



HAL
open science

Interference competition and genetic diversity at the intraspecific scale in the lactic acid bacterium *Carnobacterium maltaromaticum*

Nancy Ramia

► **To cite this version:**

Nancy Ramia. Interference competition and genetic diversity at the intraspecific scale in the lactic acid bacterium *Carnobacterium maltaromaticum*. Food engineering. Université de Lorraine; Université libanaise, 2018. English. NNT : 2018LORR0211 . tel-02096739

HAL Id: tel-02096739

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-02096739>

Submitted on 4 Jan 2021

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

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



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>



Université Libanaise
École Doctorale
Sciences et Technologies
Doyen



École Doctorale Sciences et Ingénierie
Ressources Procédés Produits Environnement

THESE EN COTUTELLE

Pour obtenir le grade de Docteur délivré par

L'Université de Lorraine

Ecole doctorale SIRENa - Sciences et Ingénierie des Ressources Naturelles

Spécialité : Génie Biotechnologique et Alimentaire

et

L'Université Libanaise

L'Ecole Doctorale des Sciences et Technologie

Spécialité : Biotechnologie

Présentée et soutenue publiquement par

RAMIA Nancy

Le 20 Décembre 2018

Compétition par interférence et diversité génétique à l'échelle intraspécifique chez la bactérie lactique *Carnobacterium maltaromaticum*

Directeur(s): **Revol-Junelles Anne-Marie, Taha Samir**

Co-encadrement de la thèse : **Borges Frédéric**

Membres du Jury

M^{me} Céline Delbès, Chargée de recherche-HDR,
UMRF 545 INRA, Auvergne-Rhône-Alpes

Rapporteur

M^r Philippe Normand, Directeur de recherche CNRS,
UMR 5557, Lyon

Rapporteur

M^{me} Anne-Marie Revol-Junelles, Professeur, LIBio,
Université de Lorraine

Directrice de thèse

M^r Samir Taha, Professeur, LBA3B ER032, EDST,
Université Libanaise

Directeur de thèse

M^r Frédéric Borges, Maître de conférences, LIBio,
Université de Lorraine

Examineur

M^r Ziad AbdelRazzak, Professeur, LBA3B ER032, EDST,
Université Libanaise

Examineur

Résumé

Compétition et diversité sont des phénomènes majeurs en microbiologie. Dans le secteur de l'agroalimentaire, la compétition est à la base de la biopréservation, un procédé dont l'objectif est d'inhiber des microorganismes indésirables par l'utilisation de microorganismes compétiteurs. La diversité microbienne est quant à elle à l'origine de la diversité de produits fermentés et en particulier de la typicité des fromages. Pourtant, l'écologie de la compétition microbienne dans les aliments et le lien avec la diversité microbienne sont très mal connus. L'objectif de ces travaux de thèse était d'une part d'étudier la diversité et d'autre part la compétition chez une bactérie représentative de l'écosystème fromager. Le modèle d'étude choisi est la bactérie lactique *Carnobacterium maltaromaticum*. Une analyse de diversité de 21 souches de *C. maltaromaticum* a été réalisée par MultiLocus Sequence Typing (MLST) et a permis de compléter la structure connue de la population de *C. maltaromaticum*. Cette étude a permis de révéler la présence de 56 génotypes au sein d'une collection de 71 souches, montrant une grande diversité génétique au sein de cette espèce. La compétition par interférence a été étudiée par réalisation de tests de compétition à haut débit. Chaque test de compétition mettait en jeu deux souches de la collection, une souche en situation d'expédition et une souche en situation de réception. Au total 5776 tests ont été réalisés à partir d'une collection de 76 souches. Les résultats ont révélé que 60% des souches inhibaient au moins une autre souche indiquant que la compétition intraspécifique est majeure au sein de l'espèce *C. maltaromaticum*. Par ailleurs, une grande variabilité de largeur de spectre d'inhibition et de sensibilité a été observée. Une approche d'analyse de réseau a révélé une architecture « nested » du réseau compétitif, suggérant que l'inhibition dépend non seulement des caractéristiques antagonistes des souches inhibitrices mais également du niveau de sensibilité des souches réceptrices. Une analyse génomique de 26 souches de la collection a été réalisée en vue de prédire leur contenu en gènes codant la synthèse de substances antagonistes et a permis d'identifier des gènes codant potentiellement des bactériocines. En conclusion, ces travaux ont montré que l'espèce *C. maltaromaticum* est, d'une part, caractérisée par une grande diversité génétique et que, d'autre part, la compétition par interférence est fréquente au sein de la population.

Mots-clés : *Carnobacterium maltaromaticum*, Compétition par interférence, Diversité génétique, Analyse de réseau, MLST, Génomique

Abstract

Competition and diversity are major phenomena in microbiology. In the agri-food sector, competition is the very basis of biopreservation, a process which objective is to inhibit undesirable microorganisms through the use of microbial competitors. Microbial diversity lies at the origin of the diversity of fermented products and particularly of the typicality of cheeses. However, the ecology of microbial competition in food and the link with microbial diversity are poorly understood. The goal of this thesis was to study the diversity and the competition of a representative model bacterium of the cheese ecosystem. The study model chosen is the lactic acid bacterium *Carnobacterium maltaromaticum*. An analysis of the diversity of 21 strains of *C. maltaromaticum* was performed by MultiLocus Sequence Typing (MLST) and allowed to complete the scheme of *C. maltaromaticum* population structure. This study revealed the presence of 56 genotypes among a collection of 71 strains, showing a high genetic diversity within this species. Interference competition was studied by performing high-throughput competition assays. Each competition assay involved two strains, one in the position of the sender strain and the other in the position of the receiver. In total, 5776 tests were performed on a collection of 76 strains. The results revealed that 60% of strains inhibited at least one other strain, indicating that intraspecific competition is major in *C. maltaromaticum*. Moreover, a large variability in the width of inhibition and sensitivity spectra has been observed. A network analysis approach revealed a nested architecture of the competitive network, suggesting that inhibition depends not only on the antagonistic characteristics of the inhibitory strains but also on the level of sensitivity of the receiver strains. A genomic analysis of 26 strains from the collection was performed in order to predict their gene content encoding the synthesis of antagonistic substances, and it allowed the identification of genes potentially encoding bacteriocins. In conclusion, this thesis has shown that the species *C. maltaromaticum* is characterized by a high genetic diversity and that interference competition is frequent in the population.

Keywords: *Carnobacterium maltaromaticum*, Interference competition, Genetic diversity, Network analysis, MLST, Genomics

Dédicace

Je dédie cette thèse,

À l'âme de mon très cher père Emile,

qui, je le sens, m'accompagne en permanence.

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour l'homme de succès et le père le plus aimant qu'il était.

À ma mère,

source de ma force,

en témoignage de ma reconnaissance infinie pour le soutien total, les sacrifices et tous les efforts qu'elle a faits pour que je poursuive mon éducation dans les meilleures conditions possibles.

À mes frères,

en souvenir d'une enfance dont nous avons partagé les meilleurs et les plus agréables moments, pour toute la complicité et l'entente qui nous unissent, ce travail est un témoignage de mon attachement et de mon amour.

À mon fiancé,

pour son soutien quotidien indéfectible, sa présence rassurante, et ses encouragements continus, source de ma persévérance.

Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés,

Nancy

Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé dans le cadre d'une cotutelle entre le Laboratoire d'Ingénierie des Biomolécules, LIBio, de l'École Doctorale SIRENa, sous la direction d'**Anne-Marie REVOL-JUNELLES**, Professeur à l'Université de Lorraine et Directrice du LIBio, et Monsieur **Jérôme STERPENICH**, Directeur de l'École Doctorale, et le Laboratoire de Biotechnologies Appliquées: Biomolécules, Biothérapies et Bioprocédés : LBA3B, de l'École Doctorale des Sciences et de Technologie, EDST, sous la direction de Monsieur **Fawaz AL OMAR**, Doyen de l'École Doctorale, et Monsieur **Mohamad KHALIL**, Directeur de l'École Doctorale. Au terme de ce travail, je souhaite vous adresser mes sincères remerciements pour m'avoir accueillie au sein de vos laboratoires.

Je tiens à remercier vivement les membres du jury, Monsieur **Philippe NORMAND**, Directeur de recherche au CNRS, Madame **Céline DELBÈS**, Chargée de recherche à l'INRA Auvergne-Rhône-Alpes, rapporteurs de thèse et Monsieur **Ziad ABDELRAZZAK**, Professeur à l'Université Libanaise, examinateur des travaux de thèse, pour avoir accepté de juger ce travail.

Je tiens également à témoigner toute ma reconnaissance à mes encadrants, Madame **Anne-Marie REVOL-JUNELLES**, directrice de thèse, Monsieur **Samir TAHA**, directeur de thèse, et l'encadrant de thèse, Monsieur **Frédéric BORGES**, Maître de Conférences et Chercheur à l'Université de Lorraine, pour avoir accepté de diriger ce travail. Leurs efforts combinés ont permis la mise en œuvre de cette thèse. Madame **Anne-Marie REVOL-JUNELLES**, malgré ses nombreuses responsabilités en tant que Directrice du LIBio et Professeur à l'ENSAIA, m'a accordée son temps précieux pour suivre de près l'avancement de mes travaux depuis le début de ma thèse, et jusqu'au moment présent. Elle a soutenu mes choix de participation à divers formations transversales et formations hors catalogue, malgré la durée relativement courte de ma thèse, et m'a ainsi encouragée à développer mes compétences de jeune chercheuse. Monsieur **Samir TAHA**, quant à lui, m'a accompagnée dès ma deuxième année de Master 2, en tant que Professeur et responsable de l'unité de ce Master. Il était le premier à m'encourager à faire un doctorat et m'a accordée l'opportunité de faire mon stage de Master 2 au LIBio, où j'ai poursuivi mes travaux de doctorat. Il m'a mis en contact avec mon encadrant de thèse Monsieur **Frédéric BORGES**, envers qui je suis particulièrement très reconnaissante pour ses conseils éclairants et généreux soutien. Je

remercie Monsieur **Frédéric BORGES** pour le temps qu'il a consacré à nos discussions scientifiques très enrichissantes.

J'aimerais aussi remercier l'équipe des bons moments du LIBio : Dr. **Cécile MANGAVEL** et Pr. **Claire GAIANI** pour les contributions qu'elles ont apportées à la valorisation scientifique de mes travaux de recherche, **Sylvie, Myriam** et **Annelore** pour leur soutien technique et bonne humeur. Mes vifs remerciements s'expriment également à **Marco Túlio PARDINI GONTIJO**, étudiant en 4^{ème} année en Génie Alimentaire, qui a participé à la production scientifique de résultats dans le cadre d'un stage qu'il a effectué au sein du LIBio. Je voudrais exprimer ma reconnaissance envers mes collègues en France, **Lamia, Sara, Janina**, et **Magda**, et aussi envers mes collègues au Liban, **Daher, Joseph** et **Ranime** qui m'ont apporté leur support moral et intellectuel tout au long de ma thèse.

Un très grand merci à mes amis **Kamil** et **Sarah** pour tous les moments de pur bonheur et de fou-rire. Qu'aurais-je fait sans leur thérapie anti-stress ?

Enfin, je remercie très chaleureusement ma mère, mes frères, et mon fiancé pour leur soutien, leurs encouragements et surtout leur amour. C'est avec beaucoup d'émotion que je vous dédie ce travail.

Table des matières

Résumé	2
Abstract	2
Dédicace.....	3
Remerciements	4
Liste des figures	9
Liste des tableaux	11
Liste des abréviations.....	12
Annexes	13
Introduction	15
Liste des publications et communications	18
Chapitre I : Revue Bibliographique	19
1. Interactions microbiennes dans l'aliment.....	20
1.1. Interactions microbiennes et aliments fermentés	20
1.2. Aliments non fermentés	25
1.3. Application des interactions antagonistes : la biopréservation	26
1.3.1. Définition du procédé.....	26
1.3.2. Agents de biopréservation et leurs critères de sélection.....	26
1.3.3. Mécanismes.....	27
1.3.4. Exemples d'application des bactériocines.....	34
1.3.5. Limites	34
1.4. Compétition et diversité	39
1.4.1. Ecologie de la compétition	39
1.4.2. Théorie des jeux : Pierre Papier Ciseaux	42
1.5. Réseaux écologiques de la compétition par interférence	45
1.5.1. Définition et typologies des réseaux écologiques	46
1.5.2. Caractéristiques des réseaux d'interaction compétitive par interférence	49
1.5.3. Relation entre inhibition et distance phylogénétique.....	50
2. Modèle d'étude : <i>Carnobacterium maltaromaticum</i>	52
2.1. Taxonomie et habitat.....	52
2.2. Pouvoir pathogène et statut de <i>C. maltaromaticum</i>	56
2.3. Compétition chez <i>C. maltaromaticum</i>	57
2.2. Diversité génétique chez <i>C. maltaromaticum</i>	59
3. Objectifs	61

Chapitre II: Résultats	63
1. Multilocus sequence typing of <i>Carnobacterium maltaromaticum</i> strains associated with fish disease and dairy products.	64
1.1. Préambule.....	64
1.2. Abstract	65
1.3. Introduction	66
1.4. Material and methods	67
1.4.1. Collection of bacterial strains.....	67
1.4.2. Multilocus sequencing.....	70
1.4.3. Nucleotides sequences analyses	70
1.4.4. Nucleotides sequences accession	70
1.5. Results	71
1.5.1. Analysis of allelic diversity at MLST loci	71
1.5.2. Assignment of sequence type numbers	72
1.5.3. Relatedness between diseased fish isolates and the other typed strains	72
1.5.4. Linkage disequilibrium in <i>C. maltaromaticum</i> population.....	75
1.5.5. Nucleotide diversity.....	75
1.6. Discussion	76
1.7. Acknowledgments	78
2. Nested structure of intraspecific interference competition in <i>Carnobacterium maltaromaticum</i>.....	79
2.1 Préambule.....	79
2.2 Abstract	80
2.3 Introduction	81
2.4 Material and methods	83
2.4.1 Collection of bacterial strains.....	83
2.4.2 Competition assays.....	87
2.4.3 High-throughput data processing.....	88
2.4.4 Statistical network analysis	89
2.4.5 Genome sequencing and assembly.....	90
2.4.6 Bacteriocin gene prediction	90
2.4.7 Evaluating correlation between bacteriocin genes predictions – inhibitory spectra at strain level	91
2.4.8 Secondary metabolites identification	91
2.5 Results	91

2.5.1	General features of the interference competition network among <i>C. maltaromaticum</i> strains	91
2.5.2	Assignment of individual interactive profiles to strains.....	93
2.5.3	Distribution of antagonistic activity, and sensitivity spectra	94
2.5.4	Interference competition and phylogeny	100
2.5.5	Genome mining of bacteriocin encoding clusters.....	101
2.5.6	Evaluating correlation between bacteriocin genes predictions – inhibitory spectra at strain level	105
2.5.7	Secondary metabolites report.....	106
2.6	Discussion	107
2.7	Aknowledgments.....	111
	Chapitre III: Discussion et Perspectives	112
	Chapitre IV : Références bibliographiques	124
	Annexes	146
	Résumé	153
	Abstract	153

Liste des figures

- Figure 1.** Schéma représentant la classification phénoménologique des interactions biotiques pouvant s'établir entre deux ou plusieurs individus appartenant à des espèces identiques ou différentes (X1 et X2) dans un écosystème donné. 23
- Figure 2.** Représentation schématique du mode d'action des bactériocines vis-à-vis de bactéries à Gram positif (a) et des bactéries à gram négatif (b) (Man-PTS : mannose phosphotransférase ; mcc : microcine ; TonB : récepteur de la membrane externe ; OmpF : protéine de la membrane externe f ; FhuA : récepteur de sidérophore fer ; SbmA : péptide transporteur de la membrane interne ; yejABEF : ABC transporteur, Cotter et al., 2013). 30
- Figure 3.** Représentation schématique du réseau équilibré des interactions antagonistes à 3 acteurs, identifié expérimentalement chez *E. coli* (d'après Kirkup and Riley, 2004). 43
- Figure 4.** Représentation schématique d'un réseau équilibré théorique à 9 acteurs. Chaque acteur est représenté par un cercle et chaque interaction antagoniste est représentée par une flèche dirigée de l'acteur producteur de la substance antagoniste, vers l'acteur inhibé par cette substance, sachant que la différence des substances est représentée par les différentes couleurs, d'après Abrudan et al., 2012). 42
- Figure 5.** Schéma représentant les différents types de réseaux (Newman, 2003) : 47
- Figure 6.** Schéma représentant les topologies variées des interactions biotiques qui sont fonction de la répartition des interactions binaires entre les individus situés sur l'axe des abscisses et les individus situés sur l'axe des ordonnées. 48
- Figure 7.** Relation entre la distance phylogénétique et la probabilité d'inhibition chez *Streptomyces* (d'après Vetsigian et al., 2011). 49
- Figure 8.** Représentation schématique des clusters de gènes codant la synthèse de bactériocines (la taille des clusters n'est pas représentée avec une échelle particulière). Les flèches noires représentent les gènes structuraux ; les flèches en gris foncé représentent les gènes des transporteurs ; celles en gris clair représentent les gènes de modification et de maturation ; celles avec des barres représentent les gènes d'immunité ; les flèches blanches représentent d'autres types de gènes comme les gènes de régulation de transcription (Alvarez-sieiro et al., 2016). 58
- Figure 9.** eBURST analysis of 71 *C. maltaromaticum* strains. Each sequence type st is represented by a circle that is proportional in size to the indicated number of strains characterized by a given ST. Dairy strains, strains isolated from diseased fish and non dairy strains are assigned dark grey, black and white colors respectively. Single locus variants (SLVS) are connected by solid lines and double locus variants (DLVS) are connected by broken lines. Clonal complexes (CC) are indicated in light grey. 73
- Figure 10.** Phylogeny. The tree was constructed based on the alignment of the concatenated sequence of the 56 STs. The grey, black and white circles symbolize dairy strains, strains isolated from diseased fish and non dairy strains, respectively. STs belonging to clonal complexes (CCs) are embraced with a grey rectangle in which the name of the clonal complex

is indicated. Tree construction was made with the neighbor joining method and was statistically tested with 1000 bootstrap replications. The bootstrap values are given as percentages, values below 80 are not shown.....	71
Figure 11. Mean nucleotide diversity. The mean nucleotide diversity was calculated for the overall population as well as for subpopulations.	72
Figure 12. A schematic flow chart of the experimental design used to perform high-throughput competition assays that test in each run the effect of 4 CFS of sender strains on the collection comprising all receiver strains.....	83
Figure 13. Principle of data processing.	89
Figure 14. Heatmap representing the pairwise interaction matrix between the 76 tested <i>C. maltaromaticum</i> strains and binary interactions (the bottom two framed rows) in which the 76 <i>C. maltaromaticum</i> strains are the sender strains targeting respectively <i>L. monocytogenes</i> EGDe and <i>L. monocytogenes</i> Δ mpt1. Red represents an antagonistic interaction while black represents a non-antagonistic interaction. X-axis depicts the tested strains in the position of senders and Y-axis depicts the tested strains in the position of receivers.	88
Figure 15. The number of <i>C. maltaromaticum</i> strains within the four different interactive profiles: PSR, SR, R, PR.....	89
Figure 16. Resistance degrees and maximal growth rates of 76 <i>C. maltaromaticum</i> receiver strains. Both strain characteristics were proved to be statistically correlated (correlation coefficient = 0,32 ; p-value = 0.04).....	94
Figure 17. Representation of the various antagonistic activity spectra (sender degrees) displayed by the sender strains.....	91
Figure 18. Representation of the various sensitivity spectra, receiver degrees, displayed by the receiver strains.....	92
Figure 19. The nested structure of the competitive network, represented by a heatmap correlating sender and receiver degrees. On the X-axis, sender strains (antagonizing at least one receiver strain) are sorted in the descending order of their respective sender degrees. On the Y-axis, receiver strains (antagonized by at least one sender strain) are sorted in the descending order of their respective receiver degrees.....	99
Figure 20. Frequencies of inhibitory interactions within and between clonal complexes.	97
Figure 21. The evaluation of correlation between the similarity matrix based on the antagonistic activity spectra of the 14 antagonistic <i>C. maltaromaticum</i> strains and the similarity matrix based on predictions of bacteriocin genes in their respective genomes.	106

Liste des tableaux

Tableau 1. Interactions microbiennes au sein des produits fermentés (Siewverts et al., 2008).	24
Tableau 2. Les différents composés antimicrobiens produits par les bactéries lactiques (Singh, 2018 ; Ghanbari et al., 2013; Paul Ross et al., 2002; Piard and Desmazeaud, 1991)..	28
Tableau 3. Classification générale des bactériocines.	31
Tableau 4. Les facteurs limitants l'efficacité des bactériocines dans l'aliment.	35
Tableau 5. Mesures topologiques de caractérisation de réseaux (Dans le cas d'un réseau dirigé, d'interactions antagonistes binaires) (Aguirre-von-Wobeser et al., 2014).	47
Tableau 6. Habitats de <i>C. maltaromaticum</i>	53
Table 7. Characteristics of the <i>C. maltaromaticum</i> strain collection.....	65
Table 8. The allelic diversity of <i>C. maltaromaticum</i> MLST loci.....	68
Table 9. Characteristics of the <i>C. maltaromaticum</i> strain collection used for competition assays.....	81
Table 10. Sender and receiver degrees characterizing strains of the competitive network.....	92
Table 11. Bacteriocin gene clusters identified in the genomes of the <i>C. maltaromaticum</i> strains. The letters indicate the presence of the bacteriocin gene (B) and/or the immunity gene (I). The results were a compilation of the automatic genome annotation and antiSMASH and BAGEL databases.....	98
Table 12. Secondary metabolites gene clusters identified in the genomes of the <i>C.</i> <i>maltaromaticum</i> strains. The genomes were analyzed using antiSMASH and the sign (+) indicates the presence of the secondary metabolite cluster. NRPS is acronym for Nonribosomal Peptide Synthetase.....	103

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique	GII : Growth inhibitory indicator	spp. : Species (plural)
ARN : Acide ribonucléique	GRAS : Generally Recognized As Safe	ST : Sequence Type
ATP : Adénosine triphosphate	kDa : Kilodalton	TSB-YE : Tryptic Soy Broth Yeast Extract
CC : Clonal Complex	LAB : Lactic Acid Bacteria	UFC : Unité Formant Colonie
CDI : Contact-Dependent Growth inhibition	Man-PTS : Mannose phosphotransférase	Souches bactériennes :
CO₂ : Dioxyde de Carbone	Mcc : microcine	C. : <i>Carnobacterium</i>
DF : Forme Dimérique	MLST : MultiLocus Sequence Typing	E. : <i>Escherichia</i>
DLV : Double Locus Variantes	NaCl : Chlorure de sodium	L. : <i>Listeria, Lactococcus</i>
EFSA : European Food Safety Authority	NRPS : Nonribosomal Peptide Synthetase	Lb. : <i>Lactobacillus</i>
FDA : Food and Drug Administration	PCR : Polymerase Chain Reaction	S. : <i>Staphylococcus</i>
g : Gramme	pH : Potentiel d'hydrogène	St. : <i>Streptococcus</i>
GABA : Acide γ -aminobutyrique	QPS : Qualified Presumption of Safety	
G (-) : Gram Négatif	SLV : Single Locus Variantes	
G (+) : Gram Positif	sp. : Species (singular)	

Annexes

Annexe 1. Schematic representation of the predicted bacteriocin encoding gene clusters done using the software “SnapGene” according to the following color code.....140

Annexe 2. Similarity matrices of a. antagonistic activity spectra displayed by the 26 *C. maltaromaticum* strains and b. predicted bacteriocin gene content, generated using DendroUPGMA and Jaccard index.....143

Annexe 3. Maximal growth rates and resistance degrees (number of non-antagonizing sender strains per receiver strain) of the 76 *C. maltaromaticum* receiver strains.....144

Introduction

Introduction

Ces travaux de recherche s'inscrivent dans la thématique globale du LIBio (Laboratoire d'Ingénierie des Biomolécules) développée autour de la valorisation d'agro-ressources à des fins alimentaires et non alimentaires, en alliant des concepts et méthodes en biochimie, physico-chimie, génie des procédés et microbiologie.

Le projet scientifique du LIBio est axé sur la compréhension de l'ensemble des phénomènes intervenant dans la structuration de la matière molle, qui permet le design contrôlé d'architectures complexes, à fonctionnalités ciblées et/ou adaptées à la vectorisation de différents composés actifs. La prise en compte de la composante biotique (bactéries, cellules eucaryotes) permet d'intégrer la complexité de l'aliment et/ou des systèmes biologiques dans la structuration des systèmes étudiés.

Afin d'atteindre ces objectifs, le projet scientifique est décliné en trois volets complémentaires dont un axé sur la conception de matrices fonctionnelles. Ce volet du projet scientifique a comme objectif de décrypter l'impact du procédé et des composantes abiotique et biotique sur les propriétés fonctionnelles, la structuration physico-chimique et la structuration biologique des matrices alimentaires. En effet, les interactions abiotiques entre la surface de la matrice, l'environnement et les procédés, influenceront la structuration et la fonctionnalité des systèmes alimentaires, notamment des systèmes déshydratés qui sont les modèles étudiés. Les interactions entre cette matrice et la composante biotique, représentée par les bactéries présentes dans de nombreux aliments, auront un impact sur la structuration des matrices alimentaires, notamment des matrices laitières. Les communautés bactériennes présentes dans les aliments sont complexes et, outre les interactions entre bactéries et matrice, les interactions entre bactéries pourront moduler la structuration des écosystèmes microbiens.

Les interactions étudiées au LIBio sont majoritairement les interactions antagonistes compétitives entre microorganismes. Leur compréhension permet de développer de nouvelles technologies de biopréservation afin d'améliorer la qualité et la sécurité microbiologique des aliments. Ce procédé de conservation alimentaire consiste à inoculer la matrice alimentaire avec des microorganismes sélectionnés pour leur capacité à inhiber la croissance de microorganismes indésirables. Dans l'objectif d'optimiser la sécurité sanitaire des aliments, la communauté scientifique a été amenée à étudier la compétition entre ces microorganismes de biopréservation et des bactéries pathogènes alimentaires. Si ces interactions ont fait l'objet de

nombreux travaux, la compétition entre l'ensemble des bactéries constitutives du microbiote alimentaire reste peu étudiée. L'objectif des travaux menés au laboratoire est d'appréhender les forces écologiques qui régissent l'ensemble de ces interactions, et d'analyser leur influence sur la structuration, la diversité de l'écosystème et l'efficacité des procédés de biopréservation.

Récemment, des approches de microbiologie à haut débit ont été développées au sein du laboratoire. Une étude menée au laboratoire, et à laquelle j'ai participé, a mis en place un système à haut débit permettant de réaliser des tests de compétition en utilisant comme souche indicatrice une souche bioluminescente du pathogène alimentaire *Listeria monocytogenes* (El Kheir et al., 2018). Ces approches à haut débit ont permis dans le cadre de ces travaux de thèse d'étudier les interactions microbiennes à plus grande échelle et de les cartographier sous la forme de réseaux écologiques. Ces approches ouvrent des perspectives particulièrement innovantes d'ingénierie de systèmes alimentaires comprenant une composante biotique.

Ce travail de thèse s'inscrit dans la continuité de ces travaux réalisés au laboratoire. L'objectif est d'étudier la compétition intraspécifique chez une bactérie lactique d'intérêt alimentaire et d'analyser la relation entre compétition et diversité bactérienne.

Les travaux de recherche ont été réalisés sur la bactérie modèle du laboratoire *Carnobacterium maltaromaticum*. Cette bactérie lactique colonise massivement certains aliments. Une étude récemment menée au laboratoire a montré, par l'application du MultiLocus Sequence Typing (MLST) sur une collection de 47 souches, que l'espèce *C. maltaromaticum* se caractérise par une grande diversité génétique (Rahman et al., 2014), qui peut refléter, dans une certaine mesure, la grande diversité des bactéries présentes dans l'aliment. En outre, des études antérieures au laboratoire ont révélé le fort potentiel de cette bactérie en tant que bactérie à activité antagoniste. En effet, l'utilisation de l'approche de bioluminescence décrite précédemment a permis de révéler le potentiel antagoniste vis-à-vis de *L. monocytogenes* d'environ 25% des souches d'une collection de *C. maltaromaticum* (résultats non publiés). *C. maltaromaticum* se révèle être un modèle approprié pour l'étude de la compétition microbienne couplée à un haut niveau de diversité.

Le premier objectif de cette thèse consistera à approfondir la diversité génétique de la population de *C. maltaromaticum* en intégrant, au schéma MLST précédemment établi

(Rahman et al., 2014), des souches en provenance de poissons malades ainsi que des souches d'origine laitière.

Le deuxième objectif de ce travail sera d'évaluer l'ampleur de la compétition intraspécifique chez *C. maltaromaticum* en mettant au point un système expérimental basé sur l'approche haut débit en vue de décrire et d'analyser le réseau écologique de compétition par interférence. Cette analyse de réseau sera complétée par une analyse génomique afin de prédire les acteurs moléculaires impliqués dans le phénomène de compétition observé au sein de l'espèce *C. maltaromaticum*.

Afin d'atteindre ces objectifs, une revue bibliographique a été réalisée sur la dimension écologique de la biopréservation des aliments, le lien entre la compétition microbienne et la diversité et les connaissances disponibles sur le modèle d'étude *C. maltaromaticum* en termes de diversité génétique et de compétition bactérienne.

Les résultats, présentés dans les chapitres 2 et 3, sont rédigés en anglais sous forme de publications. Le chapitre 2 présente la structure élargie de la population de *C. maltaromaticum* établie par la méthode de typage moléculaire MLST. Le chapitre 3 est dédié à la cartographie de la compétition intra-spécifique chez *C. maltaromaticum*, ainsi qu'à la description des caractéristiques du réseau compétitif et des caractéristiques génomiques de 26 souches présentant des propriétés écologiques particulières.

Une discussion générale et une conclusion relatives à ce travail sont présentées dans le dernier chapitre de cette thèse.

Liste des publications et communications

Communications orales et par affiche

Trois communications orales :

- **Ramia, N.E.**, Mangavel C., Taha, S., Revol-Junelles A.-M., Borges, F. Intraspecific interference competition and genetic diversity in *Carnobacterium maltaromaticum*, FoodMicro 2018, Berlin, Allemagne
- **Ramia, N.E.**, Mangavel C., Taha, S., Revol-Junelles A.-M., Borges, F. Nested structure of intraspecific interference competition in *Carnobacterium maltaromaticum*, 5èmes Journées GDR MuFoPAM, 2018, Paris, France
- Borges, F., **Ramia, N.E.**, Mangavel C., Taha, S., Revol-Junelles A.-M. Intraspecific interference competition and genetic diversity in *Carnobacterium maltaromaticum*, Congrès SFM, 2018, Paris, France

Une communication par affiche :

- **Ramia, N.E.**, Borges, F., Taha, S., Revol-Junelles A.-M. Rôle de la compétition par interférence sur la structuration de la population de *Carnobacterium maltaromaticum*, Séminaire RP2E 2018, Vandoeuvre-lès-Nancy, France

Publications

Une publication publiée :

- **Ramia, N.E.**, El Kheir, S.M., Taha, S., Mangavel, C., Revol-Junelles, A.-M., Borges, F., 2018. MultiLocus Sequence Typing of *Carnobacterium maltaromaticum* strains associated with fish disease and dairy products. *Journal of Applied Microbiology*. Oct 11. doi: 10.1111/jam.14127

Une publication en voie de soumission :

- **Ramia, N.E.**, Pardini-Gontijo, M.-T., Mangavel, C., Gaiani C., Taha, S., Revol-Junelles, A.-M., Borges, F., 2018. Nested Structure of Intraspecific Competition in *Carnobacterium maltaromaticum* (en voie de soumission).

Une publication publiée, avec participation à la réalisation de ce travail en début de thèse :

- El Kheir, S.M., Cherrat, L., Awussi, A.A., **Ramia, N.E.**, Taha, S., Rahman, A., Passerini, D., Leroi, F., Petit, J., Mangavel, C., Revol-Junelles, A.-M., Borges, F., 2018. High-Throughput Identification of Candidate Strains for Biopreservation by Using Bioluminescent *Listeria monocytogenes*. *Front. Microbiol.* 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01883>

Chapitre I : Revue Bibliographique

1. Interactions microbiennes dans l'aliment

La plupart des aliments peuvent être considérés comme des écosystèmes constitués de divers microorganismes, qui n'existent pas en tant qu'individus séparés n'interagissant pas, mais qui existent plutôt au niveau communautaire, formant ainsi les communautés microbiennes complexes de l'aliment (Dutton and Wolfe, 2013). Ces microorganismes comprennent les bactéries endogènes présentes initialement dans la matière première, des bactéries exogènes qui sont issues de l'environnement de production avec, éventuellement, présence de bactéries pathogènes ou d'altération. Des ferments commerciaux peuvent être intentionnellement ajoutés dans le cas des produits alimentaires fermentés ou biopréservés.

Les interactions entre ces divers microorganismes d'une part, et entre les microorganismes et la matrice alimentaire d'autre part, jouent un rôle crucial dans leur persistance et leur prévalence dans l'aliment. Les interactions microbiennes régissent donc la composition du microbiote alimentaire. Elles sont de divers types. Celles qui sont les plus étudiées sont probablement les interactions de nature antagoniste, qu'elles soient indirectes pour les nutriments ou liées à l'antagonisme direct entre les microorganismes (Ivey et al., 2013).

1.1. Interactions microbiennes et aliments fermentés

La fermentation, consistant en la dégradation microbienne de composés organiques sans oxydation nette, est exploitée dans le monde entier à des fins de production et de conservation alimentaire (Siewewerts 2008). C'est l'une des plus anciennes technologies de transformation des aliments connues, son utilisation remontant à 6 000 - 10 000 ans av. J.-C (Elsser-Gravesen and Elsser-Gravesen, 2014; Siewewerts 2008). La relation étroite entre le domaine de l'alimentation et le domaine de la microbiologie a été montrée, pour la première fois, par les expériences de Louis Pasteur, qui ont montré que les levures étaient responsables de la fermentation alcoolique du jus de raisin, le transformant en vin (Mortimer, 2000).

L'industrie alimentaire vise à optimiser les conditions favorisant la croissance de certaines communautés microbiennes bénéfiques, dont l'activité métabolique contribue à (i) l'allongement de la durée de vie du produit *via* la sécrétion de métabolites antimicrobiens en association avec la diminution de l'activité de l'eau, (ii) l'amélioration de la sécurité sanitaire

en inhibant le développement de bactéries pathogènes, (iii) l'augmentation de la valeur nutritionnelle et/ou (iv) l'amélioration de la qualité organoleptique du produit (Elsser-Gravesen and Elsser-Gravesen, 2014; Bourdichon et al., 2012; Hutkins, 2006).

Ces microorganismes ont ainsi une double fonction, assurant à la fois l'amélioration de la qualité globale (nutritionnelle et organoleptique) et microbiologique (durée de vie et sécurité sanitaire) de l'aliment fermenté. En effet ces deux qualités sont intrinsèquement liées. Un exemple est donné par la production d'acides organiques, qui contribue à l'inhibition des bactéries d'altération ou pathogènes mais également à la texture et au goût caractéristiques des produits fermentés.

La fermentation est à la base du mécanisme de conservation des aliments par voie biologique. L'exploitation du mécanisme de fermentation, pour garantir la sécurité sanitaire des aliments, gagne en popularité en raison de son approche écologiquement respectueuse (Elsser-Gravesen and Elsser-Gravesen, 2014; Ganguly, 2013), comparée à l'utilisation de conservateur de synthèse.

Lors de l'élaboration des produits fermentés, plusieurs types de microorganismes interviennent : des bactéries, des levures et des moisissures. Un inventaire des espèces microbiennes réalisé en 2002 inclue 82 espèces bactériennes et 31 espèces de levures et moisissures (Bourdichon et al., 2012). Parmi les bactéries, les bactéries lactiques (LAB) font partie des principaux microorganismes de fermentation (Giraffa, 2004). Ces bactéries forment un groupe de microorganismes à Gram positif (G (+)), hétérogènes sur les plans morphologiques et physiologiques mais qui ont en commun la capacité de production d'acide lactique à partir de l'hydrolyse des composés carbonés (Klaenhammer et al., 2005). Les différents genres bactériens inclus dans le terme de LAB ont fait l'objet de nombreuses controverses. Dans le *phylum* des *Firmicutes*, les LAB appartiennent à l'ordre des *Lactobacillales* et comprennent notamment le genre *Carnobacterium*.

Leur fonction essentielle dans l'élaboration des produits laitiers fermentés est l'acidification. Les LAB peuvent contribuer à d'autres activités, telle que la protéolyse, une voie biochimique essentielle pour le développement des arômes dans les aliments fermentés (Bintsis, 2018). Les LAB sont à l'origine de composés bioactifs et leur action libère divers composés dont des peptides, des exopolysaccharides, des acides gras, de l'acide γ -aminobutyrique (GABA), des acides et vitamines, qui contribuent à l'élaboration des produits alimentaires (Santiago-López et al., 2018).

Actuellement, l'application la plus importante des LAB est en tant que ferment primaire, ou ferment technologique, désigné par le terme anglo-saxon de « starter culture » : elles sont inoculées en début du processus de fabrication alimentaire, en grandes quantités, et dans des conditions assurant leur croissance optimale.

En outre, des ferments n'appartenant pas à la catégorie des « starter culture », dont l'ensemble est désigné par le terme ferment secondaire ou « adjunct culture », sont souvent intentionnellement introduits pour produire divers composés intervenant dans la qualité du produit. Ainsi des souches utilisatrices de citrate de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ou des souches de *Leuconostoc spp.* produisant, respectivement, des composés aromatiques et/ou du dioxyde de carbone, sont introduites dans certains fromages. Cette diversité va au-delà de souches appartenant à la catégorie des LAB.

La plupart des études réalisées sur les fermentations alimentaires se sont focalisées sur la performance individuelle du ferment, y compris ses interactions avec la matrice alimentaire (Sieuwerts et al., 2008). Cependant, les fermentations alimentaires sont généralement réalisées par des cultures mixtes de multiples souches ou espèces bactériennes (Hill et al., 2017; Smid and Lacroix, 2013) et leur action combinée est elle-même grandement modulée par les interactions microbiennes établies au sein des produits. Nombreux sont les défis à relever pour une application réussie de la fermentation *via* l'utilisation d'un consortium microbien, tels la compatibilité des différentes souches comprises dans le consortium et la stabilité du consortium microbien suite à son inoculation à l'échelle du bioréacteur (Jiang et al., 2017). Une étude récente chez la bactérie lactique *Lactobacillus sakei*, a démontré que dans des co-cultures conçues avec 3 souches différentes, la résistance au stress oxydant était très variable au sein de l'espèce *Lb. sakei* : la co-culture soit augmentait la résistance soit la diminuait. Or, la propriété de résistance au stress oxydant est une caractéristique, parmi plusieurs, à prendre en considération dans le cadre de l'évaluation de la performance d'un ferment (Guilbaud et al., 2012).

La stabilité des inocula de consortium microbien serait maintenue si la dynamique des interactions microbiennes est connue. Il est donc nécessaire d'appréhender ces interactions microbiennes pour une meilleure maîtrise des procédés de fermentation (Zagorec et al., 2012).

Les interactions entre microorganismes résultent d'une grande variété de mécanismes. Les effets de ces interactions sur le comportement de la souche peuvent être positifs, négatifs ou neutres. En fonction de leur impact sur chacun des microorganismes, ces interactions

peuvent être classées en 6 classes majeures, mutualisme, neutralisme, compétition, commensalisme, parasitisme et amensalisme (Smid and Lacroix, 2013 ; Sieuwerts 2008) (Figure 1). Les phénomènes de compétition sont détaillés dans le paragraphe 1.4.1.

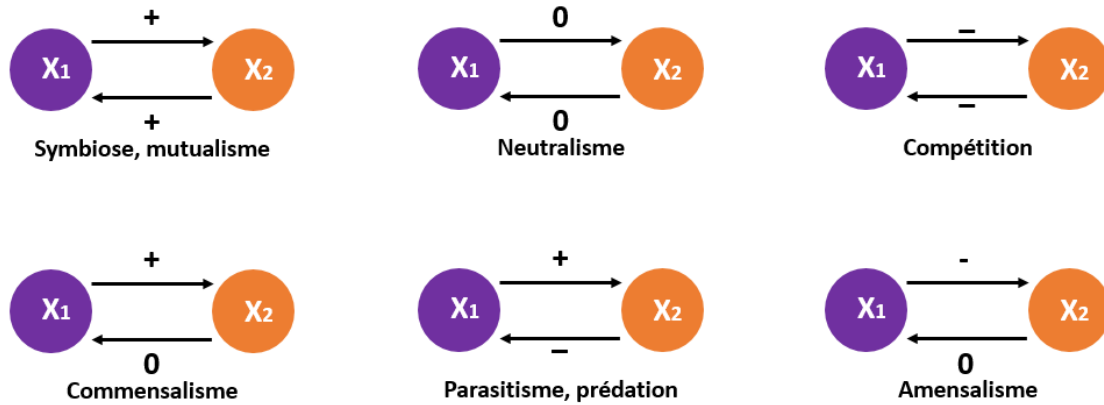


FIGURE 1. SCHÉMA REPRESENTANT LA CLASSIFICATION PHÉNOMÉNOLOGIQUE DES INTERACTIONS BIOTIQUES POUVANT S'ÉTABLIR ENTRE DEUX OU PLUSIEURS INDIVIDUS APPARTENANT A DES ESPÈCES IDENTIQUES OU DIFFÉRENTES (X1 ET X2) DANS UN ÉCOSYSTEME DONNÉ.

Les études sur les interactions microbiennes au sein des aliments fermentés ont révélé la grande diversité des interactions présentes au sein d'une grande variété d'aliments (Tableau 1, Sieuwerts 2008).

Plusieurs études à dimension écologique ont montré que les interactions bactériennes compétitives pouvaient promouvoir la stabilité microbienne, contrairement aux interactions mutualistes (Escalante et al., 2015; Hammerschmidt et al., 2014; Nowak, 2006). Ainsi, la compétition semble être plus favorable à la stabilité des consortia microbiens (composition et fonction)

Le rôle que jouent les interactions microbiennes dans la fermentation des aliments a été le plus étudié dans les produits laitiers, qui fournissent des modèles d'étude d'écosystèmes reproductibles, accessibles, cultivables et faciles à manipuler (Wolfe and Dutton, 2015). Un exemple d'écosystème simple, bien étudié, est le yaourt, pour lequel les études concernent les interactions complexes entre les deux bactéries, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* (Zagorec et al., 2012). Un autre exemple est donné par les interactions se produisant pendant la phase d'affinage du fromage, qui s'accompagne de limitations en fer. Cette limitation engendre une promotion de la compétition pour son acquisition et ainsi une inhibition de la croissance des bactéries aérobies d'affinage de la surface des fromages (Monnet et al., 2012).

