



HAL
open science

Staphylococcus xylosus : cartographie du génome et diversité génétique

Emilie Dordet-Frisoni

► **To cite this version:**

Emilie Dordet-Frisoni. Staphylococcus xylosus : cartographie du génome et diversité génétique. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II; Université d'Auvergne - Clermont-Ferrand I, 2007. Français. NNT : 2007CLF21760 . tel-00718141

HAL Id: tel-00718141

<https://theses.hal.science/tel-00718141>

Submitted on 16 Jul 2012

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.

UNIVERSITE D'AUVERGNE

UNIVERSITE BLAISE PASCAL

N° DU : 1760

Année 2007

**ECOLE DOCTORALE
DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE**

N° d'ordre : 461

Thèse

pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE BLAISE PASCAL
DISCIPLINE : SCIENCES DES ALIMENTS
PRESENTEE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT PAR**

EMILIE DORDET FRISONI

le 5 Juillet 2007

***STAPHYLOCOCCUS XYLOSUS* :**
**CARTOGRAPHIE DU GÉNOME ET DIVERSITÉ
GÉNÉTIQUE**

Rapporteurs	Mme M. Zagrec - Directrice de Recherche, INRA, Jouy-en-Josas M. Y. Le Loir - Habilité à Diriger des Recherches, STLO, Rennes
Membres	M. G. Fonty - Directeur de Recherche, CNRS, Clermont-Ferrand II Mme M-L Mingot - Maître de Conférence, Université Paul Sabatier, Toulouse Mme S. Leroy - Ingénieur de Recherche, INRA, Clermont-Ferrand Theix
Directeur de thèse	Mme R. Talon - Directrice de Recherche, INRA, Clermont-Ferrand Theix

Unité de Recherche Microbiologie - Equipe Qualité et Sécurité des Aliments
Institut National de la Recherche Agronomique - Clermont-Ferrand - Theix

Remerciements

Ce travail a été réalisé au sein de l'équipe Qualité et Sécurité des Aliments de l'Unité de Microbiologie (UR 454) de l'INRA de Clermont-Ferrand Theix.

La thèse constitue une expérience intense, passionnante. Cette « aventure » à l'image de l'océan fut emplie de belles vagues mais aussi parfois de petits flops.

J'ai eu cependant la chance d'être entourée de deux personnes, Sabine et Yannick, qui m'ont permis de vivre pleinement ces 4 années. Ils m'ont appris à surfer sur les vagues hautes et à me dépatouiller et me sortir des petits flops.

Je tiens donc à remercier Sabine Leroy, pour son enthousiasme et sa gentillesse. Que rêver de mieux qu'une responsable de thèse qui est là pour vous guider, mais qui vous fait surtout confiance et vous laisse libre de vos choix. Merci pour tout ce que tu m'as appris, scientifiquement comme humainement. Merci pour ton amitié.

Je tiens à remercier ma seconde responsable de thèse Régine Talon, pour m'avoir accueillie dans l'équipe QuaSA et pour avoir tout fait pour que j'y reste le plus longtemps possible !!! Un grand merci pour sa disponibilité et pour nos discussions qu'elles soient scientifiques ou bien artistiques.



Merci au membre du jury, avec lesquels j'ai eu un immense plaisir à échanger et discuter de mon sujet de thèse:

Mr Gérard Fonty, que je tiens à remercier chaleureusement pour avoir accepté de présider le jury lors de ma soutenance de thèse et pour la qualité exceptionnelle dont il a fait preuve pour coordonner celle-ci.

Mme Monique Zagorec et Mr Yves Leloir qui ont eu la gentillesse d'être rapporteurs et d'examiner ce manuscrit. Je les remercie à la fois pour leurs remarques pertinentes, ainsi que pour leur intérêt pour mes recherches et la discussion captivante que nous avons eue lors de ma soutenance de thèse.

Mme Marie-Line Mingot pour avoir participé en tant qu'examinatrice à ma soutenance de thèse. C'est grâce à votre aide pour trouver un stage, que j'ai par la suite eu envie de continuer sur la voie de la recherche, merci.

Un grand MERCI à toute l'équipe QuaSA, pour sa gentillesse et l'ambiance chaleureuse qu'il y règne.

Merci à mon voisin, Jean Paul Chacornac, notre « roi du bricolage », pour ces bons légumes, sa bonne humeur et pour nos « courses » à pied du midi.

Merci à Brigitte Duclos pour sa précieuse aide en informatique et pour son aide à l'élaboration du manuscrit. Je regretterai nos cueillettes au milieu des vaches et des moutons.

Je tiens à remercier, mes deux « supers » stagiaires Géraud Dorchies et Cécilia De Araujo ainsi qu'Yvette Villatte, Carine Andant et Marie Claire Debote pour leur aide à la réalisation de ce travail.

Une pensées chaleureuse et amicale également aux post-docs et thésards que j'ai croisés au cours de ces 4 ans : Stéphanie Corbière Morot-Bizot, Philippe Giammarinaro, Emilie Dumas et Stella Planchon, ainsi que tous ceux qui ont suivi de près ou de loin mon travail de thèse.

Je remercie toute ma famille et en particulier mes parents pour leur amour et leur intérêt pour mon travail.

Et enfin, Yannick, mon amour, qui c'est presque autant que moi passionné pour cette thèse. Je te remercie d'avoir toujours été là pour m'écouter, m'encourager, me reconforter. J'ai une énorme chance d'avoir un mari qui est prêt à tout sacrifier et à tout abandonner pour me suivre, où que j'aie. Cette thèse est en grande partie la tienne.

J'exprime toute ma gratitude au Ministère de l'Education National, de la Recherche et des Technologies pour m'avoir attribué une bourse de thèse et pour m'avoir donné la possibilité d'enseigner pendant ma thèse à Polytech' Clermont-Ferrand, Université Blaise Pascal, en tant que monitrice.

INTRODUCTION	9
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	15
- CHAPITRE I - TAXONOMIE, BASES PHENOTYPIQUES ET HABITAT	19
1 - TAXONOMIE	19
2 - PRINCIPAUX CARACTERES PHENOTYPIQUES DE S. XYLOSUS	23
3 - HABITAT : S. XYLOSUS UNE BACTERIE COMMENSALE ET UBIQUITAIRE ..	25
3-1. Le commensalisme.....	25
3-2. Les produits alimentaires	26
3-2.1. <i>Le lait et les produits laitiers</i>	26
3-2.2. <i>La viande et les produits carnés fermentés</i>	27
3-2.3. <i>Les produits de la mer</i>	28
- CHAPITRE II - L'AMBIVALENCE DE L'ESPECE S. XYLOSUS	31
1 - UNE ESPECE A FORT INTERET TECHNOLOGIQUE	31
1-1. Son rôle dans l'élaboration des caractéristiques sensorielles.....	31
1-1.1. <i>La dégradation des glucides</i>	32
1-1.2. <i>Le catabolisme des acides aminés</i>	32
1-1.3. <i>La dégradation des lipides</i>	33
1-1.4. <i>L'oxydation des acides gras</i>	34
1-1.5. <i>L'activité nitrate réductase</i>	35
1-1.6. <i>La synthèse de pigments</i>	35
1-2. Utilisation comme agent recombinant pour des applications biotechnologiques	36
1-2.1. <i>Développement de vaccins oraux</i>	36
1-2.2. <i>Essais de production d'anticorps</i>	36
1-2.3. <i>Utilisation comme futurs bioabsorbants ou biosenseurs?</i>	37
1-3. Un dépolluant efficace?	37
2 - ...MAIS DES SOUCHES A RISQUE	38
2-1. Les facteurs de risque.....	38
2-1.1. <i>La production de toxines</i>	38
2-1.2. <i>La formation de biofilm</i>	39
2-1.3. <i>La multirésistance aux antibiotiques</i>	41
2-2. Les mammites	42
2-3. Les dermites	44
2-4. Les infections humaines.....	45
- CHAPITRE 3 - CONNAISSANCES GENETIQUES SUR S. XYLOSUS	47
1 - METABOLISME DES HYDRATES DE CARBONE	47
1-1. Les hydrates de carbone catabolisés par <i>S. xylosus</i>	48
1-2. La glycolyse	48
1-3. Le système phosphotransférase (PTS)	49
1-4. Le glucose	50
1-5. Le saccharose	52

1-6. Le xylose.....	53
1-7. Le maltose.....	55
1-8. Le mannitol.....	56
1-9. Le lactose et le galactose.....	57
1-10. La répression catabolique du carbone.....	59
1-10.1. <i>L'induction spécifique par le carbohydrate</i>	59
1-10.2. <i>Le contrôle transcriptionnel par des régulateurs globaux</i>	61
2 - METABOLISME DES ACIDES AMINES	63
2-1. La sérine transférase	64
2-2. L'assimilation et la conversion de la choline.....	65
2-3. L'uréase.....	67
3 - METABOLISME DES LIPIDES.....	67
4 - PROPRIETES ANTI-OXYDANTES	70
4-1. La superoxyde dismutase	70
4-2. La catalase.....	71
5 - PROTEINES DE L'ENVELOPPE	73
5-1. La protéine FemA	73
5-2. La protéine MprF	75
5-3. La protéine DltA	75
5-4. La protéine Bap.....	77
6 - CONTENU PLASMIDIQUE	80
6-1. La région de réplication	80
6-2. La résistance à l'arsenite, l'arsenate et l'antimonite	81
RESULTATS	83
DIVERSITE PHENOTYPIQUE DE <i>S. XYLOSUS</i>	85
CARACTERISTIQUES GENERALES.....	87
CONTEXTE.....	88
MATERIELS ET METHODES.....	89
RESULTATS	92
Article n°1 : Ability of <i>Staphylococcus xylosus</i> to spread on soft agar surfaces	
CONTEXTE.....	98
RESULTATS	98
DIVERSITE GENETIQUE DE <i>S. XYLOSUS</i>	121
Article n°2 : Physical and genetic map of the <i>Staphylococcus xylosus</i> C2a chromosome	
PROBLEMATIQUE.....	125
RESULTATS	125
RESULTATS COMPLEMENTAIRES	127
Article n°3 : Genomic diversity in <i>Staphylococcus xylosus</i> species	
PROBLEMATIQUE.....	142

RESULTATS	143
RESULTATS SUPPLEMENTAIRES	145
DISCUSSION	183
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	189
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	203
TRAVAUX SCIENTIFIQUES.....	223

INTRODUCTION

Ubiquitaires, les staphylocoques sont commensaux des épithéliums des hommes et des animaux. L'espèce la plus connue est *Staphylococcus aureus*, responsable de nombreuses infections. Deux autres espèces sont également fréquemment associées à des pathologies, *Staphylococcus epidermidis*, responsable d'infections nosocomiales et *Staphylococcus saprophyticus* impliqué dans des infections urinaires chez l'homme. La plupart des trente sept autres espèces appartenant au genre *Staphylococcus* sont des bactéries de l'environnement qui persistent sur leurs hôtes dans un silence relatif, mais qui, dans des circonstances particulières, peuvent être responsables d'infections. Cependant, on ne sait que trop peu, que les staphylocoques sont naturellement présents dans notre alimentation et que de nombreux produits fermentés d'origine animale en contiennent. Certaines espèces participent activement au processus de fermentation et présentent un intérêt technologique. *Staphylococcus xylosus* est l'espèce la plus couramment utilisée comme ferment en co-culture avec des bactéries lactiques ou un autre staphylocoque, *Staphylococcus carnosus*.

S. xylosus appartient au vaste groupe des staphylocoques à coagulase négative et au groupe d'espèce de *S. saprophyticus*. C'est une bactérie commensale de la peau des petits mammifères et des animaux de ferme, où elle constitue la flore majoritaire. On retrouve également cette espèce sur la peau de l'homme mais son occurrence reste peu importante. *S. xylosus* est retrouvé naturellement au niveau des matières premières d'origine animale et colonise l'environnement des ateliers agro-alimentaire. Cette espèce a la capacité de former des biofilms, possède peu d'exigences nutritionnelles et est capable de s'adapter à des environnements variés ce qui lui permet de coloniser nos aliments. Des souches de *S. xylosus* sont rajoutées comme ferment pour la fabrication des saucissons mais également comme microflore de surface pour les viandes séchées et les fromages dits «à caractère» comme le Munster. Les propriétés technologiques de cette espèce sont diverses. Cette bactérie joue un rôle majeur dans le développement de la saveur et de la couleur des produits fermentés. Elle synthétise des arômes via une activité lipolytique et le catabolisme des acides aminés, notamment ceux à chaîne latérale ramifiée. Ses propriétés anti-oxydantes permettent de limiter le rancissement. Son activité nitrate réductase joue un rôle fondamental dans le développement de la couleur rouge des produits carnés fermentés. La majorité des souches est pigmentée en orange d'où son utilisation comme flore de surface de fromage. Toutes ces propriétés ont fait que, cette bactérie a essentiellement été étudiée pour ses activités métaboliques.

Si *S. xylosus* est considéré comme une espèce utile et profitable, quelques souches pourraient présenter un risque potentiel. En effet, des souches isolées de produits alimentaires se sont montrées capables de produire des entérotoxines C, D ou E, plus habituellement associées à *S. aureus*. D'autres souches ont été isolées de cas d'infections opportunistes chez l'animal telles que des mammites chez des ruminants ou encore des dermatites chez des souris. Quelques rares cas d'infections nosocomiales à *S. xylosus* ont également été relatés chez l'homme.

***S. xylosus*, bonne petite ouvrière ou bactérie à risque ?**

Il est important de pouvoir identifier les risques potentiels et de pouvoir différencier les souches de l'alimentation des souches isolées d'infections.

S. xylosus est virtuellement considéré comme non pathogène. En effet, son utilisation comme ferment est empirique comme c'est le cas pour beaucoup de ferments bactériens. Or, les ferments sont directement concernés par les initiatives de normalisation réglementaire de l'union européenne et la mise en application du concept QPS de présomption raisonnable de la sûreté des micro-organismes (QPS pour « Qualified Presumption of Safety »). Les fabricants de ferments vont donc être soumis à l'obligation de contrôler l'innocuité de leurs souches. Dans ce contexte, l'utilisation des outils de biologie moléculaire est considérée comme primordiale pour assurer l'identification et la sûreté des souches. Il est donc indispensable d'avoir une bonne connaissance génétique des espèces utilisées comme ferment. Les données génétiques recueillies pourront également permettre d'améliorer les connaissances sur les propriétés technologiques des micro-organismes ainsi que sur leur adaptabilité aux conditions de fabrication, favorisant donc par la même la sélection de souches d'intérêt alimentaire.

Si *S. xylosus* a été bien caractérisé d'un point de vue phénotypique sur la base de ses propriétés technologiques, il n'est actuellement que très peu étudié d'un point de vue génétique. La majorité des données concerne les gènes impliqués dans le métabolisme des sucres, des acides aminés, les propriétés anti-oxydantes, ainsi que quelques gènes codant des protéines de l'enveloppe. Dans ce contexte, nous avons entrepris d'établir la première carte physique et génétique d'une souche de *S. xylosus* afin d'avoir une première idée de l'organisation globale du génome d'un *S. xylosus*. La souche choisie pour cette étude est la souche modèle *S. xylosus* C2a. Elle est le dérivé curé du plasmide pSX267 de la souche de référence DSM20267 commensale de la peau humaine. La souche C2a est actuellement la

seule souche de *S. xylosus* qui peut être transformée avec une efficacité suffisante pour introduire des plasmides et construire des mutants par recombinaison chromosomique. Dans un second temps, nous nous sommes attachés à caractériser la diversité phénotypique et génotypique au sein de l'espèce *S. xylosus* dans le but de déchiffrer la versatilité de cette bactérie.

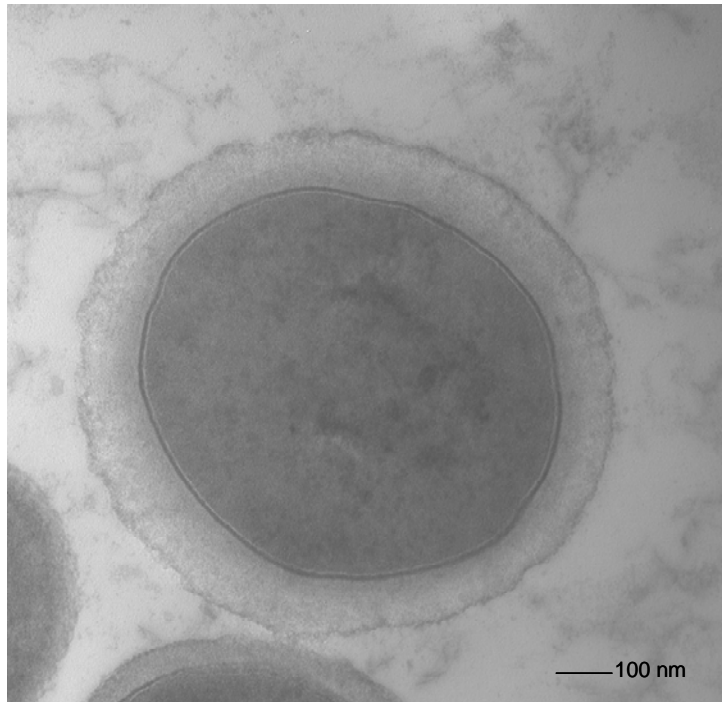
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Staphylococcus xylosus

Σταφιλη χοχο ξυλον οζ

Staphylê kokkos xulon ose (grec)

Grappe de raisin grain bois sucre



S. xylosus : observation en microscopie électronique à transmission après coloration au rouge de ruthénium

Staphylococcus xylosus est une bactérie à Gram positif, en forme de coque, appartenant au genre *Staphylococcus*. Une de ses particularités, comme son nom l'indique est de métaboliser le xylose, communément appelé le sucre du bois.

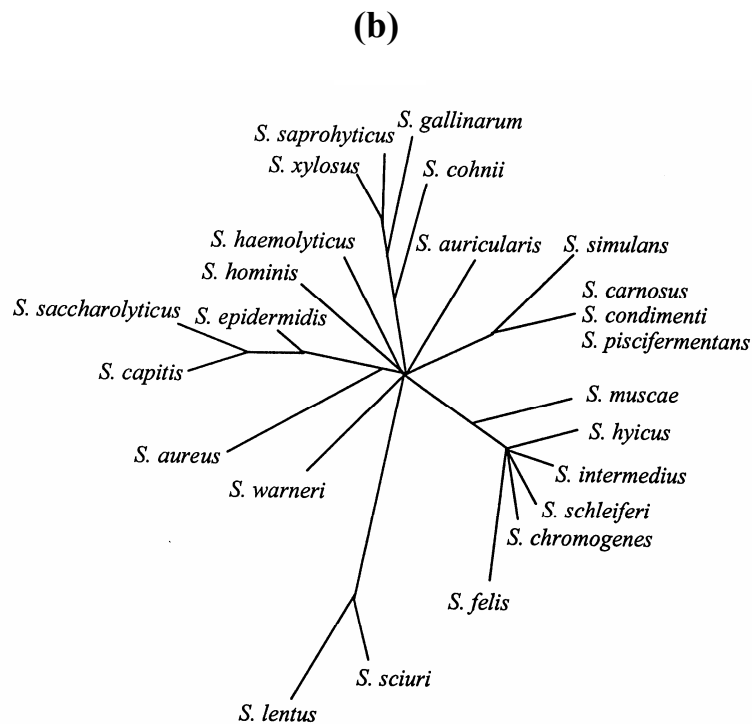
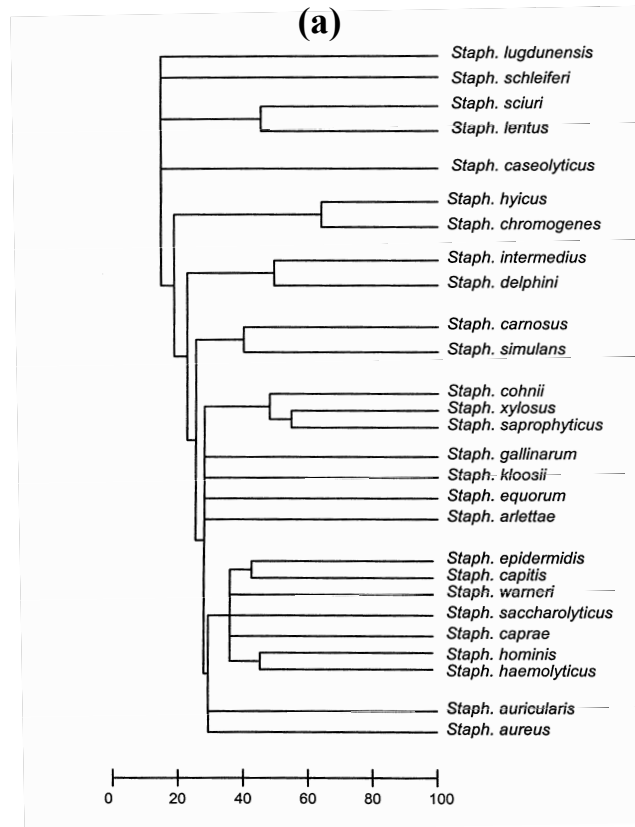


Figure 1 : Relations phylogénétiques des différentes espèces du genre *Staphylococcus* (Witte *et al.*, 2006)

(a) : déduites des hybridations ADN-ADN ; (b) : déduites de la séquence des ADNr 16S

- CHAPITRE I - TAXONOMIE, BASES PHÉNOTYPIQUES ET HABITAT

1 - TAXONOMIE

Dans l'édition 1986 du « Bergey's Manual of Systematic Bacteriology » (Volume 2), le genre *Staphylococcus* est classé dans la famille des *Micrococcaceae*, constituée des genres *Micrococcus*, *Stomatococcus*, *Planococcus* et *Staphylococcus*. Depuis 1976, les premiers résultats d'application des techniques génomiques, situant les espèces et les genres décrits dans un contexte d'évolution phylogénique (contenu en bases G-C, hybridation ADN/ADN, séquences des ADNr 16S et 23S), ainsi que l'analyse des parois, suggéraient que ces genres devaient être reclassés dans différentes familles. Plusieurs analyses de la séquence des ADNr 16S et 23S ont montré l'existence d'un groupe taxonomique unique regroupant les staphylocoques. Ce groupe est proche des genres *Enterococcus*, *Bacillus*, *Listeria*, *Planococcus* et *Brochotrix* (groupe *Bacillus-Lactobacillus-Streptococcus*). Le genre *Staphylococcus* appartient désormais au phylum XIII des Firmicutes, dans la classe III des *Bacilli* et l'ordre I des *Bacillales* (Euzéby, <http://www.bacdico.net/>).

Les staphylocoques sont des cocci à Gram positif, qui se présentent, en observation microscopique, isolés, en diplocoques, en courtes chaînettes ou en amas (les amas étant les plus caractéristiques, les staphylocoques se divisant selon deux plans). Ces coques sont non mobiles, asporulés et habituellement non capsulés. La plupart des espèces sont à catalase positive et aéro-anaérobies facultatives, à l'exception de *S. saccharolyticus* et *S. aureus* subsp. *anaerobius* qui sont anaérobies strictes.

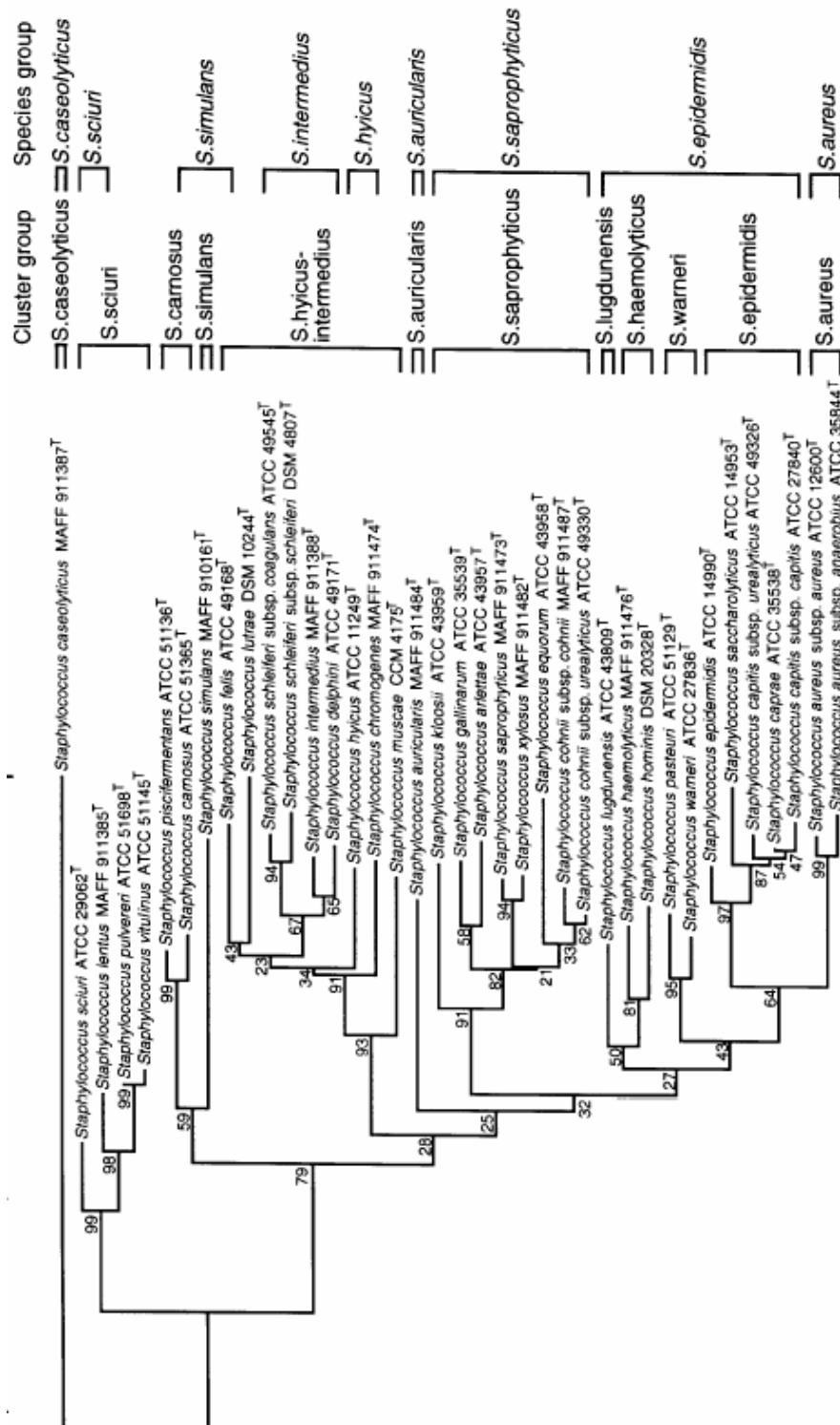


Figure 2 : Arbre phylogénétique basé sur les séquences des gènes codant les ARNr 16S montrant les relations génétiques entre les différentes espèces du genre *Staphylococcus* (Takahashi *et al.*, 1999)

Les chiffres correspondent au niveau de confiance estimé par l'analyse bootstrap et sont exprimés en pourcentage. Le « Cluster group » correspond aux groupes d'espèce déterminés par Takahashi, et al (1999) sur la base des homologues de séquence des gènes codant les ARNr 16S. Le « species group » correspond aux groupes d'espèce décrits par (Kloos & Schleifer, 1986).

Le genre *Staphylococcus* comprend actuellement 40 espèces et 24 sous-espèces (Euzéby, <http://www.bacdicto.net/>). Comme pour les autres micro-organismes, la spéciation des staphylocoques a d'abord été basée sur les données morphologiques, les propriétés physiologiques et la composition de la paroi cellulaire (Kloos & Schleifer, 1986). La présence d'une coagulase, enzyme coagulant le plasma sanguin, a permis la distinction de 2 groupes : le groupe des staphylocoques à coagulase positive (SCP) qui comprend *Staphylococcus aureus*, *S. delphini*, *S. hyicus*, *S. intermedius*, *S. lutrae*, *S. pseudointermedius*, *S. schleiferi subsp. coagulans*, et les staphylocoques à coagulase négative (SCN), groupe plus vaste qui comprend une trentaine d'espèces. Les autres caractéristiques taxonomiques employées habituellement pour différencier les espèces au sein d'un genre bactérien, telles que la formation d'acide à partir des hydrates de carbone, la présence des protéines associées à la formation de la paroi cellulaire, les enzymes extracellulaires et les toxines sont, dans le cas du genre *Staphylococcus*, très instables et s'avèrent inefficaces pour distinguer les différentes espèces. Cette variabilité importante des phénotypes au sein du genre est vraisemblablement due à des réarrangements génomiques ou à l'acquisition ou la perte d'éléments génétiques. Le développement des méthodes moléculaires et en premier lieu de l'hybridation ADN-ADN, ont permis de montrer que les staphylocoques formaient un genre bien défini qui pouvait être ensuite divisé en plusieurs groupes d'espèce (Figure 1a). Au niveau épigénique (caractérisation de la catalase, de l'aldolase ou de la L- ou D-lactate déshydrogénase) (Schleifer & Kroppenstedt, 1990) et par l'analyse des séquences des ADNr 16S et 23S (Ludwig & Schleifer, 1994), cette classification a été confirmée (Figure 1b). *S. xylosus* appartient au groupe *S. saprophyticus* (Takahashi *et al.*, 1999). En effet, en se basant à la fois sur l'analyse d'hybridations ADN-ADN et l'homologie des séquences des gènes codant l'ARNr 16S, *S. xylosus* est génétiquement proche des espèces *S. saprophyticus*, *S. cohnii subsp. cohnii* et *subsp. urealyticus*, *S. equorum*, *S. arlettae*, *S. gallinarum*, et *S. kloosii* (Figure 2). Des analyses d'hybridation ADN-ADN ont montré qu'il existait deux groupes génétiques distincts au sein de l'espèce *S. xylosus* (Kloos & Schleifer, 1986). Le premier groupe comprenait des souches isolées d'hommes ou d'animaux possédant une homologie de l'ADN de plus de 70%, dans des conditions stringentes ou optimales de réassociation. Le deuxième groupe comprenait uniquement des souches isolées de singes qui étaient génétiquement très différentes. Dans des conditions stringentes, uniquement 38-39% de l'ADN se sont réassociés avec le groupe majoritaire des souches de *S. xylosus* isolées d'hommes ou d'animaux (Kloos & Schleifer, 1986).

Tableau 1 : Caractéristiques phénotypiques de l'espèce *S. xylosus* (Schleifer & Kloos, 1975 ; Kloos & Schleifer, 1986)

Caractéristiques	<i>S. xylosus</i>
Diamètre de la colonie > 5 mm	+ ^a
Pigmentation de la colonie : caroténoïdes	d ^b
Croissance aérobie	+
Croissance anaérobie sur thioglycolate	d
Croissance en NaCl 10%	+
Croissance en NaCl 15%	d
Cytochrome c (test oxydase)	- ^c
Acide lactique isomère L	w ^d
Acide lactique isomère D	-w ^e
Production d'acétoïnes	d
FDP-aldolase class I	+
FDP-aldolase class II	-
Production d'acide en aérobie:	
D-xvlose	+
L-Arabinose	+
D-Cellobiose	-
D-Fucose	-
Raffinose	-
Salicine	d
Saccharose	+
Maltose	+
D-Mannitol	d
D-Mannose	+
D-Tréhalose	+
α-Lactose	d
D-Galactose	d
β-D-Fructose	+
D-Mélicitose	-
β-Gentiobiose	+
D-Turanose	d
D-Ribose	d
Xylitol	-w
Croissance avec (NH ₄) ₂ SO ₄ (seule source) d'azote	+
Réduction du nitrate	d
Phosphatase alcaline	d
Arginine dihydrolase	-
Uréase	+
Coagulase (plasma de lapin)	-
Clumping factor	-
Hémolyse	-w
Désoxyribonucléase (Dnase agar)	-w
Nucléase Thermorésistante	-
β-glucosidase	+
β-glucuronidase	d
β-galactosidase	+
Résistance à la novobiocine	+

^a +, 90% ou plus de souches positives; ^bd, 11-89% de souches positives; ^c 90% ou plus de souches négatives; ^dw, réaction faible; ^e -w, réaction faible à négative.

2 - PRINCIPAUX CARACTERES PHENOTYPIQUES DE *S. XYLOSUS*

S. xylosus a été isolé pour la première fois de la peau humaine par Schleifer et Kloos (1975). Les auteurs avaient réalisé une série de prélèvements sur la peau d'une quarantaine d'individus et après analyse des isolats par différents tests morphologiques, physiologiques, chimiques et biochimiques, ils ont distingué 7 nouvelles espèces de staphylocoques. La description de l'espèce *S. xylosus* a été basée sur un total de 102 souches isolées présentant les mêmes caractéristiques dont les principales sont présentées dans le Tableau 1. *S. xylosus* est phénotypiquement distinguable des autres staphylocoques par, tout d'abord, son profil de fermentation des hydrates de carbone. En effet, cette bactérie aérobie-anaérobie facultative, contrairement à la plupart des autres staphylocoques, fermente le xylose, l'arabinose et le β -gentiobiose. *S. xylosus* possède également une composition membranaire particulière puisque son peptidoglycane est de type L-Lys-Gly₅₋₆ et son acide teichoïque contient de la glucosamine et deux polyols : le glycérol et le ribitol. Seuls *S. xylosus* et *S. cohnii* possèdent un peptidoglycane de ce type et seuls *S. xylosus* et *S. saprophyticus* ont un acide teichoïque de ce type. Ceci conforte la parenté génétique de *S. xylosus* au groupe *S. saprophyticus* (Figure 2). Autre caractéristique de *S. xylosus*, sa capacité à croître dans une large gamme de températures. Toutes les souches se développent à une température de 15°C jusqu'à des températures inférieures à 45°C. De moindre importance pour l'identification de *S. xylosus*, mais à noter, la majorité des souches (80%) est capable de réduire le nitrate et produit une phosphatase alcaline. Toutes les souches de *S. xylosus* sont résistantes à la novobiocine comme toutes les espèces appartenant au groupe d'espèce de *S. saprophyticus* et produisent peu d'acide en condition de culture anaérobie. Enfin 80% des souches de *S. xylosus* sont pigmentées présentant une couleur orangée, les autres souches présentent, quant à elles, une couleur jaune-beige claire. Parfois, des différences d'intensité ou de pigmentation sont présentes au sein d'un même isolat. Certaines souches de *S. xylosus* peuvent ne pas être pigmentées à une température de 35-37°C, mais développer un pigment intense à des températures inférieures à 20°C. Les caractères phénotypiques variables au sein de l'espèce sont présentés dans le Tableau 2.

Tableau 2 : Caractères phénotypiques variables de 22 souches de *S. xylosus* (Schleifer & Kloos, 1975)

Souches	mol % G+C	Pigmentation des colonies ^a	Croissance anaérobie en thioglycolate ^b	Fermentation anaérobie du glucose (pH final)	Production d'acide L-lactique (%)	Croissance à 45°C ^c	Production d'acétyl methyl-carbinol	Réduction du nitrate	Phosphatase	Production d'acide ^d en aérobie à partir de				Peptidoglycane (mol/mol de Glu) ^e	
										Mtl	Ara	Xyl	Rib	Gly	Ser
DSM20266	36,2	yo	+	5	95	-	-	+	+	+	+	+	-	5,1	-
DSM20267	34,6	yo	+	5,1	94	-	±	+	+	+	+	+	+	5,2	-
DSM20268	35,2	gy	+	5,1	90	-	-	+	+	+	+	+	+	5,5	-
DM 37	35,2	yo	+	4,9	88	-	±	+	+	+	+	±	±	4,9	-
DM 30		gy	+	5	85	-	±	+	-	+	+	±	±	4,9	-
SM212		y	+	4,9	91	±	±	+	-	+	-	+	+	5,5	-
SM 247		gw	+	5	95	-	±	+	+	+	+	+	+	5	-
TW 41		yo	+	5,2	91	-	±	+	+	+	+	+	-	5,3	-
TW 83		yo	±C	5	82	-	-	+	+	+	+	+	-	5,6	-
TW 54		yt	+	5,1	100	-	±	+	+	+	+	±	±	5,2	0,1
AW 124	35,6	y	+	4,9	88	-	±	+	+	+	+	+	+	5,4	-
KH 168		yo	±	5	71	±	+	+	+	+	+	+	+	5,3	-
GH 30	34,8	gy	+	4,9	84	-	-	+	+	+	+	+	-	5	-
SL 114		yo	+	5	87	-	±	+	+	+	+	+	-	5	-
SE 4		gy	+	5,1	100	-	+	+	+	+	+	+	+	5,6	-
DM 172		gw	+	5,1	83	-	±	+	+	+	+	+	-	5,6	-
SM 159		gw	+	5,1	80	-	+	+	+	+	+	+	+	5,7	-
KL 236		gy	+	5,4	85	-	±	+	+	+	+	±	±	5,2	-
KL 117		yt	+	5,1	85	-	-	+	+	+	+	±	±	5,1	-
AW 244		yo	+	5,3	82	-	-	-	+	+	-	+	-	5,4	-
CCM 1400	30,2	gw	-C	5,6	70	-	-	+	ND	+	+	+	+	5,3	-
CCM 2210	32	gw	-C	5,5	70	-	-	+	ND	+	+	+	+	5,2	-

^a Symbole des pigments : y, jaune, gw, gris-blanc ; gy, gris-jaune ; yt, teinte jaunâtre ; yo, jaune orange.

^b Symbole pour les conditions de culture aérobie : +, uniformément dense ; ± gradient de croissance de dense à moins concentré en profondeur dans la portion la plus anaérobie; ±C, gradient, plus des colonies individuelles ; -C, uniquement des colonies individuelles ; -, pas de croissance

^c Réaction : + positive; ±, faible; -, négative; ND, non déterminé

^d Abréviation des hydrates de carbone : Ara, arabinose ; Mtl, mannitol ; Rib, ribose ; Xyl, xylose.

^e Rapport molécule par molécule de glucosamine.

3 - HABITAT : *S. XYLOSUS* UNE BACTERIE COMMENSALE ET UBIQUITAIRE

3-1. Le commensalisme

Comme d'autres bactéries du genre *Staphylococcus*, *S. xylosus* est une espèce commensale de l'épithélium et des muqueuses des animaux et plus particulièrement des mammifères. Comme nous l'avons déjà mentionné, cette espèce a été isolée pour la première fois à partir de peaux et de muqueuses humaines mais son occurrence chez l'homme et les grands primates reste peu importante par rapport à d'autres espèces de staphylocoques telle que *S. epidermidis* (Kloos & Musselwhite, 1975 ; Carr & Kloos, 1977 ; Nagase *et al.*, 2002). C'est chez les petits mammifères et les animaux de ferme que *S. xylosus* est décrit comme espèce majoritaire de la flore staphylococcique (Kloos *et al.*, 1976 ; Nagase *et al.*, 2002). Il est présent chez une large variété d'espèce animale (porc, mouton, cheval, vache, poule, chien, écureuil, pigeon, souris, opossum, raton laveur, outarde, grenouille) (Kloos *et al.*, 1976 ; Slaughter *et al.*, 2001 ; Silvanose *et al.*, 2001 ; Nagase *et al.*, 2002), avec un fort pourcentage d'isolats chez les petits rongeurs (écureuils, souris) et les animaux de fermes (moutons, chevaux, vaches, poules) (Tableau 3a et 3b). Selon Kloos *et al* (1976), c'est l'incapacité de *S. xylosus* à s'adapter à l'acidité qui explique sa faible occurrence sur la peau humaine. En laboratoire, *S. xylosus* montre des difficultés à croître sur des milieux dont le pH est inférieur à 5,3, or le pH de la peau humaine est de 5 alors que le pH de la peau des animaux est évalué à environ 7. Selon ces auteurs, les souches de *S. xylosus* isolées de la peau humaine correspondraient plus à une contamination par les animaux domestiques qu'à une vraie colonisation.

Tableau 3 : Occurrence de *S. xylosus* sur la peau de différentes espèces animales et de l'homme

(a)

	Ecureuils	Ecureuils volants	Ratons laveurs	Opossums	Saimiris	Porcs	Moutons	Chevaux	Vaches	Chiens	Hommes
Nombre d'individus	14	5	3	11	2	8	5	4	5	2	80
% d'individus porteurs de <i>S. xylosus</i>	64 ^b	100	33	36	0	12	100	100	100	50	42

d'après Kloos *et al.* 1976

(b)

	Porcs	Chevaux	Vaches	Poules	Chiens	Souris de laboratoire	Pigeons	Hommes
Nombre d'individus	12	17	30	73	10	23	20	80
% d'individus porteurs de <i>S. xylosus</i>	25	23,5	37	38	10	69,5	40	2,5

d'après Nagase *et al.* 2002

Des études sur la localisation de *S. xylosus* chez les bovins ont montré que cette espèce était plus particulièrement retrouvée sur les glandes mammaires et par conséquent également sur la peau de 37% des jeunes veaux (Skalka, 1991 ; Nagase *et al.*, 2002). Chez l'homme, dans les études menées par Kloos *et al.* (1976), cette espèce semble être retrouvée plus fréquemment sur la peau que sur les muqueuses, mais il n'existe actuellement aucune donnée précise sur le portage de *S. xylosus* chez les hommes et les animaux. *S. xylosus* a également été retrouvé sur la peau de 14 % des jeunes enfants et une augmentation apparente de sa prévalence en fonction de l'âge a été observée, 0% chez des enfants de 1 jour et en augmentation constante jusqu'à 35% chez des enfants de 20 à 32 semaines (Carr & Kloos, 1977).

3-2. Les produits alimentaires

La forte présence de l'espèce *S. xylosus* sur la peau des animaux de ferme pourrait expliquer sa forte prévalence dans les produits carnés et laitiers naturellement fermentés.

3-2.1. Le lait et les produits laitiers

Plusieurs études se sont intéressées à la présence des SCN dans le lait des animaux de ferme afin de rechercher leur implication potentielle dans une infection à fort préjudice pour l'industrie laitière, les mammites. C'est ainsi que de nombreux dénombrements de la flore staphylococcique dans différents types de laits ont été réalisés. *S. xylosus* a été trouvé à la fois dans le lait de vache, de chèvre, et de brebis (Deinhofer & Pernthaner, 1995 ; Ariznabarreta *et al.*, 2002 ; Ben Hassen *et al.*, 2003 ; Hariharan *et al.*, 2004), mais sa prévalence reste assez faible (2-3% en moyenne) dans les 3 types de lait. Seuls Vernozy-Rozand *et al.* (1996) retrouvent *S. xylosus* comme flore majoritaire (plus de 33%) dans le lait de chèvre. Irlinger *et al.* (1997) ont montré que les SCN endogènes du lait participent activement à la fermentation de fromages fermiers, comme le Munster ou le Livarot,

fromages à croûte lavée ou le Camembert, fromage à croûte fleurie. L'analyse de la flore de surface de 25 types de fromages traditionnels français a révélé que *S. xylosus* (11% des isolats) était une des espèces majoritaires dans ces fromages, après *S. equorum* (61%) et *S. vitulinus* (13,5%). Dans d'autres types de fromages, comme le fromage espagnol « Cásar de Cáceres » à pâte pressée non cuite, 65 % des isolats étaient des *S. xylosus* (Caceres *et al.*, 1997). *S. xylosus* a également été retrouvé (44,4% des isolats) dans différents types de fromages industriels (fromage bleu, Mozzarella, Camembert, cottage cheese) issus de lait pasteurisé (De Luca *et al.*, 1997 ; Addis *et al.*, 2001). Un effet saisonnier a été montré, avec une plus forte occurrence de cette espèce dans les fromages de la période d'octobre à mars. Lors de l'affinage de certains fromages « à caractère » comme le Munster, l'ajout de *S. xylosus* comme ferment est largement utilisé, notamment comme nous le verrons par la suite, pour les propriétés aromatiques de cette espèce ainsi que pour sa pigmentation orangée.

3-2.2. La viande et les produits carnés fermentés

S. xylosus fait partie de la micro-flore indigène de la peau des mammifères, et de ce fait, constitue la micro-flore naturelle de la viande. Il est également retrouvé à la fin des processus de transformation dans les produits carnés fermentés. Shale *et al.* (2005) ont montré que la présence de staphylocoques tel que *S. xylosus* sur la viande de bœuf en sortie d'abattoir était dépendante en grande partie des conditions d'abattage et de manutention. Dans les produits carnés frais, *S. xylosus* a été isolé de saucisses fraîches nonensemencées de porc, stockées à 4°C. Cette espèce représentait 48% des isolats (Cocolin *et al.*, 2004 ; Rantsiou *et al.*, 2005). L'écologie de *S. xylosus* dans les produits de salaison a été particulièrement étudiée. En effet, *S. xylosus* constitue un des principaux ferments utilisés en co-culture avec les bactéries lactiques dans les produits carnés fermentés et il est naturellement présent dans les produits de salaison nonensemencés.

Dans les ateliers industriels de fabrication de saucissons où *S. xylosus* est utilisé comme ferment, il reste majoritaire quel que soit le stade de fermentation, montrant une bonne adaptation de la bactérie aux différents processus de fabrication (Blaiotta *et al.*, 2004 ; Corbiere Morot-Bizot *et al.*, 2007). Dans les produits de salaisons traditionnels, c'est-à-dire nonensemencés, *S. xylosus* est très souvent décrite comme l'espèce majoritaire dans les produits finis. Il est très souvent isolé des saucissons français (Montel *et al.*, 1992), italiens (Rebecchi *et al.*, 1998 ; Cocolin *et al.*, 2001 ; Blaiotta *et al.*, 2004) et espagnols (Martin *et al.*, 2006), ainsi que dans le chorizo (Garcia *et al.*, 1980 ; Aymerich *et al.*,

2003) et le jambon cru (Rodriguez M *et al.*, 1994 ; Vilar *et al.*, 2000 ; Cordero & Zumalacarregui, 2000). Des études de suivi de *S. xylosus* au cours des procédés de fabrication de saucissons traditionnels ont été réalisées. *S. xylosus*, naturellement présent sur le produit au début du stade de fermentation, s'adapte très bien aux procédés de fabrications traditionnelles, et reste dans 2 des 3 ateliers testés, l'espèce majoritaire (plus de 50%), tout au long du stade de fermentation. Dans le cas du jambon cru ibérique, il a été démontré que la saumure était la principale source de la flore staphylococcique isolée en surface. *S. xylosus* représentait 29% des isolats issus de cette saumure (Cordero & Zumalacarregui, 2000). Une autre étude plus complète sur la flore staphylococcique, aux différents stades de fabrication des jambons crus, a montré que *S. xylosus* était l'espèce majoritairement présente sur la surface de la viande crue (32% des isolats) alors qu'au cœur des échantillons, elle représentait 12% des isolats. Après salage, 16% des isolats étaient des souches de *S. xylosus* en surface et 8% au cœur des jambons. Enfin, sur les jambons en fin de sèche, 16% des isolats de la surface correspondaient à *S. xylosus* (Vilar *et al.*, 2000). Aucun *S. xylosus* à la fin du procédé de fabrication n'a été retrouvé au cœur du produit, montrant ainsi une meilleure adaptation de cette espèce à des milieux aérobies.

3-2.3. Les produits de la mer

La présence de *S. xylosus* lors du processus de fermentation d'un poisson nommé « cassava » a récemment été décrite (Anihouvi *et al.*, 2007). Cette fermentation aboutit à un condiment le *lanhouin* couramment utilisé dans certains pays d'Afrique. Parmi les staphylocoques isolés, 34,1% étaient des *S. xylosus*, l'espèce majoritaire étant *S. lentus* (51.2%). Ces deux espèces ont été retrouvées à tous les stades de la fermentation du *lahouin* (Anihouvi *et al.*, 2007). *S. xylosus* a également été retrouvé comme une des espèces microbiennes majoritaire chez des crevettes d'élevage, plus précisément au niveau des spermatophores (Nimrat *et al.*, 2006).

En conclusion, *S. xylosus* est fréquemment retrouvé en portage chez de nombreux animaux et est présent chez une grande variété de produits alimentaires d'origine animale. De plus, cette espèce est trouvée au niveau des surfaces et des sols, et dans les environnements agro-alimentaires (Kloos & Schleifer, 1986 ; Corbiere Morot-Bizot *et al.*, 2006). *S. xylosus* est aussi décrite comme l'espèce majoritaire du fourrage combiné où elle est retrouvée dans chacun des éléments qui le composent, grains et plants de céréales verts, mais aussi dans les échantillons de sol et de poussière des lieux de fabrication (Pioch *et al.*, 1988). Enfin, la présence de *S. xylosus* dans des eaux polluées à Fez au Maroc a également été relatée (Kessie *et al.*, 1998).

S. xylosus est donc une espèce ubiquitaire et commensale que l'on retrouve tout le long de la chaîne alimentaire **«de la fourche à la fourchette»**.

- CHAPITRE II -

L'AMBIVALENCE DE L'ESPÈCE

S. XYLOSUS

Depuis sa découverte en 1975, *S. xylosus* a suscité un vif intérêt chez les industriels de l'agroalimentaire pour une utilisation en tant que ferment. Ce staphylocoque, naturellement présent dans les matières premières d'origine animale, possède des propriétés technologiques intéressantes et participe activement à leur fermentation. Cependant, depuis quelques années, quelques souches ont été isolées dans des infections opportunistes chez des animaux et chez l'homme, introduisant un doute sur les souches utilisées dans l'alimentation.

1 - UNE ESPECE A FORT INTERET TECHNOLOGIQUE...

1-1. Son rôle dans l'élaboration des caractéristiques sensorielles

Caractéristique organoleptique très recherchée, la flaveur englobe les notions de goût, d'arôme et d'odeur. Elle est le résultat d'un équilibre entre les composés volatils et non volatils interagissant entre eux et avec les protéines et les lipides. La flaveur est à la fois due à la matière première et aux ingrédients ajoutés (épices, ail...) mais elle est également le résultat du catabolisme des hydrates de carbone, des protéines et des lipides et de réactions chimiques. Il est souvent difficile de distinguer l'origine des enzymes responsables de ces dégradations, origine tissulaire ou microbienne, ainsi que de déterminer l'origine de certains composés (Talon *et al.*, 2002). *S. xylosus* participe à la flaveur principalement grâce au catabolisme des glucides, des acides aminés, des lipides et des acides gras (Olesen *et al.*, 2004). Autre caractéristique ayant un attrait pour le consommateur, la couleur du produit. *S. xylosus* contribue à cette caractéristique via son activité nitrate réductase et la synthèse de pigments.

1-1.1. La dégradation des glucides

Le métabolisme des glucides est assez bien caractérisé chez *S. xylosus*. Le glucose est le sucre préférentiellement utilisé par cette espèce (Brückner & Rosenstein, 2006). En conditions anaérobies, *S. xylosus* dégrade les glucides en acides et alcools par voie hétérofermentaire (Nychas & Arkoudelos, 1990). Le principal acide issu de la fermentation du glucose est le L-lactate, mais il n'est produit chez *S. xylosus* qu'à faible concentration. La production d'acétoïne (acétyl méthyl carbinol), qui habituellement est associée avec le diacétyl à des arômes de beurre, est très faible, voir absente, chez ce staphylocoque (Kloos & Schleifer, 1986). *S. xylosus* ne participe donc que très faiblement à la formation des arômes issus du catabolisme des hydrates de carbone.

1-1.2. Le catabolisme des acides aminés

Les acides aminés sont, dans les produits carnés fermentés, le produit de deux étapes, la protéolyse qui permet la dégradation des protéines en peptides, et le catabolisme des peptides en acides aminés. Il a été montré par Montel *et al.* (1996) que *S. xylosus* avait une faible activité protéolytique. Cette activité est principalement réalisée par les enzymes endogènes. La part de dégradation des peptides par des enzymes microbiennes n'est que de 40% (Talon *et al.*, 2002). Les staphylocoques, contrairement aux bactéries lactiques, ne contribuent que très peu à ce métabolisme. *S. xylosus* ne participe donc pas aux premières étapes du catabolisme des protéines d'origine animale (Talon *et al.*, 2002). Il a été démontré, principalement dans les produits carnés fermentés, que la flore microbienne et principalement les staphylocoques, participaient activement au catabolisme des acides aminés. Les acides aminés peuvent être transformés en molécules odorantes comme des méthyl-aldéhydes, des méthyl-acides et des méthyl-alcools (Talon *et al.*, 2002). *S. xylosus* synthétise des taux élevés de 3-méthyl butanal, qui donne une note aromatique maltée cacaotée, lorsqu'il est inoculé dans un saucisson (Stahnke, 1995). Cette molécule est un des métabolites du catabolisme des acides aminés à chaîne latérale ramifiée (leucine, valine, isoleucine). Ce catabolisme a été étudié par Beck *et al.* (2004) qui ont montré que le dérivé majeur du catabolisme de la leucine était l'acide 3-méthyl butanoïque (odeur de pied). La production de cet acide est initiée en phase stationnaire de croissance. Son précurseur immédiat est le 3-méthyl butanal, qui ne serait présent que de façon transitoire en phase exponentielle de croissance (de Vos Petersen *et al.*, 2004). Quand *S. xylosus* entre en phase stationnaire, il convertit les aldéhydes à chaîne latérale ramifiée en acides carboxyliques correspondants via un mécanisme encore hypothétique (Figure 3).

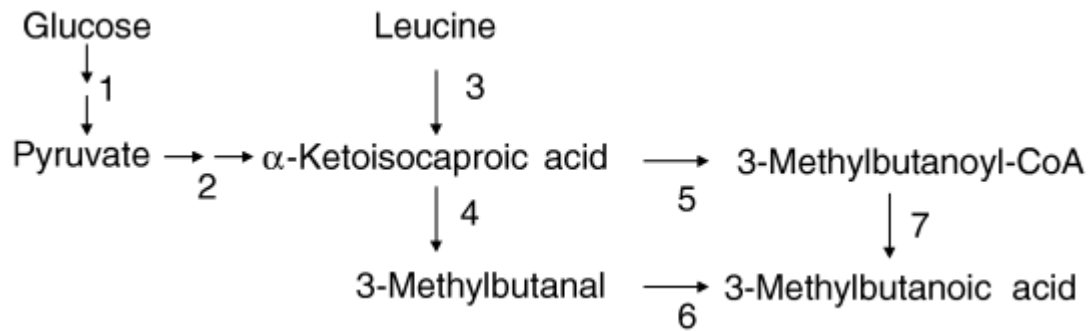


Figure 3 : Voie proposée par Beck *et al* (2004) pour la biosynthèse du 3-méthyl butanal et de l'acide 3-méthylbutanoïque à partir du glucose et de la leucine chez *S. xylosus*

Les enzymes impliquées sont les enzymes glycolytiques (1); des enzymes de la biosynthèse de l'isoleucine et de la valine (2); une transaminase (3); une décarboxylase de cétoacide à chaîne latérale ramifiée (4); une déshydrogénase de cétoacide à chaîne latérale ramifiée (5); une aldéhyde déshydrogénase (6); une acyl-CoA hydrolase ou une phosphate butyrate CoA transférase et une butyrate kinase (7)

La décarboxylation des acides aminés libres par certaines espèces bactériennes peut induire la synthèse d'amines biogènes (histamine, tyramine, putrescine, cadavérine). Consommées en excès, les amines biogènes peuvent occasionner certains troubles (maux de tête et troubles intestinaux surtout) généralement transitoires. Les souches de *S. xylosus* produisent peu ou pas d'amines biogènes, et si elles en produisent, c'est principalement de la tyramine (Martin *et al.*, 2006). Il a été montré que l'utilisation de *S. xylosus* durant la fermentation du saucisson permettait de diminuer le taux de certaines amines biogènes (histamine et tyramine) grâce à une activité amine oxydase (Martuscelli *et al.*, 2000).

1-1.3. La dégradation des lipides

La lipolyse est l'hydrolyse partielle ou complète des esters liés aux triglycérides et aux phospholipides. Elle entraîne l'augmentation de la concentration des acides gras et des diglycérides. Les lipides peuvent être hydrolysés par des lipases microbiennes ou tissulaires. Les staphylocoques sont les bactéries majoritairement impliquées dans la lipolyse microbienne. Comme nous le verrons par la suite, deux lipases différentes ont été détectées chez *S. xylosus* : GehM et SXL (chapitre III 3 -). Cette bactérie possède une activité lipolytique très active permettant la dégradation des lipides, et plus particulièrement des lipides à longue chaîne d'acides gras en acides gras libres. Cependant, cette activité ne semble pas pouvoir être optimale dans les conditions rencontrées en salaison (Kenneally *et al.*, 1998). En effet l'activité lipolytique mesurée

chez *S. xylosus* est maximale à 30°C et pH 7, or la fermentation du saucisson ou l'affinage des fromages a généralement lieu dans des gammes de pH et de températures plus basses (Talon *et al.*, 2002). Par ailleurs, les lipases tout comme les estérases sont impliquées dans la synthèse d'esters à partir d'acides et d'alcools. Les esters donnent une note fruitée aux produits (Montel *et al.*, 1996). *S. xylosus* possède aussi des estérases (Talon *et al.*, 1998). En effet, sur des tests à partir d'extraits cellulaires bruts ou de concentrés extracellulaires, il a été montré que cette espèce était capable d'estérifier des alcools et des acides pour synthétiser préférentiellement de l'éthyl butanoate. Les acides acétique et décanoïque et les acides ramifiés sont faiblement estérifiés par ce staphylocoque (Talon *et al.*, 1998). L'activité estérase de *S. xylosus* dépend du pH, de la température, mais également de la disponibilité en substrats (acides ou alcools).

1-1.4. L'oxydation des acides gras

L'oxydation des lipides, notamment dans le saucisson, est responsable de la production de composés qui peuvent altérer les qualités sensorielles et hygiéniques (Barriere *et al.*, 2001). Celle-ci peut être chimique (peroxydation) ou enzymatique (β -oxydation).

La peroxydation correspond à une réaction chimique entre les composés actifs de l'oxygène (O_2^- ; H_2O_2 ; OH^\cdot) et les acides gras insaturés. Ce processus aboutit à des hydroperoxydes, substrats pour la formation d'autres radicaux (RO^\cdot , ROO^\cdot , etc) qui se propagent par des réactions en chaîne. La condensation de deux radicaux libres entraîne la formation de produits secondaires d'oxydation (aldéhydes, alcanes, ...). Les aldéhydes, lorsqu'ils sont produits en quantité importante, altèrent les propriétés sensorielles du produit en contribuant au rancissement. Certaines bactéries jouent un rôle dans le contrôle de l'oxydation. Les propriétés anti-oxydantes de *S. xylosus* ont fait l'objet de plusieurs études. Il a été montré que différentes souches de *S. xylosus* inhibaient l'oxydation des acides gras, comme l'acide linoléique, un acide gras insaturé libéré lors de la lipolyse du gras de porc. Cette inhibition est réalisée via des activités superoxyde dismutase et catalase (Barriere *et al.*, 2001). *S. xylosus*, comme nous le verrons dans le chapitre III 2-1, possède une superoxyde dismutase cytosolique ainsi que deux catalases.

La présence de méthyl-cétones dans le saucisson a été associée à l'inoculation de *S. carnosus* et *S. xylosus*. Ces méthyl-cétones sembleraient être le résultat d'une β -oxydation incomplète des acides gras (Fadda *et al.*, 2002 ; Fadda *et al.*, 2003). Habituellement, la β -oxydation dégrade les acides gras saturés en acide acétique par

suppression successive des groupements acétyl-CoA. Cependant, des ester-CoA intermédiaires peuvent être libérés et convertis en β -céto-acides via une activité thioestérase. Ils seront ensuite transformés par décarboxylation et déshydrogénation en méthyl-cétones et en alcools secondaires (Fadda *et al.*, 2002 ; Fadda *et al.*, 2003).

1-1.5. L'activité nitrate réductase

Les nitrites ou indirectement les nitrates sont couramment utilisés en salaison. Ils ont un effet bactériostatique et sont impliqués dans le développement de la flaveur et de la couleur des produits carnés fermentés. Via leur activité nitrate réductase, les staphylocoques jouent un rôle fondamental dans le développement de la couleur en réduisant les nitrates en nitrites. Les nitrites sont ensuite réduits en oxyde d'azote qui réagit avec les pigments de la viande (principalement la myoglobine) pour former la nitrosomyoglobine (Talon *et al.*, 2002). La majorité des souches de *S. xylosus* a une activité nitrate réductase et participe ainsi au développement de la couleur rouge des produits de salaison (Talon *et al.*, 1998). Des défauts de couleur peuvent apparaître en présence de certaines bactéries lactiques qui produisent lors du catabolisme du lactate, en présence d'oxygène, du peroxyde d'hydrogène (Talon *et al.*, 1999). Celui-ci peut interagir avec la nitrosomyoglobine pour former de la cholémyoglobine de couleur verte. Via l'activité catalase, *S. xylosus* et les staphylocoques en général détruisent le peroxyde d'hydrogène et contribuent de ce fait, à la stabilité de la couleur rouge typique des produits carnés fermentés (Talon *et al.*, 2002).

1-1.6. La synthèse de pigments

Certaines souches de *S. xylosus* produisent des bêta-carotènes qui donnent une coloration orangée aux colonies. Aucune donnée sur la production de ces pigments n'est actuellement disponible. *Brevibacterium* est couramment utilisé pour le développement d'une croûte orangée sur les fromages. De même, *S. xylosus* est utilisé comme ferment pour la fabrication de fromage à « caractère » et à croûte orangée comme le Munster (Irlinger *et al.*, 1997), laissant supposer que les propriétés de pigmentation de *S. xylosus* intéressent également les industriels de l'agro-alimentaire.

1-2. Utilisation comme agent recombinant pour des applications biotechnologiques

S. xylosus est une espèce à usage alimentaire, historiquement décrite comme non pathogène. Les propriétés de la souche *S. xylosus* C2a, non pathogène et génétiquement modifiable, ont permis d'envisager son utilisation dans le cadre de développement de vaccins oraux. La souche C2a dérive de la souche de référence DSM20267, curée de son plasmide endogène pSX267 (Gotz *et al.*, 1983). Cette souche commensale de la peau est la seule souche de *S. xylosus* transformable actuellement décrite (Brückner, 1997). Un plasmide permettant l'expression de peptides au niveau de la membrane été transféré chez *S. xylosus* C2a et cela sans modifier la croissance bactérienne (Hansson *et al.*, 1992).

1-2.1. Développement de vaccins oraux

Nguyen *et al.* (1993) ont montré que *S. xylosus* pouvait être utilisé comme vaccin oral chez des souris de laboratoire. Ces auteurs ont pu exprimer, par transformation, des récepteurs hétérogènes à la surface de *S. xylosus*. Des essais sur du sérum de lapin et sur des souris ont permis de montrer l'existence d'une réponse immunitaire humorale spécifique induite par la souche recombinante. Dans une seconde étude, une souche de *S. xylosus* recombinante exprimant à sa surface trois variants d'une région de 101 acides aminés de la glycoprotéine majeure (protéine G) du virus respiratoire syncytial (RSV) a également permis de confirmer la production d'anticorps spécifiques chez la souris (Nguyen *et al.*, 1995). En utilisant la méthode quantitative de FACS (fluorescence-activated cell sorting), il a été montré que *S. xylosus* pouvait arborer 10^3 protéines de surface hétérologues par cellule.

Des essais de *S. xylosus* recombinants exprimant à leur surface une forme fonctionnelle de la sous-unité B de la toxine cholérique de *Vibro cholerae* ont également été réalisés avec succès (Liljeqvist *et al.*, 1997).

1-2.2. Essais de production d'anticorps

L'expression fonctionnelle d'un fragment d'anticorps murin anti-IgE-scFv humain à la surface de *S. xylosus* et *S. carnosus* a été réalisée par Gunneriusson *et al.* (1996). Tous les essais cellulaires ont montré que les bactéries recombinantes de *S. xylosus* et *S. carnosus* étaient capables de reconnaître l'immunogène cible : l'IgE. Ce fût la toute première étude montrant qu'un fragment d'anticorps pouvait être exprimé sous une forme fonctionnelle, et être ancré à la surface d'une bactérie Gram positive. Dans un but diagnostique, ce type

de recombinant pourrait être utilisé pour la production plus rapide et moins coûteuse d'anticorps monoclonaux ou également utilisé pour des expériences d'immunoprécipitations (Wernerus *et al.*, 2002).

1-2.3. Utilisation comme futurs bioabsorbants ou biosenseurs?

Ces dernières années, il y a eu un intérêt grandissant pour l'expression de peptides ou de protéines de fixation aux métaux en surface des bactéries. L'objectif est de générer de nouveaux bioabsorbants afin de capter les métaux toxiques des eaux usagées ou de développer des biosenseurs microbiens. De nombreuses études ont été effectuées sur les bactéries à Gram négatif, notamment *Escherichia coli* (Wernerus *et al.*, 2002). Une étude pionnière sur les bactéries Gram positives, *S. xylosus* et *S. carnosus*, a été réalisée (Samuelson *et al.*, 2000). Des souches de *S. xylosus* et *S. carnosus* recombinantes exposant des protéines de surface chimériques, contenant des peptides polyhistidyl liant les ions métalliques divalents, ont été construites. Les peptides exprimés étaient accessibles à la surface des cellules et étaient fonctionnels puisque les cellules recombinantes de *S. xylosus* et *S. carnosus* ont montré une augmentation de leur capacité à lier le nickel (Samuelson *et al.*, 2000).

1-3. Un dépolluant efficace?

Récemment, deux études sur l'utilisation de *S. xylosus* comme dépolluant ont été réalisées (Ziagova & Liakopoulou-Kyriakides, 2007 ; Ziagova *et al.*, 2007). La première concerne la capacité de biosorption naturelle de *S. xylosus* en co-culture avec *Pseudomonas* sp. pour des métaux toxiques : le cadmium Cd(II) et le chromium Cr(VI) (Ziagova *et al.*, 2007). Les deux souches étaient capables d'utiliser et de dégrader le cadmium. La dégradation du chromium par *S. xylosus* semble plus efficace que celle réalisée par *Pseudomonas* sp. Des essais ont été réalisés avec les deux métaux appliqués simultanément à différentes concentrations dans le milieu. Lors d'une concentration plus élevée en Cd(II), les deux espèces bactériennes ont montré une plus grande sélectivité de biosorption pour le Cd(II) que pour le Cr(VI). Dans le cas inverse, c'est-à-dire lors d'une plus forte concentration en Cr(VI), seul *S. xylosus* montrait une plus grande sélectivité de biosorption pour Cr(VI) comparé au Cd(II) (Ziagova *et al.*, 2007). La deuxième étude concernait l'utilisation, toujours en co-culture avec *Pseudomonas* sp., de *S. xylosus* pour la dégradation du chlorobenzène, un composé halogéné aromatique très polluant (Ziagova & Liakopoulou-

Kyriakides, 2007). Bien que capable de croître normalement dans un milieu contenant une concentration de 1 mM de ce composé toxique, *S. xylosus* s'est révélé être bien moins tolérant à une forte concentration de 1,2-dichlorobenzène et beaucoup moins efficace que *Pseudomonas sp.* pour dégrader ce composé (Ziagova & Liakopoulou-Kyriakides, 2007).

2 - ...MAIS DES SOUCHES A RISQUE

En 1982, pour la première fois, une infection humaine a été associée à une souche de *S. xylosus* (Tselenis-Kotsowilis *et al.*, 1982). Depuis, d'autres cas d'infections opportunistes à *S. xylosus* chez l'homme et chez les animaux ont été décrits. La présence de facteurs de risque chez certaines souches de cette espèce a également été montrée.

2-1. Les facteurs de risque

2-1.1. La production de toxines

S. aureus est la deuxième cause de toxi-infections alimentaires après *Salmonella*. Les toxi-infections à *S. aureus* sont directement liées à la présence d'entérotoxines. Ces dernières années, la production d'entérotoxines a également été observée chez des staphylocoques à coagulase négative tels que *S. xylosus*, *S. haemolyticus* et *S. cohnii*, principalement chez des souches isolées de produits laitiers et de produits carnés (Bautista *et al.*, 1988 ; Rodriguez *et al.*, 1996 ; Vernozy-Rozand *et al.*, 1996 ; Martin *et al.*, 2006). Les entérotoxines staphylococciques (SE) sont des toxines émétiques et pyrogéniques classées dans la famille des superantigènes, en raison de leurs activités biologiques et de leur parenté structurale (Balaban & Rasooly, 2000). Elles agissent comme un superantigène sur les lymphocytes et induisent la production de diverses cytokines inflammatoires. Neuf types antigéniques principaux de SE ont été rapportés : SEA, SEB, SEC, SED, SEE et quatre nouvellement décrits : SEG, SEH, SEI et SEJ. Récemment, la détection de gènes codant des homologues a augmenté la famille des SE : *seK*, *seL*, *seM*, *seN*, *seO*, *seT*, *seQ*, *seR* et *seU* (Balaban & Rasooly, 2000). Pour les entérotoxines SEC, SEG, SEI et SEU, plusieurs variants ont également été rapportés. Aucun rapport n'a encore été établi entre ces nouvelles SE et des intoxications alimentaires humaines, mais quelques études montrent la détection des gènes codant ces nouvelles SE dans certaines souches de staphylocoques isolées d'aliments (Rosec *et al.*, 1997 ; Blaiotta *et al.*, 2004). En ce qui concerne *S. xylosus*, la première étude montrant la production d'entérotoxines a été réalisée par Vernozy-Rozand *et al.* (1996). Ces auteurs avaient isolé des souches de

S. xylosum productrices de SEE à hauteur de 3% dans du lait et des fromages. Bautista *et al.* (1988) avaient également isolé des souches de *S. xylosum* dans du lait et sur 5 isolats, 4 étaient producteurs de SED. Enfin sur 23 souches de *S. xylosum* isolées de chèvres saines, 3 produisaient la SEC, une la SEE et une produisait les deux entérotoxines E et C (Valle *et al.*, 1990). Une étude concernant la production de SE dans les produits de salaison a également été réalisée, et des souches de *S. xylosum* productrices de SEC et/ou SED dans le jambon ont été isolées (Rodriguez *et al.*, 1996). Cependant, Martín *et al.* (2006) ont montré sur un large nombre de souches que l'occurrence des gènes codant les SE chez les SCN restait rare. Sur 194 souches de *S. xylosum* isolées de saucisson, seulement 1,5% des isolats possédaient le gène *sec* et aucun n'était pourvu des gènes *sea*, *seb*, *sed* et *see*. Enfin, certaines souches de *S. xylosum* sont également capables de produire la toxine TSST-1. Cette toxine habituellement décrite chez *S. aureus* est responsable du syndrome du choc toxique, maladie systémique humaine. Valle *et al.* (1991) ont observé que sur 23 souches de *S. xylosum* isolées de lait, 26% produisaient la TSST-1. Deux souches de *S. xylosum* productrices de TSST-1 ont également été isolées de la peau des mains de serveurs dans un restaurant au Koweït (Udo *et al.*, 1999).

