of *C. maltaromaticum* LMA 28 involved in cellular adhesion. The genome of *C. maltaromaticum* LMA 28 was mined to predict genes encoding proteins covalently anchored to the cell wall. The proteins containing potential domain with a predicted function reminiscent of adhesion are represented.

host conferring the ability to adhere to host tissues. In addition, the putative surface proteins *bn424_3147*, *bn424_3146*, and *bn424_3145* (*pilB*) are predicted to form pili on the surface of the cells; more precisely, these proteins are homologous to putative pilus tip protein, putative minor pilin protein and major pilin protein of *Enterococcus faecium*, respectively (accession numbers: GenBank: ACI49667, ACI49666, and ACI49665). Pili are multisubunit hairlike structures extending from the bacterial cell surface that are involved in adhesion to host tissues (Telford, Barocchi, Margarit, Rappuoli, & Grandi, 2006).

Exopolysaccharides are described to play multiple roles in the interaction with the host, e.g., shielding other cell surface effector molecules and protection from antimicrobial factors of the lower regions of the gastrointestinal tract (Lebeer, Vanderleyden, & De Keersmaecker, 2010). The analysis of the genome of *C. maltaromaticum* LMA 28 revealed the presence of two loci potentially involved in the synthesis of exopolysaccharides. The *eps* locus 1 and *eps* locus 2 would contain 12 and 13 genes *bn424_3057* to *bn424_3068*, and *bn424_2753* to *bn424_2765*, respectively. Those loci contain homologues to genes typically involved in exopolysaccharides in other bacteria. Thus, homologues to *epsABDGK*, which are involved in exopolysaccharides synthesis in *Lc. lactis* NIZO B40 (van Kranenburg, Marugg, van Swam, Willem, & de Vos, 1997), were found. Other genes, annotated as involved in capsular exopolysaccharide family, O-antigen polymerase family, and glycosyltransfer, as well as genes that would encode enzymes involved in sugars modifications (e.g., epimerases, dehydratases, and reductases) were also found in these two loci.

Thus, the analysis of the genome sequence of *C. maltaromaticum* LMA 28 suggests it contains genes conferring resistance to bile and to components of the immune system, that it produces adhesion factors and exopolysaccharides on the surface of its cells. Altogether, it supports the hypothesis of an intestinal life of *C. maltaromaticum* LMA 28.

4. Discussion

The fate of bacteria during the intestinal transit highly depends on the considered bacteria. Thus, the ability to survive the adverse conditions of the gut is highly variable as observed for the genus *Bifidobacterium* (Kailasapathy & Chin, 2000). It can be assumed that the ability of a microorganism to survive the transit is a prerequisite for a bacterium to be able to exert a beneficial or detrimental effect on the host. In this study, *C. maltaromaticum* LMA 28 was given to mice as a saline suspension. Enumeration of *C. maltaromaticum* LMA 28 revealed that the bacterium is recovered in the faeces showing that it is able to survive during the transit through the digestive tract. The rate of recovery was high since the amount of bacteria recovered in the faeces was approximately equal to the dose of bacteria given. Genome analysis of the strain *C. maltaromaticum* LMA 28 revealed the presence of genes that could explain its ability to resist to the adverse conditions encountered in the digestive tract. Indeed, homologues involved in resistance to bile salts and the components of the immune system were found. More precisely, homologues to *bshA* and *bshB* encoding hydrolases able to inactivate bile salts in the probiotic lactobacilli are present (Lambert et al., 2008; O'Sullivan et al., 2009). In addition, genes potentially responsible for the modification of the surface components of the bacterial cells comprising the plasmic membrane, teichoic acids and peptidoglycan were found. These modifications were described as important determinants of resistance to cationic antimicrobial peptides and lysozyme, two components of the innate immune system.

C. maltaromaticum is well known as a normal flora of fish intestine. This bacterium has been indeed isolated from diverse fish including charr, cod, salmon and trout (Leisner et al., 2007). On the other hand, this bacterium is less frequently associated to the intestine of mammals. Our findings suggest that *C. maltaromaticum* could be transient, rather than permanent, inhabitants of mammal's intestine.