TABLEAU 1 : INTERACTIONS MICROBIENNES AU SEIN DES PRODUITS FERMENTÉS (SIEUWERTS ET AL., 2008)

Type d'interaction et produit ou environnement	Organismes impliqués
<u>Mutualisme</u>	
Yaourt	<i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>
Laitier	LAB
Lait froid	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i>
Laitier, levain, milieu de laboratoire	LAB, levures, champignons
Lait	LAB, levures
Levain	<i>Saccharomyces exiguus</i> , <i>Candida humilis</i> , <i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>
Fromage affiné en surface	Divers espèces de moisissures, levures et bactéries
<u>Amensalisme</u>	
Laitier, bouillon de légumes	LAB, <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Staphylococcus</i> sp., <i>Yersinia</i> sp., <i>Bacillus</i> sp.
Bouillon de culture, milieu de laboratoire, bouillon de légumes	LAB, <i>Escherichia coli</i> , <i>Aspergillus</i> spp., <i>Enterobacter</i> sp., <i>L. monocytogenes</i> , <i>Vibrio</i> sp., <i>Salmonella</i> sp.
Vin	<i>Lactobacillus hilgardii</i> , <i>Pediococcus pentosaceus</i>
Yaourt	<i>S. thermophilus</i> , <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>
Viande	LAB, <i>L. monocytogenes</i>
Vin	Bactéries malo-lactiques, levures
Fromage affiné en surface	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>L. monocytogenes</i>
Laitue	LAB, <i>L. monocytogenes</i>
<u>Commensalisme</u>	
Laitier	LAB
Yaourt	<i>S. thermophilus</i> , <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>
Yaourt, laitier	propionibactéries
Lait	LAB, levures
Vin	Bactéries malo-lactiques, levures
Fromage affiné en surface	LAB, <i>Debaryomyces hansenii</i> , <i>Geotrichum candidum</i> , <i>Arthrobacter</i> sp., <i>Brevibacterium linens</i> , <i>Corynebacterium ammoniagenes</i> , staphylocoques
Milieu de laboratoire	Levures, <i>Bacterium linens</i>
Lait fermenté, yaourt, fromages	Levures, bactéries
<u>Compétition</u>	
Yaourt	<i>S. thermophilus</i> , <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>
Laitier	LAB, levures
<u>Parasitisme</u>	
Milieu de laboratoire	Bactérie, phage
Lait	Bactérie, phage
Environnements aquatiques	Bactérie, phage

Les aliments fermentés contiennent une biomasse microbienne élevée (Esnouf, 2017). Or, la présence d'une biomasse relativement élevée par rapport aux ressources disponibles conduit à leur limitation et donc à la promotion de la compétition (Bauer et al., 2018). La compétition est en effet considérée comme le principal moteur de la succession des communautés microbiennes dans la plupart des fermentations alimentaires (Ivey et al., 2013).

Dans les fromages, les nombreuses interactions microbiennes impliquées dans la dynamique du microbiote du fromage ne sont que partiellement élucidées. Ces interactions se déroulent depuis le début de la phase de fabrication des fromages jusqu'au processus d'affinage et mettent en jeu les LAB de la flore résidente et les LAB introduites en tant que cultures bioprotectrices (Gobetti et al., 2018).

La compétition au sein du microbiote du fromage, par ses répercussions sur la composition des écosystèmes microbiens, peut impacter les qualités organoleptiques de cet aliment. D'où la nécessité d'étudier le rôle et l'impact de la diversité microbienne des flores de surface des fromages sur leurs qualités organoleptiques (Deetae et al., 2009; Larpin-Laborde et al., 2011).

L'étude de la réponse des microorganismes à leur environnement, des relations entre microorganismes ainsi que l'analyse exhaustive de ces interactions et de leur implication dans les procédés fermentaires, est rendue possible grâce à la disponibilité de séquences génomiques pour plusieurs espèces bactériennes colonisant les aliments fermentés. C'est le cas par exemple des LAB, pour lesquelles des connaissances de pointe de leur physiologie, métabolisme et propriétés génétiques se sont développées : depuis le début du XXI^{ème} siècle, des données génomiques provenant de plus de 200 souches de LAB ont été intégrées dans différentes banques de données publiques (Douillard and de Vos, 2014; Sun et al., 2015). Les avancées en techniques de séquençage et d'analyse métagénomique sont prometteuses pour la compréhension de la dynamique des interactions des populations microbiennes concernées (Jiang et al., 2017).

1.2. Aliments non fermentés

Dans le cas des aliments non fermentés, la problématique de la compétition prend une dimension différente. En effet, dans ces aliments, la charge microbienne peut être relativement faible par rapport à celle caractérisant les aliments fermentés. Néanmoins, les

aliments non fermentés présentent une grande abondance d'espèces différentes, allant jusqu'à plusieurs milliers (Zagorec et al., 2012).

La charge microbienne, dans les aliments non fermentés, augmente en cas d'altération des aliments. Dans le cas de la viande, la compétition joue un rôle majeur dans la structuration des communautés microbiennes potentielles responsables de l'altération de la viande. L'issue de la compétition dépend largement des conditions de stockage de l'aliment qui déterminent la structure du microbiote qui va se former (Doulgeraki et al., 2012).

La compétition est ainsi un phénomène majeur, dans les aliments fermentés et non fermentés. Elle est exploitée surtout pour des fins d'application en biopréservation. Pour pouvoir prédire et maîtriser l'impact de ces applications sur l'écosystème dans son ensemble, il sera primordial d'appréhender les bases écologiques de la biopréservation.

1.3. Application des interactions antagonistes : la biopréservation

1.3.1. Définition du procédé

Une définition de ce procédé est donnée par Leroi, en 2014 : « La biopréservation des aliments, appelée également « bioconservation », « biocontrôle » ou encore « bioprotection », consiste en l'utilisation de microorganismes, appelés en d'autres termes cultures ou flores protectrices, ou leurs métabolites, afin de maîtriser la croissance de flores pathogènes et/ou d'altération » (Leroi, 2014). Son objectif est de renforcer la sécurité sanitaire des aliments ou d'en augmenter la durée de vie en inhibant la croissance de microorganismes pathogènes ou indésirables. Le procédé de biopréservation n'est pas en soi un concept nouveau. Il est utilisé depuis des siècles dans le cadre des produits fermentés. Son application à des produits non fermentés est plus récente et remonte à une dizaine d'années. Dans ces travaux de thèse, seule la stratégie consistant à ajouter volontairement dans un aliment un microorganisme positif sélectionné pour sa capacité à inhiber sera considérée.

1.3.2. Agents de biopréservation et leurs critères de sélection

Les principaux microorganismes impliqués dans la biopréservation sont les bactéries lactiques (Lucera et al., 2012). En effet, elles possèdent de nombreuses propriétés antibactériennes et font partie de la flore de nombreux aliments (Leroi 2014).

Il existe des critères de sélection des souches de LAB bioprotectrices à respecter pour garantir la réussite de la stratégie de biopréservation (Ghanbari et al, 2013).

- Critère de sécurité : Inoculer des aliments avec des LAB bioprotectrices et jugées sûres ; la majorité des bactéries lactiques bénéficient du statut anglo-saxon «GRAS» (Generally Recognized As Safe), attribué aux microorganismes considérés comme non pathogènes et attribué par la «FDA» (Food and Drug Administration, Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux). Un équivalent de ce statut au niveau européen est l'inscription dans la liste des microorganismes QPS (Qualified Presumption of Safety), adopté en 2007 par l'EFSA (European Food Safety Authority, Autorité Européenne de Sécurité des Aliments), qui comporte environ 200 espèces bactériennes dont un grand nombre de souches de LAB ;

- Critère de compatibilité : Les LAB bioprotectrices doivent être compatibles avec les aliments où leur introduction est envisagée, i) elles ne doivent pas modifier les caractéristiques organoleptiques de l'aliment et ii) elles doivent être capables de se maintenir dans la matrice de l'aliment et de maintenir leur potentiel antimicrobien tout au long du processus de sa fabrication et de sa conservation industrielle.

- Critère d'activité : les LAB bioprotectrices doivent avoir des propriétés antagonistes

- Critère d'efficacité : les LAB bioprotectrices doivent avoir une action antagoniste sur la souche cible dans l'aliment.

1.3.3 Mécanismes

Le potentiel antagoniste des bactéries lactiques bioprotectrices est dû à leurs propriétés compétitives, c'est-à-dire qu'elles peuvent se développer et dominer aux dépens des autres espèces et à leur capacité à produire diverses molécules aux propriétés inhibitrices dirigées contre les microorganismes indésirables de l'aliment. Ces molécules provoquent des effets bactériostatiques ou bactéricides vis-à-vis de la flore d'altération et/ou pathogène ciblée (Tableau 2).

Chapitre I : Revue bibliographique

TABLEAU 2 : LES DIFFÉRENTS COMPOSÉS ANTIMICROBIENS PRODUITS PAR LES BACTÉRIES LACTIQUES (SINGH, 2018 ; GHANBARI ET AL., 2013; PAUL ROSS ET AL., 2002; PIARD AND DESMAZEAUD, 1991).

Substances antagonistes	Mécanisme d'action	Exemples	Spectre d'activité
Bactériocines	Perméabilisation de la membrane	Nisine	Spectre d'activité étroit, limité aux bactéries G (+)
Acides organiques	Abaissement du pH interne et externe	Acide lactique Acide acétique	Actif vis-à-vis des bactéries G (+), G (-) et de certaines moisissures. Actif contre les bactéries G (+), G (-), <i>Clostridium</i> , certaines levures et moisissures
Peroxydes	Oxydation chimique des composants cellulaires	Peroxyde d'hydrogène	Large spectre d'activité vis-à-vis des bactéries, levures, moisissures
Reuterine	Inhibition de la synthèse d'ADN		Large spectre d'activité vis-à-vis des bactéries, levures, moisissures
Reutericycline	Dissipation de la force proton-motrice		Active contre les bactéries G (+) et G (-)
Dioxyde de Carbone	Création de conditions anaérobies antagonistes des bactéries aérobies strictes		Actif contre les bactéries psychrotrophes G (+) et plus spécialement celles G (-)
Diacétyl	Perméabilisation de la membrane	2,3-butanedione	Actif contre les bactéries G (+) et G (-)
Acides Gras	Perméabilisation de la membrane		Actifs vis-à-vis des bactéries G (+) et de quelques moisissures

Le procédé de biopréservation se base essentiellement sur l'utilisation des cultures bioprotectrices aptes à produire des bactériocines. L'étude de ces substances antagonistes occupe une place majeure dans les recherches ciblant les mécanismes d'action moléculaires à la base de la biopréservation.

Les bactériocines ont été découvertes pour la première fois il y a presque un siècle, lorsqu'une substance thermostable produite par une culture d'*Escherichia coli* V inhiba des souches d'*E. coli* S (Gratia, 1925). Ces substances ont été désignées sous le terme de « colicines » en référence à l'espèce productrice (Frederiq, 1946). Quant aux bactériocines produites par les bactéries lactiques, la première substance décrite était produite par *Streptococcus lactis* (Rogers, 1928), connue aujourd'hui sous le nom de *Lactococcus lactis* (McAuliffe et al., 2001). Cette substance a été nommée, ultérieurement, « nisine » (Mattick and Hirsch, 1947). L'activité antimicrobienne de la nisine a été démontrée, dans un fromage affiné, par l'inhibition de souche de *Clostridium* (Hirsch et al., 1951). Dès lors, leur association aux aliments a facilité l'utilisation des bactériocines. Cette utilisation a été recommandée dans les aliments pour lutter contre les contaminations par les bactéries pathogènes, d'autant plus que la production de bactériocines est un phénomène ubiquitaire, puisqu'il est considéré que 99% des espèces bactériennes peuvent produire au moins une bactériocine (Klaenhammer, 1988; Riley and Wertz, 2002).

Au cours du temps, différentes définitions ont été attribuées aux bactériocines. La première définition la plus retenue est celle proposée par Klaenhammer (1988), qui définit les bactériocines comme des protéines, ou complexes protéiques, présentant une activité bactéricide dirigée contre des espèces plus ou moins apparentées avec la souche productrice, qui elle est protégée par une protéine dite d'immunité (Klaenhammer, 1988). La plupart des bactériocines produites par les bactéries lactiques présentes des propriétés inhibitrices de bactéries à G (+) appartenant à différents genres de bactéries pathogènes dont *Clostridium*, *Staphylococcus* et *Listeria*.

Au fur et à mesure de l'avancée des études de caractérisation des bactériocines, leur définition a évolué avec une indication sur leur voie de synthèse. Ainsi, en 1995, les bactériocines sont définies comme « des peptides antibactériens, synthétisés par voies ribosomiques » (Jack et al., 1995). Elles sont sécrétées dans le milieu extracellulaire avec ou sans modifications post-traductionnelles.

En 2005, Cotter *et al.* définissent les bactériocines comme des petits peptides stables thermiquement, synthétisés par des bactéries, actifs vis-à-vis d'autres bactéries et pour lesquels le producteur développe un système d'immunité spécifique (Cotter et al 2005).

Récemment, les bactériocines ont été définies comme des peptides antimicrobiens synthétisés par des bactéries à G (+) et des bactéries à Gram négatif (G (-)) (Ahmad et al., 2017; Chikindas et al., 2018). Ces peptides sont sécrétés dans le milieu extracellulaire et peuvent agir comme agents biopréservatifs contre les bactéries indésirables (Nigam et al., 2014).

Les bactériocines produites par les bactéries lactiques forment un groupe hétérogène de peptides antimicrobiens qui se distinguent par leur structure et leur mode d'action.

Comme leur définition, la classification des bactériocines a évolué dans le temps en raison de leur forte divergence de structure, de mode d'excrétion et de mécanisme d'action. Cela a conduit à proposer plusieurs classifications (Tableau 3).

Les bactériocines agissent selon différents mécanismes (Figure 2, Cotter et al., 2013), en fonction de leur structure. Chez les LAB, les mécanismes d'action des bactériocines de classe I (lantibiotiques) et de classe II (les non lantibiotiques) sont les plus documentés.

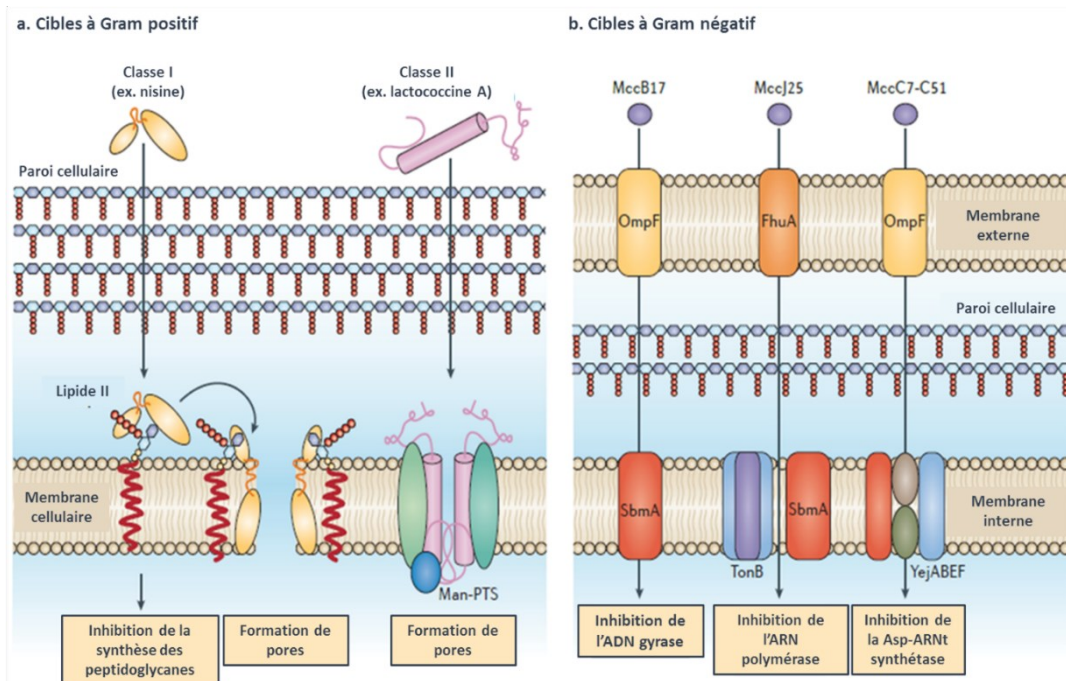


FIGURE 2. REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DU MODE D'ACTION DES BACTÉRIOCINES VIS-À-VIS DE BACTÉRIES À GRAM POSITIF (A) ET DES BACTÉRIES À GRAM NÉGATIF (B) (Man-PTS : MANNOSE PHOTOTRANSFÉRASE ; Mcc : MICROCINE ; TonB : RÉCEPTEUR DE LA MEMBRANE EXTERNE ; OmpF : PROTÉINE DE LA MEMBRANE EXTERNE F ; FhuA :

RÉCEPTEUR DE SIDÉROPHORE FER ; SbmA : PÉPTIDE TRANSPORTEUR DE LA MEMBRANE INTERNE ; yejABEF : ABC TRANSPORTEUR, COTTER ET AL., 2013).

TABLEAU 3 : CLASSIFICATION GÉNÉRALE DES BACTÉRIOCINES.

Classe	Caractéristiques générales	Classe	Spécificités	Exemples	Références
I	a. Petits peptides/lantibiotiques (< 5 kDa) ; b. Présence d'acides aminés différenciés, comme la lanthionine et β-méthyl-lanthionine ; c. Présence de modifications post-traductionnelles ; d. Thermostables.	Ia	a. Molécules linéaires et chargées positivement ; b. Activité bactéricide grâce à la formation de pores dans la membrane.	Nisine	(Ahmad et al., 2017; Garneau et al., 2002)
		Ib	a. Molécules globulaires, rigides, avec une charge négative ou sans charge nette ; b. Inhibent des nécessaires aux processus vitaux des bactéries sensibles.	Lacticine 481, Cytolysine, Mersacidine et Salivaricine	
II	a. Peptides de taille moyenne (< 10 kDa) ; b. Absence d'acides aminés modifiés ; c. Contiennent un peptide leader double-glycine qui est clivé pour l'activation de la bactériocine ; d. Thermostables.	Ila	a. Action contre <i>Listeria</i> spp. b. Présence d'une séquence conservée Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-Xaa-Cys hydrophile à la région N-terminale ;	Leucocine A, Acidocine A, Mesentericine, Pédiocine PA-1 et Sakacine P	(Ahmad et al., 2017; Garneau et al., 2002)
		I Ib	a. Présence d'au moins deux séquences peptidiques qui agissent en synergie ; b. Faible ou nulle activité individuelle.	Lactococcine G et Plantaricine A	
		I Ic	a. Thiolbiotiques : deux résidus de cystéine ; b. Cystibiotiques : un résidu de cystéine. c. Affectent la perméabilité membranaire.	Lactococcine A, Divergicine A et Acidocine B	
III	a. Peptides plus complexes et plus grands (> 30 kDa) ; b. Thermolabiles.	IIIa	Lytiques Endopeptidases avec effet bactériolytique grâce à leur capacité d'hydrolyser la partie peptidique du peptidoglycane ;	Zoocine A, Helveticine V et Lysostaphine	(Ahmad et al., 2017; Garneau et al., 2002)

Chapitre I : Revue bibliographique

		IIIb	a. Non-lytiques b. Multiples mécanismes d'adhésion aux transporteurs membranaires.	Helveticine J, Dysgalacticine et Streptococcine A-M57	
IV*	a. Peptides encore plus complexes contenant des lipides et des glucides dans leur structure ; b. Sensibilité aux enzymes lipolytiques et glycolytiques ;		-	Plantaricine S et Leuconocine S	(Ahmad et al., 2017)
V** (Circulaires)	a. Peptides circulaires de petite taille (< 8 kDa) ; b. Les régions N-terminale et C-terminale sont liées par une liaison covalente ; c. Forte stabilité par rapport à la température, au pH et aux enzymes protéolytiques ;		-	Carnocycline A, Circularine A, Uberolysine, Leucocyclicine, Garovicine ML, Amylocycline	(Gabrielsen et al., 2014)

* Certains auteurs considèrent que la classe IV n'existe pas car la présence de lipides et de glucides peut être une conséquence de la purification et non pas d'une modification naturelle.

** Certains auteurs les classifient aussi dans les classes I, II, III et IV.

1.3.4. Exemples d'application des bactériocines

Les bactériocines les plus étudiées, et pour lesquelles une utilisation commerciale en industrie alimentaire est approuvée, sont la nisine et la pédiocine PA-1. La nisine a été commercialisée pour la première fois, en tant qu'additif alimentaire E234, en Angleterre, en 1953. Depuis, son utilisation a été approuvée dans plus de 50 pays. L'utilisation de la nisine est démocratisée surtout dans les produits laitiers et le fromage fondu. Dans ces cas, la bactériocine est incorporée au produit sous forme de poudre concentrée séchée, bien que non purifiée, faite avec des ingrédients de qualité alimentaire (Favaro et al., 2015). Dans le cas de la pédiocine, la bactériocine n'est pas directement incorporée dans la matrice alimentaire. L'autorisation d'utilisation concerne plutôt les souches productrices de la pédiocine qui sont ajoutées en tant qu'ingrédients et qui sont utilisées dans la filière laitière pour inhiber *L. monocytogenes*.

Bien que plusieurs bactériocines de LAB aient été caractérisées à ce jour, leur utilisation en tant que conservateurs alimentaires reste très limitée en raison de plusieurs contraintes technologiques ou législatives. Pourtant, le potentiel bio-protecteur de diverses bactériocines a été validé, mais ces substances ne sont toujours pas approuvées comme additifs alimentaires antimicrobiens (Naghmouchi et al., 2007). Des études d'identification de nouvelles bactériocines se poursuivent malgré les contraintes de démocratisation d'usage. A titre d'exemple, une étude récente a démontré le potentiel antimicrobien d'une nouvelle bactériocine, la sonorensine, contre des bactéries à G (+) et des bactéries à G (-). Cette bactériocine s'avère efficace pour le contrôle de *L. monocytogenes* et *Staphylococcus aureus* (Chopra et al., 2015). Il a été démontré que des LAB isolées de légumes fermentés produisaient des bactériocines à la fois inhibitrices de bactéries à G (+) et de bactéries pathogènes de l'aliment à G (-) (Mokoena, 2017). En outre, la commercialisation de cultures bioprotectrices constituées d'un mélange de diverses espèces de LAB se met en place, comme pour le « Lyofast CNBAL », un mélange de souches appartenant au genre *Carnobacterium*, et capables d'inhiber des souches de *Pseudomonas* contaminant un fromage emballé (Spanu et al., 2018).

1.3.5. Limites

Afin d'optimiser l'inhibition des microorganismes indésirables, des études se sont centrées sur l'évaluation des limites du procédé de biopréservation liées à l'échec d'inactivation

des souches cibles. Ces études ont principalement pour objectif d'élucider les facteurs abiotiques et biotiques pouvant jouer le rôle de barrière à l'efficacité antimicrobienne du procédé. Très peu de données sont disponibles dans la littérature concernant les interactions entre ce procédé et l'écosystème alimentaire; ces bactéries bioprotectrices rencontreront dans les matrices alimentaires complexes de multiples micro-environnements et pourront interagir, non seulement avec les bactéries cibles, mais également avec les communautés microbiennes en présence.

1.3.5.1. Connaissances centrées sur les limites du procédé de biopréservation

Les investigations récentes des limites des stratégies de biopréservation se focalisent sur les facteurs, liés à l'aliment, qui limitent l'efficacité des bactériocines.

Cette efficacité dépendra, dans la plupart des cas, des interactions entre bactériocines et constituants de la matrice alimentaire, y compris les interactions entre bactéries de l'aliment et bactéries productrices de bactériocines, ou d'une précipitation, inactivation ou distribution spatiale non uniforme des molécules de bactériocine dans la matrice. Outre les facteurs liés à l'aliment, des facteurs liés à la bactérie cible elle-même peuvent tout de même limiter l'efficacité antimicrobienne, comme : i) la charge microbienne en bactérie cible ; une charge élevée nécessitera une concentration supérieure en bactériocines pour inactiver la cible, ii) les variations en sensibilité aux bactériocines ; l'état physiologique de la cible peut largement influencer la sensibilité aux bactériocines, sachant que des bactéries ne se développant pas activement peuvent être plus résistantes aux bactériocines, iii) la protection par des barrières physico-chimiques, les biofilms par exemple, iv) le développement de résistance ou d'adaptation au stress causé par les bactériocines (Tableau 4, Gálvez et al., 2007).

Etant donné que l'efficacité de la substance microbienne est étroitement liée à la souche bioprotectrice productrice, toute contrainte au succès d'implantation de la souche dans la matrice sera une limite à la stratégie de biopréservation. L'échec d'implantation du ferment commercialisé *Lactobacillus rhamnosus* GG, dans le lait, causé par son incapacité à dégrader

la caséine et le lactose, est un des exemples qui soulignent la nécessité de concevoir des stratégies performantes de maintien des inocula de ferments dans les matrices (Kort et al., 2015).

TABLEAU 4 : LES FACTEURS LIMITANTS L'EFFICACITÉ DES BACTÉRIOCINES DANS L'ALIMENT.

Facteurs liés à l'aliment

- Conditions de la transformation alimentaire
- Température de stockage
- pH et instabilité de la bactériocine face aux changements de pH
- Inactivation par les enzymes de l'aliment
- interaction avec les additifs/ ingrédients de l'aliment
- Adsorption des bactériocines aux composants de la matrice alimentaire
- Faible solubilité et distribution hétérogène dans la matrice alimentaire
- Stabilité limitée de la bactériocine pendant la durée de vie de l'aliment

Le microbiote alimentaire

- Charge microbienne
- Diversité microbienne
- Sensibilité aux bactériocines
- Interactions microbiennes dans l'écosystème alimentaire

Bactéries cibles

- Charge microbienne
 - Sensibilité aux bactériocines (Gram, genre, espèce, souche)
 - Etat physiologique
 - Protection par les barrières physico-chimiques (biofilms)
 - Développement de résistance/adaptation
-

1.3.5.2. Connaissances limitées des répercussions du procédé de biopréservation sur la micro-diversité des aliments

Les bactéries productrices de bactériocines peuvent entrer en compétition avec le microbiote de l'aliment (Campos et al., 2013) et avoir un impact négatif sur la diversité du microbiote alimentaire.

Il a été montré que la bactérie lactique *C. maltaromaticum*, qui n'est pas utilisée à ce jour comme ferment commercial, se caractérise par une grande diversité génétique dans les produits laitiers (Rahman et al., 2014). La grande diversité de cette bactérie contraste fortement avec la faible diversité de bactéries lactiques, telles que *L. lactis*, utilisées depuis longtemps comme ferments (Passerini et al., 2010). Ces résultats confortent l'idée que l'utilisation massive de ferments se traduit par une dominance des souches industrielles et une baisse de diversité des souches de la même espèce présentes naturellement dans les matières premières et retrouvées dans les produits fermentés.

Pour les produits laitiers fermentés, le maintien de la diversité microbiologique provenant de la flore naturelle du lait est important pour maintenir la typicité et la richesse organoleptique des produits et pour contribuer à leur sécurité sanitaire *via* l'action de consortia microbiens sur des bactéries pathogènes alimentaires. Le lien entre diversité d'une part, et typicité et sécurité du produit d'une autre part, a été étudié dans le fromage. Dans une revue de littérature, Montel *et al.* présentent des études qui ont démontré que la diversité microbienne du lait est à l'origine de la diversité des caractéristiques sensorielles du fromage. La fabrication de fromages expérimentaux, sans variations des conditions de fabrication et de maturation, produisait des fromages qui différaient par leur goût et leur texture. La différence des propriétés organoleptiques était corrélée avec le seul facteur qui variait lors du processus de fabrication, à savoir la composition du microbiote des différents échantillons de lait cru des fromages expérimentaux produits (Montel et al., 2014). Ces résultats suggèrent que la dynamique des populations microbiennes présentes dans les consortia laitiers conditionne directement les propriétés organoleptiques des fromages fabriqués à partir des laits hébergeant ces consortia.

La diversité du microbiote alimentaire est jouée un rôle important, non seulement à l'échelle de la microflore naturelle du lait, mais aussi à l'échelle des produits fermentés. De nombreuses études ont identifié, à la surface de divers fromages, des consortia multi-spécifiques présentant des propriétés antagonistes vis-à-vis de *L. monocytogenes* (Eppert et al., 1997; Imran et al., 2010; Maoz et al., 2003; Saubusse et al., 2007; Roth et al., 2010). Retureau *et al.* ont montré que 10 consortia complexes, issus de croûtes de fromages de Saint Nectaire, parmi 34 testés, inhibaient la croissance de *L. monocytogenes*. La nature hypothétique de l'inhibition est la production de bactériocines par les bactéries membres des consortia, lesquels étaient non acidifiants. Ces résultats valident l'hypothèse selon laquelle la diversité microbienne est un atout pour inhiber *L. monocytogenes* dans les fromages au lait cru (Retureau et al., 2010). Plus récemment, Callon *et al.* 2014 testèrent l'activité antagoniste anti-*Listeria* de différents consortia reconstitués à partir d'un consortium naturel inhibiteur de *Listeria*, et ont pu démontrer que le consortium naturel caractérisé par le niveau de diversité le plus élevé était le plus inhibiteur soulignant l'importance du maintien de la microdiversité naturelle dans la sécurité des aliments.

Il demeure donc nécessaire de bien appréhender les forces écologiques agissant sur la diversité du microbiote alimentaire. Ceci permettra de garantir au mieux le maintien de cette

diversité, comme impératif pour la maîtrise de la qualité et de la sécurité des produits alimentaires.

1.4. Compétition et diversité

1.4.1. Ecologie de la compétition

L'aliment, d'un point de vue écologique, correspond à un écosystème dans lequel le biotope est caractérisé par l'ensemble des propriétés physico-chimiques de la matrice alimentaire, et la biocénose se compose de la communauté microbienne de l'aliment. L'espace de l'écosystème partagé par plusieurs populations correspond à l'habitat (Dutton and Wolfe, 2013). Cet habitat, pour une espèce donnée, est déterminé par la niche écologique de l'espèce qui correspond à l'ensemble des facteurs environnementaux favorisant sa croissance (Hibbing et al., 2010).

Une niche écologique n'est pas exclusive à une espèce particulière. En effet, dans la nature existent des guildes ; une guilda est un groupe d'espèces occupant une niche commune, et exploitant donc des mêmes ressources (Song et al., 2014).

Les ressources nutritionnelles ont toujours été un point focal dans l'étude de la compétition microbienne. Jacques Monod, un pionnier dans les études des cinétiques de croissance bactérienne, a démontré la relation étroite entre croissance bactérienne et concentration en nutriments limitants. Dans un milieu chimiquement défini, dans lequel tous les éléments sauf un sont en excès, le taux de croissance est proportionnel à la concentration initiale en cet élément limitant. Le taux de croissance n'est pas le seul à être affecté par des concentrations faibles en ressources. En fait, un épuisement total de ressources partagées entraîne un arrêt simultané de toute croissance bactérienne quand la population bactérienne dominante atteint sa phase stationnaire. Cet effet de suppression de croissance est connu sous le nom d'effet Jameson et conduit à une réduction de la population maximale atteinte, mais sans modification du temps de latence et du taux de croissance (Cornu et al., 2011).

1.4.1.1. Définition de la compétition

Plusieurs classifications de la compétition ont été proposées. Il y a la classification basée sur le caractère réciproque d'un effet négatif entre les organismes. Ce cas correspond à

la situation où les deux organismes exploitent les mêmes ressources. Dans cette même classification, le cas où l'effet négatif est exercé par un seul microorganisme sur l'autre et faisant intervenir la production de substances antagonistes est appelée amensalisme (Kirshman, 2015) (§ 1.1, Figure 1). Dans une autre classification, la compétition entre deux organismes correspond aux interactions dont l'issue se traduit par l'exclusion d'un des deux organismes. Dans le cadre de cette classification, deux types de compétition sont distingués : la compétition par exploitation et la compétition par interférence. Dans la compétition par exploitation un organisme exclut l'autre par sa capacité à utiliser plus efficacement les ressources nutritionnelles. Dans la compétition par interférence, un organisme exclut l'autre grâce à la production de substances antagonistes (Case and Gilpin, 1974).

1.4.1.1.1. Compétition par exploitation

La compétition par exploitation peut résulter de diverses stratégies.

La première stratégie consiste en une absorption accrue de nutriments. Dans les écosystèmes d'aliments fermentés, c'est le cas des bactéries en compétition pour les sources de carbone, qui peuvent pourtant être présentes à des concentrations élevées dans la matrice alimentaire. Cette première stratégie est caractérisée par des taux de croissance bactérienne élevés des bactéries compétitrices, couplés à des rendements faibles (Ghoul and Mitri, 2016), sachant qu'un rendement ou « yield » correspond à la portion du substrat consommé convertie en biomasse ou ATP (Lipson, 2015). Par cette stratégie, les bactéries compétitrices absorbent plus rapidement les nutriments que les autres bactéries.

La deuxième stratégie de la compétition par exploitation se traduit par une sécrétion extracellulaire de molécules qui vont favoriser l'assimilation de nutriments. Elle comprend la production d'enzymes digestives qui dégradent des substrats de la matrice alimentaire, les rendant ainsi assimilables par les bactéries.

Cependant, ces molécules sont souvent coûteuses à produire et le fait qu'elles soient sécrétées dans le milieu extracellulaire de la bactérie productrice rend ces molécules accessibles aux bactéries voisines qui peuvent en bénéficier. Par conséquent, une autre stratégie de compétition par exploitation demeure possible et consiste en l'exploitation par une bactérie, des sécrétions d'autres bactéries tout en réduisant sa propre sécrétion de

molécules. Cette dernière stratégie, souvent décrite par le terme « tricherie », se produit souvent aux derniers stades de la fermentation et se manifeste par l'exploitation effectuée par les « tricheurs » de l'action des enzymes protéolytiques sécrétées par d'autres bactéries, en vue de l'assimilation des peptides libérés dans la matrice (Siewwerts et al., 2008).

Bien que la compétition par exploitation soit un phénomène de plus en plus étudié, rares sont les études proposant l'utilisation de cette interaction écologique à des fins d'application en industrie alimentaire. Pourtant, une application en biopréservation serait envisageable. D'après une étude menée par Nilsson *et al.*, une souche de *C. maltaromaticum* non productrice de bactériocines est capable d'exclure *L. monocytogenes* par déplétion de glucose (Nilsson et al., 2005). *Lactobacillus sakei* subsp. *carneus* (10A), une bactérie lactique non productrice de bactériocines, est capable d'inhiber *L. monocytogenes*, suggérant que la compétition pour des nutriments spécifiques ou leur déplétion par la bactérie lactique testée pourraient expliquer l'effet bioprotecteur de *Lb. sakei* subsp. *carneus* (10A) (Vermeiren et al., 2006). De plus, l'hypothèse d'une compétition par exploitation a été attribuée à l'activité anti-*Listeria* de deux consortia microbiens issus de fromage (Roth et al., 2010, 2011).

1.4.1.1.2. Compétition par interférence

La compétition par interférence est une forme directe de compétition reposant sur la capacité de certains microorganismes à produire des substances antagonistes inhibant directement la croissance d'autres microorganismes, provoquant par conséquent leur exclusion potentielle (Ghoul and Mitri, 2016). Contrairement à la compétition par exploitation, la compétition par interférence, quant à elle, est à la base d'applications majeures en biopréservation.

L'exemple classique de la compétition par interférence implique la production de substances antagonistes diffusibles. Ces substances peuvent, par exemple, être des bactériocines. Quant aux applications en industrie agroalimentaire basées sur le concept d'interférence on peut citer, à titre d'exemple, l'utilisation dans le fromage de la nisine contre *L. monocytogenes* et *Clostridium botulinum* et de la pédiocine AcH contre *L. monocytogenes* et *Staphylococcus aureus* (Singh, 2018).

La stratégie compétitive illustrant le mieux la forme directe de cette compétition, est l'utilisation du système de sécrétion de type VI, dépendant du contact, par lequel les bactéries injectent des toxines à leurs compétiteurs voisins pour favoriser la lyse cellulaire (Russell et al., 2014). Dans la catégorie des inhibitions qui dépendent du contact s'ajoute le mécanisme «CDI» (Contact-Dependent Growth inhibition), caractérisé par un transfert de domaines de toxines inhibiteurs de la croissance des bactéries cibles voisines après un contact direct avec la bactérie délivrant les domaines. Le mécanisme CDI ne peut pas se produire chez les bactéries Gram+ en raison de la présence d'une paroi épaisse de peptidoglycane empêchant le transfert de toxines à travers la membrane externe. Cependant, des espèces de *Listeria* possèdent l'analogie au système d'inhibition *via* CDI (Rendueles and Ghigo, 2015).

La relation entre compétition par interférence et compétition par exploitation est étroite. La compétition par interférence, en particulier *via* la production de bactériocines, facilite l'accès aux ressources, conférant ainsi un avantage compétitif aux bactéries productrices par rapport aux bactéries non productrices partageant les mêmes ressources (Mao et al., 2015, 2014). En d'autres termes, la compétition par interférence est un outil stratégique qui donne un avantage aux producteurs de bactériocines face aux compétiteurs non producteurs lors d'un scénario de compétition pour les ressources.

1.4.2. Théorie des jeux : Pierre Papier Ciseaux

1.4.2.1. Concilier compétition par interférence et diversité dans un modèle à trois acteurs

Une hypothèse simple quant aux conséquences écologiques de la production de substances antagonistes telles que les bactériocines est qu'elle devrait se traduire par une diminution de la diversité. En effet, dans les modèles simples de compétition à deux acteurs où une bactérie productrice de bactériocines et une bactérie sensible sont mises en jeu, la bactérie productrice de bactériocines prend le dessus sur la souche sensible et induit ainsi une diminution du niveau de diversité. Or, il a été mis en évidence expérimentalement chez *Escherichia coli*, qu'il était possible de concilier diversité et antagonisme dans le cas de la production de la bactériocine colicine (Kirkup and Riley, 2004). En présence d'une bactérie résistante non productrice de bactériocines, une coexistence est possible entre les trois génotypes : ceux de la bactérie productrice, de la bactérie sensible et de la bactérie résistante. Ces trois acteurs se maintiennent dans l'écosystème et ce maintien est attribué à un équilibre

régi par des relations dont les règles sont similaires à celles du jeu populaire « Pierre-Papier-Ciseaux » : le producteur sera plus compétitif que le sensible qu’il inhibe, lequel sera plus compétitif que le résistant car il ne subit pas le coût de la résistance, ce dernier étant plus compétitif que le producteur car il ne subit pas le coût de la production de substances inhibitrices (Figure 3).

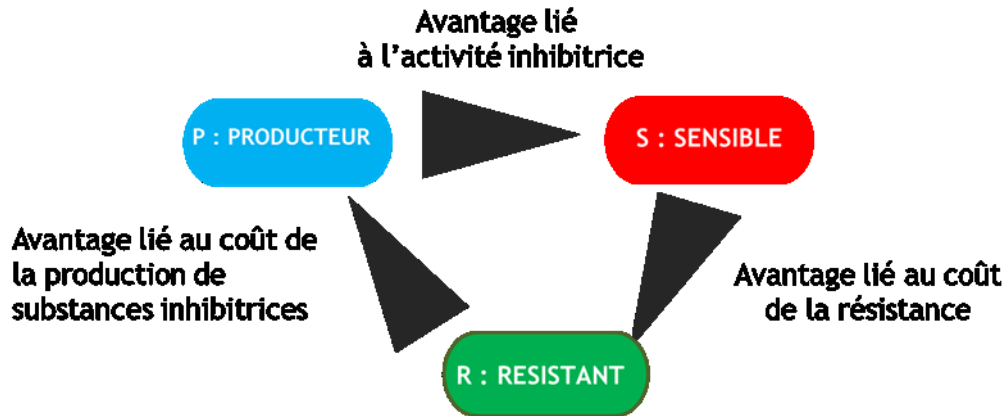


FIGURE 3. REPRÉSENTATION SCHEMATIQUE DU RESEAU EQUILIBRE DES INTERACTIONS ANTAGONISTES À 3 ACTEURS, IDENTIFIÉ EXPÉRIMENTALEMENT CHEZ *Escherichia coli* (D’APRES KIRKUP AND RILEY, 2004).

L’équilibre se mettant en place est dû aux coûts métaboliques que doivent assumer les producteurs et les résistants, sachant que le coût de la production de composés antibactériens est supérieur au coût de la résistance. Ainsi, dans le cas des producteurs, les ressources assimilées doivent être partagées entre la machinerie de croissance cellulaire et la machinerie de production des bactériocines (Blanchard et al., 2016).

1.4.2.2. Modélisation : critères à respecter pour augmenter la diversité en présence de la compétition par interférence

Une étude de modélisation, réalisée *in silico*, suggère qu’il est possible d’augmenter le nombre d’acteurs interagissant par compétition par interférence dans un écosystème modèle et de maintenir tous les acteurs de façon stable (Kerr et al., 2002). Dans l’exemple d’un modèle à neuf acteurs, chaque acteur produit une substance inhibant quatre autres acteurs et est inhibé par les quatre autres acteurs (Figure 4). Plus généralement, chaque toxine doit inhiber $(n-1)/2$ acteurs (lorsque n est impair) ou $n/2$ acteurs (lorsque n est pair). Dans ces systèmes, chaque acteur a trois statuts, tous produisent des substances donc sont producteurs, tous sont sensibles à trois substances et tous sont résistants à au moins une substance.



FIGURE 4. REPRESENTATION SCHÉMATIQUE D'UN RÉSEAU ÉQUILIBRÉ THÉORIQUE À 9 ACTEURS. CHAQUE ACTEUR EST REPRÉSENTÉ PAR UN CERCLE ET CHAQUE INTERACTION ANTAGONISTE EST REPRÉSENTÉE PAR UNE FLÈCHE DIRIGÉE DE L'ACTEUR PRODUCTEUR DE LA SUBSTANCE ANTAGONISTE, VERS L'ACTEUR INHIBÉ PAR CETTE SUBSTANCE, SACHANT QUE LA DIFFÉRENCE DES SUBSTANCES EST REPRÉSENTÉE PAR LES DIFFÉRENTES COULEURS, D'APRÈS ABRUDAN ET AL., 2012).