2-1.2. La formation de biofilm

Un biofilm peut être défini comme une communauté microbienne attachée à une surface et fréquemment englobée dans une matrice d'exopolymères. Mack *et al.* (2004) ont proposé un modèle de formation de biofilm chez les staphylocoques (Figure 4).

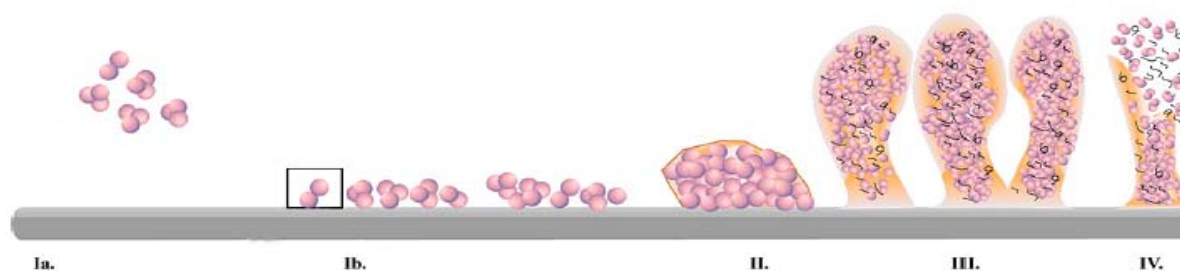


Figure 4 : Les différentes étapes de formation d'un biofilm

Ia, cellules planctoniques ; Ib, attachement à la surface abiotique et formation d'une monocouche cellulaire ; II, adhésion cellule-cellule et prolifération ; III, maturation du biofilm ; IV, détachement

La première étape est l'attachement initial ou l'adhésion des cellules à un support solide. La deuxième phase est l'accumulation ou l'agrégation intercellulaire qui conduit à la

formation de microcolonies. Cette étape inclut la division cellulaire ainsi que la production d'exopolysaccharides et conduit à l'établissement d'un biofilm mature. Planchon *et al.* (2006) ont montré que la grande majorité des souches de l'espèce *S. xylosus* avait la capacité à former des biofilms sur des supports abiotiques.

La formation de biofilm chez les bactéries est un processus complexe impliquant à la fois les caractéristiques physico-chimiques du support et les propriétés de surface de la cellule bactérienne. Une diversité des propriétés de surface a été observée par ces auteurs, puisque sur 12 souches de *S. xylosus* testées, 7 avaient des propriétés de surface hydrophiles et étaient chargées négativement, alors que 5 étaient modérément hydrophobes. Chez les staphylocoques, les acides teichoïques ainsi que différents types d'adhésines sont impliqués dans l'adhésion (Gross *et al.*, 2001). Planchon *et al.* (2006) ont observé par microscopie environnementale (Figure 5) que les cellules sessiles de *S. xylosus* étaient adhérentes sur le support abiotique, agrégées et entourées dans une matrice amorphe avec la présence d'espaces entre les amas cellulaires (Figure 5a). De plus, la présence d'un exopolymère liant les cellules les unes aux autres a été observée (Figure 5b).

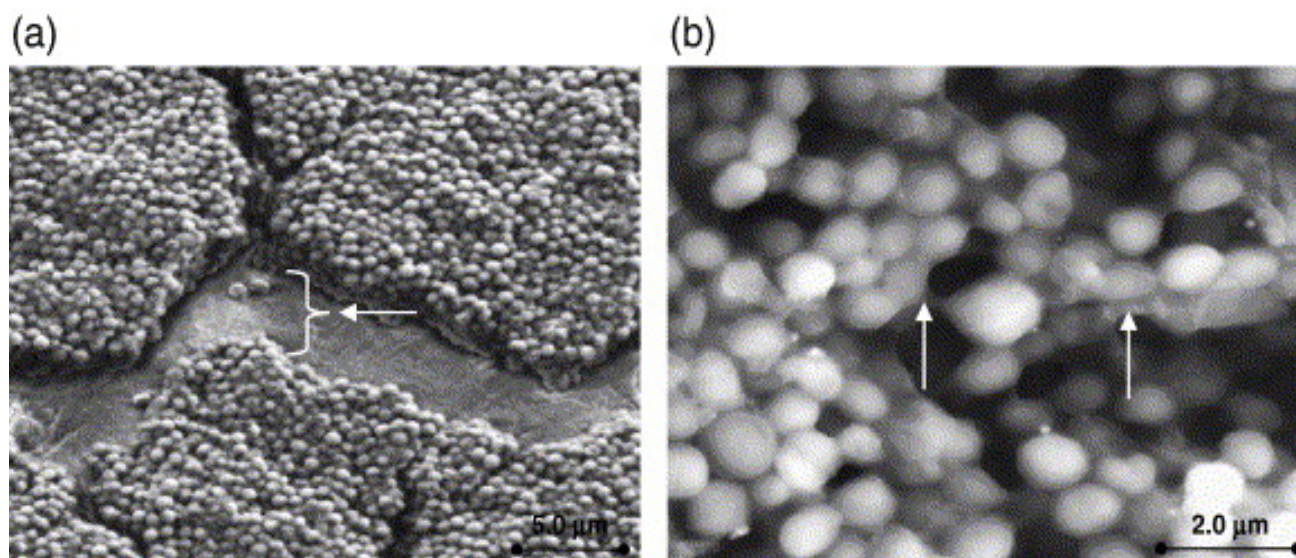


Figure 5 : Observation de *S. xylosus* C2a en biofilm par microscopie environnementale à 48 h sur lame d'acier en milieu TSB (Planchon *et al.*, 2006)

(a) Espaces intercellulaires entre les agrégats (flèche).

(b) Cellules agrégées dans une matrice amorphe et filaments entre les cellules (flèche).

Cet exopolymère serait apparemment différent des polysaccharides PIA (polysaccharidic intracellular adhesine) habituellement décrits chez *S. epidermidis* et *S. aureus* et codés par le locus *ica*. En effet, le gène *icaA*, indispensable à la formation du PIA n'est pas présent chez *S. xylosus* (Planchon *et al.*, 2006). Ces auteurs ont mis en évidence la présence du

gène codant la protéine Bap (biofilm associated protein) impliquée dans la formation de biofilm uniquement chez des souches de *S. aureus* isolées de mammites bovines (chapitre III 5-4). Il a été montré que des souches recombinantes de *S. aureus* *ica* négatives et *bap* positives pouvaient former des biofilms similaires aux souches sauvages (Cucarella *et al.*, 2004). Bien que la formation de biofilm ne soit pas un facteur de virulence en soit, cette capacité procure un avantage certain chez les bactéries pathogènes, car elle facilite la colonisation et permet une meilleure résistance aux agents antimicrobiens (Mack *et al.*, 2004).

2-1.3. La multirésistance aux antibiotiques

On observe dans la littérature une augmentation croissante de la description de souches de SCN multirésistantes aux antibiotiques. Ceci constitue un réel problème en milieu hospitalier (Arciola *et al.*, 2006). *S. xylosus* est une espèce bactérienne connue pour être naturellement résistante à la novobiocine et la lincomycine. La résistance de souches de *S. xylosus* impliquées dans des infections opportunistes chez l'homme a été étudiée, révélant la présence de souches multirésistantes à la rifampicine, la vancomycine et la gentamicine, ou à la pénicilline, la gentamicine, la tétracycline et l'érythromycine (Tableau 4) (John *et al.*, 1978 ; Gemmell & Dawson, 1982 ; Pinna *et al.*, 1999 ; Ug & Ceylan, 2003 ; Arciola *et al.*, 2006). Des tests de sensibilité aux antibiotiques sur des *S. xylosus* isolés de la peau humaine ont montré que peu de souches commensales étaient résistantes à des antibiotiques de différentes familles (Udo *et al.*, 1999). Des études sur des souches de *S. xylosus* d'origine alimentaire ont également été menées, notamment sur des souches isolées de saucisson (Martin *et al.*, 2006), de produits carnés (Simonova *et al.*, 2006) et de salami (Mauriello *et al.*, 2000) (Tableau 4). Dans toutes ces études, entre 5 et 20% des souches, étaient résistantes aux antibiotiques. Les souches résistantes étaient le plus souvent multirésistantes. On notera également l'existence d'une étude sur des souches de *S. xylosus* isolées de poulaillers, où 2 isolats étaient résistants à la quinupristine/dalfopristine et à la virginiamycine (Aarestrup *et al.*, 2000). Une autre étude sur 95 souches de *S. xylosus* isolées de grenouilles a montré que 35 étaient résistantes à l'oxacilline et à la pénicilline et une des souches à la pénicilline et à l'érythromycine (Slaughter *et al.*, 2001).

Tableau 4 : Diversité de la résistance aux antibiotiques de *S. xylosus*

Sources des isolats de <i>S. xylosus</i>	Antibiotiques
Infections opportunistes humaines	Pénicillines : Ampicilline, Méthicilline, Oxacilline, Pénicilline
	Céphalosporines : Cefamandole, Cefalozine, Céphalotine
	Aminosides : Gentamicine, Amikacine
	Phénilés : Chloramphénicol
	Tétracyclines : Tétracycline
	Macrolides : Erythromycine
	Lincosamides : Clindamycine
	Glycopeptides : Teicoplanine, Vancomycine
	Sulfamides : Sulfaméthoxazole, Triméthoprim
	Quinolones : Acide nalidixique
	Divers : Rifampicine
Peau humaine	Divers : Acide fusidique, Mupirocine
Origine alimentaire	Pénicillines : Amoxicilline, Ampicilline, Méthicilline,
	Aminosides : Néomycine, Tobramycine
	Tétracyclines : Tétracycline
	Lincosamides : Clindamycine, Lincomycine
	Divers : Rifampicine, Fosfomycine

2-2. Les mammites

La mammite est une inflammation des glandes mammaires due à une infection bactérienne qui affecte la qualité du lait ainsi que sa production. *S. aureus* est l'espèce bactérienne la plus communément impliquée dans les cas de mammites. Les SCN sont considérés comme des pathogènes opportunistes «mineurs» dans cette pathologie, cependant leur implication est en augmentation (Forsman *et al.*, 1997). Les SCN les plus fréquemment isolés sont *S. simulans* (36%), *S. hyicus* (32%), *S. epidermidis* (23%) et *S. xylosus* (9%) (Forsman *et al.*, 1997). Waage *et al.* (1999) ont également isolé des SCN dans 13% des cas de mammites. Parmi les SCN, *S. simulans* était l'espèce majoritaire (54%) alors que *S. xylosus* était retrouvée dans 2,7% des cas. Plus récemment, Malinowski *et al.* (2003) ont isolé *S. xylosus* dans 2,2% des cas d'infections mammaires bovines. *S. xylosus* a été observée comme espèce majoritaire dans le lait de chèvres atteintes de mammites (Contreras *et al.*, 1997), ainsi que dans le lait de vaches saines ou atteintes de mammites (Ben Hassen *et al.*, 2003).

Dans toutes ces études, aucune corrélation entre la présence des souches de *S. xylosus* et la pathologie observée n'a été établie. Cependant, en 2002, Ariznabarreta *et al.* ont montré que certaines souches de *S. xylosus* pouvaient provoquer une réaction inflammatoire transitoire chez les ovins. De plus, l'adhésion et l'internalisation de *S. xylosus* à des

cellules épithéliales mammaires bovines ont été clairement établies (Ariznabarreta *et al.*, 2002).

Almeida *et al.* (2001) ont observé l'adhésion et l'internalisation de *S. xylosus*, *S. epidermidis* et *S. hyicus* sur des cellules épithéliales mammaires bovines de type MAC-T. Ces auteurs ont montré que *S. xylosus* adhère beaucoup mieux que *S. epidermidis* et *S. hyicus* aux cellules épithéliales MAC-T en monocouche, et qu'il s'internalisait également beaucoup mieux dans ces cellules. L'adhésion et l'internalisation des 3 SCN testés augmentaient proportionnellement en fonction du temps de contact bactéries/cellules MAC-T, atteignant un maximum après 120 min. Des observations par microscopie à transmission d'électron ont été réalisées sur les interactions SCN/cellules MAC-T (Figure 6) révélant des changements structuraux lors de l'internalisation des bactéries. La formation d'une structure de type pseudopode à la surface des cellules MAC-T a été observée avec les 3 espèces de staphylocoques. Ce pseudopode s'étend autour de la bactérie pour l'engloutir, ce qui correspondrait à un mécanisme d'internalisation de type « trigger » (Figure 6a). Une fois internalisé, *S. xylosus* est enfermé dans une structure ressemblant à une vacuole (Figure 6b) qui peut contenir un à deux coques. Différents types d'inhibiteur ont été utilisés pour définir les mécanismes d'internalisation employés par ces bactéries.

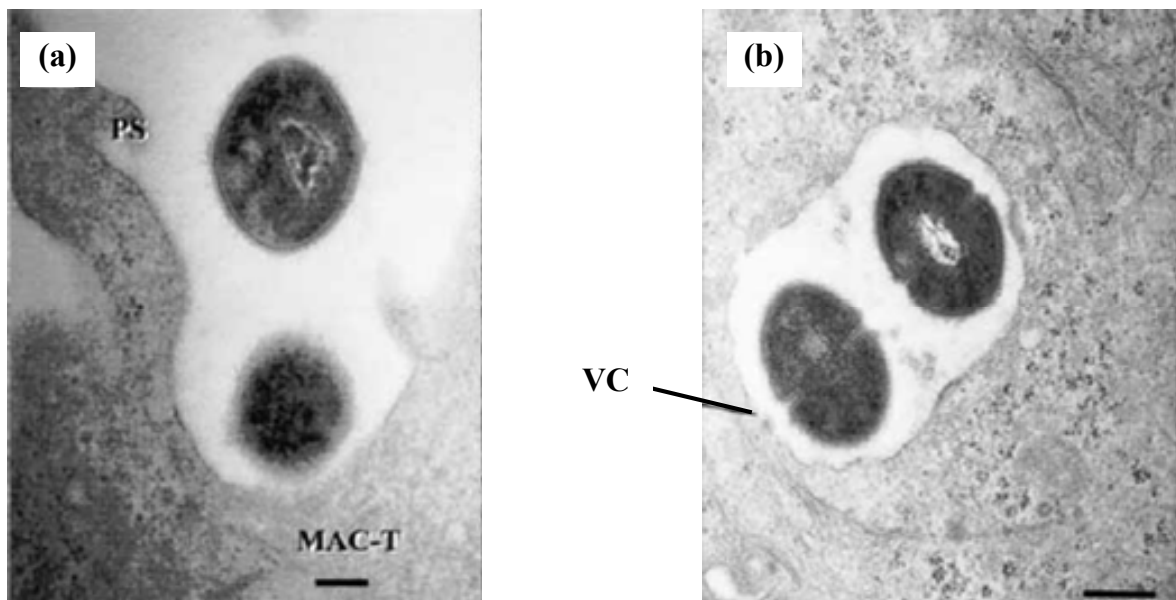


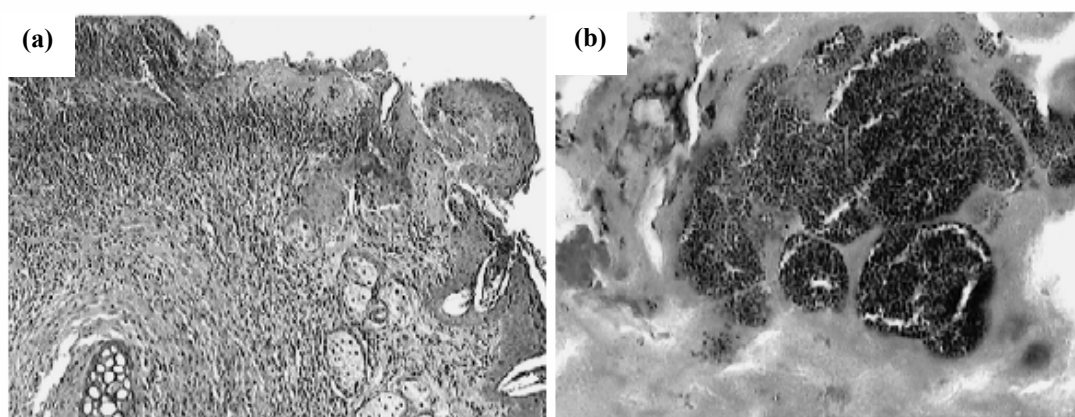
Figure 6 : Interaction entre des cellules MAC-T et *S. xylosus* observée en microscopie électronique à transmission d'après Almeida & Oliver (2001)

- (a) Adhésion de *S. xylosus* aux cellules avec formation de pseudopodes (PS)
- (b) Internalisation de 2 coques de *S. xylosus* dans une vacuole (VC)

Il semblerait que les SCN étudiés induisent une modification des éléments du cytosquelette et plus particulièrement les microfilaments d'actine-F, probablement via la production d'un signal qui induirait la transduction d'une protéine kinase (PK) chez la cellule hôte. *S. xylosus* induirait préférentiellement une activité tyrosine kinase (TPK) liée au récepteur du facteur de croissance de l'épiderme. L'interaction entre les SCN et les cellules épithéliales mammaires n'est pas le seul facteur impliqué dans le développement des mammites. En effet, la production d'entérotoxines staphylococciques est décrite comme la principale cause inflammatoire (Kuroishi *et al.*, 2003) (chapitre II 2-1.1).

2-3. Les dermates

Bradfield *et al.* (1993) ont isolé une souche de *S. xylosus* dans des lésions de type dermite qui se sont relevées être létales chez des souris immunodéprimées. Solomon *et al.* (2000) ont observé, par la suite, des infections nasales à *S. xylosus* chez des gerbilles. Won *et al.* (2002) ont constaté l'apparition de dermates chez des souris immunodéprimées. Les lésions sont apparues autour du cou, des épaules et des oreilles. L'observation de ces lésions a montré la présence de pustules et des nécroses associées à la présence de coques (Figure 7). Les bactéries isolées ont été identifiées comme étant des *S. xylosus* par amplification PCR de la région intergénique 16S-23S et par Api® Staph. Bien que les lésions soient identiques à celles observées par Bradfield *et al.* (1993), les dermates n'ont pas été dans ce cas, létales et se sont résorbées spontanément après quelques semaines.



Won *et al.* (2002)

Figure 7 : Images de microscopie optique de l'épiderme de souris atteintes de dermite (Won *et al.*, 2002)

- (a) Dermite granuleuse sur la peau autour des oreilles. Les lésions dermales incluent des pustules, des nécroses et des accumulations de neutrophiles et de macrophages.
 (b) Colonies de *S. xylosus* sur la peau d'une souris atteinte de dermite.

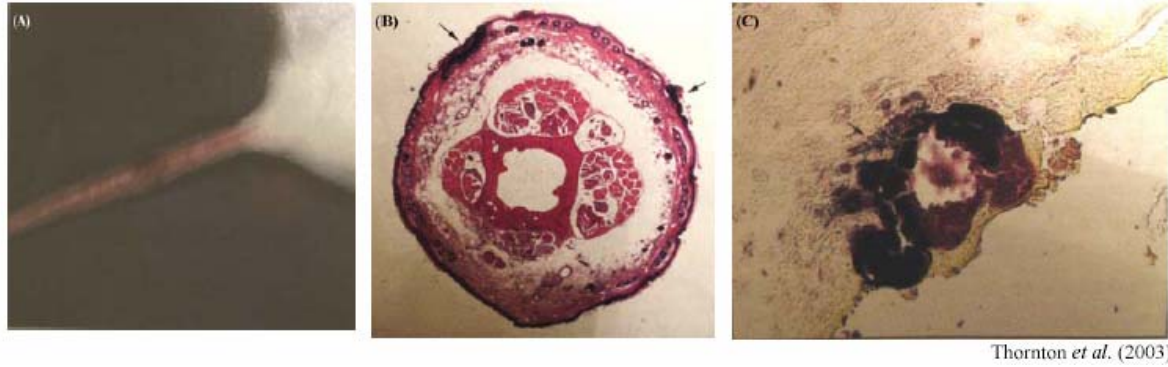
Thornton *et al.* (2003)

Figure 8 : Lésion dermatologique d'une queue de souris inoculée avec *S. xylosus* (Thornton *et al.*, 2003)

(A) Lésion de la queue. Les lésions s'étendent de manière focale à multifocale avec érythème, hyperthémie, œdème, dermite ulcéralive et formation de tissus cicatriciels, toutes étant localisées sur l'exposition dorsale de la queue.

(B) Grossissement (X2) d'une coupe transversale de la queue infectée. Les changements histopathologiques du groupe de souris inoculées s'étendent d'œdème modéré avec une hyperkératose et une hyperplasie de l'épiderme sur toute l'épaisseur à des lésions plus sévères incluant des dermatites ulcéralives et suppuratives avec hémorragies multifocales et la formation de croûtes sérocellulaires.

(C) Grossissement (X100) des micro-organismes responsables de l'infection. De nombreuses bactéries coccoïdes à Gram positif, des *S. xylosus*, colonisent l'épiderme superficiel.

Une autre étude sur des dermatites de souris a été réalisée en 2003 par Thornton *et al.* (2003). Ces auteurs ont inoculé de façon intradermale une souche de *S. xylosus*, préalablement isolée de dermite, sur des queues de souris immunodéprimées. Des lésions se sont développées dans 86% des cas. Des colonies de *S. xylosus* ont été observées au niveau de l'épiderme superficiel de la queue. De même, au niveau des lésions, des changements histopathologiques sont apparus entraînant des œdèmes jusqu'à des dermatites ulcéralives ou suppuratives (Figure 8). Les auteurs ont ensuite traité les souris pendant 14 jours avec du sulfaméthoxazole et du triméthoprime et observé une disparition de ces lésions.

2-4. Les infections humaines

Quelques rares cas d'infections à *S. xylosus* ont été décrits chez l'homme. Ces infections opportunistes ont uniquement atteint des patients immunodéprimés. Tselenis-Kotsowillis *et al.* (1982) ont été les premiers à rapporter le cas d'une pyélonéphrite à *S. xylosus*. A la même époque, Gemmel *et al.* (1982) ont isolé des souches de *S. xylosus* dans des cas d'endocardites et d'infections urinaires. Des cas d'infections de la lymphe et des ganglions ainsi que des cas d'infections urinaires, de la cornée ou dentaires causées par *S. xylosus* ont également été décrits (Orrett & Shurland, 1998 ; Pinna *et al.*, 1999 ; Olszewski *et al.*,

1999 ; Siqueira & Lima, 2002). Plus récemment, un cas d'endocardite causé par *S. xylosus* chez un patient atteint de cancer a été observé (Tompkins *et al.*, 2004). *S. xylosus* a également été impliqué dans des infections nosocomiales, notamment chez des nouveaux nés où il a été retrouvé, dans 1,8% des cas, associé à des pneumonies et des septicémies (Cunha Mde *et al.*, 2002) mais également dans l'infection de plaies post-opératoires dans les services chirurgicaux à Cotonou (Bénin) (Makoutode *et al.*, 1994). Carrillo *et al.* (2000) ont décrit la colonisation de cathéters par *S. xylosus*. Cette espèce a également été isolée lors d'infections d'implants orthopédiques (Arciola, 2006).

Dans ce chapitre, nous avons pu voir que *S. xylosus*, un des principaux ferments utilisé, en co-culture avec les bactéries lactiques, est une espèce ambivalente. De nombreuses souches présentent un fort intérêt technologique. Elles sont en effet capables de synthétiser des arômes, possèdent des propriétés anti-oxydantes et une activité nitrate réductase, facteurs importants pour la qualité sensorielle des produits fermentés. De part sa capacité à dégrader les amines biogènes et à coloniser les produits carnés et laitiers, *S. xylosus* est un acteur important dans la qualité sanitaire. Cependant, certaines souches peuvent également présenter un risque infectieux. Heureusement, la prévalence des souches « à risque » reste faible, mais cette espèce bactérienne est peu connue, notamment au niveau génétique, il est donc très difficile de déterminer ce qui différencie «Dr Jekyll de Mrs Hyde» au sein de l'espèce *S. xylosus*.

- CHAPITRE 3 -

CONNAISSANCES GÉNÉTIQUES SUR

S. XYLOSUS

Environ 150 séquences nucléotidiques appartenant à l'espèce *S. xylosus* sont disponibles dans les banques de données. Cent dix sept d'entre elles correspondent à des séquences de gènes conservés utilisés pour l'identification de l'espèce dont 56 séquences d'ADNr 16S, 32 de *sodA*, 17 de *kata*, 10 de *hsp60*. Au total, une soixantaine de gènes de *S. xylosus* est connue. Seuls quelques uns sont caractérisés. Parmi eux, des gènes, souvent organisés en opéron, impliqués dans le métabolisme et plus particulièrement le métabolisme des sucres. Une souche de *S. xylosus*, la souche C2a, a en effet été utilisée comme souche «modèle» dans les études du métabolisme des sucres chez les staphylocoques.

1 - MÉTABOLISME DES HYDRATES DE CARBONE

Les voies centrales du métabolisme du carbone sont conservées chez pratiquement tous les organismes. Cependant, une observation plus détaillée des voies spécifiques de biosynthèse et de dégradation, montre que celles-ci varient considérablement entre les bactéries, les plantes et les animaux. De plus, d'une bactérie à l'autre, les capacités métaboliques diffèrent énormément. Il n'est donc pas suffisant de généraliser et d'utiliser des approches comparatives pour comprendre la physiologie d'une bactérie. Il est nécessaire d'étudier le potentiel biosynthétique et les besoins nutritionnels pour chaque bactérie. Cependant, la comparaison avec certains organismes proches a permis de mettre en évidence, notamment chez les bactéries à Gram positif A-T riche, la présence de grands principes métaboliques communs, comme notamment une répression catabolique du carbone, différente de celle observée chez les entérobactéries.

Chez les staphylocoques, peu de caractéristiques moléculaires sont connues sur l'utilisation des hydrates de carbone, les voies de biosynthèse et les besoins nutritionnels. Mais la plus grande partie des études sur les gènes impliqués dans le métabolisme des hydrates de carbone ainsi que leur régulation transcriptionnelle a été réalisée chez l'espèce *S. xylosus*.

Cependant, elles ne portent que sur un nombre très restreint de sucres. Ce champs limité de connaissances est d'autant plus surprenant que c'est chez un staphylocoque : *S. aureus* que le système phosphotransférase (PTS) dépendant du phosphoenolpyruvate a été décrit pour la première fois chez une bactérie à Gram positif.

1-1. Les hydrates de carbone catabolisés par *S. xylosus*

Chez *S. xylosus*, une grande variété de hydrates de carbone est métabolisée en acides. En aérobie, ils peuvent être produits à partir du glucose, fructose, mannose, maltose, xylose, mannitol, saccharose et glycérol. La majorité des souches produisent de l'acide à partir du saccharose, du mannitol et du maltose. Quatre-vingt pour cent des souches produisent de l'acide à partir du galactose, arabinose, lactose, tréhalose et turanose. Moins de 30% des souches produisent de l'acide à partir du ribose, rhamnose, gentiobiose, xylitol, sorbitol ou inositol. Quelques rares souches produisent de l'acide à partir de la salicine. Le cellobiose, le mélezitose, l'adonitol, le dulcitol, l'arabitol, l'érythritol, l'érythrose, le raffinose, le mélébiose, le fucose, le tagatose, le lyxose ou le sorbose ne sont pas catabolisés par *S. xylosus* (Kloos & Schleifer, 1986). Chez cette bactérie, de nombreuses études biochimiques et physiologiques, n'ont pas été poursuivies au niveau génétique.

1-2. La glycolyse

Il semblerait que la voie principale d'utilisation du glucose chez les staphylocoques soit la voie d'Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) et la voie des pentoses phosphates. La voie d'Entner-Doudoroff ne semble pas exister chez ce genre bactérien. Dans des conditions de croissance en milieu complexe, environ 85% du glucose est catabolisé par la voie d'EMP. Le produit final prédominant du métabolisme anaérobie du glucose est le lactate bien que celui-ci soit produit en faible quantité, notamment chez *S. xylosus* (Brückner & Rosenstein, 2006). En condition de croissance aérobie, les produits finaux sont l'acétate et le CO₂. Le glucose entre dans la voie d'EMP sous forme de glucose-6-phosphate produit suite au transport et à la phosphorylation induite par le système PTS. Dans certains cas, le glucose peut entrer dans la cellule sous forme non modifiée et être converti par une glucose kinase en glucose-6-phosphate. De nombreux autres hydrates de carbone, hexoses, hexitols ou disaccharides tels que le fructose, le mannitol, le saccharose ou le maltose rentrent dans la voie d'EMP grâce à l'activité d'enzymes périphériques spécifiques d'un ou plusieurs sucres telles que des perméases, des hydrolases, des kinases et des déshydrogénases.

Sur les génomes des staphylocoques actuellement séquencés, tous les composants de la voie d'EMP sont clairement identifiés.

1-3. Le système phosphotransférase (PTS)

Le système PTS est impliqué dans les premières étapes de l'interconversion catabolique des hydrates de carbone. Le système PTS est un complexe enzymatique qui permet, en une seule étape, la translocation et la phosphorylation des sucres à travers la membrane. Il possède également un rôle de chémoréception permettant aux bactéries de s'adapter dans des milieux contenant différents sucres et gradients de sucres. Le système PTS est dépendant du phosphoénolpyruvate (PEP), donneur du groupement phosphate, indispensable à la phosphorylation des sucres. Cette phosphorylation est réalisée en cinq étapes, successives et réversibles, réalisées par les phosphotransférases EI, HPr (« histidine-containing protein »), EIIA et EIIB, induisant le transfert du groupement phosphate (Figure 9).

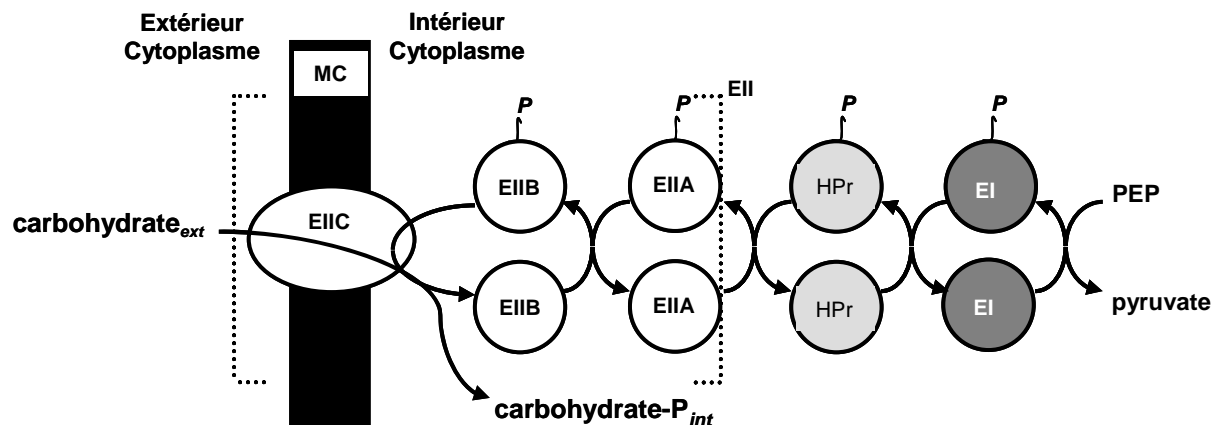


Figure 9 : Le système PTS

EII : Complexe composé de 3 protéines ou domaines protéiques EIIA, EIIB et EIIC

Le transfert du groupement phosphate débute par la phosphotransférase EI via le phosphoénolpyruvate, EI va ensuite phosphoryler HPr qui phosphorylera à son tour les domaines protéiques EIIA et EIIB du complexe EII. Le carbohydrate est transloqué dans la cellule par EIIC, puis phosphorylé par EIIB (Figure 9). Les enzymes EI et HPr sont des protéines cytoplasmiques solubles considérées comme les enzymes générales de ce système. Chez la plupart des bactéries à Gram positif étudiées, les gènes codant les protéines EI et HPr, *ptsI* et *ptsH*, sont co-localisés. Chez les staphylocoques, il en est de même chez *S. aureus* (Kuroda *et al.*, 2001), *S. epidermidis* (Zhang *et al.*, 2003), *S. carnosus* (Eisermann

et al., 1991 ; Kohlbrecher *et al.*, 1992) et *S. xylosus* (Jankovic *et al.*, 2001). Chez *S. xylosus* un promoteur en aval du gène *ptsH* a été positionné et des études de clonage ont montré que *pstI* est co-transcrit avec *ptsH* confirmant l'existence d'un opéron *pstHI*. Les gènes *pstHI* ont un haut degré de similarité, les observations faites chez *S. xylosus* semblent donc pouvoir être généralisées à l'ensemble des staphylocoques.

Contrairement à EI et HPr, le complexe EII, composé de trois domaines protéiques, EIIA, EIIB, EIIC, et parfois d'un domaine EIID, est spécifique à un ou plusieurs hydrates de carbone. Les domaines protéiques EIIA et EIIB sont deux domaines membranaires périphériques et hydrophiles de taille identique qui jouent un rôle de phosphotransférase. EIIC est le domaine transmembranaire qui catalyse le transport du sucre à travers la membrane. Le domaine EIID est un homologue du domaine EIIC. Les domaines protéiques peuvent exister sous forme de protéines individuelles ou peuvent être fusionnés en une chaîne polypeptidique unique. Par exemple chez *E. coli*, les domaines EIIA, EIIB, EIIC du complexe PTS spécifique du mannitol sont liés et forment une seule chaîne polypeptidique. Autre exemple, toujours chez *E. coli*, le système PTS spécifique du glucose est constitué de deux chaînes polypeptidiques, EIIA et le complexe EIIBC. Ces différences d'arrangement des domaines protéiques doivent avoir une importance pour la régulation. En effet, le système PTS contrôle de nombreux procédés physiologiques comme le transport, le métabolisme et la coordination du métabolisme azoté avec celui du métabolisme carboné.

Comme nous l'avons mentionné précédemment, *S. aureus* est la première espèce à Gram positif chez laquelle le système PTS a été étudié. L'assimilation du glucose, du mannose, du mannitol, de la glucosamine, du N-acetylglucosamine, du saccharose, du lactose, du galactose et des β -glucosides est dépendante du système PTS chez cette espèce. Cependant, la dépendance de l'assimilation de certains sucres vis-à-vis du système PTS varie entre les espèces de staphylocoques. En effet, chez *S. xylosus*, il a été montré que l'assimilation de nombreux sucres pouvait être indépendante du système PTS, notamment le glucose, le lactose et les pentoses dont le xylose et le xylitol (Sizemore *et al.*, 1992 ; Bassias & Bruckner, 1998 ; Fiegler *et al.*, 1999 ; Brückner & Rosenstein, 2006).

1-4. Le glucose

Le glucose est, parmi les hydrates de carbone, la source de carbone préférentiellement métabolisée par les bactéries. Afin d'assurer une assimilation efficace de ce sucre, de nombreux systèmes de transport existent. Des études sur des souches PTS déficientes de *Bacillus subtilis* (Dahl *et al.*, 1997), *Streptococcus mutans* (Cvitkovitch *et al.*, 1995),

Streptococcus bovis (Russell, 1990) ou *S. aureus* (Reizer *et al.*, 1989) ont montré que le glucose était internalisé par des mécanismes PTS-dépendant et/ou -indépendants. Peu d'études de mécanismes d'assimilation du glucose PTS indépendant ont été à ce jour étudiés. Chez *S. xylosus*, par une approche de mutagénèse par transposition, un nouveau mécanisme indépendant du système PTS a été mis en avant (Fiegler *et al.*, 1999). Les gènes *glcU* et *glkA* ont été identifiés chez des mutants où la réduction de la répression catabolique du glucose sur l'opéron lactose avait été observée. Ces gènes ont été caractérisés et se sont montrés être impliqués dans l'assimilation du glucose chez *S. xylosus* (Wagner *et al.*, 1995 ; Fiegler *et al.*, 1999). Les gènes *glcU* et *glkA* codent respectivement une protéine « d'assimilation » du glucose GlcU et une glucose kinase GlkA. Ces protéines constituent un mécanisme indépendant du système PTS important pour le catabolisme du glucose chez *S. xylosus*. Chez cette espèce, GlcU permet la translocation du glucose dans la bactérie par un mécanisme encore inconnu. GlkA phosphoryle le glucose assimilé. Sur les génomes complets des staphylocoques actuellement séquencés, la présence d'homologues de ces deux gènes a été décrite, suggérant l'existence chez d'autres staphylocoques d'un mécanisme d'assimilation et de phosphorylation indépendant du système PTS identique à celui de *S. xylosus*. Chez *S. xylosus*, *S. carnosus* et *S. epidermidis*, le gène *gdh* codant une glucose déshydrogénase est en aval de *glcU* (Fiegler *et al.*, 1999). Cette co-localisation n'est pas observée sur les génomes de *S. aureus*. L'enzyme Gdh permet la formation de gluconate à partir de glucose et est co-exprimée avec GlcU. Cette co-expression laisse supposer que la bactérie utilise deux voies métaboliques en parallèle pour produire de l'énergie à partir du glucose (Fiegler *et al.*, 1999). Les seules données concernant le système PTS spécifique du glucose chez les staphylocoques concernent *S. carnosus*. Chez cette espèce, deux gènes positionnés en tandem, *glcA* et *glcB* ont été clonés et ont permis de restaurer la capacité à fermenter le glucose chez une souche d'*E. coli* déficiente dans l'accumulation de ce sucre (Christiansen & Hengstenberg, 1996). Les protéines GlcA/B sont très similaires (69% d'identité) et possèdent une forte homologie avec les protéines EII glucose spécifiques de *B. subtilis* et d'*E. coli*. Ces deux perméases du système PTS glucose spécifique de *S. carnosus* ont un domaine protéique EII fusionné de type EIICBA. Des analyses supplémentaires ont montré que les deux protéines GlcA/B utilisaient le glucose comme substrat majoritaire, mais qu'une grande variété de glucosides était également différenciellement assimilée par ces perméases (Christiansen & Hengstenberg, 1999). Immédiatement en amont de *glcA*, le gène *glcT* a été détecté chez *S. carnosus*. L'étude de sa séquence en acides aminés montre un haut degré de similarité avec les régulateurs bactériens impliqués dans l'anti-terminaison (Stulke

et al., 1998). Dans la région intergénique entre *glcA* et *glcT*, se trouve un terminateur transcriptionnel putatif recouvrant partiellement une région répétée inversée qui pourrait correspondre à la région cible de l'antitermineur GlcT. Cette région ressemble à la région *glcT-ptsG* de *B. subtilis* et code respectivement une protéine d'anti-terminaison GlcT et une enzyme EII glucose spécifique. Une étude de l'activité de la protéine GlcT de *S. carnosus* chez *B. subtilis* a confirmé que la protéine pouvait provoquer une anti-terminaison (Knezevic *et al.*, 2000). *S. aureus* possède également deux perméases glucose spécifiques, dont les gènes ne sont pas organisés en tandem. Le seul gène, détecté sur les génomes séquencés de *S. aureus* et pouvant potentiellement coder une protéine similaire à GlcT, n'est pas génétiquement lié à *glcA*. Contrairement à *S. carnosus* et *S. aureus*, *S. epidermidis* semble avoir une seule perméase, et *glcA* et *glcT* ne sont pas en tandem. Il est intéressant de noter que les produits de ces gènes sont impliqués dans la régulation de la formation de biofilm chez une souche de *S. epidermidis* (Knobloch *et al.*, 2003). Aucun système PTS glucose spécifique n'a été actuellement décrit chez l'espèce *S. xylosus*.

1-5. Le saccharose

Un grand nombre de bactéries utilise le saccharose comme source de carbone. Le transport de ce disaccharide à travers la membrane cytoplasmique est réalisé principalement par le système PTS (Postma & Lengeler, 1985). Par ce mécanisme, le saccharose entre dans la cellule sous forme de saccharose-6-phosphate qui sera hydrolysé en glucose-6-phosphate et fructose, deux composés qui entreront ensuite dans la voie glycolytique.

Le saccharose peut également être directement clivé dans le milieu de culture par des enzymes extracellulaires telles que des levansucrases, levanases, fructosyl-transférases et glucosyl-transférases (Steinmetz *et al.*, 1985 ; Martin *et al.*, 1987 ; Munro *et al.*, 1991). Ces dernières permettent aux bactéries la formation de polymères, le fructan et le glucan, pouvant jouer un rôle dans la virulence (Wells *et al.*, 1993) ou servant de réserve d'énergie (Gering & Bruckner, 1996). Chez certaines bactéries, plusieurs mécanismes d'hydrolyse du saccharose ont été observés, notamment chez *B. subtilis* (Lepesant *et al.*, 1972) ou *Streptococcus mutans* (Munro *et al.*, 1991). Les gènes impliqués dans le transport et l'utilisation du saccharose sont souvent regroupés sur le chromosome en opéron ou en régulon. C'est chez *B. subtilis* que les mécanismes d'utilisation du saccharose sont actuellement les mieux décrits. Un contrôle positif de ce catabolisme a été montré via des mécanismes d'anti-terminaison transcriptionnelle (Stulke & Hillen, 2000).

Chez *S. xylosus*, une saccharose perméase codée par le gène *scrA* a été caractérisée. Elle est composée uniquement des domaines EIIBC (Wagner *et al.*, 1993). Le domaine EIIA essentiel à l'assimilation des sucres n'a pas été identifié. D'après les observations faites chez *E. coli* et *B. subtilis*, on peut se questionner sur l'existence d'une protéine EIIA saccharose spécifique indépendante. En effet, chez ces deux microorganismes, le domaine protéique EIIA^{Glc}, spécifique du glucose, existe à la fois sous forme indépendante ou fusionné au domaine de la perméase EIIBC^{Glc}. Dans le cas où le domaine protéique est seul, il sert de donneur de groupement phosphate aux enzymes EII saccharose spécifiques. Les enzymes GlcA/B, décrites chez *S. carnosus* comme impliquées dans le métabolisme du glucose PTS dépendant (chapitre III 1-4) sont très similaires aux enzymes EII glucose spécifiques de *E. coli* et *B. subtilis* (69% d'identité). Elles sembleraient être de bonnes candidates pour assurer la fonction du domaine EIIA saccharose spécifique manquant. Une fois le saccharose-6-phosphate internalisé, il est clivé par une saccharose phosphate hydrolase (sucrase) codée par le gène *scrB*, donnant ainsi du glucose-6-phosphate et du fructose (Brückner *et al.*, 1993). Le fructose est ensuite phosphorylé par une fructokinase codée par *scrK* (Jankovic & Bruckner, 2007). Les gènes *scrB* et *scrK* sont co-localisés et organisés un opéron. Le gène *scrA* est indépendant et n'est pas lié génétiquement.

L'expression des deux gènes *scrA* et *scrB* est induite par la concentration de saccharose présente dans le milieu. Cette régulation est sous la dépendance d'un répresseur de type LacI/GalR codé par le gène *scrR*, localisé en amont du gène *scrB* (Gering & Bruckner, 1996). Une séquence palindromique imparfaite sur les gènes *scrA* et *scrB* sert de site de fixation à ScrR. La symétrie (zone répétée inversée) de cette séquence suggère que ScrR comme la plupart des régulateurs des protéines de la famille GalR-LacI se lie de façon dimérique à son ADN cible. En plus de la régulation ScrR dépendante, l'expression de la saccharose perméase ScrA est soumise à la répression catabolique du carbone via la protéine CcpA (catabolite control protein) (chapitre III 1-10). Il semblerait qu'il en soit de même pour l'expression de la sucrase ScrB. En effet, on observe chez un mutant *scrB*, muté au niveau de son site de fixation à ScrR, une légère réduction de l'expression de la sucrase ScrB.

L'utilisation du saccharose n'a été étudiée que chez *S. xylosus* au sein du genre *Staphylococcus*. Les génomes des staphylocoques actuellement séquencés montrent la même organisation des gènes *scrA*, *scrB*, *scrK* et *scrR* que *S. xylosus*.

1-6. Le xylose

Le xylose est un pentose, très présent dans le bois et d'autres matières végétales. Malgré que

certaines souches de *S. equorum*, *S. gallinarum* soient capables de métaboliser le xylose, son utilisation est une des spécificités de l'espèce *S. xylosus* (Kloos & Schleifer, 1986). L'analyse de son assimilation par *S. xylosus* constitue l'unique information sur l'utilisation des pentoses par les staphylocoques. Le métabolisme du xylose a été décrit chez d'autres bactéries telles que *E. coli* (Song & Park, 1997), *Lactobacillus* spp. (Bor *et al.*, 1992 ; Lokman *et al.*, 1997), *L. lactis* (Erlandson *et al.*, 2000) et *Bacillus* spp. (Gärtner *et al.*, 1988). Chez *S. xylosus* et les autres bactéries étudiées, trois gènes *xylA*, *xylB* et *xylR* sont impliqués dans le catabolisme du xylose (Sizemore *et al.*, 1991 ; Sizemore *et al.*, 1992). Ils codent respectivement une xylose isomérase XylA, une xylulokinase XylB et un régulateur XylR. XylA entraîne l'isomérisation du xylose en xylulose. Celui-ci sera phosphorylé par XylB, via une réaction ATP dépendante. Le xylulose-5-phosphate produit, entrera dans la voie des pentoses phosphates, notamment chez *S. xylosus*, ou la voie des phosphokétolases observée chez les bifidobactéries ou les levures (Meile *et al.*, 2001 ; Sonderegger *et al.*, 2004). Chez *S. xylosus*, des études transcriptionnelles ont montré que *xylAB* était transcrit de façon indépendante par un promoteur en amont de *xylA*. La transcription initiée au promoteur de *xylA* est inductible par l'addition de xylose dans le milieu de culture alors que la transcription de *xylR* est constitutive. La régulation de l'expression de *xylAB* est dépendante de la protéine XylR qui agit comme un répresseur lorsqu'elle est liée au xylose (Sizemore *et al.*, 1991 ; Sizemore *et al.*, 1992). D'une façon plus générale, cette protéine agit comme un répresseur chez les bactéries à Gram positif. Par contre chez *E. coli* et *Salmonella*, XylR est un activateur en présence de xylose (Shamanna & Sanderson, 1979 ; Song & park, 1997). L'assimilation du xylose est également soumise à la répression catabolique du carbone (chapitre III. 1-10). Les gènes codant les protéines impliquées dans le transport du xylose, chez *S. xylosus*, ne sont pas identifiés, mais il a été montré que ce pentose entre dans la cellule sous forme non modifié par un système indépendant du système PTS. En effet, la transcription du gène *xylA*, complétement chez une souche de *S. carnosus* est induite par une faible concentration en xylose (Sizemore *et al.*, 1992). Or, *S. carnosus* est naturellement incapable de métaboliser le xylose et ne possède donc pas de système de transport spécifique du xylose. Cette espèce ne possède pas non plus, de transporteur d'arabinose et de ribose, sucres proches du xylose. Chez d'autres genres bactériens, il a été montré le xylose libre était transporté via des symporters à faible affinité (XylE ou XylT) ou des complexes protéiques à haute affinité (XylFGH) (Davis & Henderson, 1987 ; Schmiedel *et al.*, 1997 ; Chaillou *et al.*, 1998).

1-7. Le maltose

Le maltose est un diholoside composé de deux molécules de glucose, il est communément connu sous le nom de sucre de malt, car il apparaît dans les grains d'orge en germination. Si une unité de glucose lui est ajoutée, celui-ci devient le maltotriose, puis si une deuxième lui est ajoutée, du malto-tétrade, et ainsi de suite, formant alors un oligosaccharide avec une chaîne de glucose plus ou moins longue, appelé maltodextrine. Le maltose et les maltodextrines forment le groupe des maltosaccharides.

L'assimilation des maltosaccharides avait été étudiée uniquement chez les bactéries à Gram négatif avant l'étude réalisée chez *S. xylosus* par Egeter *et al.* (1995). Chez cette espèce, l'assimilation du maltose et des maltodextrines est dépendante d'une α -D-1,4-glucosidase ou maltase, dont le gène *malA* est le second gène de l'opéron *malRA*. MalA, en clivant les *p*-NP-glucosides, dégrade le maltose et les maltodextrines en libérant du glucose. Cette enzyme montre une spécificité envers ses substrats et dégrade plus efficacement le maltose. Cependant, elle est capable de cliver des maltodextrines à longue chaîne de plus de 7 unités de glucose. MalA est également capable, chez *S. xylosus*, de cliver le saccharose même si cette enzyme joue un rôle mineur dans ce catabolisme. Egeter *et al.* (1995) ont montré que l' α -D-1,4-glucosidase se distinguait clairement des enzymes impliquées dans le catabolisme des maltosaccharides chez *E. coli* et *Streptococcus pneumoniae*. Chez ces deux espèces, une amyloamylase, des phosphorylases de maltodextrines et des glucosidases de maltodextrines sont impliquées dans la dégradation des maltosaccharides. C'est chez *S. xylosus* que l'on a observé, pour la première fois, chez une bactérie, une enzyme de type α -glucosidase impliquée dans le catabolisme du maltose (Egeter & Brückner, 1995). En effet, ce type d'enzyme n'avait alors été observé que chez des levures. Depuis, MalA a été étudiée chez une autre bactérie Gram positive, *B. subtilis*, où elle est codée par un opéron composé de 3 gènes *malA* (codant une α -D-1,4-glucosidase), *glvR* (codant un activateur de l'opéron) et *malP* (codant une enzyme EIICB^{Mal}) (Brückner & Rosenstein, 2006). Le gène *malA* est également présent sur les génomes des staphylocoques séquencés, toujours sous sa forme bicistronique *malRA*. Des études par mutation et complémentation de *malA* et *malR* chez *S. xylosus* ont permis de montrer que *malA* ne possédait pas son propre promoteur et qu'il devait être cotranscrit avec *malR*. Curieusement, l'expression de *malA* n'est pas modulée par les maltosaccharides, et une mutation du gène *malR* n'induit pas de changement de l'expression de la protéine correspondante. Il a été observé, de plus, que l'expression de *malR* était également indépendante d'une régulation par le maltose et que MalR

n'autorégulait pas la transcription de son propre gène. La présence d'un motif de type *cre* (catabolite response element) au niveau de la région promotrice de *malR* indique que l'opéron *malRA* est soumis à la répression catabolique (chapitre III. 1-10). MalR appartient à la famille des régulateurs GalR-LacI impliqués dans la régulation des mécanismes d'assimilation du maltose (Egeter & Brückner, 1995). Curieusement, une mutation par transposition chez *S. xylosus* a montré que l'inactivation d'un système PTS tréhalose induit une légère diminution de l'utilisation du maltose par la bactérie (Brückner & Rosenstein, 2006). Sur les génomes actuellement séquencés de *S. aureus*, des gènes codant des systèmes de transport de maltosaccharides sont détectables. Aucun mécanisme de transport du maltose et des maltodextrines n'a été encore identifié chez *S. xylosus*.

1-8. Le mannitol

Le mannitol est un polyol souvent utilisé dans les milieux de culture sélectifs pour différencier les deux principales espèces de staphylocoques impliquées dans des cas cliniques, *S. aureus* qui catabolise le mannitol et *S. epidermidis* qui ne le catabolise pas. Cependant, ce test n'est pas discriminant au sein du genre *Staphylococcus* car d'autres espèces telles que *S. carnosus*, *S. simulans*, *S. capitis*, *S. simulans*, *S. sciuri*, *S. lentus*, *S. gallinarum*, *S. saprophyticus* et certaines souches de *S. xylosus*, notamment, sont mannitol positives. Le système PTS du mannitol a été bien décrit chez *S. carnosus* (Fischer & Hengstenberg, 1992). Il comprend deux enzymes EIICB codées par *mtlA* et EIIA codée par *mtlF*, qui forment le complexe PTS spécifique du mannitol. En aval de *mtlA*, le gène *mtlD* codant une mannitol-1-phosphate déshydrogénase est présent, celui-ci permet la dégradation du mannitol-1-phosphate en fructose-6-phosphate. Chez les souches de *S. aureus* séquencées, ces gènes sont présents et leur organisation est conservée (Brückner & Rosenstein, 2006). Chez *S. carnosus* et *S. aureus* une régulation des gènes *mtl* par anti-terminaison est supposée. A ce jour, aucune étude sur les mécanismes d'assimilation du mannitol chez *S. xylosus* n'a été effectuée. Il est juste à noter que chez cette espèce, le mannitol peut être un produit intracellulaire issu du métabolisme du glucose, probablement via le mannitol-1-phosphate (Edwards *et al.*, 1981). Certaines souches de *S. xylosus* peuvent produire une forte concentration de mannitol intracellulaire comparée à d'autres espèces de staphylocoques.

1-9. Le lactose et le galactose

La voie métabolique du lactose, principal sucre du lait (de 20 à 80 g.L⁻¹), n'est pas universelle chez les staphylocoques. En effet chez *S. xylosus*, l'assimilation du lactose diffère de celle observée chez *S. aureus* (Figure 10).

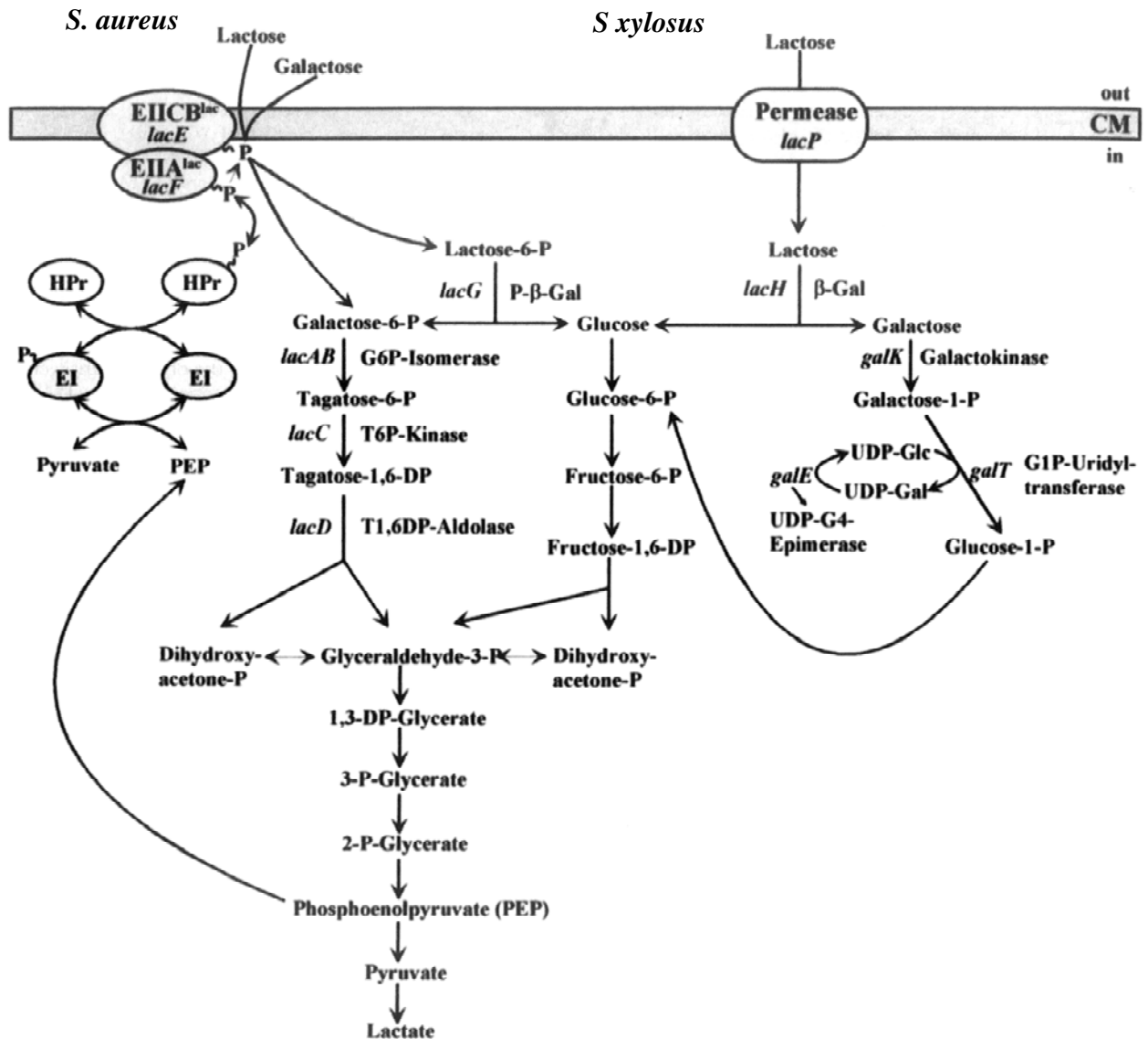


Figure 10 : Voies cataboliques alternatives du lactose chez les staphylocoques (Brückner & Rosenstein, 2006)

CM, membrane cytoplasmique ; EI, enzyme I ; EIHA_{lac}, enzyme lactose spécifique EIHA ; EIICB_{lac}, enzyme lactose spécifique EIICB ; HPr, protéine contenant une histidine ; β-Gal, β-galactosidase ; P-β-Gal, phospho-β-galactosidase ; G6P-Isomérase, galactose-6-phosphate isomérase ; G1P-uridylyltransférase, galactose-6-phosphate uridylyltransférase ; T6P-Kinase, tagatose-6-phosphate kinase ; T1,6 DP-Aldolase, tagatose-1,6-phosphate aldolase ; Udp-Gal, UDP-galactose ; UDP-Glc, UDP-glucose ; UDP-G4-Epimérase, UDP-galactose-4 épimérase ; PEP, phosphoenolpyruvate ; P, phosphate ; DP, diphosphate.

Chez *S. aureus*, le lactose ainsi que le galactose sont assimilés via un système PTS et le lactose-6-phosphate est clivé par une phospho- β -galactosidase pour donner une molécule de galactose-6-phosphate et du glucose (Breidt & Stewart, 1987 ; Breidt *et al.*, 1987). Chez *S. xylosus*, le lactose est assimilé, non phosphorylé, par une lactose perméase appartenant à la famille des protéines GPH qui transportent les galactosides, les pentoses et les hexuronides (Poolman *et al.*, 1996). Une étude récente montre, par homologie avec d'autres types de perméases, que cette perméase serait en fait une mélibiose perméase (Djordjevic *et al.*, 2001). L'assimilation du galactose chez *S. xylosus* n'a jamais été étudiée mais cette perméase peu spécifique pourrait participer au transport de ce sucre.

Chez *S. xylosus*, la lactose perméase est codée par le gène *lacP*, qui est le premier gène de l'opéron lactose (Bassias & Brückner, 1998). Le gène en aval, *lacH* code une β -galactosidase qui hydrolyse le lactose en glucose et galactose. Par conséquent, l'utilisation du lactose chez *S. xylosus* est dépendante de la phosphorylation du glucose et du galactose par des kinases.

Comme nous l'avons vu précédemment (chapitre III 1-4), le gène codant la glucose kinase a été caractérisé chez *S. xylosus* (Wagner *et al.*, 1995). Une fois le glucose phosphorylé en glucose-6-phosphate, il est catabolisé par la voie d'EMP (Figure 10). Le gène codant la galactokinase a été identifié chez *S. xylosus* après construction d'une banque de mutants mais il n'a pas, à ce jour, été encore caractérisé (Brückner *et al.*, 1993). Le galactose une fois transformé en galactose-1-phosphate rejoindra quant à lui la voie métabolique de Leloir (Figure 10) alors que chez *S. aureus*, il rejoint la voie du tagatose-6-phosphate. *lacPH* forme chez *S. xylosus* un opéron positivement contrôlé par LacR, un régulateur appartenant à la famille des régulateurs de type AraC/XylS.

Le gène codant ce régulateur est positionné en amont de l'opéron et orienté de façon opposée à l'opéron *lacPH*. Chez *S. aureus*, les gènes impliqués dans le métabolisme du lactose sont eux aussi organisés en opéron *lacABCDFEG*. Le régulateur *lacR*, correspondant à un répresseur de la famille des régulateurs DeoR, est localisé en amont, dans le même sens que l'opéron *lacABCDFEG*. Chez *S. xylosus*, l'ajout de lactose dans le milieu de culture induit l'opéron *lacPH*, alors que l'ajout galactose est sans effet. Chez *S. aureus*, la supplémentation du milieu en lactose ou en galactose entraîne une induction des gènes *lac*, le galactose-6-phosphate étant l'inducteur intracellulaire. En plus de ces régulations, il a pu être observé chez ces deux espèces, que le régulateur LacR était soumis à la répression catabolique du carbone (Brückner & Rosenstein, 2006).

1-10. La répression catabolique du carbone

Le terme de répression catabolique du carbone (RCC) est utilisé pour désigner un phénomène général chez les micro-organismes qui consiste à la répression de l'expression de certains gènes ou opérons par la présence d'une source de carbone dans un milieu, les produits de ces gènes étant très souvent liés à l'utilisation de sources de carbone alternatives (Saier *et al.*, 1995 ; Saier *et al.*, 1996 ; Brückner & Titgemeyer, 2002). Si plus d'un carbohydrate est présent dans le milieu de culture, la bactérie s'adapte et n'utilise qu'une seule source de carbone à la fois et laisse l'autre substrat dans le milieu pour une utilisation future. La cause majeure de l'utilisation préférentielle de certains sucres est le détournement de l'induction substrat spécifique des gènes du catabolisme. La plupart des études relatent la préférence du glucose comme source de carbone chez les bactéries. Chez les staphylocoques, le glucose est également une source de carbone privilégiée et de nombreuses publications mentionnent l'influence de ce sucre sur le contenu en cytochrome et dans de nombreux procédés cellulaires tels que l'utilisation de sources de carbone alternatives, la production d'enzymes extracellulaires, l'activité des enzymes glycolytiques (Brückner & Rosenstein, 2006). Si l'issue de la RCC est identique, c'est à dire la réduction de l'expression de certains gènes ou opérons, les mécanismes menant à cette répression sont assez divers. La répression liée à une source de carbone peut entraîner une diminution de la concentration d'inducteurs spécifiques à une voie catabolique alternative, une altération de l'activité de régulateurs spécifiques, ou encore une activation des protéines de contrôle globale telles que la protéine catabolique activatrice de gènes (CAP) chez les entérobactéries ou la protéine de contrôle catabolique (CcpA) chez les bactéries à Gram positif de bas G-C %.

Chez *S. xylosus*, toutes les voies métaboliques des sucres décrites sont soumises à la répression catabolique du carbone et tout particulièrement celle du glucose.

1-10.1. L'induction spécifique par le carbohydrate

L'existence de deux modes de transport des sucres, sous forme phosphorylé via le système PTS ou via un système PTS indépendant, sont des facteurs particulièrement importants pour la RCC. Les différents procédés impliqués dans la préférence pour un substrat, via la diminution de l'expression de voies métaboliques alternatives, sont l'exclusion de l'inducteur ou son expulsion (Saier *et al.*, 1996) et/ou le contrôle de l'activité du régulateur par phosphorylation (Stulke *et al.*, 1998).

L'exclusion de l'inducteur est un phénomène de régulation qui consiste en l'inhibition de l'assimilation d'une source de carbone par un autre carbohydrate. Chez les bactéries Gram

positives à bas G-C %, un composant du système PTS, la « phosphocARRIERE protéin » HPr, est impliquée dans l'exclusion de l'inducteur. La forme phosphorylée sur la sérine P-Ser-HPr en position 46 par une HPr kinase est essentielle à la répression du transport de sucres PTS indépendant *in vivo* chez *Lactobacillus casei* (Dossonnet *et al.*, 2000) et *Lactococcus lactis* (Monedero *et al.*, 2001). Chez les staphylocoques, ce mécanisme n'a jamais été étudié. De plus, chez *L. lactis* et *L. casei*, les mécanismes biochimiques impliqués dans l'inhibition des perméases par P-Ser-HPr restent inconnus.

L'expulsion de l'inducteur est un mécanisme qui contribuerait à la RCC chez quelques bactéries à Gram positif (Saier *et al.*, 1996). Ce phénomène a été observé lors d'études sur l'assimilation d'hydrates de carbone non métabolisables. L'addition d'une source de carbone rapidement métabolisable entraînerait une rapide expulsion du sucre accumulé. Il a été montré chez *L. lactis* et *L. casei* que la P-Ser-HPr ne jouerait aucun rôle dans le mécanisme d'expulsion de l'inducteur (Dossonnet *et al.*, 2000 ; Monedero *et al.*, 2001). De plus, ce mécanisme est encore très mal connu et son impact physiologique sur la RCC reste incertain. Il est décrit chez quelques bactéries Gram positives mais ne semble pas être opérationnel chez *S. aureus* et *S. xylosus* (Brückner & Rosenstein, 2006).

Un domaine protéique dupliqué spécialisé, le domaine PRD («PTS regulation domain»), permet un autre mode de contrôle de l'induction carbohydre spécifique. Ce domaine PRD est présent à la fois sur des anti-terminateurs ou des activateurs (Stulke *et al.*, 1998). Il module l'induction sucre spécifique, principalement celle des opérons des gènes du catabolisme des hydrates de carbone PTS dépendants, via un jeu complexe de phosphorylations régulées par le système PTS. La perméase du système PTS, en agissant négativement sur le régulateur, est nécessaire à l'induction sucre spécifique. La plupart des régulateurs contenant un domaine PDR ont besoin d'être phosphorylés par la protéine P-His-HPr pour être actifs. Cette régulation positive permet à la RCC de contrôler le processus d'induction, en effet si la phosphorylation du domaine PRD est empêchée, par exemple par le transport d'un autre substrat, l'induction n'a pas lieu. Le résultat final de ce mécanisme de régulation est le même que celui obtenu par le mécanisme d'exclusion de l'inducteur, cependant celui-ci ne peut fonctionner que dans le cas où l'assimilation du sucre concerné est PTS dépendante. Il est à noter, que la compétition entre les différentes perméases du système PTS pour le groupement phosphate de P-His-HPr, est également une autre voie de contrôle pour l'utilisation hiérarchique des sucres (Postma *et al.*, 1993). Comme nous l'avons vu chez *S. xylosus*, peu de mécanismes d'assimilation de sucres sont PTS

dépendants, nous pouvons donc supposer que chez cette espèce, le mécanisme d'exclusion de l'inducteur est le mécanisme de contrôle de l'induction sucre spécifique le plus courant.

1-10.2. Le contrôle transcriptionnel par des régulateurs globaux

L'activation des systèmes globaux de contrôle de transcription, en réponse à la disponibilité en hydrates de carbone d'un milieu, est le mécanisme le plus étudié dans la RCC. Celui-ci est fonctionnellement très différent entre les entérobactéries et les bactéries Gram positives à bas G-C %. Chez les entérobactéries, il existe un mécanisme d'activation via la protéine CAP (Busby & Ebright, 1999) alors que chez les bactéries Gram positives à bas G-C%, le mécanisme de régulation négative est réalisé par la protéine CcpA (Henkin, 1996).

Chez les bactéries à Gram négatif, la protéine CAP active la transcription de plus de 100 promoteurs et dans certains cas, induit également une répression. Elle a besoin d'un effecteur allostérique, l'AMPc, pour se fixer sur l'ADN, sa régulation est donc étroitement liée à la concentration intracellulaire d'AMPc (Figure 11).