If *C. maltaromaticum* is able to survive during the transit, then it opens the possibility for the bacterium to interact with the host. Thus, adherence to intestinal epithelial cells was investigated. Adherence experiments were performed with three cell lines and the adherence ability was compared to one adherent and one non-adherent *Bifidobacterium* strains. Results showed that the strain *C. maltaromaticum* LMA 28 is able to adhere to these three cell lines. This suggests that *C. maltaromaticum* LMA 28 could have the ability to come in intimate contact with the intestinal mucosa. In non-pathogenic bacteria, adherence ability is reported to play several roles. Adherence would be an important factor of intestinal mucosa colonisation, it contributes to intestinal barrier function against pathogens invasion (Ohland & Macnaughton, 2010), and is correlated to the anti-inflammatory properties of probiotics (Preising et al., 2010).

Our results revealed that the adhesion profiles of *C. maltaromaticum* LMA 28 and *B. bifidum* S17 are different. Indeed, the highest adherence values for *C. maltaromaticum* LMA 28 were obtained with T84 and HT29, while for *B. bifidum* the highest scores were obtained with Caco-2 and T84 (Fig. 2). Caco-2 and T84 cells were used as differentiated monolayers, while HT29 cells do not differentiate into columnar epithelial cells. In consequence, our data suggest that the mechanism of adhesion of *C. maltaromaticum* LMA 28 to intestinal epithelial cells is different than the one of *B. bifidum* S17.

To get an insight on the impact of *C. maltaromaticum* on inflammation, the strain *C. maltaromaticum* LMA 28 was incubated with human PBMC and the cytokine production was monitored. The results suggest that *C. maltaromaticum* could have neutral or slightly anti-inflammatory properties. The molecular mechanism underlying the inflammatory properties of gut microorganisms includes the interaction between surface components of the bacterial cell and pattern recognition receptors of the host. The recognition is followed by a signalling cascade that can end with the production of immunomodulatory cytokines, chemokines, antimicrobial or cytoprotective factors and co-stimulatory molecules (Lebeer et al., 2010). The analysis of the genome of *C. maltaromaticum* LMA 28 suggests it encodes several surface components including pili, surface proteins, and exopolysaccharides that are described as molecules acting directly or indirectly in this recognition process in other bacteria (Lebeer et al., 2010).

In fish, *C. maltaromaticum* and *C. divergens* are described to induce the expression of genes encoding IL-1b and TNFα of head kidney leucocytes of rainbow trout suggesting that these bacteria can stimulate the innate immunity of this fish species (Kim and Austin, 2006a). In addition, feeding rainbow trout with these bacteria enhances the cellular and humoural immune response in rainbow trout (Kim & Austin, 2006b). Our results suggest that the immunomodulatory properties of *Carnobacterium* are not restricted to interaction with fish and could be extended to mammals.

Within the species *C. maltaromaticum*, some strains are described as fish pathogens (Leisner et al., 2007). The genome analysis of the strain *C. maltaromaticum* ATCC 35586 allowed identifying potential virulence factors including genes encoding putative adhesion proteins, cell-wall modification enzymes, bile salt hydrolases, and capsule synthesis (Leisner et al., 2012). Whether these genes are involved in virulence in fish is still unknown. However, regarding our results, a non-exclusive hypothesis would be that these genes could also be reminiscent of the ability of the strain *C. maltaromaticum* ATCC 35586 to survive during the transit in mammal's intestine and to interact with the host. Further investigations are needed to answer this question.

5. Conclusions

Here we show that *C. maltaromaticum* is able to survive in the gastrointestinal tract of mice and that it is able to interact with human cells. *C. maltaromaticum* thus seems to exhibit some prerequisite features to be considered as a probiotic candidate. Future investigations will be required to evaluate the beneficial potential of this bacterium, in particular in the field of bacteria-host cross-talk and the potential effect on the immune system.

Acknowledgements

We are grateful to Frédéric Choulet for his help in genomic data analysis. We are also grateful to Christel Rousseaux for useful advice about mice experiments. We thank Myriam Michel, Sylvie Wolff, Arnaud Khemisti, Nicolas Blaise for technical assistance.