Dans ces conditions, les acteurs coexistent dans le système. Ces modèles suggèrent donc que pour augmenter la diversité dans un système comprenant des interactives compétitives par interférence il doit y avoir de manière conjointe : i) une augmentation de la diversité des substances antimicrobiennes produites, ii) une augmentation du nombre d'interactions antagonistes et (iii) tous les acteurs doivent avoir à la fois le statut de producteur, sensible, résistant.

Concernant la diversité des substances antimicrobiennes produites, Lyons *et al.* (2016) ont proposé de faire intervenir le rôle du transfert horizontal de gènes pour expliquer comment elle peut se maintenir. Les clusters de gènes codant la synthèse de toxines et conférant une immunité à ces substances sont fréquemment localisés dans des éléments génétiques mobiles. Ceci suggère que ces gènes seraient sujets à des événements fréquents de transfert horizontal et ainsi qu'il y aurait un brassage génétique important des clusters des gènes de toxine et d'immunité, et notamment une diversité des toxines produites.

L'effet que pourrait avoir une augmentation du nombre d'interactions antagonistes sur la diversité d'un écosystème a été étudié récemment. Une modélisation *in silico* des interactions au sein du microbiote intestinal a démontré qu'en augmentant le nombre

d'interactions compétitives au sein d'un réseau riche en interactions coopératives, une stabilité écologique s'établit et se traduit en un maintien de la diversité. En effet, la stabilité écologique correspond à la probabilité qu'une communauté retrouve son état initial après une perturbation (telle que l'introduction d'un compétiteur dans une population) c'est-à-dire à la probabilité que toutes les espèces présentes initialement soient maintenues (Ghoul and Mitri, 2016). Il a été suggéré que les interactions compétitives pourraient contribuer à la stabilité écologique, contrairement aux interactions coopératives. En fait, dans un écosystème caractérisé par un nombre important d'interactions coopératives, une dépendance entre les acteurs en coopération se crée ; un déclin dans l'abondance d'un acteur entraînerait un déclin dans l'abondance des acteurs en coopération avec ce premier (Coyte et al., 2015).

Par ailleurs, il a été montré, expérimentalement, que la répartition des fréquences des différents acteurs a un impact sur la diversité, dans le cadre de la compétition par interférence chez la bactérie du sol, *Myxococcus xanthus*. Chez cette bactérie, l'issue de la compétition par interférence dépend largement des fréquences des différents acteurs en compétition. On parle dans ce cas de « sélection fréquence-dépendante positive » : plus un acteur est présent en une fréquence élevée dans une population, plus son potentiel compétitif augmente, même s'il s'est révélé être un faible compétiteur à l'issue de tests de compétition réalisés entre compétiteurs présents en fréquences égales (Rendueles et al., 2015).

1.5. Réseaux écologiques de la compétition par interférence

La compétition par interférence est un phénomène largement répandu dans l'aliment et se produisant à l'échelle communautaire, entre des bactéries de genres et/ou d'espèces différentes, et entre des souches bactériennes de la même espèce. La compétition peut donc être considérée comme une caractéristique majeure d'écosystèmes microbiens alimentaires.

L'analyse, d'une perspective écologique, des écosystèmes microbiens de l'aliment est largement informative des fonctionnalités et caractéristiques du produit alimentaire fini. Elle renseigne sur i) son statut sain (en dressant l'inventaire des espèces microbiennes associées à l'altération de l'aliment ou les espèces pathogènes le colonisant), ii) sa qualité sensorielle (en identifiant les caractéristiques phénotypiques des flores d'affinage), iii) le niveau de maîtrise de son procédé de fabrication (en décryptant la dynamique des successions microbiennes). De plus, l'analyse écologique de l'aliment fournit des connaissances sur sa traçabilité, par la

possibilité de prédire l'origine géographique de la microflore naturelle à l'origine de sa fabrication (terroir microbiologique).

L'analyse des écosystèmes microbiens est en plein essor, surtout avec les avancées technologiques des approches génomiques/métagénomiques, transcriptomiques, protéomiques et métabolomiques (Zagorec et al., 2012). Néanmoins, cette analyse se focalise plus sur la description quantitative et qualitative de leurs communautés microbiennes. Les caractéristiques des réseaux de compétition au sein de ces communautés restent très mal connues.

1.5.1. Définition et typologies des réseaux écologiques

Bien que les approches récentes en métagénomique permettent d'évaluer la biodiversité des écosystèmes microbiens, ce niveau d'analyse des écosystèmes reste insuffisant pour la détection des changements dans le fonctionnement de ces écosystèmes. Les études basées sur la culture des microorganismes se focalisent sur des entités d'un écosystème, prises séparément, se basant ainsi sur une approche dite « approche réductionniste ». Alors que l'approche systématique tient compte des liens qui existent entre l'ensemble des entités formant un écosystème (Pavlopoulos et al., 2011) et offre ainsi une vision intégrative des écosystèmes. Cette approche est à la base des études des réseaux d'interactions.

Depuis plusieurs décennies, les réseaux d'interactions biotiques ont été bien étudiés dans le domaine de la macro-écologie. Cependant, la vision intégrative des réseaux d'interactions biotiques a été très peu appliquée en écologie microbienne. Pourtant, la problématique de recherche est la même pour les macroorganismes et les microorganismes : comprendre comment ces systèmes complexes d'entités interdépendantes se forment, évoluent et fonctionnent (Fontaine et al., 2011). L'analyse des réseaux était à l'origine déployée pour étudier des interactions du type prédateur / proie (réseaux trophiques). Récemment, l'analyse des réseaux a été utilisée pour étudier les interactions bactériennes antagonistes (Lo Giudice et al., 2007; Prasad et al., 2011; Vetsigian et al., 2011; Pérez-Gutiérrez et al., 2013).

Un réseau est constitué d'un ensemble d'éléments, appelés nœuds, connectés par des arêtes (Newman, 2003). En écologie, les réseaux ont été utilisés pour représenter la diversité

des espèces (chaque nœud représente une espèce) et leurs interactions (chaque arête représente une interaction).

Il existe plusieurs types de réseaux (Figure 5), en fonction des différents types de nœuds et d'arêtes les constituant. Si on considère les réseaux d'interactions, les nœuds peuvent représenter des genres bactériens, des espèces ou des souches, les arêtes quant à elles peuvent représenter des interactions positives (mutualisme) ou négatives (antagonisme). De plus, les réseaux peuvent être pondérés, avec des poids accordés aux arêtes ainsi qu'aux nœuds, qui par exemple, peuvent représenter pour une arête, une intensité d'interaction (Bascompte and Jordano, 2007).

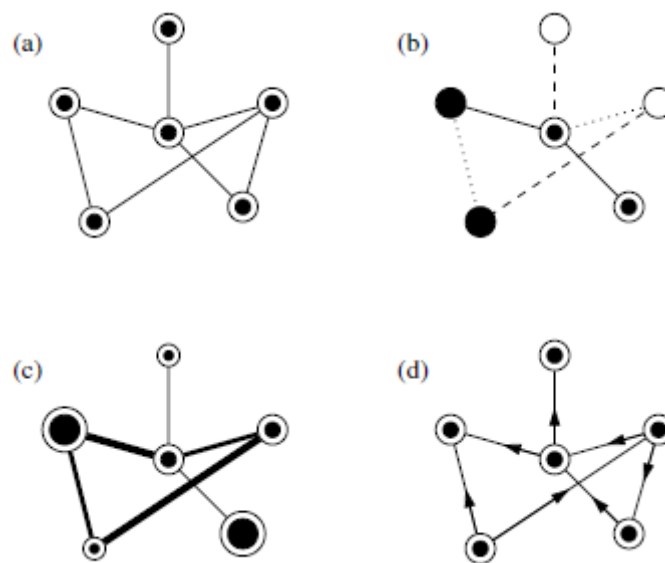


FIGURE 5. SCHÉMA REPRÉSENTANT LES DIFFÉRENTS TYPES DE RÉSEAUX (NEWMAN, 2003) :

- (a) RÉSEAU NON DIRIGÉ AVEC UN TYPE UNIQUE DE NŒUD ET D'ARÊTE
- (b) RÉSEAU AUX NŒUDS ET ARÊTES DE DIFFÉRENTS TYPES
- (c) RÉSEAU AVEC DES NŒUDS ET ARÊTES PONDÉRÉS
- (d) RÉSEAU DIRIGÉ AVEC DES DIRECTIONS DIFFÉRENTES ASSOCIÉES AUX NŒUDS

Outre les différents types de réseau, un degré de complexité s'ajoute avec la présence de différentes topologies de réseaux. La topologie se définit par le modèle suivant lequel la connexion entre les différents éléments du réseau est établie (Spivak and Tan, 2016). Autrement dit, la topologie désigne l'architecture du réseau, dictée par l'agencement des différents sommets et arêtes.

Les topologies des réseaux d'interactions biotiques sont variées, elles peuvent être représentatives soit d'une répartition aléatoire des interactions, soit d'une répartition linéaire d'interactions individuelles directes, soit d'une répartition emboîtée des interactions, soit d'une répartition modulaire des interactions présentes au sein du réseau (Figure 6).

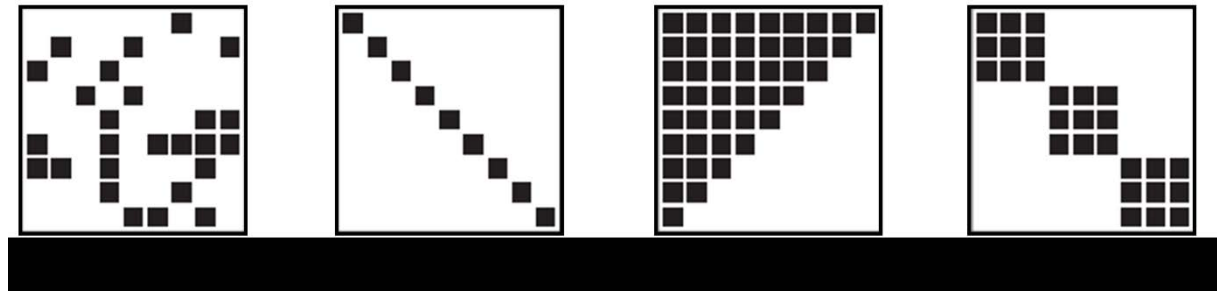


FIGURE 6. SCHÉMA REPRÉSENTANT LES TOPOLOGIES VARIÉES DES INTERACTIONS BIOTIQUES QUI SONT FONCTION DE LA RÉPARTITION DES INTERACTIONS BINAIRES ENTRE LES INDIVIDUS SITUÉS SUR L'AXE DES ABSCISSES ET LES INDIVIDUS SITUÉS SUR L'AXE DES ORDONNÉES.

Les écologues se sont surtout intéressés à l'étude des topologies de type « nestedness », de modularité et de leurs implications écologiques, surtout que ces topologies caractérisent divers réseaux interactifs, tels des réseaux d'interactions antagonistes (Krasnov et al., 2012; Thebault and Fontaine, 2010; Vacher et al., 2008). Une architecture modulaire se caractérise par une compartimentation du réseau en des modules caractérisés par une grande densité de liens intra-module, comparée à la densité de liens inter-modules (Guimerà et al., 2010; Newman and Girvan, 2004). Une architecture emboîtée du réseau rappelle le système des poupées russes ; autrement dit, les spécialistes interagissent avec des espèces, qui elles forment des sous-ensembles bien définis des espèces avec lesquelles les généralistes interagissent (Bascompte et al., 2003).

Outre l'identification de la topologie d'un réseau à travers la répartition des interactions, diverses mesures topologiques peuvent être calculées pour caractériser d'autant plus le réseau (Tableau 5).

Le grand intérêt porté à la caractérisation des architectures des réseaux écologiques est dû au fait que les topologies peuvent renseigner sur l'impact que les interactions peuvent avoir sur la stabilité écologique des espèces impliquées, et donc leur impact sur la diversité. La modularité pourrait rendre l'écosystème moins stable (Dickie et al., 2016). Cependant, il a

été montré, par des simulations réalisées sur des réseaux d'interactions mutualistes entre plantes et pollinisateurs, que l'emboîtement renforce la stabilité des réseaux plante-pollinisateur (Memmott et al., 2004). Qu'en est-il des réseaux d'interactions compétitives ?

TABLEAU 5 : MESURES TOPOLOGIQUES DE CARACTÉRISATION DE RÉSEAUX (DANS LE CAS D'UN RÉSEAU DIRIGÉ D'INTERACTIONS ANTAGONISTES BINAIRES) (AGUIRRE-VON-WOBESER ET AL., 2014).

Mesure topologique	Définition
Taille du réseau	Nombre de nœuds
Diamètre du réseau	Le plus grand nombre de sommets (interactions antagonistes) nécessaires pour relier deux nœuds (souches) par le chemin le plus court entre elles. Pour trouver le diamètre, il faut compter tous les sommets, connecter toutes les paires et retenir l'effectif maximal. Par exemple, dans un réseau à 3 nœuds : A-> B-> C, pour relier A à C, il faut aller de A à B et de B à C. Il faut donc deux connexions pour aller de A à C et le diamètre du réseau est de 2.
Densité d'interaction	Fraction des souches impliquées dans des interactions par rapport au nombre total possible d'interactions binaires.
Degré	Nombre total de sommets établis entre un nœud et les autres nœuds du réseau. C'est la somme du degré de réception, ou le nombre de sommets qui convergent vers un nœud, et du degré d'expédition, ou le nombre de sommets qui sont émanent d'un nœud.
Distribution des degrés	Distribution des degrés de tous les nœuds d'un réseau donné.
Asymétrie expéditeur-récepteur	Comparaison des variances des degrés d'expédition et de réception, pour déterminer si un réseau d'interaction est déterminé plus par le potentiel d'inhibition des souches productrices, ou par le degré de sensibilité des souches réceptrices.
Coefficient d'assortativité	Tendances des nœuds à s'attacher à des nœuds aux degrés similaires. Une valeur négative indique la tendance des nœuds à s'attacher à des nœuds de degrés différents.

1.5.2. Caractéristiques des réseaux d'interaction compétitive par interférence

Plusieurs réseaux d'interactions compétitives par interférence ont été décrits récemment, suite à l'adaptation de l'approche d'analyse statistique de réseaux aux bactéries (de Vos et al., 2017; Lo Giudice et al., 2007; Pérez-Gutiérrez et al., 2013; Prasad et al., 2011; Vetsigian et al., 2011). Ces études ont en effet analysé statistiquement les réseaux d'interactions compétitives entre des isolats bactériens isolés de divers environnements.

Lo Giudice *et al.* 2007 ont démontré, chez des bactéries marines psychrotrophes, en calculant les degrés de réception et d'expédition, que la sensibilité est corrélée à la taxonomie du fait que les degrés de sensibilité élevés étaient caractéristiques de groupes taxonomiques particuliers. Chez les bactéries du sol du genre *Streptomyces*, l'analyse du réseau et le calcul des mesures de topologie ont permis de révéler que les paires de souches antagonistes avaient tendance à s'inhiber réciproquement (Vestigan *et al.*, 2011). De plus, l'analyse du réseau compétitif des souches de *Streptomyces* a montré par calcul du coefficient d'asymétrie expédition-réception, que la structure du réseau était plutôt déterminée par le potentiel antagoniste des souches expéditrices, que par le niveau de résistance des souches réceptrices, (Vetsigian *et al.*, 2011). L'approche d'analyse de réseau a aussi été utilisée dans le but de mieux comprendre l'effet de la variation des températures sur l'issue des interactions compétitives chez des bactéries arctiques. Cette analyse a permis de déceler une diversité des profils interactifs des souches interagissant au sein du réseau, révélant ainsi la complexité des réseaux compétitifs chez les bactéries (Prasad *et al.*, 2011). Une autre étude a cartographié la compétition par interférence chez des souches du genre *Bacillus* et a démontré que l'antagonisme est un facteur déterminant dans l'exclusion spatiale des souches conspécifiques. Il a en effet été montré que la fréquence des résistants aux antagonismes à l'intérieur d'un même site géographique est supérieure à la fréquence des résistants entre différents sites d'isolement (Pérez-Gutiérrez *et al.*, 2013).

1.5.3. Relation entre inhibition et distance phylogénétique

La cartographie de la compétition par interférence, réalisée chez les bactéries du sol *Streptomyces* (§ 1.5.2), a montré que la probabilité d'inhibition augmentait avec la distance phylogénétique entre les souches de *Streptomyces* (Vetsigian *et al.*, 2011) (Figure 7).

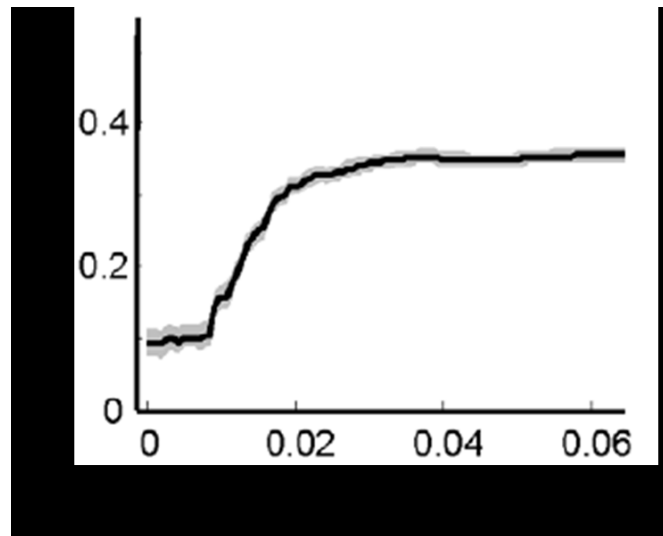


FIGURE 7. RELATION ENTRE LA DISTANCE PHYLOGÉNÉTIQUE ET LA PROBABILITÉ D'INHIBITION CHEZ *Streptomyces* (D'APRÈS VETSIGIAN ET AL., 2011).

Une autre étude, réalisée sur des bactéries marines de la famille des *Vibrionaceae*, a montré qu'une forte cohésion phylogénétique existait entre les producteurs et les résistants vis-à-vis de branches phylogénétiques plus éloignées, les souches phylogénétiquement proches ne s'inhibant pas. Plus précisément, le calcul des mesures topologiques a révélé une intensité importante des interactions compétitives chez ces bactéries, puisque 44% des souches inhibaient au moins une autre souche. D'autre part, peu de souches produisent des antibactériens à spectre large alors que de nombreuses souches phylogénétiquement proches de ces producteurs sont résistantes. Ces résultats suggèrent qu'une forte coopération existe dans les populations microbiennes marines dans le cadre des interactions antagonistes et que la compétition par interférence chez ces microorganismes se situe à l'échelle de la population plutôt qu'à l'échelle de l'individu (Cordero et al., 2012).

L'analyse des réseaux de compétition, associée à des indications sur la phylogénie des bactéries testées, a permis d'exposer des contradictions entre des études au sujet de la relation entre phylogénie/ proximité génétique et la probabilité d'inhibition. En effet, Russel *et al.* 2017, ont réalisé la cartographie des interactions antagonistes à deux acteurs au sein d'une collection de 67 espèces bactériennes isolées de 8 environnements différents. Il a été montré que l'antagonisme est plus fréquent entre espèces proches phylogénétiquement du fait qu'elles présentent des similarités fonctionnelles en termes d'exploitation de ressources. Il a par ailleurs été montré que les souches généralistes (pouvant exploiter une large gamme de ressources) avaient des tendances plus élevées à présenter des propriétés antagonistes (Russel et al., 2017). De même, à l'issue d'une cartographie de la compétition par interférence chez

Pseudomonas fluorescens, il a été montré que la probabilité d'inhibition augmente entre des isolats partageant des similarités écologiques. Une absence de lien entre inhibition et similarité génétique a été notée. L'analyse de réseau, dans le cas de cette étude, a permis une meilleure compréhension du rôle que jouent les bactériocines dans la structuration des populations bactériennes : les résultats suggèrent que les bactériocines jouent le rôle de médiateur de la compétition pour les ressources en éliminant les bactéries compétitrices partageant avec les productrices de bactériocines des ressources communes (Bruce et al., 2017).

2. Modèle d'étude : *Carnobacterium maltaromaticum*

2.1. Taxonomie et habitat

Comme certaines bactéries hétérofermentaires du genre *Lactobacillus* (groupe III), isolées de viande emballée sous vide, poulet et poisson, présentaient des caractéristiques atypiques, le genre *Carnobacterium* a été proposé dans le but de clarifier leur position taxonomique.

Le genre *Carnobacterium* appartient au phylum des *Firmicutes*, à la classe des *Bacilli*, à l'ordre des *Lactobacillales* et à la famille des *Carnobacteriaceae*. Cette famille a nouvellement été créée (Ludwig et al., 2009). Elle est représentée par le genre *Carnobacterium*, comme genre de référence, et comprend deux groupes paraphylétiques: le premier groupe comprend les genres *Alkalibacterium*, *Allofustis*, *Alloiococcus*, *Atopococcus*, *Atopostipes*, *Carnobacterium*, *Desemzia*, *Dolosigranulum*, *Isobaculum*, *Marinilactibacillus* et *Trichococcus*. Le deuxième groupe se compose des deux genres bactériens *Atopobacter* et *Granulicatella* (Pikuta and Hoover, 2014).

Le genre bactérien *Carnobacterium* est considéré comme un genre phylogénétiquement cohérent faisant partie du groupe des LAB quoique le séquençage de l'ARN 16S ait révélé des différences notables de ce genre avec les LAB (Wallbanks et al., 1990).

Les bactéries du genre *Carnobacterium* sont des bactéries à G (+), non sporulées, en forme de bâtonnets ou de cocco-bacilles, mobiles ou non-mobiles. Les carnobactéries ne possèdent pas de catalase mais quelques espèces sont capables de présenter une activité

catalytique en présence d'hème. Initialement décrites comme hétérofermentaires, ces bactéries sont désormais considérées comme homofermentaires produisant de l'acide lactique à partir du glucose, à l'exception de l'espèce *C. pleistocenium*, ou des espèces hétérofermentaires facultatives. Quelques espèces peuvent métaboliser les hexoses et les pentoses en acide lactique L(+) et, en fonction de la disponibilité en oxygène, produire de l'acide acétique, de l'éthanol, de l'acide formique et du CO₂ en proportions variables. Les carnobactéries sont capables de respirer en présence d'hématine et sont mésophiles, et comprennent des souches psychrotrophes, aptes à se développer à 0°C, pouvant tolérer jusqu'à 8% de NaCl et un pH d'une valeur de 9,5 (Cailliez-Grimal et al., 2014; Pikuta, 2014; Pikuta and Hoover, 2014).

Le genre *Carnobacterium* comprend actuellement 12 espèces : *Carnobacterium alterfunditum*, *C. antarcticum*, *C. divergens*, *C. funditum*, *C. gallinarum*, *C. iners*, *C. inhibens*, *C. jeotgali*, *C. maltaromaticum*, *C. mobile*, *C. pleistocenium*, et *C. viridans*. Récemment, *C. gilichinskyi* a été reclassé en tant que sous espèce de *C. inhibens* et de ce fait *C. inhibens* a été renommé *C. inhibens subsp. inhibens* (Nicholson et al., 2015 ; Zhu et al., 2018).

Les bactéries appartenant au genre *Carnobacterium* sont des LAB ubiquistes qui se caractérisent par une distribution diversifiée dans la nature. Leur ubiquité est due, d'une part, à leur caractère généraliste leur conférant la capacité de coloniser des environnements variés, et d'autre part, à la capacité de certaines bactéries du genre *Carnobacterium* à produire des bactériocines leur permettant d'entrer en compétition avec d'autres bactéries et ainsi conquérir des nouveaux environnements.

L'espèce *C. maltaromaticum* a été relativement tardivement découverte en raison de sa sensibilité à l'acétate, lequel entre classiquement dans la composition des milieux de culture utilisés pour isoler des bactéries lactiques à partir de produits alimentaires. Cette bactérie a ainsi été isolée de laits crus en 1974 et a été dénommée *Lactobacillus maltaromaticus* par Miller (Miller et al., 1974). Ultérieurement, il a été suggéré d'affilier les bactéries appartenant aux espèces *Lactobacillus divergens* et *Lactobacillus piscicola* dans le genre *Carnobacterium*, en tant que *Carnobacterium divergens* et *Carnobacterium piscicola*, respectivement. Sur la base de comparaisons génotypiques et phénotypiques, la souche *C. piscicola* décrite en 1987 a été reclassée en 2003 en tant que *C. maltaromaticum* (Mora et al., 2003).

Les bactéries de l'espèce *C. maltaromaticum* présentent de fortes potentialités en industrie alimentaire, notamment en laiterie comme ferment de biopréservation et d'affinage. Les études prospectives ciblées sur cette espèce ont permis de rendre compte de la place

majeure que peut prendre cette bactérie dans les fromages puisque sa concentration peut atteindre jusqu'à 10^9 UFC/g. Il a par ailleurs été montré qu'elle peut coloniser jusqu'à 10% des fromages (Cailliez-Grimal et al. 2007; Rahman et al., 2014). Contrairement à d'autres bactéries lactiques, sa concentration augmente au cours de l'affinage, probablement grâce à son caractère psychrophile lui permettant de croître à des basses températures proches de 0°C dans l'aliment (Sakala et al., 2002), et grâce à son aptitude à croître à des valeurs de pH élevées, jusqu'à 9,6. En effet, l'affinage se caractérise par une température basse et par une augmentation importante du pH au cours du temps, essentiellement en surface des fromages.

L'origine de *C. maltaromaticum* dans les fromages est inconnue, il est cependant probable que la contamination opportuniste par ce germe a lieu dès la production de lait. *C. maltaromaticum* peut être isolée de l'environnement, d'animaux et d'aliments d'origine animale tels que les produits de la mer, les produits carnés et les produits laitiers. Leur large distribution dans la nature est due à leur physiologie particulière. Ces bactéries occupent donc plusieurs niches écologiques (Tableau 6).

TABLEAU 6 : HABITATS DE *C. maltaromaticum*.

Écologie	Remarques	Références
Environnement	Ferme, peau des moutons Feces lynx Sol après 48 cycles de gel-dégel Domaine agricole traité avec du lactosérum Eau de lac du Japon	(Mills et al., 2018) (Nunez-Diaz et al., 2017) (Walker et al., 2006) (Coombs and Brenchley, 1999) (Yanagida et al., 2007)
Produits de la mer	Plat traditionnel nordique « Lutefisk » Truite Saucisses fumées de saumon Intestin de truite arc-en-ciel Saumon froid Produits de la pêche Saumon fumé froid conditionné sous vide Œufs de lump salés Moules fumées congelées	(Lunestad et al., 2018) (Al-Hisnawi et al., 2016) (Tirloni et al., 2015) (Kim and Austin, 2008) (Leroi et al., 1998) (Pilet et al., 1995) (Duffès et al., 2000) (MSc et al., 1998) (Tahiri et al., 2004)
Produits carnés	Produit carné prêt à manger Bœuf emballé sous vide Porc mariné Viande sous atmosphère modifiée Jambon cuit artisanal Belge	(Miller et al., 2015) (Youssef et al., 2015) (Schirmer et al., 2009) (Nieminen et al., 2011) (Vasilopoulos et al., 2010)
Volaille	Poulet émincé irradié Peau de poulet Viande de volaille cuite réfrigérée sous-vide	(Thornley, 1957) (Vihavainen et al., 2007) (Barakat et al., 2000)
Produits laitiers	Lait d'anesse Saint Nectaire Lait Surface de fromages français à pâte molle Fromages d'origines diverses Fromage Taleggio Mozzarella traditionnelle	(del Rio et al., 2016) (Callon et al., 2014) (Miller et al., 1974) (Cailliez-Grimal et al., 2007; Edima et al., 2007; Milliere et al., 1994; Milliere and Lefebvre, 1994) (Rahman et al., 2014) (Feligini et al., 2012) (Morea et al., 1999)
Agent d'altération	Volaille cuite découpées Poudding belge Filets de daurade Bœuf réfrigéré altéré Pilons réfrigérés sous atmosphère modifiée Crevettes réfrigérées en saumure Saumon frais ou conditionné sous atmosphère modifiée Saumon fumé Crevettes tropicales cuites et réfrigérées	(Geeraerts et al., 2018) (Gauchie et al., 2017) (Parlapani et al., 2015) (Ercolini et al., 2009; Youssef et al., 2014) (Bjorkroth et al., 2005) (Mejlholm et al., 2008) (Emborg et al., 2002; Macé et al., 2012) (Paludan-Müller et al., 1998) (Jaffrès et al., 2009)

2.2. Pouvoir pathogène et statut de *C. maltaromaticum*

Quelques travaux décrivent la production d'amines biogènes par différentes espèces de *Carnobacterium*, le niveau d'amines produit dépendant des conditions environnementales, du type d'aliment et de la souche considérée (Leisner et al., 2007; Masson et al., 1996). Des souches de *C. divergens* peuvent produire de la tyramine dans la viande (Curiel et al., 2011; Masson et al., 1999) ou dans des produits de la mer (Laursen et al., 2006). De la tyramine et /ou de l'histidine sont produits par *C. alterfunditum* dans des produits de la mer (Matamoros et al., 2009). Il a été noté que *C. maltaromaticum* produit des amines, détectées à la fin de la conservation, dans du saumon frais ou conditionné sous atmosphère modifiée (Emborg et al., 2002) ainsi que dans des fromages contaminés artificiellement avec la souche *C. maltaromaticum* LMA28 (Edima et al., 2007).

Des souches de *C. maltaromaticum* sont décrites comme pathogènes pour les poissons. Différentes souches de *C. maltaromaticum* ont été isolées de truites malades (Hiu et al., 1984; Michel et al., 1986) et associées à la mortalité de bar, de poissons-chats (Baya et al., 1991) ou de truites arc-en-ciel (Toranzo et al., 1993). Plus récemment, des *Carnobacterium* sp. ont été isolées de saumons malades du lac Michigan (Loch et al., 2012) and *C. maltaromaticum* semble être la cause de la mortalité de saumon liée à des infections du cerveau (Schaffer et al., 2013). *C. maltaromaticum* aurait cependant plus un statut de pathogène opportuniste (Michel et al., 1986), le pouvoir de virulence étant peu élevé et ne s'exerçant que sur des poissons fragiles (Leisner et al., 2012).

Certaines souches sont associées à des infections chez l'homme. Des souches de *Carnobacterium* sp. sont présentes dans du sang d'origine humaine (Hoenigl et al., 2010) et *C. maltaromaticum* a été isolée de gangrènes, où de nombreuses souches bactériennes étaient impliquées (Xu et al., 1997) et de pus issus d'une amputation de la main (Chmelar et al., 2002). Cependant la relation directe entre leur présence et les symptômes cliniques est difficile à établir. Par ailleurs, les patients malades avaient pu être infectés *via* des micro-lésions et le contact avec des poissons crus lors de la préparation de repas (Hoenigl et al., 2010). Aucune espèce de *Carnobacterium* n'est considérée comme pathogène humain. En effet, leur température optimale de croissance est inférieure à celle du corps humain, suggérant que cette espèce bactérienne n'est pas pathogène pour l'homme et les animaux à sang chaud (Pikuta and Hoover, 2014). Il est à noter que des gènes potentiels impliqués dans

la virulence ont été décrits dans le génome de *C. maltaromaticum* ATCC 35586, isolé de saumon malade (Leisner et al., 2012).

Le caractère pathogène de cette espèce vis-à-vis des poissons, le fait que des *Carnobacterium* aient été isolés de pus et de cultures de sang humain et la présence de gènes potentiels de virulence dans le génome de *C. maltaromaticum* n'ont pas permis l'inscription de *C. maltaromaticum* dans la liste des bactéries QPS. Le statut QPS, adopté en 2007 par l'EFSA (European Food Safety Authority, Autorité Européenne de Sécurité des Aliments) est associé à la notion d'espèce (EFSA 2008, 2009). Ce statut se veut être l'équivalent du statut GRAS, défini par la FDA, orienté sur l'application. 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 microorganisme (Bourdichon et al., 2012). Une centaine d'espèces de microorganismes appartenant majoritairement aux quatre groupes que sont les bactéries à G (+) non sporulantes, les bactéries du genre *Bacillus*, les levures et les champignons filamenteux sont sur la liste des microorganismes reconnus QPS par l'EFSA. Cette liste est mise à jour régulièrement. *C. maltaromaticum* a été évaluée pour la première fois en 2012 (EFSA, 2012). Le rapport de l'EFSA conclut 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. *C. maltaromaticum* est présente sur la liste établie par Bourdichon (Bourdichon et al., 2012) répertoriant les microorganismes positifs utilisés en fermentation alimentaire.

2.3. Compétition chez *C. maltaromaticum*

La production de bactériocines chez *C. maltaromaticum* a été étudiée dans un contexte d'utilisation en biopréservation pour l'inhibition de microorganismes indésirables de l'aliment, notamment de la bactérie pathogène *L. monocytogenes*.

Au sein de l'espèce *C. maltaromaticum* 12 souches produisant au moins une bactériocine caractérisée ont été décrites. La majorité des études ont démontré que les différentes souches de *C. maltaromaticum* produisent principalement des bactériocines de classes I et II et une bactériocine circulaire. La classe I comprend la « Carnocin UI49 » (Stoffels et al., 1992) et les Carnolysin A1 et A2 (Tulini et al., 2014). La classe IIa comprend

les « Carnobacteriocins A9b » (Nilson et al., 2002), les « carnobactériocines BM1 et B2 » (Quadri et al., 1994), la « Piscicoline 126 » (Gursky et al. 2006; Jack et al. 1996), la « Piscicocine CS526 » (Yamazaki et al. 2005), les « Carnocine CP51, CP52 » (Herbin et al., 1997) et V1a et V1b (Bhugaloo-Vial et al. 1996). Ces différentes dénominations regroupent 4 bactériocines de classe IIa. Une nouvelle bactériocine de classe IIa, produite par *C. maltaromaticum* CPN a été récemment décrite (Hammi et al., 2016). La « Piscicolin 61 » (Holck et al. 1994) et la « Carnobacteriocin A » (Worobo et al., 1994) sont deux bactériocines de classe IIc identiques, mises en évidence chez deux souches de *C. maltaromaticum*. La « Carnocyclin » A est le seul exemple de bactériocine circulaire (classe V) (Martin-Visscher et al. 2008) (Tableau 7).

TABLEAU 7 : SOUCHES DE *Carnobacterium maltaromaticum* PRODUISANT DES BACTERIOCINES CARACTÉRISÉES

Souches productrices	Bactériocines (analogue)	Classes	Références
UI49	Carnocine UI49	I	Stoffels et al., 1992
C2	Carnolysin A1-A2		Tulini et al., 2014
A9b	Carnobactériocine A9b (B2)	IIa	Nilsson et al., 2002
LV17B	Carnobactériocine BM1, B2		Quadri et al., 1994
UAL 26, JG126	Piscicoline 126		Gursky et al., 2006; Jack et al. 1996
CS526	Piscicocine CS526		Yamazaki et al., 2005
CP5	Carnocine CP51 (BM1), CP52 (B2)		Herbin et al., 1997
V1	Piscicocine V1b (BM1), V1a (Piscicoline 126)		Bhugaloo-Vial et al. 1996
CPN	Maltaricin CPN		Hammi et al., 2016
LV17A	Carnobactériocine A	IIc	Worobo et al. 1994
LV61	Piscicoline 61 (Carnobactériocine A)		Holck et al., 1994
UAL307	Carnocycline A	V	Martin-Visscher et al., 2008

Les gènes impliqués dans la production de bactériocines sont organisés en clusters. Dans ces clusters figurent les gènes codant le peptide précurseur de la bactériocine, et selon la bactériocine, des gènes codant les protéines/enzymes responsables de la modification de la bactériocine (Walsh et al., 2015; Wang et al., 2011). Un cluster de gène de bactériocine comprend également un gène codant une protéine conférant une immunité vis-à-vis de la bactériocine codée par le cluster, les gènes codant le transporteur permettant d'exporter le peptide dans le milieu extracellulaire, un gène codant une enzyme protéolytique permettant de cliver le peptide signal et ainsi de libérer la bactériocine dans le milieu extracellulaire et des gènes de régulation de la transcription (Alvarez-Sieiro et al., 2016; Walsh et al., 2015). Une représentation schématique d'une sélection de clusters est représentée dans la Figure 8.

2.2. Diversité génétique chez *C. maltaromaticum*

La MLST, pour MultiLocus Sequence Typing, est une méthode de typage moléculaire basée sur l'analyse de séquences de plusieurs gènes de ménage, en général 5 à 7 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.

La structure de la population de *C. maltaromaticum* a été étudiée préalablement par MultiLocus Sequence Typing (MLST) à partir de 47 souches dont 28 d'origine laitière. La population de *C. maltaromaticum* est organisée en 4 lignées phylogénétiques profondément enracinées. La puissance discriminatoire du schéma MLST est élevée, étant donné que sur un total de 47 souches caractérisées, 36 différents génotypes ont été identifiés. Les souches d'origine laitière sont représentées dans chacune de ces lignées. De plus, ces souches laitières sont caractérisées par une très grande diversité entre ces lignées (Rahman et al., 2014). Cette bactérie contraste ainsi avec les bactéries lactiques *L. lactis* et *St. thermophilus* majoritairement utilisées comme ferments, pour lesquelles une très faible diversité génétique a été observée (Passerini et al., 2010).

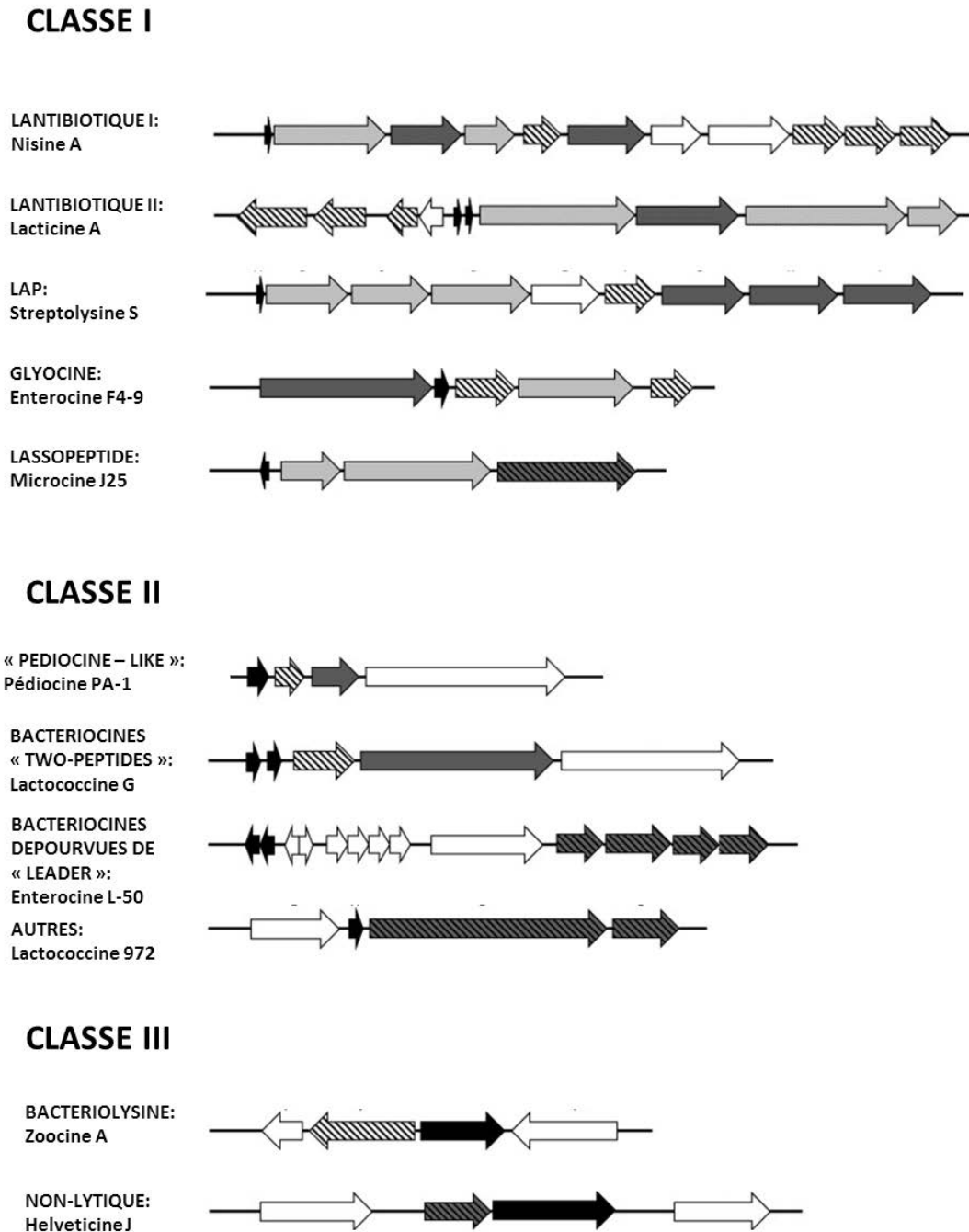


FIGURE 8. REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DES CLUSTERS DE GÈNES CODANT LA SYNTHÈSE DE BACTÉRIOCINES (LA TAILLE DES CLUSTERS N'EST PAS REPRÉSENTÉE AVEC UNE ÉCHELLE PARTICULIÈRE). LES FLÈCHES NOIRES REPRÉSENTENT LES GÈNES STRUCTURAUX ; LES FLÈCHES EN GRIS FONCÉ REPRÉSENTENT LES GÈNES DES TRANSPORTEURS ; CELLES EN GRIS CLAIR REPRÉSENTENT LES GÈNES DE MODIFICATION ET DE MATURATION ; CELLES AVEC DES BARRES REPRÉSENTENT LES GÈNES D'IMMUNITÉ ; LES FLÈCHES BLANCHES REPRÉSENTENT D'AUTRES TYPES DE GÈNES COMME LES GÈNES DE RÉGULATION DE TRANSCRIPTION (ALVAREZ-SIEIRO ET AL., 2016).