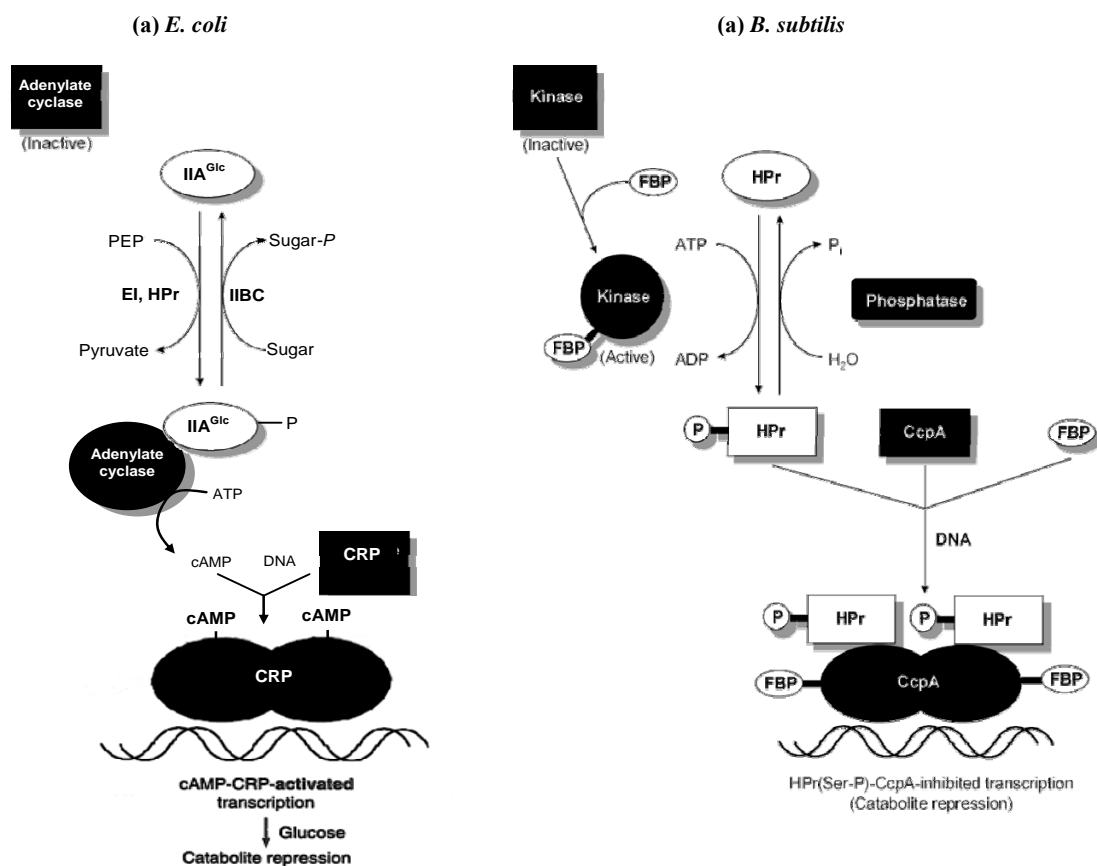


Figure 11 : Modèle hypothétique de la répression catabolique induite par le système phosphotransférase du système PTS chez (a) *E. coli* et (b) *B. subtilis* (Saier *et al.*, 1995)

Cette concentration est ajustée par une adénylate cyclase dont l'activité dépend de la forme phosphorylée de EIIA^{glc} (P-EIIA^{glc}). CAP subit également une autorégulation en fonction de sa propre concentration intracellulaire. En plus de contrôler les gènes impliqués dans le catabolisme des hydrates de carbone, cette protéine est impliquée dans un grand nombre de processus cellulaires (Busby & Ebricht, 1999).

Chez les bactéries Gram positives à bas G-C%, CcpA est une protéine centrale dans la répression catabolique du carbone (Henkin, 1996). Cette protéine est un membre de la famille des facteurs de transcription de type GalR-LacI (Weickert & Adhya, 1992). Des études sur le génome de *B. subtilis* ont montré que plus de 300 gènes étaient régulés par CcpA (Moreno *et al.*, 2001). Cette protéine fonctionne principalement comme un répresseur de transcription, mais son implication dans l'activation de certains gènes a également été décrite. Ce régulateur nécessite la présence du co-répresseur P-Ser-HPr pour se fixer sur la séquence opératrice *cre* («catabolite responsive element»). La kinase phosphorylase HPrK bifonctionnelle phosphoryle HPr en présence d'ATP et de fructose-1,6-diphosphate, un intermédiaire catabolique (Galinier *et al.*, 1998 ; Kravanja *et al.*, 1999). HPrK est donc l'enzyme senseur pour la répression catabolique chez les bactéries AT-riches à Gram positif, liant ainsi l'activité glycolytique à la régulation transcriptionnelle. Quand la concentration en phosphate est supérieure à celle de l'ATP et du fructose-1,6-diphosphate, HPrK déphosphoryle P-ser-HPr, menant à la formation de HPr et d'un pyrophosphate (Mijakovic *et al.*, 2002). Le pyrophosphate est ensuite, le plus souvent exclu par une pyrophosphatase YvoE, dont le gène est localisé dans l'opéron de *hprK* (Mijakovic *et al.*, 2002). Comparés à CAP, relativement peu de détails fonctionnels sur l'action de CcpA sont connus. Parmi les staphylocoques, la RCC CcpA- et HPrK-dépendante a été analysée en détail chez *S. xylosus* (Egeter & Bruckner, 1996 ; Huynh *et al.*, 2000 ; Jankovic *et al.*, 2001 ; Jankovic & Bruckner, 2002 ; Jankovic & Bruckner, 2007) (Figure 12).

L'inactivation du gène *ccpA* entraîne une perte pléiotropique de la régulation de plusieurs promoteurs incluant un des deux promoteurs de *ccpA*. L'expression de CcpA est donc sous contrôle d'une autorégulation, reflétant de manière évidente la nécessité pour *S. xylosus* d'équilibrer de façon très précise la régulation de CcpA (Egeter & Bruckner, 1996). La perte de l'activité HPr kinase/phosphorylase par l'inactivation du gène *hprK* abolit totalement la répression catabolique CcpA-dépendante ainsi que la répression liée à l'exclusion de l'inducteur. En plus de la perte de la RCC chez la souche de *S. xylosus* HPr kinase/phosphorylase déficiente, un phénotype inattendu a été observé. La croissance de cette souche est inhibée par le glucose et le transport du glucose se fait à une concentration

plus élevée que pour la souche sauvage. Du méthylglyoxal est également produit indiquant un métabolisme du glucose perturbé. La répression catabolique du carbone semble donc nécessaire à l'équilibre de l'assimilation des hydrates de carbone et à la protection cellulaire contre les effets nocifs d'une utilisation illimitée de sucres (Brückner & Titgemeyer, 2002). Considérant les génomes de staphylocoques actuellement séquencés, il semblerait que les mécanismes de la RCC observés chez *S. xylosus* soient également présents chez les autres staphylocoques.

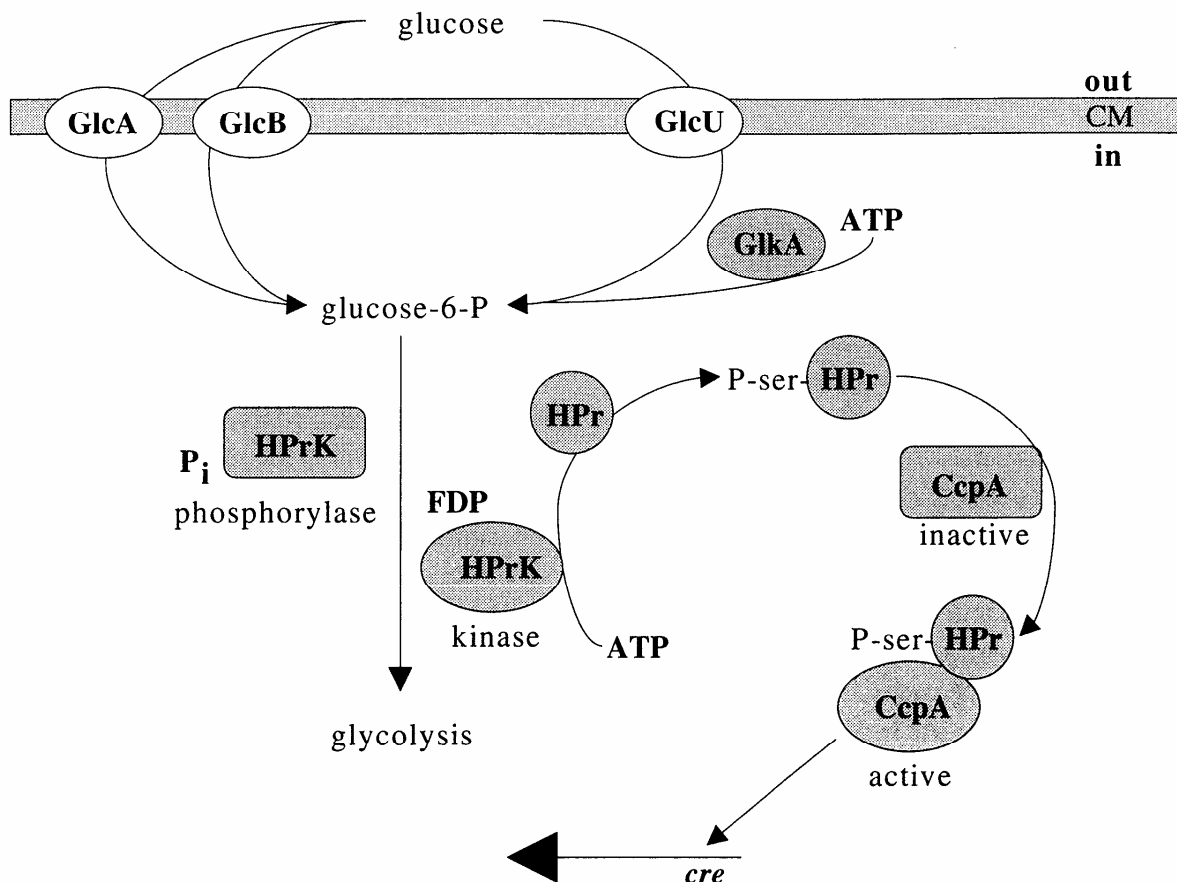


Figure 12 : La répression catabolique du glucose par la protéine CcpA chez les staphylocoques (Brückner & Rosenstein, 2006)

FDP, fructose-1,6-diphosphate ; CM, membrane cytoplasmique ; HPr, « histidine containing protein » ; HPrK, HPr kinase ; GlcA, EIIA^{Glc} ; GlcB, EIIB^{Glc} ; GlcU, protéine d'assimilation glucose ; GlkA, glucose kinase ; CcpA, régulateur global de la répression catabolique des bactéries Gram positives ; *cre*, « catabolite responsive element »

2 - METABOLISME DES ACIDES AMINES

Chez *S. xylosus*, le champ des connaissances génétiques sur le métabolisme des acides aminés est très réduit. Ceci est d'autant plus surprenant que le catabolisme de certains acides aminés, notamment les acides aminés à chaîne latérale ramifiée, est responsable de la

formation de composés aromatiques très recherchés par les industriels. La plupart des études sont des études physiologiques sur la synthèse de molécules aromatiques à partir des acides aminés chez des souches de *S. xylosus* utilisées comme ferment.

2-1. La sérine transférase

La voie de biosynthèse de la L-cystéine est la principale voie d'incorporation du soufre inorganique dans les composés organiques. Dans ce processus, le sulfate inorganique, source la plus abondante de soufre, est capté et transformé en sulfide. Le sulfide est utilisé pour produire de la L-cystéine, qui entre dans la composition de protéines ou d'autres composés organiques contenant du soufre. Chez les bactéries, la L-cystéine est produite à partir du sulfide et d'un autre acide aminé, la sérine (Fiegler & Bruckner, 1997). La réaction se déroule en deux étapes. La première est catalysée par une sérine acétyltransférase (CysE) qui active la L-sérine par une acétyl-coenzyme A en O-acétyl-L-sérine. Dans la seconde réaction, l'enzyme O-acétyl-L-sérine(thiol)-lyase produit de la L-cystéine à partir du sulfide et de l'O-acétyl-L-sérine. L'assimilation et la réduction du sulfate, ainsi que la formation de cystéine, ont été très étudiées chez *Escherichia coli* et *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (Mansilla & de Mendoza, 2000). Chez ces bactéries au moins 22 gènes sont nécessaires au transport et à la réduction du sulfate, ainsi qu'à son incorporation dans la cystéine. Chez *E. coli*, la sérine acétyltransférase fait partie d'un complexe nommé cystéine synthase avec une des isoenzymes, la O-acétyl-L-sérine (thiol) lyase. Les gènes qui codent la cystéine synthase sont dispersés sur le chromosome de *E. coli*, mais sont contrôlés de façon coordonnée par l'activateur CysB en réponse à la limitation en soufre via l'O-acétyl-L-sérine (OAS) et la N-acétyl-L-sérine (NAS) (Kredich, 1992). Chez *E. coli* et *Providencia stuartii*, l'O-acétyl-L-sérine jouerait également un rôle de molécule signal extracellulaire et limiterait le développement des biofilms (Sturgill *et al.*, 2004). Chez les bactéries Gram positives, les gènes codant la cystéine synthase ont uniquement été détectés chez *B. subtilis* et *S. xylosus*. Chez *B. subtilis*, le gène *cysE* codant la sérine acétyltransférase a été premièrement étudié. Ce gène est inclus dans un opéron avec la glutamyl-tRNA synthase (*gltX*) et la cysteinyl-tRNA synthase (*cysS*) (Gagnon *et al.*, 1994). Alors que l'expression de *gltX* semble être constitutive, les gènes *cysE* et *cysS* sont sous un contrôle cystéine spécifique, via un système d'anti-termination T-Box où les ARNt jouent un rôle crucial d'effecteurs (Condon *et al.*, 1996a ; Grundy & Henkin Tina, 2002). Une stabilité différentielle des ARNm semble également participer à la régulation (Condon *et al.*, 1996b). Chez *S. xylosus*, la découverte du gène *cysE* fut totalement fortuite. En effet, lors de la construction d'une banque de

mutants par transposition, un mutant pour lequel le contrôle catabolique de l'expression de la β -galactosidase était altéré, a été isolé. Les analyses moléculaires ont montré que ce mutant arborait un transposon à l'intérieur du gène *cysE* codant la sérine acétyltransférase. Aucune explication claire n'a pu être apportée sur la relation entre l'expression de la β -galactosidase et la mutation de *cysE*. Une des explications avancée par les auteurs est que l'approvisionnement limité en cystéine déclenche une réponse drastique altérant l'expression globale des gènes (Fiegler & Bruckner, 1997). Chez *S. xylosus*, le gène *cysE* s'est avéré être nécessaire à la synthèse de la cystéine. Comme chez *B. subtilis*, il est inséré dans un opéron contenant également les gènes *gltX* et *cysS*. Ce dernier est un gène essentiel chez *B. subtilis*, la mutation par knock out de celui-ci étant létal pour la bactérie (Gagnon *et al.*, 1994). L'interruption de *cysE* par le Tn917 chez *S. xylosus* a induit deux phénotypes. Le premier correspondait à la perte de l'activité sérine acétyltransférase et l'incapacité pour le mutant de croître sur un milieu minimum. Le second phénotype correspondait à un taux de croissance réduit quelque soit la disponibilité de la cystéine exogène. Le premier phénotype a pu être remédié par une supplémentation de cystéine dans le milieu minimum ou la complémentation en *trans* du gène *cysE*. Cependant, la croissance du mutant restait plus lente que celle de la souche sauvage. Ces résultats ont montré qu'une mutation en *cis* était responsable d'un défaut de croissance. Les auteurs ont supposé qu'il pourrait y avoir un effet polaire du Tn917 sur l'expression de *cysS* (Fiegler & Bruckner, 1997). Chez *S. xylosus*, l'expression de *cysE* est régulée en fonction de la concentration en cystéine du milieu. Le système de régulation ressemble fortement à un système d'anti-terminaison comme celui observé chez *B. subtilis* (Grundy & Henkin Tina, 2002).

2-2. L'assimilation et la conversion de la choline

Une des particularités du genre *Staphylococcus* est sa capacité à survivre à des conditions de forte concentration en sel. La majorité des souches de *S. xylosus* est capable de croître à des concentrations en NaCl supérieures à 10 % (Schleifer & Kloos, 1975). Ces bactéries possèdent des mécanismes d'osmoprotection très efficaces et bien régulés. Chez de nombreux micro-organismes, l'osmotolérance est induite par des solutés compatibles ou osmoprotectants qui peuvent être accumulés dans la cellule pour contrebalancer l'augmentation de l'osmolarité du milieu, tout en préservant le métabolisme de la cellule. Parmi ces substances, la plus efficace et la plus connue est la glycine bêtaïne. Les bactéries accumulent la glycine bêtaïne via un système d'assimilation de cette molécule ou par synthèse de *novo* à partir de la choline. Le rôle osmotique de la choline et de son dérivé, la

glycine bêtaïne, a été étudié sur un plan physiologique chez les staphylocoques. Chez *S. aureus*, il a été montré que la choline pénètre dans la cellule en réponse à un stress osmotique via un système de transport inductible et qu'une fois dans la cellule, elle était convertie en glycine bêtaïne (Graham & Wilkinson, 1992 ; Kaenjak *et al.*, 1993). Les bases génétiques de l'assimilation de la choline et de sa déshydrogénation sont connues chez *E. coli* et *B. subtilis* (Boch *et al.*, 1994 ; Kappes *et al.*, 1999). Chez *B. subtilis*, un opéron (*gbs*) codant deux déshydrogénases, une glycine bêtaïne aldéhyde déshydrogénase (GbsA) et une choline oxydase (GbsB), a été décrit. La choline oxydase appartient à la famille des alcools déshydrogénases, elle représentait lors de sa détection, un nouveau type d'enzyme impliquée dans la synthèse de la glycine bêtaïne. Contrairement à *E. coli*, aucun gène codant une protéine de transport de la choline ou une protéine de régulation n'avait été identifié dans le locus *gbs* de *B. subtilis*. Chez *S. xylosus*, le locus *cud* codant les protéines d'assimilation et de conversion de la choline en glycine bêtaïne, a été accidentellement détecté suite à une réponse faussement positive lors du criblage d'une banque d'ADN génomique de la souche *S. xylosus* C2a (Rosenstein *et al.*, 1999). Une séquence nucléotidique de 6874 nucléotides, révélant 4 ORFs (open reading frames) a été identifiée. Les ORFs détectées correspondaient à des gènes codant des protéines similaires aux protéines responsables de l'assimilation et de la déshydrogénation de la choline décrite chez *B. subtilis* et *E. coli*. Ces gènes furent nommés *cudT*, *cudA*, *cudB* et *cudC* (Rosenstein *et al.*, 1999). Le gène *cudT* code la protéine de transport de la choline et sa séquence est proche du gène *betT* qui code un transporteur de la choline décrit chez *E. coli*. La protéine CudA correspond à une bêtaïne aldéhyde déshydrogénase qui possède 65% de similarité avec la protéine GbsA de *B. subtilis*. Une forte similarité a été trouvée entre la protéine CudB et BetA, une choline déshydrogénase décrite chez *E. coli*. La protéine CudC n'a montré aucune similarité avec des protéines de fonction connue, mais présentait une identité de 54% avec le produit du gène *orf-2*, localisé en amont de l'opéron *gbsAB* de *B. subtilis* (Boch *et al.*, 1994) et 29% d'identité avec une protéine de 180 acides aminés codée par une *orf* présente en amont du gène *opuB* de *B. subtilis* et qui code un système d'assimilation de la choline (AF008930). La fonction de cette protéine reste inconnue, mais une analyse de sa structure primaire laisse supposer qu'elle correspond à une protéine de régulation. Différentes études sur des mutants *cudAcudB*, *cudB* et *cudT* négatifs ont été réalisées. Un effet inhibiteur de la choline et de son dérivé déshydrogéné, la glycine bêtaïne, a été observé sur la croissance du double mutant *cudAcudB* et du mutant *cudB*. L'inhibition du mutant *cudAcudB* par la choline était dépendante de la concentration en sel dans le milieu, suggérant que le transport et

l'assimilation de la choline sont dépendants d'une osmolarité élevée. La croissance du mutant *cudT* se caractérisait par une grande phase de latence en présence de choline et d'une forte concentration en sel dans le milieu. Des essais de conversion et d'assimilation de la choline *in vitro* sur les mutants et la souche sauvage ont confirmé que CudA et CudB catalysent effectivement la conversion de la choline en glycine bêtaïne et que CudT était le transporteur responsable de l'assimilation de la choline chez *S. xylosus* (Rosenstein *et al.*, 1999). Des études d'expression, par extension de primer sur l'ARN total de *S. xylosus*, ont montré que la choline était le principal facteur d'induction de l'opéron *cudAB*. Les essais sur l'expression des gènes *cudC* et *cudT* n'ont pas été concluants, puisque aucun transcrit n'a été détecté. Les auteurs ont supposé que ces deux gènes devaient être transcrits à un niveau très inférieur à celui des gènes *cudAB* (Rosenstein *et al.*, 1999).

2-3. L'uréase

L'uréase (EC 3.5.1.5) catalyse l'hydrolyse de l'urée en ammoniac et en carbamate. Cette enzyme est un facteur de virulence chez *S. saprophyticus*, pathogène opportuniste responsable d'infections urinaires. En effet, l'uréase permet l'alcalinisation de l'urine ce qui peut entraîner la formation de calculs rénaux. De plus, elle participe à la persistance et au pouvoir invasif de cette bactérie dans la vessie (Kuroda *et al.*, 2005). Ce gène ainsi que les gènes codant une uréase chez *S. aureus* U500 et *S. aureus* Newman ont été isolés par criblage d'une banque d'ADN et clonés chez *S. carnosus*, une espèce connue pour ne pas avoir d'activité uréase. L'analyse de l'expression de l'uréase sur des milieux contenant différentes sources d'azote, chez les souches donneuses et les souches recombinantes, a révélé que l'activité de cette enzyme chez *S. xylosus* est très forte comparée à celles observées chez les deux souches de *S. aureus* et les souches *S. carnosus* recombinantes. *S. xylosus* C2a produit son enzyme de façon constitutive, contrairement aux souches de *S. aureus* qui montrent une activité nickel dépendante.

3 - METABOLISME DES LIPIDES

La production de lipases (glycérol ester hydrolases, EC 3.1.1.3) est une propriété générale des staphylocoques (chapitre II 1-1.3). Les lipases sont des enzymes qui hydrolysent des émulsions de lipides à longues chaînes d'acides gras. Actuellement, en plus de celles des génomes de staphylocoques séquencés, 14 séquences nucléotidiques de lipases staphylococciques ont été déposées dans les banques de données, dont deux pour l'espèce

S. xylosus : *gehM* (AF208229) et *sxl* (AY701336). Un grand nombre des lipases de staphylocoques est activé en interface, c'est-à-dire quand la limite de solubilité du substrat est atteinte. Certaines lipases possèdent des propriétés typiques des estérases car elles hydrolysent également, et parfois préférentiellement, des substrats monomériques à chaîne d'acides gras courts solubles dans l'eau comme la tributyrine ou le Tween et ne montrent aucune activation en interface (Rosenstein & Götz, 2000). Il existe par conséquent une incertitude sur la classification des enzymes staphylococciques lipolytiques : lipase ou estérase ? Ce dilemme existe également pour les enzymes lipolytiques de *Pseudomonas aeruginosa* et *Bacillus subtilis* (Rosenstein & Götz, 2000). Une redéfinition de ces deux classes d'enzymes hydrolysant les acyl-esters serait donc utile. Nous choisirons dans un esprit de clarté d'utiliser ici le terme de lipase, couramment accepté dans la littérature, pour désigner les enzymes lipolytiques des staphylocoques. La première lipase détectée chez *S. xylosus* fut *GehM*, mais cette lipase n'a été que très peu caractérisée. Les seules données la concernant proviennent indirectement de l'étude d'une lipase de *S. saprophyticus*, *Ssp* qui possède une similitude de 75% avec *GehM* (Sakinc *et al.*, 2005). Cette lipase semblerait plutôt être une estérase, car elle montre une activité lipolytique préférentielle sur de la tributyrine ou du Tween 20. Elle a tout particulièrement été étudiée chez *S. saprophyticus* car elle forme une couche fibreuse dense à la surface des cellules donnant un aspect « crépu » (Figure 13) (Sakinc *et al.*, 2005).

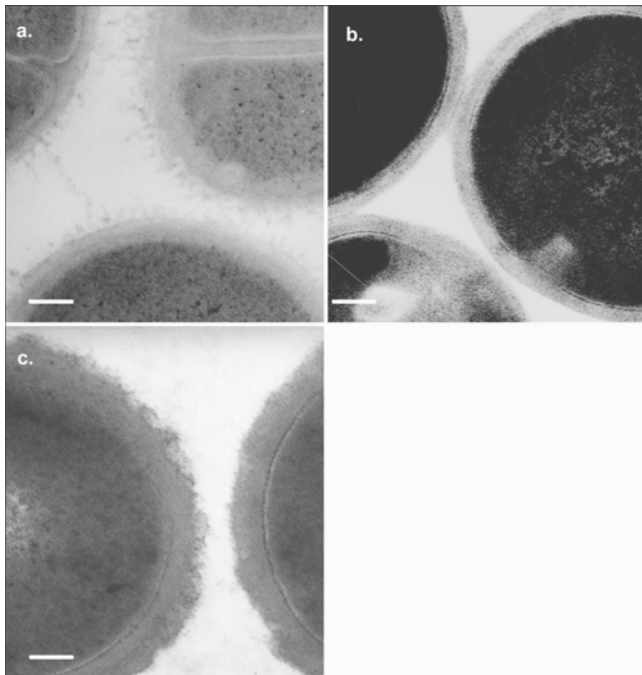


Figure 13 : Observation en microscopie électronique d'une souche sauvage et d'une souche mutante *ssp* de *S. saprophyticus* (Sakinc *et al.*, 2005)

Le mutant *ssp* (b) possède une surface lisse alors que la souche sauvage (a) revêt une surface « crépue ». Le mutant *ssp* complémenté avec un pMB1108-*ssp* retrouve une surface fibreuse dense (c).
Barre : 100 nm.

La lipase SXL de *S. xylosus* est la mieux caractérisée (Mosbah *et al.*, 2005). Cette lipase est excrétée par *S. xylosus* dans le milieu de culture. Elle est non induite par la présence de lipides à chaînes longues ou courtes d'acides gras, est monomérique et a une masse moléculaire de 43 kDa. Elle est thermostable et son activité est maximale à 45°C. SXL s'est avérée être la lipase staphylococcique la plus active sur une émulsion de trioléine, un lipide composé de longues chaînes d'acides gras. Cette enzyme est donc classée dans les « véritables lipases » (Mosbah *et al.*, 2005). D'un point de vue moléculaire, le gène codant cette lipase a été séquencé et la séquence protéique mature correspondante n'a montré que 53% de similarité avec GehM mais 99,74% avec la lipase de *S. simulans* (SSL). La partie N-terminale de la protéine SXL est identique à SSL et présente un haut degré de similarité avec la lipase de *S. aureus* NCTC8530 (SAL). Entre les deux protéines SXL et SSL, une substitution Gly 311 par Val, due à un seul nucléotide substitué, a été observée. Cette petite différence de séquence pourrait expliquer la différence de spécificité et de stabilité à température élevée observées chez les deux lipases (Mosbah *et al.*, 2005). Une étude approfondie du résidu Gly 311 a été réalisée par ces mêmes auteurs, après construction de mutants. Ce résidu est essentiel à l'activité catalytique et à la stéréo- et régio-sélectivité de la lipase SXL, mais n'a aucun rôle dans l'étape d'adsorption de l'enzyme à l'interface (Mosbah *et al.*, 2007). Enfin, Mosbah *et al.* (2006) ont montré que la région près du résidu Asp 290 était importante dans la reconnaissance du substrat et de la longueur de ces chaînes d'acides gras par la lipase SXL de *S. xylosus*. Un mutant de substitution Asp290-Ala a été construit et présentait la même affinité pour des lipides à longues et courtes chaînes d'acides gras, contrairement au phénotype sauvage. Chez *S. epidermidis*, la lipase GehD en plus de son activité lipasique est capable d'adhérer au collagène (Bowden *et al.*, 2002). Plusieurs études sur des souches virulentes de *S. aureus* et de *S. epidermidis* ont montré l'expression et la présence de lipases lors d'infections (Pourmand *et al.*, 2006 ; Burlak *et al.*, 2007).

Les industriels s'intéressent fortement aux activités lipolytiques des bactéries surtout lorsque, comme SXL, les lipases possèdent des températures d'activation élevées et sont thermostables. En effet, les applications biotechnologiques de ces enzymes sont nombreuses : utilisation dans l'industrie alimentaire ou l'industrie de synthèse de composés chimiques, utilisation comme détergent.

4 - PROPRIETES ANTI-OXYDANTES

La présence d'oxygène dans l'environnement est potentiellement toxique pour tout les êtres vivants. Cette toxicité est induite par les formes réactives de l'oxygène (ROS), générées comme sous-produits lors de la réduction univalente de l'oxygène de l'eau, qui peuvent endommager l'ADN, les protéines et les lipides (Barriere *et al.*, 2001). Les ROS incluent des radicaux superoxydes ($O_2^{\cdot-}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), et des radicaux hydroxyles (OH^{\cdot}). Pour ce défendre contre ces stress oxydatifs, la plupart des bactéries possèdent une ou des superoxydes dismutases (SODs) (EC 1.15.1.1), qui détoxifient le $O_2^{\cdot-}$ en H_2O_2 , qui est ensuite réduit en eau par des catalases (EC 1.11.1.6). Chez *S. xylosus*, les activités anti-oxydantes (catalase et SOD) sont connues pour être impliquées dans le maintien des qualités sensorielles des produits fermentés (chapitre II 1-1.4).

4-1. La superoxyde dismutase

Les superoxydes dismutases (SODs) sont des métallo-enzymes, classées en fonction de leur métal cofacteur. Il y a quatre grandes classes de SODs chez les bactéries, les SODs à manganèse (MnSOD), les SODs à fer (FeSOD), les SODs à nickel (NiSOD) et les SODs à cuivre et zinc (CuZnSOD) (Barriere *et al.*, 2001b). La plupart des souches de *S. aureus*, possèdent deux SODs. L'enzyme majeure, SODA, une MnSOD, est inductible (Clements *et al.*, 1999). La seconde SOD, une autre MnSOD moins étudiée, est codée par le gène *sodM* (Valderas & Hart, 2001). Elle est exprimée de manière constitutive et son activité est maximale en fin de phase exponentielle. Le gène *sodM* n'a été observé que chez l'espèce *S. aureus* et jamais chez les SCN (Valderas *et al.*, 2002). *S. xylosus* contient une seule SOD, de type MnSOD (Barriere *et al.*, 2001b). Sa séquence en acides aminés montre une grande similarité avec l'enzyme SodA de *S. aureus*. Elle n'est pas inhibée par le peroxyde d'hydrogène, et le manganèse est nécessaire pour le maintien de son activité en phase stationnaire, comme pour la SOD de *B. subtilis* (Inaoka *et al.*, 1998). Chez *S. xylosus*, en amont du gène *sodA*, un opéron potentiellement impliqué dans l'assimilation du zinc et sa régulation (*zurA*, *-M*, et *-R*) a été détecté. Cette organisation génomique semble être conservée chez les autres espèces de staphylocoques comme *S. aureus* et *S. epidermidis* (Barriere *et al.*, 2001b). Il ne semble pas que ZurR régule l'expression de *sodA* chez *S. xylosus*. Chez *B. subtilis*, l'analyse de la séquence nucléotidique indique que le gène *sodA* possède six promoteurs putatifs (Inaoka *et al.*, 1998). Barrière *et al.* (2001b) ont montré que le gène *sodA* de *S. xylosus* ne possédait que deux promoteurs fonctionnels. En milieu riche,

l'expression du gène *sod* chez cette espèce est induite en phase stationnaire de croissance, comme observée chez *S. aureus*. Ceci pourrait refléter le besoin d'une plus grande protection contre les oxydants toxiques accumulés lors du vieillissement cellulaire. Cependant, aucune induction n'a pu être observée dans un milieu chimiquement défini. Chez *S. xylosus*, le manganèse ne joue aucun rôle au niveau transcriptionnel contrairement à ce qui a pu être observé chez *E. coli*, où le manganèse active la transcription de *sodA* (Schrum & Hassan, 1993). Chez *S. xylosus*, le manganèse paraît être nécessaire uniquement à l'étape post-transcriptionnelle, lors de l'insertion du métal dans le site actif. Le gène *sodA* n'est pas essentiel à la croissance aérobie de *S. xylosus*, laissant supposer la présence d'autres mécanismes de protection (Barriere *et al.*, 2001b). Le mutant *sodA* construit par échange allélique chez cette espèce montre, en plus d'une perte totale d'activité SOD, un phénotype sensible aux hautes pressions en O₂ et au paraquat, substance qui génère des radicaux superoxydes. Le mutant *sod* montre également une auxotrophie à de multiples acides aminés (Barriere *et al.*, 2001b).

4-2. La catalase

Les catalases catalysent la transformation du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène. Elles jouent un rôle très important en réduisant la formation de radicaux hydroxyles hautement réactifs qui résultent de la transformation de H₂O₂ via la réaction de Fenton (Jang & Imlay, 2007). Les catalases sont divisées en trois groupes suivant les propriétés et la séquence des enzymes (Barriere *et al.*, 2002). Le premier groupe comprend des catalases monofonctionnelles de masses moléculaires moyennes comprises entre 220–350 kDa, elles sont formées par 4 sous-unités identiques, chacune contenant un groupe proto-hème. Le second groupe comprend des catalases bifonctionnelles ayant à la fois une activité catalase et peroxydase. Le troisième groupe est constitué par des catalases sans hème ou des catalases contenant un hème de type manganèse.

Chez beaucoup de bactéries, de multiples catalases sont présentes, chaque enzyme est codée par un gène différent et subit différents types de régulation. Chez *S. aureus*, un seul gène codant une catalase a été détecté et étudié, *katA*. Il a été montré que cette enzyme était régulée par un homologue du régulateur de l'assimilation du Fer (Fur), PerR (Horsburgh *et al.*, 2001). Chez la souche *S. xylosus* C2a, la construction d'un mutant délété du gène *katA* a montré qu'il existait chez cette souche 2 catalases (Barriere *et al.*, 2002). En effet, la mutation sur *katA* n'a entraînée qu'une légère diminution de l'activité catalase. Actuellement *S. xylosus* C2a est la seule souche du genre *Staphylococcus* pour laquelle la présence de deux

catalases ait été décrite. A ce jour, seule la catalase KatA de *S. xylosus* a été étudiée. Le gène de la seconde catalase, *katB*, a uniquement été séquencé (AY702101). KatA est un homologue des autres catalases staphylococciques décrites (Barriere *et al.*, 2002). Le centre actif ainsi que le site de fixation au NADPH de KatA sont conservés chez *S. xylosus*, ceci permettant de classer cette enzyme dans le groupe des catalases monofonctionnelles (Barriere *et al.*, 2002). L'environnement génétique du gène *katA* est cependant différent chez *S. xylosus* et *S. aureus* (Horsburgh *et al.*, 2001). Le gène *katA* de *S. aureus* est précédé par un gène codant une γ -aminobutyrate perméase et est suivi par les gènes *rpmG* and *rpsN* codant des homologues des protéines ribosomales 50S et 30S (Kuroda *et al.*, 2001). Les gènes codant une allantoïnase ou une carboxypeptidase sont chez *S. xylosus* à proximité du gène *katA* (Barriere *et al.*, 2002). La transcription de *katA*, chez *S. xylosus*, est induite par l'oxygène et en particulier le peroxyde d'hydrogène, lors de l'entrée en phase stationnaire. La transcription de *katA* est régulée négativement par le fer et encore plus par le manganèse. Chez *B. subtilis*, les mêmes types de régulation transcriptionnelle du gène *katA* ont été observés (Chen *et al.*, 1995). Il s'est avéré que la catalase de *B. subtilis*, KatA, faisait partie du stimulon peroxyde qui est régulé par le répresseur PerR (Bsat *et al.*, 1998). Chez *B. subtilis*, PerR semble être dépendant de la présence d'un ion métallique divalent pour se lier à l'ADN, le fer et le manganèse joueraient ce rôle. Chez *S. aureus*, Fur et PerR régulent la transcription de *katA*. Fur agit comme un activateur de transcription fer dépendant et PerR comme un répresseur manganèse dépendant. Chez *S. xylosus*, une Per box putative a été identifiée en position 3422–3438. Elle est identique sur 15 des 17 bases à la séquence consensus de la PerR box de *S. aureus* (ATTATAATTATTATAAT) (Horsburgh *et al.*, 2001). Ceci laisse supposer que la régulation de la transcription du gène *katA* chez *S. xylosus* est similaire à celle décrite chez *S. aureus*. Bien que le taux résiduel de l'activité catalase mesurée chez le mutant *katA* de *S. xylosus* soit important, Barriere *et al.* (2002) ont montré que KatA était essentielle à la résistance de *S. xylosus* à des taux élevés d'H₂O₂.

Comme nous l'avons décrit précédemment, l'oxydation des lipides est responsable de la production de composés qui peuvent affecter les qualités sensorielles et sanitaires des produits carnés fermentés (chapitre II 1-1.4). L'étude des mutants *katA* et *sodA* de la souche *S. xylosus* C2a comparée à la souche sauvage a permis de caractériser le rôle des deux enzymes KatA et SodA sur l'oxydation des acide gras libres (Barriere *et al.*, 2001a). En présence d'acide linoléique, un acide gras insaturé habituellement libéré lors de la lipolyse du gras de porc, les 3 souches (mutantes et sauvage) inhibaient l'oxydation de l'acide linoléique, mais Barriere *et al.* (2001a) ont montré que le mutant *katA*, et plus

particulièrement le mutant *sodA*, possédaient une activité anti-oxydante plus faible que la souche sauvage. Peu d'études sur les capacités anti-oxydantes bactériennes agissant contre l'oxydation des lipides ont été publiées. Seule une étude portant sur l'inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique par des bactéries lactiques avait été menée (Lin & Yen, 1999). Une inhibition de 7 à 12% de la peroxydation avait été observée en présence des bactéries lactiques (Lin & Yen, 1999). En présence de *S. xylosus*, cette inhibition est de 60% (Barriere *et al.*, 2001a). De plus, les propriétés anti-oxydantes des bactéries lactiques sont principalement attribuées à leur capacité à chélater les ions métalliques (Lin & Yen, 1999). Or, il est bien connu que les ions métalliques sous forme transitionnelle stimulent la peroxydation des lipides.

5 - PROTEINES DE L'ENVELOPPE

Les protéines de surface des bactéries à Gram positif jouent un rôle important dans les interactions avec les cellules hôtes, les surfaces abiotiques et entre les bactéries. Quelques protéines de surface ont été identifiées chez *S. xylosus* mais peu ont été caractérisées. La plupart des études portant sur ces protéines, chez *S. xylosus*, est le résultat de découvertes fortuites. Des protéines impliquées dans la défense contre l'hôte ou dans la formation de biofilm ont été plus précisément caractérisées chez *S. aureus*.

5-1. La protéine FemA

Le gène *femA* fait parti d'un opéron avec les gènes *femX* et *femB*. Il est impliqué dans l'initiation de la synthèse des peptides interchaînes du peptidoglycane (Maidhof *et al.*, 1991). FemA, FemB, et FemX sont 3 protéines impliquées dans la formation des ponts de pentaglycine chez *S. aureus* liant les chaînes de glycane entre elles. FemX ajoute la première glycine, FemA rajoute deux glycines, et FemB rajoute les deux dernières glycines (Figure 14) (Ehlert *et al.*, 1997). Les protéines Fem (factor essential for methicillin resistance) sont essentielles aux mécanismes de résistance à la méthicilline, mais sont également impliquées dans la résistance aux antibiotiques de la famille des β -lactames. La protéine FemA a été décrite pour la première fois chez *S. aureus* (Berger-Bachi *et al.*, 1989). Elle est conservée au sein du genre *Staphylococcus* et est présente à la fois chez les souches résistantes ou non aux antibiotiques. Le gène *femA* de *S. xylosus* a été détecté pour la première fois dans le cadre d'une étude envisageant l'utilisation du polymorphisme de *femA* pour le développement d'un outil d'identification des staphylocoques (Vannuffel *et al.*, 1999). La

fonction de ce gène n'a jamais été décrite chez l'espèce *S. xylosus*, cependant celle-ci doit être très proche de celle décrite chez *S. aureus*. Des essais par mutation chez *S. aureus* ont clairement montré le rôle de FemA et FemB dans la résistance à la méthicilline, l'inactivation soit de l'un soit de l'autre entraînant une large réduction de la résistance à cet antibiotique ainsi que des perturbations morphologiques tels qu'un retard de la division cellulaire et des divisions cellulaires atypiques, entraînant un phénotype « pseudomulticellulaire » (Figure 15) (Henze *et al.*, 1993).

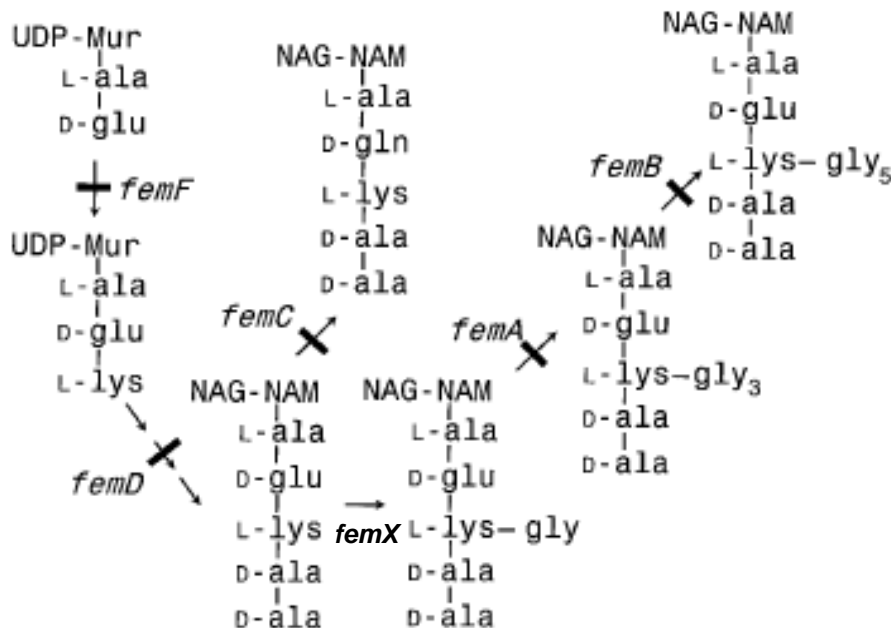


Figure 14 : Réactions de synthèse des précurseurs du peptidoglycane inhibées chez les différents mutants *fem*

UDP-Mur est le peptide précurseur de l'uridine diphosphomuramyl; NAG-NAM, l'acide N-acétylglucosamine-N-acétylmuramique

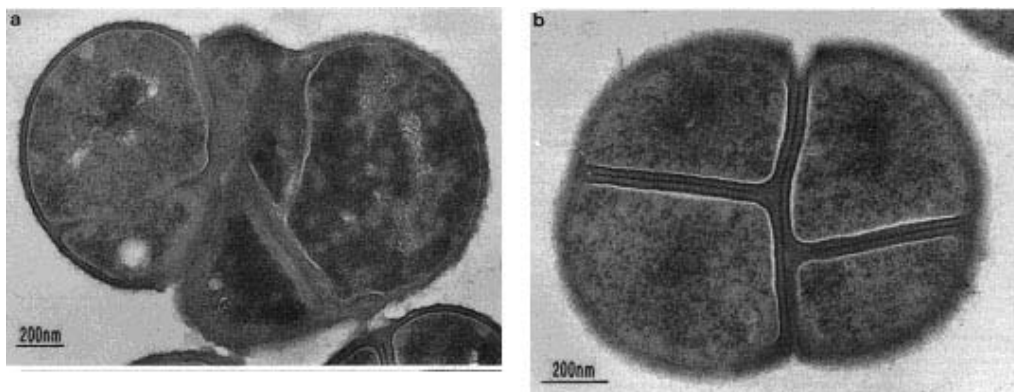


Figure 15 : Coupe d'un *S. aureus* muté sur les gènes *femA* et *femB* (Henze *et al.*, 1993)

- (a) *S. aureus* muté sur *femA* : Forme irrégulière et multicellulaire due à la perturbation de l'initiation de la synthèse de la paroi et au retard de la séparation des cellules sœurs.
- (b) *S. aureus* muté sur *femB* : Retard de la séparations des cellules soeurs mais forme cellulaire plus régulière

5-2. La protéine MprF

La protéine MprF (« multiplepeptide resistance factor ») a été détectée pour la première fois chez *S. xylosus* lors du criblage d'une banque de mutants sur la sensibilité à la gallidermine, un peptide antibiotique (Peschel *et al.*, 2001). Le gène impliqué a été séquencé et son homologue a été détecté chez *S. aureus* (Peschel *et al.*, 2001). Les deux séquences d'acides aminés déduites des gènes *mprF* de *S. xylosus* et *S. aureus* montraient plus de 80% de similarité. MprF est une protéine membranaire, une lysylphosphatidylglycérol (L-PG) synthase, qui permet d'échapper à la réponse défensive innée de l'hôte. Cette protéine est considérée comme un facteur de virulence chez *S. aureus*. Une souche de *S. aureus* mutée sur le gène *mprF* présente une virulence atténuée pour la souris car la mutation entraîne une augmentation de la sensibilité des bactéries aux neutrophiles et une augmentation *in vitro* de la sensibilité aux défensines (peptides antimicrobiens) (Peschel *et al.*, 2001). Le mutant *mprF* ne produit plus le lipide L-PG qui résulte de l'estérification du phosphatidylglycérol (PG) avec la L-lysine. La synthèse de ce lipide est impliquée dans l'instauration de la charge de surface de la membrane et influence donc l'interaction membrane - peptides antimicrobiens cationiques. Ces peptides ont en effet besoin de se lier aux groupements chargés, présents aux extrémités des lipides membranaires, avant de pouvoir être intégrés dans le coeur hydrophobe de la membrane cytoplasmique. La lysinylation des phospholipides semble également jouer un rôle similaire chez d'autres bactéries. Le L-PG a été décrit chez différentes espèces où un gène similaire à *mprF* a été identifié, tels que chez *E. faecalis*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa* et très récemment chez *Listeria monocytogenes* où MprF a également été décrit comme facteur impliqué dans la virulence (Peschel *et al.*, 2001 ; Thedieck *et al.*, 2006).

5-3. La protéine DltA

Les gènes *dlt* sont impliqués dans le transfert de la D-alanine dans l'acide teichoïque chez les bactéries Gram positives. Ils sont organisés en opéron qui contient 4 gènes *dltA*, *dltB*, *dltC* et *dltD* qui codent des catalyseurs de l'incorporation du résidu D-alanine dans les acides lipoteichoïques (LTAs). L'organisation de l'opéron *dlt* et sa séquence sont très conservés chez *S. aureus*, *S. xylosus*, *L. casei*, *Streptococcus agalactiae* et *B. subtilis* (Perego *et al.*, 1995 ; Peschel *et al.*, 1999 ; Poyart *et al.*, 2001 ; Koprivnjak *et al.*, 2006). Les études chez *L. casei* ont montré que *dltA* correspondait à une D-alanine-D-alanyl carrier protéine ligase (Dcl) qui active la D-alanine par hydrolyse de l'ATP et transfère celle-ci sur le cofacteur

phosphopantéthéine de la protéine D-alanine carrier (Dcp) codée par le gène *dltC*. La protéine hydrophobe DltB est indispensable à l'incorporation de la D-alanine dans l'acide teichoïque et est probablement impliquée dans le transfert de la D-alanine activée à travers la membrane cytoplasmique. La présence d'un peptide signal N-terminal sur la protéine DltD et le caractère essentiel de ce peptide ont permis de suggérer que la protéine DltD était impliquée dans le transfert de la D-alanine du transporteur membranaire vers l'acide teichoïque (Figure 16).

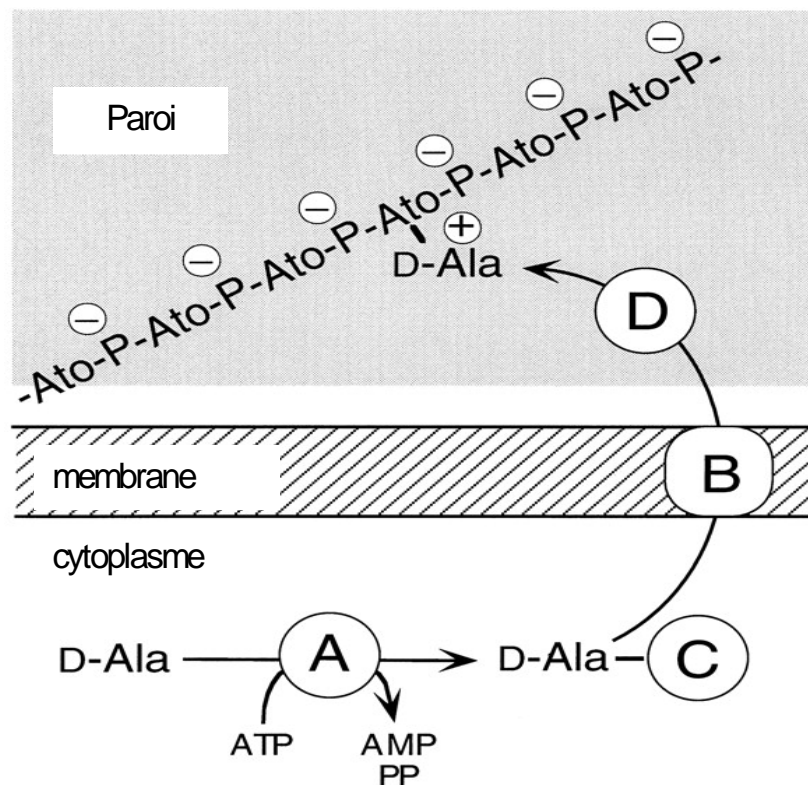


Figure 16 : Estérification des acides teichoïques

Une molécule d'acide teichoïque est composée par alternance de groupements ribitol (Ato) et de groupements phosphate (P), (Peschel *et al.*, 1999).

Chez *S. agalactiae*, deux gènes supplémentaires, *dltR* et *dltS*, codant un système à deux composants ont été détectés (Poyart *et al.*, 2001). Ils sont impliqués dans la régulation transcriptionnelle de l'opéron *dlt* dont ils font partie. Chez *B. subtilis*, l'opéron *dlt* fait partie des σ^x regulons et est régulé par les régulateurs transcriptionnels globaux AbrB et Spo0A. Il semblerait que chez les staphylocoques, la régulation de cet opéron soit également transcriptionnelle et Na^+ , Mg^{2+} et Ca^{2+} dépendante (Koprivnjak *et al.*, 2006). Chez *Streptococcus* et *Listeria*, il a été clairement montré que *dltA* était impliqué dans la virulence

des souches car les mutants *dltA* sont plus facilement reconnus par les macrophages murins lors d'infection (Spatafora *et al.*, 1999 ; Abachin *et al.*, 2002). Chez *S. xylosus* et *S. aureus*, le gène *dltA* a été détecté lors du criblage d'une banque de mutants sensibles aux peptides antimicrobiens (Peschel *et al.*, 1999). Chez ces deux espèces, les mutants *dltA* présentaient un acide teichoïque dépourvu de D-alanine qui adhérait moins aux protéines chargées négativement mais plus à celles chargées positivement. La réduction de la charge négative de la membrane par insertion de D-alanine par l'opéron *dlt* ou, comme décrit précédemment, par lysinilation grâce à la protéine MprF induit une meilleure résistance aux antibiotiques ainsi qu'une meilleure résistance aux défenses de l'hôte. Les mécanismes de multi-résistances aux antibiotiques sont répandus chez les bactéries à Gram positif et notamment chez les espèces pathogènes pour l'homme appartenant aux genres *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* et *Listeria* (Peschel *et al.*, 1999). Chez les bactéries Gram négatives, des mécanismes similaires existent, induisant des modifications de charge du lipopolysaccharide.

5-4. La protéine Bap

La protéine Bap («Biofilm associated protein») est associée à la paroi cellulaire. Elle a une masse moléculaire de 239 kDa chez *S. aureus* (Cucarella *et al.*, 2001). Initialement, la protéine Bap a été trouvée chez des isolats de mammites bovines des espèces *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. chromogenes*, *S. hyicus* et *S. xylosus* puis, récemment dans des isolats d'origine humaine de *S. epidermidis* et d'origine humaine et alimentaire de *S. xylosus* (Cucarella *et al.*, 2004 ; Tormo *et al.*, 2005). Chez *S. aureus*, la protéine Bap est responsable de la colonisation et de la persistance de la bactérie au niveau de la glande mammaire. La présence de Bap a aussi été corrélée à la formation de biofilm sur des surfaces abiotiques chez cette espèce (Cucarella *et al.*, 2001).

La protéine Bap a une architecture multidomaine caractéristique des protéines de surface des bactéries à Gram positif (Figure 17). Le domaine N-terminal (819 acides aminés) inclut une séquence signal (S) pour son exportation vers la paroi ainsi que deux régions A et B. La région A (acides aminés 45 à 360) contient deux courtes répétitions de 32 acides aminés (Cucarella *et al.*, 2001 ; Arrizubieta *et al.*, 2004 ; Tormo *et al.*, 2005). La région B (acides aminés 361 à 818) présente une grande similitude avec la protéine de surface Esp d'*Enterococcus faecalis*, responsable de la formation de biofilm chez cette espèce (Tendolkar *et al.*, 2004). Les deux régions A et B, ont des domaines de dimérisation permettant l'interaction entre deux molécules Bap, ceci permet aux bactéries d'adhérer entre elles. La protéine Bap agit ainsi à la fois comme récepteur et ligand. Dans ces régions,

on trouve aussi trois motifs de liaison au calcium « EF-hand like » (EF1, EF2-3), un quatrième se trouvant près du motif LPXTG d'ancrage à la membrane (EF4) (Cucarella *et al.*, 2002 ; Arrizubieta *et al.*, 2004). La protéine Bap peut agir comme une lectine et donc lie de manière « calcium dépendante » les sucres des exopolysaccharides des cellules voisines. La région centrale de Bap, ou région C, commence par une région espaceur (819 à 947 acides aminés) chez *S. aureus* (Cucarella *et al.*, 2001). La région entourant les résidus 948 à 2139 est composée d'un nombre variable de répétitions en tandem de 86 acides aminés. Il y a 13 répétitions pour *S. aureus* et 24 pour *S. xylosus* (Tormo *et al.*, 2005). La variation du nombre de répétitions entre les différentes espèces de staphylocoque est probablement le résultat de recombinaison homologue, mais n'affecte vraisemblablement pas la fonctionnalité de la protéine Bap (Cucarella *et al.*, 2001 ; Cucarella *et al.*, 2004). Cependant, cette variation de nombre de répétitions pourrait être associée à une évolution visant à échapper à la réponse immunitaire de l'hôte, comme observée chez les streptocoques du groupe B avec la protéine alpha C (Madoff *et al.*, 1996). Cucarella *et al.* (2001) émettent l'hypothèse que la région C servirait à projeter, à la surface, la partie N-terminale qui interagirait avec les surfaces abiotiques.

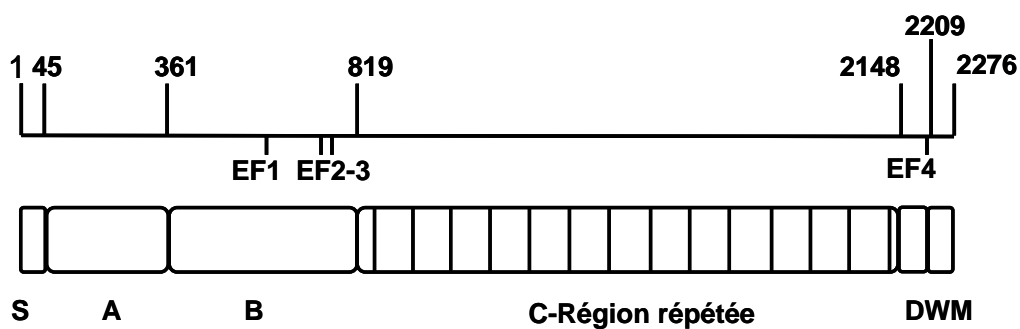


Figure 17 : Organisation structurale de la protéine Bap et localisation des domaines « EF-hand-like » (Arrizubieta *et al.*, 2004)

La région C de Bap est suivie de la région D composée de courtes répétitions de 18 acides aminés, dont le nombre varie en fonction de l'espèce. Trois répétitions sont observées pour la protéine Bap de *S. aureus* et 9 pour celle de *S. xylosus*. Elles sont suivies d'une répétition incomplète de 7 acides aminés. Cette séquence en acides aminés est riche en résidus sérine et acide aspartique, ressemblant aux répétitions SD de la famille Sdr (répétitions sérine-asparagine) des protéines de surface des staphylocoques (Josefsson *et al.*, 1998). Chez *S. xylosus*, la séquence et la taille des répétitions de la région D dans la protéine Bap sont très différentes de celles décrites chez les autres staphylocoques (Tormo *et al.*, 2005). Suite à la

région D, la région C-terminale de Bap contient des motifs d'ancrage à la paroi (W), un domaine qui s'étend dans la membrane (M) et une queue de résidus positivement chargés (Figure 17).

Le gène *bap* a été identifié pour la première fois chez *S. aureus*, grâce à l'étude d'un mutant obtenu par insertion du transposon Tn917 (Cucarella *et al.*, 2001). Le gène *bap* est contenu dans un îlot de pathogénicité chez *S. aureus* (SaPIbov2 pour « Staphylococcal Pathogenicity Island Bovine 2 ») qui contient également un gène codant un ABC transporteur et un gène codant une transposase Sip pour « Staphylococcal Integrase Protein » ayant un rôle dans l'excision-intégration (Ubeda *et al.*, 2003). Le gène *bap* des espèces *S. epidermidis*, *S. chromogenes*, *S. xylosum*, *S. simulans* et *S. hyicus* ne semble pas être contenu dans un îlot de pathogénicité (Cucarella *et al.*, 2002 ; Rabello *et al.*, 2005).

Les souches de *S. aureus* hébergeant la protéine Bap sont très adhérentes à des surfaces abiotiques et fortement productrices de biofilms (Cucarella *et al.*, 2001). Cette protéine est impliquée à la fois dans l'adhésion intercellulaire mais aussi dans l'attachement primaire à une surface abiotique. Des expériences d'infection de glandes mammaires bovines ont montré que la colonisation bactérienne augmente quand l'infection est causée par des souches de *S. aureus* mucoïdes, porteuses des gènes *icaABCD* et du gène *bap* (Cucarella *et al.*, 2004). Il a été montré que la protéine Bap subit fréquemment des changements dans le nombre de répétitions de la région C-terminale. Mais, aucune relation n'a été établie entre le nombre de répétitions et la formation de biofilm dans les isolats *bap* positifs (Cucarella *et al.*, 2004). Tous les isolats *bap* positifs étaient aussi *ica* positifs, mais en absence d'*ica*, Bap est suffisante pour induire la formation de biofilm sur les surfaces abiotiques chez *S. aureus* (Cucarella *et al.*, 2004). La présence des cations Ca^{2+} ou Mn^{2+} inhibe la formation de biofilm induite par Bap chez *S. aureus*, tandis que le Mg^{2+} n'a aucun effet (Arrizubieta *et al.*, 2004). Le calcium affecterait l'attachement primaire de *S. aureus*. Les domaines EF2 et EF3 de Bap se lient au calcium entraînant un changement de conformation de Bap, la rendant ainsi incapable d'agrégation intercellulaire. Le calcium agit comme un régulateur de biofilm à travers son interaction avec la protéine de surface Bap (Tormo *et al.*, 2005).

Bap constitue une nouvelle famille de protéines qui joue un rôle clef dans la formation de biofilm chez les bactéries à Gram positif et à Gram négatif, dans la mesure où cette protéine a été retrouvée chez *S. epidermidis* (Bhp pour « Bap Homolog Protein »), *Enterococcus faecalis* (Esp), *Salmonella enterica* (Stm2689) et *Pseudomonas putida* (Mus20) (Cucarella *et al.*, 2004 ; Tormo *et al.*, 2005 ; Lasa & Penades, 2006).

6 - CONTENU PLASMIDIQUE

Les plasmides sont des molécules d'ADN bicistroniques, circulaires, se repliquant de manière autonome. Ils sont non indispensables au métabolisme normal de la cellule bactérienne. Leur transmission peut s'effectuer d'une cellule à une autre par conjugaison ou transduction. A notre connaissance, au sein du genre *Staphylococcus*, au moins 25 séquences complètes de plasmides sont connues. La plupart de ces plasmides portent des gènes impliqués dans la résistance aux antibiotiques. Aucune séquence complète de plasmide endogène d'une souche de *S. xylosus* n'a été réalisée. Or, la variabilité du contenu plasmidique chez cette espèce est grande. En effet, sur 194 isolats, Martin *et al.* (2006) ont détecté 140 profils plasmidiques différents. Actuellement, un seul plasmide est partiellement décrit chez *S. xylosus* : pSX267. Ce plasmide est issu de la souche *S. xylosus* DSM20267. Sa taille a été évaluée à 29.5 kb et sa réplication suit un mécanisme θ . Seuls sa région de réplication et l'opéron codant la résistance à l'arsenite ont été caractérisés (Rosenstein *et al.*, 1992).

6-1. La région de réplication

La région de réplication du plasmide pSX267 a été séquencée et bien caractérisée. Ce fut la première description d'un mécanisme autonome de réplication pour les plasmides de staphylocoques (Gering *et al.*, 1996). L'analyse de la séquence d'un fragment de 1,8 kb correspondant à la zone de réplication a révélé 2 *orfs*, *repA* et *orf2* codant des protéines de 37,2 et 13,2 kDa. La séquence en acides aminés déduite de *repA* a montré des similarités avec la protéine initiatrice de la réplication du plasmide pAD1 chez *Enterococcus faecalis*. Chez pSX267, *repA* s'est révélé être l'unique gène nécessaire à la réplication du plasmide. Les différentes mutations réalisées dans ce gène ont abouti à des plasmides non réplcatifs. Le gène *orf2* code une protéine similaire à la partie C-terminal de la protéine Rep des plasmides de type RC (rolling circle), mais il a clairement été montré qu'elle ne jouait aucun rôle dans la réplication de pSX267. Gering *et al.* (1996) ont supposé que l'*orf2* correspondait à un vestige d'un petit plasmide RC qui se serait inséré dans le large plasmide pSX267, ce type de phénomène ayant déjà été observé. Une étude comparative entre les régions de réplication de pSX267 et des plasmides de résistance aux β -lactamases et métaux lourds de *S. aureus* a été réalisée (Firth *et al.*, 2000). Il a été montré que la séquence répétée présente à l'intérieur des gènes *rep*, qui correspondrait à l'origine de réplication de chaque plasmide, est une région très conservée chez les plasmides de type Inc1 : pSK1, pI9789::Tn552 de

S. aureus et chez pSX267. De plus, comme ce qui a été décrit chez le plasmide pSX267 de *S. xylosus*, une séquence incomplète d'un probable gène *orf245* (id. *orf2*) a été observée dans trois autres plasmides endogènes de *S. aureus*. Il semblerait donc que les complexes de réplication des plasmides de multirésistance chez les staphylocoques soient conservés (Firth *et al.*, 2000).

6-2. La résistance à l'arsenite, l'arsenate et l'antimonite

Le premier plasmide de résistance aux sels d'arsenate, arsenite et antimonite a été décrit chez *S. aureus* par Novick et Roth (1968). Ces gènes de résistance sont habituellement présents sur des plasmides codant également des pénicillinases et des facteurs de résistance à des métaux lourds, comme Cd^{2+} et Hg^{2+} . Le mécanisme de résistance à l'arsenic est basé sur un système d'efflux de ces composés toxiques. La résistance à l'arsenate et l'arsenite est communément présente chez les staphylocoques. Des études effectuées sur des souches de *S. xylosus* ont montré que plus de 90% des souches étaient résistantes à l'arsenate et l'arsenite et que les gènes de résistance étaient portés sur des plasmides (Rosenstein *et al.*, 1992). Des analyses par hétéroduplex entre pSX267 et pI258 issu d'une souche de *S. aureus* ont révélé une très forte homologie des gènes de la résistance à l'arsenic et de la région de réplication (Ji & Silver, 1992). Chez *E. coli*, la séquence nucléotidique de l'opéron *ars* comprend quatre *orfs*, *arsR*, *arsA*, *arsB* et *arsC*. La protéine AsrA arbore chez cette espèce deux régions homologues à une région conservée de liaison à l'adénylate, supposant que le système d'efflux de l'arsenate et de l'arsenite est ATP dépendant. Chez *S. aureus* et *S. xylosus*, l'opéron *ars* n'inclut pas l'ATPase ArsA. Les protéines ArsB de *S. xylosus* et *E. coli* sont identiques en taille et leur séquence en acides aminés montre 58% de similarité. Cette protéine correspond à une pompe à arsenite, elle possède un fort caractère hydrophobe uniforme sur toute la protéine confirmant sa localisation dans la membrane cytoplasmique. La protéine ArsC de *S. xylosus* ne présente qu'une faible similarité avec celle de *E. coli* (18% d'acides aminés identiques). Chez *E. coli* la fonction supposée de cette protéine est de changer la spécificité de la pompe à extrusion pour l'arsenite en arsenate. Malgré la faible homologie de séquence, il semblerait que la protéine ArsC de *S. xylosus* ait également la même fonction (Rosenstein *et al.*, 1992). Des études de mutations ont montré que l'inactivation de *arsB* et *arcC* entraînait l'inhibition de la résistance à l'arsenate. La résistance à l'arsénite et l'antimonite, était quant à elle, inhibée uniquement lorsque le gène *arsB* était délété. Le gène *arsR* chez *S. xylosus*, comme pour *E. coli*, code un régulateur négatif qui agit au niveau transcriptionnel. ArsR est inactivé par les ions d'arsenate, d'arsenite

et d'antimonite qui se fixent au niveau des 6 résidus cystéines de la protéine permettant ainsi la transcription de l'opéron *ars*. Des études ont montré que l'opéron *ars* de pSX267 pouvait conférer la résistance à l'arsenate et l'arsenite chez d'autres genres bactériens. La première étude de cet opéron avait été réalisée chez *S. carnosus* où *ars* avait été cloné via le plasmide pCA44 (pC194 portant les 3 gènes de résistance à l'arsenic issus de pSX267). La souche de *S. carnosus* hébergeant pCA44 devenait résistante à l'arsenic (Kreutz & Götz, 1984 ; Rosenstein *et al.*, 1992). Rosenstein *et al.* (1992) ont fait par la suite des essais d'expression de l'opéron *ars*, en utilisant le plasmide pCA44, chez *E. coli* et *B. subtilis*. Le plasmide pCA44 ne se répliquait pas chez *E. coli*, un autre vecteur portant les gènes *ars* a été utilisé. Comme pour *S. carnosus*, une augmentation de la résistance à l'arsenate et à l'arsenite a été observée chez une souche de *B. subtilis* sensible à l'arsenate et complétée avec pCA44. Chez *E. coli*, la souche était naturellement tolérante à l'arsenate et l'arsenite mais la complémentation avec les gènes *ars* de *S. xylosus* a entraîné une augmentation légère mais reproductible de la résistance à l'arsenite.

En conclusion des études génétiques réalisées chez *S. xylosus*, nous avons pu constater que peu de gènes ont été identifiés et qu'encore moins de mécanismes ont été bien décrits chez cette espèce. Le transfert latéral de matériel génétique via des séquences d'insertion (IS, « Insertion Sequence ») et/ou des phages n'a jamais été étudié chez *S. xylosus*, contrairement à *S. aureus* où nombreux éléments génétiques mobiles ont été caractérisés. Mis à part les gènes du métabolisme des hydrates de carbone, où *S. xylosus* a servi d'espèce « modèle » pour le genre *Staphylococcus*, les autres connaissances génétiques ont bien souvent été le fruit de découvertes fortuites. Ainsi, *S. xylosus* qui est pourtant très utilisé en agro-alimentaire, demeure une espèce encore mal connue.

RESULTATS

DIVERSITÉ PHÉNOTYPIQUE DE *S. XYLOSUS*

Premiers Travaux

CARACTERISTIQUES GENERALES

CONTEXTE

Les caractéristiques phénotypiques de l'espèce *S. xylosus* ont été déterminées par Schleifer & Kloos (1975) sur une centaine de souches de *S. xylosus*, toutes isolées de la peau humaine (Etude bibliographique Tableau 1). De nombreux caractères sont variables entre ces souches comme leur capacité à synthétiser des pigments, à croître en anaérobiose et à des températures supérieures à 45°C, à métaboliser les hydrates de carbone, à réduire le nitrate et à posséder une phosphatase alcaline (Etude bibliographique Tableaux 1 et 2). Cette première étude a révélé une grande diversité phénotypique chez cette espèce malgré le fait que toutes les souches caractérisées étaient isolées d'un même biotope. Or, *S. xylosus* est une bactérie présente dans l'environnement, la flore cutanéomuqueuse et digestive de nombreuses espèces animales et les matières premières d'origine animale, révélant son ubiquité. Depuis, les études sur les caractéristiques phénotypiques de *S. xylosus* sont restreintes même si elles ont été élargies à des souches d'autres biotopes. Elles portent principalement sur les caractéristiques technologiques telles que les activités lipolytiques, protéolytiques, ou nitrate réductase de souches isolées d'aliments fermentés (Garcia-Varona *et al.*, 2000 ; Martin *et al.*, 2006) ou sur les profils de sensibilité aux antibiotiques de souches isolées d'aliments ou d'origine clinique (Udo *et al.*, 1999 ; Mauriello *et al.*, 2000). Ces études ont confirmées la variabilité phénotypique de *S. xylosus*. Quelques rares études, dont une menée au laboratoire, ont également montrées une importante diversité génétique au sein de cette espèce (Villard *et al.*, 2000 ; Morot-Bizot *et al.*, 2003). Avant de focaliser notre étude sur la diversité génétique de *S. xylosus*, il nous a semblé important de connaître la variabilité phénotypique des souches que nous avons à disposition et qui avaient été isolées de différents biotopes. Nous avons étudié les caractères phénotypiques de 16 souches de *S. xylosus*, commensales de la peau, utilisées comme ferment carné ou laitier, isolées d'environnement agroalimentaire, de mammite chez la vache ou la chèvre ou responsable de dermatite chez la souris.