References

Afzal, M. I., Jacquet, T., Delaunay, S., Borges, F., Milliere, J. B., Revol-Junelles, A. M., et al. (2010). *Carnobacterium maltaromaticum*: identification, isolation tools, ecology and technological aspects in dairy products. *Food Microbiology, 27*, 573–579.

Bouhnik, Y., Pochart, P., Marteau, P., Arlet, G., Goderel, I., & Rambaud, J. C. (1992). Fecal recovery in humans of viable *Bifidobacterium* sp ingested in fermented milk. *Gastroenterology, 102*, 875–878.

Bourdichon, F., Casaregola, S., Farrokh, C., Frisvad, J. C., Gerds, M. L., Hammes, W. P., et al. (2012). Food fermentations: microorganisms with technological beneficial use. *International Journal of Food Microbiology, 154*, 87–97.

Briggiler-Marco, M., Capra, M. L., Quiberoni, A., Vinderola, G., Reinheimer, J. A., & Hynes, E. (2007). Nonstarter *Lactobacillus* strains as adjunct cultures for cheese making: in vitro characterization and performance in two model cheeses. *Journal of Dairy Science, 90*, 4532–4542.

Brulc, J. M., Antonopoulos, D. A., Miller, M. E., Wilson, M. K., Yannarell, A. C., Dinsdale, E. A., et al. (2009). Gene-centric metagenomics of the fiber-adherent bovine rumen microbiome reveals forage specific glycoside hydrolases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 106*, 1948–1953.

Cailliez-Grimal, C., Edima, H. C., Revol-Junelles, A. M., & Millière, J. B. (2007). Short communication: *Carnobacterium maltaromaticum*: the only *Carnobacterium* species in French ripened soft cheeses as revealed by polymerase chain reaction detection. *Journal of Dairy Science, 90*, 1133–1138.

Chmelar, D., Matusek, A., Korger, J., Durnova, E., Steffen, M., & Chmelarova, E. (2002). Isolation of *Carnobacterium piscicola* from human pus – case report. *Folia Microbiologica, 47*, 455–457.

Collins, L. V., Kristian, S. A., Weidenmaier, C., Faigle, M., Van Kessel, K. P., Van Strijp, J. A., et al. (2002). *Staphylococcus aureus* strains lacking D-alanine modifications of teichoic acids are highly susceptible to human neutrophil killing and are virulence attenuated in mice. *The Journal of Infectious Diseases, 186*, 214–219.

Conway, P. L., Gorbach, S. L., & Goldin, B. R. (1987). Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. *Journal of Dairy Science, 70*, 1–12.

Dieye, Y., Oxaran, V., Ledue-Clier, F., Alkhalaf, W., Buist, G., Juillard, V., et al. (2010). Functionality of sortase A in *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology, 76*, 7332–7337.

Edima, H. C., Cailliez-Grimal, C., Revol-Junelles, A. M., Rondags, E., & Milliere, J. B. (2008). Short communication: impact of pH and temperature on the acidifying activity of *Carnobacterium maltaromaticum*. *Journal of Dairy Science, 91*, 3806–3813.

Edima, H. C., Cailliez-Grimal, C., Revol-Junelles, A. M., Tonti, L., Linder, M., & Millière, J. B. (2007). A selective enumeration medium for *Carnobacterium maltaromaticum*. *Journal of Microbiological Methods, 68*, 516–521.

FDA. (2005). *Agency response letter*. GRAS notice no. GRN 000159.

Foligne, B., Dessein, R., Marceau, M., Poiret, S., Chamaillard, M., Pot, B., et al. (2007a). Prevention and treatment of colitis with *Lactococcus lactis* secreting the immunomodulatory *Yersinia* LcrV protein. *Gastroenterology, 133*, 862–874.

Foligne, B., Nutten, S., Grangette, C., Dennin, V., Goudercourt, D., Poiret, S., et al. (2007b). Correlation between in vitro and in vivo immunomodulatory properties of lactic acid bacteria. *World Journal of Gastroenterology, 13*, 236–243.