3. Objectifs

Les recherches sur la compétition microbienne dans les écosystèmes alimentaires ont longtemps été menées dans un objectif appliqué de biopréservation. L'ensemble de ces travaux a permis de produire des connaissances concernant la capacité de bactéries d'origine alimentaire à inhiber des bactéries pathogènes. Il en résulte que les propriétés des bactéries antagonistes envisagées pour des applications de biopréservation sont bien documentées. La compétition entre microorganismes non pathogènes est quant à elle très mal connue. Pourtant la connaissance des interactions compétitives entre bactéries de l'aliment pourrait permettre une meilleure maîtrise de l'écosystème alimentaire. Plus précisément, dans l'industrie fermentaire et en particulier dans l'industrie laitière, la problématique de la diversité microbienne est un enjeu majeur. La diversité microbienne est en lien étroit avec la typicité des produits. Aussi, comprendre comment la compétition agit sur la diversité microbienne des fromages présente non seulement un intérêt fondamental mais aussi un intérêt appliqué très important.

Bien qu'intuitivement la compétition doive conduire à une diminution de la biodiversité, la possibilité de concilier compétition et diversité a été démontrée expérimentalement chez *E. coli*. Chez cette bactérie un équilibre peut être établi dans un modèle à trois acteurs : une bactérie productrice d'une bactériocine et une bactérie sensible à cette bactériocine et une bactérie résistante (Kirkup et Riley 2004). Des études de modélisation *in silico* ont montré qu'il était possible de concilier compétition et diversité dans des systèmes plus complexes comprenant neuf acteurs si la densité d'interactions antagonistes est élevée, si la diversité des substances produites et si la diversité des rôles interactifs joués par les différentes bactéries du réseau sont élevées (Kerr et al., 2002).

L'objectif de ces travaux de thèse est d'étudier la diversité et compétition intraspécifique chez une bactérie lactique. Le modèle choisi est *Carnobacterium maltaromaticum*. La diversité génétique de la population de *C. maltaromaticum* sera caractérisée en intégrant au schéma MLST précédemment établi (Rahman et al., 2014), des souches en provenance de poissons malades ainsi que des souches d'origine laitière. L'ampleur de la compétition par interférence chez *C. maltaromaticum* sera caractérisée, grâce à une approche haut-débit en vue de déterminer la structure du réseau de compétition par interférence. Une approche de génomique sera appliquée dans le but

d'identifier les gènes potentiellement impliqués dans les antagonismes qui auront pu être identifiés.

Chapitre II: Résultats

1. Multilocus sequence typing of *Carnobacterium maltaromaticum* strains associated with fish disease and dairy products.

Ramia, N.E., El Kheir, S.M., Taha, S., Mangavel, C., Revol-Junelles, A.-M., Borges, F., 2018. MultiLocus Sequence Typing of *Carnobacterium maltaromaticum* strains associated with fish disease and dairy products. *Journal of Applied Microbiology*.

1.1. Préambule

La méthode de typage moléculaire MultiLocus Sequence Typing (MLST) a été mise au point au laboratoire et adaptée afin de pouvoir caractériser finement la phylogénie entre des souches appartenant à l'espèce *C. maltaromaticum*. Cette méthode a été appliquée sur une collection de 47 souches (Rahman et al., 2014). L'étude de la compétition chez cette bactérie devant être réalisée sur 76 souches, il était indispensable de compléter ces données de diversité pour un plus grand nombre de souches. Ainsi, des liens potentiels entre le potentiel compétiteur des souches d'une part, et leurs relations phylogénétiques d'une autre part pourront être étudiés.

Vingt-et-une souches additionnelles ont été typées selon la même méthode. Pour cela, 7 fragments de gènes de ménage ont été séquencés et les séquences obtenues ont été utilisées pour établir les relations phylogénétiques et la structure de la population chez cette espèce.

Compléter le schéma de la population de *C. maltaromatium* par l'intégration de nouvelles souches devrait permettre, non seulement, d'approfondir la diversité génétique de la population de cette espèce, mais aussi d'évaluer l'ampleur et les caractéristiques de la compétition entre des souches de la même espèce diversifiées génétiquement.

Outre l'intérêt de cette étude dans le contexte de l'écologie de la compétition, ces résultats de typage présentent un intérêt appliqué pour l'espèce *C. maltaromaticum*. L'espèce *C. maltaromaticum*, bien qu'elle présente un intérêt en biopréservation, ne fait pas partie des microorganismes présentant le statut QPS attribué par EFSA car cette espèce est décrite dans le secteur de la pisciculture comme pathogène opportuniste du poisson (Leisner et al., 2012). Le typage moléculaire par MLST devrait permettre de discriminer les génotypes associés à des pathologies chez le poisson des autres génotypes associés aux produits laitiers.

1.2. Abstract

Aims: *Carnobacterium maltaromaticum* is a species of Lactic Acid Bacteria (LAB) of technological interest in the field of dairy ripening and food bioprotection and is Generally Recognized As Safe (GRAS) in the USA. As it is associated with fish infections, the European Food Safety Agency (EFSA) did not include this species in the Qualified Presumption Safety (QPS) list of microorganisms. This implies that the risk assessment for the species has to be performed at the strain level. **Methods and Results:** Multilocus Sequence Typing is a tool that i) potentially allows to discriminate strains isolated from diseased fish from apathogenic strains and ii) to assess the genetic relatedness between both groups of strains. In this study, we characterized by MLST 21 *C. maltaromaticum* strains including 16 strains isolated from diseased fish and 5 apathogenic dairy strains isolated from cheese. The resulting population structure was investigated by integrating these new data to the previously published population structure (available at <http://pubmlst.org>), which represents an overall of 71 strains. **Conclusions:** This analysis revealed that none of the strains isolated from diseased fish is assigned to a clonal complex containing cheese isolates, and that 11 strains exhibit singleton genotypes suggesting that the population of diseased fish isolates is not clonal. **Significance and Impact of Study:** This study thus provides a population structure of *C. maltaromaticum* that could serve in the future as a reference that could contribute to the risk assessment of *C. maltaromaticum* strains intended to be used in the food chain.

Keywords: Lactic acid bacteria; Food bioprotection; Qualified Presumption Safety; Risk assessment; Strain level; Population structure

1.3. Introduction

Carnobacterium maltaromaticum is a non-starter species of Lactic Acid Bacteria (LAB) of technological interest in the field of dairy ripening and food bioprotection (Afzal *et al.* 2010). The species is associated with the development of desired malty odours during cheese production (Afzal *et al.* 2013). Previous studies have shown that *C. maltaromaticum* has a

strong potential in biopreservation due to its antagonistic and inhibitory effect on the food-borne pathogen *Listeria monocytogenes* (Herbin *et al.* 1997). This bacterium is Generally Recognized As Safe (GRAS) in the USA and is considered as a microorganism with technological beneficial use in EU (Bourdichon *et al.* 2012).

Most of the LAB are GRAS (Adams and Marteau, 1995), as they are rarely associated with clinical cases. Nevertheless, examples of clinical infection exist. For instance, the probiotic species *Lactobacillus rhamnosus* is occasionally associated with infections in humans (Brahimi *et al.* 2008; Wolz and Schaefer 2008; Zein *et al.* 2008). Likewise, *Lactobacillus jensenii*, a species used for food fermentation, has been recorded to cause endocarditis in a patient with underlying conditions (Patnaik *et al.* 2015). Rare clinical isolates were also described in the genus *Leuconostoc*, whose species are applied across a variety of food production processes, such as a bloodstream infection due to *Leuconostoc lactis* in an elderly woman with pneumonia and abdominal infection (Yang *et al.* 2015). Nevertheless, considering the low prevalence of these bacteria, the European Food Safety Agency (EFSA) integrated most of LAB in the Qualified Presumption of Safety (QPS) list (EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), 2012).

Among LAB, the species *C. maltaromaticum* is not on the QPS list because it has been associated with infections in fish (Leisner *et al.* 2012). The first cases of infection by *C. maltaromaticum* (formerly *C. piscicola*) were reported in 1984 in rainbow trout with kidney damage (Hiu *et al.* 1984) and cutthroat trout (Michel *et al.* 1986) followed by recorded cases of mortality in cultured striped bass, channel catfish (Baya *et al.* 1991) and rainbow trout (Toranzo *et al.* 1993). *C. maltaromaticum*-like bacteria were also linked to brain infection in

salmon shark (Schaffer *et al.* 2013). However, in most cases the observed virulence was low as the species mainly causes pathology in fish undergoing severe stress (Michel *et al.* 1986; Starliper *et al.* 1992). Moreover, it should be noticed that human clinical isolates are rare (Hoenigl *et al.* 2010).

Intentional use in food of bacteria belonging to species not on the QPS list requires a safety assessment at the strain level. For this, a tool is needed that is able to distinguish apathogenic strains from strains causing disease; in the case of *C. maltaromaticum* that would be disease in fish. An MLST scheme is available for *C. maltaromaticum* and was successfully applied to a collection of 47 strains originating from food products and from the environment (Rahman *et al.* 2014). This method distinguished strains with a high discriminatory index, as it delineated 36 genotypes among the 47 strains (Rahman *et al.* 2014). However, the collection only contained one strain isolated from diseased fish, the strain *C. maltaromaticum* ATCC35586 (Rahman *et al.* 2014) for which the whole genome sequence is available (Leisner *et al.* 2012).

The aim of this study was to integrate strains isolated from diseased fish into the population structure of the species *C. maltaromaticum* by using MLST. This knowledge will serve as a reference in the future for the risk assessment of *C. maltaromaticum* strains intended to be used in the food chain.

1.4. Material and methods

1.4.1. Collection of bacterial strains

The twenty-one *C. maltaromaticum* strains used in this study were added to a previously MLST typed collection of strains to complete the population structure of the species as shown in Table 7 (novel strains highlighted in grey). Sixteen of the novel strains had been isolated from diseased fish, courtesy of J. F. Bernadet from INRA, Infectiologie Expérimentale Rongeurs Poissons, Université Paris-Saclay, Jouy-en-Josas, and these had been speciated by amplification and sequencing of their 16S ribosomal RNA gene (Rahman *et al.* 2014). The other five strains (strains CP3, CP4, CP10, CP11 and CP12) were dairy strains isolated in 1994, from brie cheese. The 21 strains were isolated from three different countries

(17 from France, 3 from Germany and 1 from China), between 1985 and 2002. All *C. maltaromaticum* strains were cultivated in Trypticase Soy Broth medium (TSB) (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France) supplemented with 6 g/L of bacto-yeast extract (YE) and incubated at 30°C for 16 h. Strains were stored in TSBYE medium supplemented with glycerol (10%) at -80°C and propagated twice before use.

Table 7. Characteristics of the *C. maltaromaticum* strain collection.

Strain code ^a	CC ^b	ST ^c	Allele no.							Origin	Year	Location	Reference
			<i>ilvE</i>	<i>dapE</i>	<i>pyrE</i>	<i>pyc</i>	<i>ddlA</i>	<i>glpQ</i>	<i>leuS</i>				
F7	1	4	4	8	4	4	7	3	4	Halloum	2010	Lebanon	(Rahman <i>et al.</i> 2014)
F44	1	4	4	8	4	4	7	3	4	Mont D'or	2010	France	(Rahman <i>et al.</i> 2014)
LMA28	1	4	4	8	4	4	7	3	4	Brie	1994	France	(Millière <i>et al.</i> 1994)
F29-1	1	4	4	8	4	4	7	3	4	Lumpfish roe	-	Denmark	(Groth Laursen <i>et al.</i> 2005)
DSM20342 ^T	1	4	4	8	4	4	7	3	4	Raw milk	1974	USA	(Miller III <i>et al.</i> 1974)
CP3	1	4	4	8	4	4	7	3	4	Brie	1994	France	This study
F33	1	6	4	8	4	4	7	3	6	St Maure de Touraine	2010	France	(Rahman <i>et al.</i> 2014)
F86	1	11	4	8	4	4	3	3	4	Cabrales	2010	Spain	(Rahman <i>et al.</i> 2014)
L1	1	13	4	8	4	6	7	3	4	Raw milk	2010	France	(Rahman <i>et al.</i> 2014)
CP4	1	15	4	8	4	4	7	3	20	Brie	1994	France	This study
CP5	1	15	4	8	4	4	7	3	20	Brie	1994	France	(Millière <i>et al.</i> 1994)
CP23	1	16	4	8	4	4	3	9	10	Brie	1994	France	(Millière <i>et al.</i> 1994)
CP32	1	17	4	8	4	4	4	3	4	Brie	1994	France	(Millière <i>et al.</i> 1994)
F4	2	3	3	3	3	3	3	2	3	Le Montagnard	2010	France	(Rahman <i>et al.</i> 2014)
F84	2	3	3	3	3	3	3	2	3	Kernhemmer	2010	The Netherlands	(Rahman <i>et al.</i> 2014)
CP14	2	3	3	3	3	3	3	2	3	Brie	1994	France	(Millière <i>et al.</i> 1994)
F87	2	3	3	3	3	3	3	2	3	Tynjethaler	2010	The Netherlands	(Rahman <i>et al.</i> 2014)
CP7	2	3	3	3	3	3	3	2	3	Brie	1994	France	(Millière <i>et al.</i> 1994)
F42	2	7	3	3	3	3	4	2	3	Rocamadour	2010	France	(Rahman <i>et al.</i> 2014)
N15	2	7	3	3	3	3	4	2	3	Halibut-sugar salted	1990's	Denmark	(Groth Laursen <i>et al.</i> 2005)
CP10	2	40	3	3	3	3	15	2	3	Brie	1994	France	This study
CP11	2	44	3	3	3	3	3	20	33	Brie	1994	France	This study
CP12	2	41	3	3	3	3	3	2	34	Brie	1994	France	This study
F43	3	8	2	4	8	6	7	8	7	St Marcellin	2010	France	(Rahman <i>et al.</i> 2014)
CIP100481	3	18	2	4	8	6	4	3	7	Human blood	1983	France	(Groth Laursen <i>et al.</i> 2005)
9.4	3	30	2	17	8	6	4	3	14	Beef	2003	Denmark	(Groth Laursen <i>et al.</i> 2005)
710	3	35	12	4	8	6	4	3	7	Pork	2009	France	(Feurer <i>et al.</i> 2010)
JIP 14/92	3	43	19	4	8	6	4	3	24	Kidney of rainbow trout (diseased)	1992	France (Seine-Maritime)	This study

CIP102035	4	21	5	15	6	11	4	3	5	Raw milk	1985	France	
SF1189	4	27	5	15	6	11	4	10	5	Smoked salmon	1996	France	(Leroi <i>et al.</i> 1998)
ATCC35586	4	36	5	15	6	11	4	12	5	Diseased rainbow trout	1987	USA	(Hiu <i>et al.</i> 1984)
F2	5	2	2	2	2	2	2	1	2	Camembert	2010	France	(Rahman <i>et al.</i> 2014)
DSM20344	5	12	2	2	2	2	2	5	2	Raw milk	1974	USA	(Miller III <i>et al.</i> 1974)
F88	5	12	2	2	2	2	2	5	2	Pérail	2005	France	(Cailliez-Grimal <i>et al.</i> 2007)
F48	6	9	7	10	9	9	5	4	7	Mascarpone gorgonzola	2010	Italy	(Rahman <i>et al.</i> 2014)
F73	6	10	7	10	9	9	5	4	3	Selles-sur-Cher	2010	France	(Rahman <i>et al.</i> 2014)
DSM20590	7	22	9	12	9	8	4	7	17	Vacuum packed beef	1985	-	(Shaw and Harding 1985)
JIP 05/93	7	22	9	12	9	8	4	7	17	Ascites of arctic char (diseased)	1993	France (Jura)	This study
LLS E 6926	7	22	9	12	9	8	4	7	17	Kidney of arctic char (diseased)	1995	France (Jura)	This study
3.18	7	37	9	12	9	6	4	7	17	Pork	2004	Denmark	(Groth Laursen <i>et al.</i> 2005)
G117	8	34	9	18	9	6	4	7	16	Raw milk	2004	Israel	(Hantsis-Zacharov and Halpern 2007)
ML.1-97	8	39	9	18	9	6	4	7	3	salmon	2001	Denmark	(Groth Laursen <i>et al.</i> 2005)
CIP101354	9	20	8	11	6	7	4	9	11	Deer	1984	France	
LLS R 919	9	42	8	11	6	7	4	9	27	Fario troutlet (diseased)	1985	France (Jura)	This study
MM 3365.01	10	52	2	23	15	17	13	17	3	Rainbow trout (diseased)	2001	France (Poitou)	This study
MM 3364.01	10	56	19	23	15	17	13	17	28	Rainbow trout (diseased)	2001	France (Poitou)	This study
F1		1	1	1	1	1	1	1	1	Camembert	2010	France	(Rahman <i>et al.</i> 2014)
C4		1	1	1	1	1	1	1	1	Soil	2005	Canada	(Walker <i>et al.</i> 2006)
F14		5	13	9	5	5	4	3	5	Morbier	2010	Tunisia	(Rahman <i>et al.</i> 2014)
L11		14	2	5	10	6	4	5	8	Raw milk	2010	France	(Rahman <i>et al.</i> 2014)
CIP101342		19	4	11	2	4	7	3	2	Human blood	1984	France	
DSM20624		23	5	6	7	2	4	3	17	Vacuum packed minced meat	1983	-	(Holzapfel and Gerber 1983)
SF692		24	10	6	6	6	6	7	21	Smoked salmon	1995	France	(Leroi <i>et al.</i> 1998)
SF800		25	6	13	1	1	4	7	18	Smoked salmon	1995	France	(Leroi <i>et al.</i> 1998)
SF834		26	14	14	3	10	4	3	12	Smoked salmon	1995	France	(Leroi <i>et al.</i> 1998)
5.27		28	2	16	9	12	4	6	13	Beef	2003	Denmark	(Groth Laursen <i>et al.</i> 2005)
6.2		29	11	7	9	6	9	9	9	Beef	2003	Denmark	(Groth Laursen <i>et al.</i> 2005)
3BO4		31	4	8	9	1	4	11	3	Sphagnum	2005	Denmark	(Groth Laursen <i>et al.</i> 2005)
1A4II		32	15	11	11	6	4	7	19	Sphagnum	2005	Denmark	(Groth Laursen <i>et al.</i> 2005)
G97		33	9	5	9	4	8	7	15	Raw milk	2004	Israel	(Hantsis-Zacharov and Halpern 2007)

3Ba.2.II	38	4	18	8	7	1	7	17	Sphagnum pond	2006	Denmark	(Leisner <i>et al.</i> 2012)
RFA 345	45	4	1	9	3	4	19	31	Pond cyprinid fish (diseased)	1985	Germany (Hanover)	This study
JIP 07/00	46	10	5	6	6	6	14	25	Kidney of goldfish (diseased)	2000	France (Jura)	This study
RFA F54	47	4	11	16	6	4	7	29	Pond cyprinid fish (diseased)	1985	Germany (Hanover)	This study
JIP 23/91	48	17	20	8	13	10	1	17	Juvenile rainbow trout (diseased)	1991	France (Jura)	This study
JIP 19/00	49	20	1	14	15	4	15	17	Neon tetra (diseased)	2000	China (Hong-Kong)	This study
RFA 295	50	21	5	9	6	14	18	30	Pond cyprinid fish (diseased)	1985	Germany (Hanover)	This study
JIP 20/85 (3)	51	16	19	12	1	3	13	22	Fario trout (adult/diseased)	1985	France (Oise)	This study
JIP 28/91	53	18	21	13	14	11	9	23	Pike (adult/diseased)	1991	France (Indre-et-Loire)	This study
Me I,5-02	54	16	22	9	16	12	16	26	Rainbow trout (diseased)	2002	France (Brittany)	This study
131120027309	55	22	22	8	16	12	16	32	Salmonid (diseased)	2014	France (Jura)	This study

^aStrains integrated during this study are highlighted in grey, ^bCC: Clonal Complex, ^cST: Sequence Type

1.4.2. Multilocus sequencing

The primers used to amplify MLST loci were previously used for PCR amplification and the PCR products were sequenced as previously described (Rahman *et al.* 2014).

1.4.3. Nucleotides sequences analyses

The nucleotide sequences were analyzed as previously described (Rahman *et al.* 2014). Phylogenetic reconstruction was performed with MEGA v 5.1 (Tamura *et al.* 2011), according to the neighbor-joining statistical model and the Kimura 2-parameter model taking into account transitions and transversions. Bootstrap values were obtained after 1 000 iterations.

1.4.4. Nucleotides sequences accession

The MLST nucleotide sequences are hosted at PubMLST (<http://pubmlst.org/cmaltaromaticum/>; (Jolley and Maiden, 2010)).

1.5. Results

1.5.1. Analysis of allelic diversity at MLST loci

The nucleotide sequence of fragments of the seven housekeeping genes *pyrE*, *pyc*, *leuS*, *ilvE*, *glpQ*, *ddlA*, and *dapE* was determined for the 21 strains. The Tajima's test D values were all negative, ranging from -1,2372 to -0,2098 (Table 8), and since they were not significantly different from zero, or more precisely, comprised between -2 and 2, neutral selection is most likely the pattern of the studied genes evolution (Robinson *et al.* 2010). The analysis of allelic diversity produced an average of 21 alleles per locus, with a lower allelic diversity for *ddlA* that is represented by 15 alleles and the highest allelic diversity for *leuS* represented by 34 alleles (Table 8). The number of polymorphic sites S ranged from 17 for *pyrE* to 46 for *ilvE* (Table 8), reaching a total of 193 polymorphic sites covering all the concatenated sequences of 2 985 nucleotides. Moreover, the nucleotide diversity (π), which is a measure of polymorphism representing the average number of different nucleotides per site, at the level of two randomly selected and compared sequences, was similar for the seven loci (Table 8).

Table 8. The allelic diversity of *C. maltaromaticum* MLST loci.

Gene	Size (bp)	D^*	π^*	G+C*	S*	Number of Alleles
<i>dapE</i>	399	-1,0390	0,0163	0,398	33	23
<i>ddlA</i>	309	-0,8678	0,0189	0,339	23	15
<i>glpQ</i>	522	-0,8791	0,0121	0,390	27	20
<i>ilvE</i>	426	-1,2372	0,0206	0,411	46	22
<i>leuS</i>	408	-0,2098	0,0130	0,380	22	34
<i>pyc</i>	516	-0,2815	0,0139	0,358	25	17
<i>pyrE</i>	405	-0,3120	0,0124	0,401	17	16

* D : Tajima's D value, π : nucleotide diversity, G+C: percent of G and C content, S: number of variable sites

1.5.2. Assignment of sequence type numbers

For each strain, a specific Sequence Type (ST) was determined based on the combination of alleles. This produced 17 STs that were added to the database, giving a total of 71 (Table 7). The discriminatory power of the MLST scheme applied to the bacterial strain collection was notably high, reaching a value of 0.99. Forty-nine out of 56 STs were represented by a single strain, whereas STs assigned to more than one strain are much fewer in number: 4 STs (ST1, ST7, ST12 and ST15) were exhibited by 2 strains, ST22 embedded 3 strains, ST3 comprised 5 strains, and ST4 comprised 6 strains.

1.5.3. Relatedness between diseased fish isolates and the other typed strains

The population structure was studied with eBURST (Figure 9) (Feil *et al.* 2004). This analysis identified 25 STs as singletons and 31 STs that are part of clonal complexes. The 16 strains were divided over 11 singletons and the remaining 5 were part of 4 clonal complexes. CC4 combined strains CIP102035 and SF1189, isolated from raw milk and smoked salmon, respectively, with the diseased fish isolate *C. maltaromaticum* ATCC35586 (Figure 9, Table 7). CC7 contains the two strains isolated from meat products DSM20590 (ST22) and 3.18 (ST37), as well as the two strains isolated from the diseased fish isolate LLS E 6926 (ST22) and JIP 05/93 (ST22). CC9 contains the strain isolated from deer CIP101354 (ST20) and the diseased fish isolate LLS R 919 (ST42). CC10 contains the two strains isolated from diseased fish MM 3365.01 (ST52) and MM 3364.01 (ST56). In addition, a phylogenetic tree was built and allowed to reveal close relatedness between the strain isolated from smoked salmon SF834 (ST26) and CC9; as well as the strain isolated from smoked salmon SF692 (ST24) and the diseased fish isolate JIP 07/00 (ST46) (Figure 10). Overall, these results show that 5 strains isolated from diseased fish are closely related to strains isolated from food products. None were closely related to strains isolated from cheese. The remaining 11 strains isolated from diseased fish were singletons, suggesting that the population of strains isolated from diseased fish is mostly not clonal.

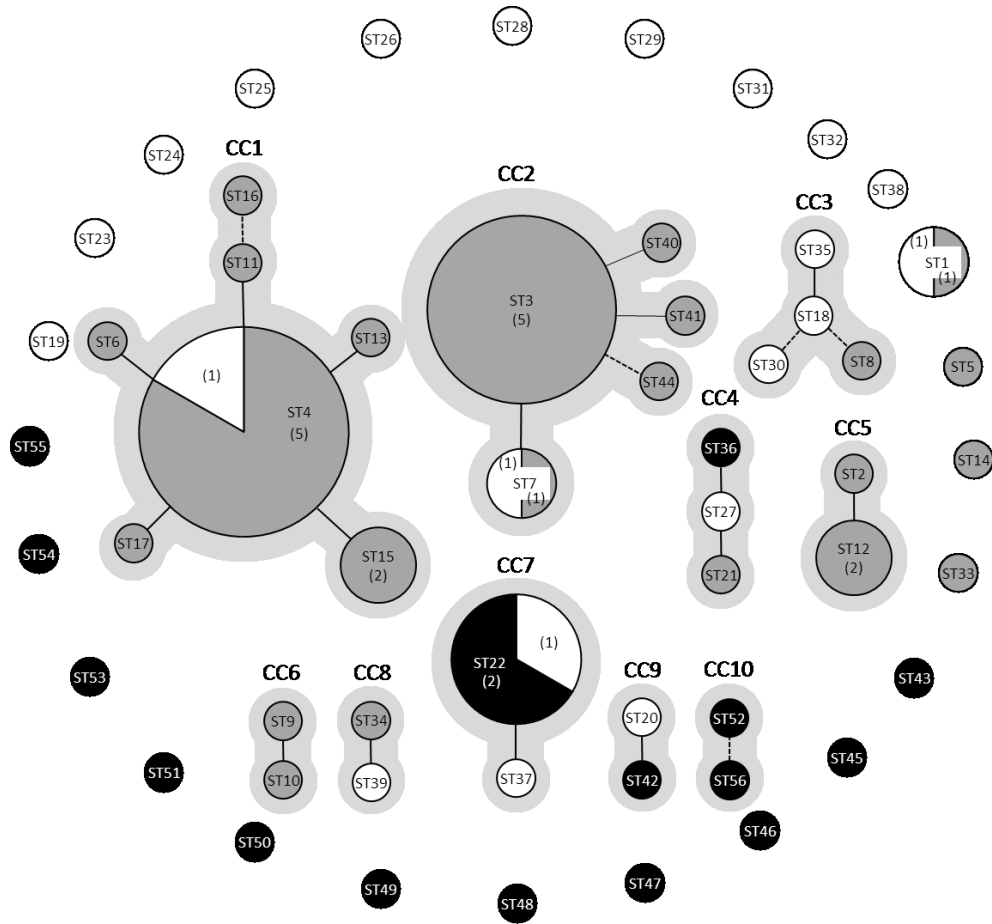


Figure 9. eBURST analysis of 71 *C. maltaromaticum* strains. Each sequence type ST is represented by a circle that is proportional in size to the indicated number of strains characterized by a given ST. Dairy strains, strains isolated from diseased fish and non dairy strains are assigned dark grey, black and white colors respectively. Single Locus Variants (SLVs) are connected by solid lines and Double Locus Variants (DLVs) are connected by broken lines. Clonal Complexes (CC) are indicated in light grey.

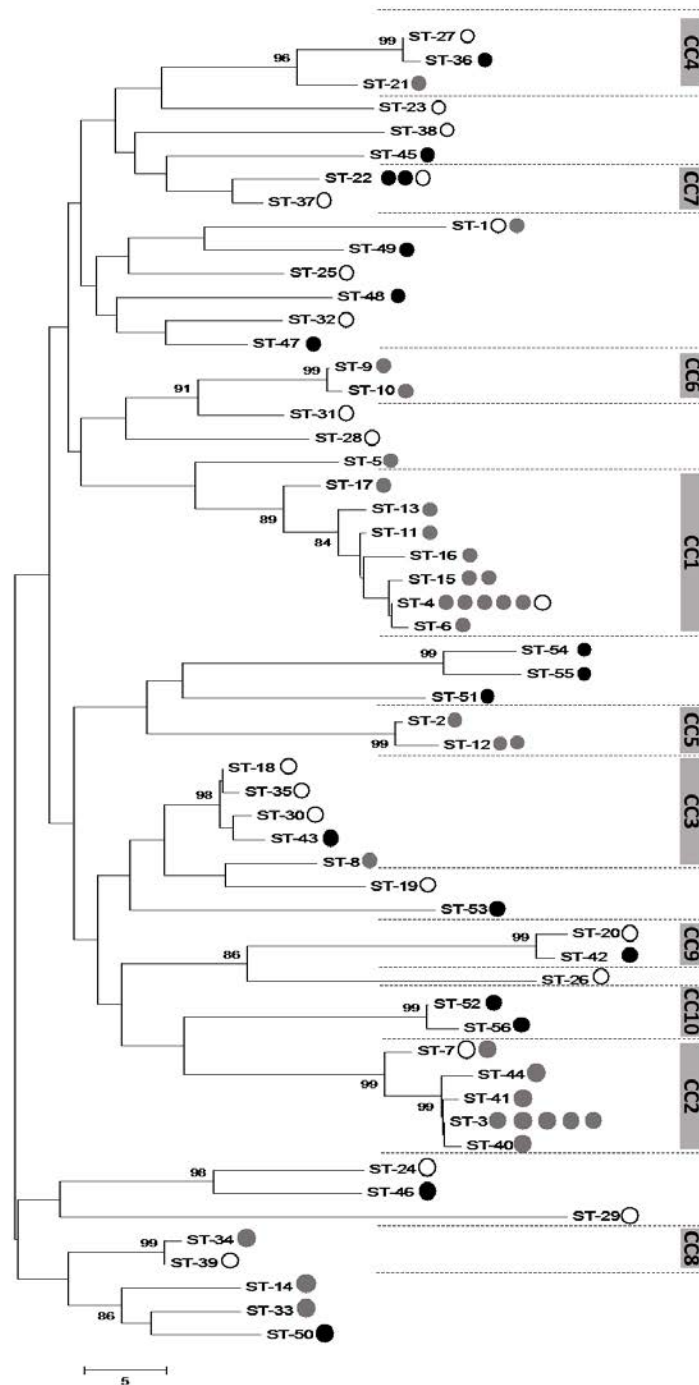


Figure 10. Phylogeny. The tree was constructed based on the alignment of the concatenated sequence of the 56 STs. The grey, black and white circles symbolize dairy strains, strains isolated from diseased fish and non dairy strains, respectively. STs belonging to clonal complexes (CCs) are embraced with a grey rectangle in which the name of the clonal complex is indicated. Tree construction was made with the neighbor joining method and was statistically tested with 1000 bootstrap replications. The bootstrap values are given as percentages, values below 80 are not shown.

1.5.4. Linkage disequilibrium in *C. maltaromaticum* population

The standardized association index I_A^S , that statistically evaluates whether alleles at different loci are randomly associated while taking into account the number of loci, was calculated. For the overall *C. maltaromaticum* population, the I_A^S was equal to 0.163 ($P < 0.01$) showing a slight linkage disequilibrium. The standardized index of association for the diseased fish isolates was of 0.0910 ($P < 0.01$) and therefore was lower than the standardized association index of the whole population, suggesting that recombination played a more pronounced role in shaping the population of fish isolates. On the contrary, the index I_A^S was equal to 0.455 ($P < 0.01$) for the population of dairy strains revealing that this sub-population is more clonal.

1.5.5. Nucleotide diversity

The mean nucleotide diversity (π) of the whole population was compared to those of the different sub-populations (Figure 11). The results revealed that π was approximately of 0.012 for the whole population. The π values for the dairy and the diseased-fish populations were around 0.011 and 0.013, respectively, and were therefore close to the π value of the overall population. By contrast, the π values were markedly lower for the clonal complexes. These results indicate that the diversity of the dairy and diseased fish sub-populations is high, suggesting that these environments are not selective for the species *C. maltaromaticum*.

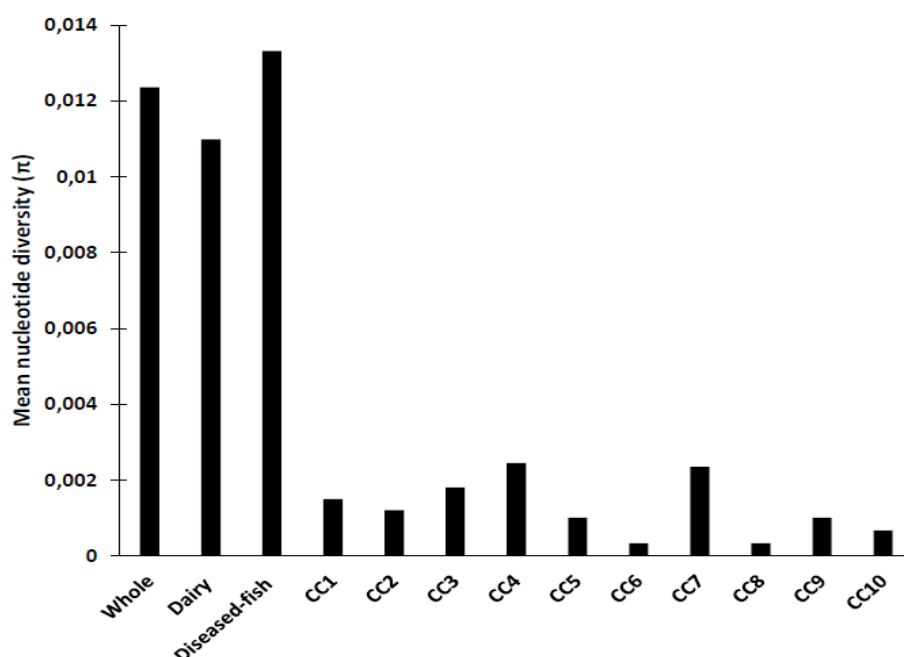


Figure 11. Mean nucleotide diversity. The mean nucleotide diversity was calculated for the overall population as well as for sub populations.

1.6. Discussion

In the present work, the previously established MLST scheme of the lactic acid bacterium *C. maltaromaticum* (Rahman *et al.* 2014), was used to type 21 additional strains, including sixteen isolates obtained from diseased fishes and five dairy strains. The method allowed to delineate 56 STs among the 71 strains, with a discriminatory power of 0.99. These results confirmed previous results showing that this MLST scheme is a powerful typing method for *C. maltaromaticum* (Rahman *et al.* 2014). This study identified 17 new STs and thus enabled to further explore the diversity within the species *C. maltaromaticum*.

The dairy strains represented by 23 STs were mostly linked to clonal complexes (82.6%). On the contrary, approximately 70% of the strains isolated from diseased fish corresponded to singleton genotypes inferring the presence of several strains that lead to infection in fish rather the presence of a hypervirulent lineage. In line with this, the association index was lower in the diseased-fish isolates compared to the overall population, whereas the dairy isolates exhibited a higher association index. This suggests that the dairy population is more clonal than the diseased fish isolates. In the population formed by the diseased fish isolates, recombination may have played a significant role in shaping the population.

Although the dairy population showed clonal properties, the strains are spread in several clonal complexes. This leads to a high nucleotide diversity, almost as high as the nucleotide diversity corresponding to the overall population. These results further confirm the hypothesis according to which the dairy environment is not selective for the population of *C. maltaromaticum* (Rahman *et al.* 2014).

The objective of this MLST analysis was to investigate the extent of the relatedness between food strains and fish pathogenic strains. *C. maltaromaticum* strain SF1189 (ST27), isolated from smoked salmon, had been previously found to belong to the same clonal complex than the diseased fish strain ATCC 35586 (ST 36), isolated from diseased rainbow trout and the dairy strain CIP102035 (ST21) isolated from raw milk (Rahman *et al.* 2014). This latter finding suggests that transfer between the milk production sector and the fish

environment might be possible. Such habitat shift has been previously suggested to explain the presence of marine halotolerant γ -*Proteobacteria* in cheese (Wolfe *et al.* 2014).

Several strains isolated from diseased fish exhibit genotypes closely related to food isolates. In CC7, the two strains isolated from diseased fish, strain JIP 05/93, isolated from ascites of arctic char, and strain LLS E 6926, isolated from kidney of arctic char, belong to ST22 as well as strain DSM20590 which was isolated from vacuum packed beef. Moreover, strain LLS R 919, isolated from a diseased fario troutlet, forms CC9 with strain CIP101354 which was isolated from deer meat. Some strains isolated from diseased fish were therefore revealed to be closely related to strains isolated from edible products. However, it can be noticed that no strain isolated from diseased fish, introduced by this work to the *C. maltaromaticum* MLST scheme, was assigned to a clonal complex comprising dairy strains isolated from cheese.

The EFSA did not include the species *C. maltaromaticum* in the QPS list because it is associated with fish disease (EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), 2012). This necessitates tools for the risk assessment of single strains when an intentional use in the food chain is considered for which MLST proves to be useful. The 16 strains that were isolated from diseased fish were typed by MLST which added the following STs: ST22, ST36, ST42, ST43, and ST45 to ST56. In addition, ST22, ST36, ST42, ST52 and ST56 are part of the clonal complexes: CC4, CC7, CC9, and CC10. We suggest that strains exhibiting these STs, as well as those associated with clonal complexes, should be avoided from food, and consistently that strains that should be considered for intentional use in food should be exhibiting the remaining or new STs.

These MLST data could be used in the future as a reference for the risk assessment of strains intended to be used in the food chain and thus could contribute to accelerate the innovative use of strains that belong to the species *C. maltaromaticum* for dairy ripening and food protection purposes.

1.7. Acknowledgments

We thank JF Bernardet for providing to us the strains isolated from diseased fish used in this study. We also thank Myriam Michel and Sylvie Wolff for their technical assistance during this work.

2. Nested structure of intraspecific interference competition in *Carnobacterium maltaromaticum*

Ramia, N.E., Pardini-Gontijo, M.-T., Mangavel, C., Gaiani C., Taha, S., Revol-Junelles, A.-M., Borges, F., 2018. Nested Structure of Intraspecific Competition in *Carnobacterium maltaromaticum* (en voie de soumission).

2.1 Préambule

Les approches de microbiologie à haut débit sont essentiellement mises au service de criblage de souches candidates pour des applications en biopréservation, la stratégie de criblage étant basée sur l'étude de leurs potentiels compétitifs vis-à-vis de pathogènes alimentaires, telle *Listeria monocytogenes* (El Kheir et al., 2018). Ces approches à haut débit ont permis de révéler le potentiel antagoniste vis-à-vis de *L. monocytogenes* d'environ 25% des 96 souches de *C. maltaromaticum* (résultats non publiés).

Contrairement aux connaissances bien documentées sur la compétition entre bactérie d'intérêt et bactérie pathogène, les connaissances relatives à la compétition entre les différentes bactéries présentes dans l'aliment sont peu documentées.

Un système expérimental basé sur l'approche haut-débit sera mis au point pour pouvoir analyser le réseau de compétition par interférence chez *C. maltaromaticum*. Des tests de compétition à deux acteurs, au nombre de 5776, seront réalisés au sein d'une collection de 76 souches de *C. maltaromaticum*. Chaque test mettra en jeu deux souches, une souche en situation d'expédition et une souche en situation de réception. En outre, dans l'objectif d'explorer plus finement la compétition par interférence, une approche de génomique descriptive sera appliquée sur des génomes complets de 26 souches de *C. maltaromaticum* afin de prédire leur contenu en gènes codant la synthèse de substances antagonistes et notamment en gènes codant potentiellement des bactériocines.

L'identification des caractéristiques de la compétition par interférence à l'échelle intraspécifique chez *C. maltaromaticum* devrait contribuer à combler des lacunes sur des topologies de réseaux de compétition par interférence entre bactéries de l'aliment et plus précisément à l'échelle intra-spécifique. Par ailleurs, la caractérisation des propriétés écologiques du réseau expérimental devrait permettre d'établir une comparaison avec les propriétés écologiques des réseaux théoriques qui concilient compétition et diversité. La problématique de l'issue de la compétition sur la microdiversité de l'aliment sera abordée.

2.2 Abstract

Interference competition in food has long been investigated for applications in biopreservation by examining the antagonistic properties of candidate bioprotective strains targeting undesirable, food contaminating bacteria. While microbial biodiversity lies at the origin of food products typicality, few studies have focused on interference competition within the food microflora and its impact on biodiversity. We examined the extent, network properties and putative genes of interference competition among a collection of 76 bacterial strains of *Carnobacterium maltaromaticum*, a genetically diverse species of lactic acid bacteria known for comprising several bacteriocinogenic strains with bioprotective potentialities against the food-borne pathogen *Listeria monocytogenes*. The performed high-throughput competition assays, investigating 5 776 pairwise interactions, showed that intraspecific interference competition was major in *C. maltaromaticum* with approximately 60% of the sender strains antagonizing at least one receiver strain. A high diversity of inhibitory activity and sensitivity spectra were identified. Through the network analysis approach, we determined the highly nested architecture of *C. maltaromaticum* competitive network, thus showing that interference competition in this species was determined by both the potency of the antagonistic substances produced and by the level of antimicrobial sensitivity of the receiver strains. *In silico* mining of antagonistic substances in 26 *C. maltaromaticum* strains genomes revealed a diversity of antagonistic substances, compatible with the observed target specificity of antagonizing strains. Our study revealed that interference competition in *C. maltaromaticum* shared many features with *in silico* models reconciling competition and diversity, and the data highlight the importance of studying competitive network properties, for a better understanding of bacterial interactions on the microdiversity of the food ecosystem.