MATERIELS ET METHODES

Souches étudiées et conditions de culture

Les souches de *S. xylosus* sont présentées dans le tableau 1. Elles sont cultivées en bouillon BHI (Brain Heart Infusion, Difco) sous agitation à 200 rpm et/ou sur gélose BHI à 30°C ou 37°C. L'identification de toutes les souches avait été confirmée par des méthodes moléculaires, « staphylococcal oligonucleotide array » (Giammarinaro *et al.*, 2005) et PCR spécifique *S. xylosus* (Morot-Bizot *et al.*, 2003).

Tableau 1 : Souches de *S. xylosus* étudiées

Souche	Origine	Source
DSM20266	Peau humaine	Deutsche Sammlung von Mikro organismen
DSM20267	Peau humaine	Deutsche Sammlung von Mikro organismen
C2a	Dérivée DSM20267, curée de son plasmide	(Brückner <i>et al.</i> , 1993)
S00290	Environnement agroalimentaire (salaison)	Collection INRA Theix
S01002	Ferment produit carné	
S01003	Ferment produit carné	
S01004	Ferment produit carné	
S04002	Ferment produit carné	
S04003	Ferment produit laitier	
S03187	Saucisson naturellement fermenté	
S03191	Saucisson naturellement fermenté	
S04009	Mammite bovine	Collection INRA Nouzilly
S04018	Mammite bovine	
S04020	Mammite caprine	
S04021	Mammite caprine	
00-1747	Dermite de souris	(Won <i>et al.</i> , 2002)

Observation macroscopique

Les souches ont étéensemencées sur gélose et incubées à 37°C pendant 16 heures. La forme et la couleur des colonies ont été observées après 5 heures à température ambiante à la lumière du jour.

Caractères biochimiques

Les caractères biochimiques des souches ont été établis par des tests sur galeries Api[®] Staph et Api[®] 50CH (Biomérieux) selon les recommandations du fournisseur.

Croissance à différentes températures

A partir de cultures incubées 16 heures à 30°C, des dilutions à 10^5 bactéries /ml ont été réalisées dans un milieu BHI. 300 µl de ces dilutions ont été déposés dans des microplaques (100 puits) et la croissance des souches a été suivie, pendant 24 h ou 48 h à différentes températures (15°C, 25°C, 30°C, 37°C, 42°C) sous agitation, par mesure d'absorbance à 600 nm selon une périodicité de 10 min l'aide d'un Bioscreen C (LAB SYSTEMS). Sur chaque microplaque, 20 étaient non ensemencés servent de témoin. Chaque mesure de croissance a été réalisée dans 5 puits différents à partir de la même dilution. Le taux de croissance (μ_{\max}) de chaque souche a été estimé par la méthode de Gompertz selon l'équation : $\log_{10}(N) = \log_{10}(N_0) + A \cdot \exp\left(-\exp\left(\frac{\mu_{\max} \cdot \exp(1)}{A} * (L-t) + 1\right)\right)$ où t = temps, N = population bactérienne au temps t, N_0 = population bactérienne à t = 0, A = accroissement, μ_{\max} = taux de croissance, L = temps de latence.

Croissance en milieu minimum

Les souches de *S. xylosus* ont été pré-cultivées en bouillon BHI, puis cultivées en milieu minimum à 30°C. La composition de ce milieu est la suivante : 1 g $\text{Na}_3\text{-citrate } 2\text{H}_2\text{O}$, 7 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 3 g KH_2PO_4 , 1 g NaCl, 1 g KCl, 4g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,0147 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 5 g glucose, 3 vitamines (0,012 mg biotine, 4,6 mg d'acide nicotinique, 2 mg de thiamine hydrochloride) et des éléments traces (1,5 mg $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,07 mg ZnCl_2 , 0,1 mg $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,006 mg d'acide borique, 0,19 mg CoCl_2 , 0,002 mg $\text{CuCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,024 mg $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,036 mg $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) qsp 1 litre (Fiegler & Bruckner, 1997). Les souches sont considérées comme capables de croître en milieu minimum si elles atteignent une densité optique (DO) d'au moins 1 lors de la troisième culture.

Tableau 2 : Caractères biochimiques variables entre les souches de *S. xylosus* testées par galeries Api® 50CH et Api® Staph

	Erythritol	L- Arabinose	D- Ribose	D- Galactose	L- Rhamnose	Inositol	D- Sorbitol	Esculine Citrate de fer	Salicine	D- Mélibiose	D- Tréhalose	D- Raffinose	Xylitol	Gentiobiose	D- Turannose	Nitrate reductase	Acétoïne	Uréase
DSM20266	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+
DSM20267	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+
C2a	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+
S00290	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+
S01002	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+
S01003	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
S01004	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
S04002	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-
S04003	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+
S03187	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
S03191	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+
S04009	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-
S04018	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+
S04020	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+
S04021	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+
00-1747	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-

RESULTATS

Caractéristiques macroscopiques

L'observation des 16 souches sur des géloses BHI montre que les colonies formées après 24 heures sont petites, rondes, à bord lisse et brillantes. Seule la souche *S. xylosus* S04009 forme des colonies mates, à bordures crénelées. Les souches *S. xylosus* DSM20266, DSM20267 et sa dérivée C2a, commensales de la peau, S01004, S03187 et S03191 d'origine carnée, et S04009, S04018 et S04021 isolées de mammite forment des colonies pigmentées du jaune-orangé à l'orange. Les souches *S. xylosus* S01002, S01003, S04002 d'origine carnée, S04003 d'origine laitière, S00290 isolée de l'environnement d'un atelier de salaison, S04020 isolée de mammite et 00-1747 responsable de dermite forment des colonies blanches-beiges.

Caractéristiques biochimiques

Cinquante cinq tests biochimiques à partir des galeries Api[®] Staph et Api[®] 50CH ont été réalisés pour caractériser les souches. La souche *S. xylosus* DSM20267 et son dérivé curé C2a ont le même profil biochimique. Onze tests biochimiques sont communs à toutes les souches de *S. xylosus*. En effet, toutes métabolisent le D-glucose, le D-fructose, le D-xylose, le D-mannose, le glycérol, le D-mannitol, le D-maltose, le D-saccharose, le D-lactose et elles possèdent une N-acétylglucosaminase et une phosphatase alcaline. Aucune souche ne métabolise le D-arabinose, le L-xylose, le D-adonitol, le méthyl-βD-xylopyranoside, le L-sorbose, le dulcitol, le méthyl-αD-mannopyranoside, le méthyl-αD-glucopyranoside, l'amygdaline, l'arbutine, le D-céliobiose, l'inuline, le D-mélézitose, l'amidon, le glycogène, le D-lyxose, le D-tagatose, le D- et L-fucose, le D- et L-arabitol, le potassium gluconate, le potassium-2-cétogluconate et le potassium-4-cétogluconate. Aucune des souches de *S. xylosus* n'a d'activité arginine hydrolase. Dix sept tests sont variables entre les différentes souches (Tableau 2). Une classification hiérarchique ascendante des souches, basée sur les résultats des 55 tests Api[®], a été réalisée en utilisant une méthode d'agrégation lien complet et l'indice de similarité 1 de Sokal & Sneath (XLSTAT). Les 16 souches se divisent en 2 groupes équivalents sur la base de leur capacité à métaboliser ou non le L-arabinose (Figure 1). Le premier groupe (I) comprend la majorité des souches d'intérêt technologique et une souche isolée de mammite.

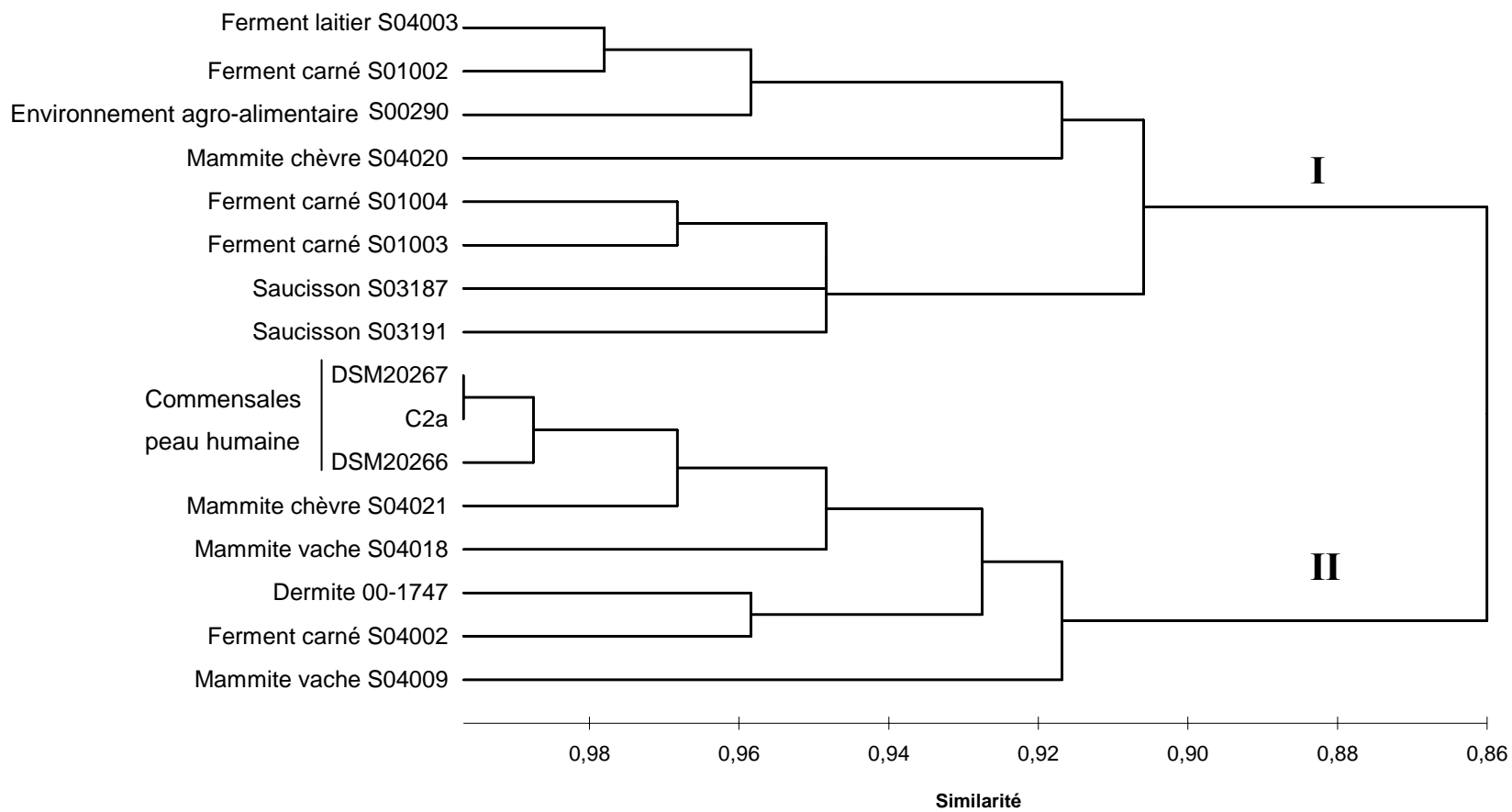


Figure 1 : Classification ascendante hiérarchiques des souches de *S. xylosus* testées, basées sur les caractères biochimiques testés par galleries Api® 50CH et Api® Staph

Analyse par le logiciel XLSTAT, indice de similarité de Sokal & Sneath (1), lien complet.

Le second groupe (II) contient les souches commensales de la peau, la majorité des souches isolées de mammite, la souche responsable de dermite chez la souris et une souche utilisée comme ferment.

Croissance en milieu riche à différentes températures

La croissance en milieu BHI, suivie en Bioscreen, a révélé que les 16 souches de *S. xylosus* peuvent croître sur une gamme de température allant de 15 à 42°C. Les courbes de croissance de la souche *S. xylosus* C2a à différentes températures sont présentées à titre d'exemple dans la Figure 2. Le taux de croissance des bactéries a pu être estimé grâce au modèle de Gompertz (Tableau 3).

Les 3 souches commensales de la peau, DSM20266, DSM20267 et sa dérivée C2a, la souche S00290 isolée de l'environnement d'un atelier de salaison, et les 3 souches S01002, S01003 et S04002 utilisées comme ferment ont un taux de croissance maximum à 30°C.

La souche S03191 isolée d'un saucisson naturellement fermenté, la souche S04003 utilisée comme ferment laitier, la souche 00-1747 isolée de dermite et la souche S04020 isolée de mammite ont un taux de croissance maximum à 37°C.

La souche *S. xylosus* S03187, isolée de saucisson naturellement fermenté, ainsi que les souches S04009 et S04018 isolées de mammite ont des taux de croissance maximum à 42°C. Les souche S04021, isolée de mammite, et S01004 utilisée comme ferment, possèdent un taux de croissance maximum identique à 30°C, 37°C et 42°C.

La formation d'agrégats par certaines souches a été observée lors du suivi de croissance à des températures supérieures à 30°C. Ces agrégats ont vraisemblablement généré un biais durant la mesure de l'absorbance, notamment pour *S. xylosus* S04020, expliquant ainsi le faible taux de croissance de cette souche aux températures supérieures à 30°C.

Croissance en milieu minimum

Le milieu minimum utilisé a été développé par Brückner *et al.* (1993) pour la souche *S. xylosus* C2a. Onze des 16 souches de *S. xylosus* testées sont capables de croître sur ce milieu minimum : *S. xylosus* C2a, DSM2067, DSM20266, S00290, S01002, S04002, S04003, 00-1747, S04009, S04020 et S04021. Les souches *S. xylosus* S01003, S01004, S03191, S03187 et S04018 ne se multiplient pas sur ce milieu.

Ces résultats sont discutés dans la partie Discussion.

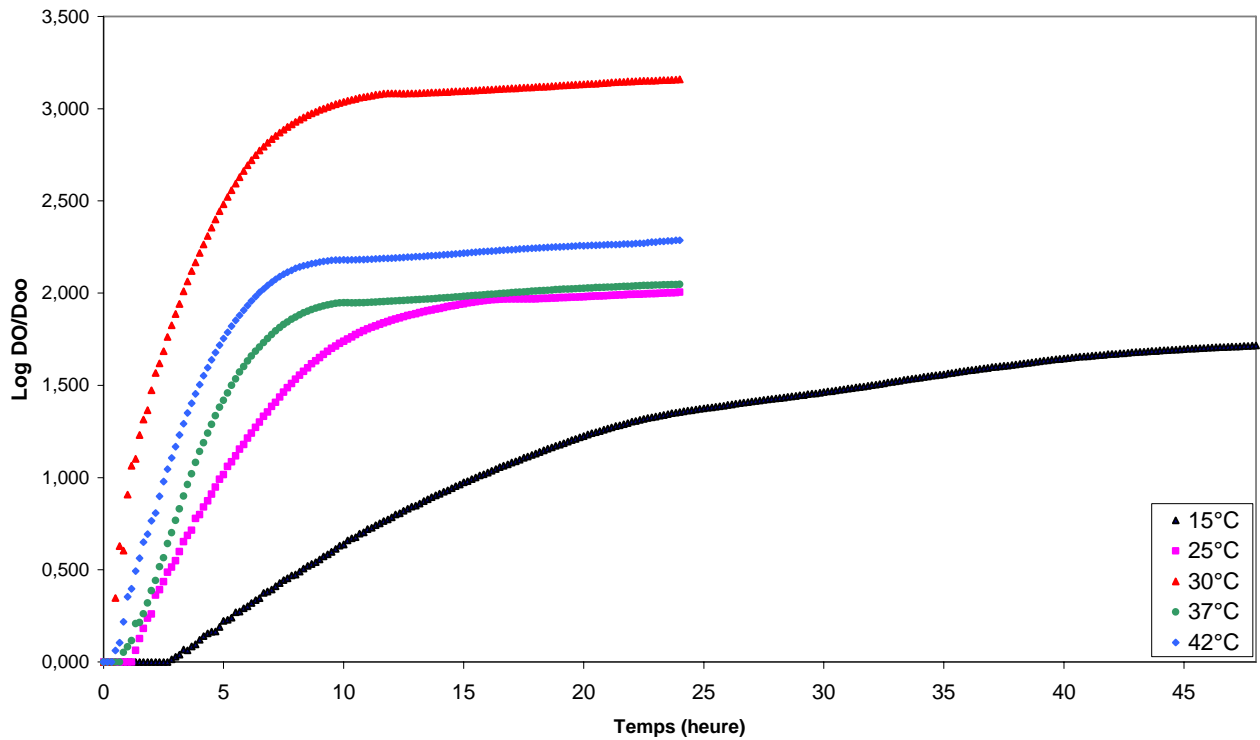


Figure 2 : Courbe de croissance de *S. xylosus* C2a à différentes températures en milieu BHI

Tableau 3 : Taux de croissance maximum des souches de *S. xylosus* à différentes températures dans un milieu BHI

	μ_{\max} (1/h)				
	15°C	25°C	30°C	37°C	42°C
DSM20266	0,093	0,277	0,849	0,392	0,431
DSM20267	0,135	0,359	0,654	0,477	0,44
C2a	0,075	0,25	0,568	0,399	0,444
S00290	0,095	0,284	0,726	0,358	0,368
S01002	0,095	0,333	0,578	0,486	0,355
S01003	0,104	0,259	0,601	0,539	0,51
S01004	0,071	0,264	0,312	0,312	0,311
S04002	0,081	0,308	0,403	0,349	0,351
S04003	0,09	0,201	0,316	0,399	0,32
S03187	0,098	0,375	0,463	0,42	0,504
S03191	0,09	0,281	0,311	0,357	0,324
S04009	0,066	0,23	0,296	0,347	0,434
S04018	0,077	0,346	0,473	0,469	0,51
S04020	0,067	0,181	0,235	0,261	0,238
S04021	0,086	0,232	0,355	0,352	0,355
00-1747	0,088	0,243	0,534	0,636	0,616
Moyenne	0,088	0,276	0,48	0,409	0,413
Ecart type	0,017	0,056	0,175	0,093	0,094

Article n°1

Ability of *Staphylococcus xylosus* to spread on soft agar surfaces

Emilie Dordet-Frisoni, Régine Talon and Sabine Leroy*

Article soumis à Research in Microbiology

CONTEXTE

C'est fortuitement que nous avons observé un phénomène fascinant lors de tests d'inhibition en gélose semi-solide de bactéries pathogènes par des staphylocoques. Une souche de *S. xylosus* avait la particularité d'envahir la gélose. Kloss & Schleifer (Kloos & Schleifer, 1986) avait déjà noté cette propriété lors de la description de l'espèce. La mobilité des bactéries sur des surfaces semi-solides a été caractérisée chez beaucoup de genres bactériens aussi bien à Gram négatif que positif. Six modes de translocation de surface ou « spreading » sont définis sur la base de leur micromorphologie: le « swarming » dépendant des flagelles et en partie d'interaction cellule-cellule, le « swimming » dépendant des flagelles et de fluides, le « gliding » dépendant de forces motrices intrinsèques et en partie d'interaction cellule-cellule, le « twitching » dépendant de forces motrices intrinsèques et de pili de type IV, le « sliding » dépendant de la croissance et d'une friction réduite entre les cellules par des surfactants, le « darting » dépendant de la croissance d'agrégats cellulaires encapsulés (Henrichsen, 1972 ; Harshey, 2003).

Nous avons voulu voir si le phénomène de propagation rapide que nous avons observé chez une souche de *S. xylosus*, et qui n'avait alors jamais été caractérisé chez un staphylocoque, était observé chez d'autres souches.

RÉSULTATS

- ◆ Sur 51 souches testées, 37 ont la capacité de se propager sur une gélose semi-solide. La vitesse de propagation ainsi que l'aspect des colonies géantes formées diffère entre les souches. Une souche montrant une forte capacité de colonisation a été choisie comme souche d'étude. Il faut noter que la souche modèle C2a et la souche DSM20267 dont elle dérive n'ont pas la capacité à se propager sur une gélose semi-solide.
- ◆ Les conditions optimums du phénomène sont observées sur un milieu riche à 0,4% d'agar et après une incubation à 25°C. Dans ces conditions la vitesse de propagation peut atteindre 125 µm/min.

- ◆ *S. xylosus* est capable de coloniser indifféremment un milieu gélosé BHI (« Brain Heart Infusion ») ou LB (Luria-Bertani), ainsi qu'un milieu minimum (Fiegler & Bruckner, 1997).
- ◆ La présence d'un surfactant n'a pas pu être mise en évidence
- ◆ En microscopie optique, nous avons pu observer que le front de la colonie géante est constitué de cellules disjointes en monocouche. Cette observation a été confirmée par microscopie électronique à balayage (MEB). Dans la zone centrale, les bactéries forment des agrégats compacts.
- ◆ L'ajout de DNase I dans le milieu de culture induit une augmentation de la vitesse de translocation pouvant alors atteindre 175 $\mu\text{m}/\text{min}$. L'observation en MEB a révélé qu'il n'y a presque plus d'agrégats dans la zone centrale.
- ◆ Une étude réalisée sur 12 souches avait montré que toutes les souches sauf une ont la capacité de former des biofilms sur surface abiotique (Planchon *et al.*, 2006). Parmi ces souches, nous avons observé qu'il n'y a aucune corrélation entre l'aptitude à former des biofilms et la capacité à se propager sur des surfaces semi-solides. En effet, les souches biofilm positives ont ou non la capacité à se propager et la souche biofilm négative montre une très vive translocation de surface.

Surface migration of *Staphylococcus xylosus* on low-agar media

Emilie Dordet-Frisoni, Brigitte Gaillard-Martinie, Régine Talon, Sabine Leroy*

INRA, Centre de Clermont-Ferrand Theix, Unité Microbiologie, 63122 Saint-Genès
Champanelle, France.

edordet@clermont.inra.fr

Brigitte.Gaillard-Martinie@clermont.inra.fr

talon@clermont.inra.fr

sleroy@clermont.inra.fr “*Correspondence and reprints”

Abstract

Staphylococcus xylosus is a commensal species commonly found on the skin of mammals, but also currently used as starter culture for meat fermentation. Most strains of this species colonize by forming a biofilm on abiotic surfaces. We showed here that the majority of *S. xylosus* strains also exhibit extensive colony spreading on the surface of soft agar media. This phenomenon was not correlated with the biofilm-forming ability. It occurred in different culture media and was dependent on temperature. Formation of a giant *S. xylosus* colony did not involve a biosurfactant. Microscopic observation showed that the front of the giant colony comprised a single layer of spacing cells with more packed cells in the median area. Supplementation of the soft media with DNase I increased *S. xylosus* colony spreading, indicating that extracellular DNA may be involved in limiting the phenomenon. The ability of *S. xylosus* to spread on semisolid surfaces may constitute an advantage for surface colonization.

Keywords: *Staphylococcus xylosus*; motility, giant colony

1. Introduction

It is increasingly believed that communities of bacteria act together rather than as a group of individual cells. It would be interesting to understand how these communities are formed and colonize different natural habitats. Different invasive behaviors are used by bacteria for the acquisition of nutrients, and motility constitutes a benefit. Many bacteria translocate by the propeller function of flagella [22]. Some bacteria, such as mycobacteria and streptococci, can spread on semi-solid surfaces without locomotory organelles [2,17]. A mechanism called sliding is generally used by these bacteria [8]. It is provided by the expansive forces of a growing culture in combination with special surface properties of the cells resulting in

reduced friction between the cell and its substrate [7]. Sliding motility results in a uniform sheet of closely packed cells in a single layer [8]. A phenomenon called darting has been observed in some staphylococcal species [8], and involves slow surface translocation produced by the expansive forces developed in an aggregate of cells. Micromorphologically, cells or aggregates of cells are distributed randomly with empty areas in between [8]. In other Firmicutes, spreading motility independent of flagella was observed. In *Bacillus subtilis*, a sliding type of surface motility was detected in a nonflagellated mutant [13]. Secreted surfactin and extracellular potassium ions are required for the spreading of *B. subtilis* [12]. Recently, rapid *S. aureus* colony spreading on soft agar medium was reported [11]. The surface translocation of *S. aureus* differed from the darting of *S. epidermidis*, a slow surface translocation on solid agar medium described by Henrichsen [8].

Staphylococcus xylosus is a non-motile Gram-positive coccus, which belongs to the *Staphylococcus saprophyticus* group. *S. xylosus* is a common inhabitant of the skin of a variety of mammals and occasionally of humans [15]. This species is usually isolated from dairy and meat products [3,9,16,20], and is commonly used as starter culture for meat products (Talon *et al.*, 2002). It is also isolated from environmental sources like the surfaces in food processing plants or of medical equipment [1,4,5]. It probably colonizes the skin and surfaces by forming a biofilm [21]. Surface translocation could also contribute to surface colonization. The capacity of *S. xylosus* to translocate from the site of inoculation on soft agar medium was first reported by Kloss *et al.* [14]. In the present study, we characterized the ability of *S. xylosus* to migrate widely on semi-solid surfaces, and suggest an important role for extracellular DNA in cell-cell aggregation.

2. Materials and methods

2.1 Strains and media

The *S. xylosus* strains used in this study are listed in Table 1. Bacteria were routinely grown in BHI (brain-heart infusion) broth (BD Becton, Dickinson and Company, Sparks, Md, USA) at 30 °C and with orbital shaking of 200 rpm.

2.2 Spreading experiments

Colony spreading was performed in BHI medium solidified with 0.4% w/v agar (Difco, Detroit, Mi USA). In some experiments, the agar content was varied, between 0.3 and 1.5% w/v. Colony spreading was also tested in two other media, Luria-Bertani (LB) medium containing 10 g/L tryptone peptone (Difco), 5 g/L yeast extract (Difco), 5 g/L NaCl, (pH 7.0), and a minimal medium, the MX medium developed specifically for *S. xylosus* by Fiegler and Brückner [6] containing of (per L): 1 g Na₃-citrate·2H₂O, 7 g Na₂HPO₄·2H₂O, 3 g KH₂PO₄, 1 g NaCl, 1 g KCl, 4 g (NH₄)₂SO₄, 0.5 g MgSO₄·7H₂O, 0.0147 g CaCl₂·2H₂O, three vitamins, 0.012 mg biotin, 4.6 mg nicotinic acid, 2 mg thiamine hydrochloride, and trace elements, 1.5 mg FeCl₂·4H₂O, 0.07 mg ZnCl₂, 0.1 mg MnCl₂·4H₂O, 0.006 mg boric acid, 0.19 mg CoCl₂, 0.002 mg CuCl₂·H₂O, 0.024 mg NiCl₂·6H₂O and 0.036 mg Na₂MoO₄·2H₂O. Different carbon sources were added to the MX medium: 5 g/L of glucose, fructose or lactose. Media were autoclaved and 20 mL or 65 mL were poured into plates of 8.5 or 14 cm diameter, respectively. Plates containing agar medium were freshly prepared before inoculation and dried, open for 15 min, in a laminar flow chamber. For standard tests, the centers of agar plates were inoculated in triplicate with 2 µl of overnight culture containing approximately 10⁹ CFU/mL. After inoculation, open plates were dried in a laminar flow chamber for 10 min. The initial inoculum formed a spot with a diameter of 6 mm. Unless indicated otherwise, plates were incubated at 25°C for up to 96 h before a negative reaction was recorded. Plates were photographed using a digital camera (Kodak

EasyShare DX6490). In some cases, plates were inoculated from dilutions of overnight culture containing approximately 10^7 , 10^5 or 10^3 CFU/mL, or from 10 x or 100 x concentrated bacterial suspension obtained after centrifugation of overnight culture. In other experiments, the BHI and MX media were supplemented with different micronutrients or substances: 7 mM K_2HPO_4 , 1 mM KCl, 0.025% Tween 80, 50 or 250 μ g/mL trypsin (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Mo, USA), 90 units/mL DNase I (Roche, Mannheim, Germany) or 1 mg/mL DNase-free RNase A (Sigma- Aldrich). To measure spreading rates, the diameter of the growth zone radiating from the point of inoculation on triplicate plates was measured each hour after surface migration commenced.

2.3 Microscopy

Bacteria were grown for 16 h on 0.4% agar BHI medium before they were processed for microscopic studies. Surface film colonies on plates were transferred directly to a glass cover slip. Optical microscopic analyses were performed using a phase-contrast Zeiss Axioplan 2E. For electron microscopic analyses, the cells on glass cover slips were fixed in 3% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.4) at 4°C for 1 h, dehydrated using a graded ethanol and acetone series, placed on stubs and coated with gold in an EMSCOPE SC500, and observed with a SEM 505 Philips scanning microscope.

3. Results

3.1 Screening of spreading phenomenon in *S. xylosus* strains

Fifty one *S. xylosus* strains described in Table 1 were inoculated on BHI low-agar medium plates at 30°C. Thirty-seven *S. xylosus* examined could colonize the surface of the soft medium, after 16 hours of incubation (Table 1 & Fig. 1). Fourteen strains did not spread from the point of inoculation and showed a 6 mm colony diameter, which was the size of the spotted area before incubation (Fig. 1B). Efficacy of spreading and shape of the resultant giant colonies were distinct for the different *S. xylosus* strains (Table 1 & Fig. 1). The

majority of efficiently spreading strains formed a uniform surface film growth (Fig. 1A). Other morphologies could be observed showing a fractal edge of migration (Fig 1C), or protrusions (Fig. 1DE&F). The less efficient strains usually spread with the formation of protrusions (Fig. 1E&F). The giant colonies varied in thickness. No correspondence between ecological niches of *S. xylosus* strains and their spreading capacity was observed.

3.2 Culture conditions for *S. xylosus* spreading

An efficiently spreading *S. xylosus* strain, *S. xylosus* S04002, was chosen to characterize colony spreading on semi-solid media. *S. xylosus* C2a, a nonspreading strain, was used as negative control. Different agar concentrations were tested ranging from 0.3 to 1.5% of agar (w/v) in BHI and LB media. The *S. xylosus* strain spread on either LB or BHI medium. Colony spreading was observed in 0.3, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8 and 0.9% of agar but an increase in agar concentration in the medium up to 0.5% significantly decrease the size of surface migration (Fig 2A). *S. xylosus* spread optimally on 0.3 to 0.4% agar (wt/vol) and did not spread at an agar concentration above 1%. Colony spreading was observed in minimal medium MX with 0.4% agar, different sources of carbon including glucose, lactose and fructose were found to support spreading. However, *S. xylosus* spread less efficiently on this medium than on BHI or LB media, due to a low rate of growth (data not shown). It is important to note that colony spreading decreased when the period of plate drying before inoculation was prolonged (data not shown).

The surface migration of the *S. xylosus* S04002 strain was observed at different temperatures ranging from 10°C to 42°C. This strain showed good growth at all tested temperatures (data not shown). The diameter of the giant colonies was a maximum when the plates were incubated at 25°C. Spreading did not occur at temperatures over 35°C (Fig 2B). Surface migration was observed at temperatures ranging from 20°C to 35°C. At 10°C, cellular translocation was slow and observed after almost 48 h of incubation.

Kinetic measurements in optimal conditions for *S. xylosus* spreading (BHI medium solidified with 0.4% of agar, 25°C) indicated that the diameters of the growth zone did not increase between 0 and 6 h, after which the growth zone diameter increased continuously and rapidly (Fig. 3), with the edge of the spreading zone advancing at 125 µm/min.

To investigate if the initial cell density influenced the surface migration, we tested different bacterial inocula. The overnight culture was 100- or 10,000-fold diluted in BHI broth, or 10- or 100-fold concentrated. Two µl of these suspensions or pellets were spotted. No differences in colony spreading were observed after inoculation of the dense cell suspensions. The start of spreading was delayed with the diluted suspensions.

3.3 Absence of a biosurfactant

To examine the mechanism of surface migration, we tested for production of a surfactant that could increase the wettability of the agar surface. We were unable to detect surfactant in *S. xylosus* cultures by the drop collapsing test of Jain *et al.* [10]. Moreover, 10 µl water drops applied to the surface of the agar medium near the edge of the giant colony did not cause water spotting, confirming the absence of a surfactant. The addition of Tween 80, an anionic surfactant, resulted in disruption of surface film growth and formation of some protrusions (data not shown) and did not promote spreading of the non-motile C2a strain. Supplementation of BHI or MX media with potassium, a stimulator of surfactant secretion in *B. subtilis* [13], did not affect *S. xylosus* spreading.

3.4 Molecules increasing *S. xylosus* rate of surface migration

Spreading of *S. xylosus* was weakly enhanced by the addition of trypsin to the BHI and MX media (data not shown). An increase in trypsin concentration increased the rate of colony surface migration. The addition of DNase I but not RNase A to the BHI and MX media strongly enhanced the surface film growth. The surface of 14 cm diameter plate was completely covered after 22 h of growth on DNase I-supplemented BHI medium (Fig. 3).

The rate of spreading was 175 $\mu\text{m}/\text{min}$. The giant colony was thinner on the media supplemented with DNase I (data not shown).

3.5 Microscopic observation

To examine the giant colony morphology of *S. xylosus*, optical and electron microscopic analyses were performed on the spreading strain S04002. Optical microscopic observations of the edge of the giant colony on the low-agar medium showed a monolayer of cells with spaces between the cells (Fig. 4). In the median zone, the cells seemed to be more packed (Fig. 4). This observation was confirmed by electron microscopy (Fig. 5A&B). In the median growth area of the giant colony, the cells were aggregated in multiple layers separated by intercellular spaces (Fig. 5B). When the giant colony was formed on medium supplemented with DNase I, the appearance of the median zone was clearly modified and showed few or no aggregated cells.

4. Discussion

The majority of *S. xylosus* strains, independently of their origin, can spread rapidly on a soft agar medium surface, colonizing the entire surface available. The average size of the giant colonies was dependent on the strain, agar concentration, temperature and time of incubation. Spreading growth of *S. xylosus* was optimally observed on 0.3-0.4% agar media at 25°C. Surface translocation was inhibited above 35°C. The two rich BHI and LB media, and the minimal medium MX with various sources of carbon, supported spreading of *S. xylosus*. The spreading behavior was thus independent of the growth medium and did not require amino acids, glucose or complex nutrients. Some strains of *S. aureus* can spread rapidly on low-agar medium [11]. Unlike *S. xylosus*, 40°C was the optimum temperature for surface translocation of *S. aureus*. No spreading of *S. aureus* was observed below 30°C, and when the LB medium was used. The factors affecting the colonization of semi-solid surface appeared to differ between these two species. Moreover, microscopic analyses revealed that

the micromorphology of the giant colony of *S. xylosus* was different from that of *S. aureus*. The edge of the *S. xylosus* colony comprised a single layer of spacing cells, while that of *S. aureus* consisted of closely packed cells in several layers [11]. The surface translocation of *S. xylosus* does not appear to correspond to any of the six known bacterial surface translocations described by Henrichsen [8].

The flagellum-independent spread could depend on the production of surfactants, which lower the surface tension of the water and enhance surface migration [13,19]. We have been unable to detect a surfactant in *S. xylosus* giant colonies, but colony spreading of this species is probably facilitated by the wettability of the media as drying of the surface media decreased the phenomenon. But the addition of Tween 80, which is known to modify the surface tension of the medium and improve surface wettability [18], did not have a significant effect on *S. xylosus* colony spreading.

Addition of trypsin, a serine protease, moderately improved the surface migration of *S. xylosus*, probably by limiting the cell-cell adhesion due to proteins. But DNase I strongly enhanced *S. xylosus* surface translocation. DNase I acts upon single-chain and double-stranded DNA. It can prevent cell-cell aggregation, which might be induced by extracellular DNA (eDNA) [23]. In *S. xylosus*, the presence of DNase limited the formation of cell aggregates in the median area of the giant colony. Some bacteria, such as *Pseudomonas aeruginosa* and *S. aureus*, produce eDNA, which forms a matrix participating in cell-cell contacts in biofilms [24,25]. We may suppose that eDNA reduces the spreading of *S. xylosus*. We have previously reported the ability of twelve of the *S. xylosus* strains tested in this work to form biofilms [21]. No correlation between spreading ability and biofilm formation can be established. The biofilm-forming *S. xylosus* strains may or may not spread on semi-solid medium. Strain S01002 is unable to form biofilm, but shows efficient surface translocation.

Colony spreading could be a great benefit for *S. xylosus*, which is ubiquitous and colonizes naturally fermented food. The spreading motility of *S. xylosus* strains may provide some advantage for colonization of surfaces. The biological significance of the ability of *S. xylosus* to spread, and the spreading mechanisms, remain to be elucidated.

Acknowledgements

We wish to thank Young-Suk Won for giving us the strain implicated in mouse dermatitis, Pascal Rainard for the strains isolated from mastitis, Michèle Bes, Emmanuel Coton and Jacques Schrenzel for the clinical strains, Andrea Laukovà for the strains isolated from rabbit and dog, Thomas Rinsoz for the strain isolated from poultry and Christine Vernozy for the strains isolated from mouse. We would like to thank Brigitte Duclos for secretarial assistance and David Marsh for revision of the English. Emilie Dordet-Frisoni is the recipient of a fellowship of the French Ministry of “Education Nationale et Recherche”.

References

- [1] Arciola, C.R., Campoccia, D., An, Y.H., Baldassarri, L., Pirini, V., Donati, M.E., Pegreff, F., Montanaro, L. (2006) Prevalence and antibiotic resistance of 15 minor staphylococcal species colonizing orthopedic implants. *Int. J. Artif. Organs* 29, 395-401.
- [2] Bergman, S., Selig, M., Collins, M.D., Farrow, J.A., Baron, E.J., Dickersin, G.R., Ruoff, K.L. (1995) "*Streptococcus milleri*" strains displaying a gliding type of motility. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45, 235-239.
- [3] Cocolin, L., Rantsiou, K., Iacumin, L., Urso, R., Cantoni, C., Comi, G. (2004) Study of the ecology of fresh sausages and characterization of populations of lactic acid bacteria by molecular methods. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 1883-1894.
- [4] Corbière Morot-Bizot, S., Leroy, S., Talon, R. (2006) Staphylococcal community of a

small unit manufacturing traditional dry fermented sausages. *Int. J. Food Microbiol.* 108, 210-217.

[5] Cunha Mde, L., Lopes, C.A., Rugolo, L.M., Chalita, L.V. (2002) Clinical significance of coagulase-negative staphylococci isolated from neonates. *J. Pediatr. (Rio J)* 78, 279-288.

[6] Fiegler, H. and Bruckner, R. (1997) Identification of the serine acetyltransferase gene of *Staphylococcus xylosum*. *FEMS Microbiol. Lett.* 148, 181-187.

[7] Harshey, R.M. (2003) Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal. *Annu. Rev. Microbiol.* 57, 249-273.

[8] Henrichsen, J. (1972) Bacterial surface translocation: a survey and a classification. *Bacteriological Rev.* 36, 478-503.

[9] Irlinger, F., Morvan, A., Elsolh, N., Bergere, J.L. (1997) Taxonomic characterization of coagulase-negative staphylococci in ripening flora from traditional french cheeses. *Syst. Appl. Microbiol.* 20, 319-328.

[10] Jain, D., Collins-Thompson, D., Lee, H., Trevors, J. (1991) A drop-collapsing test for screening surfactant-producing. *J. Microbiol. Methods* 13, 271-279.

[11] Kaito, C. and Sekimizu, K. (2007) Colony spreading in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 189, 2553-2557.

[12] Kinsinger, R.F., Kearns, D.B., Hale, M., Fall, R. (2005) Genetic requirements for potassium ion-dependent colony spreading in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 187, 8462-8469.

[13] Kinsinger, R.F., Shirk, M.C., Fall, R. (2003) Rapid surface motility in *Bacillus*

subtilis is dependent on extracellular surfactin and potassium ion. J. Bacteriol. 185, 5627-5631.

[14] Kloos, W.E. , Schadewaldt, P., Schleifer, K.H. (1981) In: Starr, Stolp, Trüper, Balows, Schlegel (Eds.), The Prokariotes. A handbook on habitats, isolation, and identification of bacteria, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 1548-1569.

[15] Kloos, W.E. and Schleifer, K.H. (1986) In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Williams & Wilkins, Baltimore, Md., pp. 1013-1035.

[16] Martin, B., Garriga, M., Hugas, M., Bover-Cid, S., Veciana-Nogues, M.T., Aymerich, T. (2006) Molecular, technological and safety characterization of Gram-positive catalase-positive cocci from slightly fermented sausages. Int. J. Food Microbiol. 107, 148-158.

[17] Martinez, A., Torello, S., Kolter, R. (1999) Sliding motility in mycobacteria. J. Bacteriol. 181, 7331-7338.

[18] Matsuyama, T., Bhasin, A., Harshey, R.M. (1995) Mutational analysis of flagellum-independent surface spreading of *Serratia marcescens* 274 on a low-agar medium. J. Bacteriol. 177, 987-991.

[19] Matsuyama, T., Kaneda, K., Nakagawa, Y., Isa, K., Hara-Hotta, H., Yano, I. (1992) A novel extracellular cyclic lipopeptide which promotes flagellum-dependent and -independent spreading growth of *Serratia marcescens*. J. Bacteriol. 174, 1769-1776.

[20] Montel, M.C., Talon, R., Cantonnet, M., Fournaud, J. (1992) Identification of *Staphylococcus* from French dry sausage. Lett. Appl. Microbiol. 15, 73-77.

[21] Planchon, S., Gaillard-Martinie, B., Dordet-Frisoni, E., Bellon-Fontaine, M.N.,

Leroy, S., Labadie, J., Hebraud, M., Talon, R. (2006) Formation of biofilm by *Staphylococcus xylosus*. Int. J. Food Microbiol. 109, 88-96.

[22] Rashid, M.H. and Kornberg, A. (2000) Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. Proc Natl Acad Sci U S A 97, 4885-4890.

[23] Renner, W.A., Jordan, M., Eppenberger, H.M., Leist, C. (2004) Cell-cell adhesion and aggregation: Influence on the growth behavior of CHO cells. Biotechnol. Bioeng. 41, 188-193.

[24] Rice, K.C., Mann, E.E., Endres, J.L., Weiss, E.C., Cassat, J.E., Smeltzer, M.S., Bayles, K.W. (2007) The *cidA* murein hydrolase regulator contributes to DNA release and biofilm development in *Staphylococcus aureus*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 104, 8113-8118.

[25] Whitchurch, C.B., Tolker-Nielsen, T., Ragas, P.C., Mattick, J.S. (2002) Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. Science 295, 1487.

Legends to figures

Figure 1. Surface colonization by *S. xylosus* strains on low-agar medium plates. Two μl of overnight cultures were spotted in the center of 0.4% agar BHI medium and incubated at 25°C for 16 h. (A) spreading growth zone of the strain S04002, (B) growth on the nonspreading C2a strain, (C) , (D), (E) and (F) spreading growth zone of the strains S04011, 839, S04018, S01001, respectively.

Figure 2. Diameters of circular growth zone at different agar concentrations (A), and different temperatures (B) emanating from 2 μl of overnight culture after 16 h of incubation at 25°C. The control strain was the nonspreading *S. xylosus* C2a (\blacktriangle) and the spreading strain was *S. xylosus* S04002 (\blacksquare). Assays were performed in triplicate. The error bars indicate standard deviations.

Figure 3. Spreading kinetics of the *S. xylosus* S04002 strain at 25°C on 0.4% agar BHI medium supplemented (\blacksquare) or not (\blacklozenge) with DNase I. The error bars indicate standard deviations.

Figure 4. Optical microscopic observation of the edge of a giant colony of the *S. xylosus* S04002 strain formed on 0.4% agar BHI at 25°C.

Figure 5. Electron microscopic observations of the edge (A) and the median growth area of a giant colony of the *S. xylosus* S04002 strain formed at 25°C on 0.4% agar BHI supplemented (C) or not (B) with DNase I.

Table 1 *S. xylosus* strains and ability to spread at 25°C on 0.4% agar BHI medium

Strain	Origin	Spreading
DSM20266	Human skin	-
DSM20267	Human skin	-
C2a	DSM20267 cured	-
839	Meat starter	++
840	Meat starter	-
S01002	Meat starter	++
S01003	Meat starter	++
S01004	Meat starter	-
S01006	Meat starter	+++
S01007	Meat starter	+++
S01008	Meat starter	-
S04002	Meat starter	+++
S01001	Dairy starter	+
S04003	Dairy starter	++
S03187	Sausage	+++
S03191	Sausage	+
S06173	Raw milk	++
S06171	Cheese	++
S06175	Cheese	+++
S06176	Cheese	+
S06178	Cheese	-
S00290	Environment of food plant	+
S06167	Environment of food plant	+++
S06179	Environment of food plant	++
S06186	Environment of food plant	-
S04009	Cow mastitis	+++
S04010	Cow mastitis	+++
S04012	Cow mastitis	++
S04013	Cow mastitis	+++
S04016	Cow mastitis	-
S04017	Cow mastitis	-
S04018	Cow mastitis	+
S04011	Goat mastitis	++

S04014	Goat mastitis	-
S04019	Goat mastitis	+++
S04020	Goat mastitis	+++
S04021	Goat mastitis	+
00-1747	Mouse dermatitis	-
S07002	Mouse	+*
S07003	Mouse	-
S07001	Poultry feces	++
S07010	Dog feces	-
S07011	Rabbit feces	+
S06222	Clinical, prosthetic heart valve	+++
S07005	Clinical, endocarditis	+*
S06223	Clinical, liquid	++
S06224	Clinical, urine	++
S07006	Clinical, cerebrospinal fluid	++
S07007	Clinical, blood culture	++
S07008	Clinical, blood culture	+
S06225	Clinical, blood culture	++

*Strains spreading after 48 hours

Fig 1.

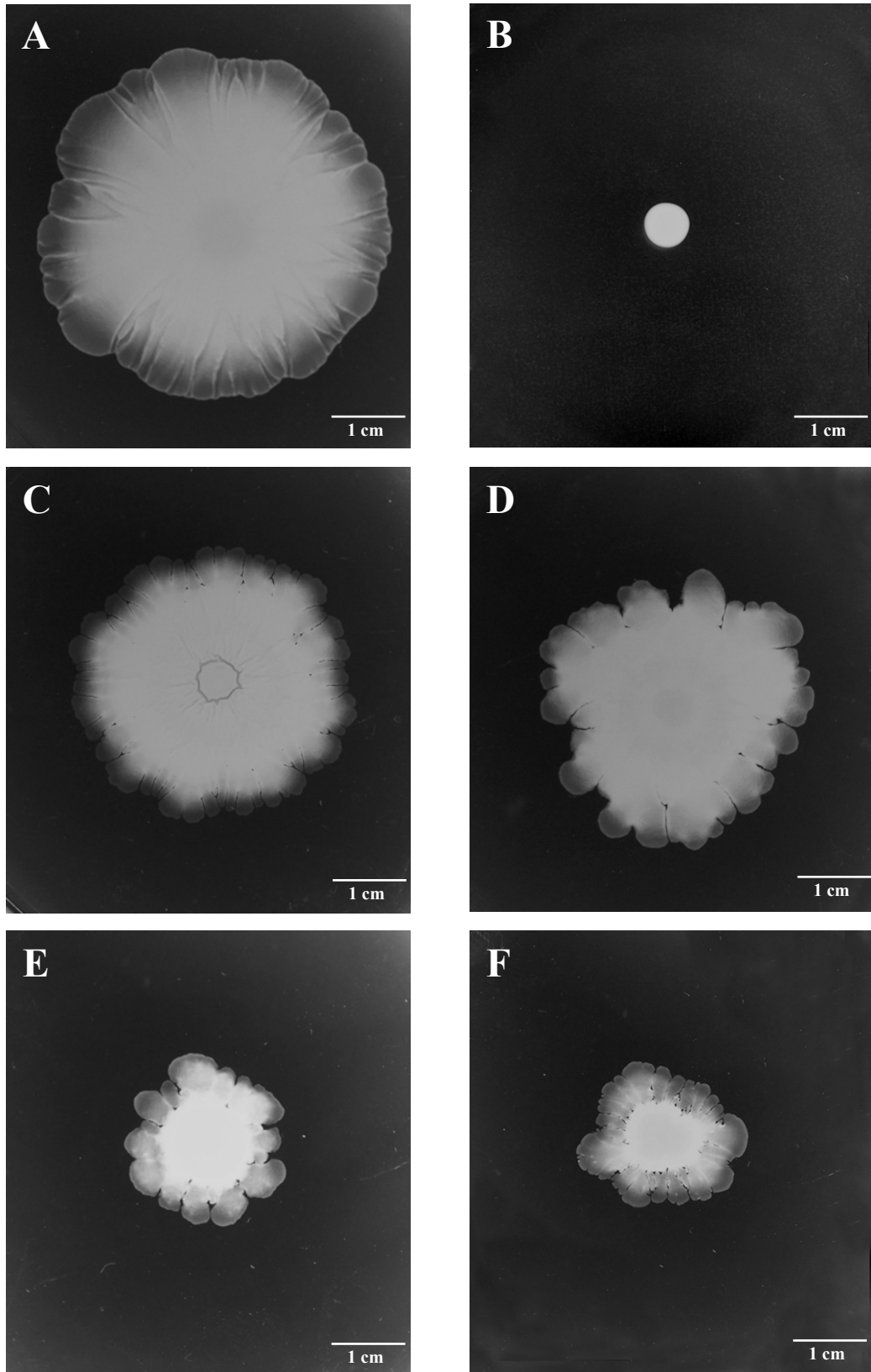
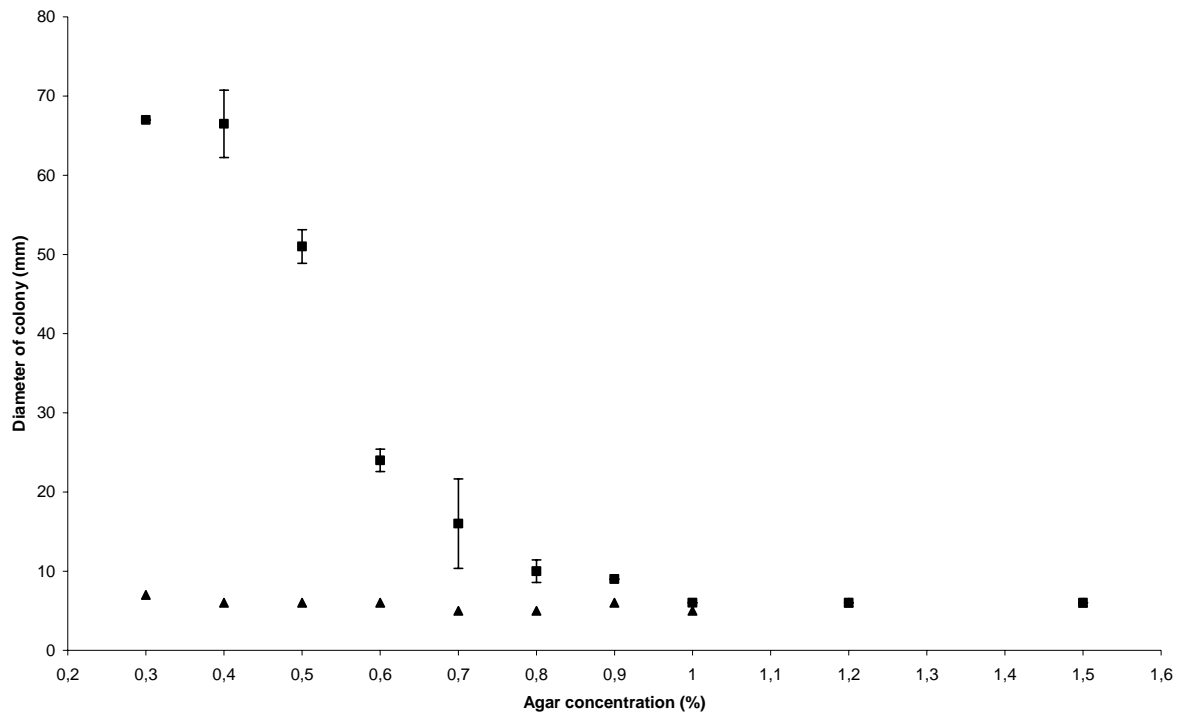


Fig 2.

A



B

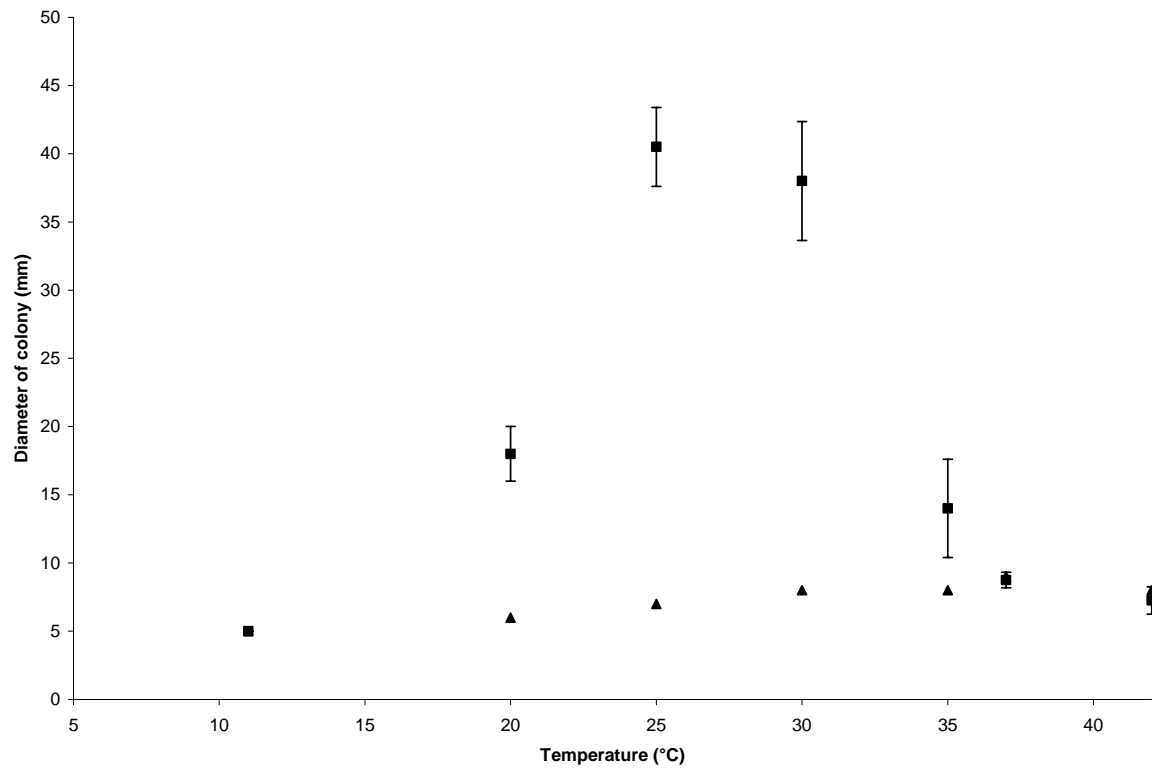


Fig 3.

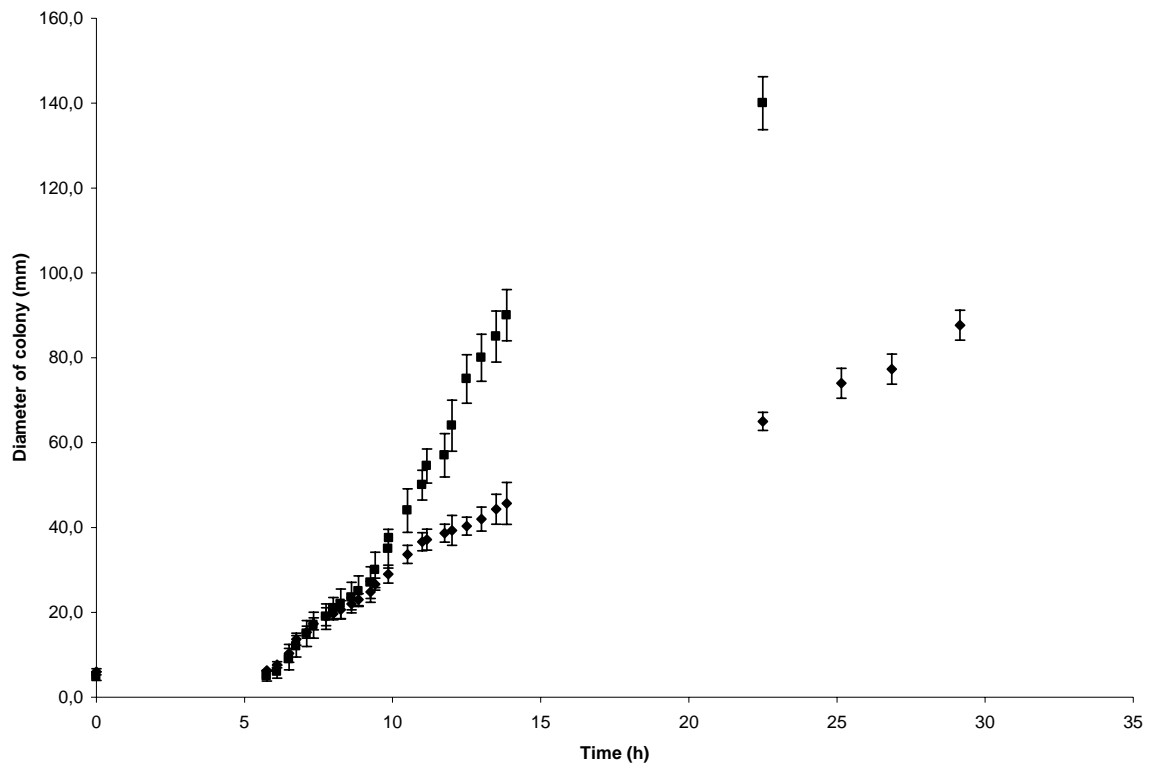


Fig 4.

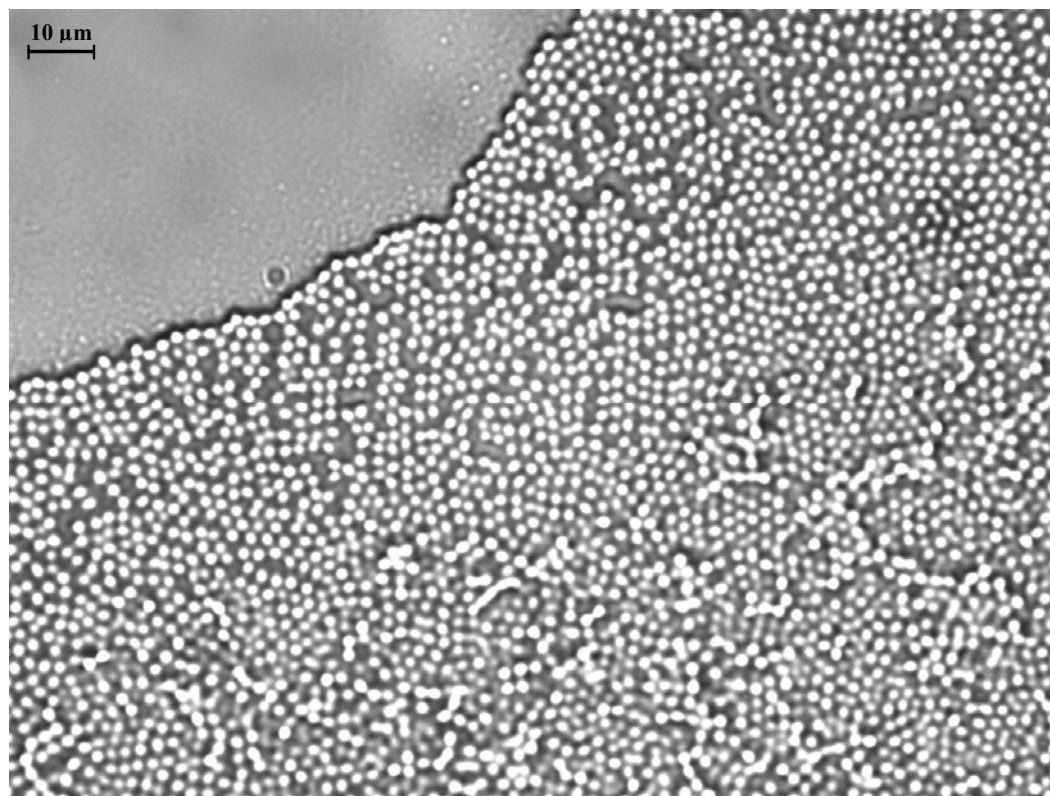
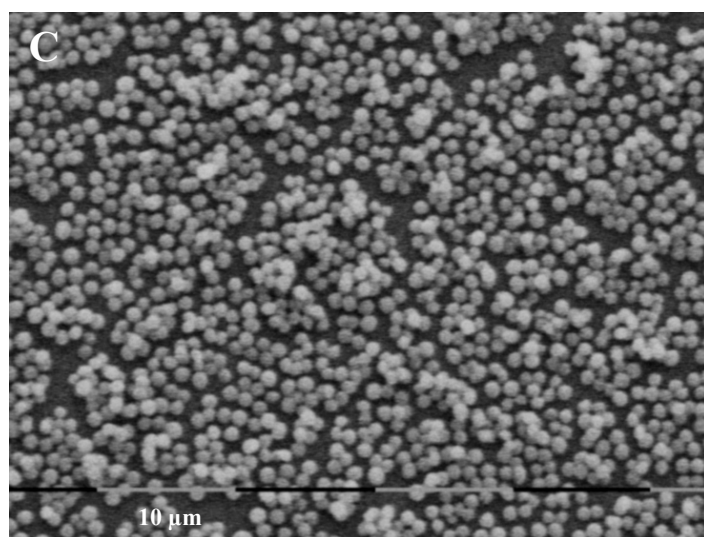
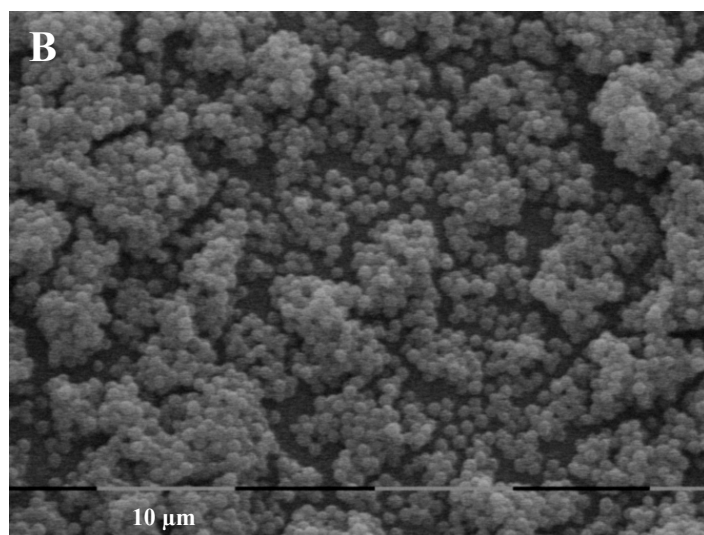
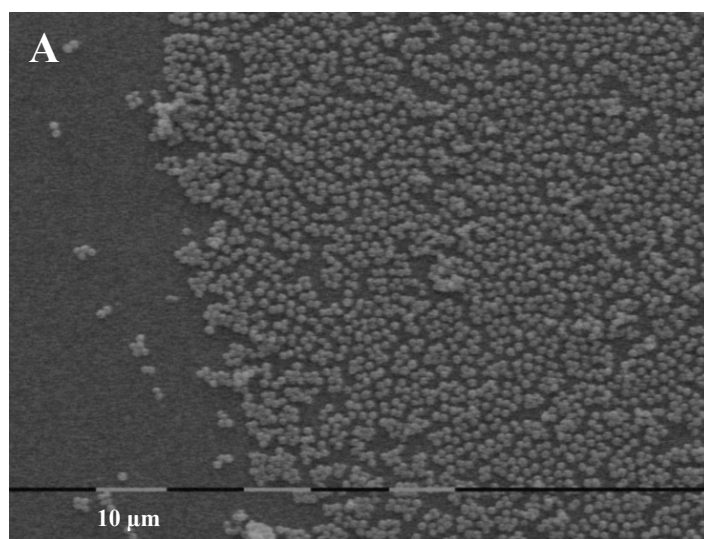


Fig 5.



DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE DE *S. XYLOSUS*

Article n°2

Dordet-Frisoni E., Talon R. and Leroy S.

Physical and genetic map of the *Staphylococcus xylosus* C2a chromosome

FEMS Microbiology Letters, 2007 Jan ; 266 (2): 184-193

PROBLEMATIQUE

Peu d'informations génétiques sur l'espèce *S. xylosus* étaient disponibles en 2003 lorsque ce travail a débuté. La majorité des connaissances portait sur les caractéristiques métaboliques en lien avec l'intérêt technologique de cette espèce. Vingt-trois gènes étaient décrits chez *S. xylosus* et environ 70 kb de séquence génomique étaient connus. La plupart des gènes étudiés concernaient le métabolisme des sucres, des acides aminés et la résistance au stress oxydatif. Aucune information sur l'organisation du génome de *S. xylosus* n'était alors disponible alors que cette espèce est couramment utilisée comme ferment dans les industries agro-alimentaires. Notre équipe avait comme projet de séquencer le génome entier de la souche *S. xylosus* C2a, un dérivé curé du plasmide psx267 de la souche de référence DSM20267, commensale de la peau. Pour préparer ce projet, il était indispensable d'estimer avec précision la taille du génome de cette souche pour optimiser la construction des banques. Nous avons ainsi construit la carte physique et génétique du chromosome de cette souche. Le séquençage aléatoire global du chromosome de *S. xylosus* C2a a été réalisé en collaboration avec le Génoscope durant l'année 2005. La connaissance de l'organisation globale de ce chromosome a permis d'accompagner l'étape délicate d'assemblage du génome.

RÉSULTATS

- ◆ La taille du génome de *S. xylosus* C2a a été estimée à 2868 kb \pm 10 kb par analyse en électrophorèse en champ pulsé après macrorestriction. Cette taille correspond à la taille moyenne des génomes du genre *Staphylococcus*. *S. xylosus* C2a fait partie des plus gros génomes actuellement décrits dans le groupe des staphylocoques à coagulase négative (Tableau 1).
- ◆ Dans cette étude, la taille du génome de six autres souches de *S. xylosus* a également été estimée. Une variation notable de la taille des génomes, de l'ordre de 11%, au sein de l'espèce *S. xylosus* a été mise en évidence, la différence de taille entre le plus petit génome et le plus grand étant de l'ordre de 300 kb.
- ◆ La carte physique de *S. xylosus* C2a a été construite, en positionnant 47 sites de restrictions obtenus avec les enzymes *ApaI*, *AscI*, *I-CeuI*, *SfiI* et *SmaI* sur le chromosome de cette souche.

- ◆ Trente-trois marqueurs génétiques, principalement des gènes du métabolisme, dont dix nouvellement décrits chez cette espèce ont été positionnés permettant d'établir la première carte génétique de *S. xylosus*. La position de l'origine de réplication (*oriC*) a été déduite grâce à la localisation des gènes *dnaA* et *gyrA* souvent présents près de cette région sur les génomes bactériens. La position et l'orientation des opérons ribosomiaux, transcrits de façon divergente de part et d'autre de l'origine de réplication, ont conforté cette localisation.
- ◆ Le chromosome de *S. xylosus* C2a contient six opérons ribosomiaux (*rrn*) dont 2 sont organisés en tandem. Chez les autres souches de *S. xylosus* étudiées, le nombre de *rrn* varie de 5 à 6 copies. Cette variation du nombre de *rrn* (5 ou 6) est également observée chez les espèces *S. aureus* et *S. epidermidis*. Lorsqu'il existe six copies de *rrn*, trois sont toujours regroupées dans une région représentant moins de 2 % du génome laissant penser que des événements de recombinaison se sont produits entre deux de ces opérons. Chez *S. xylosus* C2a, tous les opérons ribosomiaux contiennent deux sites de restriction *SmaI* et un site de restriction *ApaI*. Ces sites de restriction sont également présents sur les *rrn* des staphylocoques actuellement séquencés. Il existe donc une bonne conservation du contenu et de l'organisation des opérons ribosomiaux au sein du genre *Staphylococcus*.