Gleinser, M., Grimm, V., Zhurina, D., Yuan, J., & Riedel, C. U. (2012). Improved adhesive properties of recombinant bifidobacteria expressing the *Bifidobacterium bifidum*-specific lipoprotein BopA. *Microbial Cell Factories, 11*, 80.

Grice, E. A., Kong, H. H., Conlan, S., Deming, C. B., Davis, J., Young, A. C., et al. (2009). Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome. *Science, 324*, 1190–1192.

Kailasapathy, K., & Chin, J. (2000). Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. *Immunology and Cell Biology, 78*, 80–88.

Kim, D. H., & Austin, B. (2006a). Cytokine expression in leucocytes and gut cells of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* Walbaum, induced by probiotics. *Veterinary Immunology and Immunopathology, 114*, 297–304.

Kim, D. H., & Austin, B. (2006b). Innate immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) induced by probiotics. *Fish and Shellfish Immunology, 21*, 513–524.

Kleerebezem, M., Hols, P., Bernard, E., Rolain, T., Zhou, M., Siezen, R. J., et al. (2010). The extracellular biology of the *lactobacilli*. *FEMS Microbiology Reviews, 34*, 199–230.

Klijn, N., Weerkamp, A. H., & de Vos, W. M. (1995). Genetic marking of *Lactococcus lactis* shows its survival in the human gastrointestinal tract. *Applied and Environmental Microbiology, 61*, 2771–2774.

van Kranenburg, R., Marugg, J. D., van Swam, I. I., Willem, N. J., & de Vos, W. M. (1997). Molecular characterization of the plasmid-encoded eps gene cluster essential for exopolysaccharide biosynthesis in *Lactococcus lactis*. *Molecular Microbiology, 24*, 387–397.

Lambert, J. M., Bongers, R. S., de Vos, W. M., & Kleerebezem, M. (2008). Functional analysis of four bile salt hydrolase and penicillin acylase family members in *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Applied and Environmental Microbiology, 74*, 4719–4726.

Laursen, B. G., Leisner, J. J., & Dalgaard, P. (2006). *Carnobacterium* species: effect of metabolic activity and interaction with *Brochothrix thermosphacta* on sensory characteristics of modified atmosphere packed shrimp. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54*, 3604–3611.

Lebeer, S., Vanderleyden, J., & De Keersmaecker, S. C. (2010). Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. *Nature Reviews Microbiology, 8*, 171–184.

Leisner, J. J., Hansen, M. A., Larsen, M. H., Hansen, L., Ingmer, H., & Sorensen, S. J. (2012). The genome sequence of the lactic acid bacterium, *Carnobacterium maltaromaticum* ATCC 35586 encodes potential virulence factors. *International Journal of Food Microbiology, 152*, 107–115.

Leisner, J. J., Laursen, B. G., Prevost, H., Drider, D., & Dalgaard, P. (2007). *Carnobacterium*: positive and negative effects in the environment and in foods. *FEMS Microbiology Reviews, 31*, 592–613.

Leroi, F., Arbey, N., Joffraud, J. J., & Chevalier, F. (1996). Effect of inoculation with lactic acid bacteria on extending the shelf-life of vacuum-packed cold smoked salmon. *International Journal of Food Science and Technology, 31*, 497–504.

Ley, R. E., Hamady, M., Lozupone, C., Turnbaugh, P. J., Ramey, R. R., Bircher, J. S., et al. (2008). Evolution of mammals and their gut microbes. *Science, 320*, 1647–1651.

Mathieu, F., Michel, M., Lebrihi, A., & Lefebvre, G. (1994). Effect of the bacteriocin carnocin CP5 and of the producing strain *Carnobacterium piscicola* CP5 on the viability of *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 in salt solution, broth and skimmed milk, at various incubation temperatures. *International Journal of Food Microbiology, 22*, 155–172.

Miller, A., Morgan, M. E., & Libbey, L. M. (1974). *Lactobacillus maltaromicus*, a new species producing a malty aroma. *International Journal of Systematic Bacteriology, 24*, 346–354.