Keywords: *Carnobacterium maltaromaticum*, intraspecific level, interference competition, network analysis, nestedness, genomics

2.3 Introduction

Microbial competition is a widespread phenomenon in food ecosystems, especially in fermented foods characterized by a high microbial biomass (Esnouf, 2017) that causes limitation in available resources, thus leading to the promotion of competition (Bauer et al., 2018). This phenomenon has long been applied for food biopreservation purposes (Stiles, 1996; Drider et al., 2006; Elsser-Gravesen and Elsser-Gravesen, 2014; Leyva Salas et al., 2017). Its application is mainly based on the exploitation of the properties of competitive microorganisms capable of inhibiting food-borne pathogens by secreting antagonistic substances, such as bacteriocins, *via* interference competition. Hence, studies on microbial competition have long been conducted with the aim of optimizing biopreservation and have led to increased knowledge of the competition between bioprotective food microorganisms and unwanted food microorganisms (Chopra et al., 2015; Mokoena, 2017). However, competition between nonpathogenic food microorganisms is not well known. Microbial competition may negatively impact the microdiversity of food. For instance, it has been demonstrated, that the use of industrial competitive strains of *Lactococcus lactis* in food caused a reduction in the diversity of *L. lactis* strains belonging to the resident microflora (Passerini et al., 2010). The maintenance of microbial diversity is, however, crucial for food processing, especially because high levels of diversity have been linked to the promotion of the typicality and the safety of fermented foods (Eppert et al., 1997; Imran et al., 2010; Maoz et al., 2003; Roth et al., 2010; Retureau et al., 2010; Montel et al., 2014). Understanding competitive interactions among food bacteria could allow a better control of the food ecosystem.

Although competition can lead to a decrease of biodiversity, under certain circumstances competition and diversity can be compatible as it was shown for *Escherichia coli*. For this species, an equilibrium could be established in a three actor model in which three bacterial strains coexisted, with one strain being the producer of a bacteriocin, the second one being sensitive to the produced bacteriocin and the third being resistant to it. This scenario can be mapped to the children's game of RPS (rock–paper–scissors), a game with no single winning strategy. Similar results were obtained with *in silico* models where several actors were able to cohabit if the density of antagonistic interactions were high along with a high diversity of the produced substances and a high diversity of the interactive roles played by the different interacting actors (Abrudan et al., 2012). Nonetheless, the three actor model

and the nine actor model are both considered bottom-up approaches (Ghoul and Mitri, 2016) meaning that the models only consider small subpopulations of microorganisms that aren't representative of more complex competitive networks involving a larger number of microorganisms.

For a better understanding of microbial competition, approaches based on network analysis, referred to as top-down approaches, are being recently used to analyze the statistical properties of microbial competitive networks (Aguirre-von-Wobeser et al., 2014). The approach of network analysis enabled Lo Giudice et al. 2007 to find that sensitivity was correlated with taxonomy in marine psychrotrophic bacteria by comparing sender and receiver degrees of different strains belonging to different taxonomic groups. Furthermore, analysis of the competitive network of *Streptomyces* strains showed by calculating the sender-receiver asymmetry coefficient, that the structure of the competitive network was determined by the antagonistic potential of the sender strains, rather than the resistance level of receiver strains (Vetsigian et al., 2011). The network analysis approach was also used to better understand the effect of temperature variation on the outcome of competitive interactions in Arctic bacteria (Prasad et al., 2011). Another study mapped interference competition among *Bacillus* strains and demonstrated that antagonism is a determining factor in the spatial exclusion of con-specific strains (Pérez-Gutiérrez et al., 2013). Furthermore, interference competition mapping showed that the probability of inhibition increased with phylogenetic distance in *Streptomyces* soil bacteria (Vetsigian et al., 2011) and in *Vibrionaceae* strains (Cordero et al., 2012). Network analysis allowed also the validation of two hypotheses that are in contradiction with the previous ones: Russel et al. 2017 showed that inhibition was more frequent between phylogenetically related species characterized by a niche overlap, and similarly, it has been shown in *Pseudomonas fluorescens*, that the probability of inhibition increased between isolates sharing ecological similarities (Bruce et al., 2017). Additionally, network analysis has proven to be a useful approach for determining the architecture of competitive bacterial networks. Aguirre-von-Wobeser et al. 2014 were able to identifying the pattern of nestedness shaping the competitive network between 37 gamma-proteobacteria, a pattern that has long been observed in the context of mutualistic interactions between plants and animal pollinators (James et al., 2012; Wei et al., 2015) and that has been linked to promotion of biodiversity (Bastolla et al., 2009).

While bacterial competitive networks are being widely investigated in models of environmental bacteria, the structure of competitive networks among food bacteria remains

unknown. The aim of this study was to assess the extent of interference competition in the lactic acid food bacterium *Carnobacterium maltaromaticum* by mapping the competitive network within a population of 76 strains, using a high-throughput approach, followed by a network analysis aiming to identify the network architecture. This study also aims to further investigate competition in *C. maltaromaticum* by performing an *in silico* mining of bacteriocins in 26 *C. maltaromaticum*. This knowledge of the ecological properties of interference competition at the intraspecific level of a food bacterium will contribute to a better understanding of microbial competition between food bacteria and its potential impact on the microdiversity of the food ecosystem.

2.4 Material and methods

2.4.1 Collection of bacterial strains

The *C. maltaromaticum* strains used in this study are presented in Table 9. Several strain of *Listeria monocytogenes* were used : the wild-type strain *L. monocytogenes* EGDe, and *L. monocytogenes* Δ *mpt1*, a mutant strain deficient in man-PTS genes encoding the mannose phosphotransferase system, which play the role of receptor for class II bacteriocins (pediocin-like group) (Tymoszevska et al., 2017) (Table 9). All strains were cultivated in Trypticase Soy Broth medium (TSB) (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France) supplemented with 6 g/L of bacto-yeast extract (YE) and incubated at 30 °C for 16 h. Strains were stored in TSBYE medium supplemented with glycerol at a final concentration of 10 % (v/v) at – 80 °C and propagated twice before use.

The receiver strains were cultivated in 96 well sterile microplates in which each well was filled with 200 μ L TSBYE and inoculated with 5 μ L of TSBYE precultures. The microplates were incubated for 24h at 30°C prior to storage at -80°C. They were propagated once in fresh medium conditioned in 96 well microplate before use.

Table 9. Characteristics of the *C. maltaromaticum* strain collection used for competition assays

Strain code	Origin	Year	Country	ST	CC	Reference
ATCC 35586	Diseased rainbow trout	1987	USA	36	4	(Hiu et al. 1984)
CIP102035	Raw milk	1985		21	4	
DSM20624	Vacuum packed minced meat	1983	France	23		(Holzapfel and Gerber 1983)
3Ba.2.II	Sphagnum pond	2006	Denmark			(Leisner et al. 2012)
RFA 345	Pond cyprinid fish (diseased)	1985	Germany (Hanover)	45		(Ramia et al., 2018)
DSM20590	Vacuum packed beef	1985		22	7	(Shaw and Harding , 1985)
JIP 05/93	Ascites of arctic char (diseased)	1993	France (Jura)	22	7	(Ramia et al., 2018)
LLS E 6926	Kidney of arctic char (diseased)	1995	France (Jura)	22	7	(Ramia et al., 2018)
F1	Camembert	2010	France	1		(Rahman et al. 2014)
C4	Soil	2005	Canada	1		(Walker et al. 2006)
JIP 19/00	Neon tetra (diseased)	2000	China (Hong-Kong)	49		(Ramia et al., 2018)
JIP 23/91	Juvenile rainbow trout (diseased)	1991	France (Jura)	48		(Ramia et al., 2018)
1A4II	Sphagnum	2005	Denmark	32		(Groth Laursen et al. 2005)
RFA F54	Pond cyprinid fish (diseased)	1985	Germany (Hanover)	47		(Ramia et al., 2018)
F48	Mascarpone gorgonzola	2010	Italy	9	6	(Rahman et al. 2014)
F73	Selles-sur-Cher	2010	France	10	6	(Rahman et al. 2014)
3BO4	Sphagnum	2005	Denmark	31		(Groth Laursen et al. 2005)
5.27	Beef	2003	Denmark	28		(Groth Laursen et al. 2005)
F14	Morbier	2010	Tunisia	5		(Rahman et al. 2014)
CP32	Brie	1994	France	17	1	(Millière et al. 1994)
L1	Lait cru	2010	France	13	1	(Rahman et al. 2014)
F86	Cabrales	2010	Spain	11	1	(Rahman et al. 2014)
CP23	Brie	1994		16	1	(Millière et al. 1994)
CP4	Brie	1994		15	1	(Millière et al. 1994)
CP5	Brie	1994		15	1	(Millière et al. 1994)
F29-1	Lumpfish roe		Denmark	4	1	(Laursen et al. 2005)
F7	Halloum	2010	Lebanon	4	1	(Rahman et al. 2014)
F44	Mont D'or	2010	France	4	1	(Rahman et al. 2014)
LMA28	Brie	1994	France	4	1	(Millière et al. 1994)
DSM20342	Raw milk	1974	USA	4	1	(Miller III et al. 1974)
CP3	Brie	1994	France	4	1	(Ramia et al., 2018)
F33	St Maure de Touraine	2010	France	6	1	(Rahman et al. 2014)
Me I,5-02	Rainbow trout (diseased)	2002	France (Brittany)	54		(Ramia et al., 2018)

1,31E+11	Salmonid (diseased)	2014	France (Jura)	55		(Ramia et al., 2018)
JIP 20/85 (3)	Fario trout (adult/diseased)	1985	France (Oise)	51		(Ramia et al., 2018)
F2	Camembert	2010	France	2	5	(Rahman et al. 2014)
DSM20344	Lait cru	1974	USA	12	5	(Miller III et al. 1974)
C44	Pérail	2005	France	12	5	(Cailliez-Grimal et al. 2007)
CIP100481	Human blood	1983	France	18	3	
710	Pork	2009	France	35	3	(Feurer et al. 2010)
9.4	Beef	2003	Denmark	30	3	(Groth Laursen et al. 2005)
JIP 14/92	Kidney of rainbow trout (diseased)	1992	France (Seine-Maritime)	43	3	(Ramia et al., 2018)
F43	St Marcellin	2010	France	8	3	(Rahman et al. 2014)
CIP101342	Human blood	1984	France	19		
JIP 28/91	Pike (adult/diseased)	1991	France (Indre-et-Loire)	53		(Ramia et al., 2018)
CIP101354	Deer	1984	France	20	9	
LLS R 919	Fario troutlet (diseased)	1985	France (Jura)	42	9	(Ramia et al., 2018)
MM 3365.01	Rainbow trout (diseased)	2001	France (Poitou)	52	10	(Ramia et al., 2018)
MM 3364.01	Rainbow trout (diseased)	2001	France (Poitou)	56	10	(Ramia et al., 2018)
F42	Rocamadour	2010	France	7	2	(Rahman et al. 2014)
N15	Halibut-sugar salted	1990s	Denmark	7	2	(Groth Laursen et al. 2005)
CP11	Brie	1994	France	44	2	(Ramia et al., 2018)
CP12	Brie	1994	France	41	2	(Ramia et al., 2018)
F4	Le Montagnard	2010	France	3	2	(Rahman et al. 2014)
F84	Kernhemmer	2010	The Netherlands	3	2	(Rahman et al. 2014)
CP14	Brie	1994	France	3	2	(Millière et al. 1994)
F87	Tynjethaler	2010	The Netherlands	3	2	(Rahman et al. 2014)
CP7	Brie	1994	France	3	2	(Millière et al. 1994)
CP10	Brie	1994	France	40	2	(Millière et al. 1994)
JIP 07/00	Kidney of goldfish (diseased)	2000	France (Jura)	46		(Ramia et al., 2018)
G117	Raw milk	2004	Israel	34		(Hantsis-Zacharov and Halpern 2007)
L11	Raw milk	2010	France	14		(Rahman et al. 2014)
G97	Lait cru	2004	Israel	33		(Hantsis-Zacharov and Halpern 2007)
RFA 295	Pond cyprinid fish (diseased)	1985	Germany (Hanover)	50		(Ramia et al., 2018)
6.2	Beef	2003	Denmark	29		(Groth Laursen et al. 2005)
JIP 169/77(3)	Frario trout (diseased)	1977	France (Pas-de-Calais)			(This study)
JIP P04/83	Rainbow trout (adult, diseased)	1983	France (North)			(This study)
JIP 05/93 (3)	Arctic char (kidney, diseased)	1993	France (Jura)			(This study)
LLS E 6103	Goldfish (Kidney, diseased)	1995	France (Jura)			(This study)
RFA 378	Pond cyprinid fish (diseased)	1985	Germany (Hanover)			(This study)

10040100629	Diseased fish	2010		(This study)
8.1	Beef		Denmark	(Groth Laursen et al. 2005)
L2	Raw milk	2010	France	(Rahman et al. 2014)
L3	Raw milk	2010	France	(Rahman et al. 2014)
L7	Raw milk	2010	France	(Rahman et al. 2014)
CP1	Brie	1994	France	(This study)

Strains used for the in silico genome mining of antagonistic substances are highlighted in grey, CC: Clonal Complex, ST: Sequence Type (Rahman et al., 2014, Ramia et al., 2018)

2.4.2 Competition assays

For each high-throughput competition assay, a control microplate was designed in order to get measures of the growth kinetics of receiver strains when fresh TSBYE is added (Figure 12).

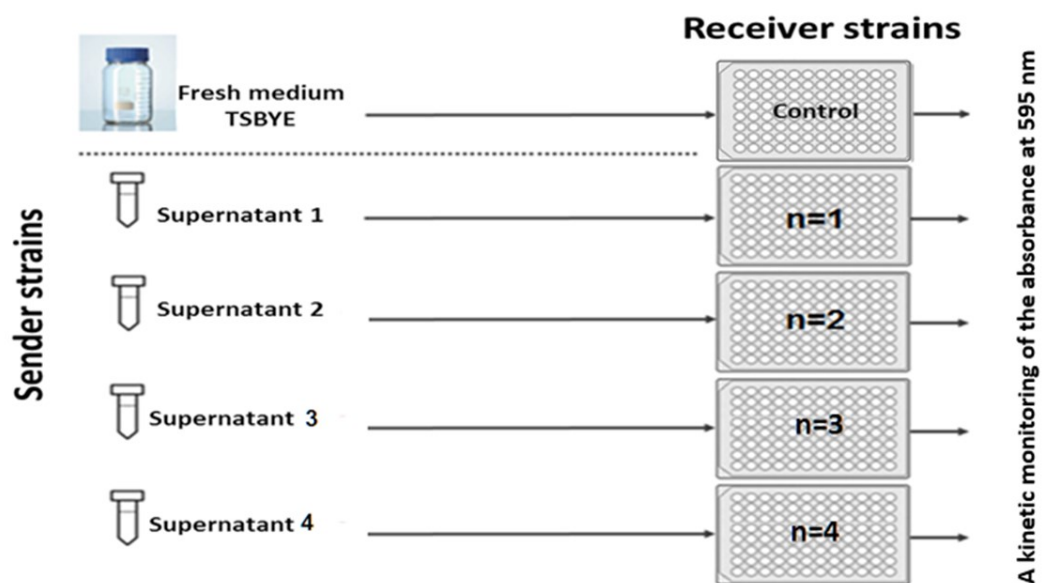


Figure 12. A schematic flow chart of the experimental design used to perform high-throughput competition assays that test in each run the effect of 4 CFS of sender strains on the collection comprising all receiver strains.

Each competition assay was carried following a three-day protocol. Two days prior to exposing the receiver strains to the CFS of sender strains a colony of a sender strain was used to inoculate 10 mL TSBYE medium and the culture was performed by incubating at 30°C for 24h. The resulting culture was washed once with fresh TSBYE by centrifugation at 2795 x g for 10 min, then the cells were resuspended in 10 mL of fresh TSBYE medium. This

suspension was diluted 1000 times in 50 mL of TSBYE medium and was incubated at 30°C for 24h. In parallel, a microplate containing frozen cultures of receiver strains was thawed and 5 µL were used to inoculate 195 µL of fresh TSBYE in each well of a 96-well microplate which was subsequently incubated at 30°C for 24h. On day 3, CFS of each of the sender strain was prepared by centrifugation of the sender strain culture at 2795 x for 10 min, followed by filtration of the supernatant through a 0.45 µm pore sized filter. In parallel, 20 µL of the receiver strains precultured in 96-well microplates were used to inoculate 90 µL of fresh TSBYE in 96 well microplate and then 100 µL of CFS of the sender strain was added to each well. A kinetic monitoring of the absorbance at 595 nm was carried out using the plate reader Infinite Pro 200 (Tecan) integrated into an automated handling system allowing to monitor 5 96-well microplates in parallel. For each batch of 5 microplates, one microplate was used as a growth positive control (in which 100 µL additional TSBYE medium was added instead of CFS), and the remaining microplates were used to test the effect of the CFS of 4 sender strains.

2.4.3 High-throughput data processing

Growth kinetics were measured at 40-minute intervals for 20 h. At the end of each run, data were exported to an Excel® spreadsheet. High-throughput screening data were processed by determining, for each kinetic, a qualitative and quantitative Growth Inhibition Indicator (GII) that allowed to classify pairwise interactions into two categories: antagonistic and non-antagonistic interactions. The GII evaluates the impact of the sender strain CFS on the growth of the receiver strain by calculating the difference: “ $t_2 - t_1$ ”; where “ t_2 ” is the time (min) required for the receiver strain culture to reach an OD_{595nm} value of 0.2 when under the presence of the cell-free supernatant of the sender strain, and “ t_1 ” is the time (min) required for the receiver strain to reach an OD_{595nm} of 0.2 when cultivated in the positive control (fresh TSBYE medium exclusively, Figure 13). A GII value greater than 300 denotes was interpreted as a significant inhibition.

The interference competition map was obtained by constructing a (76 × 76) pairwise interaction matrix based on the GII values, then converting the latter into a binary matrix by assigning the number “1” to GII values higher than 300 for antagonistic interactions and by assigning “0” GII values less than 300 for non-antagonistic interactions. The resulting binary matrix was converted into a heatmap (Figure 14).

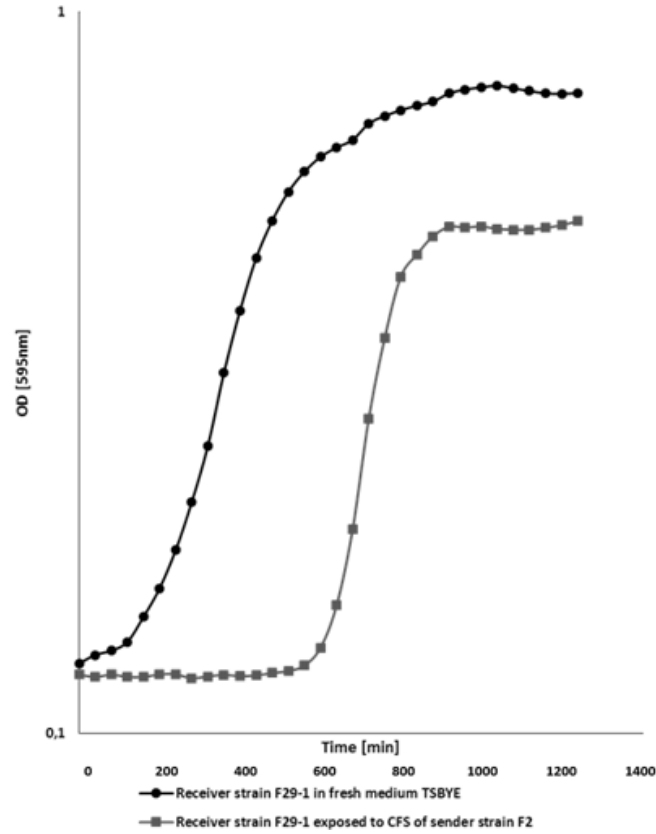


Figure 13. Principle of data processing. For each tested binary interaction, the growth of the receiver strain in the positive control (fresh TSBYE medium exclusively) is compared to the one recorded when the receiver strain is exposed to the CFS of the sender strain

2.4.4 Statistical network analysis

The interaction frequency of the resulting competitive network was obtained by dividing the number of observed antagonistic interactions by the number of possible interactions (Equation 1, Vetsigian et al., 2011).

$$F = \sum_{ij} A_{i \leftarrow j} / N^2$$

Equation 1. The formula of interaction frequency “F” for a N*N binary interaction matrix $A_{i \leftarrow j}$ in which 1 indicates the presence of an antagonistic interaction and 0 indicates the absence of an antagonistic interaction, with N being the number of tested stains and N*N, the number of tested pairs of interacting strains.

This value ranges from 0, when none of the strains are competitive, to 1 when all strains compete with all strains. The network diameter, defined as the longest path connecting any two strains (Newman, 2003), was obtained by the network analyzer tool implemented in

Cytoscape software (Shannon et al., 2003). Sender degrees and receiver degrees were calculated individually, for each strain, and correspond respectively to the number of strains antagonized by a given strain and the number of strains antagonizing it (Newman, 2003; Pérez-Gutiérrez et al., 2013). The sender-receiver asymmetry which identifies whether the competitive network is determined on average more by sender strains or by the receiver, was calculated as proposed by Vetsigian et colleagues (2011) (Equation 2).

$$Q = \left(\text{var}_i \sum_j A_{i \leftarrow j} / N - \text{var}_j \sum_i A_{i \leftarrow j} / N \right) \frac{1}{F(1-F)}$$

Equation 2. The formula of sender-receiver asymmetry based on the variances of sender and receiver degrees; matrices with negative Q are sender-determined, and with positive Q are receiver-determined.

Nestedness was calculated as defined in Bascompte and colleagues (2003) using the algorithm of Rodriguez-Girones and Santamaria (2006).

2.4.5 Genome sequencing and assembly

C. maltaromaticum strains used for the genomic analysis part of the study are highlighted in grey in Table 9. Sequencing was carried out on an Illumina MiSeq sequencer (Eurofins genomics) in order to generate paired-end reads. De novo assembly was performed using CLC Genomics Workbench 10. As a result, the assembly yield in average 72 ± 24 contigs, varying from 37 to 134.

2.4.6 Bacteriocin gene prediction

In silico identification of putative bacteriocin-encoding gene clusters in *C. maltaromaticum* strains genomes was performed using BAGEL3 and BAGEL4 (de Jong et al., 2006). Clusters were represented schematically using the software SnapGene software (from GSL Biotech; available at: www.snapgene.com) (Annexe 1).

2.4.7 Evaluating correlation between bacteriocin genes predictions – inhibitory spectra at strain level

To test the correlation between bacteriocin genes predictions and inhibitory spectra at strain level, two similarity matrices were created for the strains and represented respectively: the similarity matrix of antagonistic activity spectra displayed by the strains and the similarity matrix of predicted bacteriocin gene contents. Both similarity matrices were generated using DendroUPGMA, a dendrogram construction utility available online at: <http://genomes.urv.cat/UPGMA/> based on the “Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean” (Annexe 2). Similarity indexes that generated the matrices were calculated using the Jaccard index.

Mantel test was performed using XLSTAT software and correlation between the similarity matrix of antagonistic activity spectra displayed by the strains and the similarity matrix of predicted bacteriocin gene content was calculated using the Pearson correlation coefficient r .

2.4.8 Secondary metabolites identification

In silico identification of putative gene clusters encoding secondary metabolites in *C. maltaromaticum* strains genomes was performed using antiSMASH (Medema et al., 2011).

2.5 Results

2.5.1 General features of the interference competition network among *C. maltaromaticum* strains

Considering the competitive network of *C. maltaromaticum* strains, the frequency of antagonistic interactions was 0.12 with 702 antagonistic interactions out of a total of 5 776 tested pairwise interactions.

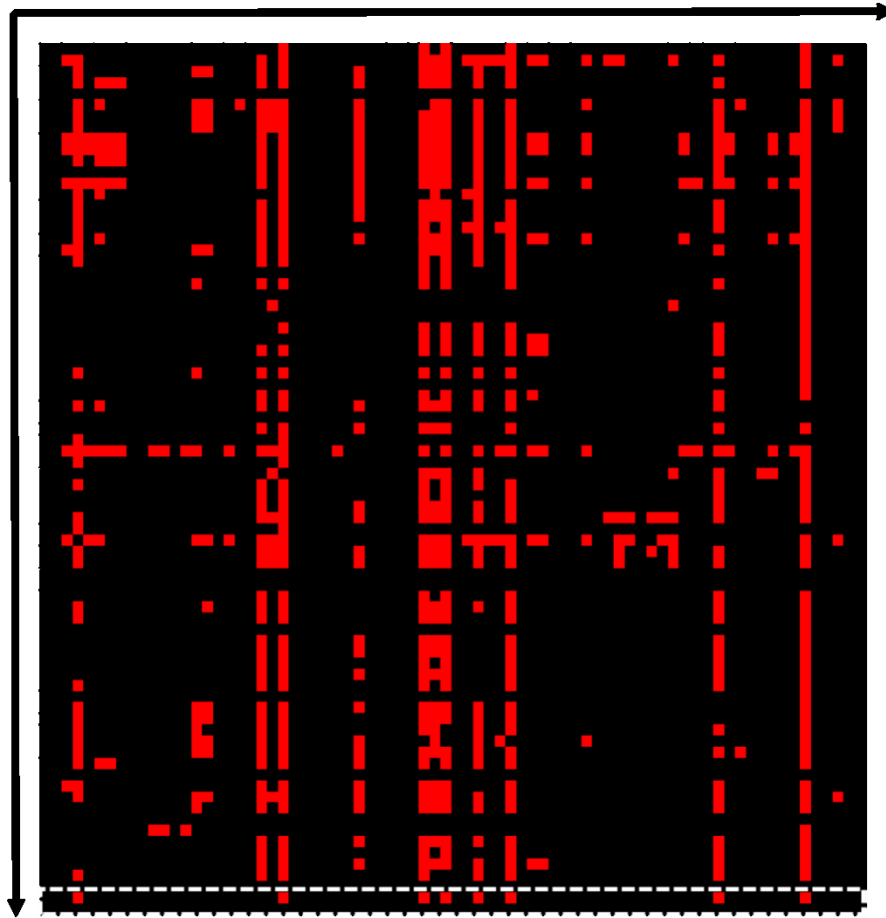


Figure 14. Heatmap representing the pairwise interaction matrix between the 76 tested *C. maltaromaticum* strains and binary interactions (the bottom framed rows) in which the 76 *C. maltaromaticum* strains are the sender strains targeting respectively *L. monocytogenes* EGDe and *L. monocytogenes* Δ mpt1. Red represents an antagonistic interaction while black represents a non-antagonistic interaction. X-axis depicts the tested strains in the position of senders and Y-axis depicts the tested strains in the position of receivers.

This interaction frequency is defined as the fraction of strains with observed antagonistic interactions relative to the number of possible strain-pairs (76×76) in the collection. The resulting competitive network connected all strains tested except five strains that weren't involved in any antagonistic interaction, neither as the antagonizing strain, nor as the antagonized strain. The network diameter (§ 1.5.1, Tableau 5) was of 5, meaning that the most disconnected pair of strains were connected by 5 antagonistic interactions.

Forty-five *C. maltaromaticum* sender strains were antagonizing at least one receiver strain, thus leading to a percentage of 60 % producer strains that is representative of a relatively high level of intraspecific competition in *C. maltaromaticum* species. In fact the mapping of interspecific competition between *C. maltaromaticum* strains and both *L.*

monocytogenes strains revealed that 8 out of the 76 tested *C. maltaromaticum* strains, antagonized *L. monocytogenes* EGDe, which is representative of an interspecific competition estimated at 11 %. None of the *C. maltaromaticum* sender strains exhibited antagonistic properties against the mutant *L. monocytogenes* $\Delta mpt1$ strain deficient in man-PTS genes, suggesting that the anti-*L. monocytogenes* substances produced by the antagonizing *C. maltaromaticum* strains are most probably class II pediocin-like bacteriocins, since man-PTS genes encode the mannose phosphotransferase system which is the receptor for class II bacteriocins. The eight antagonizing *C. maltaromaticum* strains identified against *L. monocytogenes* EGDe were highly antagonistic at the intraspecific level suggesting that at an interspecific level, antagonism is less frequent compared to intraspecific level, because a higher inhibition potency is required.

Furthermore, 69 *C. maltaromaticum* receiver strains were antagonized by at least one *C. maltaromaticum* sender strain, thus leading to a heterogeneity in the frequencies of producers, and sensitive strains.

2.5.2 Assignment of individual interactive profiles to strains

C. maltaromaticum strains were sorted into different categories, each category representing an interactive profile assigned according to the role played by a given strain in the context of pairwise interactions (Figure 15).

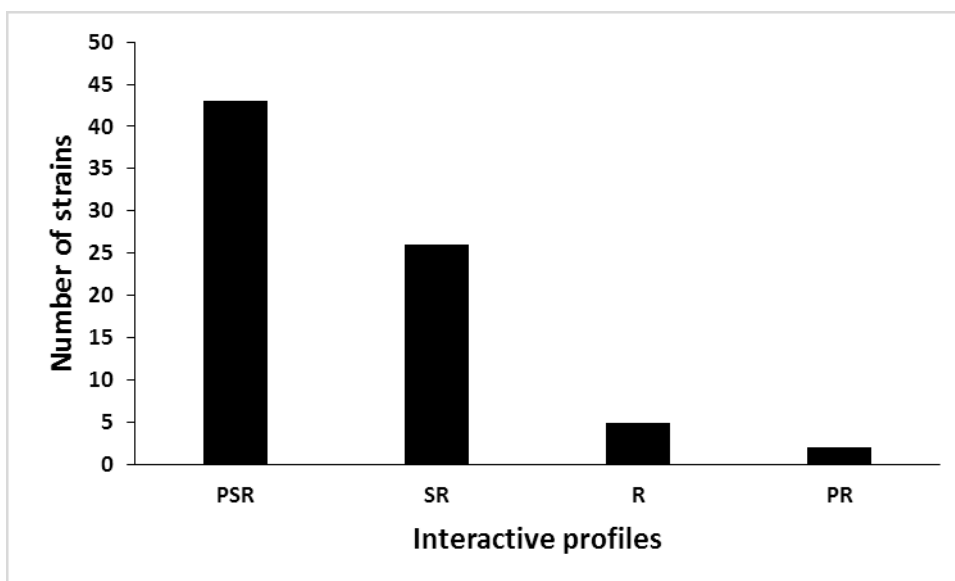


Figure 15. The number of *C. maltaromaticum* strains within the four different interactive profiles: PSR, SR, R, PR.

Forty-three strains were assigned the PSR profile that has the largest percentage: 57 % of *C. maltaromaticum* tested strains were simultaneously producers of growth-antagonizing substances against at least one receiver strains, sensitive towards at least one producer strain, and resistant to at least one producer strain. Twenty six strains had the SR profile, thus were not producers but displayed sensitivity and resistance towards other strains. Five strains were assigned the R profile. The latter strains were not producers but remained resistant to all the producers. And 2 strains had the PR profile, meaning that the strains were producers but also resistant to all the other producers. It can be noticed that strains displaying R and PR profiles were all but one (CP1) isolated from diseased fish.

Moreover, by analyzing the growth of the receiver strains in fresh TSBYE medium, at the level of “control” microplates, the maximum growth rate that is characteristic of each strain was inferred and was positively correlated to the degree of resistance of the receiver strain (number of non-antagonizing sender strains per receiver strain) (Figure 16) (Annexe 3).

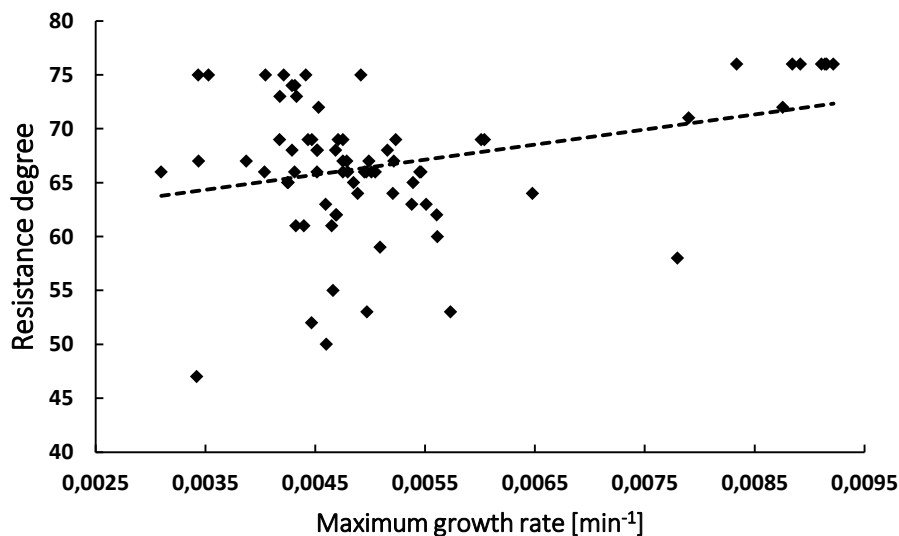


Figure 16. Resistance degrees and maximal growth rates of 76 *C. maltaromaticum* receiver strains. Both strain characteristics were proved to be statistically correlated (correlation coefficient = 0,32 ; p-value = 0.04).

2.5.3 Distribution of antagonistic activity, and sensitivity spectra

Beyond the heterogeneity in the distribution of interactive profiles among strains, there was a large heterogeneity in the antagonistic activity and sensitivity spectra of the strains, defined respectively as the sender degree and the receiver degree. Statistically, this heterogeneity was confirmed by calculating the sender-receiver asymmetry that is based on the variances of sender and receiver degrees (§ 2.4.4). The sender-receiver asymmetry was equal to -0,4 indicating the network was sender-determined (Figure 14).

Sender strains, antagonizing at least one receiver strain, displayed various spectra of sender degrees (Figure 17) ; apart the 31 out of the 76 sender strains (40.8%) that had no antagonistic potential, the strains had activity spectra that vary from one inhibited strain to more than 65 inhibited strains. The majority of the antagonizing strains (78 %) inhibited between 1 and 22 strains, thus displaying narrow antagonistic activity spectra. Approximately 7 % of the antagonizing strains exhibited an intermediate spectrum of antagonistic activity by inhibiting between 23 and 44 strains. Whereas broad-spectra of antagonistic activity were only displayed by 16 % of the antagonizing strains with growth-inhibition that targeted a bigger number of receiver strains ranging from 45 to 66 sensitive strains.

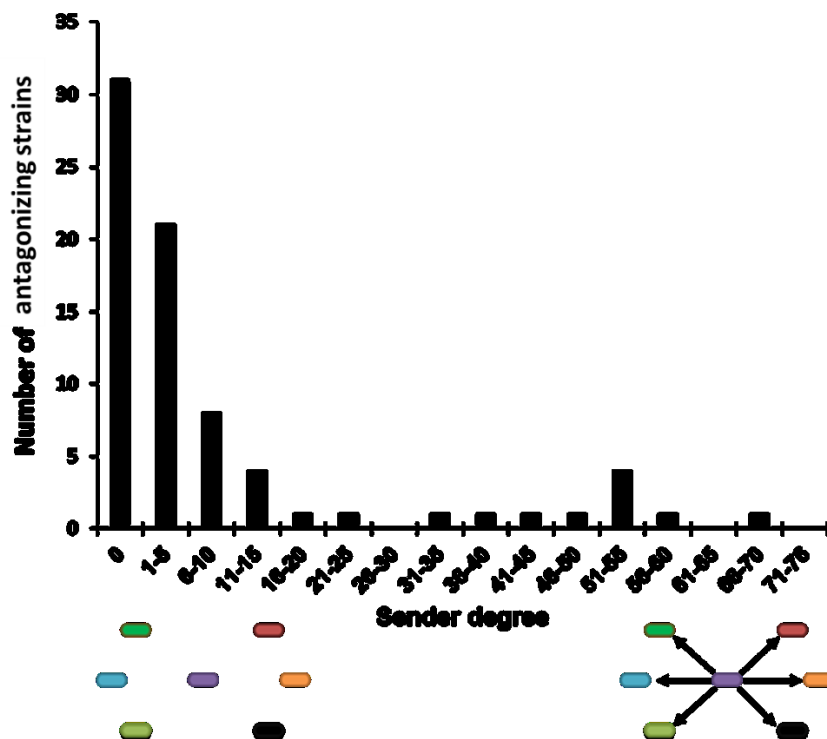


Figure 17. Representation of the various antagonistic activity spectra (sender degrees) displayed by the sender strains.

Apart from 7 *C. maltaromaticum* strains resistant to all 76 *C. maltaromaticum* sender strains, 69 receiver strains were revealed to be sensitive to at least one *C. maltaromaticum* sender strain. Sensitive strains had various sensitivity spectra (Figure 18), the most frequent of which corresponded to a narrow spectrum that characterized 44 sensitive strains that were inhibited by 1 to 10 sender strains (63.8%). Whereas, strains of an intermediate spectrum of sensitivity are fewer: 19 receiver strains (27.5%) were antagonized by 11 to 20 sender strains. Only 6 receiver strains were antagonized by 21 to 29 sender strains, thus leading to 8.7% of receiver strains having broad sensitivity spectra.

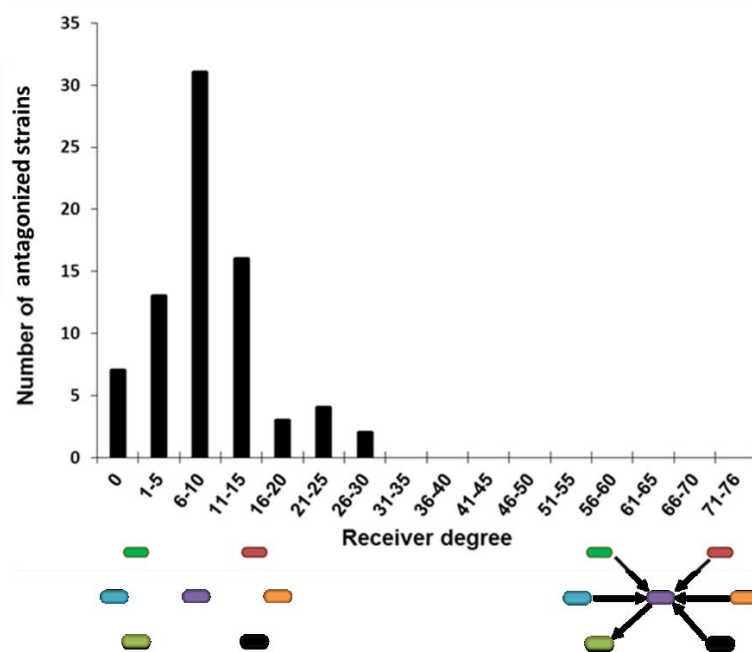


Figure 18. Representation of the various sensitivity spectra, receiver degrees, displayed by the receiver strains.

Hence, each strain of the collection was characterized by specific sender and receiver degrees (Table 10).

Table 10. Sender and receiver degrees characterizing strains of the competitive network.

Strain code	Sender degree	Receiver degree
ATCC 35586	0	5
CIP102035	0	21
DSM20624	8	12
3Ba.2.II	21	14
RFA 345	5	0
DSM20590	12	18
JIP 05/93	7	15
LLS E 6926	6	15
F1	0	23
C4	0	23
JIP 19/00	2	13
JIP 23/91	2	10
1A4II	0	24
RFA F54	2	7
F48	16	10
F73	12	10
3BO4	0	10
5.27	2	16
F14	1	13
CP32	0	7
L1	52	4
F86	11	8
CP23	58	1
CP4	0	3
CP5	0	1
F29-1	0	7
F7	0	8
F44	1	10
LMA28	0	1
DSM20342	32	9
CP3	0	1
F33	0	9
Me I,5-02	0	10
131120027309	0	0
JIP 20/85 (3)	0	9
F2	55	2
DSM20344	39	29

C44	54	3
CIP100481	0	10
710	4	8
9.4	44	7
JIP 14/92	2	10
F43	5	17
CIP101342	55	2
JIP 28/91	0	26
CIP101354	11	14
LLS R 919	10	13
MM 3365.01	0	0
MM 3364.01	0	0
F42	0	7
N15	9	11
CP11	0	8
CP12	2	1
F4	5	9
F84	2	9
CP14	0	7
F87	2	9
CP7	2	7
CP10	7	1
JIP 07/00	5	12
G117	2	11
L11	0	10
G97	47	11
RFA 295	4	14
6.2	2	10
JIP 169/77(3)	0	0
JIP P04/83	1	10
JIP 05/93 (3)	6	15
LLS E 6103	0	11
RFA 378	5	0
10040100629	66	4
8.1	0	10
L2	0	7
L3	6	12
L7	0	8
CP1	0	0

Moreover, to test whether there is a relation between the sender degree and the receiver degree, strains from the heatmap were rearranged, according to their sender and receiver degrees (Figure 19).

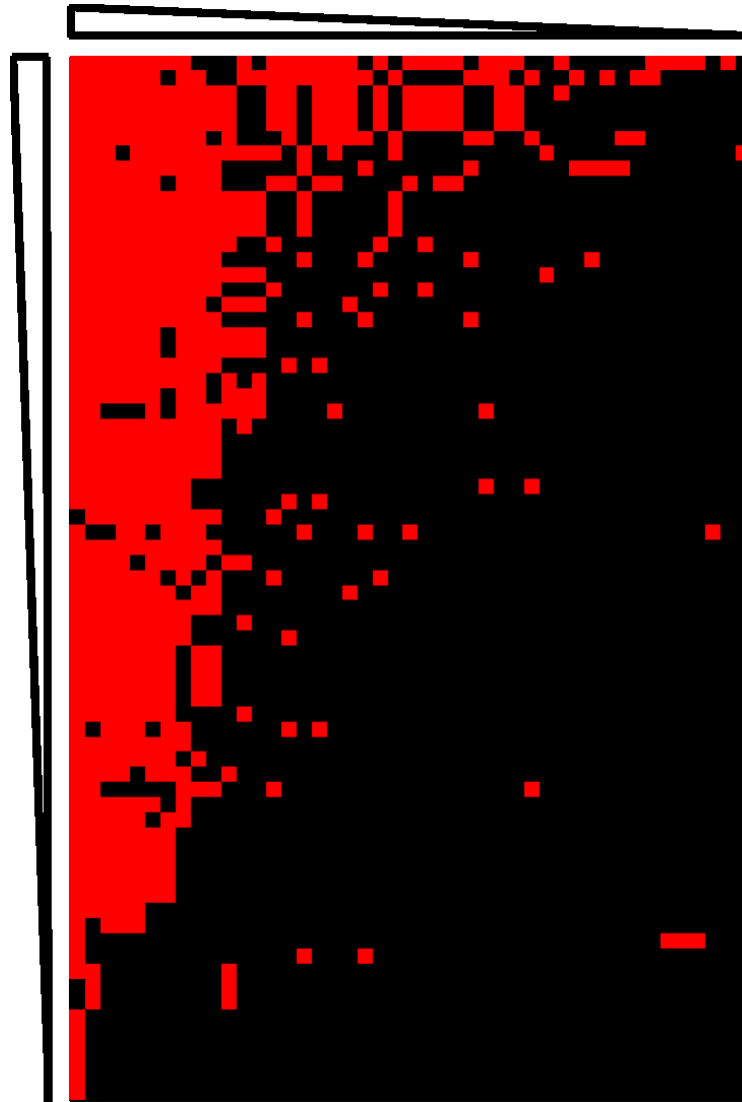


Figure 19. The nested structure of the competitive network, represented by a heatmap correlating sender and receiver degrees. On the X-axis, sender strains (antagonizing at least one receiver strain) are sorted in the descending order of their respective sender degrees. On the Y-axis, receiver strains (antagonized by at least one sender strain) are sorted in the descending order of their respective receiver degrees.