Tableau 1 : Variation intra et inter-espèce de la taille des chromosomes des staphylocoques actuellement séquencés

Espèce	Souche	Taille du chromosome (kb)	Nombre de <i>rrn</i>	Référence
<i>S. aureus</i>	Mu50	2879	5	Kuroda <i>et al.</i> , 2001
	N315	2815	5	Kuroda <i>et al.</i> , 2001
	MW2	2820	6	Baba <i>et al.</i> , 2002
	MRSA252	2903	5	Holden <i>et al.</i> , 2004
	MSSA476	2800	5	Holden <i>et al.</i> , 2004
	COL	2809	6	Gill <i>et al.</i> , 2005
	USA300	2873	5	Diep <i>et al.</i> , 2006
	RF122	2742	5	NC_007622
	NCTC8325	2821	5	NC_007795
	<i>S. epidermidis</i>	ATCC 12228	2499	5
RP62A		2617	6	Gill <i>et al.</i> , 2005
<i>S. saprophyticus</i>	ATCC 15305	2517	6	Kuroda <i>et al.</i> , 2005
<i>S. haemolyticus</i>	JCSC1435	2685	5	Takeuchi <i>et al.</i> , 2005
<i>S. carnosus</i>	TM300	2560	5	Rosenstein <i>et al.</i> , 2005

Tableau 2 : Estimation de la taille des chromosomes et nombre d'opérons ribosomaux des souches de *S. xylosus* établis après macro-restriction avec l'enzyme I-CeuI et analyse par PFGE

	Origine	Nombre de <i>rrn</i>	Taille du chromosome (kb)
C2a	Peau humaine	6	2876
839	Ferment produit carné	6	2904
840	Ferment produit carné	6	2864
S01002	Ferment produit carné	6	2900
S01003	Ferment produit carné	6	2839
S01004	Ferment produit carné	5	2930
S01006	Ferment produit carné	6	2819
S01007	Ferment produit carné	6	2807
S01008	Ferment produit carné	6	2957
S04002	Ferment produit carné	6	2893
S01001	Ferment produit laitier	6	2824
S04003	Ferment produit laitier	6	2881
S00290	Environnement agro-alimentaire	6	2908
S03191	Saucisson	6	2906
S04009	Mammite bovine	5	3182
S04010	Mammite bovine	5	2840
S04011	Mammite bovine	5	2822
S04012	Mammite bovine	6	2911
S04013	Mammite bovine	5	2833
S04014	Mammite bovine	6	2933
S04016	Mammite bovine	5	2883
S04017	Mammite bovine	6	2956
S04018	Mammite bovine	6	2966
S04019	Mammite caprine	5	3259
S04020	Mammite caprine	5	3152
00-1747	Dermite de souris	5	2996

RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES

◆ Nous avons observé que les génomes de trois souches isolées de pathologies animales étaient plus grands d'environ 200 kb et contenaient cinq opérons ribosomaux contrairement à la souche commensale de la peau *S. xylosus* C2a et aux trois souches d'origine carnée ou isolée de l'environnement ce qui laissait supposer un lien entre l'origine des souches et le nombre de *rrn*. Afin de vérifier si ces observations pouvaient être généralisées, nous avons

évalué après restriction par l'endonucléase I-CeuI, la taille du chromosome et le nombre de *rrn* chez 20 autres souches de *S. xylosus*. Dix sont des souches utilisées comme ferment et 10 ont été isolées de mammites bovines ou caprines. La taille du chromosome des souches varie de 3259 à 2807 kb avec une taille moyenne 2925 kb. La variation de taille de génome au sein de l'espèce *S. xylosus* est plus importante que celle que nous avons établie précédemment sur un nombre restreint de souches. Elle est d'environ 14% et donc du même ordre que la différence de taille des génomes séquencés dans le genre *Staphylococcus* (14%). Les chromosomes des souches isolées de pathologies animales sont en moyenne plus grands que les chromosomes d'intérêt technologique, laissant supposer l'acquisition de matériel génétique chez ces souches. La variation du nombre de *rrn* de 5 à 6 a été confirmée. Les souches d'intérêt technologique arborent 6 *rrn*. Le nombre d'opérons ribosomiaux est variable chez les souches isolées de pathologies animales. Le nombre de *rrn* ne peut donc pas être corrélé à l'origine des souches.

◆ Une étude comparative entre le génome de *S. xylosus* C2a et les génomes de staphylocoques déjà séquencés a été réalisée sur la base des marqueurs génétiques de la carte de *S. xylosus*. Nous avons pu observer que la position de ces marqueurs semble assez conservée chez les autres espèces de staphylocoques (Figure 1). Au sein du groupe des staphylocoques à coagulase négative, *S. xylosus* appartient au groupe d'espèce *S. saprophyticus*. Sur la base des 33 marqueurs génétiques et des opérons ribosomiaux, l'organisation du génome de *S. xylosus* C2a semble proche de celle de *S. saprophyticus* bien que le génome de ce dernier soit de plus petite taille (2516 kb).

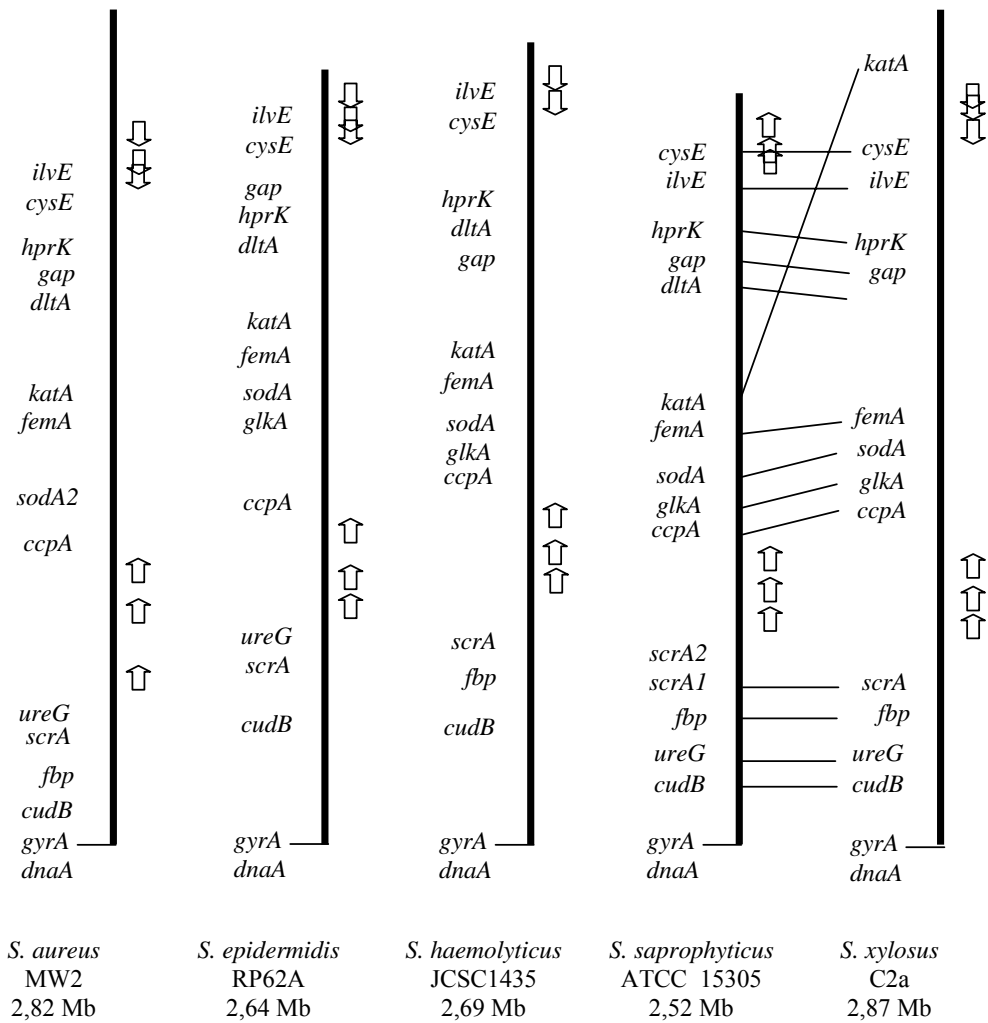


Figure 1 : Comparaison de la carte génétique de *S. xylosus* C2a avec les chromosomes de *S. aureus* MW2 (Baba *et al.*, 2002), *S. epidermidis* RP62a (Gill *et al.*, 2005), *S. haemolyticus* JCSC1435 (Takeuchi *et al.*, 2005) et *S. saprophyticus* ATCC 15305 (Kuroda *et al.*, 2005). L'alignement a été réalisé à partir de la position de l'origine de réplication déduite par la position des gènes *dnaA* et *gyrA*. Les flèches correspondent aux opérons ribosomaux.

Physical and genetic map of the *Staphylococcus xylosus* C2a chromosome

Emilie Dordet-Frisoni, Régine Talon & Sabine Leroy

INRA, Centre de Clermont-Ferrand Theix, Unité Microbiologie, Qualité et Sécurité des Aliments, Saint-Genès Champanelle, France

Correspondence: Sabine Leroy, INRA, Centre de Clermont-Ferrand Theix, Unité Microbiologie, Qualité et Sécurité des Aliments, F-63122 Saint-Genès Champanelle, France. Tel.: +33 4 73 62 45 95; fax: +33 4 73 62 42 68; e-mail: sleroy@clermont.inra.fr

Received 19 June 2006; revised 6 September 2006; accepted 20 October 2006.
First published online 24 November 2006.

DOI:10.1111/j.1574-6968.2006.00538.x

Editor: Oscar Kuipers

Keywords

Staphylococcus xylosus; chromosome map; genome size; *rrn* loci.

Introduction

Staphylococcus xylosus belongs to the coagulase-negative group of staphylococci (CNS). It is used as a starter culture for meat and dairy products. It ensures colour development and contributes to typical aromas (Talon *et al.*, 2002). *S. xylosus* is a ubiquitous bacterium that was first isolated from human skin (Schleifer & Kloos, 1975). It is frequently isolated in naturally fermented products and food-processing environments (Irlinger *et al.*, 1997; Rossi *et al.*, 2001; Martin *et al.*, 2006). Most *S. xylosus* strains are able to form biofilms (Planchon *et al.*, 2006). This capacity could explain the presence of this species in food-processing plants. Historically, this species was first defined as a nonpathogenic bacterium and *S. xylosus* has received particular attention as a recombinant microorganism for development of an oral vaccine (Nguyen *et al.*, 1995). However, this species shows a certain degree of diversity as some strains have been described as being involved in opportunistic animal infections like mastitis or dermatitis (Forsman *et al.*, 1997; Won *et al.*, 2002; Malinowski *et al.*, 2003; Thornton *et al.*, 2003). In addition, several strains isolated from milk and goats were reported to produce enterotoxins (Bautista *et al.*, 1988; Valle *et al.*, 1990). The *S. xylosus* C2a strain used in this study is derived from the type strain DSM20267 cured of its endogenous plasmid pSX267 (Götz *et al.*, 1983). Transfor-

Abstract

Staphylococcus xylosus is a ubiquitous bacterium frequently isolated from mammalian skin and occurring naturally on meat and dairy products. A physical and genetic map of the *S. xylosus* C2a chromosome was constructed by pulsed-field gel electrophoresis analysis after digestion with *AscI*, *ApaI*, *I-CeuI*, *SfiI* and *SmaI* enzymes and hybridization analysis. The chromosome size was estimated to be 2868 ± 10 kb. Thirty-three genetic markers were mapped. The probable origin of replication (*oriC*) was positioned. Six *rrn* loci were located, and their orientation was determined. The chromosomes of six additional *S. xylosus* strains were also analysed by *I-CeuI* digestion, and an intraspecies diversity of the chromosome size and the number of *rrn* operons was shown.

mation systems have been developed for *S. xylosus* C2a strain (Brückner, 1997) and allowed to study main metabolic staphylococcal-related pathways (Brückner *et al.*, 1993; Egeter & Brückner, 1995; Bassias & Brückner, 1998; Fiegler *et al.*, 1999).

Despite the significance of *S. xylosus* as a fermenting agent and its occurrence in the food environment, there is little information on its genetic content, and the structural organization of its chromosome is still unknown. In the *Staphylococcus* genus, whole-genome information is available for the four species recognized as opportunistic human pathogens: *Staphylococcus aureus* (Kuroda *et al.*, 2001; Baba *et al.*, 2002; Holden *et al.*, 2004; Gill *et al.*, 2005), *Staphylococcus epidermidis* (Zhang *et al.*, 2003; Gill *et al.*, 2005), *Staphylococcus saprophyticus* (Kuroda *et al.*, 2005) and *Staphylococcus haemolyticus* (Takeuchi *et al.*, 2005). Concerning the other staphylococcal species, only the chromosome organization of *Staphylococcus carnosus*, also used as a starter culture, is known (Wagner *et al.*, 1998).

To better understand the content and organization of the *S. xylosus* genome, the construction of the physical and genetic map of the chromosome of *S. xylosus* C2a strain provides a framework for studying structural conservation within this species. It is also an extremely valuable basis for starting a genome sequencing project. In this study, the physical map was constructed and 33 genetic loci were

mapped. The size of the circular chromosome was estimated and the number of copies and orientation of *rrn* operons were demonstrated. The chromosomes of six additional *S. xylosus* strains were analysed to determine the intraspecies diversity.

Materials and methods

Bacterial strains and growth conditions

The *S. xylosus* C2a strain was used in this study (Götz *et al.*, 1983). Two *S. xylosus* strains were isolated from meat environment (*S. xylosus* S00290) or sausage (*S. xylosus* S03191) and one (*S. xylosus* S04002) is used as a meat starter culture. *Staphylococcus xylosus* S04009 and *S. xylosus* S04020 were isolated from mastitis, and *S. xylosus* 00-1747 from mouse dermatitis (Won *et al.*, 2002). The strains were grown in brain-heart infusion medium at 37 °C.

Preparation, restriction enzyme digestion and electrophoretic separation of DNA

Genomic DNA was prepared in agarose plugs as described previously (Morot-Bizot *et al.*, 2003). The enzymes *AscI*, *SfiI* and *I-CeuI*, and *SmaI* and *ApaI* were from New England Biolabs and Promega, respectively, and were used according to the manufacturers' instructions.

Digested DNA was subjected to pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) in 1% agarose gels in $0.5 \times$ TBE buffer at on a CHEF-DR III apparatus (Bio-Rad). The electrophoretic conditions are described in the Fig. 1 legend. Two-dimensional (2D) PFGE was performed as described by Cornillot *et al.* (1997). To investigate the presence of DNA fragments between 15 and 1 kb, all digests were resolved in conventional 0.7% agarose gels. Gels were analysed using QUANTITY ONE QUANTITATION Software (Bio-Rad).

Southern hybridization and DNA probes

The separated digested chromosomal DNA was passively transferred overnight to positively charged nylon membranes (Hybond-N, Amersham). All probes used in this study (Table 1) were labelled with random-primed DNA labelling using DIG-High Prime (Roche). Probes were amplified using the primers listed in Table 1. All the probes used were checked and sequenced with BigDye terminators according to the manufacturer in a DNA capillary sequencer 'ABI PRISM 310' (PE Applied Biosystems). Hybridizations and detections were performed using chemiluminescent detection following the supplier's instructions (Roche).

The GenBank accession numbers for the sequences reported in this paper are DQ471958, DQ471959, DQ472004–DQ472011.

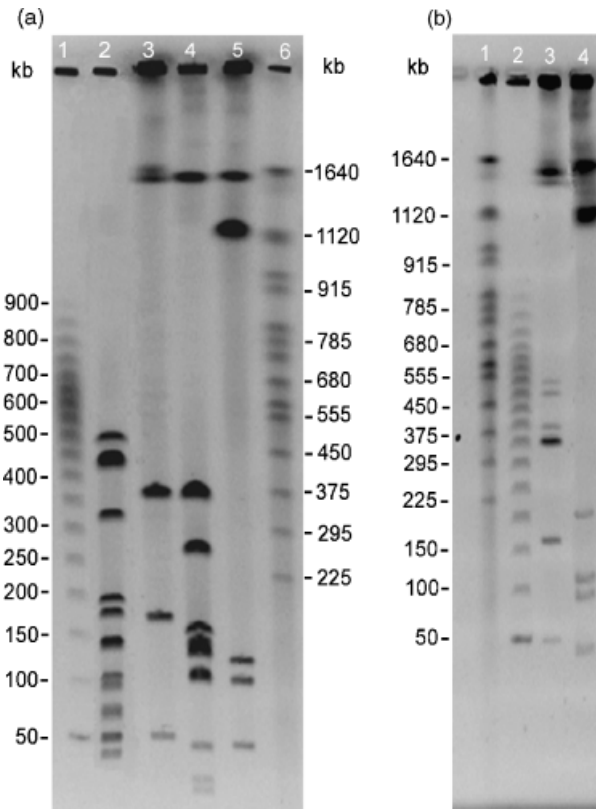


Fig. 1. (a) Macrorestriction fragments of *Staphylococcus xylosus* C2a chromosome. Lane 1: lambda DNA concatemers, lane 2: *ApaI* digestion, lane 3: *AscI* digestion, lane 4: *SmaI* digestion, lane 5: *I-CeuI* digestion and lane 6: *Staphylococcus cerevisiae* chromosomal DNA (Bio-Rad). (b) *AscI* and *I-CeuI* partial restrictions. Lane 1: *S. cerevisiae* chromosomal DNA; lane 2: lambda DNA concatemers (Promega), lane 3: *AscI* partial restriction (4 h of digestion with 0.5 U), lane 4: *I-CeuI* partial restriction (4 h of digestion with 1 U). PFGE were performed with switch times of 100 s for 12 h, 70 s for 16 h and 1–30 s for 13 h at 6 V cm^{-1} , 120 and 14 °C.

Results

Estimation of chromosomal size

The size of the genome of *S. xylosus* C2a was evaluated by PFGE of chromosomal DNA digested with the rare cutting enzymes *ApaI*, *AscI*, *SfiI* and *SmaI*. The homing endonuclease *I-CeuI*, which recognizes sites located in bacterial *rrl* genes, was also used. *SfiI* cleaved the chromosome at a unique site (data not shown). The restriction patterns observed on PFGE are shown in Fig. 1a. The small fragments were detected by conventional electrophoresis (data not shown). In total, 13, 4, 6 and 12 bands were observed after digestion with *ApaI*, *AscI*, *I-CeuI* and *SmaI*, respectively (Table 2). The size of the largest fragment of the *AscI* pattern was underestimated due to the lack of accuracy of PFGE for fragment larger than 1.6 Mb. Its exact size was therefore determined after double digestion with *SfiI*. A higher

Table 1. Probes derived from PCR amplified genes and used for physical and genetic mapping of *Staphylococcus xyloso* C2a

Gene	Gene product	Primer sequences (5'–3')	Fragment size (kb)	Accession no.	Hybridizing fragments			Reference
					<i>Ap</i> ₁	<i>As</i> ₁	<i>Sm</i> ₁	
Carbohydrate transport and metabolism								
<i>glkA</i>	Glucose kinase	ACGGGAGAAGTAAACGGAGC ACACCTGTAGCAGATGCCAC	469	X84332	<i>Ap</i> ₁	<i>As</i> ₁	<i>Sm</i> ₁	Wagner et al. (1995)
<i>ccpA</i>	Catabolite control protein	TGGCAACCGTTTCTCGTGAG TCATACCCACTGCACCAATGTC	830	X95439	<i>Ap</i> ₁	<i>As</i> ₁	<i>Sm</i> ₁	Egeter & Brückner (1996)
<i>malR</i>	Maltose-maltotriose utilization regulator	AACCAAACCGAGCAGCGAGAAC TTTGTGGCGGGGATGCAAATG	800	X78853	<i>Ap</i> ₁	<i>As</i> ₁	<i>Sm</i> ₁	Egeter & Brückner (1995)
<i>lacH</i>	β-D-galactosidase (lactase)	CTCCTGAAGAAATTGAGGAGAC TCATGGGGCACCTATTTG	301	Y14599	<i>Ap</i> ₂	<i>As</i> ₁	<i>Sm</i> ₄	Bassias & Brückner (1998)
<i>xyIA</i>	Xylose isomerase	TGTTGCGGAACGTGATTGGG CTTCACGACCGCCCCAAAAAAC	385	X57599	<i>Ap</i> ₂	<i>As</i> ₁	<i>Sm</i> ₄	Sizemore et al. (1991)
<i>pstHI</i>	Phosphocarrier protein general component of the phosphoenolpyruvate-dependent carbohydrate	AGCGTACCAAAATAAAGCTGAG CCAGCCATTTCTCCGCACATAC	788	AF316496	<i>Ap</i> ₃	<i>As</i> ₁	<i>Sm</i> ₁	Brückner & Meyer (unpublished)
<i>scrA</i>	Sucrose-specific enzyme II of the phosphotransferase system	TGTGCAACGCGCTTGAGACTTG TACCCATGAGCAAACCACCAGC	310	X69800	<i>Ap</i> ₇	<i>As</i> ₂	<i>Sm</i> ₇	Wagner et al. (1993)
<i>gap</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	TACACAAGATGCGCCACAC GATCGCCAACCTGCATAACAC	356	AF495486	<i>Ap</i> ₄	<i>As</i> ₁	<i>Sm</i> ₁	Liu et al. (unpublished)
<i>gusA</i>	β-Glucuronidase	GTGAGCACGAATCATAGCAGAG CACCTACAGCAGTCGTTTCATC	465	DQ472005	<i>Ap</i> ₁₀	<i>As</i> ₄	<i>Sm</i> ₇	This study
<i>fbp</i>	Fructose biphosphatase	AGCCTTCCGTCTAAAATGCC GCCACCAACTGCATACAAAAC	905	DQ472006	<i>Ap</i> ₁₀	<i>As</i> ₁	<i>Sm</i> ₁₁	This study
<i>scrB</i>	β-fructofuranosidase	CGGAGTGGACAAAAGAGCAAC TATCGGGCAAACCCATCCAC	898	X67744	<i>Ap</i> ₁₂	<i>As</i> ₃	<i>Sm</i> ₆	Brückner et al. (1993)
<i>glcU</i>	Glucose uptake operon	GGCCAAAATATGTAACACTCGC	328	Y14043	<i>Ap</i> ₁₂	<i>As</i> ₃	<i>Sm</i> ₆	Fiegler et al. (1999)
<i>gdh</i>	Amino acid transport and metabolism	CCTTTACCGCCATAAATGC						
<i>ampS</i>	Leucyl aminopeptidase	CGAGTAGATGGTAACGACCCAG CCAAGAGCAATGTGGCATGAAG	514	DQ472010	<i>Ap</i> ₁₃	<i>As</i> ₃	<i>Sm</i> ₆	This study
<i>culdB</i>	Choline dehydrogenase	TGAAACGACACCAGAACCAC CCAGCCATTTCTCCGCACATAC	322	AF009415	<i>Ap</i> ₂	<i>As</i> ₁	<i>Sm</i> ₃	Rosenstein et al. (1999)
<i>ureG</i>	Urease	ATCACGCACACCTACGCTTG AGCAGCTAAATTGTCCGCCACC	1000	Z35136	<i>Ap</i> ₅	<i>As</i> ₁	<i>Sm</i> ₃	Jose (unpublished)
<i>gltd</i>	NADPH glutamate synthase	AGACGAAGCGGCACAACAAG TCACGCAATGCAGTAGCGAC	828	DQ472007	<i>Ap</i> ₆	<i>As</i> ₁	<i>Sm</i> ₁₂	This study
<i>cysE</i>	Serine O-acetyltransferase	AGGTGCCCAAATCGGTAGAC TGCTCGTAAATTGGGTCAGG	363	Y07614	<i>Ap</i> ₈	<i>As</i> ₁	<i>Sm</i> ₁	Fiegler & Brückner (1997)
<i>ilvE</i>	Branched-chain amino acid aminotransferase	GCACAAACGAATGCATCAGCAC GACGTTCTTCCACTTCATAGCC	217	DQ472004	<i>Ap</i> ₈	<i>As</i> ₁	<i>Sm</i> ₁	This study
<i>arg</i>	Arginase	GCATTGAGCATAACCATTTC ACTAAACCTACTGCTTGCTCTG	615	DQ472008	<i>Ap</i> ₉	<i>As</i> ₂	<i>Sm</i> ₈	This study
Genes near oriC								
<i>dnaA</i>	Replication initiation protein	GARGARTTYTTYCAYACNTTYAAC* GARGARTTYTTYCAYACNTTYAAT* ACWGHGTRTGRTCYCTWCCWCC*	530	DQ471958	<i>Ap</i> ₂	<i>As</i> ₁	<i>Sm</i> ₂	This study
<i>gyrA</i>	DNA gyrase subunit A	ATGCGTGAATCATTITTAGACTATGC† GAGCCAAAGTTACCTTGACC†	300	DQ471959	<i>Ap</i> ₂	<i>As</i> ₁	<i>Sm</i> ₂	This study
Inorganic ion transport and metabolism								
<i>sodA</i>	Superoxide dismutase	TGCATTGGAACCACACATTGATC GTGTTCCCAAACATCTAATCCTAAG	468	AJ276960	<i>Ap</i> ₁	<i>As</i> ₁	<i>Sm</i> ₁	Barrière et al. (2001)

Table 1. Continued

Gene	Gene product	Primer sequences (5'–3')	Fragment size (kb)	Accession no.	Hybridizing fragments			Reference
					<i>ApaI</i>	<i>AscI</i>	<i>SmaI</i>	
<i>katA</i>	Catalase	CAGTGGTTAACACCCAAACGG CAGGCCAACGTGGTGACAG	762	AJ295151	Ap6	As1	Sm2	Barrière <i>et al.</i> (2002)
rrn operon								
<i>rrs</i>	16S rRNA gene	CCTATAAGACTGGGATAACTTCGGG CTTTGAGTTTCAACCTTGCCTGTCG	780	AY688108	Ap6, Ap9, Ap11, Ap13, Ap15, Ap16	As1, As2, As3	Sm5, Sm6, Sm8, Sm10, Sm12, Sm19	Becker <i>et al.</i> (2004)
<i>rrl</i>	23S rRNA gene	CTGTCTCAACGAGAGACTC ACTAAGTCCGCTCTTTCGACCC	400	DQ472009	Ap8, Ap9, Ap12, Ap14, Ap15, Ap16	As1, As2, As3	Sm13, Sm14, Sm15, Sm16, Sm17, Sm18	This study
Other genes								
<i>femA</i>	Formation of pentaglycine side chain of staphylococci peptidoglycan	GTGAGGTATTGGAAAATGCAGG TTCCACCCGCATAATACTACTAC	614	AF099965	Ap1	As1	Sm1	Vannuffel <i>et al.</i> (1999)
<i>mprF</i>	Putative membrane protein	CCGTCTTTTGTATTGCACTC CCCGCTTTTCTTCCCTGAC	905	AF145698	Ap1	As1	Sm1	Peschel <i>et al.</i> (2001)
<i>bap</i>	Biofilm-associated protein	CCCTATATCGAAGGTGTAGAATTGCAC GCTGTTGAAGTTAATACTGTACCTGC	970	DQ008304	Ap2	As1	Sm4	Tormo <i>et al.</i> (2005)
<i>asx</i>	Putative bifunctional autolysin	CAACAGTCGCAACACGTTCTGTC CCACTCGTACTACTCTGAAG	692	AJ401468	Ap3	As1	Sm1	Hell <i>et al.</i> (unpublished)
<i>dltA</i>	D-alanine-D-alanyl carrier protein ligase	TGGACCTACAGAAGCGACAG CATCCTCGGCAATCTGCTTAC	575	AF032440	Ap4	As1	Sm1	Peschel <i>et al.</i> (1999)
<i>hprK</i>	HPr kinase (operon <i>urvA</i>)	GCCAGATGAAGAACGTAAAGGACG CTGTTAGTATCGATCCAGCGCC	376	AJ243915	Ap4	As1	Sm1	Huynh <i>et al.</i> (2000)
<i>gehM</i>	Lipase precursor	ACATACGAAGCGAGCGTTGG TAGTGGAGAAATCTCACCGCC	300	AF208229	Ap6	As1	Sm2	Rosenstein & Götz (2000)
<i>ycgM</i>	Fumarylacetoacetate hydrolase	TTTTTACCGCCAGTCACGCC ATTCATACCTGCACCAACGCC	566	DQ472011	Ap17	As1	Sm1	This study

*Degenerated primers were used, deduced from highly conserved region of the DnaA protein Richter & Messer (1995).

†Primers were designed from a consensus sequence observed in coagulase-negative staphylococci Dubin *et al.* (1999).

staining intensity of several *ApaI* and *SmaI* bands suggested the presence of comigrating fragments. Double digestion analysis with *AscI* and PFGE 2D indicated that the *SmaI* fragments of 100 and 48 kb were doublets (data not shown). After digestion with *SfiI*, the 444 kb *ApaI* fragment was revealed to be a doublet. The other broader *ApaI* fragments of 142, 72 and 53 kb were demonstrated to be doublets by hybridization with specific probes (see below). Hybridization experiments also revealed that the 3 kb *SmaI* band corresponded to six different restriction fragments (see below). The genome size of the *S. xylosus* C2a strain was estimated to be 2868 ± 10 kb.

Construction of an I-CeuI, AscI and SfiI backbone

Partial I-CeuI digestions were performed to organize the six I-CeuI fragments. After partial digestion, two additional fragments were observed (Fig 1b). We could deduce that the fragment > 2000 kb could only be obtained with the combination of Ce1 (1460 kb)+Ce2 (1138 kb). The 225 kb

fragment could only correspond to the combination of Ce3 (125 kb)+Ce4 (100 kb). According to this, the linkage of Ce1 with Ce2 and Ce3 with Ce4 was deduced but the order between Ce3 and Ce4 could not be established. Because of the large size of Ce1 and Ce2 fragments, no partial digestions including Ce5 (50 kb) could be distinguished. However, the combinations Ce3+Ce4+Ce5, Ce3+Ce5 or Ce4+Ce5 were not detected; this indicated that Ce5 is not linked to Ce3 or Ce4 and was positioned between Ce1 and Ce2 in the large partial restriction fragment. The small fragment Ce6 (5 kb) was placed by a combination of double digestion *AscI/SfiI* and consecutive digestion with I-CeuI. After digestion with I-CeuI, the largest fragment from the double digestion *AscI/SfiI* gave three fragments of 810, 475 and 48 kb (Ce5) and one fragment of 5 kb (Ce6), which was not detected directly after electrophoresis because of its low DNA concentration. Hybridization experiments revealed the presence of this small fragment (see below). This led to the linkage of Ce6 fragment with Ce5 but it was not possible to determine their order. To carry on the construction of the backbone, restriction with enzyme *AscI* was performed. We ordered *AscI* fragments by

Table 2. Mean sizes of fragments generated by digestion with *ApaI*, *AscI*, *I-CeuI* and *SmaI* enzymes of the *Staphylococcus xylosum* C2a chromosome

Fragment no.	Fragment size* (kb) obtained with			
	<i>ApaI</i>	<i>AscI</i>	<i>I-CeuI</i>	<i>SmaI</i>
1	486 ± 5	2270 ± 50	1460 ± 10	1460 ± 17
2	444 ± 4 [†]	364 ± 7	1138 ± 19	365 ± 5
3	444 ± 4 [†]	169 ± 4	125 ± 1	260 ± 4
4	325 ± 2	51 ± 2	100 ± 2	155 ± 1
5	196 ± 1		48 ± 1	135 ± 1
6	180 ± 0		5 ± 0	125 ± 1
7	142 ± 2 [†]			100 ± 1 [†]
8	142 ± 2 [†]			100 ± 1 [†]
9	105 ± 0			48 ± 2 [†]
10	98 ± 1			48 ± 2 [†]
11	72 ± 3 [†]			31 ± 1
12	72 ± 3 [†]			25 ± 1
13	53 ± 1 [†]			3 ± 0 [‡]
14	53 ± 1 [†]			3 ± 0 [‡]
15	47 ± 1			3 ± 0 [‡]
16	6 ± 0			3 ± 0 [‡]
17	4.3 ± 0			3 ± 0 [‡]
18				3 ± 0 [‡]
19				2.3 ± 0
Estimated genome size (kb)	2869	2854	2876	2872

*Mean size of five or three (for large fragments) independent gels ± the SD.

[†]Two comigrating fragments indistinguishable in size.

[‡]Six comigrating fragments indistinguishable in size.

partial digestion, which gave three transitional fragments (Fig. 1b). The 580 kb fragment was attributed to the sum of the fragments As2, As3 and As4, the 530 kb fragment to the sum of As2 and As3 and the 420 kb fragment to the sum of As2 and As4. According to this, we could conclude that As2 was flanked by As3 and As4 fragments. Double restriction analyses were performed to align the *AscI* and *I-CeuI* skeletons (Table 3). Double digestions with the single restriction site enzyme *SfiI*, which cut *AsI* into 1335+935 kb fragments and *CeI* into 930+530 kb fragments, indicated that *AsI* overlapped the *CeI* fragment (data not shown). The order was established for all the fragments generated, except for *Ce6*. The *Ce6* fragment linked to *Ce5* was arbitrarily positioned after *Ce5*. The *I-CeuI*, *AscI* and *SfiI* backbone was thus achieved (Fig. 2). These results demonstrated the circular nature of the *S. xylosum* C2a chromosome, as always observed in *Staphylococcus*.

Positioning of genetic markers and extension to the physical map to include *ApaI* and *SmaI* fragments

Based on the *I-CeuI*, *AscI* and *SfiI* backbone, a genetic map was constructed by hybridization of restriction fragments of

S. xylosum C2a chromosome with specific probes (Table 1). Thirty-three genetic markers were localized on the physical map (Fig. 2). The *gyrA* and *dnaA* probes allowed orientation of the map (Fig. 2). The use of genetic markers was essential to complete the physical map for *SmaI* and *ApaI* restriction fragments. Double digestions with *SfiI* restriction enzyme allowed to locate the Sm1 fragment (930+530 kb) and the Ap3 fragment (380+70 kb) within the *CeI* and *AsI* fragments (Fig. 1b). The *ApaI* and *SmaI* restriction sites were colocalized with all the *I-CeuI* sites (Table 3). Analysis of the size of *SmaI* and *ApaI* fragments allowed their location within *AscI* and *I-CeuI* (Table 2, Fig. 2), and genetic markers were used to determine their order (Table 1).

The *gyrA*, *xylA* and *cudB* probes assigned the Sm2, Sm3 and Sm4 fragments within Ap2 (Table 1). Sm4 was not restricted by *ApaI* and thus surrounded by Sm2 and Sm3. Hybridization with the *katA* and *gehM* probes revealed that Sm2 also overlapped Ap6. This fragment overlapped Sm12 from the results of hybridization using a *gltD* probe. The location of the *ureG* probe revealed that Sm3 partly covered Ap5. The linkage of Sm12-Sm2-Sm4-Sm3 and Ap6-Ap2-Ap5 was thus established (Fig. 2). The position of Sm11 in Ap10 and *AsI* fragment was determined using the *fbp* probe. Moreover, the *gusA* probe colocalized Ap10 with Sm7 and *As4* fragments (Table 1). The *scrA* probe hybridized to Sm7, Ap7 and *As2*, indicating that these fragments were colocalized (Table 1). The Ap10 and Ap7 fragments were thus linked and overlapped Sm11-Sm7 and *As1-As4-As2* (Fig. 2). The position of the Sm9 fragment was established by double digestion with *AscI* enzyme and 2D PFGE analysis. The *As2* fragment was restricted by *SmaI* giving four fragments of 135 (Sm5), 90, 65 and 49 kb (Sm9) (data not shown). Given the circular nature of the chromosome, the remaining Sm5 fragment was positioned in the free portion between Sm9 and Sm8. The remaining small *SmaI* fragments (Sm13 to Sm17) were positioned by hybridization with the *rrl* probe (see below).

The hybridization of different probes with Ap1, Ap3, Ap4, Ap8 and Ap16 fragments showed the overlap of these fragments within the Sm1 fragment (Table 1). Owing to the position of Ap3 linked to the *SfiI* restriction site, Ap1 was thus mapped upstream from the Ap3 fragment in the clockwise orientation of the map. The *rrl* probe hybridized to Ap8 (Table 1). Thus, this fragment was positioned close to the junction between *CeI* and *Ce5*. The Ap4 fragment could only be located between Ap8 and Ap3. Different locations were possible for Ap16. This fragment was arbitrarily positioned between the Ap4 and Ap3 fragments.

Copy number, position, orientation and organization of *rrn* loci

To position *rrn* loci inside the *S. xylosum* C2a chromosome, the intron-encoded endonuclease *I-CeuI* was used. Six

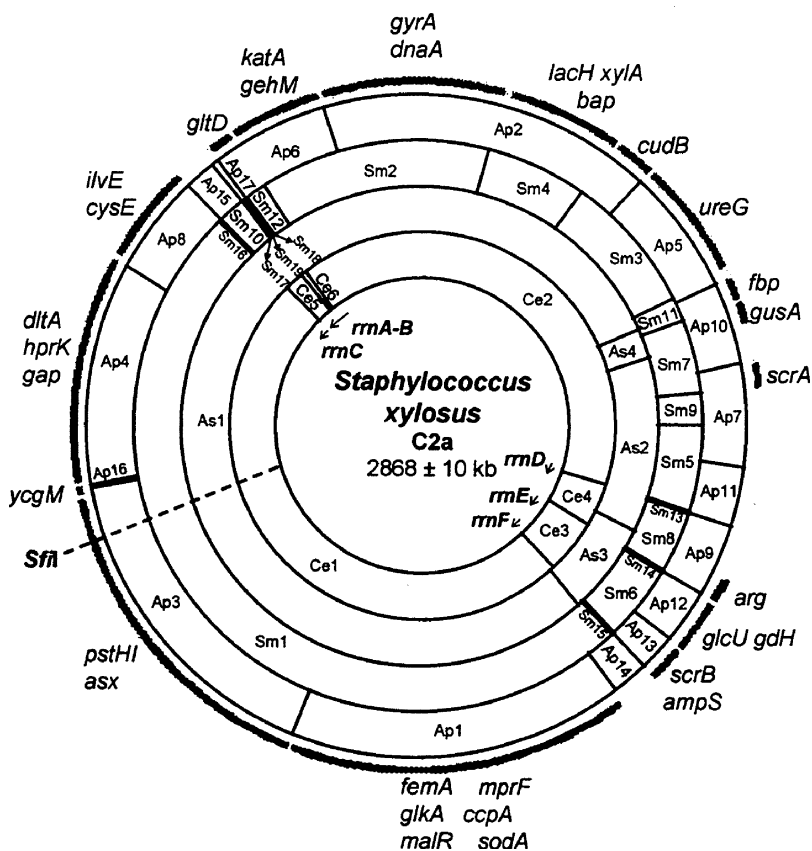


Fig. 2. Physical and genetic map of the 2868 ± 10 kb chromosome of *Staphylococcus xylosus* C2a generated with *Apa*I, *Asc*I, *I-Ceu*I, *Sma*I and *Sfi*I digestions. The chromosome map was oriented based on the location of *dnaA* and *gyrA* genes. The restriction fragments are designated as indicated in Table 2. The relative positions of Ce6, Ap16, Ap17 and Sm19 are not known. The genes are positioned on the map to the minimum region localized by hybridization. The direction of transcription of *rrn* operons (*rrnA* to *rrnF*) is indicated by an arrow.

fragments were obtained after *I-Ceu*I digestion, indicating that six *rrn* loci are present on the *S. xylosus* C2a chromosome (Table 2). Two of these are most probably contiguous as the fragment Ce6 (5 kb) corresponded to the size of a typical bacterial *rrn* operon. Two specific probes corresponding to the *S. xylosus* partial *rrs* gene and to the 3' end of the *rml* gene, located upstream and downstream from the *I-Ceu*I site, were used to locate the six *rrn* loci (Table 1). They are clustered in two different regions of the chromosome. Three *rrn* operons named *rrnA*, *rrnB* and *rrnC* were positioned within the region of the As1, Ap15 and Sm10 fragments. The three others named *rrnD*, *rrnE* and *rrnF* were within the As2-As3 fragments (Fig. 2). Hybridization with the *rrs* and *rml* probes to *I-Ceu*I digested DNA fragments indicated the *rrn* operon orientations (Fig. 2). These results highlighted that the *rrn* loci are pointed outward to both directions of the putative *oriC* region. So the *rrnA*, *rrnB* and *rrnC* operons were oriented in the opposite direction relative to *rrnD*, *rrnE* and *rrnF* operons. We showed the probable presence of *Apa*I and *Sma*I restriction sites in the *rrn* loci in the *S. xylosus* chromosome. Hybridization with the *rml* probes to *Sma*I fragments revealed the presence of two close *Sma*I restriction sites in the *rrn* loci on each side of the *rml* probe. This probe hybridized only to the 3 kb *Sma*I band (Table 1). Thus, we could establish that this band

corresponds to six indistinguishable fragments (Sm13 to 18, Table 2). The position of the *Apa*I restriction site within the *rrn* loci was deduced from *Apa*I/*Sma*I double digestion and conventional electrophoresis analysis. The 3 kb fragments were restricted by *Apa*I and generated fragments of 1.4 and 1.5 kb (Table 3). This result demonstrated the presence of an *Apa*I restriction site within the *rml* gene. The *rrs* and *rml* probes hybridized to *Apa*I fragments of 72 and 53 kb. As Ap12 (72 kb) and Ap13 (53 kb) were located within the Ce3 fragment, each of these fragments could only be hybridized with one of the *rrn* probes: *rrs* or *rml*. These results confirmed the presence of Ap11/Ap12 and Ap13/Ap14 doublets.

Variations of chromosome size and *rrn* operon content within *S. xylosus* species

We analysed the chromosome of six additional strains by digestion with *I-Ceu*I (Table 4). *Staphylococcus xylosus* S04002, a meat starter, two strains isolated from the environment of a meat-processing unit (*S. xylosus* S00290) and from a naturally fermented meat product (*S. xylosus* S03191), had chromosome sizes very close to that of *S. xylosus* C2a. The chromosome sizes of the strains isolated from dermatitis and mastitis, *S. xylosus* 00-1747, S04009 and S04020, were larger up to 300 kb (Table 4). The strains of meat origin yielded six *I-Ceu*I fragments as *S. xylosus* C2a

Table 3. Products of double digestion of *Staphylococcus xylosus* C2a chromosome

Name and size (kb) of double restriction fragments											
Ascl I-Ceul		Ascl Smal		Ascl Apal		Apal I-Ceul		Apal Smal		I-Ceul Smal	
Fragment	Size	Fragment	Size	Fragment	Size	Fragment	Size	Fragment	Size	Fragment	Size
AsCe1	1450	AsSm1	1450	AsAp1	488	ApCe1	484	ApSm1	485	CeSm1	1460
AsCe2	750	AsSm2	355	AsAp2	448*	ApCe2	442*	ApSm2	442	CeSm2	362
AsCe3	285	AsSm3	260	AsAp3	448*	ApCe3	442*	ApSm3	325	CeSm3	259
AsCe4	125	AsSm4	154	AsAp4	325	ApCe4	323	ApSm4	210	CeSm4	154
AsCe5	57	AsSm5	135	AsAp5	195	ApCe5	195	ApSm5	186	CeSm5	136
AsCe6	53*	AsSm6	125	AsAp6	180	ApCe6	182	ApSm6	155*	CeSm6	126
AsCe7	53*	AsSm7	90	AsAp7	142*	ApCe7	140*	ApSm7	155*	CeSm7	100
AsCe8	50*	AsSm8	65	AsAp8	142*	ApCe8	140*	ApSm8	142	CeSm8	100
AsCe9	50*	AsSm9	49*	AsAp9	72*	ApCe9	105	ApSm9	102	CeSm9	48*
AsCe10	5	AsSm10	49*	AsAp10	72*	ApCe10	99	ApSm10	80*	CeSm10	48*
		AsSm11	34*	AsAp11	55	ApCe11	73*	ApSm11	80*	CeSm11	32
		AsSm12	34*	AsAp12	50	ApCe12	73*	ApSm12	75*	CeSm12	26
		AsSm13	24	AsAp13	47*	ApCe13	53*	ApSm13	75*	CeSm13	2.3
		AsSm14	15*	AsAp14	47*	ApCe14	53*	ApSm14	75*	CeSm14	2*
		AsSm15	15*	AsAp15	47*	ApCe15	47	ApSm15	53*	CeSm15	2*
		AsSm16	4	AsAp16	47*	ApCe16	6	ApSm16	53*	CeSm16	2*
		AsSm17	3*	AsAp17	40	ApCe17	5	ApSm17	47*	CeSm17	2*
		AsSm18	3*	AsAp18	12			ApSm18	47*	CeSm18	2*
		AsSm19	3*	AsAp19	6			ApSm19	26	CeSm19	2*
		AsSm20	3*	AsAp20	5			ApSm20	20	CeSm20	1*
		AsSm21	3*	AsAp21	4.3			ApSm21	15	CeSm21	1*
		AsSm22	3*					ApSm22	10	CeSm22	1*
		AsSm23	2.3					ApSm23	6	CeSm23	1*
								ApSm24	2.3	CeSm24	1*
								ApSm25	1.5*	CeSm25	1*
								ApSm26	1.5*		
								ApSm27	1.5*		
								ApSm28	1.5*		
								ApSm29	1.5*		
								ApSm30	1.5*		
								ApSm31	1.4*		
								ApSm32	1.4*		
								ApSm33	1.4*		
								ApSm34	1.4*		
								ApSm35	1.4*		
								ApSm36	1.4*		
Estimated genome size (kb)	2878		2876		2872		2862		2873		2869

*Comigrating fragments indistinguishable in size deduced by the construction of the physical map.

strain. The three strains isolated from opportunistic infections yielded only five fragments.

Discussion

The size of the circular chromosome of the *S. xylosus* C2a strain was estimated to be 2868 ± 10 kb, which is comparable to that of other staphylococci. From the smallest to the largest *S. xylosus* genome, the size varied by 11%, which shows a significant variation within the species. The size of chromosome of *S. xylosus* is closer to that of *S. aureus*

(2742–2903 kb) (Kuroda *et al.*, 2001; Baba *et al.*, 2002; Holden *et al.*, 2004; Gill *et al.*, 2005) than that of other CNS, *S. epidermidis* (2499–2616 kb) (Zhang *et al.*, 2003; Gill *et al.*, 2005), *S. haemolyticus* (2685 kb) (Takeuchi *et al.*, 2005), *S. saprophyticus* (2516 kb) (Kuroda *et al.*, 2005) and *S. carnosus* (about 2590 kb) (Wagner *et al.*, 1998). The size variability among the staphylococcal genomes appears to be about 14%. *Staphylococcus xylosus* belongs to the largest genome size staphylococci.

Forty-seven restriction fragments were positioned in the physical map of the *S. xylosus* C2a chromosome. The

Table 4. Sizes of I-CeuI fragments of *Staphylococcus xylosus* genomes

Fragment	C2a	S00290	S03191	S04002	00-1747	S04009	S04020
1	1460	1450	1445	1430	1445	1661	1509
2	1138	1180	1183	1185	1278	1243	1380
3	125	125	125	125	125	130	115
4	100	100	100	100	100	100	100
5	48	48	48	48	48	48	48
6	5	5	5	5			
Total (kb)	2876	2908	2906	2893	2996	3182	3152

distribution of those restriction sites was not homogenous along the chromosome, suggesting a nonrandom distribution of regions richer in GC. Within these large regions, many genetic markers could not be precisely located. Thirty-three genes, including *rrs* and *rml* genes, were mapped. Taking into account the position and the association of the *dnaA* and *gyrA* genes, which are often found near the chromosome origin of replication of bacteria (*oriC*) (Richter & Messer, 1995) and always near *oriC* of staphylococci, the most probable location of the *S. xylosus* C2a chromosomal *oriC* is within the 210 kb ApSm4 fragment. The location of *oriC* is also supported by the position and orientation of the *rrn* operons, transcribed divergently from this region.

The *S. xylosus* C2a chromosome contains six copies of the *rrn* operon. The chromosome of the other strains contained five or six copies. The number of *rrn* operons has been reported as five or six in *S. aureus* (Kuroda *et al.*, 2001; Baba *et al.*, 2002; Holden *et al.*, 2004; Gill *et al.*, 2005), and *S. epidermidis* (Zhang *et al.*, 2003; Gill *et al.*, 2005), five in *S. haemolyticus* JCSC1435 (Takeuchi *et al.*, 2005) and six in *S. saprophyticus* ATCC 15305 (Kuroda *et al.*, 2005). The six *rrn* operons of *S. xylosus* C2a are located in a region representing < 50% of the chromosome. Moreover, three of them are clustered in a region representing only 2% of the chromosome. Among the staphylococci, whose chromosome contains six *rrn* operons, three of them are always clustered similarly. The characterization of the *rrn* loci from *S. xylosus* C2a showed the presence of two *SmaI* and one *Apal* restriction sites for all the copies. These restriction sites are also present in ribosomal operons of the staphylococcal sequenced genomes. It thus appears that *S. xylosus* *rrn* operon content is similar to that of the other staphylococci. Interestingly, a recombination event occurred between the two close *rrnA* and *rrnB* copies in three *S. xylosus* strains, as deduced from the disappearance of the 5 kb I-CeuI fragment. These three strains also had a larger chromosome and were all isolated from dermatitis or mastitis, whereas the other three strains isolated from the meat environment had a smaller genome and six *rrn* copies. Although this study is based only on a few strains, these features might give some indications of the genome characteristics of opportunistic pathogenic vs. nonpathogenic strains.

It has been shown that the environs of *oriC* are a chromosomal region unique to each staphylococcal species (Takeuchi *et al.*, 2005). *Staphylococcus xylosus* genes *lacH* and *xylA* were noted near the probable *oriC*. One of the phenotypic characteristics of the *S. xylosus* species is the utilization of xylose. The *xylA* gene encodes a xylose isomerase belonging to a xylose utilization operon (Size-more *et al.*, 1991). The gene *lacH* encodes a β -galactosidase and is comprised of a lactose utilization bicistronic operon. The lactose utilization system of *S. xylosus* clearly differs from that found in *S. aureus* (Bassias & Brückner, 1998). This operon is present in the recently sequenced genome of *S. saprophyticus* (Kuroda *et al.*, 2005). It has the same genetic organization and the same localization as *S. xylosus*. The *bap* gene encoding the biofilm-associated protein is located close to the *lacH* and *xylA* genes near the probable *oriC*. This gene involved in biofilm formation was first described in an *S. aureus* strain associated with bovine mastitis (Cucarella *et al.*, 2001). This gene is contained in a putative composite transposon inserted into a mobile staphylococcal pathogenicity island in *S. aureus*, and a horizontal gene transfer among staphylococci has been suggested (Tormo *et al.*, 2005).

The construction of the genomic map of the *S. xylosus* C2a chromosome will be of great help for the final assembly of the sequences for the genome sequencing project that has been undertaken in our laboratory and Genoscope (<http://www.genoscope.cns.fr>).

Acknowledgements

We would like to thank Brigitte Duclos for technical assistance and David Marsh for revision of the English. Emilie Dordet-Frisoni is the recipient of a fellowship of the French Ministry of 'Education Nationale et Recherche'.

References

- Baba T, Takeuchi F, Kuroda M *et al.* (2002) Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. *Lancet* **359**: 1819–1827.

- Barrière C, Brückner R & Talon R (2001) Characterization of the single superoxide dismutase of *Staphylococcus xylosus*. *Appl Environ Microbiol* **67**: 4096–4104.
- Barrière C, Brückner R, Centeno D & Talon R (2002) Characterisation of the *katA* gene encoding a catalase and evidence for at least a second catalase activity in *Staphylococcus xylosus*, bacteria used in food fermentation. *FEMS Microbiol Lett* **216**: 277–283.
- Bassias J & Brückner R (1998) Regulation of lactose utilization genes in *Staphylococcus xylosus*. *J Bacteriol* **180**: 2273–2279.
- Bautista L, Gaya P, Medina M & Nunez M (1988) A quantitative study of enterotoxin production by sheep milk staphylococci. *Appl Environ Microbiol* **54**: 566–569.
- Becker K, Harmsen D, Mellmann A, Meier C, Schumann P, Peters G & von Eiff C (2004) Development and evaluation of a quality-controlled ribosomal sequence database for 16S ribosomal DNA-based identification of *Staphylococcus* species. *J Clin Microbiol* **42**: 4988–4995.
- Brückner R (1997) Gene replacement in *Staphylococcus carnosus* and *Staphylococcus xylosus*. *FEMS Microbiol Lett* **151**: 1–8.
- Brückner R, Wagner E & Götz F (1993) Characterization of a sucrose gene from *Staphylococcus xylosus*. *J Bacteriol* **175**: 851–857.
- Cornillot E, Croux C & Soucaille P (1997) Physical and genetic map of the *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 chromosome. *J Bacteriol* **179**: 7426–7434.
- Cucarella C, Solano C, Valle J, Amorena B, Lasa I & Penades JR (2001) Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *J Bacteriol* **183**: 2888–2896.
- Dubin DT, Fitzgibbon JE, Nahvi MD & John JF (1999) Topoisomerase sequences of coagulase-negative staphylococcal isolates resistant to ciprofloxacin or trovafloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* **43**: 1631–1637.
- Egeer O & Brückner R (1995) Characterization of a genetic locus essential for maltose-maltotriose utilization in *Staphylococcus xylosus*. *J Bacteriol* **177**: 2408–2415.
- Egeer O & Brückner R (1996) Catabolite repression mediated by the catabolite control protein CcpA in *Staphylococcus xylosus*. *Mol Microbiol* **21**: 739–749.
- Fiegler H & Brückner R (1997) Identification of the serine acetyltransferase gene of *Staphylococcus xylosus*. *FEMS Microbiol Lett* **148**: 181–187.
- Fiegler H, Bassias J, Jankovic I & Brückner R (1999) Identification of a gene in *Staphylococcus xylosus* encoding a novel glucose uptake protein. *J Bacteriol* **181**: 4929–4936.
- Forsman P, Tilsala-Timisjarvi A & Alatossava T (1997) Identification of staphylococcal and streptococcal causes of bovine mastitis using 16S-23S rRNA spacer regions. *Microbiology* **143**: 3491–3500.
- Gill SR, Fouts DE, Archer GL et al. (2005) Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain and a biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain. *J Bacteriol* **187**: 2426–2438.
- Götz F, Zabielski J, Philipson L & Lindberg M (1983) DNA homology between the arsenate resistance plasmid pSX267 from *Staphylococcus xylosus* and the penicillinase plasmid pI258 from *Staphylococcus aureus*. *Plasmid* **9**: 126–137.
- Holden MT, Feil EJ, Lindsay JA et al. (2004) Complete genomes of two clinical *Staphylococcus aureus* strains: evidence for the rapid evolution of virulence and drug resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 9786–9791.
- Huynh PL, Jankovic I, Schnell NF & Brückner R (2000) Characterization of an HPr kinase mutant of *Staphylococcus xylosus*. *J Bacteriol* **182**: 1895–1902.
- Irlinger F, Morvan A, Elsolh N & Bergere JL (1997) Taxonomic characterization of coagulase-negative staphylococci in ripening flora from traditional french cheeses. *Syst Appl Microbiol* **20**: 319–328.
- Kuroda M, Ohta T, Uchiyama I et al. (2001) Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* **357**: 1225–1240.
- Kuroda M, Yamashita A, Hirakawa H et al. (2005) Whole genome sequence of *Staphylococcus saprophyticus* reveals the pathogenesis of uncomplicated urinary tract infection. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 13272–13277.
- Malinowski E, Klossowska A, Kaczmarowski M & Kuzma K (2003) Prevalence of intramammary infections in pregnant heifers. *Bull Vet Inst Pulawy* **47**: 165–170.
- Martin B, Garriga M, Hugas M, Bover-Cid S, Veciana-Nogues MT & Aymerich T (2006) Molecular, technological and safety characterization of Gram-positive catalase-positive cocci from slightly fermented sausages. *Int J Food Microbiol* **107**: 148–158.
- Morot-Bizot S, Talon R & Leroy-Sétrin S (2003) Development of specific PCR primers for a rapid and accurate identification of *Staphylococcus xylosus*, a species used in food fermentation. *J Microbiol Methods* **55**: 279–286.
- Nguyen TN, Gourdon MH, Hansson M et al. (1995) Hydrophobicity engineering to facilitate surface display of heterologous gene products on *Staphylococcus xylosus*. *J Biotechnol* **42**: 207–219.
- Peschel A, Otto M, Jack RW, Kalbacher H, Jung G & Götz F (1999) Inactivation of the *dlt* operon in *Staphylococcus aureus* confers sensitivity to defensins, protegrins, and other antimicrobial peptides. *J Biol Chem* **274**: 8405–8410.
- Peschel A, Jack RW, Otto M et al. (2001) *Staphylococcus aureus* resistance to human defensins and evasion of neutrophil killing via the novel virulence factor MprF is based on modification of membrane lipids with L-lysine. *J Exp Med* **193**: 1067–1076.
- Planchon S, Gaillard-Martinie B, Dordet-Frisoni E, Bellon-Fontaine M-N, Leroy S, Labadie J, Hébraud M & Talon R (2006) Formation of biofilm by *Staphylococcus xylosus*. *Int J Food Microbiol* **109**: 88–96.
- Richter S & Messer W (1995) Genetic structure of the *dnaA* region of the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC6803. *J Bacteriol* **177**: 4245–4251.
- Rosenstein R & Götz F (2000) Staphylococcal lipases: biochemical and molecular characterization. *Biochimie* **82**: 1005–1014.

- Rosenstein R, Futter-Bryniok D & Götz F (1999) The choline-converting pathway in *Staphylococcus xylosus* C2a: genetic and physiological characterization. *J Bacteriol* **181**: 2273–2278.
- Rossi F, Tofalo R, Torriani S & Suzzi G (2001) Identification by 16S–23S rDNA intergenic region amplification, genotypic and phenotypic clustering of *Staphylococcus xylosus* strains from dry sausages. *J Appl Microbiol* **90**: 365–371.
- Schleifer KH & Kloos WE (1975) Isolation and characterization of Staphylococci from human skin. I. Amended descriptions of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus* and descriptions of three new species: *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus xylosus*. *Int J Syst Bacteriol* **25**: 50–61.
- Sizemore C, Buchner E, Rygus T, Witke C, Götz F & Hillen W (1991) Organization, promoter analysis and transcriptional regulation of the *Staphylococcus xylosus* xylose utilization operon. *Mol Gen Genet* **227**: 377–384.
- Takeuchi F, Watanabe S, Baba T *et al.* (2005) Whole-genome sequencing of *Staphylococcus haemolyticus* uncovers the extreme plasticity of its genome and the evolution of human-colonizing staphylococcal species. *J Bacteriol* **187**: 7292–7308.
- Talon R, Leroy-Sétrin S & Fadda S (2002) Bacterial starters involved in the quality of fermented meat products. *Research Advances in Quality of Meat and Meat Products* (Toldrá F, ed), pp. 175–191. Research Signpost, Trivandrum, India.
- Thornton VB, Davis JA, St Clair MB & Cole MN (2003) Inoculation of *Staphylococcus xylosus* in SJL/J mice to determine pathogenicity. *Contemp Top Lab Anim Sci* **42**: 49–52.
- Tormo MA, Knecht E, Götz F, Lasa I & Penades JR (2005) Bap-dependent biofilm formation by pathogenic species of *Staphylococcus*: evidence of horizontal gene transfer? *Microbiology* **151**: 2465–2475.
- Valle J, Gomez-Lucia E, Piriz S, Goyache J, Orden JA & Vadillo S (1990) Enterotoxin production by staphylococci isolated from healthy goats. *Appl Environ Microbiol* **56**: 1323–1326.
- Vannuffel P, Heusterspreute M, Bouyer M, Vandercam B, Philippe M & Gala JL (1999) Molecular characterization of *femA* from *Staphylococcus hominis* and *Staphylococcus saprophyticus*, and *femA*-based discrimination of staphylococcal species. *Res Microbiol* **150**: 129–141.
- Wagner E, Götz F & Brückner R (1993) Cloning and characterization of the *scrA* gene encoding the sucrose-specific Enzyme II of the phosphotransferase system from *Staphylococcus xylosus*. *Mol Gen Genet* **241**: 33–41.
- Wagner E, Doskar J & Götz F (1998) Physical and genetic map of the genome of *Staphylococcus carnosus* TM300. *Microbiology* **144**: 509–517.
- Wagner E, Marcandier S, Egeter O, Deutscher J, Götz F & Brückner R (1995) Glucose kinase-dependent catabolite repression in *Staphylococcus xylosus*. *J Bacteriol* **177**: 6144–6152.
- Won YS, Kwon HJ, Oh GT, Kim BH, Lee CH, Park YH, Hyun BH & Choi YK (2002) Identification of *Staphylococcus xylosus* isolated from C57BL/6J-Nos2(tm1Lau) mice with dermatitis. *Microbiol Immunol* **46**: 629–632.
- Zhang YQ, Ren SX, Li HL *et al.* (2003) Genome-based analysis of virulence genes in a non-biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis* strain (ATCC 12228). *Mol Microbiol* **49**: 1577–1593.

Article n°3

Genomic diversity in *Staphylococcus xylosus* species

Emilie Dordet-Frisoni, Géraud Dorchies, Cécilia De Araujo, Régine Talon and Sabine Leroy*

Applied and Environmental Microbiology, article en révision avec modifications mineures

(août 2007)

PROBLEMATIQUE

Lorsque nous avons débuté cette étude, la majorité des informations génétiques publiées sur l'espèce *S. xylosus* provenait des deux souches de référence *S. xylosus* DSM 20266 et *S. xylosus* C2a, dérivée de la souche DSM 20267 curée de son plasmide pSX267. Ces deux souches sont des souches isolées de la peau humaine. La diversité génétique au sein de l'espèce *S. xylosus* n'avait jusqu'alors jamais été étudiée et peu d'informations génétiques sur des souches d'autres origines n'étaient disponibles. Or, comme nous l'avons vu dans l'étude bibliographique, *S. xylosus* est présent dans de nombreuses niches écologiques. Cette espèce est capable de s'adapter à des conditions environnementales très différentes. Nous avons observé des variations phénotypiques entre les différentes souches de *S. xylosus* étudiées avec des différences dans le métabolisme des hydrates de carbone ou dans la capacité à se propager sur une gélose molle (Article 1). L'analyse des profils d'ADN après macro-restriction et PFGE de souches de *S. xylosus* d'origine variée (Article 2) a montré qu'il existait des variations du profil génétique, de la taille du chromosome (11%) au sein de l'espèce, et du nombre des opérons ribosomiaux (5 à 6).

Pour identifier les différences génétiques entre plusieurs souches bactériennes, différentes méthodes moléculaires sont disponibles. La plus exhaustive est le séquençage du génome de plusieurs souches d'une même espèce, mais ceci a un coût financier important qui est souvent rédhibitoire. La seconde méthode consiste à l'identification de variations chromosomiques par Long-Range PCR et le séquençage des zones de taille variable, mais celle-ci nécessite pour la détermination des amorces spécifiques de connaître au moins le génome complet d'une souche de l'espèce. Or, au début de ce travail, la séquence complète du génome de *S. xylosus* C2a n'était pas encore disponible. Une méthode moléculaire alternative, l'hybridation soustractive et suppressive, a donc été choisie pour étudier la diversité génétique au sein de l'espèce *S. xylosus*. Celle-ci permet de rechercher et d'isoler des régions du génome présentes chez une souche, dite cible, mais absentes chez une autre souche, dite soustractive. Le choix des souches de *S. xylosus* cibles a été réalisé d'après leur origine et sur la base de leur diversité génétique révélée par PFGE. Trois souches représentant au mieux la diversité, à la fois écologique et génétique, de *S. xylosus* ont été sélectionnées parmi 23 souches, *S. xylosus* S04002, une souche utilisée comme ferment, *S. xylosus* S04009, une souche isolée de mammite de vache et *S. xylosus* 00-1747, une souche responsable de dermite chez la souris. Le génome de la souche *S. xylosus* C2a, a été soustrait au génome de chacune des trois

souches cibles permettant la construction de trois banques de soustraction. Nous avons évalué l'occurrence des fragments souches-spécifiques sur les autres 20 souches de *S. xylosus* que nous avons en collection. La localisation de ces fragments souches-spécifiques sur le génome de *S. xylosus* a été déterminée par hybridation sur la base de la carte physique et génétique établie pour la souche modèle *S. xylosus* C2a (Article 2).

RÉSULTATS

- ◆ L'analyse PFGE après macro-restriction avec l'enzyme *Sma*I a révélé une grande diversité génétique entre les 24 souches de *S. xylosus* étudiées. Il a été observé dix huit profils génétiques différents. Deux des souches possèdent un profil génétique très éloigné des autres souches de *S. xylosus*, il s'agit d'une souche isolée de mammite de chèvre et la souche responsable de dermatite chez la souris. Aucune relation entre l'origine des souches et la variabilité génétique n'a pu être établie.
- ◆ Trois banques ont été constituées à partir de trois soustractions distinctes du génome de la souche *S. xylosus* C2a, aux génomes des trois souches cibles *S. xylosus* S04002, S04009, 00-1747. Parmi les fragments d'ADN obtenus, respectivement, 40, 43 et 39 se sont révélés être uniques et spécifiques des souches cibles, soit 122 fragments au total.
- ◆ Ces 122 fragments représentent environ 78 kb de séquences d'ADN. Ils contiennent de l'information génétique sur *S. xylosus* différente de celle du génome de la souche modèle C2a. Après analyse, 149 ORFs (« open reading frames ») ont été détectées. La majorité de ces ORFs correspondait à des protéines du métabolisme, les autres à des régulateurs, des transporteurs, des déterminants de résistance, des protéines de l'enveloppe ou phagiques.
- ◆ Chaque souche se distingue par des caractères génétiques spécifiques. De nombreux fragments cibles issues de la souche utilisée comme ferment correspondent à des gènes liés au métabolisme. Des preuves de transferts horizontaux (phages, IS...) ont été observées chez la souche isolée de mammite. La souche responsable de dermatite est la souche génétiquement la plus éloignée. Elle possède de nombreuses ORFs similaires à des protéines appartenant à d'autres genres bactériens tels que des *Bacillus*, *Geobacillus*, *Clostridium*, *Oceanobacillus*.
- ◆ La souche isolée de mammite est la souche qui partage le plus de fragments spécifiques en commun avec les deux autres souches cibles *S. xylosus* S04002 et 00-1747. Elle possède avec la souche utilisée comme ferment, S04002, la quasi-totalité des gènes de l'opéron impliqué dans le métabolisme d'un sucre spécifique, le myo-inositol. Avec la souche

responsable de dermite, 00-1747, elle partage un grand nombre de gènes impliqués dans des mécanismes de résistances aux antibiotiques et autres composés toxiques. Seuls 6 fragments sont communs aux trois souches cibles.

- ◆ L'étude de la distribution des 122 fragments spécifiques a été étendue à 20 souches de *S. xylosus*, 10 utilisées comme ferments carné ou laitier et 10 isolées de mammites de vache ou de chèvre. Après une analyse statistique, deux groupes de souches ont pu être constitués. Le premier comprend trois souches isolées de mammite et les deux souches cibles *S. xylosus* isolée de mammite (S04009) et responsable de dermite (00-1747), il pourrait constituer le groupe des souches dites « à risque ». En effet, la souche *S. xylosus* 00-1747 a la capacité de provoquer des lésions cutanées importantes, des nécroses, chez des souris de laboratoire. Parmi les fragments d'ADN cibles-spécifiques, communs à toutes ces souches, aucun des facteurs de virulence actuellement connus chez les bactéries à Gram positif n'a pu être mis en évidence. Le second groupe comprend toutes les souches utilisées comme ferment et des souches isolées de mammite, soit 18 souches. Deux sous-groupes se distinguent dans ce second groupe. Le sous-groupe 2a est très hétérogène, aucun fragment n'est retrouvé commun à toutes les souches. Il comprend une majorité de souches isolées de mammite. Le sous-groupe 2b est plus homogène, il est constitué d'une grande partie des souches utilisées comme ferment. Ces souches ont toutes en commun des gènes impliqués dans le métabolisme fermentatif, ainsi que la majorité des gènes de l'opéron du catabolisme du myo-inositol.
- ◆ Les fragments issus de chaque banque de soustraction ont été positionnés sur le chromosome de la souche cible correspondante. Chez les 3 souches cibles, plus de 97% de ces fragments sont positionnés sur un fragment I-CeuI d'environ 1100 kb et plus de 60% sur un fragment SmaI inclus dans le fragment I-CeuI, de taille comprise entre 300 et 400 kb. La construction de la carte physique et génétique du génome de la souche *S. xylosus* C2a ainsi que la construction des cartes partielles des génomes des souches cibles S04002, S04009 et 00-1747, nous ont permis de supposer que ces fragments sont localisés au niveau de la région proche de l'origine de réplication (*oriC*) (Figure 1). Le positionnement des gènes *dnaA* et *gyrA* sur le génome des 3 souches cibles nous a permis de confirmer cette hypothèse. Comme il avait été démontré chez les staphylocoques séquencés, la région proche de l'*oriC* est également chez *S. xylosus* une zone de spéciation. Il semblerait, de plus, que chez cette espèce cette région génomique soit une région souche spécifique, lieu privilégié de transferts horizontaux de gènes et de réarrangements

génétiques. Cette zone de haute plasticité ou d'insertion privilégiée pourrait jouer un rôle majeur dans la capacité d'adaptation de *S. xylosus* à de nombreuses niches écologiques.