Mora, D., Scarpellini, M., Franzetti, L., Colombo, S., & Galli, A. (2003). Reclassification of *Lactobacillus maltaromicus* (Miller et al. 1974) DSM 20342(T) and DSM 20344 and *Carnobacterium piscicola* (Collins et al. 1987) DSM 20730(T) and DSM 20722 as *Carnobacterium maltaromaticum* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 53*, 675–678.

Ohland, C. L., & Macnaughton, W. K. (2010). Probiotic bacteria and intestinal epithelial barrier function. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology, 298*, G807–G819.

O'Sullivan, O., O'Callaghan, J., Sangrador-Vegas, A., McAuliffe, O., Slattery, L., Kaleta, P., et al. (2009). Comparative genomics of lactic acid bacteria reveals a niche-specific gene set. *BMC Microbiology, 9*, 50.

Peschel, A., Jack, R. W., Otto, M., Collins, L. V., Staubitz, P., Nicholson, G., et al. (2001). *Staphylococcus aureus* resistance to human defensins and evasion of neutrophil killing via the novel virulence factor MprF is based on modification of membrane lipids with L-lysine. *Journal of Experimental Medicine, 193*, 1067–1076.

Peschel, A., Otto, M., Jack, R. W., Kalbacher, H., Jung, G., & Gotz, F. (1999). Inactivation of the *dlt* operon in *Staphylococcus aureus* confers sensitivity to defensins, protegrins, and other antimicrobial peptides. *Journal of Biological Chemistry, 274*, 8405–8410.

Preising, J., Philippe, D., Gleinser, M., Wei, H., Blum, S., Eikmanns, B. J., et al. (2010). Selection of bifidobacteria based on adhesion and anti-inflammatory capacity in vitro for amelioration of murine colitis. *Applied and Environmental Microbiology, 76*, 3048–3051.

Rachman, C., Kabadjova, P., Valcheva, R., Prevost, H., & Dousset, X. (2004). Identification of *Carnobacterium* species by restriction fragment length polymorphism of the 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region and species-specific PCR. *Applied and Environmental Microbiology, 70*, 4468–4477.

Roger, L. C., Costabile, A., Holland, D. T., Hoyles, L., & McCartney, A. L. (2010). Examination of faecal *Bifidobacterium* populations in breast- and formula-fed infants during the first 18 months of life. *Microbiology, 156*, 3329–3341.

Sakala, R. M., Hayashidani, H., Kato, Y., Hirata, T., Makino, Y., Fukushima, A., et al. (2002). Change in the composition of the microflora on vacuum-packaged beef during chiller storage. *International Journal of Food Microbiology, 74*, 87–99.

Telford, J. L., Barocchi, M. A., Margarit, I., Rappuoli, R., & Grandi, G. (2006). Pili in gram-positive pathogens. *Nature Reviews Microbiology, 4*, 509–519.

Veiga, P., Erkelenz, M., Bernard, E., Courtin, P., Kulakauskas, S., & Chapot-Chartier, M. P. (2009). Identification of the asparagine synthase responsible for D-Asp amidation in the *Lactococcus lactis* peptidoglycan interpeptide cross-bridge. *Journal of Bacteriology, 191*, 3752–3757.

Velez, M. P., De Keersmaecker, S. C., & Vanderleyden, J. (2007). Adherence factors of *Lactobacillus* in the human gastrointestinal tract. *FEMS Microbiology Letters, 276*, 140–148.

Vollmer, W. (2008). Structural variation in the glycan strands of bacterial peptidoglycan. *FEMS Microbiology Reviews, 32*, 287–306.

Walter, J., Loach, D. M., Alqumber, M., Rockel, C., Hermann, C., Pfitzenmaier, M., et al. (2007). D-Alanyl ester depletion of teichoic acids in *Lactobacillus reuteri* 100-23 results in impaired colonization of the mouse gastrointestinal tract. *Environmental Microbiology, 9*, 1750–1760.