The network was characterized by a strong nested pattern that was validated statistically by the “binmat method” that attributed to the observed nestedness a score of 5.45 ($p < 0.00001$). On a scale of 1 to 100, where 1 corresponds to a maximum of nestedness, a value of 5.45 is demonstrative of a highly nested structure. Thus, antagonism was not randomly organized; the nested architecture of the heat map implies that inhibition depends on two factors: the potency of the sender and the sensitivity level of the receiver.

2.5.4 Interference competition and phylogeny

In order to evaluate whether a link between antagonism and phylogeny existed, for each clonal complex, two inhibition frequencies were calculated (Figure 20):

- i) The frequency of inhibitory interactions within a given clonal complex, as the number of intra-CC inhibitory interactions relative to the total number of possible interactions.
- ii) The frequency of inhibitory interactions targeting a given clonal complex, being directed from all other clonal complexes, as the number of inter-CC inhibitory interactions relative to the total number of possible interactions.

The frequencies of inhibitory interactions varied between CCs, at the level of intra-CC and inter-CC. Sixty percent of CCs were characterized by an absence of inhibitory interactions between their strains: CC2, CC4, CC6, CC8, CC9, and CC10. In the remaining CCs, 2 were characterized by a higher inhibitory interactions frequency between strains of the same CC, compared to the frequency of inhibitory interactions targeting the CC: CC3 and CC5. The other 2 CCs (CC1 and CC7) had higher frequencies for inter-CC inhibitions.

Overall, the mean frequency of inhibitory interactions was slightly higher between strains originating from different CCs (0.16) than the mean frequency of inhibitory interactions between strains comprised in the same clonal complex (0.08).

Thus, antagonism seemed to be higher between phylogenetically distant strains. Nonetheless, this analysis was performed on 42 strains for which phylogenetic information was available, out of a total of 76 *C. maltaromaticum* strains tested for antagonism.

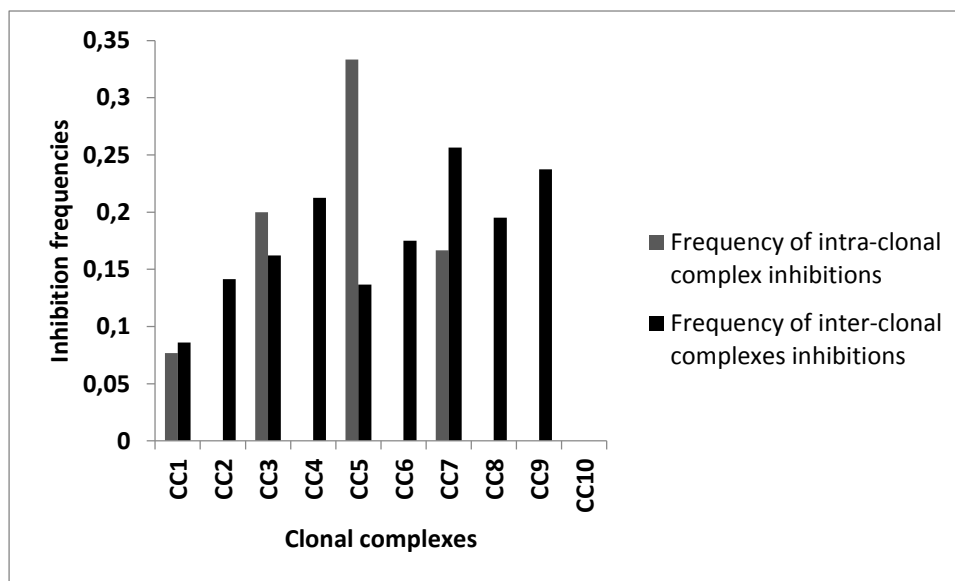


Figure 20. Frequencies of inhibitory interactions within and between clonal complexes.

2.5.5 Genome mining of bacteriocin encoding clusters

The following gene clusters were identified, within the *C. maltaromaticum* population *in silico*, using automatic genome annotation, antiSMASH and BAGEL: 8 gene clusters associated with class I bacteriocin production (38.1%), 9 gene clusters associated with class II bacteriocin production (52.4%) and 2 gene clusters associated with class III bacteriocin production (9.5%). Among the population, 24 strains (92.3%) presented at least one bacteriocin encoding gene, reaching a maximum of seven putative clusters for *C. maltaromaticum* CP4 and CP5. The bacteriocin classification scheme proposed by (Alvarez-Sieiro et al., 2016) was used to distinguish the different classes of bacteriocins found in this study. The putative bacteriocins clusters and immunity genes are presented in Table 11.

Table 11. Bacteriocin gene clusters identified in the genomes of the *C. maltaromaticum* strains. The letters indicate the presence of the bacteriocin gene (B) and/or the immunity gene (I). The results were a compilation of the automatic genome annotation and antiSMASH and BAGEL results.

Strain code	Class I							Class II							Class III		Bacteriocin	Immunity	Sender degree					
	Amylocyclicin (circular)	Glyocin	Cytolysin (Lanthipeptide)	Lanthipeptide 1	Sactipeptide 1	Sactipeptide 2	Sactipeptide 3	Thiopeptide	Camobacteriocin BMI	Carnocin CP52	Hiracin T8	Lactococcin_972	Leucocin A	Piscicolin 61	Piscicolin 126	Plantaricin A				Unknown Ilc 1	Unknown Ilc 2	Unknown Ilc 3	Linocin-M18	Propionicin SM1
JIP 28/91				BI					BI			I		BI	I	B						4	5	0
JIP 05/93	BI		B						BI			I		BI	I	B				B		6	5	7
LLS R 919						B			BI			I		I	I							2	4	10
MM 3364.01									I			I		I	I							0	4	0
MM 3365.01									I			I		I	I							0	4	0
RFA 378									BI			I		I						B		2	3	5
10040100629		B							BI			I		BI	I	B						4	4	66
710			B			B			BI			I		I	I							3	4	4
8.1									BI		BI	I		BI	I	B						4	5	0
9.4			B				B		BI	BI		I		I	I							4	5	44
CIP100481			B			B			BI			I		I	I					B		4	4	0
CIP101354						B			BI			I		I	I							2	4	11
CIP102035									BI			I		I						B		2	3	0
CP1						B			BI	B		I	B	I	I		B	B				6	4	0
CP4						B			BI	B		I	B	I	I		B	B	B			7	4	0
CP5						B			BI	B		I	B	I	I		B	B	B			7	4	0
CP14									BI			I		I	I				B	B		3	4	0
DSM20344	B					B			BI			I		I	I					B		4	4	39
DSM20590			B						BI			I		BI	I	B						4	4	12
F4									BI			I		I					B	B		3	3	5
F7						B			BI	B		I	B	I	I		B	B				6	4	0
F14									BI			I		I	I							1	4	1
F42									BI			I		I					B	B		3	3	0
F48					B		BI	BI	BI			I		I	I							3	5	16
F73					B		BI	BI	BI			I		I	I							3	5	12
F84							BI	BI	BI			I		I					B	B		3	3	2

2.5.5.1 Class I

Eight class I bacteriocins were predicted for the *C. maltaromaticum* population: a circular bacteriocin (amylocyclicin), a glyocin, two lanthipeptides (cytolysin and putative lanthipeptide), three sactipeptides and a thiopeptide.

2.5.5.1.1 Circular

The circular bacteriocin identified (amylocyclicin) was previously described for *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 (Scholz et al., 2014). These bacteriocins are formed after the cleavage of a leader peptide and the formation of a covalent bond between the N- and C-termini regions (Alvarez-Sieiro et al., 2016; van Heel et al., 2017).

2.5.5.1.2 Glyocins

One putative glyocin cluster was predicted for *C. maltaromaticum* 10040100629. Glycocins are peptides with a glucose group linked by a covalent bond in cysteine residues by glycosyltransferases. The only two examples of this class are Glyocin F produced by *Lactobacillus plantarum* (Kelly et al., 1996) and Sublancin 168 produced by *Bacillus subtilis* 168 (Paik et al., 1998).

2.5.5.1.3 Lanthipeptides

One lanthipeptide cluster was found in the genome of *C. maltaromaticum* JIP 28/91. Lanthipeptides are known for having lanthionine and methyl-lanthionine moieties, which are formed after dehydration of serine and threonine residues, respectively, and cyclized with cysteine residues (Ongey and Neubauer, 2016).

2.5.5.1.4 Sactipeptides

A total of three different sactipeptide clusters were found among the *C. maltaromaticum* strains. The first cluster was predicted for *C. maltaromaticum* F48 and F73, the second for nine strains (LLS R 919, 710, CIP100481, CIP101354, CP1, CP4, CP5, DSM20344 and F7) and the third for *C. maltaromaticum* 9.4. In the class of sactipeptides, cysteine side chain is crosslinked with the α -carbon of any other amino acid residue of the polypeptide chain. Subtilosin A, produced by *B. subtilis* 168 (Babasaki et al., 1985) and

Thurincin H, produced by *B. thuringiensis* SF361 (Lee et al., 2009) are representative examples of this class.

2.5.5.1.5 Thiopeptides

Both *C. maltaromaticum* F48 and F73 presented one thiopeptide synthesis cluster. Thiopeptides form a class composed of over 100 entities which are characterized by the presence of thiazol(in)e rings along with nitrogenous ring (Just-Baringo et al., 2014).

2.5.5.2 Class II

Class II bacteriocins are small peptides which are not subjected to extensive post-translational modifications and are characterized by having a double-glycine motif for extracellular exportation *via* ABC-transporters (Kuo et al., 2013; van Belkum et al., 1997). Overall, 9 class II bacteriocin encoding gene clusters were predicted in the *C. maltaromaticum* population. Carnobacteriocin BM1 was the most frequent bacteriocin among the population, being identified in 24 strains (92.3%), while the immunity gene most present was Leucocin A, identified for all strains. The immunity gene was found independently of the respective structural bacteriocin gene for Leucocin A and Plantaricin A. For this class, three not previously characterized class IIc bacteriocins were identified.

2.5.5.2.1 Class IIa: pediocin-like peptides

Among the 9 class II bacteriocins founded for the *Carnobacterium* population, 6 belonged to the subclass IIa: Carnobacteriocin BM1, Carnocin CP52, Hiracin T8, Piscicolin 61 and 126, and Sakacin A. The class IIa bacteriocins are heat stable, non-modified, cationic, hydrophobic peptides which contain a double-glycine leader peptide. They present normally a size inferior to 10 kDa (Balciunas et al., 2013). The pediocin-like bacteriocins are active particularly against *Listeria*. The N-terminal region contains two cysteine residues joined by a disulfide bridge, and a conserved YGNGVXC motif while the C-terminus is less conserved (Mokoena, 2017).

2.5.5.2.2 Class IIb: two-peptide bacteriocins

No putative bacteriocin encoding genes, belonging to the subclass IIb, were found for the *C. maltaromaticum* population. Class IIb bacteriocins comprise mostly cationic peptides and consist of two different peptides fully active only in the presence of both peptides in approximately equal quantities (Balciunas et al., 2013).

2.5.5.2.3 Class IIc: leaderless bacteriocins

Four bacteriocin encoding genes belonging to this subclass were found within the population: one Lactococcin 972 and three putative bacteriocins. Leaderless bacteriocins are small heat-stable peptides and can be divided into two groups: thiolbiotics and cystibiotics. Thiolbiotics are bacteriocins with two cysteine residues and cystibiotics present only one cysteine residue (Mokoena, 2017).

2.5.5.2.4 Class IId

No bacteriocin belonging to subclass IIb were found within the population. This subclass represents a very heterogeneous group of unrelated bacteriocins (Alvarez-Sieiro et al., 2016).

2.5.5.3 Class III

Two class III bacteriocins were predicted for the *C. maltaromaticum* population. The Linocin M18 encoding gene was found in 42.3% (n = 11) of the population while the Propionicin SM1 gene was found in 15.4% (n = 4) of the strains. Class III bacteriocins are more complex peptides and present molecular mass above 30 kDa (Ahmad et al., 2017). Linocin M18 and Propionicin SM1 was first isolated from *Brevibacterium linens* (Valdés-Stauber and Scherer, 1994) and *Propionibacterium jensenii* DF1 (Miescher et al., 2000), respectively.

2.5.6 Evaluating correlation between bacteriocin genes predictions – inhibitory spectra at strain level

The genomes of eleven non producer *C. maltaromaticum* strains, that is having a sender degree equal to 0, were mined for the presence of bacteriocin gene clusters. Two

strains out of 11 had 0 predicted bacteriocin gene clusters: strains 416 and 418 (Table 11). For the remaining 9 non producer strains, bacteriocin genes were predicted and the number of clusters ranged from 2 to 7, suggesting that bacteriocin mining data didn't match strains antagonistic profiles.

To further investigate the link between bacteriocin predictions and the antagonistic profile of strains, the Pearson correlation coefficient r between the similarity matrix of antagonistic activity spectra displayed by the strains and the similarity matrix of predicted bacteriocin gene was calculated for the 14 antagonistic strains (Figure 21).

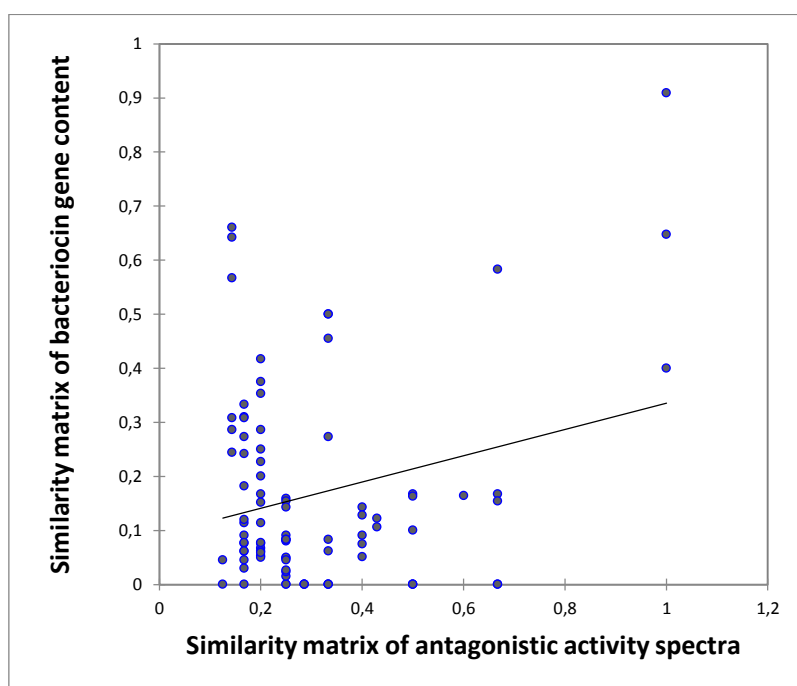


Figure 21. The evaluation of correlation between the similarity matrix based on the antagonistic activity spectra of the 14 antagonistic *C. maltaromaticum* strains and the similarity matrix based on predictions of bacteriocin genes in their respective genomes.

A positive correlation between bacteriocin predictions and the antagonistic profile of producer strains was revealed and statistically supported with a Pearson correlation coefficient of 0,25 (p-value=0.027).

2.5.7 Secondary metabolites report

The 26 *C. maltaromaticum* genomes were investigated for the presence of putative secondary metabolite encoding clusters using antiSMASH database (excluding bacteriocins). Only seven strains (JIP 28/91, 430, CIP102035, CP1, CP4, CP5 and DSM20344) presented

one cluster each, representing a percentage of 26.9% of the population (Table 12). Genome mining resulted in identifying three different nonribosomal peptide synthetases (NRPS) clusters, one terpene cluster and one unidentified cluster.

Table 12. Secondary metabolites gene clusters identified in the genomes of the *C. maltaromaticum* strains. The genomes were analyzed using antiSMASH and the sign (+) indicates the presence of the secondary metabolite cluster. NRPS is acronym for Nonribosomal Peptide Synthetase.

Strain	NRPS I	NRPS II	NRPS III	Terpene	Other
JIP 28/91		+			
10040100629			+		
CIP102035				+	
CP1	+				
CP4	+				
CP5	+				+
DSM20344	+				

2.6 Discussion

In this study, intraspecific interference competition in *C. maltaromaticum* was mapped by performing high-throughput competition assays that investigated a total of 5 776 pairwise interactions within a collection of 76 strains. A high level of interference competition, at the intraspecific level, was recorded with approximately 60% of the sender strains inhibiting at least one receiver strain and 91% of the receiver strains being inhibited by at least one sender strain. A previous study mapped interference competition at the interspecific level among 185 *Vibrionaceae* strains and revealed that 44% of the sender strains inhibited at least one other strain and 86% of the receiver strains were inhibited by at least one strain (Cordero et al., 2012). A more recent study mapped intergeneric interference competition within a collection of 37 gamma-proteobacteria belonging to different genera and showed that 81% of the sender strains antagonized at least one other strain and 81% of the receiver strains were antagonized by at least one strain (Aguirre-von-Wobeser et al., 2014). This suggests that interference competition at the intraspecific level in *C. maltaromaticum* is relatively high because percentages of both antagonizing and antagonized strains were higher within *C. maltaromaticum* population compared to the recorded percentages in the population of *Vibrionaceae*. Furthermore, when compared to intergeneric interference competition among gamma-proteobacteria, intraspecific interference competition in *C. maltaromaticum* was

characterized by a higher percentage of antagonized strains (91% of antagonized strains for *C. maltaromaticum*, and 81% of antagonized strains for gamma-proteobacteria).

Our results also showed that intraspecific interference competition was surprisingly major within the population of *C. maltaromaticum*, when compared to interspecific competition between *C. maltaromaticum* strains as senders and the *L. monocytogenes* EGDe strain as the receiver (out of 45 *C. maltaromaticum* sender strains that inhibited con-specifics, only 8 strains were capable of inhibiting *L. monocytogenes*). This latter finding suggests that the ecological role of interference competition in *C. maltaromaticum* differs from the ecological role of interference competition among *Vibrionaceae* in which phylogenetically related strains were involved in social cohesion (Cordero et al., 2012). Russel *et al*, 2017, by mapping interference competition within a collection of 67 bacterial species belonging to different phyla, demonstrated that inhibition was more frequent between phylogenetically related species characterized by a niche overlap. According to the authors, the main driver of competition seemed to be metabolic similarity that is the degree of niche overlap between the interacting microorganisms. This theory agrees with the high level of competition obtained in *C. maltaromaticum*; even though the ecological niche is not perfectly overlapped between strains of this species (Groth Laursen et al., 2005), they do share quite highly similar niches.

C. maltaromaticum strains could be categorized into four different interactive profiles: PSR, SR, PR and R. The majority of the strains exhibited a PSR profile while the R profile was the rarest. Similarly, Prasad *et al*. 2011 were interested in delineating interacting strains of arctic bacteria according to their interactive profiles. In their study, they mapped antagonism among 139 strains isolated from five soil samples and they categorized strains of the four samples in which antagonism was observed. Seven different interactive profiles were identified, thus leading to a higher level of complexity compared to our study that lacks three profiles that were additionally observed within the collection of arctic bacteria: PS, P and S. Moreover, their results highly contrasted with ours, since the PSR profile was the less represented in all of the studied samples (the rarest in three samples and absent in one sample), whereas the R profile was the most common in two samples and the second most common in the other two samples. The reason explaining these differences is still unknown, future studies will be required to understand how microbial populations are shaped regarding these interacting profiles.

The competitive network of *C. maltaromaticum*, revealed a high variability of both the sender degrees characterizing the antagonistic activity spectra of sender strains and the receiver degrees characterizing the sensitivity spectra of receiver strains. Indeed, the sender degree is broad, ranging from 0 to 66 antagonized strains and peaks near extreme low values with the majority of antagonizing strains (78 %) displaying low sender degrees (between 1 and 22). By contrast, the receiver degree is narrower than the sender degree, ranging from 0 to 29 antagonizing strains, and has an unimodal pattern. It was previously demonstrated for the competitive network among 64 *Streptomyces* strains that the sender degree peaks near both extreme values, meaning that the majority of the sender strains are either slightly antagonistic or highly antagonistic (Vetsigan et al., 2011). This contrasts with the low frequency of highly antagonistic strains in *C. maltaromaticum*. As for the distribution of receiver degrees, a similar narrow and unimodal pattern was observed in *Streptomyces* competitive network, meaning that in *C. maltaromaticum* and *Streptomyces*, sensitive strains tended to have intermediate sensitivity levels, few were highly antagonized. The sender-receiver asymmetry coefficient was very similar in both competitive networks with a value of - 0,4 in *C. maltaromaticum* and a value of - 0.37 in *Streptomyces*. This implies that the outcome of competition is determined more by the sender strains, rather than the receiver strains. Surprisingly, the mapped competition among the 37 gamma-proteobacteria was also characterized by a sender-receiver asymmetry estimated by a value of - 0,31, very close to the previous ones (Aguirre-von-Wobeser et al., 2014). This suggests that the sender determined asymmetry could be a common property of bacterial competition at many taxonomic levels, since it has been demonstrated for intergeneric competition (Aguirre-von-Wobeser et al., 2014), interspecific competition (Vetsigan et al., 2011) and, by this present study, for intraspecific competition. More data should be generated from more bacterial competitive network in order to test this hypothesis.

The analysis of *C. maltaromaticum* competitive network revealed that antagonistic interactions are shaped by a strong pattern of nestedness (with a score of 5.45), thus indicating that a double determinism dictates the outcome of competition, which depends on the inhibition potency of sender strains and the level of sensitivity of the receiver strains. Similarly, Aguirre-von-Wobeser *et al.* 2014 were able to elucidate a more nested structure of interference competition among 37 gamma-proteobacteria (Aguirre-von-Wobeser et al., 2014) with a score of 0.872. This may suggest a similarity in the underlying molecular competitive mechanisms in the two distinct bacterial networks, hence similar competitive mechanisms

may be present at the taxonomic intraspecific level of the nested competition in Gram positif *C. maltaromaticum* and the taxonomic intergeneric level of the nested competition among gamma-proteobacteria. However, the ecological consequence of nestedness on the dynamics of competition and diversity in bacteria has never been addressed. In the context of the well described mutualistic networks between plants and animal pollinators (James et al., 2012; Wei et al., 2015), nestedness has been shown to minimize competition between species, thus promoting biodiversity (Bastolla et al., 2009). In the case of bacterial interference competition, the double determinism of inhibition implies that the receiver strain contributes, just like the sender strain, to deciding the competition outcome. Furthermore, in mutualistic networks; nestedness is thought to emerge from past evolutionary history (Bascompte and Jordano, 2007). Concretely, in bacterial interference competition, the nested structure emerges from a variability in sender and receiver degrees, a variability that is caused by underlying evolutionary adaptive mechanisms. Receiver strains were shown to strongly respond to highly potent inhibitory strains, by inducing their defense mechanism of bacteriocin production. In order to avoid causing this form of response in receiver strains, highly potent inhibitors may evolve into becoming weak inhibitors (Gillor et al., 2013).

While a high genetic diversity was found in the population of *C. maltaromaticum* (Rahman et al., 2014; Ramia et al., 2018), a high diversity of bacteriocin encoding genes was found among a population of 26 *C. maltaromaticum* strains: 24 strains (92.3%) presented at least one bacteriocin encoding gene and the number of predicted clusters per strain ranged from 1 to 7. *In silico* mining of putative secondary metabolite encoding clusters, other than bacteriocins, showed that only seven strains (JIP 28/91, 430, CIP102035, CP1, CP4, CP5 and DSM20344) presented one cluster each, representing a percentage of 26.9% of the population. Results of the *in silico* mining of antagonistic substances strongly suggest that bacteriocins are the main antagonistic substances involved in interference competition in *C. maltaromaticum*. This contrasted with the population of *Vibrionaceae* within which broad-range antibiotics are produced by few genotypes within the populations. Moreover, these substances are mainly synthesized by PKS-NRP systems (Cordero et al., 2012).

The discovery of high interference competition at the intraspecific level resolution in the food bacterium *C. maltaromaticum* could potentially be a turning point in looking more closely at the competition within the food microbiota. It highlights the need to investigate competition at this level of resolution, the intra-species scale, because it could be of a great extent in other species as well and might greatly impact the structure of microbial communities.

2.7 Acknowledgments

We thank Annelore Elfassy, Myriam Michel and Sylvie Wolff for their technical assistance during this work.

Chapitre III: Discussion et Perspectives

Les **objectifs** des travaux réalisés dans le cadre de cette thèse étaient :

- **d’approfondir la diversité génétique de la population de *C. maltaromaticum* en intégrant, au schéma MLST précédemment établi (Rahman et al., 2014), des souches issues de poissons malades ainsi que des souches d’origine laitière.**
- **d’évaluer l’ampleur de la compétition intraspécifique chez *C. maltaromaticum*. Pour cela un système expérimental basé sur l’approche haut débit devait être développé dans le but d’analyser le réseau écologique de la compétition par interférence. De plus, une analyse génomique devait être réalisée afin de prédire les acteurs moléculaires impliqués dans les phénomènes de compétition observés au sein de l’espèce *C. maltaromaticum*.**

Diversité génétique

L’utilisation de la méthode MLST pour le typage de souches de *C. maltaromaticum* avait révélé que sur les 47 souches étudiées, 36 génotypes différents étaient présents (Rahman et al., 2014). Or pour évaluer l’ampleur de la compétition par interférence chez *C. maltaromaticum*, il était nécessaire de caractériser génétiquement plus de souches appartenant à cette espèce. En outre, la collection de *C. maltaromaticum* caractérisée par Rahman et al. 2014 contenait seulement une souche isolée de poisson malade, la souche *C. maltaromaticum* ATCC35586. Les résultats de typage par MLST devaient aussi permettre d’améliorer l’appréciation du risque associé à l’utilisation de *C. maltaromaticum* dans la chaîne alimentaire. L’espèce *C. maltaromaticum* présente un intérêt en biopréservation mais ne fait pas partie des microorganismes possédant le statut QPS (Qualified Presumption of Safety) car cette espèce est décrite dans le secteur de la pisciculture comme pathogène opportuniste du poisson (Leisner et al., 2012).

Vingt-et-une souches additionnelles ont été typées par MLST, dont 16 souches provenaient de poissons malades. Onze des souches nouvellement introduites étaient phylogénétiquement éloignées de toutes les autres souches de la collection, formant ainsi des singletons. Par ailleurs, cette étude a permis d’identifier 17 nouveaux STs et 4 nouveaux CCs

formés par des souches phylogénétiquement proches. Le pouvoir discriminant du schéma MLST

reste stable par rapport à ce qui avait été décrit (0.98 dans l'étude Rahman et al., 2014, et 0.99 dans cette étude). Ces résultats confirment ainsi les résultats antérieurs montrant que la méthode MLST est un outil performant pour la différenciation de souches phylogénétiquement proches chez *C. maltaromaticum* (Rahman et al. 2014).

De plus, l'analyse plus fine des réparations des souches issues de poissons malades ainsi que des souches d'origine laitière dans le schéma MLST nous a permis de leur attribuer deux modalités potentielles d'évolution différentes : les souches laitières, faisant principalement partie de complexes clonaux (82,6%) et ayant un indice d'association élevé, devraient avoir une évolution clonale. Au contraire, 70% des souches isolées de poissons malades correspondaient à des singletons distincts et possédaient un indice d'association plus faible que celui des souches laitières, ce qui suggère l'absence d'une lignée hypervirulente dans leur population. Le typage moléculaire a donc permis de bien discriminer les génotypes associés à des pathologies chez le poisson des autres génotypes associés aux produits laitiers. Il peut être noté qu'aucune des souches isolées de poissons malades n'était assignée à un complexe clonal contenant des souches isolées de fromages.

Notre analyse a permis de répertorier toutes les STs et tous les CCs associés à des souches de poissons malades. Ainsi, cette étude pourrait servir de référence pour l'appréciation du risque associé à l'utilisation de *C. maltaromaticum* dans la chaîne alimentaire, en guidant le choix de souches destinées à être utilisées dans la filière alimentaire de façon à éviter les STs et les CCs qui comprennent des souches de poissons malades.

Compétition intraspécifique

L'approche haut-débit utilisée dans ces travaux de thèse a permis de décrire le réseau d'interaction compétitive par interférence au sein de *C. maltaromaticum* grâce à la réalisation de 5 776 tests de compétition. Cette approche a été couplée à une approche d'analyse de réseau et a permis par ailleurs de caractériser plus finement la compétition par interférence chez cette espèce.

❖ Les Mesures Topologiques de la Compétition par Interférence chez *C. maltaromaticum*

1. Un pourcentage d'antagonisme élevé au niveau intraspécifique

La cartographie de la compétition par interférence chez *C. maltaromaticum* a révélé un niveau élevé d'antagonisme, à l'échelle intraspécifique. Environ 60% des souches expéditrices étaient capables d'inhiber au moins une souche réceptrice et 91% des souches réceptrices étaient inhibées par au moins une souche expéditrice. En comparant ce niveau de compétition intraspécifique aux niveaux de compétition obtenus à l'échelle intergénérique entre des gamma-proteobacteria, où 81% était le pourcentage de souches inhibées (contre 91% chez *C. maltaromaticum*) et à l'échelle interspécifique chez *Vibrionaceae*, où 44% des souches expéditrices étaient capables d'inhiber au moins une souche réceptrice (contre 60% chez *C. maltaromaticum*) et 86% des souches réceptrices étaient inhibées par au moins une souche expéditrice (contre 91% chez *C. maltaromaticum*), on a pu confirmer le haut niveau de compétition à l'échelle intraspécifique chez l'espèce *C. maltaromaticum*. Ces résultats soulignent la nécessité d'accorder une importance à l'étude de la compétition à l'échelle intraspécifique chez les bactéries surtout qu'elle pourrait, par son caractère majeur, impacter la structuration des communautés microbiennes.

2. Diversité des profils interactifs des souches

Les souches de *C. maltaromaticum* ont été assignées à quatre profils interactifs différents: PSR, SR, PR et R. La majorité des souches avaient le profil PSR, tandis que le profil R était le plus rare. D'une façon similaire, Prasad *et al.* 2011 ont pu identifier, chez des bactéries arctiques en compétition, sept profils interactifs différents avec les profils additionnels: PS, P et S. Les différences majeures entre les deux études sont liées à la fréquence élevée du profil PSR chez *C. maltaromaticum* contrastant avec sa faible fréquence chez les bactéries arctiques. Cependant, les souches appartenant au profil interactif R sont majoritaires dans le réseau compétitif des bactéries arctiques contrairement à ce qui a été observé pour le réseau compétitif chez *C. maltaromaticum*. Une modélisation d'un système à neuf acteurs suggère que la diversité des profils interactifs dépend de mécanismes complexes

de coévolution des différentes souches coexistantes (Kerr et al., 2002). Ainsi, la diversité des profils interactifs observée chez *C. maltaromaticum* pourrait engendrer un maintien de la diversité, en promouvant la coexistence. Cependant, les facteurs contribuant à des différences entre les différents réseaux de compétition demeurent mal connus, des études supplémentaires sont donc nécessaires pour mieux comprendre comment les populations microbiennes se structurent en fonction des profils interactifs diversifiés.

3. Degrés d'expédition et de réception

L'analyse du réseau compétitif chez *C. maltaromaticum* a révélé une forte variabilité des degrés d'expédition et des degrés de réception. Il a été aussi montré que la fréquence des degrés d'expédition élevés était faible. De même, les degrés de sensibilité élevés avaient des fréquences faibles. La minorité de ces phénotypes pourrait expliquer la diversité élevée observée chez *C. maltaromaticum*. Des différences dans la répartition des degrés ont été observées en comparant le réseau d'interaction compétitive chez *C. maltaromaticum* avec celui des *Streptomyces* (Vetsigan et al., 2011). En effet, la répartition des degrés d'expédition chez *Streptomyces* présente une distribution bimodale avec une fréquence relativement élevée de souches présentant des spectres d'expédition larges. La distribution des degrés de sensibilité est similaire chez *C. maltaromaticum* et *Streptomyces*, avec une majorité de souches réceptrices présentant un degré intermédiaire de sensibilité.

Cependant, la topologie qui a été partagée entre les trois différentes échelles taxonomiques de compétition : l'échelle intraspécifique chez *C. maltaromaticum*, l'échelle interspécifique chez *Streptomyces* (Vetsigan et al., 2011), et l'échelle intergénérique chez les gamma-protéobactérie (Aguirre-von-Wobeser et al., 2014), est l'asymétrie expédition-réception avec des valeurs assez proches pour les trois réseaux respectifs : - 0,4, - 0,37, - 0,31. Ces valeurs négatives signifient que l'issue de la compétition est le plus déterminée par les souches expéditrices. Cette propriété semble caractériser les réseaux de compétition bactérienne. Cependant, pour pouvoir valider cette hypothèse, il serait intéressant de caractériser l'asymétrie dans d'autres réseaux bactériens.

4. Structure « Nested » de la compétition intraspécifique chez *C. maltaromaticum*

L'analyse du réseau de compétition par interférence chez *C. maltaromaticum* a montré que ce réseau s'organise en une architecture dite « nested ». Cette architecture montre que les interactions compétitives par interférence dépendent non seulement de la force d'inhibition des souches productrices, mais aussi du degré de sensibilité des souches réceptrices. Un réseau compétitif, à l'échelle intergénérique entre des gamma-proteobactéries, s'est également révélé caractérisé par une architecture « nested » (Aguirre-von-Wobeser et al., 2014). Ces résultats suggèrent que les mécanismes moléculaires de la compétition bactérienne par interférence semblent être similaires à l'échelle intergénérique, représentée par le réseau compétitif entre les gamma-proteobactéries, et à l'échelle intraspécifique, représentée par le réseau compétitif entre les souches de la bactérie lactique *C. maltaromaticum*. Cependant, les implications de la structure « nested » sur les dynamiques de la compétition et de la diversité n'ont jamais été abordées. La « nestedness » a le plus été étudiée dans le cadre des relations mutualistes entre les plantes et les pollinisateurs (James et al., 2012; Wei et al., 2015) et il a été montré, pour ce type d'interactions, que la nestedness réduit la compétition entre espèces. Cela a été donc démontré dans le cadre de la compétition par exploitation entre les pollinisateurs (Bastolla et al., 2009). Il serait donc intéressant d'étudier cette topologie dans des réseaux d'interactions bactériennes, pour pouvoir tester le lien entre la « nestedness » et la microdiversité.

❖ Compétition dans le genre *Carnobacterium*

Le genre *Carnobacterium* comprend actuellement 12 espèces. Les bactéries de ce genre peuvent coloniser des habitats très divers en allant des fosses océaniques, au fromage en passant par le tube digestif des poissons. Une étude de génomique comparée réalisée au laboratoire sur des génomes de souches isolées de milieu marin (*C. inhibens*, *Carnobacterium* sp AT7, *Carnobacterium* sp 17.4) et de souches isolées de produit animaux de type poisson, viande ou fromage (*C. divergens*, *C. maltaromaticum*) avait montré des différences très importantes au niveau génomique. Les souches isolées de milieux marins présentaient en effet

un secrétome comprenant peu de protéines comparativement aux souches isolées de produits animaux. Ces différences ont été interprétées comme le résultat d'une différenciation écologique entre espèces de ce genre (Iskandar et al., 2017). Il serait intéressant de comparer l'ampleur et la structure de la compétition par interférence chez ces autres espèces de *Carnobacterium*, cela pourrait permettre d'établir l'impact que cette différenciation écologique a pu avoir dans le genre *Carnobacterium* sur les interactions écologiques.

❖ **Caractères généraliste et spécialiste, compétition par interférence et compétition par exploitation**

Les bactéries lactiques peuvent se diviser en deux catégories en fonction de la largeur de leur niche écologique : les bactéries généralistes et les bactéries spécialistes. *C. maltaromaticum* est une espèce généraliste. Les données expérimentales obtenues par Russel et al. 2017 suggèrent que les espèces ayant un mode de vie généraliste ont une tendance plus importante à établir des interactions compétitives par interférence. L'hypothèse proposée est que les bactéries généralistes ne seraient pas capables d'exploiter les ressources de façon optimale, contrairement aux bactéries spécialistes, et qu'en conséquence les gènes codant des substances antagonistes leur permettraient d'y avoir accès lorsqu'elles sont en compétition avec des spécialistes. Une perspective intéressante consisterait à évaluer l'ampleur de la compétition chez d'autres espèces de bactéries lactiques connues pour leur mode de vie généraliste et spécialiste. Des expériences de compétitions pourraient être réalisées afin de mesurer la compétitivité de ces microorganismes sur les deux plans : exploitation et interférence. Cela permettrait de déterminer si chez ces bactéries la proportion des interactions par interférence est liée à la capacité de ces bactéries à exploiter ces ressources. Il est à noter qu'il est connu chez les bactéries lactiques que certaines espèces sont faiblement acidifiantes dans le lait et que d'autres sont fortement acidifiantes, lesquelles activités dépendent de l'efficacité avec laquelle ces bactéries fermentent le lactose. À titre d'exemple, *Streptococcus thermophilus* et les souches d'origine laitière de *Lactococcus lactis* sont capables d'utiliser très efficacement le lactose alors que les souches lactose+ de *C. maltaromaticum* sont quant à elles faiblement acidifiantes (Edima et al., 2008). Il serait intéressant d'étudier la compétition chez ces autres espèces bactériennes du lait.

❖ **Compétition par interférence, niche écologique et distance phylogénétique**

Les travaux de Cordero ont montré qu'il y avait moins d'interactions compétitives entre bactéries phylogénétiquement proches qu'entre bactéries plus éloignées à l'échelle interspécifique (Cordero et al., 2012). Ces résultats ont été interprétés comme le résultat d'une cohésion sociale existant au sein d'une population de microorganismes étroitement apparentés. Chez *C. maltaromaticum*, un degré de compétition très élevé est observé au niveau intraspécifique. Par ailleurs, une compétition interspécifique, apparemment plus faible, est également observée entre *C. maltaromaticum* et *L. monocytogenes* EGDe du fait que sur les 45 souches de *C. maltaromaticum* révélées comme étant inhibitrices à l'échelle intraspécifique, seulement 8 souches étaient capables d'inhiber *L. monocytogenes*. Ces résultats suggèrent que la compétition par interférence ne jouerait pas le même rôle écologique que chez les *Vibrionaceae*. Une étude réalisée par d'autres auteurs sur des bactéries appartenant aux Phylums *Actinobacteria*, *Bactéroidetes*, *Firmicutes* et *Proteobacteria* ont montré un lien entre la probabilité d'inhibition et d'une part la distance phylogénétique et d'autre part la similarité métabolique. D'après ces auteurs, le moteur de la compétition serait plutôt la similarité métabolique, ou autrement dit, le degré de chevauchement de niche entre les microorganismes en jeu. Cette théorie est en accord avec les résultats observés chez *C. maltaromaticum*, car même si la niche écologique n'est pas parfaitement chevauchante entre les souches de cette espèce (Groth Laursen et al. 2005), leurs niches sont très proches. Dans ce contexte, il serait intéressant d'estimer le niveau de similarité métabolique entre les souches de *C. maltaromaticum* afin de mettre en relation la compétition et la similarité écologique chez cette espèce.

❖ Les acteurs moléculaires impliqués dans la compétition

Les analyses de génomes de *C. maltaromaticum* suggèrent fortement que les substances impliquées dans la compétition par interférence sont des bactériocines. En effet, sur 26 génomes étudiés, 24 génomes présentaient au moins un cluster codant potentiellement pour la synthèse d'une bactériocine. Cela contraste avec la faible fréquence des clusters codant potentiellement pour la synthèse d'autres métabolites secondaires, ces derniers ont été prédits dans les génomes de seulement 7 des 26 souches de *C. maltaromaticum*. Or, il a été montré chez les *Vibrionaceae*, que rares étaient les génotypes qui produisaient des substances antagonistes de spectre large au sein d'une population de souches plus ou moins apparentées

et que ces substances sont majoritairement synthétisées par les systèmes PKS-NRP (Cordero et al., 2012).

Des expériences pourraient être réalisées afin de confirmer la nature des substances produites par *C. maltaromaticum*. Pour cela, des surnageants de culture des souches expéditrices pourraient être neutralisés ou traités avec des protéases et des catalases en vue de caractériser les substances actives afin de savoir si elles sont de nature protéique, s'il s'agit d'acides organiques ou encore de peroxyde d'hydrogène.

❖ **Compétition et rôle de l'habitat**

Les souches utilisées dans cette étude ont été isolées d'habitats très différents : de produits laitiers, de produits carnés, produits de la mer, de poissons malades. Même si un nombre important de souches ont été isolées de produits similaires, peu ont été isolée des mêmes échantillons. Pourtant, il a été montré que la proximité géographique entre souches pouvait jouer un rôle très important sur les interactions compétitives. Ainsi, il a été montré chez *Bacillus*, que la fréquence de souches résistantes était plus élevée entre isolats du même habitat qu'entre isolats provenant d'habitats différents (Pérez-Gutiérrez et al., 2013). Il serait intéressant d'évaluer chez une bactérie comme *C. maltaromaticum* comment la proximité géographique agit sur la fréquence des géotypes producteurs, sensibles et résistants. Pour cela, des souches différentes pourraient isolées de produits alimentaires en prenant en compte ce paramètre contrairement à ce qui a été fait avec la collection constituée par le laboratoire. En effet, dans la majorité des cas, un seul isolat avait été retenu par échantillon lors de la constitution de la collection. Une approche similaire pourrait être réalisée mais cette fois-ci en isolant plusieurs souches différentes par échantillon. Une approche similaire de cartographie des interactions compétitives pourrait être réalisée sur ces souches.

❖ **Compétition par interférence et assemblage des communautés chez *C. maltaromaticum***

Ces travaux de thèse ont permis d'établir le réseau d'interactions compétitives chez l'espèce *C. maltaromaticum*. Bien que ce réseau soit établi, l'influence des interactions compétitives sur l'assemblage des communautés microbiennes reste mal connue. Pour tester

ce lien, les interactions compétitives entre des bactéries représentatives des différents profils interactifs, pourraient être évaluées *via* de tests de compétition menés en co-culture, dans un milieu solide. Des dénombrements seront réalisés afin de déduire pour les deux souches en interaction, les indices de compétitivité respectifs. Ces résultats seront confrontés au réseau de la compétition par interférence chez *C. maltaromaticum* pour pouvoir prédire l'influence de cette compétition sur l'assemblage des communautés chez *C. maltaromaticum*.