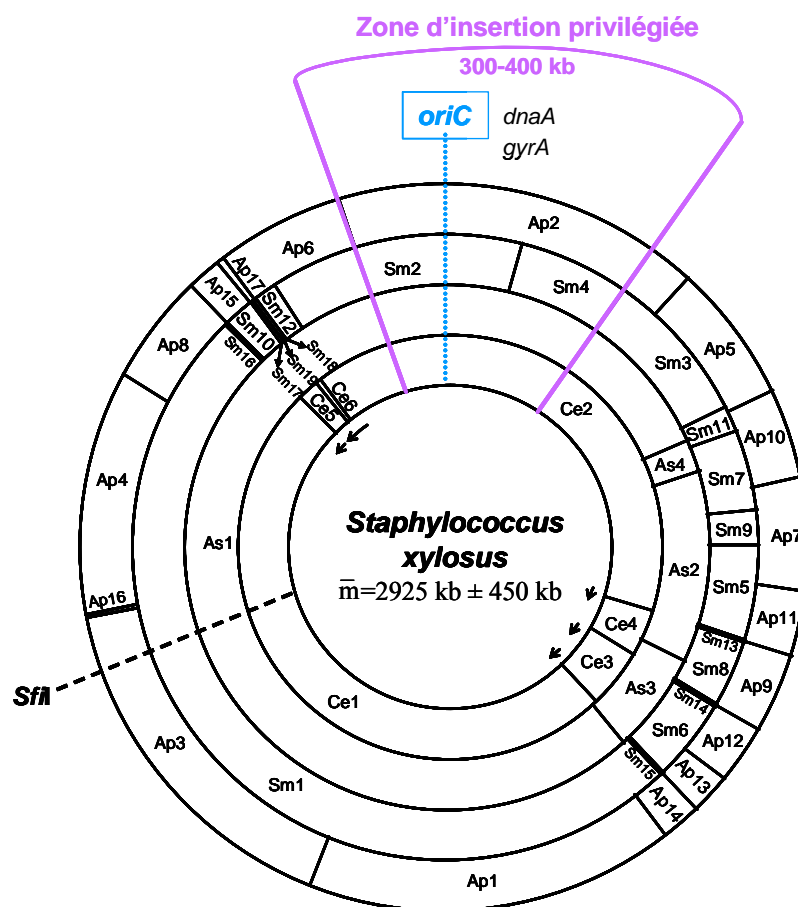


Fig1 : Carte physique du chromosome de *S. xylosus* et localisation de la zone de spéciation souches-spécifiques

RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES

- ◆ Au début de cette étude, une première banque de soustraction entre la souche utilisée comme ferment *S. xylosus* S04002 et la souche *S. xylosus* C2a a été constituée. Elle comprenait 576 clones. La taille et la présence d'inserts ont tout d'abord été détectées chez 192 clones et 33 ont été séquencés. L'analyse de ces séquences a révélée que plus de 70% des fragments soustraits étaient d'origine plasmidique. Or, le but de notre étude était l'identification des différences chromosomiques entre des souches de *S. xylosus*. Pour isoler et étudier les plasmides, il existe des méthodes plus adaptées comme la construction de banques plasmidiques et leur séquençage. Pour résoudre ce problème, nous avons donc

décidé de soustraire à chacune des souches cibles le génome de la souche *S. xylosus* C2a et les plasmides des souches cibles.

- ◆ Les plasmides des souches cibles ont été extraits et purifiés avec le kit QIAprep® Miniprep Handbook (Quiagen) selon les recommandations du fournisseur sauf qu'une incubation de 20 min à 37°C des cellules en présence de lysostaphine (0,5 mg/ml) a été réalisée avant l'étape de lyse. Le plasmide pSX267 de la souche *S. xylosus* DSM20267 d'une taille de 30 kb a servi de témoin. Les plasmides des souches d'*E. coli* Rsa (35 kb) et *E. coli* V517 (55 kb, 7,4 kb, 5,7kb, 5,2 kb, 4 kb, 3,1 kb, 2,8 kb et 2,2 kb) ont été utilisés comme marqueurs de taille, ainsi que le marqueur Lambda (Biorad) et Raoul (Qbiogene). La souche utilisée comme ferment possède un minimum de 7 plasmides de taille comprise entre 30 et 2,5 kb et la souche isolée de mammite un plasmide d'environ 30 kb. La souche isolée de dermite ne présente aucun plasmide apparent. Aux vues des différences du contenu plasmidique des souches de *S. xylosus*, nous avons voulu élargir cette étude à 15 autres souches d'origine diverse. Une grande variabilité du contenu plasmidique a été observée. La majorité des souches de *S. xylosus* hébergent entre 1 et 7 plasmides, de taille comprise entre 2 et 30kb. Cette première étude souligne l'intérêt de s'intéresser aux plasmides des souches de *S. xylosus* et à leur contenu pour mieux appréhender la diversité génétique au sein de l'espèce. Pour analyser le contenu plasmidique il sera alors nécessaire d'optimiser les méthodes d'extractions plasmidiques pour mieux évaluer la taille et le nombre de ces plasmides.

Genomic diversity in *Staphylococcus xylosus* species

Emilie Dordet-Frisoni, Géraud Dorchies, Cécilia De Araujo, Régine Talon, and Sabine Leroy*

INRA, Centre de Clermont-Ferrand Theix, Unité Microbiologie, Qualité et Sécurité des Aliments, 63122 Saint-Genès Champanelle, France.

RUNNING TITLE: Diversity in *Staphylococcus xylosus*

* Corresponding author. Tel.: +33-4-73-62-45-95; fax: +33-4-73-62-42-68.

E-mail address: sleroy@clermont.inra.fr

ABSTRACT

Staphylococcus xylosus is a commensal of the skin of humans and animals and a ubiquitous bacterium naturally present in food. It is one of the major starter cultures used for meat fermentation, but a few strains could potentially be hazardous and are related to animal opportunistic infections. To better understand the genetic diversity of *S. xylosus* intraspecies, suppressive and subtractive hybridization (SSH) was carried out with the *S. xylosus* C2a strain, a commensal of human skin, used as driver from three tester strains, S04002 used as a starter culture, S04009 isolated from cow mastitis or 00-1747 responsible for mouse dermatitis. SSH revealed 122 tester-specific fragments corresponding to 149 open reading frames (ORFs). A large proportion of these ORFs resembled genes involved in specific metabolisms. Analysis of the distribution of the tester-specific fragments in 20 *S. xylosus* strains of various origins showed that the *S. xylosus* species could be divided into two clusters with one only composed of potentially hazardous strains. The genetic content diversity of this species is colocalized in a region near the origin of replication of the chromosome. This region of speciation previously observed in *Staphylococcus* genus corresponded in *S. xylosus* species to a strain-specific region potentially implicated in ecological fitness.

INTRODUCTION

Staphylococcus xylosus is a commensal bacterium generally found inhabiting the skin and the mucous membranes of mammals and birds (15;22). *S. xylosus* is ubiquitous, can be found in various niches (12;25;28) and persists in soils and on surfaces (32). This occurrence could be explained by the capacity of this species to form biofilms (29). *S. xylosus* is naturally present in raw meat and milk and is commonly used as starter culture for their fermentation (14;36). This species is virtually defined as a nonpathogenic *Staphylococcus*, but a few strains of *S. xylosus* are related to animal and human opportunistic infections (27;33;37;39). Thus, most strains are commensal and useful in food while others could potentially be hazardous, showing the versatility of this species.

Genomes, and consequently phenotypes, can be highly heterogeneous in bacterial strains, even if they belong to the same species. Genomic comparative studies between all *Staphylococcus* sequenced genomes showed an average 78% identity (35). The 22% genetic variability observed within the *Staphylococcus* genus is also observed within species. Indeed, genetic diversity between 36 *S. aureus* strains using whole-genome DNA microarrays, showed that 78% of genes were common to all strains and 22% of genes were strain-specific and might play a role in adaptation to specialized niches (7). In a previous study by genomic DNA restriction and pulsed field gel electrophoresis (PFGE) analysis of seven *S. xylosus* strains of various origins, we showed genomic diversity within this species, with a variation of chromosome size and ribosomal operon (*rrn*) number (5). *S. xylosus* isolated from opportunistic infections seemed to have chromosomes up to 11% larger than strains isolated from the food environment (5). Genomic differences were also found between *S. xylosus* strains isolated from meat products by PFGE and random amplified polymorphic DNA analyses (5), but much remains to be learned about the genetic content differences. Strain-specific genes of *S. xylosus* are of major interest in explaining the versatility of this species.

We expanded comparisons of *S. xylosus* strains, by using suppressive and subtractive hybridization (SSH). This method provides comprehensive surveys of genome differences among closely related strains by facilitating the identification of DNA segments present in one genome (tester) but absent in another (driver). It has been widely used for the analysis of bacterial pathogen genomes to discover new epidemiological markers, virulence factors, and host specificity determinants (38). SSH was also successfully used to study genome plasticity or intraspecies genomic diversity (23;30).

In this work, SSH was carried out between three *S. xylosus* tester strains: *S. xylosus* S04002, used as a starter culture, *S. xylosus* S04009 isolated from cow mastitis and *S. xylosus* 00-1747 responsible for mouse dermatitis (39), and *S. xylosus* C2a strain used as a driver, a commensal of human skin. The chromosomal organization of the *S. xylosus* C2a strain was known (5) and has constituted the starting point for studying the genetic diversity within this species. A total of 29.7, 25.4 and 22.8 kb specific DNA fragments were isolated from the 3 SSH libraries obtained from *S. xylosus* S04002, S04009 and 00-1747, respectively. Their distribution among 20 *S. xylosus* strains was analyzed and their location in the respective chromosomes of the *S. xylosus* tester strains was determined.

MATERIALS AND METHODS

Strains.

The *S. xylosus* strains used in the study are listed in Table 1. The *S. xylosus* C2a strain is derived from the type strain DSM20267 cured of its endogenous plasmid pSX267 (11). The other strains are nonduplicate isolates of different origins. Bacteria were stored at -70°C. Cultures were grown in brain heart infusion broth or agar and incubated at 37 °C for 16 h.

Pulsed-field gel electrophoresis.

Genomic DNA of *S. xylosus* strains was prepared in agarose plugs as described previously (21). Plugs were restricted with the endonuclease I-*CeuI* (New England Biolabs, UK) or *SmaI*

enzyme (Promega, Charbonnière, France) according to the manufacturer's instructions. Fragments were separated by PFGE in 1% agarose gels in 0.5 X TBE buffer on a CHEF-DR III apparatus (Bio-Rad, Ivry, France). Electrophoretic conditions were 50 s to 100 s for 6 h and 10 s to 30 s for 18 h or 50 s to 90 s for 22 h and 1 s to 12 s for 13 h at 14 °C at a constant voltage of 6 V.cm⁻¹ and an angle of 120° for the determination of specific subtracted fragment location. Lambda DNA concatemers were used as molecular size markers (Promega). After migration, gels were stained in ethidium bromide, digitized under UV light (Gel Doc 2000, Bio-Rad) and analyzed using Quantity One Quantitation Software (Bio-Rad). Similarities between the PFGE profiles, based on band position, were derived by the Dice correlation coefficient with a maximum position tolerance of 2%. A hierarchic unweighted pair group method analysis (UPGMA) was used to generate a dendrogram.

Chromosomal DNA and plasmid preparation.

Chromosomal DNA from *S. xylosus* was isolated by the method of Marmur (18). To isolate plasmid DNA from *S. xylosus*, cells were lysed with 16 µg/ml lysostaphin and the QIAprep Miniprep kit (Quiagen, Courtaboeuf, France) was subsequently applied.

Suppressive subtractive hybridizations and differential screening.

Three subtracted DNA libraries were generated following the recommendations for the Clontech PCR-select Bacterial Genome Subtraction Kit (BD Biosciences Clontech, Erembodegem, Belgium). Genomic DNA of *S. xylosus* strains S04002, S04009 and 00-1747 were used as the testers and that of *S. xylosus* C2a was used as a driver. To increase the proportion of chromosomal subtracted DNA, the endogenous plasmids of the tester strains were also used as drivers. Genomic and plasmid DNAs were digested by the appropriate *RsaI* enzyme. Suppression-subtractive hybridizations were carried out as recommended by the supplier except that hybridization temperatures were set at 61°C instead 63°C due to the low G+C content of *Staphylococcus* DNA. The pool of subtracted fragments was amplified by

PCR using the Advantage cDNA polymerase (BD Biosciences Clontech). PCR products generated in each library were cloned into pGEM-T Easy vector (Promega) according to the supplier's recommendations and transformed into *Escherichia coli* TG1 competent cells, which were then cultured on Luria-Bertani agar plates containing 100 µg/ml ampicillin, 50 µg/ml X-Gal and 0.5 mM isopropyl-thiogalactoside. Resulting transformants were individually grown in LB medium containing 100 µg/ml ampicillin in 96-well microtiter plates and stored in 20% glycerol at -70°C. Subtracted library clones were randomly selected as templates for PCR amplification using nested primers 1 and 2R, provided in the genome subtraction kit. PCR products were analyzed by agarose gel electrophoresis to verify the size of the inserts and the presence of one distinct amplified product. PCR products of each subtracted library were screened for tester-specific fragments using dot blot hybridization. They were arrayed in duplicate onto positively charged nylon membranes (Hybond N+, Amersham Biosciences, Orsay, France). One µg of *RsaI*-restricted genomic DNA from driver and each tester DNA was randomly labeled with the Dig-High Prime system (Roche Applied Science, Neuilly sur Seine, France) and then used as probes to hybridize separately the blots. The digoxigenin-labeled probes were detected by the Dig color detection kit (Roche). The distribution of tester-specific fragments was also evaluated among *S. xylosus* strains. Genomic DNAs from 20 strains (Table 1) were used as probes, as described above. The distribution of tester-specific fragments was analyzed by a complete linkage hierarchical cluster analysis. The aggregation method of Sokal & Sneath (1) was used (XLSTAT software).

DNA sequencing and analysis.

Plasmid DNA containing tester-specific inserts was isolated from individual clones using the NucleoSpin Plasmid QuickPure kit (Macherey-Nagel, Hoerdt, France). Sequencing reactions were performed using BigDye terminator as recommended by the supplier (Applied

Biosystems, Courtaboeuf, France) and analyzed by using an ABI 310 automated DNA sequencer. Bioinformatic analyses were performed from web-based servers. The sequences were analyzed by BLASTX and/or BLASTN searches against the NCBI Genbank database. Based on the analysis, redundant sequences were identified and sequence assembly was done with the CAP3 program (<http://bioinformatics.iastate.edu/aat/sas.html>). ORF Finder and BLASTX were performed on contigs. When no similarity was found a PSI-BLAST analysis was performed.

Determination of the chromosomal location of subtracted sequences.

For Southern blotting, digested chromosomal DNA of *S. xylosus* S04002, S04009 and 00-1747 strains separated by PFGE were passively transferred onto positively charged nylon membranes (Hybond-N+, Amersham Biosciences). Equal amounts of PCR amplicons of each tester-specific inserts were pooled and randomly labeled using the Dig-High Prime system (Roche Applied Science). After hybridizations, detection was performed using the Dig chemiluminescent detection kit following the supplier's instructions (Roche Applied Science). To confirm the localization of tester-specific inserts, chromosomal DNA restriction fragments of interest were excised from PFGE gel, rinsed 3 times for 30 min with 10 mM Tris HCl, pH 8.5, and digested with *RsaI* (Promega) according to the supplier's recommendations. DNA fragments were thus extracted from agarose and purified before labeling with the AlkPhos direct labeling kit (Amersham Biosciences) and hybridized to the dot blot containing the subtracted unique sequenced as described for the differential screening.

Nucleotide sequence accession numbers.

Insert sequences of the subtracted libraries have been deposited in Genbank and given accession numbers ER935832 to ER935953.

RESULTS and DISCUSSION

PFGE analysis.

The twenty-four *S. xylosus* strains were characterized by PFGE patterns after genomic DNA restriction with *SmaI* enzyme (Fig 1). A large diversity of PFGE patterns was found between strains as 18 distinct genetic profiles were observed. The genetic relatedness of the *S. xylosus* strains ranged from 10 to 100% (Fig 1). Employing a cut-off similarity value of 70%, one cluster exclusively composed of *S. xylosus* strains used as starter culture was constituted while all the other strains had their own macro-restriction profiles except for the S01007 and S01004 strains used as starter culture, and the strains S04016 and S04018, which were both cow mastitis isolates. Cluster analysis did not show any relationship between the origin of *S. xylosus* isolates and their *SmaI* PFGE and confirmed the intraspecies genomic differences observed by Martin *et al.* (19). From our study, 3 strains with heterogenic profiles and of 3 different origins were chosen to represent *S. xylosus* genetic diversity: *S. xylosus* S04002, used as a starter culture, S04009, isolated from cow mastitis and 00-1747, responsible for mouse dermatitis.

Suppressive subtractive hybridizations of *S. xylosus* C2a from S04002, S04009 or 00-1747.

Following SSH, three DNA subtraction libraries were created containing 192, 384 and 320 clones of putative specific DNAs of *S. xylosus* S04002, S04009 and 00-1747, respectively. The number of clones respected the proportion of the chromosome size difference of the three tester strains evaluated in our previous study (5). After PCR amplification of the cloned inserts, clones giving no amplicon or multiple amplicons were discarded. To check the specificity of cloned inserts of the three libraries, PCR products of the inserts were arrayed and hybridized with the genomic DNA probes of the three respective tester strains or the driver C2a strain. From *S. xylosus* S04002, S04009, 00-1747 DNA subtraction libraries, a

total of 75, 105 and 92 DNA fragments were found to be specific to the tester strains, respectively. All these DNA fragments were two-end sequenced and 40, 43 and 39 different sequences were identified, respectively (Table 2). A total of 29.67, 22.78 and 25.42 kilobases were extracted from the *S. xylosus* S04002, S04009 and 00-1747 genomes, respectively. The size of these specific DNA fragments varied from 125 to 1715 bp with an average size of 700 bp. Their GC contents were 30.3% for those of S04002 subtracted library, 32.8% for S04009 subtracted library and 31.1% for 00-1747 subtracted library. These percentages of GC were at the lower limit of *S. xylosus* G+C content, estimated to be between 30 and 36% (31). SSH has thus been used successfully for the extraction of the differential genetic content of *S. xylosus* strains arising from various niches.

Identification of specific sequences of *S. xylosus* S04002, S04009 and 00-1747, a large proportion of specific metabolism sequences.

The 122 tester-specific fragments were analyzed by BLASTX and PSI-BLAST searches and led the identification of 149 ORFs as shown in Table 2. These ORFs were assigned to one of the seven classes: metabolism, regulatory, cell membrane/surface structure, resistance, transport, phage-related structure and IS elements and unknown functions. Fourteen ORFs resembled hypothetical bacterial genes of unknown function, while two fragments had no significant matches with known sequences. The other ORFs had significant similarity to sequences with known functions largely described in *Staphylococcus* genus. However, the *S. xylosus* 00-1747 strain had 20 of its 47 detected ORFs corresponding to genes from other bacterial genera (Table 2). A majority of ORFs seemed to be related to specific metabolisms as biotin, myo-inositol and sorbitol, to amino acid and fermentative metabolisms, and to pentose and glucuronate interconversions (Table 2).

In the *S. xylosus* S04009 genome strain, fragments corresponding to five genes involved in myo-inositol metabolism as well as the Na⁺: myo-inositol co-transporter were subtracted

(Table 2). Myo-inositol is a hexitol which is a constituent of virtually every living cell; it is synthesized by plants and is essential for humans and animals. Different bacterial species (*Klebsiella*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Bacillus subtilis*...) are able to use myo-inositol as carbohydrate source, but genes implicated in this catabolism have been described in few species (16). In *Bacillus subtilis*, two *iol* operons were described including an operon of 10 genes *iolABCDEFGHIJ* and an operon of two genes *iolRS* (40). Until now, these genes had never been described in a *Staphylococcus* genus.

Five ORFs of the *S. xylosus* 00-1747 strain were related to lysine and glycine metabolism genes none of which corresponded to staphylococcal genes (Table 2). Sarcosine oxidase and betaine aldehyde dehydrogenase were shown to be implicated in metabolism of glycine betaine, an effective osmoprotectant (1;4). Only betaine aldehyde dehydrogenase and dihydropicolinate synthase were identified in actual staphylococcal sequenced genomes, but these genes showed no significant match at the DNA level with these ORFs. Sarcosine oxidase and saccharopine dehydrogenase have never been observed in staphylococcal genomes. The fact that *S. xylosus* 00-1747 strain contained numerous nonstaphylococcal homology ORFs might be explained by its origin. This strain was isolated from mouse dermatitis in Korea. The particular origin of this strain suggests that ecological and/or geographical divergences in *S. xylosus* species may exist.

From the *S. xylosus* meat starter S04002 subtraction, fragments corresponding to fermentative metabolism were found: an acetolactate synthase which transforms pyruvate in acetolactate, its regulator AlsR, and an acetoin dehydrogenase which transforms acetoin into diacetyl, as well as a lactate permease also implicated in anaerobic metabolism (Table 2). Acetoin and diacetyl are aroma compounds. Their production in fermented meat products have been characterized as having a dairy-product odor (20). Some *S. xylosus* strains produce these aroma compounds more than other staphylococcus species (34). This property is variable

between *S. xylosus* strains, and a correlation between strain persistence in ripened meat and the capacity of strains to produce acetoin was shown (9). In lactic acid bacteria isolated from fermented sausages, the production of acetoin is stimulated by a low pH and a low sugar concentration, conditions that could be found at the end of the ripening process (9). Recently, Fuchs *et al.* (8) showed that in *S. aureus* the production of acetoin and lactate was stimulated by anaerobic growth conditions.

The large number of differential genes predicted to be involved in metabolism strongly suggested a wide adaptation of *S. xylosus* strains to their environment and to the availability of the different substrates.

Horizontal transfer in *S. xylosus* S04009.

The *S. xylosus* S04009 strain isolated from cow mastitis showed 12 specific subtracted fragments corresponding to phage-related sequences (Table 2). The presence of at least 3 different bacteriophages, 77, 2638A and EW, was deduced and an IS605/IS200 transposase was also detected. Three phage-related proteins were found in *S. xylosus* S04002 and one in 00-1747 subtracted fragments. Phages in *S. aureus* are well studied, 37 phage genomes are reported in the GenBank database (3;17). To our knowledge, there are few studies of phages from coagulase negative staphylococci, and only two phages from *S. epidermidis* have been completely sequenced and molecularly characterized (3). Other putative evidence of horizontal transfer in *S. xylosus* S04009 is the presence of specific sequences corresponding to antibiotic resistance as methicillin, fosfomycin and macrolide resistance proteins (Table 2).

Particular *S. xylosus* surface structures.

Specific surface structures were found in the *S. xylosus* tester strains. The meat starter strain *S. xylosus* S04002 possessed a specific fragment corresponding to a 67 kDa myosin-crossreactive streptococcal antigen-like protein. This protein family is thought to have structural features in common with the beta chain of the class II antigens. In *Streptococcus*

pyogenes it reacts with anti-myosin antibodies and plays a role in the pathogenesis of streptococcal infections (13). This gene is found in other *Staphylococcus* sequenced genomes as *S. aureus*, *S. epidermidis* or *S. haemolyticus*, but its function in those bacteria is still unknown. The *S. xylosus* 00-1747 strain implicated in mouse dermatitis contained a specific fragment resembling a Toll-Interleukin receptor (TIR). Such a eukaryotic signaling mimicking molecule has been described in *Salmonella enterica* serovar Enteritidis (24). It was demonstrated that it is an important virulence factor *in vivo* by modulating host defense mechanisms involved in regulation of NF- κ B and caspase activation. Experiments in mice infected with a *Salmonella* strain deficient in TIR showed reduced lethality. Predicted TIR-like domains are widespread and show an unusual distribution in bacterial species. A lateral gene transfer of this gene has been supposed (24).

Specific fragments shared by *S. xylosus* S04002, S04009 and 00-1747.

The presence of common fragments in the three *S. xylosus* tester strain chromosomes was detected by dot blot hybridization using genomic DNA of the three strains as a probe. The three strains shared only 6 specific fragments. Those 6 common fragments corresponded to arsenic resistance genes with the arsenate reductase and the arsenical efflux pump membrane protein, a riboflavin kinase, a hypothetical phage infection protein and two fragments which were similar to an autolysin, a mannosyl-glycoprotein endo-beta-N-acetylglucosamidase (Table 2).

Among the 122 specific fragments, 66 hybridized with *S. xylosus* S04009 genomic DNA. This mastitis isolate contained the highest number of specific fragments in its genome.

The *S. xylosus* strains S04009 and 00-1747 isolated from mastitis and dermatitis, respectively, shared the highest number of specific fragments with 29 in common. They had specific sequences similar to a hexitol-specific PTS system, probably sorbitol-specific. Indeed, other fragments related to sorbitol assimilation were isolated such as a sorbitol dehydrogenase and

the putative regulator of the sorbitol operon. Those two commensal strains also shared numerous specific DNA sequences implicated in resistance to antibiotics and other toxic components as tellurium, but also antibiotic synthesis-related sequences as a monooxygenase and a lipopeptide, micrococcin P1. These two strains also had in common the *feoB* gene implicated in ferrous ion transport. This gene was identified in *S. aureus* and *S. epidermidis* genomes but had not been characterized (10). The ability to acquire iron (Fe) in a host was known to be an essential attribute of most pathogenic bacteria (2).

The meat starter strain S04002 and the strain S04009 isolated from mastitis shared 20 fragments. They have in common the *iolABCDE* myo-inositol genes, but not the *iolG* gene, which was present in S04002 and absent in S04009. *IolG* corresponds to a myo-inositol 2-dehydrogenase which is the first enzyme of the myo-inositol catabolism, degrading the incoming myo-inositol into 2-keto-myo-inositol. The *iolFHIIJ* and *iolRS* genes described in *B. subtilis* were not detected in the subtracted libraries (40). The gene *iolR* corresponds to a negative regulator of the *iol* operon, *iolF* is related to a myo-inositol transporter and *iolE* codes for a 2-keto-myo-inositol dehydratase, while the function of the other *iol* genes is still unclear in *B. subtilis* (40).

The meat starter *S. xylosus* S04002 had only 9 fragments in common with the mouse dermatitis strain 00-1747. The biotin synthesis-related sequences obtained after genomic subtraction of these two strains seemed to be drastically different at the DNA level, and none of these fragments hybridized with the two genomic DNAs.

Conservation of tester-specific fragments within *S. xylosus* strains.

The extent of polymorphism among *S. xylosus* strains for the specific fragments was assessed. The *RsaI* digested genomic DNAs of 20 different *S. xylosus* strains, 10 used as starters in the food industry and 10 isolated from cow or goat mastitis (Table 1), were hybridized with the 122 specific fragment sequences of the 3 tester strains. Four specific fragments (D39, D129,

D137 and D158) from the *S. xylosus* 00-1747 library and four (Mb33, Mb66, M85 and M130) from the *S. xylosus* S04009 library were absent in the genomic DNA of the 20 *S. xylosus* strains. No specific fragment was present in all the *S. xylosus* genomes. The subtracted fragment most commonly found, which hybridized with 21 of the 23 *S. xylosus* strains (including the three tester strains), was fragment D294 corresponding to a hypothetical membrane protein and a CHAP domain corresponding to an amidase domain frequently found in autolysin precursor. A hierarchic ascendant classification gathered the strains into two clusters named I and II (Fig 2).

Cluster I comprised five strains, all isolated from animal-associated opportunistic infections, sharing 8 fragments: Mb26, Mb48, Mb147, M139, M149, D63, D96 and D213 (Table 2). These fragments corresponded to metabolic genes as PTS system specific to hexitol and its associated antiterminator Bgl, a sorbitol dehydrogenase, an acetyl transferase of unknown specificity, and a riboflavin kinase. Three of these fragments (Mb147, M139 and M149) corresponding to a hexitol assimilation system were absent in cluster II except one strain. The cluster could be divided into two subgroups named Ia and Ib. The Ia subgroup included the tester strain *S. xylosus* S04009 and the strain S04013 both isolated from cow mastitis. These two strains had 43 of the 122 specific fragments in common, 25 of which were from the *S. xylosus* S04009 library, showing a highly related genetic content between these two strains. Subgroup Ib comprised the tester strain *S. xylosus* 00-1747 isolated from mouse dermatitis and two strains isolated from goat mastitis, S04019 and S04020. The genomes of these three strains shared 20 fragments, 9 of which were common to the genome of the tester strain S04009 of subgroup Ia.

Cluster II comprised 18 strains that shared a few fragments with cluster I, and shared the E154 fragment, which was absent in cluster I except for one strain. This fragment corresponded to the accessory gene regulator C (*agrC*) which is a staphylococcal conserved

regulator. It has been observed that there is a high genetic variability of the *agr* locus in *Staphylococcus* species and particularly in the *agrC* sequence (26). This variability was observed between *Staphylococcus* species, but even between subpopulation of a single species (6). In *S. aureus*, *agrD* and *agrC* polymorphism permitted definition of a group broadly correlated with genotype which was correlated with pathotype (26). The existence of at least two different genotypic clusters (I and II) within the *S. xylosus* species was confirmed by the *argC* polymorphism distribution observed.

Cluster II could be divided into two subgroups named IIa and IIb. Subgroup IIa comprised the tester strain S04002 and the S01001 and S01008 strains of meat origin, and six other strains isolated from mastitis (Fig 2, Table 1). Within this heterogeneous subgroup, only two fragments were found to be in common: D294, described previously to be the most shared fragment between the 23 *S. xylosus* strains, and the fragment E154 already mentioned above. Subgroup IIb comprised 8 *S. xylosus* strains used as starters (Fig 2, Table 1) and one *S. xylosus* isolated from cow mastitis S04016. Twenty-one fragments were common between all these strains. They corresponded to the six myo-inositol metabolism genes (*iolABCDEFG*), all the fermentative metabolism genes (*als*, acetoin reductase and lactate permease) and the lipase gene (E179). The presence of *iol* genes in the majority of starter *S. xylosus* strains and their absence in the actual staphylococcal sequenced genomes indicate a specific and fortuitous acquisition of these genes by some *S. xylosus* strains. The presence of fermentative metabolism may be an adaptation to anaerobic growth conditions. In *S. aureus*, the overexpression of the genes implicated in butanediol fermentation and lactate production were recently observed under fermentative conditions (Fuchs 2007). Adaptation to anaerobic conditions and lipase activity could procure a technological advantage for *S. xylosus* used in food processing.

Location of tester-specific fragments on their respective chromosomes.

The location of each specific fragment from the three DNA subtraction libraries was analyzed by Southern hybridization. Genomic DNAs of the *S. xylosus* S04002, S04009 and 00-1747 strains were digested with I-*CeuI* or *SmaI*, resolved by PFGE (Fig 3), and blotted for Southern hybridization with a labeled pool of the specific fragments of each library. The specific fragments were located on the ~1100 kb I-*CeuI* fragment of each tester strain chromosome and on a few *SmaI* fragments. The specific fragments from the *S. xylosus* S04002 library were located on the 375 kb and 125 kb *SmaI* fragments, those of the *S. xylosus* S04009 mainly on the 300 kb but also on the 150 kb, 100 kb and 50 kb *SmaI* fragments, and the fragments of *S. xylosus* 00-1747 were located on the 400 kb and 100 kb *SmaI* fragments (Fig 3). To confirm the probable colocalization of the SSH library specific fragments, a second hybridization was performed using PFGE macro-restricted fragments as probes. The distribution of all the specific fragments from the 3 libraries is shown in Figure 3. For each of the *S. xylosus* S04002, S04009 and 00-1747 subtracted libraries, more than 97.5% of inserts were located in the ~1100 kb I-*CeuI* fragment. Most of these fragments were located on the 300/400 kb *SmaI* fragments on each *S. xylosus* tester strain, confirming that numerous specific fragments were colocalized on the *S. xylosus* S04002, S04009 and 00-1747 chromosomes. In a previous study we demonstrated by positioning the *dnaA* and *gyrA* genes, which are often found near the chromosome origin of replication of bacteria (*oriC*), that in *S. xylosus* C2a the origin of replication *oriC* was in the 1138 kb I-*CeuI* and 365 kb *SmaI* fragments (5). To check if the colocalization region corresponds to the *oriC* of the three tester strain chromosomes, we hybridized *dnaA* and *gyrA* probes on I-*CeuI* or *SmaI* restriction fragments of *S. xylosus* S04002, S04009 and 00-1747 strains (data not shown). The genes *dnaA* and *gyrA* were located on the ~1100 kb I-*CeuI* fragment and on 300/400 kb *SmaI* fragments of the three tester strains. Takeuchi *et al.* (35) observed by a comparative analysis of *S. haemolyticus*

genome with the seven *S. aureus* and the two *S. epidermidis* sequenced genomes that a region named “*oriC* environ” emerged as a chromosomal region unique to each staphylococcal species. It dictates many biological features that characterize each staphylococcal species. For example, in the “*oriC* environ” of *S. aureus* important virulence determinants as protein A (*spa*), coagulase (*coa*) and the capsule operon (*cap5*[8]A to -P) were present. This “*oriC* environ” region was defined in the downstream region 30 kb from the *oriC*. It contained the staphylococcal cassette chromosomes, which might serve as a vehicle for introduction of exogenous genes into this region as well as inserted sequence (IS) elements and other recombinases serving to excise unused genes. A species-specific upstream region was also observed in some *Staphylococcus* strains. The authors’ theory was that certain useful foreign genes were preserved by being transferred upstream of the *oriC*, protecting them from IS-mediated deletion occurring in the *oriC* environ. It was observed that the “*oriC* environ” was similar within a species but diverse among the different species, and the seven *S. aureus* sequenced strains had the downstream part of the *oriC* environ in common (35). In this study, we showed that the polymorphism of *S. xylosus* strains was principally centered on this “*oriC* environ” region, a species-specific region and also a strain-specific region in *S. xylosus*. Analysis of the differential genetic content of different *S. xylosus* demonstrated that this region is implicated in staphylococcal speciation but also actively participates in species evolution by the acquisition of new metabolism function like assimilation of new carbohydrate sources, antibiotic resistance or factors possibly implicated in virulence. These strain-specific genes may be used as markers in epidemiological or evolutionary studies. The genomic evolution capacity is essential for ubiquitous species such as *S. xylosus*. Sequencing this strain-specific “*oriC* environ” region in numerous *Staphylococcus* species and numerous strains within a species should provide a better understanding of staphylococcal genome plasticity and the genetic fitness of this genus in response to specialized niches.

Acknowledgements

We wish to thank Young-Suk Won for giving us the strain implicated in mouse dermatitis and Pascal Rainard for the strains isolated from mastitis. We would like to thank Isabelle Lebert for helpful discussions, Sébastien Masseglia for technical assistance, Brigitte Duclos for secretarial assistance, and David Marsh for revision of the English. Emilie Dordet-Frisoni is the recipient of a fellowship from the French Ministry of “Education Nationale et Recherche”. This work was financially supported by the ANR project “Genoferment” ANR-05-PNRA-020.

References

1. **Boch, J., B. Kempf, and E. Bremer.** 1994. Osmoregulation in *Bacillus subtilis*: synthesis of the osmoprotectant glycine betaine from exogenously provided choline. *Journal of Bacteriology* **176**:5364-5371.
2. **Cartron, M. L., S. Maddocks, P. Gillingham, C. J. Craven, and S. C. Andrews.** 2006. Feo transport of ferrous iron into bacteria. *Biometals* **19**:143-157.
3. **Daniel, A., P. E. Bonnen, and V. A. Fischetti.** 2007. First complete genome sequence of two *Staphylococcus epidermidis* bacteriophages. *Journal of Bacteriology* **189**:2086-2100.
4. **Diab, F., T. Bernard, A. Bazire, D. Haras, C. Blanco, and M. Jebbar.** 2006. Succinate-mediated catabolite repression control on the production of glycine betaine catabolic enzymes in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 under low and elevated salinities. *Microbiology* **152**:1395-1406.
5. **Dordet-Frisoni, E., R. Talon, and S. Leroy.** 2007. Physical and genetic map of the

-
- Staphylococcus xylosus* C2a chromosome. FEMS Microbiology Letters **266**:184-193.
6. **Dufour, P., S. Jarraud, F. Vandenesch, T. Greenland, R. P. Novick, M. Bes, J. Etienne, and G. Lina.** 2002. High genetic variability of the *agr* locus in *Staphylococcus* species. Journal of Bacteriology **184**:1180-1186.
 7. **Fitzgerald, J. R., S. D. Reid, E. Ruotsalainen, T. J. Tripp, M. Liu, R. Cole, P. Kuusela, P. M. Schlievert, A. Jarvinen, and J. M. Musser.** 2003. Genome diversification in *Staphylococcus aureus*: Molecular evolution of a highly variable chromosomal region encoding the Staphylococcal exotoxin-like family of proteins. Infection and Immunity **71**:2827-2838.
 8. **Fuchs, S., J. Pane-Farre, C. Kohler, M. Hecker, and S. Engelmann.** 2007. Anaerobic Gene Expression in *Staphylococcus aureus*. Journal of Bacteriology **189**:4275-4289.
 9. **Garcia-Varona, M., E. M. Santos, I. Jaime, and J. Rovira.** 2000. Characterisation of *Micrococcaceae* isolated from different varieties of chorizo. Food Microbiology **54**:189-195.
 10. **Gill, S. R., D. E. Fouts, G. L. Archer, E. F. Mongodin, R. T. Deboy, J. Ravel, I. T. Paulsen, J. F. Kolonay, L. Brinkac, M. Beanan, R. J. Dodson, S. C. Daugherty, R. Madupu, S. V. Angiuoli, A. S. Durkin, D. H. Haft, J. Vamathevan, H. Khouri, T. Utterback, C. Lee, G. Dimitrov, L. Jiang, H. Qin, J. Weidman, K. Tran, K. Kang, I. R. Hance, K. E. Nelson, and C. M. Fraser.** 2005. Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain and a biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain. Journal of Bacteriology **187**:2426-2438.

11. **Gotz, F., J. Zabielski, L. Philipson, and M. Lindberg.** 1983. DNA homology between the arsenate resistance plasmid pSX267 from *Staphylococcus xylosus* and the penicillinase plasmid pI258 from *Staphylococcus aureus*. *Plasmid* **9**:126-137.
12. **Kessie, G., M. Ettayebi, A. M. Haddad, A. M. Shibl, F. J. al-Shammary, A. F. Tawfik, and M. N. al-Ahdal.** 1998. Plasmid profile and antibiotic resistance in coagulase-negative staphylococci isolated from polluted water. *Journal of Applied Microbiology* **84**:417-422.
13. **Kil, K. S., M. W. Cunningham, and L. A. Barnett.** 1994. Cloning and sequence analysis of a gene encoding a 67-kilodalton myosin-cross-reactive antigen of *Streptococcus pyogenes* reveals its similarity with class II major histocompatibility antigens. *Infection and Immunity* **62**:2440-2449.
14. **Kloos, W. E. and K. H. Schleifer.** 1986. Genus IV. *Staphylococcus*, p. 1013-1035. *In* Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Williams & Wilkins, Baltimore, Md.
15. **Kloos, W. E., R. J. Zimmerman, and R. F. Smith.** 1976. Preliminary studies on the characterization and distribution of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species on animal skin. *Applied and Environmental Microbiology* **31**:53-59.
16. **Krings, E., K. Krumbach, B. Bathe, R. Kelle, V. F. Wendisch, H. Sahm, and L. Eggeling.** 2006. Characterization of myo-inositol utilization by *Corynebacterium glutamicum*: the stimulon, identification of transporters, and influence on L-lysine formation. *Journal of Bacteriology* **188**:8054-8061.
17. **Kwan, T., J. Liu, M. DuBow, P. Gros, and J. Pelletier.** 2005. The complete genomes and proteomes of 27 *Staphylococcus aureus* bacteriophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **102**:5174-5179.

18. **Marmur, J.** 1961. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganism. *Journal of Molecular Biology* **3**:208-218.
19. **Martin, B., M. Garriga, M. Hugas, S. Bover-Cid, M. T. Veciana-Nogues, and T. Aymerich.** 2006. Molecular, technological and safety characterization of Gram-positive catalase-positive cocci from slightly fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology* **107**:148-158.
20. **Montel, M. C., J. Reitz, R. Talon, J. L. Berdagué, and S. Rousset-Akrim.** 1996. Biochemical activities of *Micrococcaceae* and their effects on the aromatic profiles and odours of a dry sausage model. *Food Microbiology* **13**:489-499.
21. **Morot-Bizot, S., R. Talon, and S. Leroy-Setrin.** 2003. Development of specific PCR primers for a rapid and accurate identification of *Staphylococcus xylosus*, a species used in food fermentation. *Journal of Microbiological Methods* **55**:279-286.
22. **Nagase, N., A. Sasaki, K. Yamashita, A. Shimizu, Y. Wakita, S. Kitai, and J. Kawano.** 2002. Isolation and species distribution of staphylococci from animal and human skin. *Journal of Veterinary Medical Science* **64**:245-250.
23. **Nesbo, C. L., K. E. Nelson, and W. F. Doolittle.** 2002. Suppressive subtractive hybridization detects extensive genomic diversity in *Thermotoga maritima*. *Journal of Bacteriology* **184**:4475-4488.
24. **Newman, R. M., P. Salunkhe, A. Godzik, and J. C. Reed.** 2006. Identification and characterization of a novel bacterial virulence factor that shares homology with mammalian Toll/interleukin-1 receptor family proteins. *Infection and Immunity* **74**:594-601.

-
25. **Nimrat, S., S. Siriboonlamom, S. Zhang, Y. Xu, and V. Vuthiphandchai.** 2006. Chilled storage of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) spermatophores. *Aquaculture* **261**:944-951.
 26. **Novick, R.** 2006. Staphylococcal pathogenesis and pathogenicity factors: genetics and regulation, p. 496-516. *In* Gram-Positive Pathogens, 2nd Edition. ASM Press, Washington D.C.
 27. **Pinna, A., S. Zanetti, M. Sotgiu, L. A. Sechi, G. Fadda, and F. Carta.** 1999. Identification and antibiotic susceptibility of coagulase negative staphylococci isolated in corneal/external infections. *British Journal of Ophthalmology* **83**:771-773.
 28. **Pioch, G., H. Heyne, and W. Witte.** 1988. [Coagulase-negative *Staphylococcus* species in mixed fodder and on grain]. *Zentralblatt für Mikrobiologie* **143**:157-171.
 29. **Planchon, S., B. Gaillard-Martinie, E. Dordet-Frisoni, M. N. Bellon-Fontaine, S. Leroy, J. Labadie, M. Hebraud, and R. Talon.** 2006. Formation of biofilm by *Staphylococcus xylosus*. *International Journal of Food Microbiology* **109**:88-96.
 30. **Radnedge, L., P. G. Agron, P. L. Worsham, and G. L. Andersen.** 2002. Genome plasticity in *Yersinia pestis*. *Microbiology* **148**:1687-1698.
 31. **Schleifer, K. H. and W. E. Kloos.** 1975. Isolation and characterization of Staphylococci from human skin. I. Amended descriptions of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus* and descriptions of three new species: *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus xylosus*. *International Journal of Systematic Bacteriology* **25**:50-61.
 32. **Shale, K., J. F. R. Lues, P. Venter, and E. M. Buys.** 2005. The distribution of

- Staphylococcus* sp. on bovine meat from abattoir deboning rooms. Food Microbiology 22:433-438.
33. **Siqueira, J. F. Jr and K. C. Lima.** 2002. *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus xylosus* in a secondary root canal infection with persistent symptoms: a case report. Aust Endod J 28:61-63.
34. **Sondergaard, A. K. and L. Stahnke.** 2002. Growth and aroma production by *Staphylococcus xylosus*, *S. carnosus* and *S. equorum*: a comparative study in model systems. International Journal of Food Microbiology 75:99-109.
35. **Takeuchi, F., S. Watanabe, T. Baba, H. Yuzawa, T. Ito, Y. Morimoto, M. Kuroda, L. Cui, M. Takahashi, A. Ankai, S. Baba, S. Fukui, J. C. Lee, and K. Hiramatsu.** 2005. Whole-genome sequencing of *Staphylococcus haemolyticus* uncovers the extreme plasticity of its genome and the evolution of human-colonizing staphylococcal species. Journal of Bacteriology 187:7292-7308.
36. **Talon, R., S. Leroy-Sétrin, and S. Fadda.** 2002. Bacterial starters involved in the quality of fermented meat products, p. 175-191. In Research Advances in Quality of Meat and Meat Products - Chapter 10. Research Signpost .
37. **Tompkins, J. C., J. Figueroa, and R. W. Steele.** 2004. Occult Bacteremia. Infect Med 21:68-72.
38. **Winstanley, C.** 2002. Spot the difference: applications of subtractive hybridisation to the study of bacterial pathogens. Journal of Medical Microbiology 51:459-467.
39. **Won, Y. S., H. J. Kwon, G. T. Oh, B. H. Kim, C. H. Lee, Y. H. Park, B. H. Hyun, and Y. K. Choi.** 2002. Identification of *Staphylococcus xylosus* isolated from

C57BL/6J-Nos2(tm1Lau) mice with dermatitis. *Microbiology and Immunology* **46**:629-632.

40. **Yoshida, K. I., D. Aoyama, I. Ishio, T. Shibayama, and Y. Fujita.** 1997. Organization and transcription of the myo-inositol operon, *iol*, of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* **179**:4591-4598.

Table 1. *S. xylosus* strains used in this study and their origin

Strain	Origin
C2a ^a	Derived of DSM20267, human skin
839	Meat starter
840	Meat starter
S01002	Meat starter
S01003	Meat starter
S01004	Meat starter
S01006	Meat starter
S01007	Meat starter
S01008	Meat starter
S04002 ^a	Meat starter
S01001	Dairy starter
S04003	Dairy starter
S04009 ^a	Cow mastitis
S04010	Cow mastitis
S04012	Cow mastitis
S04013	Cow mastitis
S04016	Cow mastitis
S04017	Cow mastitis
S04018	Cow mastitis
S04011	Goat mastitis
S04014	Goat mastitis
S04019	Goat mastitis
S04020	Goat mastitis
00-1747 ^a	Mouse dermatitis

^a Strain used for SSH

Fig 1 UPGMA dendrogram with Dice coefficient of PFGE profiles of 24 *Sma*I macro-restricted *S. xylo*sus chromosomes

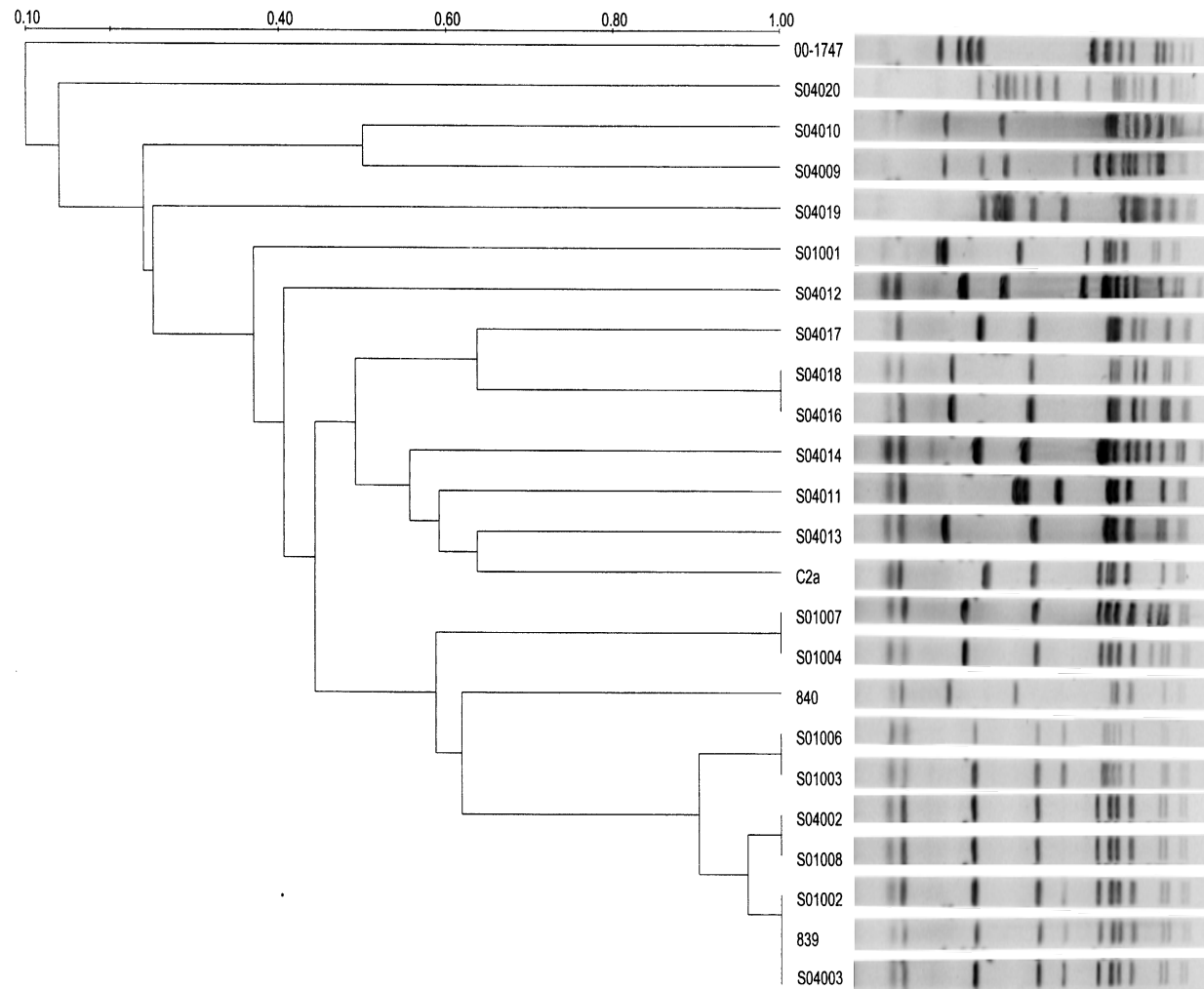


Table 2 *S. xylosus* S04002, S04009 and 00-1747 specific sequences with significant protein matches in the GeneBank database

Homology to predicted encoded protein	Fragments	eval	% id ^a	Organism	Accession no.	S04002	S04009	00-1747
Metabolism								
Biotin metabolism								
Biotin synthase BioB	E5	2,00E-44	85	<i>Staphylococcus aureus</i> COL	ER935916	+		
	E129	2,00E-34	80	<i>S. aureus</i> COL	ER935940	+		
Adenosylmethionine-8-amino-7-oxononanoate aminotransferase	E5	1,00E-17	62	<i>S. aureus</i> Mu50	ER935916	+		
BioA	D128	6,00E-125	82	<i>S. aureus</i> COL	ER935891			+
BioD protein	D128	4,00E-26	63	<i>Staphylococcus epidermidis</i> RP62A	ER935891			+
Myo-inositol catabolism								
Myo-inositol catabolism protein IolA	Mb262	5,00E-133	74	<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	ER935857	+	+	
	D76	6,00E-40	65	<i>Geobacillus kaustophilus</i> HTA426	ER935886			+
Myo-inositol catabolism protein IolB	Mb11	1,00E-61	52	<i>B. licheniformis</i> ATCC 14580	ER935832	+	+	
Myo-inositol catabolism protein IolC	Mb11	7,00E-59	63	<i>Bacillus halodurans</i> C-125	ER935832	+	+	
Putative myo-inositol catabolism protein IolC	M141	1,00E-30	66	<i>B. licheniformis</i> ATCC 14580	ER935866	+	+	
Myo-inositol catabolism protein IolD	M141	8,00E-71	70	<i>B. halodurans</i> C-125	ER935866	+	+	
Myo-inositol catabolism protein IolG	E126	2,00E-64	50	<i>Bacillus cereus</i> E33L	ER935938	+		
Myo-inositol catabolism protein IolE	Mb118	2,00E-79	63	<i>Clostridium tetani</i> E88	ER935843	+	+	
Pentose and glucuronate interconversion								
D-arabino-3-hexulose-6-phosphate formaldehyde lyase	E51	2,00E-14	95	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> ATCC 15305	ER935923	+	+	
Putative hexulose-6-phosphate synthase	E28	4,00E-75	95	<i>S. saprophyticus</i> ATCC 15305	ER935918	+	+	
Putative 6-phospho-3-hexuloisomerase	E28	9,00E-77	83	<i>S. saprophyticus</i> ATCC 15305	ER935918	+	+	
UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase	E36	7,00E-75	90	<i>S. saprophyticus</i> ATCC 15305	ER935921	+		
2-dehydro-3-deoxyphosphogluconate aldolase	Mb275	3,00E-78	63	<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>israelensis</i>	ER935858		+	+

					ATCC 35646				
2-dehydro-3-deoxygluconokinase PfkB	D151	5,00E-63	55	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp.	ER935896			+	
	D242	6,00E-29	49	<i>Mesenteroides</i> ATCC 8293					
	Mb59	3,00E-27	52	<i>Bacillus weihenstephanensis</i> KBAB4	ER935906		+	+	
Alpha/beta hydrolase fold family protein				<i>Flavobacteriales bacterium</i> HTCC2170	ER935840		+		
Fructose and mannose metabolism									
Phosphomannomutase	E127	4,00E-83	65	<i>S. epidermidis</i> RP62A	ER935939		+		
Hexitol dehydrogenase	Mb27	4,00E-94	69	<i>S. aureus</i> COL	ER935835		+	+	
	M139	1,00E-14	72	<i>S. aureus</i> COL	ER935864		+	+	
Sorbitol dehydrogenase	M139	3,00E-10	62	<i>S. aureus</i> COL	ER935864		+	+	
Fermentative metabolism									
Acetoin (diacetyl) reductase ButA	E129	9,00E-57	81	<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	ER935940		+		
Alpha-acetolactate synthase AlsS	E190	0.0	97	<i>S. saprophyticus</i> ATCC 15305	ER935953		+		
Amino acid metabolism									
Saccharopine dehydrogenase related protein	D85	2,00E-04	54	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> SK11	ER935887			+	
	D218	2,E-35	64	<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> SK11	ER935905			+	
Sarcosine oxidase, alpha subunit	D129	5,00E-77	51	<i>B. thuringiensis</i> serovar <i>konkukian</i> str. 97-27	ER935892			+	
Sarcosine oxidase beta subunit	D298	4,00E-45	41	<i>B. cereus</i> ATCC 14579	ER935912			+	
Betaine-aldehyde dehydrogenase	D298	9,00E-25	63	<i>B. weihenstephanensis</i> KBAB4	ER935912			+	
Dihydrodipicolinate synthase (DHDPS)	D176	2,00E-06	42	<i>Rickettsia felis</i> URRWXCal2	ER935899			+	
Other									
Lipase	E179	4,00E-92	92	<i>S. saprophyticus</i>	ER935951		+		
Putative lipase	D218	2,00E-88	83	<i>S. saprophyticus</i> ATCC 15305	ER935905			+	
UDP-glucose 4-epimerase	D44	2,00E-20	59	<i>G. kaustophilus</i>	ER935881			+	
Dihydroorotase	D23	1,00E-71	56	<i>B. cereus</i> G9241	ER935879		+	+	
Putative nucleoside-diphosphate-sugar epimerase DTDP-D-glucose 4,6-dehydratase	D46	1,00E-55	82	<i>S. saprophyticus</i> ATCC 15305	ER935882		+	+	
COG1670: putative acetyltransferase	D96	5,00E-45	54	<i>S. saprophyticus</i> ATCC 15305	ER935888		+	+	
Aldehyde dehydrogenase aldA	D106	4,00E-55	69	<i>Bacillus</i> sp. B14905	ER935889			+	

Riboflavin kinase ribR	D213	9,00E-10	40	<i>B. subtilis subsp. subtilis</i> str. 168	ER935904	+	+	+
COG2936: putative peptidase S9, prolyl oligopeptidase precursor	D273	5,00E-50	81	<i>S. aureus</i> RF122	ER935909			+
Similar to oxidoreductase	Mb127	8,00E-16	36	<i>S. aureus</i> Mu50	ER935844		+	+
COG0655: putative iron-sulfur flavoprotein (hypothetical protein SAS0063)	E184	1,00E-16	53	<i>S. aureus</i> MSSA476	ER935952	+		
Short-chain alcohol dehydrogenase	E139	9,00E-73	98	<i>S. saprophyticus</i> ATCC 15305	ER935942	+		
COG4221: putative Short-chain alcohol dehydrogenase of unknown specificity	E51	2,00E-42	100	<i>S. saprophyticus</i> ATCC 15305	ER935923	+		
COG1063: alcohol dehydrogenase	M65	2,00E-141	97	<i>S. saprophyticus</i> ATCC 15305	ER935860	+	+	
Regulatory								
Putative regulator of HxLAB (hexulose-6-phosphate synthase & 6-phospho-3-hexuloisomerase)	E111	1,00E-35	98	<i>S. saprophyticus</i> ATCC 15305	ER935932	+		
Transcriptional regulator, LysR family probable AlsR regulator	E173	4,00E-37	33	<i>Bacillus clausii</i> KSM-K16	ER935950	+		
Putative regulator of sorbitol operon	D7	4,00E-18	28	<i>Clostridium beijerincki</i> NCIMB 8052	ER935875			+
Sorbitol operon activator	D254	2,00E-24	39	<i>C. beijerincki</i> KSM-K16	ER935908			+
Transcriptional regulator putative hydrogen peroxide-inducible genes activator	E85	3,00E-81	99	<i>S. saprophyticus</i> ATCC 15305	ER935928	+	+	
PTS multi-domain regulator BglG	Mb48	6,00E-41	44	<i>S. aureus</i> MSSA476	ER935839			+
	D63	2,E-16	45	<i>S. aureus</i> COL	ER935884			+
Putative PTS multi-domain regulator EIIA putative fructose/mannitol specific	Mb147	6,00E-45	45	<i>S. aureus</i> MSSA476	ER935850			+
PTS system enzyme II B component putative sorbitol-specific	M149	6,00E-35	87	<i>S. aureus</i> Mu50	ER935867			+
	D53	2,00E-36	84	<i>S. aureus</i> Mu50	ER935883			+
PTS transport system, IIA component putative galactitol-specific	D53	1,00E-07	44	<i>S. aureus</i> MRSA252	ER935883			+
Accessory gene regulator C <i>agrC</i>	E154	5,00E-110	83	<i>S. saprophyticus</i> ATCC 15305	ER935944	+		
Protein SSP2020 putative ebsC transcription regulation protein	M160	6,00E-40	61	<i>S. saprophyticus</i> ATCC 15305	ER935868			+
NmrA-like transcriptional regulator	D11	8,00E-22	38	<i>Salinispora tropica</i> CNB-440	ER935876			+
Transcriptional regulator, LysR family domain protein	E184	4,00E-56	66	<i>S. aureus</i> MSSA476	ER935952	+		
	E116	8,00E-13	46	<i>S. aureus</i> USA300	ER935933	+		

Transcriptional regulator, GntR family/aminotransferase, class I	E3	1,00E-53	57	<i>S. aureus</i> COL	ER935914	+	+	
	Mb46	1,00E-49	59	<i>S. aureus</i> COL	ER935838			+
	Mb145	9,00E-20	81	<i>S. aureus</i> COL	ER935849			+
COG1167: putative transcriptional regulator GntR family	E100	2,00E-165	98	<i>S. saprophyticus</i> ATCC 15305	ER935929	+		
Transcriptional regulator (AraC/XylS family)	D141	2,00E-43	58	<i>Oceanobacillus iheyensis</i> HTE831	ER935895			+
COG1733: putative transcriptional regulator	E139	3,00E-17	93	<i>S. saprophyticus</i> ATCC 15305	ER935942	+		+
Cell membrane/surface structure								
Putative autolysin (mannosyl-glycoprotein endo-beta-N-acetylglucosamidase)	E73	3,00E-55	99	<i>S. saprophyticus</i> ATCC 15305	ER935926	+	+	+
	E130	2,00E-178	97	<i>S. saprophyticus</i> ATCC 15305	ER935941	+		
Autolysin (mannosyl-glycoprotein endo-beta-N-acetylglucosamidase)	D294	5,00E-07	66	<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	ER935911	+	+	+
67 kDa myosin-crossreactive streptococcal antigen-like protein	E110	3,00E-26	94	<i>S. epidermidis</i>	ER935931	+		
smart00255: putative Toll-Interleukin receptor	D157	1,00E-35	69	<i>S. aureus</i> MSSA476	ER935897			+
Glycosyl transferase, family 2:CDP-glycerol:poly(glycerophosphate) glycerophosphotransferase	E121	1,00E-32	40	<i>Clostridium phytofermentans</i> ISDg	ER935935	+		
Lipopolysaccharide modification acyltransferase	Mb127	8,00E-19	78	<i>S. epidermidis</i> ATCC 1228	ER935844			+
Biofilm-associated protein Bap	D137	1,00E-18	28	<i>Staphylococcus hyicus</i>	ER935894			+
LPXTG cell wall surface anchor family protein, hypothetical protein SSPP105	E25	1,00E-27	98	<i>S. saprophyticus</i> ATCC 15305	ER935917	+		
Cell wall surface anchor family protein, hypothetical protein SSPP105	E34	2,00E-114	98	<i>S. saprophyticus</i> ATCC 15305	ER935920	+		
Putative membrane protein of unknown function	D157	3,00E-05	36	<i>S. saprophyticus</i> ATCC 15305	ER935897			+
COG3152: Predicted membrane protein	D158	0.056	31	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	ER935898			+
COG3949: SSP0396 uncharacterized membrane protein	D294	9,00E-24	39	<i>S. saprophyticus</i> ATCC 15305		+	+	+
Resistance								
Methicillin resistance protein MecA1	Mb201	4,00E-38	52	<i>Staphylococcus sciuri</i>	ER935854			+
MecR1, methicillin resistance regulatory protein	M116	5,00E-73	58	<i>S. aureus</i>	ER935862			+
Metallothiol transferase fosB (fosfomycin resistance protein)	M130	3,00E-69	89	<i>S. haemolyticus</i> JCSC1435	ER935863			+

MphBM macrolide 2'-phosphotransferase II	M180	1,00E-92	86	<i>S. aureus</i>	ER935869		+	+
Micrococcin P1 peptide synthetase	Mb107	6,00E-123	58	<i>Staphylococcus equorum</i>	ER935842		+	+
Putative tetrone resistance transmembrane protein	D178	3,00E-18	36	<i>B. halodurans</i> C-125	ER935901		+	+
Aminoglycoside adenylyltransferase	D121	7,00E-51	79	<i>S. saprophyticus</i> ATCC 15305	ER935890			+
Arsenate reductase	E125	3,00E-73	100	<i>S. xylosus</i> plasmid Psx267	ER935937	+	+	+
Arsenic efflux pump protein	E125	2,00E-61	100	<i>S. aureus</i>	ER935937	+	+	+
Arsenical efflux pump membrane protein	D284	4,00E-19	100	<i>S. xylosus</i> plasmid Psx267	ER935910	+	+	+
Arsenical resistance operon repressor	D284	4,00E-49	89	<i>S. aureus</i> N315	ER935910	+	+	+
Membrane protein TerC, possibly involved in tellurium resistance	D16	1,00E-11	78	<i>S. saprophyticus</i> ATCC 15305	ER935877			+
Probable drug resistance transporter of EmrB/QacA family	Mb12	4,00E-19	46	<i>Listeria monocytogenes</i> str. 4b F2365	ER935833	+	+	
Putative drug exporter of the RND superfamily	E4	8,00E-91	74	<i>S. saprophyticus</i> ATCC 15305	ER935915	+		
COG2329: putative antibiotic biosynthesis monooxygenase	M266	2,00E-27	55	<i>S. aureus</i> JH1	ER935873		+	+
Transport								
L-lactate permease	E117	2,00E-47	92	<i>S. saprophyticus</i> ATCC 15305	ER935934	+		
Na ⁺ :myo-inositol cotransporter	Mb42	1,00E-56	70	<i>Bacillus clausii</i> KSM-K16	ER935837	+	+	
Amino acid permease-associated region lysine-specific permease precursor	D132	4,00E-58	53	<i>Pseudomonas fluorescens</i> PfO-1	ER935893			+
PTS system enzyme IIC component putative galactitol-specific I	M283	9,00E-34	57	<i>Salmonella typhimurium</i> LT2	ER935874		+	
Ferrous iron transport protein B	Mb142	8,00E-42	76	<i>S. epidermidis</i> RP62A	ER935848		+	+
ATPase copper transport	E158	4,00E-62	86	<i>S. aureus</i> USA300	ER935947	+		
	D182	4,00E-110	85	<i>S. aureus</i> USA300	ER935902			+
Putative permease, putative role in amino acid adenylation	E157	2,00E-51	81	<i>S. aureus</i> USA300	ER935946	+	+	
Putative permease of drug and metabolite transporter superfamily	E38	6,00E-122	98	<i>S. saprophyticus</i> ATCC 15305	ER935922	+	+	
Putative transporter, EamA family	E77	8,00E-50	53	<i>S. aureus</i> Mu50	ER935927	+		
Putative ABC-type nitrate sulfonate taurine bicarbonate transport system ATPase component	M237	3,00E-65	89	<i>S. saprophyticus</i> ATCC 15305	ER935871		+	+
TRAP-T family transporter, putative tripartite tricarboxylate transporter(TTT)	D177	2,00E-17	49	<i>Rhodobacter sphaeroides</i> 2.4.1	ER935900		+	+
ABC transporter, ATP-binding/permease protein	D19	6,00E-18	73	<i>S. aureus</i> COL	ER935878			+

Putative ABC transporter permease	E61	1,00E-10	89	<i>S. saprophyticus</i> ATCC 15305	ER935925	+		
Major facilitator family transporter	E142	3,00E-32	54	<i>Listeria innocua</i> Clip11262	ER935943	+		+
Putative permease of the major facilitator superfamily	D301	4,00E-20	96	<i>S. saprophyticus</i> ATCC 15305	ER935913			+
Phage-related and IS elements								
IS605/IS200-like transposase	Mb168	3,00E-86	89	<i>S. epidermidis</i> ATCC 1228	ER935851		+	+
Recombinase Sin	E110	3,00E-75	94	<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	ER935931	+		
Integrase	Mb194	7,00E-66	64	<i>S. aureus</i> RF122	ER935852		+	
Phage infection protein	E168	0.0	99	<i>S. epidermidis</i> RP62A	ER935949	+		+
Phage terminase large subunit, 77ORF003	Mb33	5,00E-68	62	Bacteriophage 77	ER935836		+	
ORF001	Mb66	3,00E-11	60	Bacteriophage 2638A	ER935841		+	
ORF094	Mb66	7,00E-13	79	Bacteriophage 2638A	ER935841		+	
ORF028	Mb66	3,00E-06	77	Bacteriophage 2638A	ER935841		+	
Conserved phage protein probable ORF029 of bacteriophage 37	Mb131	1,00E-16	56	<i>S. haemolyticus</i> JCSC1435	ER935845		+	
phiPVL ORF050-like protein	Mb133	3,00E-06	36	<i>S. aureus</i> USA300	ER935846		+	
ORF025	Mb137	3,00E-08	51	Bacteriophage EW	ER935847		+	
ORF60	Mb215	2,00E-06	46	<i>S. phage</i> 187	ER935856		+	
ORF077	Mb215	0.012	41	Bacteriophage EW	ER935856		+	
Capsid protein, 77ORF006	M85	7,00E-55	80	Bacteriophage 77	ER935861		+	
77ORF042	M85	1,00E-12	47	Bacteriophage 77	ER935861		+	
ORF001	M256	3,00E-59	59	Bacteriophage 2638A	ER935872		+	
Phage helicase, C-terminal	M200	2,00E-22	31	<i>Clostridium thermocellum</i> ATCC 27405	ER935870		+	
Integrase, ORF010	D65	2,00E-30	56	Bacteriophage 52A	ER935885			+
Hypothetical protein SSPP103, phage infection protein	E160	3,00E-11		<i>S. saprophyticus</i> ATCC 15305	ER935948	+	+	+
Hypothetical protein SAR0381, probable phage protein	Mb279	5,00E-09	38	<i>S. aureus</i> MRSA252	ER935859		+	
Unknown function								
COG3877: unnamed protein product	E31	7,00E-37	79	<i>S. haemolyticus</i> JCSC1435	ER935919	+		
Hypothetical protein SSP0169	E55	2,00E-09	85	<i>S. saprophyticus</i> ATCC 15305	ER935924	+		
Similar to unknown protein SH2317	E108	7,00E-09	60	<i>S. haemolyticus</i>	ER935930	+		
Hypothetical protein SE2200	E123	3,00E-09	89	<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	ER935936	+		+

Hypothetical protein SH0055	E156	1,00E-34	70	<i>S. haemolyticus</i> JCSC1435	ER935945	+		
COG1284: Uncharacterized conserved protein SSP1949	Mb26	2,00E-36	84	<i>S. saprophyticus</i> ATCC 15305	ER935834		+	+
Hypothetical protein cn33	Mb198	2,00E-19	37	<i>S. epidermidis bacteriophage</i> CNPH82	ER935853		+	
Hypothetical protein SH1793	Mb215	0.001	54	<i>S. haemolyticus</i> JCSC1435	ER935856		+	
Hypothetical protein no similarity found	Mb213				ER935855		+	
Hypothetical protein SAB0188	M139	7,00E-07	64	<i>S. aureus</i> RF122	ER935864		+	+
Hypothetical protein Mbar_A2529	M266	2,00E-12	30	<i>Methanosarcina barkeri str. fusaro</i>	ER935873		+	+
Hypothetical protein	D39	8,00E-12	45	<i>S. aureus</i> Mu50	ER935880			+
Truncated hypothetical protein	D121	1,E-10	83	<i>S. saprophyticus</i> ATCC 15305	ER935890			+
Hypothetical protein SSP2368	D197	4,00E-05	49	<i>S. saprophyticus</i> ATCC 15305	ER935903		+	+
No significant similarity found	M140				ER935865		+	
No significant similarity found	D246				ER935907			+
^a	%			id:	%		of	identity

Fig 2 Distribution of tester-specific fragments within *S. xylosus* strains.