Wan, J., Harmark, K., Davidson, B. E., Hillier, A. J., Gordon, J. B., Wilcock, A., et al. (1997). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by piscicolin 126 in milk and Camembert cheese manufactured with a thermophilic starter. *Journal of Applied Microbiology, 82*, 273–280.

Résumé

La bactérie *Carnobacterium maltaromaticum* ne présente pas le statut d'innocuité présomptive (QPS) pour une utilisation dans l'alimentation humaine et animale en raison du faible niveau de connaissances disponibles sur ce micro-organisme et des pathologies qu'il peut provoquer chez le poisson. Un objectif de ces travaux de thèse était de renforcer le socle de connaissances sur ce micro-organisme en déterminant la séquence complète de la souche fromagère *C. maltaromaticum* LMA 28 et en évaluant le devenir de la bactérie après ingestion par le consommateur. Un autre objectif visait à améliorer les connaissances taxonomiques au sein de l'espèce *C. maltaromaticum* grâce à la mise au point d'un schéma MLST (« MultiLocus Sequence Typing »). La séquence complète de la souche *C. maltaromaticum* LMA 28 a révélé une taille de génome importante de 3,8 Mpb ce qui semble atypique dans le genre *Carnobacterium*. L'analyse du génome de cette souche indique qu'il contiendrait des gènes d'adaptation à l'environnement intestinal. Il a été montré que la bactérie est capable de survivre durant le transit gastro-intestinal chez la souris. Cette souche est également capable d'adhérer à des cellules intestinales humaines et présenterait des propriétés neutres voire anti-inflammatoires. L'ensemble de ces informations suggère que la bactérie est capable de survivre durant le transit gastro-intestinal et qu'elle est capable d'interagir avec l'hôte. Au niveau taxonomique, il a été montré que la MLST chez l'espèce *C. maltaromaticum* permet d'atteindre un haut niveau de résolution. Les résultats de MLST suggèrent que le lait et les fromages à pâte molle sont peu sélectifs pour les souches de cette espèce. De plus, deux complexes clonaux majoritaires, principalement représentés par des souches laitières, ont été identifiés. Leur existence suggère qu'une lignée de l'espèce est particulièrement bien adaptée à l'environnement laitier ou qu'un phénomène de domestication est en cours. Un grand nombre de singletons ont également été identifiés suggérant que la diversité chez cette espèce est sous-estimée et qu'elle reste à explorer.

Mots clés : *Carnobacterium maltaromaticum*, bactérie lactique, MLST, phylogénie, tube digestif

Summary

The bacterium *Carnobacterium maltaromaticum* is not granted as qualified presumption of safety (QPS) for use in food and feed due to limited knowledge about this organism and its virulence in fish. One objective of this thesis was to strengthen the body of knowledge by determining the complete genome sequence of the cheese strain *C. maltaromaticum* LMA 28 and to evaluate the fate of this bacterium after ingestion by the consumer. Another objective was to improve the taxonomic knowledge within the species *C. maltaromaticum* through the development of a MLST (MultiLocus Sequence Typing) scheme. The complete sequence of the strain *C. maltaromaticum* LMA 28 revealed a genome size of approximately 3.8 Mbp, which is unusually high in the genus *Carnobacterium*. The analysis of the genome of this strain indicates the presence of genes conferring the adaptation to the intestinal environment. The bacterium is able to survive during the gastro-intestinal transit in mice. Moreover, this strain is able to adhere to human intestinal epithelial cell lines and would have neutral or anti-inflammatory properties. These data suggest that *C. maltaromaticum* LMA 28 is adapted to the digestive tract of mammals. At the taxonomical level, it was shown that MLST is highly discriminatory for the species *C. maltaromaticum*. In addition, the MLST results suggest that milk and soft cheeses are poorly selective for strains of this species. In addition, two major clonal complexes suggest that a sub-population within this species is well adapted to the dairy environment or that a sub-population is submitted to a domestication process. A high proportion of singletons was obtained suggesting that the diversity was under-estimated and remains to be explored.

Keywords: *Carnobacterium maltaromaticum*, lactic acid bacteria, MLST, phylogeny, gastro-intestinal tract