❖ **Influence de la communication entre bactéries sur l'expression des interactions compétitives par interférence**

Il a été montré chez d'autres bactéries comme les *Streptomyces* que la présence d'un microorganisme pouvait induire ou réprimer l'expression de gènes codant la synthèse de substances antagonistes (Abrudan et al., 2015). Des phénomènes similaires d'interférence pourraient avoir lieu chez *C. maltaromaticum* et pourraient se traduire par une inhibition de la production de molécules antagonistes par la bactérie expéditrice. Réciproquement, une molécule signal produite par une souche pourrait induire la production de molécules antagonistes chez la bactérie expéditrice. Cette hypothèse sera testée à partir des souches identifiées par ces présents travaux de thèse comme souches productrices. Ces souches seront cultivées en présence du surnageant des autres souches de la collection, lesquelles joueront dans ce cas le rôle de la composante biotique tierce. Ensuite le surnageant de la souche ainsi cultivée sera testé comme précédemment pour évaluer son pouvoir antibactérien. Pour cela, une sélection des souches identifiées comme les plus sensibles du réseau compétitif établi sera testée.

❖ **Exploration de l'étude de la compétition chez d'autres bactéries de l'aliment**

De nombreuses autres bactéries de l'aliment ont des potentiels compétitifs non explorés. En couplant les tests de compétition à haut débit, l'analyse de réseau écologique et l'analyse des génomes, la place de la compétition dans les communautés microbiennes de l'aliment pourrait être plus largement étudiée. Cela pourrait permettre une meilleure maîtrise des procédés industriels liés à l'affinage et à la sécurité des aliments, se basant sur la

manipulation des écosystèmes microbiens et notamment des interactions entre les différentes bactéries constituant ces écosystèmes.

Chapitre IV : Références bibliographiques

A

Abrudan, M.I., Brown, S., Rozen, D.E., 2012. Killing as means of promoting biodiversity. *Biochem. Soc. Trans.* 40, 1512–1516.

Abrudan, M.I., Smakman, F., Grimbergen, A.J., Westhoff, S., Miller, E.L., van Wezel, G.P., Rozen, D.E., 2015. Socially mediated induction and suppression of antibiosis during bacterial coexistence. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, 11054–11059. <https://doi.org/10.1073/pnas.1504076112>

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

Adams, M.R., Marteau, P., 1995. On the safety of lactic acid bacteria from food. *Int. J. Food Microbiol.* 27, 263–264.

Afzal, M.I., Jacquet, T., Delaunay, S., Borges, F., Millière, 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, 573–579. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.03.019>

Afzal, M.I., Gonzalez Ariceaga, C.C., Lhomme, E., Ali, N.K., 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, 223–230. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.05.008>

Aguirre-von-Wobeser, E., Soberón-Chávez, G., Eguiarte, L.E., Ponce-Soto, G.Y., Vázquez-Rosas-Landa, M., Souza, V., 2014. Two-role model of an interaction network of free-living γ -proteobacteria from an oligotrophic environment: Two-role model of an interaction network. *Environ. Microbiol.* 16, 1366–1377. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12305>

Ahmad, V., Khan, M.S., Jamal, Q.M.S., Alzohairy, M.A., Al Karaawi, M.A., Siddiqui, M.U., 2017. Antimicrobial potential of bacteriocins: in therapy, agriculture and food preservation. *Int. J. Antimicrob. Agents* 49, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.08.016>

Al-Hisnawi, A., Ringø, E., Davies, S.J., Waines, P., Bradley, G., Merrifield, D.L., 2015. First report on the autochthonous gut microbiota of brown trout (*Salmo trutta* Linnaeus). *Aquac. Res.* 46, 2962–2971. <https://doi.org/10.1111/are.12451>

Alvarez-Sieiro, P., Montalbán-López, M., Mu, D., Kuipers, O.P., 2016. Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 2939–2951. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7343-9>

B

Babasaki, K., Takao, T., Shimonishi, Y., Kurahashi, K., 1985. Subtilosin A, a new antibiotic peptide produced by *Bacillus subtilis* 168: isolation, structural analysis, and biogenesis. *J. Biochem.* 98, 585–603.

- Balciunas, E.M., Castillo Martinez, F.A., Todorov, S.D., Franco, B.D.G. de M., Converti, A., Oliveira, R.P. de S., 2013. Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review. *Food Control* 32, 134–142. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.11.025>
- 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, 83–94.
- Bascompte, J., Jordano, P., 2007. Plant-Animal Mutualistic Networks: The Architecture of Biodiversity. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 38, 567–593. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.38.091206.095818>
- Bascompte, J., Jordano, P., Melian, C.J., Olesen, J.M., 2003. The nested assembly of plant-animal mutualistic networks. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 9383–9387. <https://doi.org/10.1073/pnas.1633576100>
- Bastolla U., Fortuna M.A., Pascual-García A., Ferrera A., Luque B., Bascompte J., 2009. The architecture of mutualistic networks minimizes competition and increases biodiversity. *Nature* 458, 1018–1020
- Bauer, M.A., Kainz, K., Carmona-Gutierrez, D., Madeo, F., 2018. Microbial wars: competition in ecological niches and within the microbiome. *Microb. Cell* 5, 215–219. <https://doi.org/10.15698/mic2018.05.628>
- Baya, A.M., Toranzo, A.E., Lupiani, B., Li, T., Roberson, B.S., Hetrick, F.M., 1991. Biochemical and serological characterization of *Carnobacterium* spp. isolated from farmed and natural populations of striped bass and catfish. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 3114–20.
- Bhugaloo-Vial, P., Dousset, X., Metivier, A., Sorokine, O., Anglade, P., Boyaval, P., Marion, D., 1996. Purification and amino acid sequences of piscicocins V1a and V1b, two class IIa bacteriocins secreted by *Carnobacterium piscicola* V1 that display significantly different levels of specific inhibitory activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 4410–4416.
- Bintsis, T., 2018. Lactic Acid Bacteria: Their Applications in Foods. *J Bacteriol Mycol.* 5(2), 1065.
- Bjorkroth, J., Ristiniemi, M., Vandamme, P., Korkeala, H., 2005. *Enterococcus* species dominating in fresh modified-atmosphere-packaged, marinated broiler legs are overgrown by *Carnobacterium* and *Lactobacillus* species during storage at 6 degrees C. *Int. J. Food Microbiol.* 97, 267–276. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.04.011>
- Blanchard, A.E., Liao, C., Lu, T., 2016. An Ecological Understanding of Quorum Sensing-Controlled Bacteriocin Synthesis. *Cell. Mol. Bioeng.* 9, 443–454. <https://doi.org/10.1007/s12195-016-0447-6>
- 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., Ter Schure, E., Van Boven, A., Vankerckhoven, V., Zgoda, A., Tuijelaars, S., Hansen, E.B., 2012. Food fermentations: Microorganisms with technological beneficial use. *Int. J. Food Microbiol.* 154, 87–97. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.12.030>
- Brahimi, M., Mathern, P., Fascia, P., Afchain, J.M. and Lucht, F., 2008. Infection à *Lactobacillus rhamnosus* et pancréatite : deux cas. *Médecine Mal. Infect.* 38, 29-31. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2007.10.005>

Bruce, J.B., West, S.A., Griffin, A.S., 2017. Bacteriocins and the assembly of natural *Pseudomonas fluorescens* populations. *J. Evol. Biol.* 30, 352–360. <https://doi.org/10.1111/jeb.13010>

C

Cailliez-Grimal, C., Afzal, M.I., Revol-Junelles, A.-M., 2014. *Carnobacterium*, in: Encyclopedia of Food Microbiology, Elsevier, Academic Press. Batt, C. A.; Tortorello, M. L., pp. 379–383.

Cailliez-Grimal, C., Edima, H.C., Revol-Junelles, A.-M., Milliere, 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, 1133–1138.

Callon, C., Retureau, E., Didiene, R., Montel, M.-C., 2014. Microbial biodiversity in cheese consortia and comparative *Listeria* growth on surfaces of uncooked pressed cheeses. *Int. J. Food Microbiol.* 174, 98–109. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.01.003>

Campos, C.A., Castro, M.P., Rivas, F.P., Schelegueda, L.I., 2013. Bacteriocins in food: evaluation of the factors affecting their effectiveness 11.

Case, T.J., Gilpin, M.E., 1974. Interference competition and niche theory. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71, 3073–3077.

Cauchie, E., Gand, M., Kergourlay, G., Taminiau, B., Delhalle, L., Korsak, N., Daube, G., 2017. The use of 16S rRNA gene metagenetic monitoring of refrigerated food products for understanding the kinetics of microbial subpopulations at different storage temperatures: the example of white pudding. *Int. J. Food Microbiol.* 247, 70–78. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.10.012>

Chikindas, M.L., Weeks, R., Drider, D., Chistyakov, V.A., Dicks, L.M., 2018. Functions and emerging applications of bacteriocins. *Curr. Opin. Biotechnol.* 49, 23–28. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.07.011>

Chmelar, D., Matussek, A., Korger, J., Durnova, E., Steffen, M., Chmelarova, E., 2002. Isolation of *Carnobacterium piscicola* from human pus - Case report. *Folia Microbiol.* 47, 455–457. doi:10.1007/BF02818708

Chopra, L., Singh, G., Kumar Jena, K., Sahoo, D.K., 2015. Sonorensin: A new bacteriocin with potential of an anti-biofilm agent and a food biopreservative. *Sci. Rep.* 5. <https://doi.org/10.1038/srep13412>

Cintas, L.M., Casaus, P., Herranz, C., Havarstein, L.S., Holo, H., Hernandez, P.E., Nes, I.F., 2000. Biochemical and Genetic Evidence that *Enterococcus faecium* L50 Produces Enterocins L50A and L50B, the sec-Dependent Enterocin P, and a Novel Bacteriocin Secreted without an N-Terminal Extension Termed Enterocin Q. *J. Bacteriol.* 182, 6806–6814. <https://doi.org/10.1128/JB.182.23.6806-6814.2000>

- Cisneros, Y.M.Á., Fernández, F.J., Alquicira, E.P., 2017. Characteristics of antibacterial peptides produced by bacteria. In *Antimicrobial research: Novel bioknowledge and educational programs* (A. Méndez-Vilas, Ed.)
- 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, 5443–5450.
- Cordero, O.X., Wildschutte, H., Kirkup, B., Proehl, S., Ngo, L., Hussain, F., Le Roux, F., Mincer, T., Polz, M.F., 2012. Ecological Populations of Bacteria Act as Socially Cohesive Units of Antibiotic Production and Resistance. *Science* 337, 1228–1231. <https://doi.org/10.1126/science.1219385>
- Cornu, M., Billoir, E., Bergis, H., Beaufort, A., Zuliani, V., 2011. Modeling microbial competition in food: Application to the behavior of *Listeria monocytogenes* and lactic acid flora in pork meat products. *Food Microbiol.* 28, 639–647. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.08.007>
- Cotter, P.D., Hill, C., Ross, R.P., 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food: Food microbiology. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 777–788. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1273>
- Cotter, P.D., Ross, R.P., Hill, C., 2013. Bacteriocins — a viable alternative to antibiotics? *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 95–105. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2937>
- Cotter, P.D., 2014. An ‘Upp’-turn in bacteriocin receptor identification: Identifying bacteriocin receptors. *Mol. Microbiol.* 92, 1159–1163. <https://doi.org/10.1111/mmi.12645>
- Coyte, K.Z., Schluter, J., Foster, K.R., 2015. The ecology of the microbiome: Networks, competition, and stability. *Science* 350, 663–666. <https://doi.org/10.1126/science.aad2602>
- Curiel, J.A., Ruiz-Capillas, C., de las Rivas, B., Carrascosa, A.V., Jimenez-Colmenero, F., Munoz, R., 2011. Production of biogenic amines by lactic acid bacteria and enterobacteria isolated from fresh pork sausages packaged in different atmospheres and kept under refrigeration. *Meat Sci.* 88, 368–373. doi:10.1016/j.meatsci.2011.01.011

D

- de Jong, A., van Hijum, S.A.F.T., Bijlsma, J.J.E., Kok, J., Kuipers, O.P., 2006. BAGEL: a web-based bacteriocin genome mining tool. *Nucleic Acids Res* 34, W273–W279. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl237>
- de Vos, M.G.J., Zagorski, M., McNally, A., Bollenbach, T., 2017. Interaction networks, ecological stability, and collective antibiotic tolerance in polymicrobial infections. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 114, 10666–10671. <https://doi.org/10.1073/pnas.1713372114>
- Deetae, P., Mounier, J., Bonnarme, P., Spinnler, H.E., Irlinger, F., Helinck, S., 2009. Effects of *Proteus vulgaris* growth on the establishment of a cheese microbial community and on the production of volatile aroma compounds in a model cheese. *J. Appl. Microbiol.* 107, 1404–1413. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04315.x>

- Dickie, I.A., Cooper, J.A., Bufford, J.L., Hulme, P.E., Bates, S.T., 2016. Loss of functional diversity and network modularity in introduced plant-fungal symbioses. *AoB Plants* plw084. <https://doi.org/10.1093/aobpla/plw084>
- Douillard, F.P., de Vos, W.M., 2014. Functional genomics of lactic acid bacteria: from food to health. *Microb. Cell Factories* 13, S8. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-S1-S8>
- Doulgeraki, A.I., Ercolini, D., Villani, F., Nychas, G.-J.E., 2012. Spoilage microbiota associated to the storage of raw meat in different conditions. *Int. J. Food Microbiol.* 157, 130–141. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.05.020>
- Drider, D., Fimland, G., Hechard, Y., McMullen, L. M., and Prevost, H., 2006. The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiol Mol Biol Rev* 70, 564–82.
- Duffes, F., Leroi, F., Dousset, X., Boyaval, P., 2000. Use of a bacteriocin producing *Carnobacterium piscicola* strain, isolated from fish, to control *Listeria monocytogenes* development in vacuum-packed cold-smoked salmon stored at 4°C. *Sci. Aliments* 20, 153–158.
- Dutton, R.J., Wolfe, B.E., 2013. Towards an Ecosystem Approach to Cheese Microbiology. *Microbiol. Spectr.* 1. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.CM-0012-12>

E

- 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, 516–521. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.10.006>
- 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, 3806–3813. doi:10.3168/jds.2007-0878
- EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), 2008. The maintenance of the list of QPS microorganisms intentionally added to food or feed (2008 update). *The EFSA journal.* 923, 1–48.
- EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ) (2009) Scientific opinion on the maintenance of the list of QPS microorganisms intentionally added to food or feed (2009 update), *The EFSA journal.* 7(12), 1–92.
- EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ) (2012) Scientific opinion on the maintenance of the list of QPS microorganisms intentionally added to food or feed (2012 update), *The EFSA journal.* 10(12), 1–84.
- El Kheir, S.M., Cherrat, L., Awussi, A.A., Ramia, N.E., Taha, S., Rahman, A., Passerini, D., Leroi, F., Petit, J., Mangavel, C., Revol-Junelles, A.-M., Borges, F., 2018. High-Throughput Identification of Candidate Strains for Biopreservation by Using Bioluminescent *Listeria monocytogenes*. *Front. Microbiol.* 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01883>
- Elsser-Gravesen, D., Elsser-Gravesen, A., 2014. Biopreservatives. *Biotechnol. Food Feed Addit.* 29–49. https://doi.org/10.1007/10_2013_234

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, 790–799.

Eppert, I., Valdés-Stauber, N., Götz, H., Busse, M., Scherer, S., 1997. Growth reduction of *Listeria* spp. caused by undefined industrial red smear cheese cultures and bacteriocin-producing *Brevibacterium* lines as evaluated *in situ* on soft cheese. Appl Env. Microbiol 63, 4812–4817.

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. 75, 1990–2001. <https://doi.org/10.1128/AEM.02762-08>

Escalante, A.E., Rebolleda-Gómez, M., Benítez, M., Travisano, M., 2015. Ecological perspectives on synthetic biology: insights from microbial population biology. Front. Microbiol. 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00143>

Esnouf, C., 2017. L'alimentation à découvert. CNRS Éditions *via* OpenEdition.

F

Favaro, L., Barretto Penna, A.L., Todorov, S.D., 2015. Bacteriocinogenic LAB from cheeses – Application in biopreservation? Trends Food Sci. Technol. 41, 37–48. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.09.001>

Feil E.J., Li B.C., Aanensen D.M., Hanage W.P. and Spratt B.G., 2004. eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. J. Bacteriol. 186, 1518-1530. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.186.5.1518-1530.2004>.

Feligini, M., Panelli, S., Buffoni, J.N., Bonacina, C., Andrighetto, C., Lombardi, A., 2012. Identification of microbiota present on the surface of Taleggio cheese using PCR-DGGE and RAPD-PCR. J. Food Sci. 77, M609-615. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02932.x>

Feurer C., Ellouze M., 2010. Utilisation raisonnée de la flore naturelle de viande de porc fraîche pour améliorer sa qualité sanitaire. Bilan Act IFIP-Inst Porc. 34:125.

Fontaine, C., Guimarães, P.R., Kéfi, S., Loeuille, N., Memmott, J., van der Putten, W.H., van Veen, F.J.F., Thébault, E., 2011. The ecological and evolutionary implications of merging different types of networks: Merging networks with different interaction types. Ecol. Lett. 14, 1170–1181. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2011.01688.x>

Frederiq, P., 1946. Sur la sensibilité et l'activité antibiotique des staphylococciques. C. R. Soc. Biol. 140, 1167–1170.

G

- Gabrielsen, C., Brede, D.A., Nes, I.F., Diep, D.B., 2014. Circular bacteriocins: biosynthesis and mode of action. *Appl. Environ. Microbiol.* AEM.02284-14. <https://doi.org/10.1128/AEM.02284-14>
- Gálvez, A., Abriouel, H., López, R.L., Omar, N.B., 2007. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int. J. Food Microbiol.* 120, 51–70. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.06.001>
- Ganguly, S., 2013. *Recent Advances in Food Processing Technology*. Research India Publications. ISBN 978-81-89476-19-X.
- Garneau, S., Martin, N.I., Vederas, J.C., 2002. Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Biochimie* 84, 577–592. [https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(02\)01414-1](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(02)01414-1)
- Geeraerts, W., Pothakos, V., De Vuyst, L., Leroy, F., 2018. Variability within the dominant microbiota of sliced cooked poultry products at expiration date in the Belgian retail. *Food Microbiol.* 73, 209–215. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.01.019>
- Ghanbari, M., Jami, M., Kneifel, W., Domig, K.J., 2013. Antimicrobial activity and partial characterization of bacteriocins produced by lactobacilli isolated from Sturgeon fish. *Food Control* 32, 379–385. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.12.024>
- Ghoul, M., Mitri, S., 2016. The Ecology and Evolution of Microbial Competition. *Trends Microbiol.* 24, 833–845. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.06.011>
- Majeed, H., Lampert, A., Ghazaryan, L., Gillor, O., 2013. The Weak Shall Inherit: Bacteriocin-Mediated Interactions in Bacterial Populations. *PLoS ONE* 8, e63837. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063837>
- Giraffa, G., 2004. Studying the dynamics of microbial populations during food fermentation: Table 1. *FEMS Microbiol. Rev.* 28, 251–260. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2003.10.005>
- Gobbetti, M., Di Cagno, R., Calasso, M., Neviani, E., 2018. Drivers that establish and assembly the lactic acid bacteria biota in cheeses. *Trends Food Sci. Technol.* 78, 244–254. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.06.010>
- Gratia, A., 1925. Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de colibacille. *Compt. Rend. Soc. Biol.* 93, 1040–1042.
- Groth Laursen B., 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.* 28:151–164.
- Guilbaud, M., Zagorec, M., Chaillou, S., Champomier-Vergès, M.-C., 2012. Intraspecies diversity of *Lactobacillus sakei* response to oxidative stress and variability of strain performance in mixed strains challenges. *Food Microbiol.* 29, 197–204. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.07.011>
- Gursky, L.J., Martin, N.I., Derksen, D.J., Belkum, M.J. van, Kaur, K., Vederas, J.C., Stiles, M.E., McMullen, L.M., 2006. Production of piscicolin 126 by *Carnobacterium maltaromaticum* UAL26 is controlled by temperature and induction peptide concentration. *Arch. Microbiol.* 186, 317–325. doi:10.1007/s00203-006-0147-z

Guimerà, R., Stouffer, D.B., Sales-Pardo, M., Leicht, E.A., Newman, M.E.J., Amaral, L.A.N., 2010. Origin of compartmentalization in food webs. *Ecology* 91(10), 2941–2951

H

Hantsis-Zacharov E., Halpern M., 2007. Culturable Psychrotrophic Bacterial Communities in Raw Milk and Their Proteolytic and Lipolytic Traits. *Appl Environ Microbiol.* 73:7162–7168.

Hammerschmidt, K., Rose, C.J., Kerr, B., Rainey, P.B., 2014. Life cycles, fitness decoupling and the evolution of multicellularity. *Nature* 515, 75.

Hammi, I., Delalande, F., Belkhou, R., Marchioni, E., Cianferani, S., Ennahar, S., 2016. Maltarin CPN, a New Class IIa Bacteriocin Produced by *Carnobacterium maltaromaticum* CPN Isolated from Mould-Ripened Cheese. *J. Appl. Microbiol.* 121 (5), 1268–74. <https://doi.org/10.1111/jam.13248>.

Herbin, S., Mathieu, F., Brulé, F., Branlant, C., Lefebvre, G., Lebrihi, A., 1997. Characteristics and Genetic Determinants of Bacteriocin Activities Produced by *Carnobacterium piscicola* CP5 Isolated from Cheese. *Curr. Microbiol.* 35, 319–326. doi:10.1007/s002849900262

Hibbing, M.E., Fuqua, C., Parsek, M.R., Peterson, S.B., 2010. Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 15–25. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2259>

Hill, D., Sugrue, I., Arendt, E., Hill, C., Stanton, C., Ross, R.P., 2017. Recent advances in microbial fermentation for dairy and health. *F1000Research* 6, 751. <https://doi.org/10.12688/f1000research.10896.1>

Hirsch, A., Grinsted, E., Chapman, H.R., Mattick, A., 1951. A note on the inhibition of an anaerobic sporeformer in Swiss type cheese by a nisin-producing *Streptococcus*. *J. Dairy. Res.* 18, 205–206.

Hiu, S.F., Holt, R.A., Sriranganathan, N., Seidler, R.J., Fryer, J.L., 1984. *Lactobacillus piscicola*, a New Species from Salmonid Fish. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 34, 393–400. doi:10.1099/00207713-34-4-393

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, 493–495. doi:10.1099/jmm.0.016808-0

Holck, A.L., Axelsson, L., Schillinger, U., 1994. Purification and cloning of piscicolin 61, a bacteriocin from *Carnobacterium piscicola* LV61. *Curr. Microbiol.* 29, 63–68.

Holzappel, W., Gerber, E., 1983. *Lactobacillus divergens* sp. nov., a New Heterofermentative *Lactobacillus* Species Producing L(+)-Lactate. *Syst. Appl. Microbiol.* 4, 522–534. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(83\)80010-1](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(83)80010-1)

Hutkins, R.W., 2006. Microbiology and technology of fermented foods, IFT Press series. IFT Press.

I

Imran, M., Desmaures, N., Vernoux, J.-P., 2010. From undefined red smear cheese consortia to minimal model communities both exhibiting similar anti-listerial activity on a cheese-like matrix. *Food Microbiol.* 27, 1095–1103. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.07.016>

Iskandar, C.F., Borges, F., Taminiau, B., Daube, G., Zagorec, M., Remenant, B., Leisner, J.J., Hansen, M.A., Sørensen, S.J., Mangavel, C., Cailliez-Grimal, C., Revol-Junelles, A.-M., 2017. Comparative Genomic Analysis Reveals Ecological Differentiation in the Genus *Carnobacterium*. *Front. Microbiol.* 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00357>

Ivey, M., Massel, M., Phister, T.G., 2013. Microbial Interactions in Food Fermentations. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 4, 141–162. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-022811-101219>

J

Jack, R.W., Tagg, J.R., Ray, B., 1995. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiol. Rev.* 59, 171–200.

Jack, R.W., Wan, J., Gordon, J., Harmark, K., Davidson, B.E., Hillier, A.J., Wettenhall, R.E., Hickey, M.W., Coventry, M.J., 1996. Characterization of the chemical and antimicrobial properties of piscicolin 126, a bacteriocin produced by *Carnobacterium piscicola* JG126. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 2897–2903.

Jaffrès, E., Sohier, D., Leroi, F., Pilet, M.F., Prévost, 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, 20–29. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.05.017>

James, A., Pitchford, J.W., Plank, M.J., 2012. Disentangling nestedness from models of ecological complexity. *Nature* 487, 227–230. <https://doi.org/10.1038/nature11214>

Jiang, L.-L., Zhou, J.-J., Quan, C.-S., Xiu, Z.-L., 2017. Advances in industrial microbiome based on microbial consortium for biorefinery. *Bioresour. Bioprocess.* 4. <https://doi.org/10.1186/s40643-017-0141-0>

Jolley, K.A., Maiden, M.C., 2010. BIGSdb: Scalable analysis of bacterial genome variation at the population level. *BMC Bioinfo.* 11, 595. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-595>

Just-Baringo, X., Albericio, F., Álvarez, M., 2014. Thiopeptide antibiotics: retrospective and recent advances. *Mar Drugs* 12, 317–351. <https://doi.org/10.3390/md12010317>

K

- Kelly, W.J., Asmundson, R.V., Huang, C.M., 1996. Characterization of plantaricin KW30, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Applied Bacteriology* 81, 657–662. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1996.tb03561.x>
- Kerr, B., Riley, M.A., Feldman, M.W., Bohannan, B.J.M., 2002. Local dispersal promotes biodiversity in a real-life game of rock–paper–scissors. *Nature* 418, 171–174
- Kim, D.-H., Austin, B., 2008. Characterization of probiotic carnobacteria isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) intestine. *Lett. Appl. Microbiol.* 47, 141–147. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02401.x>
- Kirchman, D.L., 2015. Bertrand, J.C., Caumette P., Lebaron, P., Matheron, R., Normand, P., Sime-Ngando, T., 2015. *Environmental Microbiology: Fundamentals and Applications*. Springer. ISBN 978-94-017-9117-5 933 pp. \$129. *Limnol. Oceanogr. Bull.* 24, 97–98. <https://doi.org/10.1002/lob.10043>
- Kirkup, B.C., Riley, M.A., 2004. Antibiotic-mediated antagonism leads to a bacterial game of rock-paper-scissors in vivo. *Nature* 428, 412–414.
- Klaenhammer, T.R., 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie* 70, 337.
- Klaenhammer, T.R., Barrangou, R., Buck, B.L., Azcarate-Peril, M.A., 2005. Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. *FEMS Microbiol. Rev.* 29, 393–409. <https://doi.org/10.1016/j.fmrre.2005.04.007>
- Kort, R., Westerik, N., Mariela Serrano, L., Douillard, F.P., Gottstein, W., Mukisa, I.M., Tuijn, C.J., Basten, L., Hafkamp, B., Meijer, W.C., Teusink, B., de Vos, W.M., Reid, G., Sybesma, W., 2015. A novel consortium of *Lactobacillus rhamnosus* and *Streptococcus thermophilus* for increased access to functional fermented foods. *Microb. Cell Factories* 14. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0370-x>
- Krasnov, B.R., Fortuna, M.A., Mouillot, D., Khokhlova, I.S., Shenbrot, G.I., Poulin, R., 2012. Phylogenetic Signal in Module Composition and Species Connectivity in Compartmentalized Host-Parasite Networks. *Am. Nat.* 179, 501–511. <https://doi.org/10.1086/664612>
- Kuo, Y.-C., Liu, C.-F., Lin, J.-F., Li, A.-C., Lo, T.-C., Lin, T.-H., 2013. Characterization of putative class II bacteriocins identified from a non-bacteriocin-producing strain *Lactobacillus casei* ATCC 334. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 237–246. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4149-2>

L

- Larpin-Laborde, S., Imran, M., Bonaïti, C., Bora, N., Gelsomino, R., Goerges, S., Irlinger, F., Goodfellow, M., Ward, A.C., Vancanneyt, M., Swings, J., Scherer, S., Guéguen, M., Desmasures, N., 2011. Surface microbial consortia from Livarot, a French smear-ripened cheese. *Can. J. Microbiol.* 57, 651–660. <https://doi.org/10.1139/w11-050>
- Laursen, B.G., Leisner, J.J., Dalgaard, P., 2006. *Carnobacterium* species: Effect of metabolic activity and interaction with *Brochothrix thermosphacta* on sensory characteristics of

Bibliographiques

modified atmosphere packed shrimp. *J. Agric. Food Chem.* 54, 3604–3611. doi:10.1021/jf053017f

Lee, H., Churey, J.J., Worobo, R.W., 2009. Biosynthesis and transcriptional analysis of thurincin H, a tandem repeated bacteriocin genetic locus, produced by *Bacillus thuringiensis* SF361. *FEMS Microbiol. Lett.* 299, 205–213. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01749.x>

Leisner, J.J., Laursen, B.G., Prévost, H., Drider, D., Dalgaard, P., 2007. *Carnobacterium*: positive and negative effects in the environment and in foods. *FEMS Microbiol. Rev.* 31, 592–613. doi:10.1111/j.1574-6976.2007.00080.x

Leisner, J.J., Hansen, M.A., Larsen, M.H., Hansen, L., Ingmer, H., Sørensen, S.J., 2012. The genome sequence of the lactic acid bacterium, *Carnobacterium maltaromaticum* ATCC 35586 encodes potential virulence factors. *Int. J. Food Microbiol.* 152, 107–115. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.05.012

Leroi, F., 2014. Des bactéries marines pour la conservation des aliments. *Biofutur* 33–35.

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, 111–121.

Leyva Salas, M., Mounier, J., Valence, F., Coton, M., Thierry, A., and Coton, E., 2017. Antifungal Microbial Agents for Food Biopreservation-A Review. *Microorganisms* 5. doi:10.3390/microorganisms5030037.

Lipson, D.A., 2015. The complex relationship between microbial growth rate and yield and its implications for ecosystem processes. *Front. Microbiol.* 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00615>

Lo Giudice, A., Brilli, M., Bruni, V., De Domenico, M., Fani, R., Michaud, L., 2007. Bacterium–bacterium inhibitory interactions among psychrotrophic bacteria isolated from Antarctic seawater (Terra Nova Bay, Ross Sea): Antagonism among psychrotrophic Antarctic marine bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* 60, 383–396. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2007.00300.x>

Loch, T.P., Scribner, K., Tempelman, R., Whelan, G., Faisal, M., 2012. Bacterial infections of Chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum), returning to gamete collecting weirs in Michigan. *J. Fish Dis.* 35, 39–50. doi:10.1111/j.1365-2761.2011.01322.x

Ludwig, W., Schleifer, K.-H., Whitman, W.B., 2009. Family III. *Carnobacteriaceae* fam. nov, in: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. P. De Vos, G. M. Garrity, D. Jones, N. R.

Lunestad, B.T., Grevskott, D.H., Roiha, I.S., Svanevik, C.S., 2018. Microbiota of lutefisk, a Nordic traditional cod dish with a high pH. *Food Control* 90, 312–316. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.03.011>

Krieg, W. Ludwig, F. A. Rainey, K.-H. Schleifer & W. B. Whitman., New York: Springer, p. 549.

Lucera, A., Costa, C., Conte, A., Del Nobile, M.A., 2012. Food applications of natural antimicrobial compounds. *Front. Microbiol.* 3. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00287>

Lyons, N.A., Kraigher, B., Stefanic, P., Mandic-Mulec, I., Kolter, R., 2016. A Combinatorial Kin Discrimination System in *Bacillus subtilis*. *Curr. Biol.* 26, 733–742.

M

Macé, S., Cornet, J., Chevalier, F., Cardinal, M., Pilet, M.-F., Dousset, X., Joffraud, J.-J., 2012. Characterisation of the spoilage microbiota in raw salmon (*Salmo salar*) steaks stored under vacuum or modified atmosphere packaging combining conventional methods and PCR-TTGE. *Food Microbiol.* 30, 164–172. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.10.013>

Mao, J., Blanchard, A.E., Lu, T., 2015. Slow and steady wins the race: a bacterial exploitative competition strategy in fluctuating environments. *ACS Synth. Biol.* 4, 240.

Mao, L., Liu, Y., Shi, G., Jiang, S., Cheng, G., Li, X., An, L., Feng, H., 2014. Wheat cultivars form distinctive communities of root-associated arbuscular mycorrhiza in a conventional agroecosystem. *Plant Soil* 374, 949–961. <https://doi.org/10.1007/s11104-013-1943-2>

Maoz, A., Mayr, R., Scherer, S., 2003. Temporal Stability and Biodiversity of Two Complex Antilisterial Cheese-Ripening Microbial Consortia. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 4012. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.7.4012-4018.2003>

Martin-Visscher, L.A., van Belkum, M.J., Garneau-Tsodikova, S., Whittal, R.M., Zheng, J., McMullen, L.M., Vederas, J.C., 2008. Isolation and Characterization of Carnocyclin A, a Novel Circular Bacteriocin Produced by *Carnobacterium maltaromaticum* UAL307. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 4756–4763. doi:10.1128/AEM.00817-08

Masson, F., Johansson, G., Montel, M.C., 1999. Tyramine production by a strain of *Carnobacterium divergens* inoculated in meat-fat mixture. *Meat Sci.* 52, 65–69. doi:10.1016/S0309-1740(98)00149-1

Masson, F., Talon, R., Montel, M.C., 1996. Histamine and tyramine production by bacteria from meat products. *Int. J. Food Microbiol.* 32, 199–207.

Matamoros, S., Pilet, M.F., Gigout, F., Prevost, H., Leroi, F., 2009. Selection and evaluation of seafood-borne psychrotrophic lactic acid bacteria as inhibitors of pathogenic and spoilage bacteria. *Food Microbiol.* 26, 638–44.

Mattick, A.T.R., Hirsch, A., 1947. Further observations on an inhibitory substance (nisin) from *Lactic streptococci*. *Lancet Lond. Engl.* 2, 5.

McAuliffe, O., Ross, R.P., Hill, C., 2001. Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiol. Rev.* 25, 285–308. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2001.tb00579.x>

Medema, M.H., Blin, K., Cimermancic, P., de Jager, V., Zakrzewski, P., Fischbach, M.A., Weber, T., Takano, E., Breitling, R., 2011. antiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences. *Nucleic Acids Res* 39, W339–W346. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr466>

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, 250–259. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.03.022>
- Memmott, J., Waser, N.M., Price, M.V., 2004. Tolerance of pollination networks to species extinctions. Proc. R. Soc. B Biol. Sci. 271, 2605–2611. <https://doi.org/10.1098/rspb.2004.2909>
- Michel, C., Faivre, B., Kerouault, B., 1986. Biochemical-Identification of *Lactobacillus-Piscicola* Strains from France and Belgium. Dis. Aquat. Org. 2, 27–30. doi:10.3354/dao002027
- Miescher, S., Stierli, M.P., Teuber, M., Meile, L., 2000. Propionicin SM1, a bacteriocin from *Propionibacterium jensenii* DF1: isolation and characterization of the protein and its gene. Syst. Appl. Microbiol. 23, 174–184. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(00\)80002-8](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(00)80002-8)
- Miller, A., Morgan, M.E., Libbey, L.M., 1974. *Lactobacillus maltaromicus*, a New Species Producing a Malty Aroma. Int. J. Syst. Bacteriol. 24, 346–354. doi:10.1099/00207713-24-3-346
- Miller, P., Liu, X., McMullen, L.M., 2015. Microbiota of regular sodium and sodium-reduced ready-to-eat meat products obtained from the retail market. Can. J. Microbiol. 61, 150–154. <https://doi.org/10.1139/cjm-2014-0630>
- Milliere, J., Lefebvre, G., 1994. *Carnobacterium-Piscicola*, a Common Species of French Soft Cheeses from Cows Raw-Milk. Neth. Milk Dairy J. 48, 19–30.
- Milliere, J., Michel, M., Mathieu, F., Lefebvre, G., 1994. Presence of *Carnobacterium* Spp in French Surface Mold-Ripened Soft-Cheese. J. Appl. Bacteriol. 76, 264–269. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1994.tb01626.x>
- Mills, J., Horváth, K.M., Reynolds, A.D., Brightwell, G., 2018. Farm and abattoir sources of *Carnobacterium* species and implications for lamb meat spoilage. J. Appl. Microbiol. 125, 142–147. <https://doi.org/10.1111/jam.13748>
- Mokoena, M.P., 2017. Lactic Acid Bacteria and Their Bacteriocins: Classification, Biosynthesis and Applications against Uropathogens: A Mini-Review. Molecules 22, 1255. <https://doi.org/10.3390/molecules22081255>
- Montel, M.-C., Buchin, S., Mallet, A., Delbes-Paus, C., Vuitton, D.A., Desmasures, N., Berthier, F., 2014. Traditional cheeses: Rich and diverse microbiota with associated benefits. Int. J. Food Microbiol. 177, 136–154. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.019>
- 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, 675–678. doi:10.1099/ijvs.0.02405-0
- 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, 574–582. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00855.x>
- Mortimer, R.K., 2000. Evolution and Variation of the Yeast (*Saccharomyces*) Genome. Genome Res. 10, 403–409. <https://doi.org/10.1101/gr.10.4.403>

N

Naghmouchi, K., Kheadr, E., Lacroix, C., Fliss, I., 2007. Class I/Class IIa bacteriocin cross-resistance phenomenon in *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiol.* 24, 718–727. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2007.03.012>

Newman, M.E.J., 2003. The Structure and Function of Complex Networks. *SIAM Rev.* 45, 167–256. <https://doi.org/10.1137/S003614450342480>

Newman, M.E.J., Girvan, M., 2004. Finding and evaluating community structure in networks. *Phys. Rev. E* 69. <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.69.026113>

Nicholson, W.L., Zhalnina, K., de Oliveira, R.R., Triplett, E.W., 2015. Proposal to rename *Carnobacterium inhibens* as *Carnobacterium inhibens* subsp. *inhibens* subsp. *nov* and description of *Carnobacterium inhibens* subsp. *gilichinskyi* subsp. *nov*., a psychrotolerant bacterium isolated from Siberian permafrost. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 65, 556–561. [doi:10.1099/ijvs.0.067983-0](https://doi.org/10.1099/ijvs.0.067983-0)

Nilsson, L., Nielsen, M.K., Ng, Y., Gram, L., 2002. Role of acetate in production of an autoinducible class IIa bacteriocin in *Carnobacterium piscicola* A9b. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 2251–2260.

Nieminen, T.T., Vihavainen, E., Paloranta, A., Lehto, J., Paulin, L., Auvinen, P., Solismaa, M., Bjorkroth, K.J., 2011. Characterization of psychrotrophic bacterial communities in modified atmosphere-packed meat with terminal restriction fragment length polymorphism. *Int. J. Food Microbiol.* 144, 360–366. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.10.018>

Nigam, A., Gupta, D., Sharma, A., 2014. Treatment of infectious disease: beyond antibiotics. *Microbiol. Res.* 169, 643–651. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2014.02.009>

Nilsson, L., Hansen, T.B., Garrido, P., Buchrieser, C., 2005. Growth inhibition of *Listeria monocytogenes* by a nonbacteriocinogenic *Carnobacterium piscicola*. *J. Appl. Microbiol.* 98, 172.

Nowak, M.A., 2006. Five rules for the evolution of cooperation. *Science* 314, 1560. <https://doi.org/10.1126/science.1133755>

Núñez-Díaz, J.A., Balebona, M.C., Alcaide, E.M., Zorrilla, I., 2017. Insights into the fecal microbiota of captive Iberian lynx (*Lynx pardinus*). *Int. Microbiol. Off. J. Span. Soc. Microbiol.* 20, 31.

O

Ongey, E.L., Neubauer, P., 2016. Lanthipeptides: chemical synthesis versus in vivo biosynthesis as tools for pharmaceutical production. *Microb. Cell Fact.* 15, 97. <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0502-y>

P

- Paik, S.H., Chakicherla, A., Hansen, J.N., 1998. Identification and characterization of the structural and transporter genes for, and the chemical and biological properties of, sublancin 168, a novel lantibiotic produced by *Bacillus subtilis* 168. *J. Biol. Chem.* 273, 23134–23142
- Passerini, Delphine, 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, e15306. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015306>
- Paludan-Müller, 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, 155–166.
- Parlapani, F.F., Kormas, K.A., Boziaris, I.S., 2015. Microbiological changes, shelf life and identification of initial and spoilage microbiota of sea bream fillets stored under various conditions using 16S rRNA gene analysis: Spoilage microbiota of sea bream fillets. *J. Sci. Food Agric.* 95, 2386–2394. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6957>
- Patnaik, S., Davila, C.D., Chennupati, A. and Rubin, A., 2015. Case Report: Endocarditis of the native aortic valve caused by *Lactobacillus jensenii*. *BMJ Case Rep.* 2015. <https://doi.org/10.1136/bcr-2014-206288>
- Paul Ross, R., Morgan, S., Hill, C., 2002. Preservation and fermentation: past, present and future. *Int. J. Food Microbiol.* 79, 3–16. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00174-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00174-5)
- Pavlopoulos, G.A., Secier, M., Moschopoulos, C.N., Soldatos, T.G., Kossida, S., Aerts, J., Schneider, R., Bagos, P.G., 2011. Using graph theory to analyze biological networks. *BioData Min.* 4. <https://doi.org/10.1186/1756-0381-4-10>
- Pérez-Gutiérrez, R.-A., López-Ramírez, V., Islas, Á., Alcaraz, L.D., Hernández-González, I., Olivera, B.C.L., Santillán, M., Eguiarte, L.E., Souza, V., Travisano, M., Olmedo-Alvarez, G., 2013. Antagonism influences assembly of a *Bacillus* guild in a local community and is depicted as a food-chain network. *ISME J.* 7, 487–497. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.119>
- Piard, J., Desmazeaud, M., 1991. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 1. Oxygen metabolites and catabolism end-products. *Le Lait*, INRA Editions, 71 (5) 525–541.
- Pikuta, E.V., Hoover, R.B., 2014. The genus *Carnobacterium*. Blackwell Science Publ, Oxford.
- Pikuta, E.V., 2014. The family *Carnobacteriaceae*. Blackwell Science Publ, Oxford.
- Pilet, M., Dousset, X., Barre, R., Novel, G., Desmazeaud, M., Piard, J., 1995. Evidence for 2 Bacteriocins Produced by *Carnobacterium piscicola* and *Carnobacterium divergens* Isolated from Fish and Active Against *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.* 58, 256–262.
- Prasad, S., Manasa, P., Buddhi, S., Singh, S.M., Shivaji, S., 2011. Antagonistic interaction networks among bacteria from a cold soil environment. *FEMS Microbiol. Ecol.* 78, 376–385. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01171.x>

Q

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. *J. Biol. Chem.* 269, 12204–12211.