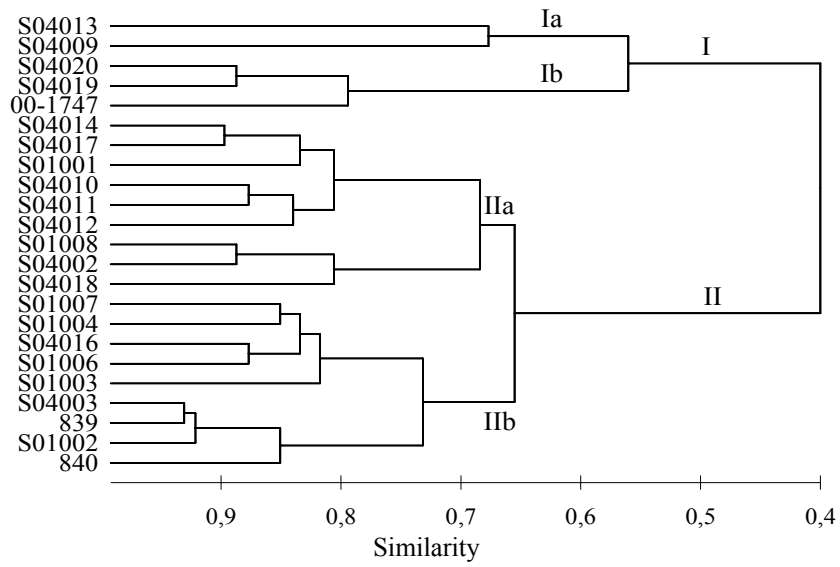
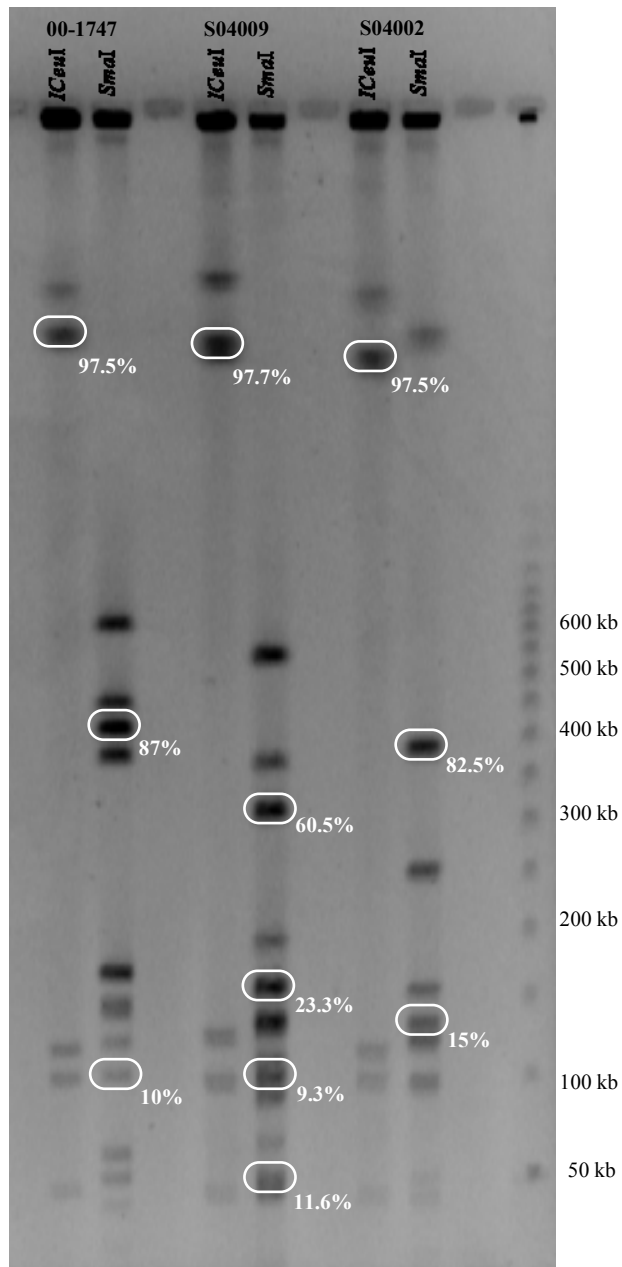


Fig 3 PFGE patterns of the *S. xylosus* 00-1747 S04009, and S04002 tester strains. The percentage of specific fragments that hybridized with restriction fragments is detailed for each restriction pattern.



DISCUSSION

Staphylococcus xylosus est une bactérie ubiquitaire, retrouvée tout au long de la chaîne alimentaire (Kloos & Schleifer, 1986 ; Pioch *et al.*, 1988 ; Irlinger *et al.*, 1997 ; Kessie *et al.*, 1998 ; Rantsiou *et al.*, 2005 ; Nimrat *et al.*, 2006 ; Anihouvi *et al.*, 2007). De plus, c'est un des principaux ferments utilisés pour les produits carnés (Talon *et al.*, 2003). Cette bactérie colonise un grand nombre de biotopes grâce à sa capacité d'adaptation à diverses conditions environnementales (Vilar *et al.*, 2000 ; Corbiere Morot-Bizot *et al.*, 2007), mais également à sa capacité à coloniser les surfaces (Planchon *et al.*, 2006). *S. xylosus* a été bien caractérisé sur la base de ses propriétés technologiques (Talon *et al.*, 2002) mais l'espèce est encore mal connue d'un point de vue génétique. Avant de focaliser sur ce point, il nous a semblé important de mieux connaître cette espèce dans sa diversité phénotypique.

Au début de cette thèse, la collection de *S. xylosus* disponible au laboratoire était composée de souches de référence et de souches d'origine carnée, utilisées comme ferment, isolées de saucissons naturellement fermentés ou de l'environnement d'atelier de salaison. Nous avons donc décidé d'élargir cette collection avec des souches d'autres origines. Comme chacun sait, obtenir des souches de différents laboratoires n'est pas chose aisée. De plus, cette tâche a été alourdie par le fait que beaucoup de souches que nous avons reçues n'appartenaient pas à l'espèce *S. xylosus*, après identification par les méthodes moléculaires fiables développées au laboratoire (Morot-Bizot *et al.*, 2003 ; Giammarinaro *et al.*, 2005). Cependant, nous avons pu enrichir la collection avec des souches d'origine laitière, isolées de mammite, de dermite, mais aussi tout récemment de souches de portage de différentes espèces animales et de souches cliniques.

Les souches de *S. xylosus* ont été caractérisées par 55 tests biochimiques et ont pu être différenciées sur la base de 17 tests, dont 14 basés sur le métabolisme des glucides. Sur cette base, deux groupes de souches ont pu être distingués, un groupe (I) constitué en majorité par des souches d'intérêt technologique et un second groupe (II) comprenant des souches commensales de la peau ou isolées d'infections opportunistes, ainsi qu'une souche utilisée comme ferment. L'analyse des profils métaboliques laisse à penser qu'il pourrait exister un lien entre le phénotype et l'origine des souches. Il faudrait bien sûr confirmer ce lien en étendant cette étude à une large collection de *S. xylosus*. Les souches du groupe II sont les seules à métaboliser le L-arabinose. Il a été décrit que ce carbohydrate était consommé par moins de 30% des souches de *S. xylosus* (Kloos & Schleifer, 1986). Toutes les souches testées sauf deux possèdent une activité nitrate réductase. Les deux souches incapables de réduire le nitrate ont été isolées de saucissons naturellement fermentés fabriqués sans adition

de sels nitrates. L'activité nitrate réductase est une propriété importante recherchée chez les souches utilisées comme ferment. En effet, elle permet le développement de la couleur rouge des produits carnés fermentés supplémentés en nitrate (Talon *et al.*, 1999). Toutes les souches d'origine carnée produisent de l'acétoïne, une molécule issue de la fermentation butanediolique. L'acétoïne contribue à la flaveur des produits fermentés (Stahnke, 1995).

Kloss et Schleifer (Kloos & Schleifer, 1986) ont montré que 80% des souches de *S. xylosus* commensales de la peau étaient pigmentées en jaune-orangé. Lors de notre étude sur des souches d'origine variée, nous avons observé que cette pigmentation est indépendante de l'origine des souches. Nous avons constaté que seulement 50% des souches sont pigmentées. La croissance des souches a été suivie en milieu complexe à différentes températures. Le but était de déterminer si des souches provenant de différentes niches écologiques avaient des températures optimales de croissance différentes. Nous avons observé qu'une grande proportion des souches a un optimum de croissance à 30°C en milieu complexe. Les souches de *S. xylosus* commensales et isolées de produits ou d'environnement carnés semblent croître préférentiellement à 30°C alors que les souches issues d'environnements laitiers s'adaptent mieux à des températures plus élevées. La température basale des ruminants et du lait en sortie de pis est proche de 38°C alors que la température moyenne de la peau est de 30°C et celle des environnements agro-alimentaire est bien plus basse. Lors de la description de l'espèce *S. xylosus*, Schleifer et Kloos (1975) avaient observé que les souches de *S. xylosus* sont capables de croître dans une large gamme de température allant de 15 à 45°C, l'optimum étant à 30°C.

Une grande proportion des souches de *S. xylosus* s'est montrée capable de croître dans un milieu minimum dont la seule source d'azote est du NH₄. La majorité des souches de *S. xylosus* possèdent donc tout l'équipement enzymatique nécessaire à la synthèse des acides aminés essentiels. Les faibles besoins nutritionnels de cette espèce doivent lui conférer un avantage pour survivre dans l'environnement.

La colonisation des surfaces participe également à cette survie. *S. xylosus* est capable de former un biofilm sur des surfaces abiotiques (Planchon *et al.*, 2006). La formation de biofilm est multifactorielle. Elle implique chez *S. xylosus*, des polysaccharides autres que ceux actuellement décrits pour les staphylocoques, et des protéines de surface (Planchon, 2006 ; Planchon *et al.*, 2006). Lors de cette thèse, nous avons étudié chez *S. xylosus* un autre mode de colonisation de surface. Plus de 70% des souches ont la capacité de se propager sur des géloses molles, colonisant en 24 à 48 h toute la surface d'une boîte de Pétri standard. La vitesse de propagation est plus ou moins rapide en fonction de la souche de *S. xylosus*, et

peut atteindre 125 $\mu\text{m}/\text{min}$ dans des conditions optimales, sur une gélose à 0,4% d'agar après incubation à 25°C. La capacité à se propager sur des géloses molles a récemment été observée chez quelques souches de *S. aureus* (Kaito & Sekimizu, 2007). Chez cette espèce, le phénomène est optimal à 40°C et ne se produit pas à des températures inférieures à 30°C. Chez *S. xylosum*, un effet régulateur de la température a été observé puisque la capacité à se propager pour former une colonie géante est inhibée à des températures supérieures à 35 °C. La propagation de *S. xylosum* n'est pas dépendante du milieu puisque ce phénomène est observé sur des milieux riches de type BHI (« Brain Heart Infusion ») ou LB (Luria-Bertani) comme sur un milieu minimum. Aucun besoin nutritionnel spécifique ne semble donc être requis pour ce type de colonisation de surface. Chez *S. aureus*, ce phénomène est dépendant des conditions de cultures et notamment, il n'est pas observé sur milieu LB (Kaito & Sekimizu, 2007).

Chez certaines bactéries, il a été montré que la sécrétion de surfactant contribuait aux phénomènes de mobilité sur surface (Matsuyama *et al.*, 1992 ; Kinsinger *et al.*, 2003). Chez *S. xylosum*, aucun surfactant pouvant contribuer au mécanisme de propagation en surface semi-solide n'a pu être mis en évidence.

L'observation du front de migration de la colonie géante en microscopie optique ou électronique à balayage montre que les cellules de *S. xylosum* forment une monocouche de cellules disjointes. Dans la zone plus centrale, il y a une plus forte densité cellulaire et les cellules forment des agrégats. Chez *S. aureus*, sur le front de migration les coques sont agrégés et forment des multicouches cellulaires (Kaito & Sekimizu, 2007).

L'addition de DNase I dans le milieu de culture entraîne une accélération du phénomène de colonisation. Nous avons observé, par microscopie électronique à balayage, qu'en présence de DNase I, les cellules de la zone centrale étaient peu ou pas agrégées. En biologie cellulaire, la DNase I est couramment utilisée pour prévenir les agrégations cellulaires, induites par l'ADN relargué des cellules endommagées (Renner *et al.*, 2004). De plus, chez les bactéries, l'ADN extracellulaire (ADNe) participe à la formation des biofilms (Whitchurch *et al.*, 2002). Le traitement à la DNase I entraîne la déstructuration de biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* au stade précoce (Whitchurch *et al.*, 2002). Chez *P. aeruginosa*, le relargage de l'ADNe est sous la régulation du quorum sensing (Allesen-Holm *et al.*, 2006). L'ADNe joue également un rôle important dans la formation de biofilm chez *S. aureus* (Rice *et al.*, 2007). Chez cette espèce, il a été montré que la capacité des souches à se propager sur des surfaces semi-solides n'était pas corrélée avec leur aptitude à former des biofilms (Kaito & Sekimizu, 2007). Il semble qu'il en soit de même chez *S. xylosum*.

L'augmentation de la vitesse de colonisation des surfaces semi-solides par *S. xylosus* après l'ajout de DNase I, nous incite à penser que la présence d'ADNe pourrait freiner la translocation cellulaire. Pour renforcer cette hypothèse, il serait nécessaire de mesurer la quantité l'ADNe présent, rechercher les régulateurs impliqués dans la lyse cellulaire et notamment ceux nouvellement observés chez *S. aureus* (Rice *et al.*, 2007). La caractérisation génétique de ce type de colonisation chez *S. xylosus* sera cependant très difficile puisque la seule souche génétiquement transformable, la souche *S. xylosus* C2a est incapable de se propager sur une surface semi-solide.

La plasticité phénotypique observée chez *S. xylosus* est sans doute le reflet de sa diversité génétique. Des études avaient montré des différences génotypiques importantes entre des souches de *S. xylosus* (Villard *et al.*, 2000 ; Morot-Bizot *et al.*, 2003 ; Martin *et al.*, 2006). En analysant par électrophorèse en champ pulsé le profil génomique d'une vingtaine de souches de *S. xylosus*, nous avons également observé une grande variabilité intra-espèce. Récemment, dans le cadre du projet ANR SCN-BEER, l'analyse de 78 souches de *S. xylosus* d'origine carnée et laitière a confirmé cette diversité (Desmonts *et al.*, 2007).

Le but de cette thèse était de caractériser la diversité génétique de *S. xylosus*. Dans un premier temps, nous avons voulu avoir une vue globale de l'organisation du chromosome de *S. xylosus*. Pour cela, nous avons construit la carte physique et génétique de la souche « modèle » *S. xylosus* C2a. C'est, chez cette souche, que la grande majorité du matériel génétique connu chez *S. xylosus* a été identifiée. *S. xylosus* C2a est issue de la souche DSM20267 curée de son plasmide pSX267 et ne présente pas de modification apparente du phénotype. Elle est actuellement la seule souche de *S. xylosus* qui peut être transformée avec une efficacité suffisante pour introduire des plasmides et construire des mutants par recombinaison chromosomique. Son chromosome est circulaire et sa taille a été évaluée à 2868 kb \pm 10 kb. Cette taille est comparable à celle observée chez les staphylocoques séquencés. Il est intéressant de noter que la taille du chromosome de la souche *S. xylosus* C2a est proche de celui des souches de *S. aureus* séquencés (2742 kb à 2903 kb) (Kuroda *et al.*, 2001 ; Diep *et al.*, 2006). Les génomes des souches des autres SCN, *S. epidermidis* (2499 à 2616 kb) (Zhang *et al.*, 2003 ; Gill *et al.*, 2005), *S. haemolyticus* (2685 kb) (Takeuchi *et al.*, 2005), *S. saprophyticus* (2516 kb) (Kuroda *et al.*, 2005) et *S. carnosus* (2560 kb) (Rosenstein *et al.*, 2005) sont plus petits. La différence de taille au sein du genre *Staphylococcus* est de 14%, le chromosome de *S. xylosus* C2a est un des chromosomes les

plus grands au sein de ce genre. Généralement, une augmentation de taille des génomes correspond à une augmentation du nombre de gènes et probablement à de nouvelles acquisitions métaboliques qui permettent une meilleure adaptabilité à l'environnement (Casjens, 1998). Ceci pourrait expliquer la capacité de *S. xylosus* à coloniser divers biotopes (Kloos & Schleifer, 1986). Afin d'observer si toutes les souches de *S. xylosus* possédaient un chromosome de taille comparable à celui de la souche C2a, la taille du chromosome de 23 autres souches de différentes origines a été estimée. La différence de taille est de 450 kb, entre le plus grand et le plus petit chromosome. Ainsi, la variation de taille est de l'ordre de 14% au sein de l'espèce *S. xylosus* ce qui est comparable à celle observée au sein du genre *Staphylococcus*. Les chromosomes des souches isolées d'infections opportunistes sont en moyenne plus grands que ceux des souches d'autres origines. Cette étude, bien que réalisée sur un nombre restreint de souches, nous amène à nous questionner sur l'acquisition éventuelle de matériel génétique chez les souches pouvant présenter un risque potentiel.

Lors de l'élaboration de la carte physique de *S. xylosus* C2a, 47 fragments de restriction obtenus après digestion avec les enzymes *ApaI*, *AscI*, *I-CeuI*, *SfiI*, *SmaI* ont été positionnés. Leur répartition sur le chromosome n'est pas homogène laissant supposer que la distribution des régions riches en G+C chez cette bactérie riche en A-T n'est pas aléatoire. Trente trois gènes, dont 10 nouvellement identifiés et les gènes codant l'ADN ribosomal ont été localisés sur le chromosome de *S. xylosus* C2a. La région de l'origine de réplication (*oriC*) a été déterminée par le positionnement des gènes *dnaA* et *gyrA* qui sont très souvent voisins de l'*oriC* chez les bactéries (Cole & Saint Girons, 1994). Cette localisation a été confirmée par le positionnement et l'orientation des opérons ribosomiaux (*rrn*) transcrits de façon divergente de part et d'autre de cette région. Le chromosome de *S. xylosus* C2a contient 6 copies de *rrn*, dont 3 sont regroupés sur une région représentant moins de 2% du génome. Chez les staphylocoques, on observe 5 à 6 copies de *rrn* chez *S. aureus* (Kuroda *et al.*, 2001 ; Baba *et al.*, 2002 ; Holden *et al.*, 2004 ; Gill *et al.*, 2005) et *S. epidermidis* (Zhang *et al.*, 2003 ; Gill *et al.*, 2005), 5 copies chez *S. haemolyticus* JCSC1435 (Takeuchi *et al.*, 2005) et 6 chez *S. saprophyticus* ATCC 15305 (Kuroda *et al.*, 2005). Nous avons observé chez *S. xylosus* une variation du nombre de *rrn* de 5 à 6. Cependant, la majorité des souches possèdent 6 opérons ribosomiaux. Leur organisation sur le génome est conservée au sein de l'espèce.

La carte génétique de la souche *S. xylosus* C2a nous a permis de faire une première comparaison de l'organisation globale du chromosome de cette souche avec les chromosomes des souches de staphylocoques séquencées. Nous avons ainsi pu observer que

la position des marqueurs génétiques sur le chromosome de *S. xylosus* C2a était similaire à celle du chromosome de *S. saprophyticus*. Sur la base des hybridations ADN-ADN et de la comparaison des séquences des ADNr 16S, *S. xylosus* a été classé dans le groupe d'espèce de *S. saprophyticus* (Kloos & Schleifer, 1986). Nos observations sur l'organisation globale du génome de *S. xylosus* confirment que, malgré une différence de taille de chromosome d'environ 350 kb, les espèces *S. xylosus* et *S. saprophyticus* sont génétiquement proches. L'organisation des opérons ribosomiaux, ainsi que la position des marqueurs génétiques sont également bien conservées sur tous les génomes des staphylocoques séquencés. Une étude de génomique comparée entre tous les génomes de staphylocoques séquencés a montré que 78 % du chromosome sont conservés entre les espèces (Takeuchi *et al.*, 2005). Les 22% de variabilité génétique observée au sein du genre *Staphylococcus* sont aussi importants que la variabilité génétique observée au sein d'une même espèce. En effet, lors d'une analyse par puce à ADN de 36 souches de *S. aureus*, il s'est avéré que 78% des gènes étaient communs à toutes les souches et que 22% étaient souches spécifiques (Fitzgerald *et al.*, 2003). Les souches étant d'origine variée, les auteurs ont donc émis la théorie que ce polymorphisme génétique devait jouer un rôle dans l'adaptation et la spécialisation des souches à leur niche écologique.

Le polymorphisme génétique de l'espèce *S. xylosus* a été montré par la variabilité des pulstotypes, la différence de taille des chromosomes et la variation du nombre d'opérons ribosomiaux. Pour caractériser la variabilité du contenu génétique de *S. xylosus*, nous avons choisi d'utiliser une méthode d'hybridation suppressive et soustractive (SSH) puisque qu'aucun génome séquencé de *S. xylosus* n'était alors disponible. Cette méthode permet de soustraire au génome d'une souche dite cible, le génome d'une souche dite soustractrice. Le but est d'isoler et de caractériser les fragments d'ADN de la souche cible absents chez la souche soustractrice (Lisitsyn *et al.*, 1993 ; Winstanley, 2002). Elle permet d'identifier en partie l'information génétique différentielle entre des bactéries proches, cependant l'intérêt de la SSH doit être modulé par l'abondance des fragments d'ADN isolés, faux positifs ou redondants (Agron *et al.*, 2002).

Trois souches d'origine variée, choisies dans la diversité génétique ont été utilisées comme souches cibles : *S. xylosus* S04002 utilisée comme ferment, S04009 isolée de mammite bovine et 00-1747 responsable de dermatite chez la souris (Won *et al.*, 2002). La souche « modèle » *S. xylosus* C2a, commensale de la peau a été utilisée comme souche soustractrice. Nous avons réalisé trois soustractions distinctes. Trois banques de soustraction ont été ainsi constituées contenant au total 122 fragments cibles-spécifiques. Après analyse, 149 ORFs

(« open reading frames ») ont été identifiées dont la majorité était des protéines du métabolisme, mais également des régulateurs, des transporteurs, des déterminants de résistance, des protéines de l'enveloppe ou phagiques. Une majorité des ORFs était similaire à des protéines déjà identifiées au sein du genre *Staphylococcus*. Il est intéressant de noter que 20 des 47 *orfs* spécifiques isolées chez la souche responsable de dermite de souris correspondaient à des gènes jamais identifiés chez des staphylocoques mais chez d'autres genres bactériens tels que des *Bacillus*, *Geobacillus*, *Clostridium* ou *Oceanobacillus*. D'autres gènes impliqués également dans le métabolisme présentent des séquences nucléotidiques divergentes des séquences codant des protéines de même fonction chez les staphylocoques. Cette souche d'origine murine provient de Corée (Won *et al.*, 2002). Ceci montre une évolution différente des souches de *S. xylosus* en fonction du biotope ou de l'origine géographique.

La majorité des ORFs identifiées chez les souches cibles correspondait à des gènes impliqués dans des métabolismes spécifiques comme ceux de la biotine, du myo-inositol, du sorbitol, de la lysine, de la glycine bêtaïne ou de la conversion du pentose en glucuronate. Chez la souche S04009 isolée de mammite, de nombreux gènes de l'opéron impliqué dans le catabolisme du myo-inositol ont été isolés. Le myo-inositol est un hexitol présent chez tous les êtres vivants. Il est synthétisé uniquement par les plantes et certains micro-organismes et est essentiel aux animaux et aux hommes. Différentes bactéries sont capables d'utiliser le myo-inositol comme source de carbone (*Klebsiella*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Bacillus* ...) mais les gènes impliqués dans le catabolisme de cet hexitol ne sont caractérisés que chez très peu d'espèces (Krings *et al.*, 2006). Chez *Bacillus subtilis*, deux opérons *iol* sont impliqués, l'un composé de 10 gènes *iolABCDEFGHIJ* et l'autre de deux gènes *iolRS* (Yoshida *et al.*, 1997). Les gènes impliqués dans le catabolisme du myo-inositol n'avaient jamais été identifiés au sein du genre *Staphylococcus*. Certains gènes *iol* sont présents chez la souche cible *S. xylosus* S04002 utilisée comme ferment. Chez cette souche, des gènes codant des protéines impliquées dans le métabolisme fermentatif ont également été isolés: une acétolactate synthase qui transforme le pyruvate en acétolactate, son régulateur AlsR, une acétoïne réductase qui transforme l'acétoïne en diacétyle et une lactate perméase. La présence de nombreux fragments cibles-spécifiques correspondant à des gènes impliqués dans le métabolisme suggère que les souches de *S. xylosus* ont une forte capacité d'adaptation à leur environnement et à la disponibilité en substrat.

Nous avons détecté des séquences phagiques et une IS (« Insertion Sequence ») chez la souche isolée de mammite S04009. La présence de ces éléments mobiles suggère l'existence de transferts horizontaux (Brussow *et al.*, 2004 ; Kwan *et al.*, 2005).

La souche isolée de mammite et celle responsable de dermite de souris possèdent plusieurs gènes codant des résistances aux antibiotiques ainsi que des gènes codant des protéines de synthèse de molécules antibiotiques comme une monooxygénase et un lipopeptide antibiotique, la micrococcine P1. Ces deux souches possèdent également un transporteur de fer, *feoB*. Ce transporteur pourrait avoir, chez ces bactéries, un rôle dans la captation du fer, essentielle à la survie et à la multiplication des bactéries dans l'hôte (Jin *et al.*, 2006 ; Naikare *et al.*, 2006).

Un gène codant une protéine de surface atypique, un récepteur Toll-Interleukine (TIR), a été identifié chez la souche *S. xylosus* 00-1747 responsable de lésions graves chez la souris. Ce récepteur mimant le système immunitaire eucaryote, a été décrit chez *Salmonella enterica* serovar Enteritidis (Newman *et al.*, 2006). Il a été montré chez cette espèce, que ce récepteur était un facteur de virulence important *in vivo*, car il module les mécanismes de défense de l'hôte. Des expérimentations *in vivo* ont montré une diminution de la létalité chez des souris infectées par des souches mutées sur le gène codant le récepteur Toll-Interleukine. Chez les bactéries, les domaines de type TIR sont répandus, mais la distribution aléatoire de ce récepteur au sein des genres bactériens laisse supposer qu'il est transmis par transfert horizontal (Newman *et al.*, 2006).

La distribution des 122 fragments cibles-spécifiques chez une vingtaine de souche de *S. xylosus* a été recherchée. Aucun fragment n'est présent chez toutes les souches. Huit fragments ne sont présents que chez les souches cibles dont ils sont issus. L'analyse de la distribution de ces fragments nous a permis de distinguer deux grands groupes de souches.

Le groupe I comprend deux souches cibles, celle isolée de mammite (S04009) et celle responsable de dermite (00-1747) ainsi que trois autres souches isolées de mammite. Ce groupe I pourrait constituer le groupe des souches potentiellement à risque. Pour confirmer cette hypothèse, il serait indispensable de tester la virulence des souches isolées de mammite, dans un premier temps, par des tests d'adhésion à des cellules épithéliales ou des fibroblastes d'origine mammaire bovine puis par des tests d'invasion et de multiplication dans ces cellules (Matthews *et al.*, 1994 ; Smits *et al.*, 1996). Dans un deuxième temps, les souches pourraient être testées *in vivo* dans le modèle de mammite chez la souris allaitante développé par Chandler (1970) qui a servi à tester la virulence de souches de *S. aureus*

(Jonsson *et al.*, 1985 ; Brouillette *et al.*, 2004). Les souches du groupe I ont en commun 8 fragments d'ADN cibles-spécifiques correspondant à un gène du système PTS hexitol spécifique et son régulateur, une sorbitol déshydrogénase, une acétyl transférase et une riboflavine kinase. Trois de ces fragments ne sont retrouvés que chez les souches de ce groupe à l'exception d'une souche du groupe II. Ils correspondent tous à un système d'assimilation d'un hexitol.

Le groupe II contient toutes les souches utilisées comme ferment et des souches isolées de mammites, soit 18 souches. Ce groupe diffère du groupe I notamment par la présence d'un fragment correspondant au gène *agrC* présent chez toutes les souches, sauf une. Le gène *agrC* (« accessory gene regulator ») code un régulateur spécifique des staphylocoques. Une grande variabilité génétique du locus *agr* a été observée au sein des staphylocoques et en particulier, sur le gène *agrC*. Cette variabilité a été étudiée chez *S. aureus*, et observée également chez des SCN (Dufour *et al.*, 2002 ; Novick, 2006). Chez *S. aureus*, le polymorphisme des gènes *agrC* et *agrD* a permis de définir des groupes génotypiques corrélés à des pathotypes (Novick, 2006). Il est encore un peu tôt pour conclure qu'il en est de même chez *S. xylosus*, mais l'étude du polymorphisme du locus *agr* chez cette espèce est une piste intéressante qui permet déjà de constituer deux grands groupes génétiques au sein de l'espèce. Au sein du groupe II, deux sous-groupes se distinguent. Le sous-groupe IIa est très hétérogène, aucun fragment n'étant retrouvé commun à toutes les souches. Le sous-groupe IIb, plus homogène, est constitué d'une grande partie des souches utilisées comme ferment. Ces souches ont de nombreux fragments cibles-spécifiques en commun, notamment des ORFs impliquées dans le métabolisme fermentatif. Il a été montré très récemment par analyse transcriptomique chez *S. aureus*, que des conditions anaérobies favorisent la synthèse d'acide comme le lactate et la voie fermentative du butanediol (Fuchs *et al.*, 2007). La capacité d'adaptation à l'anaérobie pourrait procurer un avantage technologique certain aux souches utilisées comme ferment. La majorité des gènes de l'opéron du catabolisme du myo-inositol a également été retrouvée chez toutes les souches du sous-groupe IIb. Ils correspondent aux six gènes de l'opéron *iolABCDEG*. La présence de ce locus chez la majorité des souches utilisées comme ferment, et son absence dans les génomes de staphylocoques actuellement séquencés, indiquent une acquisition fortuite de ces gènes par certaines souches de *S. xylosus*.

Nous voulions déterminer si ces fragments souches-spécifiques étaient localisés aléatoirement ou non sur le chromosome de *S. xylosus*. Pour cela, nous avons positionné sur le chromosome de la souche cible correspondante les fragments issus de chaque banque de

soustraction. Chez les trois souches cibles, la grande partie des fragments est positionnée dans un fragment *SmaI* de 300 à 400 kb. La répartition du polymorphisme génétique n'est donc pas aléatoire chez *S. xylosus*. La construction de la carte physique et génétique de la souche *S. xylosus* C2a, ainsi qu'une bonne connaissance des profils de macro-restriction des souches cibles, nous ont permis de supposer que l'origine de réplication (*oriC*) était présente dans ce fragment de restriction. Nous avons confirmé cette hypothèse grâce au positionnement des gènes *dnaA* et *gyrA* sur les génomes des trois souches cibles. Il a été montré lors de l'étude comparative du génome de *S. haemolyticus* avec sept génomes de *S. aureus* et deux génomes de *S. epidermidis* que la région en aval de l'origine de réplication correspondait à une région chromosomique unique à chaque espèce (Takeuchi *et al.*, 2005). De nombreux déterminants caractérisant ces espèces sont présents dans la région proche de l'*oriC*. Par exemple, dans l'environnement de l'*oriC* chez *S. aureus*, des déterminants importants dans la virulence de l'espèce, tels que la protéine A (*spa*), la coagulase (*coa*) et l'opéron de la capsule (*cap5[8]A to -P*) sont présents. Cette région spécifique d'espèce est également présente chez *S. xylosus* comme nous l'avons montré lors de l'établissement de la carte génétique de la souche *S. xylosus* C2a. En effet, au niveau de l'*oriC* sont présents des gènes spécifiques à *S. xylosus* comme *lacH* et *xylA*. Le gène *lacH* code une β -galactosidase et est localisé dans un opéron bicistronique d'utilisation du lactose. Le système d'assimilation du lactose chez *S. xylosus* est spécifique (Etude Bibliographique Chapitre III 1-9) (Bassias & Bruckner, 1998). Le gène *xylA* code une xylose isomérase impliquée dans le métabolisme du xylose. Ce métabolisme constitue une des caractéristiques phénotypiques de l'espèce *S. xylosus*. Nous avons également noté la présence, près de l'*oriC*, du gène *bap* (« biofilm associated protein ») impliqué dans la formation de biofilm. Ce gène a été initialement découvert chez une souche de *S. aureus* impliquée dans des mammites bovines (Cucarella *et al.*, 2004). Chez *S. aureus*, il a été montré que ce gène était porté par un îlot de pathogénicité et qu'un possible transfert horizontal serait responsable de sa présence chez d'autres espèces de staphylocoques (Ubeda *et al.*, 2003 ; Tormo *et al.*, 2005). Les transferts horizontaux dans la région proche de l'*oriC* pourraient faire intervenir des éléments de type IS ou des recombinases, mais également des cassettes chromosomiques (SCCs, « staphylococcal cassette chromosomes ») qui permettent l'introduction ou l'exclusion de gènes (Hanssen & Sollid, 2007). Les SSCs sont présentes dans la région de haute plasticité proche de l'*oriC* des staphylocoques (Takeuchi *et al.*, 2005).

Une autre région spécifique d'espèce chez *Staphylococcus* a également été observée en amont de l'origine de réplication (Takeuchi *et al.*, 2005). La théorie énoncée par ces auteurs,

est que les gènes utiles à l'espèce seraient transférés dans cette zone, à l'opposé de la région de haute plasticité, afin d'être protégé des réarrangements chromosomiques et notamment des délétions induites par les IS. L'évolution génomique des staphylocoques constituerait donc un nouveau paradigme de spéciation, distinct de tous les autres mécanismes décrits jusqu'alors chez les autres genres bactériens.

Takeuchi *et al.* (2005) ont montré que dans les génomes de staphylocoques séquencés, la région proche de l'*oriC* était variable entre les espèces mais conservées entre les souches d'une même espèce. En effet, chez *S. aureus*, les souches séquencées ont toute une région proche l'*oriC* identique. Nous avons montré lors de notre étude que cela n'était pas le cas chez *S. xylosus*, où cette région, en plus d'être une région de spéciation, est une région souche-spécifique. L'analyse des différences du contenu génétique chez différentes souches de *S. xylosus*, montre que cette région participe à l'évolution de l'espèce grâce à l'acquisition de fonctions métaboliques comme l'assimilation de nouvelles sources de carbone, de résistances aux antibiotiques ou d'éventuels facteurs de virulence. Cette plasticité de génome est essentielle à *S. xylosus* une espèce qui sait s'adapter à divers environnements.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Staphylococcus xylosus est une espèce versatile. Elle s'adapte à différents habitats et montre des phénotypes et des génotypes variés. *S. xylosus* est un des principaux ferments utilisé en salaison. Il est naturellement présent dans les ateliers agro-alimentaires. C'est une bactérie à faible besoin nutritionnel qui colonise les surfaces grâce à la formation de biofilms, mais peut-être aussi par un phénomène de translocation cellulaire observable sur une surface semi-solide. Ce phénomène pourrait représenter un avantage pour la colonisation, notamment d'aliments comme la viande ou le fromage, ou encore *in vivo*. Cependant, les mécanismes impliqués dans la translocation cellulaire de *S. xylosus* restent encore à déterminer.

Les propriétés technologiques de *S. xylosus* sont bien connues, mais cette espèce était mal caractérisée d'un point de vue génétique. Dans le cadre des réglementations sur l'utilisation des ferments et pour la pérennisation de l'utilisation de *S. xylosus*, il sera indispensable de bien connaître génétiquement cette espèce. Ces connaissances permettront d'une part, de vérifier l'innocuité des souches employées et d'autre part, de faciliter la sélection de souches d'intérêt alimentaire. C'est pour cette raison que notre équipe avait pour projet de séquencer le génome entier d'une souche de cette espèce. Pour préparer ce projet, l'estimation de la taille du chromosome de la souche modèle *S. xylosus* C2a a été réalisée et a permis la construction de banques génomiques de taille adaptée pour réaliser le séquençage aléatoire globale de son chromosome avec une bonne redondance des séquences. Les banques et le séquençage en masse ont été réalisés en 2005, en collaboration avec le Génoscope. L'élaboration de la carte physique et génétique, notamment le positionnement des opérons ribosomiaux, a constitué une aide précieuse lors de l'étape d'assemblage du génome. Début 2007, les étapes de finition et d'assemblage du chromosome ont été achevées. Le chromosome de *S. xylosus* C2a fait 2 786 686 bases. L'estimation de taille réalisée lors l'établissement de la carte physique et génétique (2868 kb \pm 10) était donc très proche de la taille réelle du chromosome. L'annotation automatique du génome a été réalisée et la validation de l'annotation des 2842 ORF du chromosome est en cours.

La majorité des données génétiques sur l'espèce *S. xylosus* a été obtenue à partir de la souche modèle *S. xylosus* C2a, commensale de la peau humaine. Très peu d'informations sur le contenu génétique des autres souches étaient disponibles. En plus des données génétiques que la séquence complète du génome de la souche C2a allait nous apporter, il nous a semblé important d'étudier la diversité génétique de *S. xylosus* provenant de niches écologiques variées.

En ce qui concerne les plasmides de *S. xylosus*, les données génétiques étaient réduites puisqu'un seul plasmide, pSX267 avaient été caractérisés. Le séquençage complet de ce plasmide de 30 kb a été entrepris par notre équipe et est actuellement en cours d'annotation. Nous avons montré que le contenu plasmidique des souches de *S. xylosus* est variable, certaines souches pouvant héberger jusqu'à 7 plasmides. L'optimisation des méthodes d'extractions plasmidiques sera nécessaire pour mieux étudier cette variabilité.

Nos efforts se sont centrés sur l'étude des différences du contenu chromosomique des souches de *S. xylosus*. Par une méthode d'hybridation soustractive et à partir du génome de trois souches cibles, une souche de *S. xylosus* utilisée comme ferment, une isolée de mammite bovine et une responsable de dermite chez la souris, respectivement, 30 kb, 23 kb et 25 kb de séquences chromosomiques spécifiques de ces souches cibles et absentes du génome de la souche *S. xylosus* C2a ont été obtenues. Un grand nombre des fragments d'ADN souches-spécifiques correspondait à des gènes impliqués dans le métabolisme. L'analyse de la distribution de tous les fragments spécifiques sur un plus grand nombre de souches a permis de distinguer deux groupes au sein de l'espèce. L'un contient des souches pouvant présenter un risque potentiel. Il sera essentiel, à l'avenir de tester la virulence de ces souches isolées d'infections opportunistes. L'élargissement du nombre de souches testées et la sélection des fragments spécifiques les plus discriminants pourront permettre la réalisation d'études épidémiologiques. De plus, nous avons observé un polymorphisme du gène *agrC* entre les deux groupes de souches. Ce gène, ainsi que les autres gènes du locus *agr* pourront être séquencés chez diverses souches de *S. xylosus*, permettant ainsi de vérifier si comme pour *S. aureus*, ce polymorphisme génétique permet la définition de génotypes. Un projet ANR auquel participe l'équipe, « SCN/BEER » s'intéresse actuellement à évaluer la biodiversité et le risque potentiel des staphylocoques à coagulase négative (SCN) isolés de fromage, de salaison, d'atelier de fabrication et de cas cliniques. Dans ce projet, les facteurs de risque seront recherchés chez des souches de *S. xylosus* via une puce à ADN comprenant plus de 270 oligonucléotides correspondant à des gènes codant des facteurs de risque connus chez les Firmicutes.

Nous avons montré sur les chromosomes de *S. xylosus* la présence d'une zone d'insertion privilégiée de gènes, localisée dans les environs de l'origine de répllication. Cette région avait été, lors d'une étude de génomique comparée, définie comme une région de spéciation chez les staphylocoques. Chez *S. xylosus*, cette région chromosomique est également une région souche-spécifique, lieu de nouvelles acquisitions génétiques importantes pour l'adaptation de l'espèce à ces différentes niches écologiques.

Les bases génétiques de l'espèce *S. xylosus* sont maintenant posées. Le séquençage de la souche C2a, ainsi que les données génétiques supplémentaires acquises vont permettre la réalisation d'études génomiques et post génomiques sur cette espèce. Le génome de *S. xylosus* C2a en cours d'annotation nous révélera bientôt tous ses secrets. Plusieurs autres projets de séquençage pourront être réalisés. Le séquençage de la région souche-spécifique chez plusieurs souches de *S. xylosus* permettra de mieux comprendre la plasticité du génome de l'espèce ainsi que son adaptation génétique en réponse à l'environnement. Le plasmide pSX267 a été séquencé, il sera intéressant de compléter nos connaissances sur l'information génétique portée par les plasmides endogènes des souches de *S. xylosus* et d'étudier les éventuels échanges génétiques. Au niveau post-génomique, une puce d'oligonucléotides spécifiques de la souche *S. xylosus* C2a est en cours de développement (Programme ANR Génoférent) et permettra de déterminer les mécanismes d'adaptation de l'espèce à divers environnements, notamment les environnements alimentaires. Certains des fragments souches spécifiques obtenus grâce à l'hybridation soustractive pourront permettre d'enrichir la puce spécifique de *S. xylosus*.

**REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES**

- A** Aarestrup F. M., Agero Y., Ahrens P., Jorgensen J. C. O., Madsen M. & Jensen L. B. (2000). Antimicrobial susceptibility and presence of resistance genes in staphylococci from poultry. *Veterinary Microbiology*. 74, 353-364.
- Abachin E., Poyart C., Pellegrini E., Milohanic E., Fiedler F., Berche P. & Trieu-Cuot P. (2002). Formation of D-alanyl-lipoteichoic acid is required for adhesion and virulence of *Listeria monocytogenes*. *Molecular Microbiology*. 43, 1-14.
- Addis E., Fleet G. H., Cox J. M., Kolak D. & Leung T. (2001). The growth, properties and interactions of yeasts and bacteria associated with the maturation of Camembert and blue-veined cheeses. *International Journal of Food Microbiology*. 69, 25-36.
- Agron P. G., Macht M., Radnedge L., Skowronski E. W., Miller W. & Andersen G. L. (2002). Use of subtractive hybridization for comprehensive surveys of prokaryotic genome differences. *FEMS Microbiology Letters*. 211, 175-182.
- Allesen-Holm M., Barken K. B., Yang L., Klausen M., Webb J. S., Kjelleberg S., Molin S., Givskov M. & Tolker-Nielsen T. (2006). A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. *Molecular Microbiology*. 59, 1114-1128.
- Almeida R. A. & Oliver S. P. (2001). Interaction of coagulase-negative *Staphylococcus* species with bovine mammary epithelial cells. *Microbial Pathogenesis*. 31, 205-212.
- Anihouvi V. B., Sakyi-Dawson E., Ayernor G. S. & Hounhouigan J. D. (2007). Microbiological changes in naturally fermented cassava fish (*Pseudotolithus* sp.) for *lanhouin* production. *International Journal of Food Microbiology*. 116, 287-291.
- Arciola C. R. (2006). Opportunistic bacteria in implant infections. Knowing them to plan their control. *International Journal of Artificial Organs*. 29, 341-342.
- Arciola C. R., Campoccia D., An Y. H., Baldassarri L., Pirini V., Donati M. E., Pegreff F. & Montanaro L. (2006). Prevalence and antibiotic resistance of 15 minor staphylococcal species colonizing orthopedic implants. *International Journal of Artificial Organs*. 29, 395-401.
- Ariznabarreta A., Gonzalo C. & San Primitivo F. (2002). Microbiological quality and somatic cell count of ewe milk with special reference to staphylococci. *Journal of Dairy Science*. 85, 1370-1375.
- Arrizubieta M. J., Toledo-Arana A., Amorena B., Penades J. R. & Lasa I. (2004). Calcium inhibits *bap*-dependent multicellular behavior in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*. 186, 7490-7498.
- Aymerich T., Martin B., Garriga M. & Hugas M. (2003). Microbial quality and direct

PCR identification of lactic acid bacteria and nonpathogenic Staphylococci from artisanal low-acid sausages. *Applied and Environmental Microbiology*. 69, 4583-4594.

B

Baba T., Takeuchi F., Kuroda M., Yuzawa H., Aoki K., Oguchi A., Nagai Y., Iwama N., Asano K., Naimi T., Kuroda H., Cui L., Yamamoto K. & Hiramatsu K. (2002). Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. *Lancet*. 359, 1819-1827.

Balaban N. & Rasooly A. (2000). Staphylococcal enterotoxins. *International Journal of Food Microbiology*. 61, 1-10.

Barriere C., Centeno D., Lebert A., Leroy-Setrin S., Berdague J. L. & Talon R. (2001a). Roles of superoxide dismutase and catalase of *Staphylococcus xylosus* in the inhibition of linoleic acid oxidation. *FEMS Microbiology Letters*. 201, 181-185.

Barriere C., Brückner R. & Talon R. (2001b). Characterization of the single superoxide dismutase of *Staphylococcus xylosus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 67, 4096-4104.

Barriere C., Brückner R., Centeno D. & Talon R. (2002). Characterisation of the *kata* gene encoding a catalase and evidence for at least a second catalase activity in *Staphylococcus xylosus*, bacteria used in food fermentation. *FEMS Microbiology Letters*. 216, 277-283.

Barriere C., Leroy-Sétrin S. & Talon R. (2001). Characterization of catalase and superoxide dismutase in *Staphylococcus carnosus* 833 strain. *Journal of Applied Microbiology*. 91, 514-519.

Bassias J. & Brückner R. (1998). Regulation of lactose utilization genes in *Staphylococcus xylosus*. *Journal of Bacteriology*. 180, 2273-2279.

Bautista L., Gaya P., Medina M. & Nunez M. (1988). A quantitative study of enterotoxin production by sheep milk staphylococci. *Applied and Environmental Microbiology*. 54, 566-569.

Beck H. C., Hansen A. M. & Lauritsen F. R. (2004). Catabolism of leucine to branched-chain fatty acids in *Staphylococcus xylosus*. *Journal of Applied Microbiology*. 96, 1185-1193.

Ben Hassen S., Messadi L. & Ben Hassen A. (2003). Identification et caractérisation des espèces de *Staphylococcus* isolées de lait de vaches atteintes ou non de mammite. *Annales de Médecine Vétérinaire*. 147, 41-47.

Berger-Bachi B., Barberis-Maino L., Strassle A. & Kayser F. H. (1989). FemA, a host-

mediated factor essential for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: molecular cloning and characterization. *Molecular and General Genetics*. 219, 263-269.

Blaiotta G., Ercolini D., Pennacchia C., Fusco V., Casaburi A., Pepe O. & Villani F. (2004). PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus spp.* strains isolated from meat and dairy products. Evidence for new variants of *seG* and *seI* in *S. aureus* AB-8802. *Journal of Applied Microbiology*. 97, 719-730.

Boch J., Kempf B. & Bremer E. (1994). Osmoregulation in *Bacillus subtilis*: synthesis of the osmoprotectant glycine betaine from exogenously provided choline. *Journal of Bacteriology*. 176, 5364-5371.

Bor YC., Moraes C., Lee SP., Crosby WL., Sinskey AJ. & Batt CA. (1992). Cloning and sequencing the *Lactobacillus brevis* gene encoding xylose isomerase. *Gene*. 114, 127-132.

Bowden M. G., Visai L., Longshaw C. M., Holland K. T., Speziale P. & Hook M. (2002). Is the GehD lipase from *Staphylococcus epidermidis* a collagen binding adhesin? *Journal of Biological Chemistry*. 277, 43017-43023.

Bradfield J. F., Wagner J. E., Boivin G. P., Steffen E. K. & Russell R. J. (1993). Epizootic fatal dermatitis in athymic nude mice due to *Staphylococcus xylosus*. *Laboratory Animal Science*. 43, 111-113.

Breidt F. Jr & Stewart G. C. (1987). Nucleotide and deduced amino acid sequences of the *Staphylococcus aureus* phospho-beta-galactosidase gene. *Applied and Environmental Microbiology*. 53, 969-973.

Breidt F. Jr, Hengstenberg W., Finkeldei U. & Stewart G. C. (1987). Identification of the genes for the lactose-specific components of the phosphotransferase system in the *lac* operon of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Biological Chemistry*. 262, 16444-16449.

Brouillette E., Grondin G., Lefebvre C., Talbot B. G. & Malouin F. (2004). Mouse mastitis model of infection for antimicrobial compound efficacy studies against intracellular and extracellular forms of *Staphylococcus aureus*. *Veterinary Microbiology*. 101, 253-262.

Brussow H., Canchaya C. & Hardt W. D. (2004). Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 68, 560-602.

Brückner R., Wagner E. & Götz F. (1993). Characterization of a sucrase gene from *Staphylococcus xylosus*. *Journal of Bacteriology*. 175, 851-857.

Brückner R. (1997). Gene replacement in *Staphylococcus carnosus* and *Staphylococcus xylosus*. *FEMS Microbiology Letters*. 151, 1-8.

Brückner R. & Titgemeyer F. (2002). Carbon catabolite repression in bacteria: choice of

the carbon source and autoregulatory limitation of sugar utilization. *FEMS Microbiology Letters*. 209, 141-148.

Brückner R. & Rosenstein R. (2006). Carbohydrate catabolism: pathways and regulation - Chapter 34. In *Gram-Positive Pathogens, 2nd Edition*, Eds Vincent A. Fischetti et al., ASM Press, Washington D.C. pp.427-433.

Bsat N., Herbig A., Casillas-Martinez L., Setlow P. & Helmann J. D. (1998). *Bacillus subtilis* contains multiple Fur homologues: identification of the iron uptake (Fur) and peroxide regulon (PerR) repressors. *Molecular Microbiology*. 29, 189-198.

Burlak C., Hammer C. H., Robinson M. A., Whitney A. R., McGavin M. J., Kreiswirth B. N. & Deleo F. R. (2007). Global analysis of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* exoproteins reveals molecules produced *in vitro* and during infection. *Cell Microbiology*. 9, 1172-1190.

Busby S. & Ebright R. H. (1999). Transcription activation by catabolite activator protein (CAP). *Journal of Molecular Biology*. 293, 199-213.

C

Caceres P., Castillo D. & Pizarro M. (1997). Secondary flora of Casar de Caceres cheese: Characterization of *Micrococcaceae*. *International Dairy Journal*. 7, 531-536.

Carr D. L. & Kloos W. E. (1977). Temporal study of the staphylococci and micrococci of normal infant skin. *Applied and Environmental Microbiology*. 34, 673-680.

Carrillo Esper R., de los Angeles Tellez Morales M. & Salinas Ruiz S. (2000). *Staphylococcus xylosus* : una bacteria emergente. *Revista Medica del Hospital General de Mexico*. 63, 107-111.

Casjens S. (1998). The diverse and dynamic structure of bacterial genomes. *Annual Review of Genetics*. 32, 339-377.

Chaillou S., Bor Y. C., Batt C. A., Postma P. W. & Pouwels P. H. (1998). Molecular cloning and functional expression in *Lactobacillus plantarum* 80 of xylT, encoding the D-xylose-H⁺ symporter of *Lactobacillus brevis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 64, 4720-4728.

Chandler R. L. (1970). Experimental bacterial mastitis in the mouse. *Journal of Medical Microbiology*. 3, 273-282.

Chen L., Keramati L. & Helmann J. D. (1995). Coordinate regulation of *Bacillus subtilis* peroxide stress genes by hydrogen peroxide and metal ions. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*. 92, 8190-8194.

Christiansen I. & Hengstenberg W. (1996). Cloning and sequencing of two genes from

Staphylococcus carnosus coding for glucose-specific PTS and their expression in *Escherichia coli* K-12. *Molecular and General Genetics*. 250, 375-379.

Christiansen I. & Hengstenberg W. (1999). Staphylococcal phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system--two highly similar glucose permeases in *Staphylococcus carnosus* with different glucoside specificity: protein engineering in vivo? *Microbiology*. 145(Pt 10), 2881-2889.

Clements M. O., Watson S. P. & Foster S. J. (1999). Characterization of the major superoxide dismutase of *Staphylococcus aureus* and its role in starvation survival, stress resistance, and pathogenicity. *Journal of Bacteriology*. 181, 3898-3903.

Cocolin L., Rantsiou K., Iacumin L., Urso R., Cantoni C. & Comi G. (2004). Study of the ecology of fresh sausages and characterization of populations of lactic acid bacteria by molecular methods. *Applied and Environmental Microbiology*. 70, 1883-1894.

Cocolin L., Manzano M., Aggio D., Cantoni C. & Comi G. (2001). A novel polymerase chain reaction (PCR) -- denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) for the identification of *Micrococcaceae* strains involved in meat fermentations. Its application to naturally fermented Italian sausages. *Meat Science*. 58, 59-64.

Cole S. T. & Saint Girons I. (1994). Bacterial genomics. *FEMS Microbiology Reviews*. 14, 139-160.

Condon C., Grunberg-Manago M. & Putzer H. (1996a). Aminoacyl-tRNA synthetase gene regulation in *Bacillus subtilis*. *Biochimie*. 78, 381-389.

Condon C., Putzer H. & Grunberg-Manago M. (1996b). Processing of the leader mRNA plays a major role in the induction of *thrS* expression following threonine starvation in *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*. 93, 6992-6997.

Contreras A., Corrales J. C., Sanchez A. & Sierra D. (1997). Persistence of subclinical intramammary pathogens in goats throughout lactation. *Journal of Dairy Science*. 80, 2815-2819.

Corbiere Morot-Bizot S., Leroy S. & Talon R. (2006). Staphylococcal community of a small unit manufacturing traditional dry fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology*. 108, 210-217.

Corbiere Morot-Bizot S., Leroy S. & Talon R. (2007). Monitoring of staphylococcal starters in two French processing plants manufacturing dry fermented sausages. *Journal of Applied Microbiology*. 102, 238-244.

Cordero M. R. & Zumalacarregui J. M. (2000). Characterization of *Micrococcaceae* isolated from salt used for Spanish dry-cured ham. *Letters in Applied Microbiology*. 31, 303-

306.

Cucarella C., Solano C., Valle J., Amorena B., Lasa I. & Penades J. R. (2001). Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *Journal of Bacteriology*. 183, 2888-2896.

Cucarella C., Tormo M. A., Knecht E., Amorena B., Lasa I., Foster T. J. & Penades J. R. (2002). Expression of the biofilm-associated protein interferes with host protein receptors of *Staphylococcus aureus* and alters the infective process. *Infection and Immunity*. 70, 3180-3186.

Cucarella C., Tormo M. A., Ubeda C., Trotonda M. P., Monzon M., Peris C., Amorena B., Lasa I. & Penades J. R. (2004). Role of biofilm-associated protein bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. *Infection and Immunity*. 72, 2177-2185.

Cunha Mde L., Lopes C. A., Rugolo L. M. & Chalita L. V. (2002). Clinical significance of coagulase-negative staphylococci isolated from neonates. *Journal of Pediatric (Rio J)*. 78, 279-288.

Cvitkovitch D. G., Boyd D. A. & Hamilton I. R. (1995). Regulation of sugar transport via the multiple sugar metabolism operon of *Streptococcus mutans* by the phosphoenolpyruvate phosphotransferase system. *Journal of Bacteriology*. 177, 5704-5706.

Dahl J. L., Wei B. Y. & Kadner R. J. (1997). Protein phosphorylation affects binding of the *Escherichia coli* transcription activator UhpA to the uhpT promoter. *Journal of Biological Chemistry*. 272, 1910-1919.

Davis E. O. & Henderson P. J. (1987). The cloning and DNA sequence of the gene xylE for xylose-proton symport in *Escherichia coli* K12. *Journal of Biological Chemistry*. 262, 13928-13932.

De Luca G., Zanetti F. & Stampi S. (1997). *Staphylococcus aureus* in dairy products in the Bologna area. *International Journal of Food Microbiology*. 35, 267-270.

de Vos Petersen C., Beck H. C. & Lauritsen F. R. (2004). On-line monitoring of important organoleptic methyl-branched aldehydes during batch fermentation of starter culture *Staphylococcus xylosus* reveal new insight into their production in a model fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*. 85, 298-305.

Deinhofer M. & Pernthaner A. (1995). *Staphylococcus* spp. as mastitis-related pathogens in goat milk. *Veterinary Microbiology*. 43, 161-166.

Desmonts M.-H., Lintz A., Coton E., Coton M., Jamet E., Leroy S. & Talon R. (2007) Caractérisation moléculaire des souches de staphylocoques à coagulase-négative d'origine

alimentaire ou clinique par PFGE 7^{ème} Congrès de la Société Française de Microbiologie Nantes, Mai 2007.

Diep B. A., Gill S. R., Chang R. F., Phan T. H., Chen J. H., Davidson M. G., Lin F., Lin J., Carleton H. A., Mongodin E. F., Sensabaugh G. F. & Perdreau-Remington F. (2006). Complete genome sequence of USA300, an epidemic clone of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet*. 367, 731-739.

Djordjevic G. M., Tchieu J. H. & Saier M. H. Jr. (2001). Genes involved in control of galactose uptake in *Lactobacillus brevis* and reconstitution of the regulatory system in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*. 183, 3224-3236 .

Dossonnet V., Monedero V., Zagorec M., Galinier A., Perez-Martinez G. & Deutscher J. (2000). Phosphorylation of HPr by the bifunctional HPr Kinase/P-ser-HPr phosphatase from *Lactobacillus casei* controls catabolite repression and inducer exclusion but not inducer expulsion. *Journal of Bacteriology*. 182, 2582-2590.

Dufour P., Jarraud S., Vandenesch F., Greenland T., Novick R. P., Bes M., Etienne J. & Lina G. (2002). High genetic variability of the agr locus in *Staphylococcus* species. *Journal of Bacteriology*. 184, 1180-1186.

E

Edwards K. G., Blumenthal H. J., Khan M. & Slodki M. E. (1981). Intracellular mannitol, a product of glucose metabolism in staphylococci. *Journal of Bacteriology*. 146, 1020-1029.

Egeter O. & Brückner R. (1995). Characterization of a genetic locus essential for maltose-maltotriose utilization in *Staphylococcus xylosus*. *Journal of Bacteriology*. 177, 2408-2415.

Egeter O. & Brückner R. (1996). Catabolite repression mediated by the catabolite control protein CcpA in *Staphylococcus xylosus*. *Molecular Microbiology*. 21, 739-749.

Ehlert K., Schroder W. & Labischinski H. (1997). Specificities of FemA and FemB for different glycine residues: FemB cannot substitute for FemA in staphylococcal peptidoglycan pentaglycine side chain formation. *Journal of Bacteriology*. 179, 7573-7576.

Eisermann R., Fischer R., Kessler U., Neubauer A. & Hengstenberg W. (1991). Staphylococcal phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system. Purification and protein sequencing of the *Staphylococcus carnosus* histidine-containing protein, and cloning and DNA sequencing of the *ptsH* gene. *European Journal of Biochemistry*. 197, 9-14.

Erlandson K. A., Park J. H., Wissam, El Khal, Kao H. H., Basaran P., Brydges S. & Batt C. A. (2000). Dissolution of xylose metabolism in *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 66, 3974-3980.

F

- Fadda S., Leroy-Sétrin S., Diot A. & Talon R.** (2002) Screening of staphylococci on their ability to produce ketones Proceedings of the 48 th ICoMST Rome, Italie, 25-30 Août.
- Fadda S., Leroy-Sétrin S. & Talon R.** (2003). Preliminary characterization of β -decarboxylase activities in *Staphylococcus carnosus* 833, a strain used in sausage fermentation. *FEMS Microbiology Letters*. 228, 143-149.
- Fiegler H. & Brückner R.** (1997). Identification of the serine acetyltransferase gene of *Staphylococcus xylosus*. *FEMS Microbiology Letters*. 148, 181-187.
- Fiegler H., Bassias J., Jankovic I. & Brückner R.** (1999). Identification of a gene in *Staphylococcus xylosus* encoding a novel glucose uptake protein. *Journal of Bacteriology*. 181, 4929-4936.
- Firth N., Apisiridej S., Berg T., O'Rourke B. A., Curnock S., Dyke K. G. & Skurray R. A.** (2000). Replication of staphylococcal multiresistance plasmids. *Journal of Bacteriology*. 182, 2170-2178.
- Fischer R. & Hengstenberg W.** (1992). Mannitol-specific enzyme II of the phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system of *Staphylococcus carnosus*. Sequence and expression in *Escherichia coli* and structural comparison with the enzyme II mannitol of *Escherichia coli*. *European Journal of Biochemistry*. 204, 963-969.
- Fitzgerald J. R., Reid S. D., Ruotsalainen E., Tripp T. J., Liu M., Cole R., Kuusela P., Schlievert P. M., Jarvinen A. & Musser J. M.** (2003). Genome diversification in *Staphylococcus aureus*: Molecular evolution of a highly variable chromosomal region encoding the Staphylococcal exotoxin-like family of proteins. *Infection and Immunity*. 71, 2827-2838.
- Forsman P., Tilsala-Timisjarvi A. & Alatossava T.** (1997). Identification of staphylococcal and streptococcal causes of bovine mastitis using 16S-23S rRNA spacer regions. *Microbiology*. 143, 3491-3500.
- Fuchs S., Pane-Farre J., Kohler C., Hecker M. & Engelmann S.** (2007). Anaerobic Gene Expression in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*. 189, 4275-4289.

G

- Gagnon Y., Breton R., Putzer H., Pelchat M., Grunberg-Manago M. & Lapointe J.** (1994). Clustering and co-transcription of the *Bacillus subtilis* genes encoding the aminoacyl-tRNA synthetases specific for glutamate and for cysteine and the first enzyme for cysteine biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*. 269, 7473-7482.
- Galinier A., Kravanja M., Engelmann R., Hengstenberg W., Kilhoffer M. C.,**

- Deutscher J. & Haiech J.** (1998). New protein kinase and protein phosphatase families mediate signal transduction in bacterial catabolite repression. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A.* 95, 1823-1828.
- Garcia M. L., Moreno B. & Bergdoll M. S.** (1980). Characterization of staphylococci isolated from mastitic cows in Spain. *Applied and Environmental Microbiology.* 39, 548-553.
- Garcia-Varona M., Santos E. M., Jaime I. & Rovira J.** (2000). Characterisation of *Micrococcaceae* isolated from different varieties of chorizo. *Food Microbiology.* 54, 189-195.
- Gärtner D., Geissendorfer M. & Hillen W.** (1988). Expression of the *Bacillus subtilis xyl* operon is repressed at the level of transcription and is induced by xylose. *Journal of Bacteriology.* 170, 3102-3109.
- Gemmell C. G. & Dawson J. E.** (1982). Identification of coagulase-negative staphylococci with the API staph system. *Journal of Clinical Microbiology.* 16, 874-877.
- Gering M. & Brückner R.** (1996). Transcriptional regulation of the sucrase gene of *Staphylococcus xylosus* by the repressor ScrR. *Journal of Bacteriology.* 178, 462-469.
- Gering M., Götz F. & Brückner R.** (1996). Sequence and analysis of the replication region of the *Staphylococcus xylosus* plasmid pSX267. *Gene.* 182, 117-122.
- Giammarinaro P., Leroy S., Chacornac J. P., Delmas J. & Talon R.** (2005). Development of a new oligonucleotide array to identify staphylococcal strains at species level. *Journal of Clinical Microbiology.* 43, 3673-3680.
- Gill S. R., Fouts D. E., Archer G. L., Mongodin E. F., Deboy R. T., Ravel J., Paulsen I. T., Kolonay J. F., Brinkac L., Beanan M., Dodson R. J., Daugherty S. C., Madupu R., Angiuoli S. V., Durkin A. S., Haft D. H., Vamathevan J., Khouri H., Utterback T., Lee C., Dimitrov G., Jiang L., Qin H., Weidman J., Tran K., Kang K., Hance I. R., Nelson K. E. & Fraser C. M.** (2005). Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain and a biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain. *Journal of Bacteriology.* 187, 2426-2438.
- Götz F., Zabielski J., Philipson L. & Lindberg M.** (1983). DNA homology between the arsenate resistance plasmid pSX267 from *Staphylococcus xylosus* and the penicillinase plasmid pI258 from *Staphylococcus aureus*. *Plasmid.* 9, 126-137.
- Graham J. E. & Wilkinson B. J.** (1992). *Staphylococcus aureus* osmoregulation: roles for choline, glycine betaine, proline, and taurine. *Journal of Bacteriology.* 174, 2711-2716.

Gross M., Cramton S. E., Götz F. & Peschel A. (2001). Key role of teichoic acid net charge in *Staphylococcus aureus* colonization of artificial surfaces. *Infection and Immunity*. 69, 3423-3426.

Grundy F. J. & Henkin Tina. (2002). Synthesis of serine, glycine, cysteine, and methionine- Chapter 18. In *Bacillus subtilis and its closest relatives, from genes to cells*, Eds Abraham L. Sonenshein, James A. Hoch, Richard Losick, ASM Press, Washington D.C. pp.245-254.

Gunneriusson E., Samuelson P., Uhlen M., Nygren P. A. & Stahl S. (1996). Surface display of a functional single-chain Fv antibody on staphylococci. *Journal of Bacteriology*. 178, 1341-1346.

H **Hanssen A. M. & Sollid J. U.** (2007). Multiple Staphylococcal Cassette Chromosomes and Allelic Variants of Cassette Chromosome Recombinases in *Staphylococcus aureus* and Coagulase-Negative Staphylococci from Norway. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 51, 1671-1677.

Hansson M., Stahl S., Nguyen T. N., Bachi T., Robert A., Binz H., Sjolander A. & Uhlen M. (1992). Expression of recombinant proteins on the surface of the coagulase-negative bacterium *Staphylococcus xylosus*. *Journal of Bacteriology*. 174, 4239-4245.

Hariharan H., Donachie W., Macaldowie C. & Keefe G. (2004). Bacteriology and somatic cell counts in milk samples from ewes on a Scottish farm. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 68, 188-192.

Harshey R. M. (2003). Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal. *Annual Review of Microbiology*. 57, 249-273.

Henkin T. M. (1996). The role of CcpA transcriptional regulator in carbon metabolism in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiology Letters*. 135, 9-15.

Henrichsen J. (1972). Bacterial surface translocation: a survey and a classification. *Bacteriological Review*. 36, 478-503.

Henze U., Sidow T., Wecke J., Labischinski H. & Berger-Bachi B. (1993). Influence of *femB* on methicillin resistance and peptidoglycan metabolism in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*. 175, 1612-1620.

Holden M. T., Feil E. J., Lindsay J. A., Peacock S. J., Day N. P., Enright M. C., Foster T. J., Moore C. E., Hurst L., Atkin R., Barron A., Bason N., Bentley S. D., Chillingworth C., Chillingworth T., Churcher C., Clark L., Corton C., Cronin A., Doggett J., Dowd L., Feltwell T., Hance Z., Harris B., Hauser H., Holroyd S., Jagels K.,

James K. D., Lennard N., Line A., Mayes R., Moule S., Mungall K., Ormond D., Quail M. A., Rabbinowitsch E., Rutherford K., Sanders M., Sharp S., Simmonds M., Stevens K., Whitehead S., Barrell B. G., Spratt B. G. & Parkhill J. (2004). Complete genomes of two clinical *Staphylococcus aureus* strains: evidence for the rapid evolution of virulence and drug resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A.* 101, 9786-9791.

Horsburgh M. J., Clements M. O., Crossley H., Ingham E. & Foster S. J. (2001). PerR controls oxidative stress resistance and iron storage proteins and is required for virulence in *Staphylococcus aureus*. *Infection and Immunity.* 69, 3744-3754.

Huynh P. L., Jankovic I., Schnell N. F. & Brückner R. (2000). Characterization of an HPr kinase mutant of *Staphylococcus xylosus*. *Journal of Bacteriology.* 182, 1895-1902.

I **Inaoka T., Matsumura Y. & Tsuchido T.** (1998). Molecular cloning and nucleotide sequence of the superoxide dismutase gene and characterization of its product from *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology.* 180, 3697-3703.

Irlinger F., Morvan A., Elsolh N. & Bergere J. L. (1997). Taxonomic characterization of coagulase-negative staphylococci in ripening flora from traditional french cheeses. *Systematic and Applied Microbiology.* 20, 319-328.

J **Jang S. & Imlay J. A.** (2007). Micromolar intracellular hydrogen peroxide disrupts metabolism by damaging iron-sulfur enzymes. *Journal of Biological Chemistry.* 282, 929-937.