R

Rahman, A., Cailliez-Grimal, C., Bontemps, C., Payot, S., Chaillou, S., Revol-Junelles, A.-M., Borges, F., 2014. High Genetic Diversity among Strains of the Unindustrialized Lactic Acid Bacterium *Carnobacterium maltaromaticum* in Dairy Products as Revealed by Multilocus Sequence Typing. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 3920–3929. <https://doi.org/10.1128/AEM.00681-14>

Ramia, N.E., El Kheir, S.M., Taha, S., Mangavel, C., Revol-Junelles, A.M., Borges, F., 2018. MultiLocus Sequence Typing of *Carnobacterium maltaromaticum* strains associated with fish disease and dairy products. *Journal of Applied Microbiology*.

Rendueles, O., Amherd, M., Velicer, G.J., 2015. Positively Frequency-Dependent Interference Competition Maintains Diversity and Pervades a Natural Population of Cooperative Microbes. *Curr. Biol.* 25, 1673–1681. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.04.057>

Rendueles, O., Ghigo, J.-M., 2015. Mechanisms of Competition in Biofilm Communities. *Microbiol. Spectr.* 3. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MB-0009-2014>

Retureau, É., Callon, C., Didienne, R., Montel, M.-C., 2010. Is microbial diversity an asset for inhibiting *Listeria monocytogenes* in raw milk cheeses? *Dairy Sci. Technol.* 90, 375–398. <https://doi.org/10.1051/dst/2010010>

Riley, M.A., Wertz, J.E., 2002. Bacteriocins: Evolution, Ecology, and Application. *Annu. Rev. Microbiol.* 56, 117–137. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.161024>

Rodriguez-Girones, M.A., Santamaria, L., 2006. A new algorithm to calculate the nestedness temperature of presence-absence matrices. *J. Biogeogr.* 33, 924–935. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2006.01444.x>

Rogers, L.A., 1928. The inhibiting effect of *Streptococcus lactis* on *Lactobacillus bulgaricus*. *J. Bacteriol.* 16, 321–5.

Roth, E., Miescher Schwenninger, S., Hasler, M., Eugster-Meier, E., 2010. Population dynamics of two antilisterial cheese surface consortia revealed by temporal temperature gradient gel electrophoresis. *BMC Microbiol.* 10, 74. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-74>

Roth, E., Schwenninger, S.M., Eugster-Meier, E., Lacroix, C., 2011. Facultative anaerobic halophilic and alkaliphilic bacteria isolated from a natural smear ecosystem inhibit *Listeria* growth in early ripening stages. *Int. J. Food Microbiol.* 147, 26–32. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.02.032>

Russel, J., Røder, H.L., Madsen, J.S., Burmølle, M., Sørensen, S.J., 2017. Antagonism correlates with metabolic similarity in diverse bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 114, 10684–10688. <https://doi.org/10.1073/pnas.1706016114>

Russell, A.B., Peterson, S.B., Mougous, J.D., 2014. Type VI secretion system effectors: poisons with a purpose. *Nat. Rev. Microbiol.* 12, 137–148. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3185>

S

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.* 74:87–99.

Santiago-López, L., Aguilar-Toalá, J.E., Hernández-Mendoza, A., Vallejo-Cordoba, B., Liceaga, A.M., González-Córdova, A.F., 2018. Invited review: Bioactive compounds produced during cheese ripening and health effects associated with aged cheese consumption. *J. Dairy Sci.* 101, 3742–3757. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13465>

Saubusse, M., Millet L., Delbes C., Callon C., Montel M. C., 2007. Application of Single Strand Conformation Polymorphism PCR method for distinguishing cheese bacterial communities that inhibit *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* 116, 126--135.

Schaffer, P.A., Lifland, B., Sommeran, S.V., Casper, D.R., Davis, C.R., 2013. Meningoencephalitis Associated With *Carnobacterium maltaromaticum* -Like Bacteria in Stranded Juvenile Salmon Sharks (*Lamna ditropis*). *Vet. Pathol.* 50, 412-417. <https://doi.org/10.1177/0300985812441033>

Schirmer, B.C., Heir, E., Langsrud, S., 2009. Characterization of the bacterial spoilage flora in marinated pork products. *J. Appl. Microbiol.* 106, 2106–2116. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04183.x>

Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N.S., Wang, J.T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B., Ideker, T., 2003. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* 13, 2498–2504. <https://doi.org/10.1101/gr.1239303>

Shaw, B.G., Harding, C.D., 1985. Atypical *Lactobacilli* from Vacuum-Packaged Meats: Comparison by DNA Hybridization, Cell Composition and Biochemical Tests with a Description of *Lactobacillus carnis* sp. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* 6, 291-297. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(85\)80034-5](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(85)80034-5)

Siewerts, S., de Bok, F.A.M., Hugenholtz, J., van Hylekama Vlieg, J.E.T., 2008. Unraveling Microbial Interactions in Food Fermentations: from Classical to Genomics Approaches. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 4997–5007. <https://doi.org/10.1128/AEM.00113-08>

Singh, V.P., 2018. Recent approaches in food biopreservation - a review. *Open Vet. J.* 8, 104. <https://doi.org/10.4314/ovj.v8i1.16>

- Smid, E.J., Lacroix, C., 2013. Microbe–microbe interactions in mixed culture food fermentations. *Curr. Opin. Biotechnol.* 24, 148–154. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2012.11.007>
- Song, L. 2014. An integrated habitat index for albacore tuna in waters near the Cook Islands based on the quantile regression method. Paper presented at 6th International Symposium on GIS/Spatial Analyses in Fishery and Aquatic Sciences, Tampa, FL.
- Soto del Rio, M. de los D., Andrighetto, C., Dalmaso, A., Lombardi, A., Civera, T., Bottero, M.T., 2016. Isolation and characterisation of lactic acid bacteria from donkey milk. *J. Dairy Res.* 83, 383–386. <https://doi.org/10.1017/S0022029916000376>
- Spanu, C., Piras, F., Mocci, A.M., Nieddu, G., De Santis, E.P.L., Scarano, C., 2018. Use of *Carnobacterium* spp protective culture in MAP packed Ricotta fresca cheese to control *Pseudomonas* spp. *Food Microbiol.* 74, 50–56. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.02.020>
- Spivak, D.I., Tan, J., 2016. Nesting of dynamical systems and mode-dependent networks. *J. Complex Netw.* cnw022. <https://doi.org/10.1093/comnet/cnw022>
- 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*. *Dis. Aquat. Organ.* 13, 181-187.
- Stoffels, G., Nissen-Meyer, J., Gudmundsdottir, A., Sletten, K., Holo, H., Nes, I.F., 1992. Purification and characterization of a new bacteriocin isolated from a *Carnobacterium* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 1417–1422.
- Sun, Z., Harris, H.M.B., McCann, A., Guo, C., 2015. Expanding the biotechnology potential of lactobacilli through comparative genomics of 213 strains and associated genera. *Nat. Commun.* 6.
- Szabó, P., Czárán, T., Szabo, G. 2007 Competing associations in bacterial warfare with two toxins. *J. Theor. Biol.* 248, 736–744

T

- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S., 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum-parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28, 2731–2739.
- Thebault, E., Fontaine, C., 2010. Stability of Ecological Communities and the Architecture of Mutualistic and Trophic Networks. *Science* 329, 853–856. <https://doi.org/10.1126/science.1188321>
- Thornley, M.J., 1957. Observations on the microflora of minced chicken meat irradiated with 4 mev cathode rays. *J. Appl. Bacteriol.* 20, 286–298. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1957.tb00104.x>
- Tirloni, E., Stella, S., Bernardi, C., 2015. An Efficient and Tasty Use of Atlantic Salmon Trimming: Microbiological and Chemical-Physical Evaluation of Salmon Frankfurters 7.

Tulini, F.L., Lohans, C.T., Bordon, K.C.F., Zheng, J., Arantes, E.C., Vederas, J.C., De Martinis, E.C.P., 2014. Purification and characterization of antimicrobial peptides from fish isolate *Carnobacterium maltaromaticum* C2: Carnobacteriocin X and carnolysins A1 and A2. *Int. J. Food Microbiol.* 173, 81–88. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.12.019>

Toranzo, A., Romalde, J., Nunez, S., Figueras, A., Barja, J., 1993. An Epizootic in Farmed, Market-Size Rainbow-Trout in Spain Caused by a Strain of *Carnobacterium-Piscicola* of Unusual Virulence. *Dis. Aquat. Org.* 17, 87–99. doi:10.3354/dao017087

Tymoszewska, A., Diep, D.B., Wirtek, P., Aleksandrak-Piekarczyk, T., 2017. The Non-Lantibiotic Bacteriocin Garvicin Q Targets Man-PTS in a Broad Spectrum of Sensitive Bacterial Genera. *Sci. Rep.* 7. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09102-7>

V

Vacher, C., Piou, D., Desprez-Loustau, M.-L., 2008. Architecture of an Antagonistic Tree/Fungus Network: The Asymmetric Influence of Past Evolutionary History. *PLoS ONE* 3, e1740. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001740>

Valdés-Stauber, N., Scherer, S., 1994. Isolation and characterization of Linocin M18, a bacteriocin produced by *Brevibacterium linens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 3809–3814.

van Belkum, M.J.1., Stiles, M.E., 2000. Nonlantibiotic antibacterial peptides from lactic acid bacteria. *Nat Prod Rep.* 17(4), 323–35

van Belkum, M.J., Worobo, R.W., Stiles, M.E., 1997. Double-glycine-type leader peptides direct secretion of bacteriocins by ABC transporters: colicin V secretion in *Lactococcus lactis*. *Mol. Microbiol.* 23, 1293–1301.

van Heel, A.J., Montalban-Lopez, M., Oliveau, Q., Kuipers, O.P., 2017. Genome-guided identification of novel head-to-tail cyclized antimicrobial peptides, exemplified by the discovery of pumilarin. *Microb Genom* 3. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000134>

Vasilopoulos, C., De Maere, H., De Mey, E., Paelinck, H., De Vuyst, L., Leroy, F., 2010. Technology-induced selection towards the spoilage microbiota of artisan-type cooked ham packed under modified atmosphere. *Food Microbiol.* 27, 77–84. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.08.008>

Vásquez M, S.M., Suárez M, H., Montoya, O.I., 2009. Evaluación de bacteriocinas como medio protector para la biopreservación de la carne bajo refrigeración. *Rev. Chil. Nutr.* 36. <https://doi.org/10.4067/S0717-75182009000300005>

Vermeiren, L., Devlieghere, F., Vandekinderen, I., Debevere, J., 2006. The interaction of the non-bacteriocinogenic *Lactobacillus sakei* 10A and lactocin S producing *Lactobacillus sakei* 148 towards *Listeria monocytogenes* on a model cooked ham. *Food Microbiol.* 23, 511–518. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2005.10.005>

Vetsigian, K., Jajoo, R., Kishony, R., 2011. Structure and Evolution of *Streptomyces* Interaction Networks in Soil and *In Silico*. *PLoS Biol.* 9, e1001184. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001184>

Vihavainen, E., Lundström, H.-S., Susiluoto, T., Koort, J., Paulin, L., Auvinen, P., Björkroth, 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, 1136–1145. <https://doi.org/10.1128/AEM.01644-06>

W

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. . *Int. J. Syst. Bacteriol.* 40, 224–230. doi:10.1099/00207713-40-3-224

Wan, J., Harmark, K., Davidson, B.E., Hillier, A.J., Gordon, J.B., Wilcock

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, 1784–1792. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.3.1784-1792.2006>

Walsh, C.J., Guinane, C.M., Hill, C., Ross, R.P., O’Toole, P.W., Cotter, P.D., 2015. *In silico* identification of bacteriocin gene clusters in the gastrointestinal tract, based on the Human Microbiome Project’s reference genome database. *BMC Microbiol.* 15, 183. <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0515-4>

Wang, H., Fewer, D.P., Sivonen, K., 2011. Genome Mining Demonstrates the Widespread Occurrence of Gene Clusters Encoding Bacteriocins in Cyanobacteria. *PLOS ONE* 6, e22384. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022384>

Wei, Z., Yang, T., Friman, V.-P., Xu, Y., Shen, Q., Jousset, A., 2015. Trophic network architecture of root-associated bacterial communities determines pathogen invasion and plant health. *Nat. Commun.* 6. <https://doi.org/10.1038/ncomms9413>

Wolfe B.E., Button J.E., Santarelli M., Dutton R.J., 2014. Cheese Rind Communities Provide Tractable Systems for In Situ and In Vitro Studies of Microbial Diversity. *Cell* 158, 422-433.

Wolfe, B.E., Dutton, R.J., 2015. Fermented Foods as Experimentally Tractable Microbial Ecosystems. *Cell* 161, 49–55. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.02.034>

Wolz, M., Schaefer, J., 2008. “Swiss cheese–like” brain due to *Lactobacillus rhamnosus*. *Neurology* 70, 979–979. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000305967.88845.c7>

Worobo, R.W., Henkel, T., Sailer, M., Roy, K.L., Vederas, J.C., Stiles, M.E., 1994. Characteristics and genetic determinant of a hydrophobic peptide bacteriocin, carnobacteriocin A, produced by *Carnobacterium piscicola* LV17A. *Microbiology* 140, 517–526. doi:10.1099/00221287-140-3-517

X

Xu, J.G., Yang, H.M., Lai, X.H., Fu, X.L., Wu, J.M., Huang, L.B., Yu, X.J., Wu, Y.P., Wu, Y.J., Liu, B.Y., 1997. Etiological study for a case of multi-bacterial synergistic gangrene. *Chin. Sci. Bull.* 42, 511–&. doi:10.1007/BF02882606

Y

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, 554–557. doi:10.1128/AEM.71.1.554-557.2005

Yanagida, F., Chen, Y.-S., Yasaki, M., 2007. Isolation and characterization of lactic acid bacteria from lakes. *J. Basic Microbiol.* 47, 184–190. <https://doi.org/10.1002/jobm.200610237>

Yang, C., Wang, D., Zhou, Q., Xu, J., 2015. Bacteremia due to vancomycin-resistant *Leuconostoc lactis* in a patient with pneumonia and abdominal infection. *Am. J. Med. Sci.* 349, 282.

Youssef, M.K., Gill, C.O., Tran, F., Yang, X., 2014. Unusual Compositions of Microflora of Vacuum-Packaged Beef Primal Cuts of Very Long Storage Life. *J. Food Prot.* 77, 2161–2167. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-14-190>



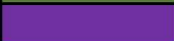






Z

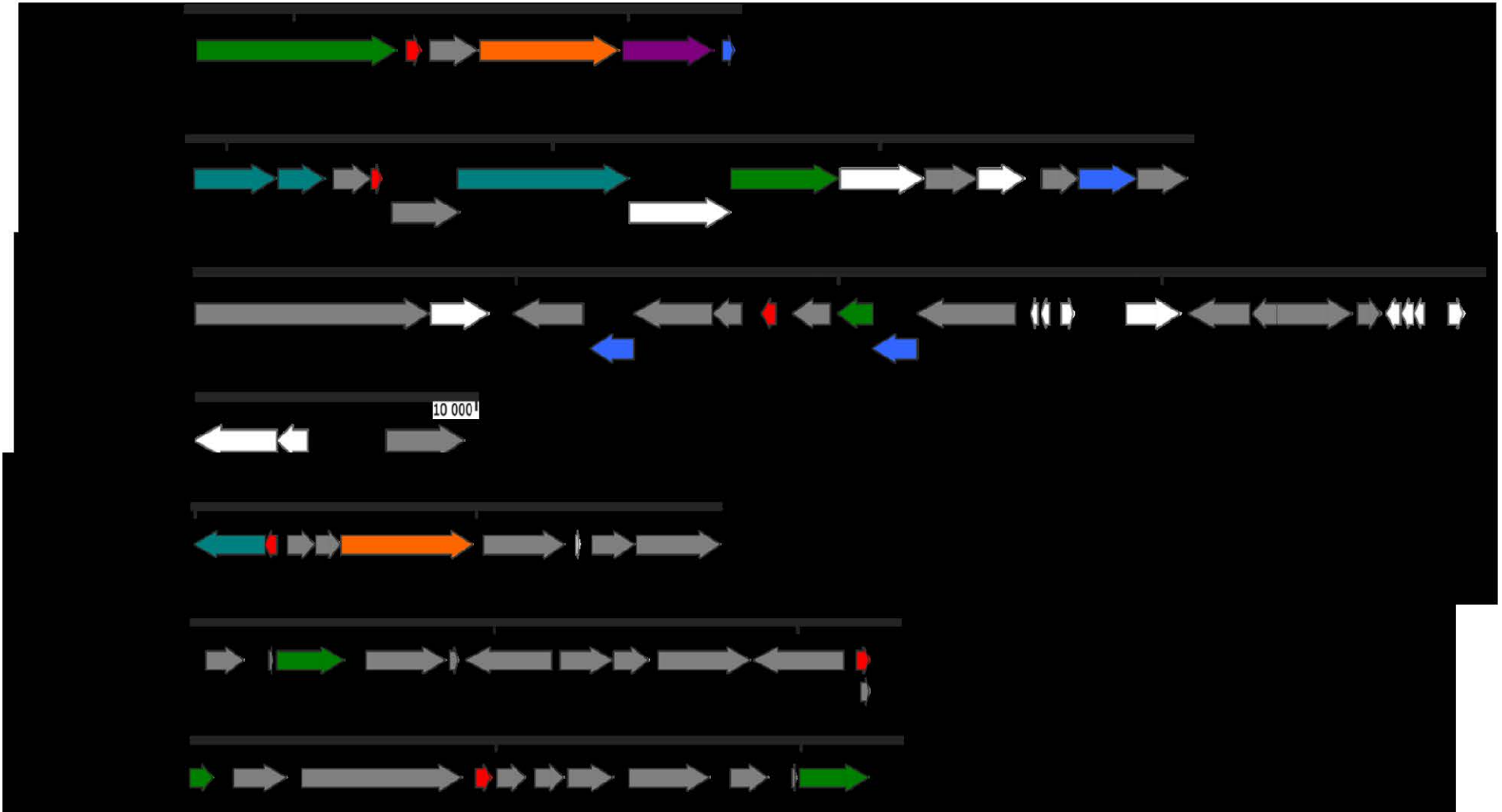
Zagorec, M., Champomier-Verges, M.-C., Renault, P., Valence-Bertel, F., 2012. Ecosystèmes microbiens et préservation des aliments. *Innov. Agron.* 24, 57–77.

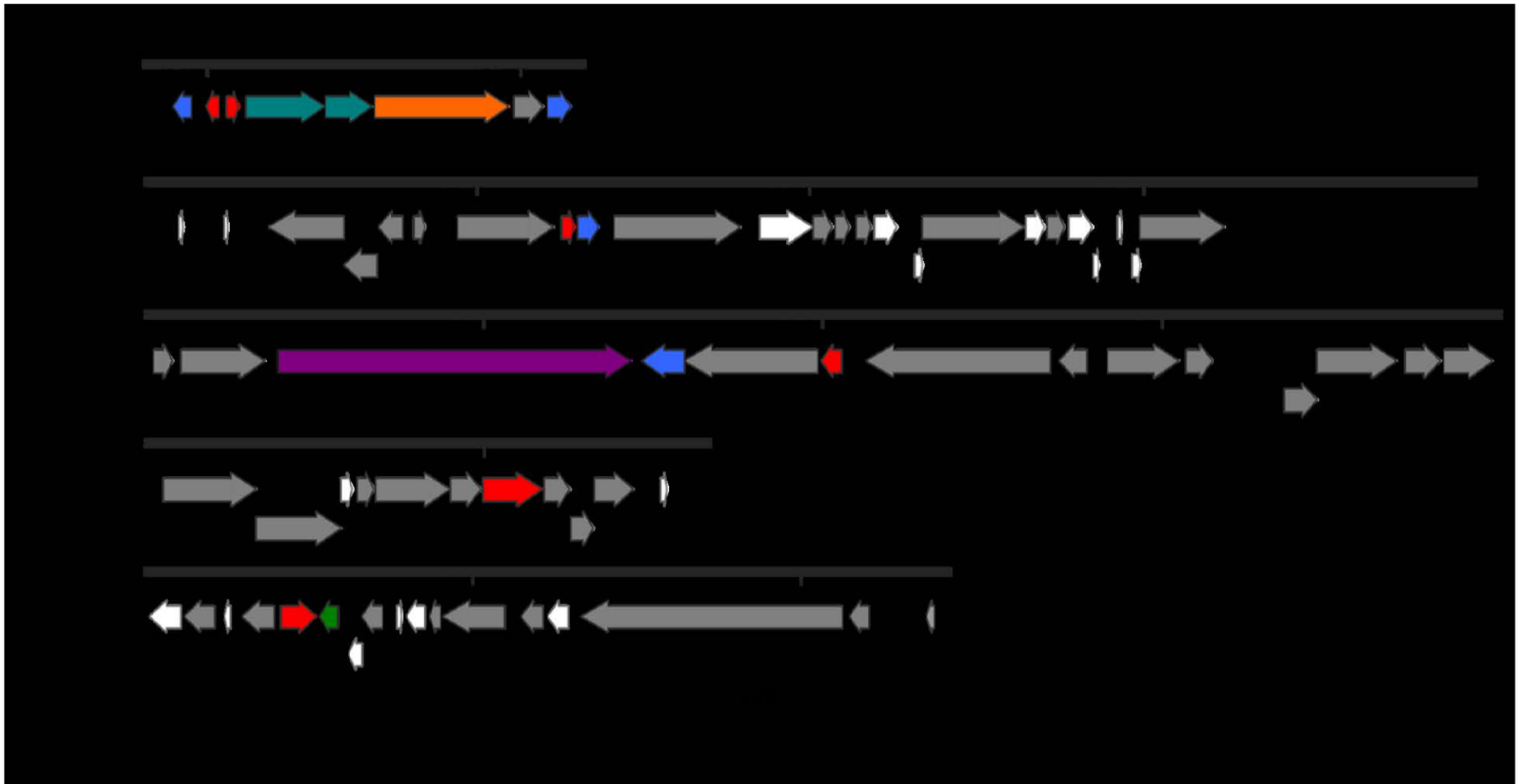
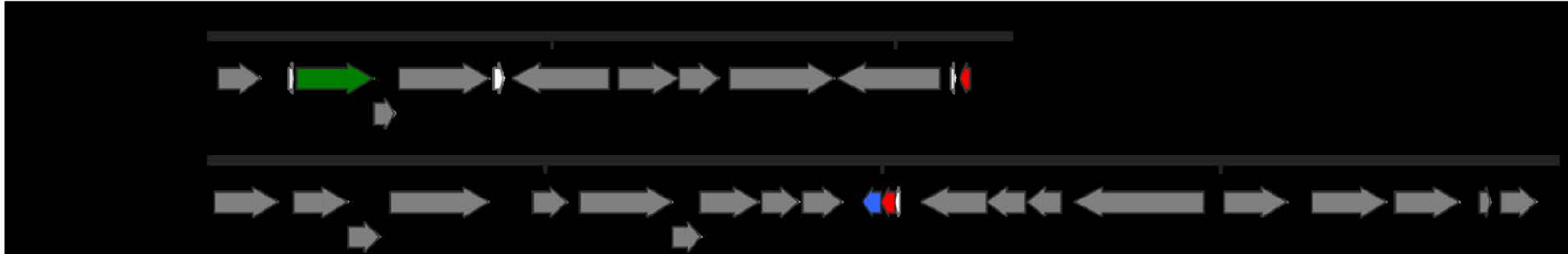
Zhu, S., Lin, D., Xiong, S., Wang, X., Xue, Z., Dong, B., Shen, X., Ma, X., Chen, J., Yang, J., 2018. *Carnobacterium antarcticum* sp. nov., a psychrotolerant, alkaliphilic bacterium isolated from sandy soil in Antarctica. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 68, 1672–1677. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002727>

Annexes

Annexe 1 : Schematic representation of the predicted bacteriocin encoding gene clusters done using the software “SnapGene” according to the following color code.

	Bacteriocin
	Modification
	Leader cleavage
	Transport and leader cleavage
	Immunity and transport
	Regulation
	Associated protein
	Blast hit with database
	Hypothetical protein





Annexe 2 : Similarity matrices of a. antagonistic activity spectra displayed by the 26 *C. maltaromaticum* strains and b. predicted bacteriocin gene content, generated using DendroUPGMA and Jaccard index.

a.

	JIP 28/91	JIP 05/93	LLS R 919	MM3364.01	MM3365.01	RFA 378	10040100629	710	8.1	9.4	CIP100481	CIP101354	CIP102035	CP1	CP4	CP5	CP14	DSM20344	DSM20590	F4	F7	F14	F42	F48	F73	F84
JIP 28/91	1.00	0.00	0.00	1.00	1.00	0.00	0.00	0.00	1.00	0.00	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00	0.00	0.00	1.00	0.00	1.00	0.00	0.00	0.00
JIP 05/93	0.00	1.00	0.31	0.00	0.00	0.50	0.11	0.00	0.00	0.16	0.00	0.29	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.12	0.58	0.00	0.00	0.00	0.00	0.05	0.00	0.00
LLS R 919	0.00	0.31	1.00	0.00	0.00	0.50	0.15	0.17	0.00	0.23	0.00	0.91	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.17	0.38	0.15	0.00	0.00	0.00	0.08	0.05	0.09
MM3364.01	1.00	0.00	0.00	1.00	1.00	0.00	0.00	0.00	1.00	0.00	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00	0.00	0.00	1.00	0.00	1.00	0.00	0.00	0.00
MM3365.01	1.00	0.00	0.00	1.00	1.00	0.00	0.00	0.00	1.00	0.00	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00	0.00	0.00	1.00	0.00	1.00	0.00	0.00	0.00
RFA 378	0.00	0.50	0.50	0.00	0.00	1.00	0.08	0.00	0.00	0.11	0.00	0.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.10	0.42	0.00	0.00	0.00	0.00	0.05	0.00	0.00
10040100629	0.00	0.11	0.15	0.00	0.00	0.08	1.00	0.06	0.00	0.64	0.00	0.17	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.57	0.16	0.08	0.00	0.02	0.00	0.24	0.18	0.03
710	0.00	0.00	0.17	0.00	0.00	0.00	0.06	1.00	0.00	0.09	0.00	0.15	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.08	0.14	0.29	0.00	0.00	0.00	0.05	0.07	0.20
8.1	1.00	0.00	0.00	1.00	1.00	0.00	0.00	0.00	1.00	0.00	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00	0.00	0.00	1.00	0.00	1.00	0.00	0.00	0.00
9.4	0.00	0.16	0.23	0.00	0.00	0.11	0.64	0.09	0.00	1.00	0.00	0.25	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.66	0.27	0.11	0.00	0.02	0.00	0.33	0.27	0.05
CIP100481	1.00	0.00	0.00	1.00	1.00	0.00	0.00	0.00	1.00	0.00	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00	0.00	0.00	1.00	0.00	1.00	0.00	0.00	0.00
CIP101354	0.00	0.29	0.91	0.00	0.00	0.46	0.17	0.15	0.00	0.25	0.00	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.16	0.35	0.14	0.00	0.00	0.00	0.08	0.05	0.08
CIP102035	1.00	0.00	0.00	1.00	1.00	0.00	0.00	0.00	1.00	0.00	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00	0.00	0.00	1.00	0.00	1.00	0.00	0.00	0.00
CP1	1.00	0.00	0.00	1.00	1.00	0.00	0.00	0.00	1.00	0.00	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00	0.00	0.00	1.00	0.00	1.00	0.00	0.00	0.00
CP4	1.00	0.00	0.00	1.00	1.00	0.00	0.00	0.00	1.00	0.00	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00	0.00	0.00	1.00	0.00	1.00	0.00	0.00	0.00
CP5	1.00	0.00	0.00	1.00	1.00	0.00	0.00	0.00	1.00	0.00	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00	0.00	0.00	1.00	0.00	1.00	0.00	0.00	0.00
CP14	1.00	0.00	0.00	1.00	1.00	0.00	0.00	0.00	1.00	0.00	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00	0.00	0.00	1.00	0.00	1.00	0.00	0.00	0.00
DSM20344	0.00	0.12	0.17	0.00	0.00	0.10	0.57	0.08	0.00	0.66	0.00	0.16	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.00	0.24	0.13	0.00	0.03	0.00	0.31	0.31	0.05
DSM20590	0.00	0.58	0.38	0.00	0.00	0.42	0.16	0.14	0.00	0.27	0.00	0.35	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.24	1.00	0.06	0.00	0.08	0.00	0.12	0.09	0.08
F4	0.00	0.00	0.15	0.00	0.00	0.00	0.08	0.29	0.00	0.11	0.00	0.14	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.13	0.06	1.00	0.00	0.00	0.00	0.05	0.06	0.40
F7	1.00	0.00	0.00	1.00	1.00	0.00	0.00	0.00	1.00	0.00	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00	0.00	0.00	1.00	0.00	1.00	0.00	0.00	0.00
F14	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02	0.00	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03	0.08	0.00	0.00	1.00	0.00	0.06	0.08	0.00
F42	1.00	0.00	0.00	1.00	1.00	0.00	0.00	0.00	1.00	0.00	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00	0.00	0.00	1.00	0.00	1.00	0.00	0.00	0.00
F48	0.00	0.05	0.08	0.00	0.00	0.05	0.24	0.05	0.00	0.33	0.00	0.08	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.31	0.12	0.05	0.00	0.06	0.00	1.00	0.65	0.06
F73	0.00	0.00	0.05	0.00	0.00	0.00	0.18	0.07	0.00	0.27	0.00	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.31	0.09	0.06	0.00	0.08	0.00	0.65	1.00	0.08
F84	0.00	0.00	0.09	0.00	0.00	0.00	0.03	0.20	0.00	0.05	0.00	0.08	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.05	0.08	0.40	0.00	0.00	0.00	0.06	0.08	1.00

b.

	JIP 28/91	JIP 05/93	LLS R 919	MM3364.01	MM3365.01	RFA 378	10040100629	710	8.1	9.4	CIP100481	CIP101354	CIP102035	CP1	CP4	CP5	CP14	DSM20344	DSM20590	F4	F7	F14	F42	F48	F73	F84
JIP 28/91	1.00	0.43	0.20	0.00	0.00	0.20	0.60	0.17	0.60	0.14	0.14	0.20	0.20	0.11	0.10	0.10	0.17	0.14	0.60	0.17	0.11	0.25	0.17	0.17	0.17	0.17
JIP 05/93	0.43	1.00	0.14	0.00	0.00	0.33	0.43	0.29	0.43	0.25	0.43	0.14	0.33	0.09	0.18	0.18	0.29	0.43	0.67	0.29	0.09	0.17	0.29	0.13	0.13	0.29
LLS R 919	0.20	0.14	1.00	0.00	0.00	0.33	0.20	0.67	0.20	0.20	0.50	1.00	0.33	0.33	0.29	0.29	0.25	0.50	0.20	0.25	0.33	0.50	0.25	0.25	0.25	0.25
MM3364.01	0.00	0.00	0.00	1.00	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
MM3365.01	0.00	0.00	0.00	1.00	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
RFA 378	0.20	0.33	0.33	0.00	0.00	1.00	0.20	0.25	0.20	0.20	0.50	0.33	1.00	0.14	0.29	0.29	0.67	0.50	0.20	0.67	0.14	0.50	0.67	0.25	0.25	0.67
10040100629	0.60	0.43	0.20	0.00	0.00	0.20	1.00	0.17	0.60	0.14	0.14	0.20	0.20	0.11	0.10	0.10	0.17	0.14	0.60	0.17	0.11	0.25	0.17	0.17	0.17	0.17
710	0.17	0.29	0.67	0.00	0.00	0.25	0.17	1.00	0.17	0.40	0.75	0.67	0.25	0.29	0.25	0.25	0.20	0.40	0.40	0.20	0.29	0.33	0.20	0.20	0.20	0.20
8.1	0.60	0.43	0.20	0.00	0.00	0.20	0.60	0.17	1.00	0.14	0.14	0.20	0.20	0.11	0.10	0.10	0.17	0.14	0.60	0.17	0.11	0.25	0.17	0.17	0.17	0.17
9.4	0.14	0.25	0.20	0.00	0.00	0.20	0.14	0.40	0.14	1.00	0.33	0.20	0.20	0.11	0.10	0.10	0.17	0.14	0.33	0.17	0.11	0.25	0.17	0.17	0.17	0.17
CIP100481	0.14	0.43	0.50	0.00	0.00	0.50	0.14	0.75	0.14	0.33	1.00	0.50	0.50	0.25	0.38	0.38	0.40	0.60	0.33	0.40	0.25	0.25	0.40	0.17	0.17	0.40
CIP101354	0.20	0.14	1.00	0.00	0.00	0.33	0.20	0.67	0.20	0.20	0.50	1.00	0.33	0.33	0.29	0.29	0.25	0.50	0.20	0.25	0.33	0.50	0.25	0.25	0.25	0.25
CIP102035	0.20	0.33	0.33	0.00	0.00	1.00	0.20	0.25	0.20	0.20	0.50	0.33	1.00	0.14	0.29	0.29	0.67	0.50	0.20	0.67	0.14	0.50	0.67	0.25	0.25	0.67
CP1	0.11	0.09	0.33	0.00	0.00	0.14	0.11	0.29	0.11	0.11	0.25	0.33	0.14	1.00	0.86	0.86	0.13	0.25	0.11	0.13	1.00	0.17	0.13	0.13	0.13	0.13
CP4	0.10	0.18	0.29	0.00	0.00	0.29	0.10	0.25	0.10	0.10	0.38	0.29	0.29	0.86	1.00	1.00	0.25	0.38	0.10	0.25	0.86	0.14	0.25	0.11	0.11	0.25
CP5	0.10	0.18	0.29	0.00	0.00	0.29	0.10	0.25	0.10	0.10	0.38	0.29	0.29	0.86	1.00	1.00	0.25	0.38	0.10	0.25	0.86	0.14	0.25	0.11	0.11	0.25
CP14	0.17	0.29	0.25	0.00	0.00	0.67	0.17	0.20	0.17	0.17	0.40	0.25	0.67	0.13	0.25	0.25	1.00	0.40	0.17	1.00	0.13	0.33	1.00	0.20	0.20	1.00
DSM20344	0.14	0.43	0.50	0.00	0.00	0.50	0.14	0.40	0.14	0.14	0.60	0.50	0.50	0.25	0.38	0.38	0.40	1.00	0.14	0.40	0.25	0.25	0.40	0.17	0.17	0.40
DSM20590	0.60	0.67	0.20	0.00	0.00	0.20	0.60	0.40	0.60	0.33	0.33	0.20	0.20	0.11	0.10	0.10	0.17	0.14	1.00	0.17	0.11	0.25	0.17	0.17	0.17	0.17
F4	0.17	0.29	0.25	0.00	0.00	0.67	0.17	0.20	0.17	0.17	0.40	0.25	0.67	0.13	0.25	0.25	1.00	0.40	0.17	1.00	0.13	0.33	1.00	0.20	0.20	1.00
F7	0.11	0.09	0.33	0.00	0.00	0.14	0.11																			

Annexe 3 : Maximal growth rates and resistance degrees (number of non-antagonizing sender strains per receiver strain) of the 76 *C. maltaromaticum* receiver strains.

Strain code	Maximum growth rate	Resistance degree
ATCC 35586	0,0079	71
CIP102035	0,0047	55
DSM20624	0,0065	64
3Ba.2.II	0,0047	62
RFA 345	0,0091	76
DSM20590	0,0078	58
JIP 05/93	0,0043	61
LLS E 6926	0,0044	61
F1	0,0050	53
C4	0,0057	53
JIP 19/00	0,0054	63
JIP 23/91	0,0031	66
1A4II	0,0045	52
RFA F54	0,0042	69
F48	0,0048	66
F73	0,0048	66
3BO4	0,0050	66
5.27	0,0056	60
F14	0,0055	63
CP32	0,0044	69
L1	0,0045	72
F86	0,0043	68
CP23	0,0034	75
CP4	0,0042	73
CP5	0,0049	75
F29-1	0,0047	69
F7	0,0045	68
F44	0,0045	66
LMA28	0,0042	75
DSM20342	0,0034	67
CP3	0,0035	75
F33	0,0048	67
Me I,5-02	0,0050	66
131120027309	0,0092	76
JIP 20/85 (3)	0,0039	67
F2	0,0043	74
DSM20344	0,0034	47
C44	0,0043	73
CIP100481	0,0040	66
710	0,0052	68
9.4	0,0060	69
JIP 14/92	0,0055	66

F43	0,0051	59
CIP101342	0,0043	74
JIP 28/91	0,0046	50
CIP101354	0,0047	62
LLS R 919	0,0046	63
MM 3365.01	0,0091	76
MM 3364.01	0,0092	76
F42	0,0052	69
N15	0,0042	65
CP11	0,0045	68
CP12	0,0040	75
F4	0,0050	67
F84	0,0048	67
CP14	0,0060	69
F87	0,0052	67
CP7	0,0045	69
CP10	0,0044	75
JIP 07/00	0,0052	64
G117	0,0048	65
L11	0,0043	66
G97	0,0054	65
RFA 295	0,0056	62
6.2	0,0050	66
JIP 169/77(3)	0,0089	76
JIP P04/83	0,0049	66
JIP 05/93 (3)	0,0046	61
LLS E 6103	0,0043	65
RFA 378	0,0083	76
10040100629	0,0088	72
8.1	0,0055	66
L2	0,0048	69
L3	0,0049	64
L7	0,0047	68
CP1	0,0088	76

Compétition par interférence et diversité génétique à l'échelle intraspécifique chez la bactérie lactique *Carnobacterium maltaromaticum*

Résumé

Compétition et diversité sont des phénomènes majeurs en microbiologie. Dans le secteur de l'agroalimentaire, la compétition est à la base de la biopréservation, un procédé dont l'objectif est d'inhiber des microorganismes indésirables par l'utilisation de microorganismes compétiteurs. La diversité microbienne est quant à elle à l'origine de la diversité de produits fermentés et en particulier de la typicité des fromages. Pourtant, l'écologie de la compétition microbienne dans les aliments et le lien avec la diversité microbienne sont très mal connus. L'objectif de ces travaux de thèse était d'une part d'étudier la diversité et d'autre part la compétition chez une bactérie représentative de l'écosystème fromager. Le modèle d'étude choisi est la bactérie lactique *Carnobacterium maltaromaticum*. Une analyse de diversité de 21 souches de *C. maltaromaticum* a été réalisée par MultiLocus Sequence Typing (MLST) et a permis de compléter la structure connue de la population de *C. maltaromaticum*. Cette étude a permis de révéler la présence de 56 génotypes au sein d'une collection de 71 souches, montrant une grande diversité génétique au sein de cette espèce. La compétition par interférence a été étudiée par réalisation de tests de compétition à haut débit. Chaque test de compétition mettait en jeu deux souches de la collection, une souche en situation d'expédition et une souche en situation de réception. Au total 5776 tests ont été réalisés à partir de la collection de 76 souches. Les résultats ont révélé que 60% des souches inhibaient au moins une autre souche de la collection indiquant que la compétition intraspécifique est majeure au sein de l'espèce *C. maltaromaticum*. Par ailleurs, une grande variabilité de largeur de spectre d'inhibition et de spectre de sensibilité a été observée. Une approche d'analyse de réseau a révélé une architecture « nested » du réseau compétitif suggérant que l'inhibition dépend non seulement des caractéristiques antagonistes des souches inhibitrices mais également du niveau de sensibilité des souches réceptrices. Une analyse génomique de 26 souches de la collection a été réalisée en vue de prédire leur contenu en gènes codant la synthèse de substances antagonistes et a permis d'identifier des gènes codant potentiellement des bactériocines. En conclusion, ces travaux de thèse ont montré que l'espèce *Carnobacterium maltaromaticum* est d'une part caractérisée par une grande diversité génétique et que d'autre part la compétition par interférence est fréquente au sein de la population.

Mots-clés : *Carnobacterium maltaromaticum*, Compétition par interférence, Diversité génétique, Analyse de réseau, MLST, Génomique

Interference competition and genetic diversity at the intraspecific scale in the lactic acid bacterium *Carnobacterium maltaromaticum*

Abstract

Competition and diversity are major phenomena in microbiology. In the agri-food sector, competition is the very basis of biopreservation, a process which objective is to inhibit undesirable microorganisms through the use of microbial competitors. Microbial diversity lies at the origin of the diversity of fermented products and particularly of the typicality of cheeses. However, the ecology of microbial competition in food and the link with microbial diversity are poorly understood. The goal of this thesis was to study the diversity and the competition of a representative model bacterium of the cheese ecosystem. The study model chosen is the lactic acid bacterium *Carnobacterium maltaromaticum*. An analysis of the diversity of 21 strains of *C. maltaromaticum* was performed by MultiLocus Sequence Typing (MLST) and allowed to complete the scheme of *C. maltaromaticum* population structure. This study revealed the presence of 56 genotypes among a collection of 71 strains, showing a high genetic diversity within this species. Interference competition was studied by performing high-throughput competition assays. Each competition assay involved two strains, one in the position of the sender strain and the other in the position of the receiver. In total, 5776 tests were performed on a collection of 76 strains. The results revealed that 60% of strains inhibited at least one other strain of the collection, indicating that intraspecific competition is major in *C. maltaromaticum*. Moreover, a large variability in the width of inhibition and sensitivity spectra has been observed. A network analysis approach revealed a nested architecture of the competitive network, suggesting that inhibition depends not only on the antagonistic characteristics of the inhibitory strains but also on the level of sensitivity of the receiver strains. A genomic analysis of 26 strains from the collection was performed in order to predict their gene content encoding the synthesis of antagonistic substances, and it allowed the identification of genes potentially encoding bacteriocins. In conclusion, this thesis has shown that the species *Carnobacterium maltaromaticum* is characterized by a high genetic diversity and that interference competition is frequent in the population.

Keywords: *Carnobacterium maltaromaticum*, Interference competition, Genetic diversity, Network analysis, MLST, Genomics