Jankovic I., Egeter O. & Brückner R. (2001). Analysis of catabolite control protein A-dependent repression in *Staphylococcus xylosus* by a genomic reporter gene system. *Journal of Bacteriology.* 183, 580-586.

Jankovic I. & Brückner R. (2002). Carbon catabolite repression by the catabolite control protein CcpA in *Staphylococcus xylosus*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology.* 4, 309-314.

Jankovic I. & Brückner R. (2007). Carbon catabolite repression of sucrose utilization in *Staphylococcus xylosus*: catabolite control protein CcpA ensures glucose preference and autoregulatory limitation of sucrose utilization. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology.* 12, 114-120.

Ji G. & Silver S. (1992). Reduction of arsenate to arsenite by the ArsC protein of the arsenic resistance operon of *Staphylococcus aureus* plasmid pI258. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A.* 89, 9474-9478.

Jin B., Newton S. M., Shao Y., Jiang X., Charbit A. & Klebba P. E. (2006). Iron acquisition systems for ferric hydroxamates, haemin and haemoglobin in *Listeria monocytogenes*. *Molecular Microbiology*. 59, 1185-1198.

John J. F. J., Gramling P. K. & O'Dell N. M. (1978). Species identification of coagulase-negative staphylococci from urinary tract isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. 8, 435-437.

Jonsson P., Lindberg M., Haraldsson I. & Wadstrom T. (1985). Virulence of *Staphylococcus aureus* in a mouse mastitis model: studies of alpha hemolysin, coagulase, and protein A as possible virulence determinants with protoplast fusion and gene cloning. *Infection and Immunity*. 49, 765-769.

Josefsson E., O'Connell D., Foster T. J., Durussel I. & Cox J. A. (1998). The binding of calcium to the B-repeat segment of SdrD, a cell surface protein of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Biological Chemistry*. 273, 31145-311452.

K

Kaenjak A., Graham J. E. & Wilkinson B. J. (1993). Choline transport activity in *Staphylococcus aureus* induced by osmotic stress and low phosphate concentrations. *Journal of Bacteriology*. 175, 2400-2406.

Kaito C. & Sekimizu K. (2007). Colony spreading in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*. 189, 2553-2557.

Kappes R. M., Kempf B., Kneip S., Boch J., Gade J., Meier-Wagner J. & Bremer E. (1999). Two evolutionarily closely related ABC transporters mediate the uptake of choline for synthesis of the osmoprotectant glycine betaine in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*. 32, 203-216.

Kenneally, Leuschner & Arendt. (1998). Evaluation of the lipolytic activity of starter cultures for meat fermentation purposes. *Journal of Applied Microbiology*. 84, 839-846.

Kessie G., Ettayebi M., Haddad A. M., Shibl A. M., al-Shammary F. J., Tawfik A. F. & al-Ahdal M. N. (1998). Plasmid profile and antibiotic resistance in coagulase-negative staphylococci isolated from polluted water. *Journal of Applied Microbiology*. 84, 417-22.

Kinsinger R. F., Shirk M. C. & Fall R. (2003). Rapid surface motility in *Bacillus subtilis* is dependent on extracellular surfactin and potassium ion. *Journal of Bacteriology*. 185, 5627-5631.

Kloos W. E. & Musselwhite M. S. (1975). Distribution and persistence of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species and other aerobic bacteria on human skin. *Applied Microbiology*. 30, 381-385.

- Kloos W. E., Zimmerman R. J. & Smith R. F.** (1976). Preliminary studies on the characterization and distribution of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species on animal skin. *Applied and Environmental Microbiology*. 31, 53-59.
- Kloos W. E. & Schleifer K. H.** (1986). Genus IV. *Staphylococcus*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Eds P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe, and J. G. Holt, Williams & Wilkins, Baltimore, Md. pp.1013-1035.
- Knezevic I., Bachem S., Sickmann A., Meyer H. E., Stulke J. & Hengstenberg W.** (2000). Regulation of the glucose-specific phosphotransferase system (PTS) of *Staphylococcus carnosus* by the antiterminator protein GlcT. *Microbiology*. 146(Pt 9), 2333-2342.
- Knobloch J. K., Nedelmann M., Kiel K., Bartscht K., Horstkotte M. A., Dobinsky S., Rohde H. & Mack D.** (2003). Establishment of an arbitrary PCR for rapid identification of Tn917 insertion sites in *Staphylococcus epidermidis*: characterization of biofilm-negative and nonmucoid mutants. *Applied and Environmental Microbiology*. 69, 5812-5818.
- Kohlbrecher D., Eisermann R. & Hengstenberg W.** (1992). Staphylococcal phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system: molecular cloning and nucleotide sequence of the *Staphylococcus carnosus ptsI* gene and expression and complementation studies of the gene product. *Journal of Bacteriology*. 174, 2208-2214.
- Koprivnjak T., Mlakar V., Swanson L., Fournier B., Peschel A. & Weiss J. P.** (2006). Cation-induced transcriptional regulation of the *dlt* operon of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*. 188, 3622-3630.
- Kravanja M., Engelmann R., Dossonnet V., Bluggel M., Meyer H. E., Frank R., Galinier A., Deutscher J., Schnell N. & Hengstenberg W.** (1999). The *hprK* gene of *Enterococcus faecalis* encodes a novel bifunctional enzyme: the HPr kinase/phosphatase. *Molecular Microbiology*. 31, 59-66.
- Kredich N. M.** (1992). The molecular basis for positive regulation of *cys* promoters in *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*. 6, 2747-2753.
- Kreutz B. & Götz F.** (1984). Construction of *Staphylococcus* plasmid vector pCA43 conferring resistance to chloramphenicol, arsenate, arsenite and antimony. *Gene*. 31, 301-304.
- Krings E., Krumbach K., Bathe B., Kelle R., Wendisch V. F., Sahm H. & Eggeling L.** (2006). Characterization of myo-inositol utilization by *Corynebacterium glutamicum*: the stimulon, identification of transporters, and influence on L-lysine formation. *Journal of Bacteriology*. 188, 8054-8061.

Kuroda M., Ohta T., Uchiyama I., Baba T., Yuzawa H., Kobayashi I., Cui L., Oguchi A., Aoki K., Nagai Y., Lian J., Ito T., Kanamori M., Matsumaru H., Maruyama A., Murakami H., Hosoyama A., Mizutani-Ui Y., Takahashi N. K., Sawano T., Inoue R., Kaito C., Sekimizu K., Hirakawa H., Kuhara S., Goto S., Yabuzaki J., Kanehisa M., Yamashita A., Oshima K., Furuya K., Yoshino C., Shiba T., Hattori M., Ogasawara N., Hayashi H. & Hiramatsu K. (2001). Whole genome sequencing of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet*. 357, 1225-1240.

Kuroda M., Yamashita A., Hirakawa H., Kumano M., Morikawa K., Higashide M., Maruyama A., Inose Y., Matoba K., Toh H., Kuhara S., Hattori M. & Ohta T. (2005). Whole genome sequence of *Staphylococcus saprophyticus* reveals the pathogenesis of uncomplicated urinary tract infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102, 13272-13277.

Kuroishi T., Komine K., Kai K., Itagaki M., Kobayashi J., Ohta M., Kamata S. & Kumagai K. (2003). Concentrations and specific antibodies to staphylococcal enterotoxin-C and toxic shock syndrome toxin-1 in bovine mammary gland secretions, and inflammatory response to the intramammary inoculation of these toxins. *Journal of Veterinary Medical Science*. 65, 899-906.

Kwan T., Liu J., DuBow M., Gros P. & Pelletier J. (2005). The complete genomes and proteomes of 27 *Staphylococcus aureus* bacteriophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*. 102, 5174-5179.

L **Lasa I. & Penades J. R.** (2006). Bap: a family of surface proteins involved in biofilm formation. *Research in Microbiology*. 157, 99-107.

Lepesant J. A., Kunst F., Lepesant-Kejzlarova J. & Dedonder R. (1972). Chromosomal location of mutations affecting sucrose metabolism in *Bacillus subtilis* Marburg. *Molecular and General Genetics*. 118, 135-160.

Liljeqvist S., Samuelson P., Hansson M., Nguyen T. N., Binz H. & Stahl S. (1997). Surface display of the cholera toxin B subunit on *Staphylococcus xylosus* and *Staphylococcus carnosus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 63, 2481-2488.

Lin M. Y. & Yen C. L. (1999). Antioxidative ability of lactic acid bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47, 1460-1466.

Lisitsyn N., Lisitsyn N. & Wigler M. (1993). Cloning the differences between two complex genomes. *Science*. 259, 946-951.

Lokman BC., Heerikhuisen M., Leer RJ., Van den Broek A., Borsboom Y., Chaillou S., Postma PW. & Pouwels PH. (1997). Regulation of expression of the *Lactobacillus*

pentosus xylAB operon. *Journal of Bacteriology*. 179, 5391-5397.

Ludwig W. & Schleifer K. H. (1994). Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. *FEMS Microbiology Reviews*. 15, 155-173.

M

Mack D., Becker P., Chatterjee I., Dobinsky S., Knobloch J. K., Peters G., Rohde H. & Herrmann M. (2004). Mechanisms of biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*: functional molecules, regulatory circuits, and adaptive responses. *International Journal of Medical Microbiology*. 294, 203-212.

Madoff L. C., Michel J. L., Gong E. W., Kling D. E. & Kasper D. L. (1996). Group B streptococci escape host immunity by deletion of tandem repeat elements of the alpha C protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*. 93, 4131-4136.

Maidhof H., Reinicke B., Blumel P., Berger-Bachi B. & Labischinski H. (1991). *femA*, which encodes a factor essential for expression of methicillin resistance, affects glycine content of peptidoglycan in methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains. *Journal of Bacteriology*. 173, 3507-3513.

Makoutode M., Amoussouga Ph., Ahossi C., Devleeschouwer M. & Dony J. (1994). Infection post-opératoires de plaies à *Staphylococcus xylosus* dans les services chirurgicaux de Centre National Hospitalier et Universitaire de Cotonou : Aspects bactériologiques. *J. Soc. Biol. Clin.-Benin*. 1, 40-42.

Malinowski E., Klossowska A., Kaczmarowski M. & Kuzma K. (2003). Prevalence of intramammary infections in pregnant heifers. *Bulletin of The Veterinary Institute in Pulawy*. 47, 165-170.

Mansilla M. C. & de Mendoza D. (2000). The *Bacillus subtilis* *cysP* gene encodes a novel sulphate permease related to the inorganic phosphate transporter (Pit) family. *Microbiology*. 146(Pt 4), 815-821.

Martin B., Garriga M., Hugas M., Bover-Cid S., Veciana-Nogues M. T. & Aymerich T. (2006). Molecular, technological and safety characterization of Gram-positive catalase-positive cocci from slightly fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology*. 107, 148-158.

Martin I., Debarbouille M., Ferrari E., Klier A. & Rapoport G. (1987). Characterization of the levanase gene of *Bacillus subtilis* which shows homology to yeast invertase. *Molecular and General Genetics*. 208, 177-184.

Martuscelli M., Crudele M. A., Gardini F. & Suzzi G. (2000). Biogenic amine formation

and oxidation by *Staphylococcus xylosus* strains from artisanal fermented sausages. *Letters in Applied Microbiology*. 31, 228-232.

Matsuyama T., Kaneda K., Nakagawa Y., Isa K., Hara-Hotta H. & Yano I. (1992). A novel extracellular cyclic lipopeptide which promotes flagellum-dependent and -independent spreading growth of *Serratia marcescens*. *Journal of Bacteriology*. 174, 1769-1776.

Matthews K. R., Rejman J. J., Turner J. D. & Oliver S. P. (1994). Proliferation of a bovine mammary epithelial cell line in the presence of bacterial virulence factors. *Journal of Dairy Science*. 77, 2959-2964.

Mauriello G., Moschetti G., Villani F., Blaiotta G. & Coppola S. (2000). Antibiotic resistance of coagulase-negative staphylococci isolated from artisanal Naples-type salami. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 51, 19-24.

Meile L., Rohr L. M., Geissmann T. A., Herensperger M. & Teuber M. (2001). Characterization of the D-xylulose 5-phosphate/D-fructose 6-phosphate phosphoketolase gene (*xfp*) from *Bifidobacterium lactis*. *Journal of Bacteriology*. 183, 2929-2936.

Mijakovic I., Poncet S., Galinier A., Monedero V., Fieulaine S., Janin J., Nessler S., Marquez J. A., Scheffzek K., Hasenbein S., Hengstenberg W. & Deutscher J. (2002). Pyrophosphate-producing protein dephosphorylation by HPr kinase/phosphorylase: a relic of early life? *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*. 99, 13442-13447.

Monedero V., Kuipers O. P., Jamet E. & Deutscher J. (2001). Regulatory functions of serine-46-phosphorylated HPr in *Lactococcus lactis*. *Journal of Bacteriology*. 183, 3391-3398.

Montel M. C., Talon R., Cantonnet M. & Fournaud J. (1992). Identification of *Staphylococcus* from French dry sausage. *Letters in Applied Microbiology*. 15, 73-77.

Montel M. C., Reitz J., Talon R., Berdagué J. L. & Rousset-Akrim S. (1996). Biochemical activities of *Micrococcaceae* and their effects on the aromatic profiles and odours of a dry sausage model. *Food Microbiology*. 13, 489-499.

Moreno M. S., Schneider B. L., Maile R. R., Weyler W. & Saier M. H. Jr. (2001). Catabolite repression mediated by the CcpA protein in *Bacillus subtilis*: novel modes of regulation revealed by whole-genome analyses. *Molecular Microbiology*. 39, 1366-1381.

Morot-Bizot S., Talon R. & Leroy-Setrin S. (2003). Development of specific PCR primers for a rapid and accurate identification of *Staphylococcus xylosus*, a species used in food fermentation. *Journal of Microbiological Methods*. 55, 279-286.

Mosbah H., Sayari A., Mejdoub H., Dhouib H. & Gargouri Y. (2005). Biochemical and molecular characterization of *Staphylococcus xylosus* lipase. *Biochimica et Biophysica Acta*.

1723, 282-291.

Mosbah H., Sayari A., Bezzine S. & Gargouri Y. (2006). Expression, purification, and characterization of His-tagged *Staphylococcus xylosus* lipase wild-type and its mutant Asp 290 Ala. *Protein Expression and Purification*. 47, 516-523.

Mosbah H., Sayari A., Verger R. & Gargouri Y. (2007). Gly311 residue triggers the enantioselectivity of *Staphylococcus xylosus* lipase: A monolayer study. *Journal of Colloid and Interface Science*. 310, 196-204.

Munro C., Michalek S. M. & Macrina F. L. (1991). Cariogenicity of *Streptococcus mutans* V403 glucosyltransferase and fructosyltransferase mutants constructed by allelic exchange. *Infection and Immunity*. 59, 2316-2323.

N **Nagase N., Sasaki A., Yamashita K., Shimizu A., Wakita Y., Kitai S. & Kawano J.** (2002). Isolation and species distribution of staphylococci from animal and human skin. *Journal of Veterinary Medical Science*. 64, 245-250.

Naikare H., Palyada K., Panciera R., Marlow D. & Stintzi A. (2006). Major role for FeoB in *Campylobacter jejuni* ferrous iron acquisition, gut colonization, and intracellular survival. *Infection and Immunity*. 74, 5433-5444.

Newman R. M., Salunkhe P., Godzik A. & Reed J. C. (2006). Identification and characterization of a novel bacterial virulence factor that shares homology with mammalian Toll/interleukin-1 receptor family proteins. *Infection and Immunity*. 74, 594-601.

Nguyen T. N., Hansson M., Stahl S., Bachi T., Robert A., Domzig W., Binz H. & Uhlen M. (1993). Cell-surface display of heterologous epitopes on *Staphylococcus xylosus* as a potential delivery system for oral vaccination. *Gene*. 128, 89-94.

Nguyen T. N., Gourdon M. H., Hansson M., Robert A., Samuelson P., Libon C., Andreoni C., Nygren P. A., Binz H., Uhlen M. & et a. l. (1995). Hydrophobicity engineering to facilitate surface display of heterologous gene products on *Staphylococcus xylosus*. *Journal of Biotechnology*. 42, 207-219.

Nimrat S., Siriboonlamom S., Zhang S., Xu Y. & Vuthiphandchai V. (2006). Chilled storage of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) spermatophores. *Aquaculture*. 261, 944-951.

Novick R. P. & Roth C. (1968). Plasmid-linked resistance to inorganic salts in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*. 95, 1335-1342.

Novick R. (2006). Staphylococcal pathogenesis and pathogenicity factors : genetics and regulation. In *Gram-Positive Pathogens, 2nd Edition*, Eds Vincent A. Fischetti et al., ASM

Press, Washington D.C. pp.496-516.

Nychas G. J. E. & Arkoudelos J. S. (1990). Staphylococci: their role in fermented sausages. *Society for Applied Bacteriology Symposium Series*. 19, 167S-188S.

O

Olesen P. T., Stahnke L. & Talon R. (2004). Effect of ascorbate, nitrate and nitrite on the amount of flavour compounds produced from leucine by *Staphylococcus xylosus* and *Staphylococcus carnosus*. *Meat Science*. 68, 193-200.

Olszewski W. L., Jamal S., Manokaran G., Pani S., Kumaraswami V., Kubicka U., Lukomska B., Tripathi F. M., Swoboda E., Meisel-Mikolajczyk F., Stelmach E. & Zaleska M. (1999). Bacteriological studies of blood, tissue fluid, lymph and lymph nodes in patients with acute dermatolymphangioadenitis (DLA) in course of 'filarial' lymphedema. *Acta Tropica*. 73, 217-224.

Orrett F. A. & Shurland S. M. (1998). Significance of coagulase-negative staphylococci in urinary tract infections in a developing country. *Connecticut Medicine*. 62, 199-203.

P

Perego M., Glaser P., Minutello A., Strauch M. A., Leopold K. & Fischer W. (1995). Incorporation of D-alanine into lipoteichoic acid and wall teichoic acid in *Bacillus subtilis*. Identification of genes and regulation. *Journal of Biological Chemistry*. 270, 15598-15606.

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

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

Pinna A., Zanetti S., Sotgiu M., Sechi L. A., Fadda G. & Carta F. (1999). Identification and antibiotic susceptibility of coagulase negative staphylococci isolated in corneal/external infections. *British Journal of Ophthalmology*. 83, 771-773.

Pioch G., Heyne H. & Witte W. (1988). [Coagulase-negative *Staphylococcus* species in mixed fodder and on grain]. *Zentralblatt für Mikrobiologie*. 143, 157-171.

Planchon S., Gaillard-Martinie B., Dordet-Frisoni E., Bellon-Fontaine M. N., Leroy S., Labadie J., Hebraud M. & Talon R. (2006). Formation of biofilm by *Staphylococcus*

xylosus. *International Journal of Food Microbiology*. 109, 88-96.

Planchon S. (2006). Aptitude de *Staphylococcus carnosus* et *Staphylococcus xylosus* à former des biofilms. Etude d'une souche "biofilm positif" par une approche protéomique, Thèse de Docteur d'Université - Spécialité Sciences des Aliments, option Microbiologie, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand II.

Poolman B., Knol J., van der Does C. , Henderson P. J., Liang W. J., Leblanc G., Pourcher T. & Mus-Veteau I. (1996). Cation and sugar selectivity determinants in a novel family of transport proteins. *Molecular Microbiology*. 19, 911-922.

Postma P. W. & Lengeler J. W. (1985). Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system of bacteria. *Microbiological Reviews*. 49, 232-269.

Postma P. W., Lengeler J. W. & Jacobson G. R. (1993). Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiological Reviews*. 57, 543-594.

Pourmand M. R., Clarke S. R., Schuman R. F., Mond J. J. & Foster S. J. (2006). Identification of antigenic components of *Staphylococcus epidermidis* expressed during human infection. *Infection and Immunity*. 74, 4644-4654.

Poyart C., Lamy M. C., Boumaila C., Fiedler F. & Trieu-Cuot P. (2001). Regulation of D-alanyl-lipoteichoic acid biosynthesis in *Streptococcus agalactiae* involves a novel two-component regulatory system. *Journal of Bacteriology*. 183, 6324-6334.

R

Rabello R. F., Souza C. R., Duarte R. S., Lopes R. M., Teixeira L. M. & Castro A. C. (2005). Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from bovine mastitis in Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Dairy Science*. 88, 3211-3219.

Rantsiou K., Iacumin L., Cantoni C., Comi G. & Cocolin L. (2005). Ecology and characterization by molecular methods of *Staphylococcus* species isolated from fresh sausages. *International Journal of Food Microbiology*. 97, 277-284.

Rebecchi A., Crivori S., Sarra P. G. & Cocconcelli P. S. (1998). Physiological and molecular techniques for the study of bacterial community development in sausage fermentation. *Journal of Applied Microbiology*. 84, 1043-1049.

Reizer J., Sutrina S. L., Saier M. H., Stewart G. C., Peterkofsky A. & Reddy P. (1989). Mechanistic and physiological consequences of HPr(ser) phosphorylation on the activities of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system in gram-positive bacteria: studies with site-specific mutants of HPr. *EMBO Journal*. 8, 2111-2120.

Renner W. A., Jordan M., Eppenberger H. M. & Leist C. (2004). Cell-cell adhesion and aggregation: Influence on the growth behavior of CHO cells. *Biotechnology and*

Bioengineering. 41, 188-193.

Rice K. C., Mann E. E., Endres J. L. , Weiss E. C., Cassat J. E., Smeltzer M. S. & Bayles K. W. (2007). The *cidA* murein hydrolase regulator contributes to DNA release and biofilm development in *Staphylococcus aureus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*. 104, 8113-8118.

Rodriguez M, Nunez F, Cordoba JJ, Sanabria C, Bermudez E & Asensio MA. (1994). Characterization of *Staphylococcus* spp. and *Micrococcus* spp. isolated from Iberian ham throughout the ripening process. *International Journal of Food Microbiology*. 24, 329-335.

Rodriguez M., Nunez F., Cordoba J. J., Bermudez E. & Asensio M. A. (1996). Gram-positive, catalase-positive cocci from dry cured Iberian ham and their enterotoxigenic potential. *Applied and Environmental Microbiology*. 62, 1897-1902.

Rosec J. P., Guiraud J. P., Dalet C. & Richard N. (1997). Enterotoxin production by staphylococci isolated from foods in France. *International Journal of Food Microbiology*. 35, 213-221.

Rosenstein R., Peschel A., Wieland B. & Götz F. (1992). Expression and regulation of the antimonite, arsenite, and arsenate resistance operon of *Staphylococcus xylosus* plasmid pSX267. *Journal of Bacteriology*. 174, 3676-3683.

Rosenstein R., Futter-Bryniok D. & Götz F. (1999). The choline-converting pathway in *Staphylococcus xylosus* C2A: genetic and physiological characterization. *Journal of Bacteriology*. 181, 2273-2278.

Rosenstein R. & Götz F. (2000). Staphylococcal lipases: biochemical and molecular characterization. *Biochimie*. 82, 1005-1014.

Rosenstein R., Nerz C., Resch A. & Götz F. (2005) Comparative genome analyses of staphylococcal species 2nd European Conference on Prokariotic genomes, Prokagen 2005 Göttingen, Germany, 23-26 September.

Russell J. B. (1990). Low-affinity, high-capacity system of glucose transport in the ruminal bacterium *Streptococcus bovis*: evidence for a mechanism of facilitated diffusion. *Applied and Environmental Microbiology*. 56, 3304-3307.

S

Saier M. H. Jr, Chauvaux S., Deutscher J., Reizer J. & Ye J. J. (1995). Protein phosphorylation and regulation of carbon metabolism in gram-negative versus gram-positive bacteria. *Trends in Biochemical Sciences*. 20, 267-271.

Saier M. H. Jr, Chauvaux S., Cook G. M., Deutscher J., Paulsen I. T., Reizer J. & Ye J. J. (1996). Catabolite repression and inducer control in Gram-positive bacteria. *Microbiology*.

142(Pt 2), 217-230.

Sakinc T., Woznowski M., Ebsen M. & Gatermann S. G. (2005). The surface-associated protein of *Staphylococcus saprophyticus* is a lipase. *Infection and Immunity*. 73, 6419-6428.

Samuelson P., Wernerus H., Svedberg M. & Stahl S. (2000). Staphylococcal surface display of metal-binding polyhistidyl peptides. *Applied and Environmental Microbiology*. 66, 1243-1248.

Schleifer K. H. & Kloos W. E. (1975). Isolation and characterization of Staphylococci from human skin. I. Amended descriptions of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus* and descriptions of three new species: *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus xylosus*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 25, 50-61.

Schleifer K. H. & Kroppenstedt R. M. (1990). Chemical and molecular classification of staphylococci. *Society for Applied Bacteriology Symposium Series*. 19, 9S-24S.

Schmiedel D., Kintrup M., Kuster E. & Hillen W. (1997). Regulation of expression, genetic organization and substrate specificity of xylose uptake in *Bacillus megaterium*. *Molecular Microbiology*. 23, 1053-1062.

Schrum L. W. & Hassan H. M. (1993). Transcriptional activation of Mn-superoxide dismutase gene (sodA) of *Escherichia coli* by MnCl₂. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1216, 186-190.

Shale K., Lues J. F. R., Venter P. & Buys E. M. (2005). The distribution of *Staphylococcus* sp. on bovine meat from abattoir deboning rooms. *Food Microbiology*. 22, 433-438.

Shamanna DK. & Sanderson KE. (1979). Genetics and regulation of D-xylose utilization in *Salmonella typhimurium* LT2. *Journal of Bacteriology*. 139, 71-79

Silvanose C. D., Bailey T. A., Naldo J. L. & Howlett J. C. (2001). Bacterial flora of the conjunctiva and nasal cavity in normal and diseased captive bustards. *Avian Diseases*. 45, 447-451.

Simonova M., Stropfova V., Marcinakova M., Laukova A., Vesterlund S., Moratalla M. L., Bover-Cid S. & Vidal-Carou C. (2006). Characterization of *Staphylococcus xylosus* and *Staphylococcus carnosus* isolated from Slovak meat products. *Meat Science*. 73, 559-564.

Siqueira J. F. Jr & Lima K. C. (2002). *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus xylosus* in a secondary root canal infection with persistent symptoms: a case report. *Australian Endodontic Journal* 28, 61-63.

- Sizemore C., Buchner E., Rygus T., Witke C., Götz F. & Hillen W.** (1991). Organization, promoter analysis and transcriptional regulation of the *Staphylococcus xylosus* xylose utilization operon. *Molecular and General Genetics*. 227, 377-384.
- Sizemore C., Wieland B., Götz F. & Hillen W.** (1992). Regulation of *Staphylococcus xylosus* xylose utilization genes at the molecular level. *Journal of Bacteriology*. 174, 3042-3048.
- Skalka B.** (1991). [Occurrence of staphylococcal species in clinically healthy domestic animals]. *Veterinarni Medicina (Praha)*. 36, 9-19.
- Slaughter D. M., Patton T. G., Sievert G., Sobieski R. J. & Crupper S. S.** (2001). Antibiotic resistance in coagulase-negative staphylococci isolated from Cope's gray treefrogs (*Hyla chrysoscelis*). *FEMS Microbiology Letters*. 205, 265-270.
- Smits E., Cifrian E., Guidry A. J., Rainard P., Burvenich C. & Paape M. J.** (1996). Cell culture system for studying bovine neutrophil diapedesis. *Journal of Dairy Science*. 79, 1353-1360.
- Solomon H. F.** (2000). Nasal Dermatitis ("facial eczema" or "Sore nose"). *Laboratory Animal Diagnosis*.
- Sonderegger M., Jeppsson M., Hahn-Hagerdal B. & Sauer U.** (2004). Molecular basis for anaerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae* on xylose, investigated by global gene expression and metabolic flux analysis. *Applied and Environmental Microbiology*. 70, 2307-2317.
- Song S. & Park C.** (1997). Organization and regulation of the D-xylose operons in *Escherichia coli* K-12: XylR acts as a transcriptional activator. *Journal of Bacteriology*. 179, 7025-7032.
- Spatafora G. A., Sheets M., June R., Luyimbazi D., Howard K., Hulbert R., Barnard D., el Janne M. & Hudson M. C.** (1999). Regulated expression of the *Streptococcus mutans* *dlt* genes correlates with intracellular polysaccharide accumulation. *Journal of Bacteriology*. 181, 2363-2372.
- Stahnke L. H.** (1995). Dried sausages fermented with *Staphylococcus xylosus* at different temperatures and with different ingredient levels — Part II. Volatile components. *Meat Science*. 41, 193-209.
- Steinmetz M., Le Coq D., Aymerich S., Gonzy-Treboul G. & Gay P.** (1985). The DNA sequence of the gene for the secreted *Bacillus subtilis* enzyme levansucrase and its genetic control sites. *Molecular and General Genetics*. 200, 220-228.
- Stulke J., Arnaud M., Rapoport G. & Martin-Verstraete I.** (1998). PRD--a protein

domain involved in PTS-dependent induction and carbon catabolite repression of catabolic operons in bacteria. *Molecular Microbiology*. 28, 865-874.

Stulke J. & Hillen W. (2000). Regulation of carbon catabolism in *Bacillus* species. *Annual Reviews of Microbiology*. 54, 849-880 .

Sturgill G., Toutain C. M., Komperda J., O'toole G. A. & Rather P. N. (2004). Role of CysE in production of an extracellular signaling molecule in *Providencia stuartii* and *Escherichia coli*: Loss of *cysE* enhances biofilm formation in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 186, 7610-7617.

T Takahashi T., Satoh I. & Kikuchi N. (1999). Phylogenetic relationships of 38 taxa of the genus *Staphylococcus* based on 16S rRNA gene sequence analysis. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 49(Pt 2), 725-728.

Takeuchi F., Watanabe S., Baba T., Yuzawa H., Ito T., Morimoto Y., Kuroda M., Cui L., Takahashi M., Ankai A., Baba S., Fukui S., Lee J. C. & Hiramatsu K. (2005). Whole-genome sequencing of *Staphylococcus haemolyticus* uncovers the extreme plasticity of its genome and the evolution of human-colonizing staphylococcal species. *Journal of Bacteriology*. 187, 7292-7308.

Talon R., Chastagnac C., Vergnaisn L., Montel M. C. & Berdague J. L. (1998). Production of esters by Staphylococci. *International Journal of Food Microbiology*. 45, 143-150.

Talon R., Walter D., Chartier S., Barričre C. & Montel M. C. (1999). Effect of nitrate and incubation conditions on the production of catalase and nitrate reductase by staphylococci. *International Journal of Food Microbiology*. 52, 47-56.

Talon R., Leroy-Sétrin S. & Fadda S. (2002). Bacterial starters involved in the quality of fermented meat products. In *Research Advances in Quality of Meat and Meat Products*, Eds Fidel Toldrá, Research Signpost pp.175-191.

Talon R., Leroy S. & Fadda S. (2003). Dry Fermented Sausages. In *Handbook of Food and Beverage Fermentation Technology*, Marcel Dekker pp.397-416.

Tendolkar P. M., Baghdayan A. S., Gilmore M. S. & Shankar N. (2004). Enterococcal surface protein, Esp, enhances biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Infection and Immunity*. 72, 6032-6039.

Thedieck K., Hain T., Mohamed W., Tindall B. J., Nimtz M., Chakraborty T., Wehland J. & Jansch L. (2006). The MprF protein is required for lysinylation of phospholipids in listerial membranes and confers resistance to cationic antimicrobial

peptides (CAMPs) on *Listeria monocytogenes*. *Molecular Microbiology*. 62, 1325-1339.

Thornton V. B., Davis J. A., St .Clair M. B. & Cole M. N. (2003). Inoculation of *Staphylococcus xylosus* in SJL/J mice to determine pathogenicity. *Contemporary Topics in Laboratory Animal Science*. 42, 49-52.

Tompkins J. C., Figueroa J. & Steele R. W. (2004). Occult Bacteremia. *Infection in Medicine*. 21, 68-72.

Tormo M. A., Knecht E., Götz F., Lasa I. & Penades J. R. (2005). Bap-dependent biofilm formation by pathogenic species of *Staphylococcus*: evidence of horizontal gene transfer? *Microbiology*. 151, 2465-2475.

Tselenis-Kotsowilis A. D., Koliomichalis M. P. & Papavassiliou J. T. (1982). Acute pyelonephritis caused by *Staphylococcus xylosus*. *Journal of Clinical Microbiology*. 16, 593-594.

U **Ubeda C., Tormo M. A., Cucarella C., Trotonda P., Foster T. J., Lasa I. & Penades J. R.** (2003). Sip, an integrase protein with excision, circularization and integration activities, defines a new family of mobile *Staphylococcus aureus* pathogenicity islands. *Molecular Microbiology*. 49, 193-210.

Udo E. E., Al-Bustan M. A., Jacob L. E. & Chugh T. D. (1999). Enterotoxin production by coagulase-negative staphylococci in restaurant workers from Kuwait City may be a potential cause of food poisoning. *Journal of Medical Microbiology*. 48, 819-823.

Ug A. & Ceylan O. (2003). Occurrence of resistance to antibiotics, metals, and plasmids in clinical strains of *Staphylococcus* spp. *Archives of Medical Research*. 34, 130-136.

V **Valderas M. W. & Hart M. E.** (2001). Identification and characterization of a second superoxide dismutase gene (*sodM*) from *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*. 183, 3399-3407.

Valderas M. W., Gatson J. W., Wreyford N. & Hart M. E. (2002). The superoxide dismutase gene *sodM* is unique to *Staphylococcus aureus*: absence of *sodM* in coagulase-negative staphylococci. *Journal of Bacteriology* . 184, 2465-2472.

Valle J., Gomez-Lucia E., Piriz S., Goyache J., Orden J. A. & Vadillo S. (1990). Enterotoxin production by staphylococci isolated from healthy goats. *Applied and Environmental Microbiology*. 56, 1323-1326.

Valle J., Vadillo S., Piriz S. & Gomez-Lucia E. (1991). Toxic shock syndrome toxin 1 (TSST-1) production by staphylococci isolated from goats and presence of specific

antibodies to TSST-1 in serum and milk. *Applied and Environmental Microbiology*. 57, 889-891.

Vannuffel P., Heusterspreute M., Bouyer M., Vandercam B., Philippe M. & Gala J. L. (1999). Molecular characterization of *femA* from *Staphylococcus hominis* and *Staphylococcus saprophyticus*, and *femA*-based discrimination of staphylococcal species. *Research in Microbiology*. 150, 129-141.

Vernozy-Rozand C., Mazuy C., Prevost G., Lapeyre C., Bes M., Brun Y. & Fleurette J. (1996). Enterotoxin production by coagulase-negative staphylococci isolated from goats' milk and cheese. *International Journal of Food Microbiology*. 30, 271-280.

Vilar I., Garcia Fontan M. C., Prieto B., Tornadijo M. E. & Carballo J. (2000). A survey on the microbiological changes during the manufacture of dry-cured lacón, a Spanish traditional meat product. *Journal of Applied Microbiology*. 89, 1018-1026.

Villard L., Kodjo A., Borges E., Maurin F. & Richard Y. (2000). Ribotyping and rapid identification of *Staphylococcus xylosus* by 16-23S spacer amplification. *FEMS Microbiology Letters*. 185, 83-87.

W **Waage S., Mork T., Roros A., Aasland D., Hunshamar A. & Odegaard S. A.** (1999). Bacteria associated with clinical mastitis in dairy heifers. *Journal of Dairy Science*. 82, 712-719.

Wagner E., Götz F. & Brückner R. (1993). Cloning and characterization of the *scrA* gene encoding the sucrose-specific Enzyme II of the phosphotransferase system from *Staphylococcus xylosus*. *Molecular and General Genetics*. 241, 33-41.

Wagner E., Marcandier S., Egeter O., Deutscher J., Götz F. & Brückner R. (1995). Glucose kinase-dependent catabolite repression in *Staphylococcus xylosus*. *Journal of Bacteriology*. 177, 6144-6152.

Weickert M. J. & Adhya S. (1992). A family of bacterial regulators homologous to Gal and Lac repressors. *Journal of Biological Chemistry*. 267, 15869-15874.

Wells V. D., Munro C. L., Sulavik M. C., Clewell D. B. & Macrina F. L. (1993). Infectivity of a glucan synthesis-defective mutant of *Streptococcus gordonii* (Challis) in a rat endocarditis model. *FEMS Microbiology Letters*. 112, 301-305.

Wernerus H., Lehtio J., Samuelson P. & Stahl S. (2002). Engineering of staphylococcal surfaces for biotechnological applications. *Journal of Biotechnology*. 96, 67-78.

Whitchurch C. B., Tolker-Nielsen T., Ragas P. C. & Mattick J. S. (2002). Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science*. 295, 1487.

Winstanley C. (2002). Spot the difference: applications of subtractive hybridisation to the study of bacterial pathogens. *Journal of Medical Microbiology*. 51, 459-467.

Witte W., Strommenger B. & Werner G. (2006). Diagnostics, Typing, and Taxonomy. In *Gram-Positive Pathogens, 2nd Edition*, Eds Vincent A. Fischetti et al., ASM Press, Washington D.C. pp.371-380.

Won Y. S., Kwon H. J., Oh G. T., Kim B. H., Lee C. H., Park Y. H., Hyun B. H. & Choi Y. K. (2002). Identification of *Staphylococcus xylosus* isolated from C57BL/6J-Nos2(tm1Lau) mice with dermatitis. *Microbiology and Immunology*. 46, 629-632.

Y **Yoshida K. I., Aoyama D., Ishio I., Shibayama T. & Fujita Y.** (1997). Organization and transcription of the myo-inositol operon, *iol*, of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*. 179, 4591-4598.

Z **Zhang Y. Q., Ren S. X., Li H. L., Wang Y. X., Fu G., Yang J., Qin Z. Q., Miao Y. G., Wang W. Y., Chen R. S., Shen Y., Chen Z., Yuan Z. H., Zhao G. P., Qu D., Danchin A. & Wen Y. M.** (2003). Genome-based analysis of virulence genes in a non-biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis* strain (ATCC 12228). *Molecular Microbiology*. 49, 1577-1593.

Ziagova M. & Liakopoulou-Kyriakides M. (2007 in press). Kinetics of 2,4-dichlorophenol and 4-Cl-m-cresol degradation by *Pseudomonas sp.* cultures in the presence of glucose. *Chemosphere*.

Ziagova M., Dimitriadis G., Aslanidou D., Papaioannou X., Litopoulou Tzannetaki E. & Liakopoulou-Kyriakides M. (2007). Comparative study of Cd(II) and Cr(VI) biosorption on *Staphylococcus xylosus* and *Pseudomonas sp.* in single and binary mixtures. *Bioresource Technology*. 98, 2859-2865.

TRAVAUX SCIENTIFIQUES

PUBLICATIONS

- Planchon S., Gaillard-Martinie B., **Dordet-Frisoni E.**, Bellon-Fontaine M.N., Leroy S., Labadie J., Hebraud M., Talon R. Formation of Biofilm by *Staphylococcus xylosus*. *Int J Food Microbiol.* 2006 May 25;109(1-2):88-96
- **Dordet-Frisoni E.**, Talon R., Leroy S. Physical and genetic map of the *Staphylococcus xylosus* C2a chromosome. *FEMS Microbiol Lett.* 2007 Jan; 266(2):184-93
- **Dordet-Frisoni E.**, Géraud Dorchies, Cécilia De Araujo, Talon R., Leroy S. Genomic diversity in *Staphylococcus xylosus* species. *Appl Environ Microbiol* Submitted 2007
- **Dordet-Frisoni E.**, Talon R., Leroy S. Surface migration of *Staphylococcus xylosus* on low-agar media. *Res Microbiol* Submitted 2007

CHAPITRE D'OUVRAGE

- Champomier-Vergès M., CrutzLe Coq A.M., Zagorec M., Leroy S., **Dordet-Frisoni E.**, Planchon S., Talon R. 2007. Genetics of microbial starters. In: Handbook of Fermented Meat and Poultry, Eds F. Toldra, Wai-Kit Nip, J.G. Sebranek, L.H. Stahnke, Expedito-Tadeu F. Silveira and R. Talon and Y.H. Hui. Chapter 17.

COMMUNICATION ORALE

- Leroy-Sétrin S., **Dordet-Frisoni E.**, Fréaux B., Talon R. L'aminotransférase à chaîne latérale ramifiée de *Staphylococcus carnosus* responsable de la première étape du catabolisme de la leucine en composés d'arôme de salaison. 6ème Congrès de la SFM, Bordeaux, mai 2004. Communication orale Leroy-Sétrin S. et affichée, résumé.
- Leroy S., **Dordet-Frisoni E.**, Planchon S., Talon R.. The different facets of *Staphylococcus xylosus*, a bacterium commonly used as meat starter. II International Symposium on Lactic Acid Bacteria, octobre 2006, San Miguel de Tucuman, Argentine. Communication orale Leroy S. (conférencier invité) et résumé.
- V. Zuliani, C. Feurer, A. Romey, C. Guizard, S. Leroy, **E. Frisoni-Dordet**, R. Talon, A. Goubet, M. Daty, F. Baraige, M. Champomier-Vergès, S. Chaillou & M. Zagorec. Interactions entre *Staphylococcus xylosus* et *Lactobacillus sakei* dans une matrice «saucisson» modèle. colloque SFM «Interactions bactériennes dans les environnements agroalimentaires: apport des nouvelles approches». 7 novembre 2006, Paris. Communication orale V. Zuliani et résumé
- **Dordet-Frisoni E.**, Talon R., Leroy S. Les multiples facettes de *Staphylococcus xylosus*. 7ème Congrès de la SFM, mai 2007, Nantes. Communication orale Dordet-Frisoni E. et affichée, résumé.

COMMUNICATION AFFICHÉE

- Leroy-Sétrin S., **Dordet-Frisoni E.**, Frémaux B., Talon R. L'aminotransférase à chaîne latérale ramifiée de *Staphylococcus carnosus* responsable de la première étape du catabolisme de la leucine en composés d'arôme de salaison. 6ème Congrès de la SFM, Bordeaux, mai 2004. Communication orale Leroy-Sétrin S. et affichée, résumé.
- Leroy S., **Dordet-Frisoni E.**, Frémaux B., Talon R. Rôle de l'aminotransférase à chaîne latérale ramifiée de *Staphylococcus carnosus* dans la conversion de la leucine en composés d'arôme de salaison. Colloque Produits Alimentaires Fermiers, octobre 2004, Clermont-Ferrand. Communication affichée et résumé.
- Talon R., Leroy S., **Dordet-Frisoni E.** Projet de séquençage du génome complet de *Staphylococcus xylosus*. Séminaire INRA «Programmes de génomique animale, végétale et des microorganismes», décembre 2004, Paris. Communication affichée et résumé.
- **Dordet-Frisoni E.**, Talon R., Leroy S. Physical and genetic map of *Staphylococcus xylosus* C2a: On the way for sequencing genome. 2ème congrès Prokagen, septembre 2005, Göttingen, Allemagne. Communication affichée et résumé.
- **Dordet-Frisoni E.**, Talon R., Leroy S. Les multiples facettes de *Staphylococcus xylosus*. 7ème Congrès de la SFM, mai 2007, Nantes. Communication orale Dordet-Frisoni E. et affichée, résumé.

DOCUMENTS OU PRESENTATIONS A VOCATION DE TRANSFERT OU RELATIFS A L'ANIMATION DE LA RECHERCHE

- **Dordet-Frisoni E.**, Talon R., Leroy S. Spécificité et diversité de *Staphylococcus xylosus* : carte physique et génétique une première étape Journées de l'École Doctorale, avril 2005, Clermont-Ferrand. Communication orale Dordet-Frisoni E. et résumé.
- **Dordet-Frisoni E.**, Talon R., Leroy S. Carte physique et génétique de *Staphylococcus xylosus* C2a: En route pour le séquençage du génome complet ! Journée des Microbiologistes d'Auvergne, avril 2005, Clermont-Ferrand. Communication orale Dordet-Frisoni E. et résumé.
- Planchon S., Gaillard-Martinie B., **Dordet-Frisoni E.**, Leroy S., Labadie J., Hebraud M., Talon R. Formation de biofilms par les Staphylocoques: étude de *Staphylococcus xylosus* C2a. Journée des Microbiologistes d'Auvergne, avril 2005, Clermont-Ferrand. Communication orale S. Planchon et résumé.
- **Dordet-Frisoni E.**, Talon R., Leroy S. Carte physique et génétique de *Staphylococcus xylosus* C2a : Une première image de l'organisation du génome avant la séquence complète. Rencontre des microbiologistes de l'INRA, juin 2006, Dourdan. Communication affichée et résumé.
- **Dordet-Frisoni E.**, Talon R., Leroy S. Tout ce que vous avez toujours voulu savoir sur *Staphylococcus xylosus* ! Etude de la diversité génétique au sein de l'espèce. Animation

scientifique de l'Unité Microbiologie, février 2007, Saint Genès Champanelle. Communication orale Dordet-Frisoni E.

- **Dordet-Frisoni E.**, Talon R., Leroy S. *Staphylococcus xylosus* : Caractérisation de la diversité au sein de l'espèce Journée des Microbiologistes d'Auvergne, mars 2007, Clermont-Ferrand. Communication orale Dordet-Frisoni E. et résumé.

COMMUNICATION ORALE

L'AMINOTRANSFÉRASE À CHAÎNE LATÉRALE RAMIFIÉE DE *STAPHYLOCOCCUS CARNOSUS* RESPONSABLE DE LA PREMIÈRE ÉTAPE DU CATABOLISME DE LA LEUCINE EN COMPOSÉS D'ARÔME DE SALAISON.

Sabine Leroy-Sétrin, Emilie Frisoni-Dordet, Bastien Frémaux et Régine Talon

INRA, Unité de Recherches sur la Viande, Laboratoire de Microbiologie, 63122 Saint Genès-Champanelle, France.

Les acides aminés à chaîne latérale ramifiée sont des précurseurs de composés d'arôme jouant un rôle important dans le développement de la saveur des saucissons. Chez *Staphylococcus carnosus*, couramment utilisé comme ferment, la première étape de dégradation de la leucine est une transamination. Cette réaction conduit à la production d' α -cétoisocaproate dont la dégradation entraîne essentiellement la synthèse d'acide 3-méthyl butanoïque qui a un fort potentiel aromatique. La souche *S. carnosus* 833 produit de fortes quantités de cet acide. Le gène codant l'aminotransférase à chaîne latérale ramifiée (BcAT) chez cette souche a été identifié. Afin d'évaluer le rôle et l'importance de cette enzyme dans la dégradation de la leucine et la production d'acide 3-méthyl butanoïque, un mutant inactivé au niveau de ce gène et une souche sur-exprimant cette enzyme ont été construits. L'activité aminotransférase de ces souches a été évaluée par un dosage de l'activité enzymatique d'extraits protéiques bruts et par dosage des métabolites par chromatographie liquide à haute performance. Le mutant négatif perd toute activité de transamination vis à vis des trois acides aminés à chaîne latérale ramifiée. BcAT est donc la seule enzyme responsable de la transamination de la leucine, l'isoleucine et la valine chez *S. carnosus* contrairement à ce qui a été observé chez *Lactococcus lactis* où l'aminotransférase des acides aminés aromatiques est capable de transaminer la leucine. La synthèse d' α -cétoisocaproate et de l'acide 3-méthyl butanoïque est fortement inhibée chez la souche mutée. De plus, elle montre un important déficit de croissance sur des milieux non supplémentés en α -cétoisocaproate ou en 1 des α -cétoacides dérivant de l'isoleucine ou de la valine. Ces α -cétoacides jouent un rôle important dans la synthèse des parois ce qui peut expliquer ce phénotype chez la souche mutée. La souche sur-exprimant BcAT possède des activités de transamination de la leucine, l'isoleucine et la valine supérieures à celles de la souche sauvage. L'étude de cette souche nous a permis de montrer que BcAT était également capable de transaminer la méthionine alors que cette activité est quasi nulle chez la souche sauvage. La souche sur-exprimant BcAT synthétise beaucoup plus d' α -cétoisocaproate et d'acide 3-méthyl butanoïque que la souche sauvage. L'activité de BcAT et donc le niveau de synthèse de l' α -cétoisocaproate influencent toute la voie conduisant à la synthèse de molécules aromatiques.

**6ème Congrès de la SFM
mai 2004 Bordeaux, FRANCE**

THE DIFFERENT FACETS OF *STAPHYLOCOCCUS XYLOSUS*, A BACTERIUM COMMONLY USED AS MEAT STARTER

S. Leroy, E. Dordet-Frisoni, S. Planchon, R. Talon

Unité Microbiologie, INRA, Centre Clermont-Theix, F-63122 Saint Genès-Champanelle, France

Staphylococcus xylosus belongs to the coagulase-negative group of staphylococci. It is used as starter culture in the manufacture of sausages and cheese products. It ensures colour development and contributes to typical aroma, mainly by modulating the level and nature of volatile products of lipid oxidation and by degrading branched-chain amino acids. *S. xylosus* is a ubiquitous bacterium which was first isolated from human skin. It is frequently isolated in meat, milk, naturally fermented products and food processing environments. Most *S. xylosus* strains are able to form biofilm. This capacity could explain the presence of this species in food processing plants. Historically, *S. xylosus* was first defined as a non pathogenic bacterium. However, it shows a certain degree of diversity since some strains have been described as involved in opportunistic animal infections like mastitis or dermatitis and in rare opportunistic human infections. Despite the significance of *S. xylosus* as a starter culture and its occurrence in the food environment, there is little information on its genetic content. To understand and characterize the different facets of this species, the whole genome of the *S. xylosus* strain C2a is being sequenced. The physical and genetic map of the chromosome of this strain was established. Moreover this strain was characterized by a proteomic approach for identification of cell wall and membrane proteins that could be implicated in biofilm formation. A genomic subtractive hybridisation procedure was used to isolate DNA fragments that might be good candidates to explore the diversity of the *S. xylosus* species.

II International Symposium on Lactic Acid Bacteria
octobre 2006, San Miguel de Tucuman, Argentine

INTERACTIONS ENTRE *STAPHYLOCOCCUS XYLOSUS* ET *LACTOBACILLUS SAKEI* DANS UNE MATRICE SAUCISSON MODÈLE

V. Zuliani¹, C. Feurer¹, A. Romey¹, C. Guizard¹, S. Leroy², E. Frisoni-Dordet², R. Talon², A. Goubet³, M. Daty³, F. Baraige³, M. Champomier-Vergès³, S. Chaillou³ & M. Zagorec³

-1 Institut de la Filière Porcine, Pôle viandes fraîches et produits transformés, 7 avenue du Général de Gaulle, 94700 Maisons-Alfort, France

-2 Unité de Recherche Microbiologie, INRA, Site de Theix, 63122 Saint Genes Champanelle, France

-3 Unité Flore Lactique et Environnement Carné, INRA, Domaine de Vilvert, 78350, Jouy en Josas, France

Les produits carnés fermentés tels que le saucisson sec doivent leurs qualités organoleptiques principalement à deux microorganismes : *Staphylococcus xylosum*, essentiellement associé au développement de l'arôme typique des produits de salaison, et *Lactobacillus sakei* responsable de la production d'acide lactique qui intervient dans la texture et la qualité microbiologique du produit. Les mécanismes mis en jeu par ces deux espèces bactériennes pour contribuer à des produits de qualités sont partiellement connus. Cependant, la plupart des informations ont été obtenues à partir de cultures pures, et souvent réalisées en conditions de laboratoire.

La viande, matière première pour la fabrication de saucissons est naturellement contaminée. De plus la structure physique de la matrice carnée (matrice solide, hétérogène) rend les expérimentations difficiles. Le génome d'une souche modèle de *L. sakei* a été entièrement séquencé (Chaillou *et al*, 2005) et celui de *S. xylosum* C2A est en cours de finition. Les informations révélées par la séquence des génomes permettent de mieux comprendre l'adaptation de ces bactéries à la matrice carnée et de mieux cibler les fonctions potentielles qu'elles expriment. En outre la connaissance de ces séquences génomiques permet maintenant d'aborder l'étude du comportement de ces deux espèces par des approches transcriptomique et protéomique.

Dans le cadre du projet ANR Géoferment, une matrice carnée modèle paucimicrobienne a été développée et standardisée. Elle permet de suivre le développement de *L. sakei* et *S. xylosum* et l'évolution des caractéristiques physico-chimiques de la matrice (a_w pH..). Des protocoles standardisés sont en cours de mise au point pour la purification des ARNs et protéines microbiens. Les comportements de *L. sakei* et *S. xylosum* en culture pure et en co-culture, en conditions de laboratoire et dans ces matrices modèles seront comparés. Cette étude permettra de mettre en évidence quelles sont les fonctions exprimées par ces deux espèces lors de la fermentation des saucissons et de connaître les interactions qui existent entre ces deux bactéries. Les résultats obtenus permettront une meilleure maîtrise de ces deux espèces qui contribuent toutes deux à la qualité des produits carnés fermentés mais sont en compétition pour se développer sur ce substrat.

S. Chaillou, M. Champomier-Vergès, M. Cornet, A.-M. Crutz Le Coq, A.-M. Duzet, V. Martin, S. Beaufils, R. Bossy, E. Darbon-Rongère, V. Loux & M. Zagorec. **2005**. Complete genome sequence of the meat-born lactic acid bacterium *Lactobacillus sakei* 23K. Nature Biotechnol., **23**:1527-1533.

**Colloque SFM « Interactions bactériennes dans les environnements agroalimentaires:
apport des nouvelles approches »**

7 novembre 2006, Paris, FRANCE

LES MULTIPLES FACETTES DE *STAPHYLOCOCCUS XYLOSUS*

Dordet Frisoni E., Talon R, Leroy S.

INRA, Centre de recherche Clermont-Ferrand Theix, Unité Microbiologie, 63122 Saint-Genès Champanelle, France

Staphylococcus xylosus est une bactérie Gram positive riche en AT commensale de la peau de l'homme et des animaux. Cette bactérie est utilisée comme ferment pour les produits carnés et laitiers dans lesquels elle joue un rôle majeur dans le développement de la couleur et de la saveur. Elle est souvent mentionnée comme espèce dominante dans les ateliers agroalimentaires. Sa capacité à former des biofilms sur des surfaces abiotiques pourrait expliquer sa persistance dans ces environnements. *S. xylosus* est historiquement une espèce reconnue comme non pathogène. Son utilisation comme microorganisme à Gram-positif recombinant pour le développement d'un vaccin oral a même été envisagée. Cependant, au sein de cette espèce, il existe une très grande diversité des souches : certaines sont impliquées dans des pathologies animales telles que des mammites ou des dermatites, d'autres isolées de lait et de jambon cru produisent des entérotoxines C, D ou E pouvant présenter un risque de pathogénicité. Quelques rares cas d'infections opportunistes humaines dues à *S. xylosus* ont également été rapportés.

Afin de mieux appréhender les différentes facettes de l'espèce *S. xylosus*, des études par électrophorèse en champ pulsé (PFGE) et d'Hybridation Soustractive et Suppressive (SSH) ont été réalisées. Pour ces études, la souche *S. xylosus* C2a a été utilisée comme souche de référence. Cette souche est commensale de la peau et le séquençage de son chromosome vient d'être achevé par notre équipe en collaboration avec le Génoscope et les Unités FLEC et MIG de l'INRA de Jouy-en-Josas. Une vingtaine de souches de *S. xylosus* comprenant des souches « ferments » et des souches isolées de pathologies animales a été étudiée par PFGE après macrorestriction génomique avec les enzymes *SmaI* et *I-CeuI*. Une très grande diversité des profils génétiques au sein de l'espèce *S. xylosus* a été observée ainsi qu'une différence de taille de génome de l'ordre de 11%.

La SSH permet de rechercher et d'isoler des régions du génome présentes chez une souche (cible) mais absentes chez une autre souche (soustracteur). Le chromosome de *S. xylosus* C2a a donc été soustrait aux chromosomes de 3 souches cibles de *S. xylosus*: une souche utilisée comme ferment (S04002), une souche isolée de mammité de vache (S04009) et une souche responsable de dermatite chez la souris (00-1747). Après la soustraction, trois banques contenant 192, 384 et 320 clones ont été obtenues, respectivement. Tous les fragments spécifiques des souches *S. xylosus* S04002, S04009 et 1747-47 ont été séquencés et 42, 48 et 44 fragments uniques ont été identifiés. Ces fragments d'ADN spécifiques correspondent à des gènes du métabolisme (catabolisme des hydrates de carbone, des acides aminés, synthèse de vitamines), des transporteurs (type ABC, perméase), des gènes de régulation (type LysR, BglG) ou encore des gènes de réponse au stress (osmoprotection, résistance aux antibiotiques, à l'arsenic). Les souches isolées de mammité (S04009) et de dermatite (1747-47) comprennent également de nombreux phages ainsi que des séquences d'insertion (IS) démontrant l'existence de transferts horizontaux. La localisation de ces fragments sur les chromosomes des souches cibles a montré la présence d'une zone privilégiée d'insertion de gènes. Cette zone est proche de l'origine de réplication (*oriC*) et correspondrait à une région de spéciation chez les staphylocoques.

Etude financée par l'Agence Nationale de la Recherche, Contrat ANR-05-PNRA-020-05, projet : « Compréhension du fonctionnement des espèces microbiennes cibles des matrices alimentaires et origine de leur diversité génétique »

**7ème Congrès de la SFM
mai 2007, Nantes, FRANCE**

COMMUNICATION AFFICHEE

6ème Congrès de la SFM mai 2004, Bordeaux, FRANCE

Colloque Produits Alimentaires Fermiers, octobre 2004, Clermont-Ferrand, FRANCE



Institut National de la Recherche Agronomique

Sabine Leroy-Sétrin
Emilie Frisoni-Dordet
Bastien Frémanx
Régine Talon
INRA-Théix
SRV - Microbiologie
63122 Saint-Genis-Champagnelle, France
email: sleroy@clermont.inra.fr

Conclusion

Staphylococcus carnosus possède un seul gène codant une aminotransférase à chaîne latérale ramifiée (BeAT). *bcAT* code une protéine de 359 acides aminés présentant 58% d'identité avec la BeAT de *Bacillus subtilis* et 40% avec celle de *Lactococcus lactis*. BeAT est chez *S. carnosus* la seule enzyme responsable de la transamination des acides aminés à chaîne latérale ramifiée contrairement à ce qui est décrit chez *L. lactis*. La synthèse d' α -cétosocaproate et d'acide 3-méthyl butanoïque est fortement inhibée chez le mutant *bcAT*-négatif. Ce mutant montre un important déficit de croissance dans des milieux de culture carencés en un des trois acides aminés à chaîne latérale ramifiée ou non-supplémentés en un des 3 α -cétocidoacides correspondants. Les α -cétocidoacides entrent dans la voie de synthèse des acides gras à chaîne latérale qui sont incorporés dans les membranes ce qui peut expliquer ce déficit de croissance. L'activité de la BeAT de *S. carnosus* influence toute la voie conduisant à la synthèse de molécules aromatiques via les acides aminés à chaîne latérale ramifiée et la voie permettant la synthèse des constituants membranaires via les α -cétocidoacides.

L'aminotransférase à chaîne latérale ramifiée de *Staphylococcus carnosus* responsable de la première étape du catabolisme de la leucine en composés d'arôme de salaison



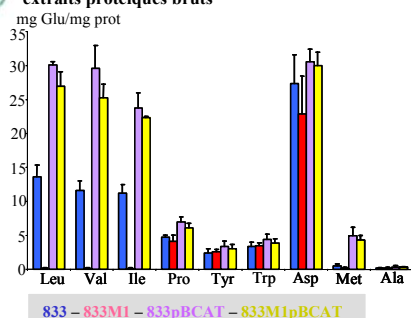
Objectif

Staphylococcus carnosus est couramment utilisé comme ferment dans la fabrication du saucisson sec. Il contribue au développement de la faveur en influençant la composition en composés aromatiques. Parmi ces composés, l'acide 3-méthyl butanoïque et le 3-méthyl butanal issus de la dégradation de la leucine confèrent des notes animales et des odeurs de malt et de cacao au saucisson. La première étape de dégradation de la leucine est une transamination qui conduit à la production d' α -cétosocaproate dont la dégradation aboutit à la production des molécules aromatiques.

La transamination est catalysée par une aminotransférase (BeAT) spécifique des acides aminés à chaîne latérale ramifiée : leucine, isoleucine et valine. Afin d'évaluer le rôle de cette enzyme, la souche *S. carnosus* 833, le mutant *bcAT*-négatif, 833M1, le mutant complémenté avec un plasmide portant le gène *bcAT* (pBCAT), 833M1pBCAT et la souche sauvage transformée avec pBCAT, 833pBCAT ont été caractérisés.

Résultats

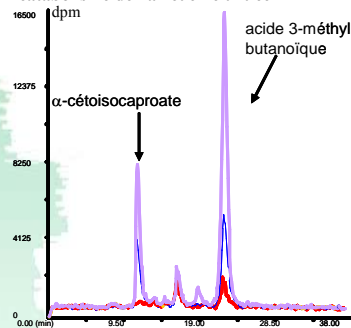
Dosage des activités aminotransférases des extraits protéiques bruts



833 – 833M1 – 833pBCAT – 833M1pBCAT

Le mutant *bcAT*-négatif 833M1 n'a plus aucune activité de transamination vis-à-vis de la leucine, valine, isoleucine. Le mutant complémenté et la souche 833 hébergeant pBCAT ont des activités de transamination de ces acides aminés et de la méthionine supérieures à celles de la souche 833.

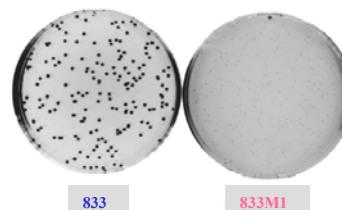
Dosage par chromatographie liquide haute performance des métabolites issus du catabolisme de la leucine tritiée



833 – 833M1 – 833pBCAT

Le mutant *bcAT*-négatif 833M1 ne synthétise ni α -cétosocaproate ni acide 3-méthyl butanoïque. La souche 833 hébergeant pBCAT produit 2 fois plus d' α -cétosocaproate et 3 fois plus d'acide 3-méthyl butanoïque que la souche 833.

Croissance de la souche sauvage 833 et du mutant 833M1 sur une gélose riche Peptone-Extrait de levure

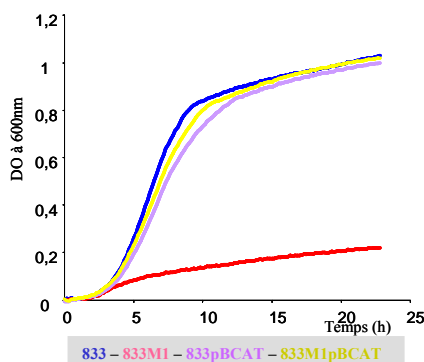


833

833M1

Le mutant *bcAT*-négatif forme des micro-colonies sur une gélose riche. La supplémentation de ce milieu avec au moins un des 3 α -cétocidoacides dérivant de la leucine, valine ou isoleucine restaure une croissance normale.

Croissance des différentes souches en milieu chimiquement défini sans leucine, valine, isoleucine



833 – 833M1 – 833pBCAT – 833M1pBCAT

La croissance du mutant *bcAT*-négatif est fortement inhibée dans un milieu chimiquement défini carencé en leucine, valine et isoleucine. La supplémentation de ce milieu avec un ou deux de ces acides aminés et/ou les 3 α -cétocidoacides correspondants ne restaure pas la croissance du mutant.

Séminaire INRA «Programmes de génomique animale, végétale et des microorganismes», décembre 2004, Paris, FRANCE



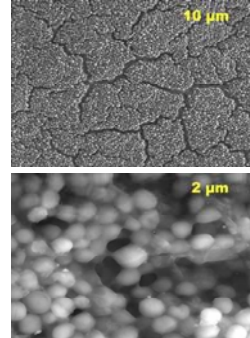
Projet de séquençage du génome complet de *Staphylococcus xylosus*

Régine Talon
Sabine Leroy
Emilie Dordet-Frisoni
SRV - Microbiologie
INRA-Theix
Département MICA
63122 Saint-Genès
Champanelle, France
talon@clermont.inra.fr

Pourquoi *Staphylococcus xylosus*?

- Coque à Gram positif, riche en AT
- Flore commensale cutanée de l'homme et des animaux
- Ferments pour salaison et fromage
 - Rôle majeur dans la flaveur et la couleur
- Souches pathogènes / pathogènes opportunistes
 - Infections nosocomiales
 - Mammites (bovins, caprins, ovins)
 - Dermite de souris
 - Production d'entérotoxines (C, D, E)
 - Résistance aux antibiotiques
- Capacité à coloniser l'environnement (biofilm)

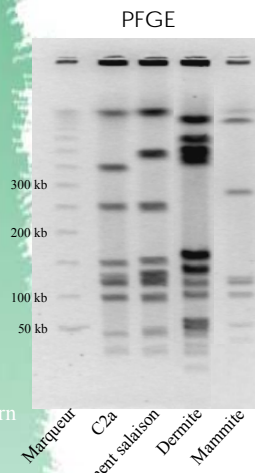
Biofilm 2 jours de *S. xylosus*
microscopie environnementale



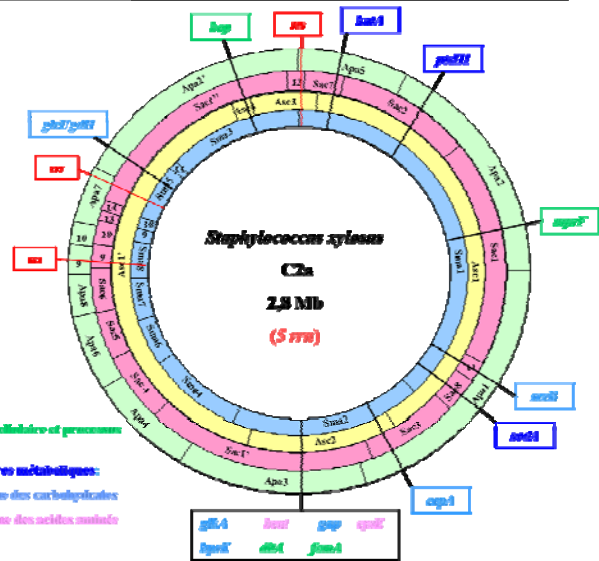
Objectif

- Spécificité *S. xylosus*
- Gènes biofilm
- Gènes adaptation, survie environnements alimentaires
- Diversité des souches
- Innocuité des souches : éléments mobiles

Diversité des souches



Carte physique et génétique



Financement

AIP, INRA

Partenariat

- Génoscope, 2005
- Unité MIG
- Unité FLEC
- INRA, Jouy-en-Josas
- Université Kaiserslautern

Comité de pilotage

- Unité BASE (INRA, Tours)
- Unité GDPD (UMR INRA-Université Bordeaux)

Caractéristiques des génomes de *S. aureus* - *S. epidermidis*

	<i>S. aureus</i> N 135	<i>S. aureus</i> M u 50	<i>S. epidermidis</i> A T C C 12228
Chromosome			
Taille (pb)	2 814 816	2 878 084	2 499 279
G + C %	32,8 %	32,9 %	32,10 %
Region codante	2 595	2 697	2 419
ARNs			
16S	5	5	5
23S	5	5	5
5S	6	6	6
ARN de transfert	62	60	60
Séquence d'insertion			
IS 1181	8	10	0
IS 431	2	2	0
IS 1272	1	1	30
Autres	10	11	28
Ilots de pathogénicité	3	3	0

2ème congrès Prokagen, septembre 2005, Göttingen, Allemagne

Physical and genetic map of *Staphylococcus xylosus* C2a: On the way for sequencing genome

INRA
 Centre de Recherche pour l'Élevage et la Santé Animale
 UR370, Microbiologie
 INRA-Theix
 63122 Saint-Genès Champanelle
 FRANCE
 sleroy@clermont.inra.fr

The physical map of *S.xylosus* C2a was constructed by pulse field gel electrophoresis after digestion with *Apa*I, *Asc*I, *I-Ceu*I, *Sma*I and *Sfi*I. 35 restriction fragments were obtained. The size of the chromosome was estimated to be 2850 kb. Five *rrn* clusters were present in a region representing about 50% of the genome. Four of them are grouped on a region representing 10% of the genome. Genetic map was obtained by Southern hybridization and 23 genes or gene clusters were positioned on the map. Three co-localizations of genes were observed of which some are also found in other sequenced *Staphylococcus* genomes. However the physical and genetic map of *S. xylosus* leads us to suppose a genome specificity of this species.

Sequencing of the *S. xylosus* C2a genome is in progress in collaboration with the Genoscope.

<http://www.genoscope.cns.fr/externe/English/Projets/index.html>

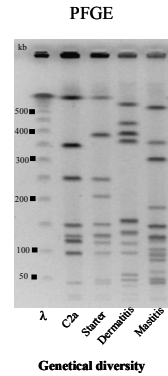
The genome is being sequenced at 12X coverage using three libraries:
 ✓ 15,000 inserts of 3 kb cloned in the pcdna2.1 vector
 ✓ 7,500 inserts of 10 kb cloned in the pCNS vector
 ✓ 2300 inserts of 20-25 kb cloned in a miniBAC vector (pBBC).

Staphylococcus xylosus

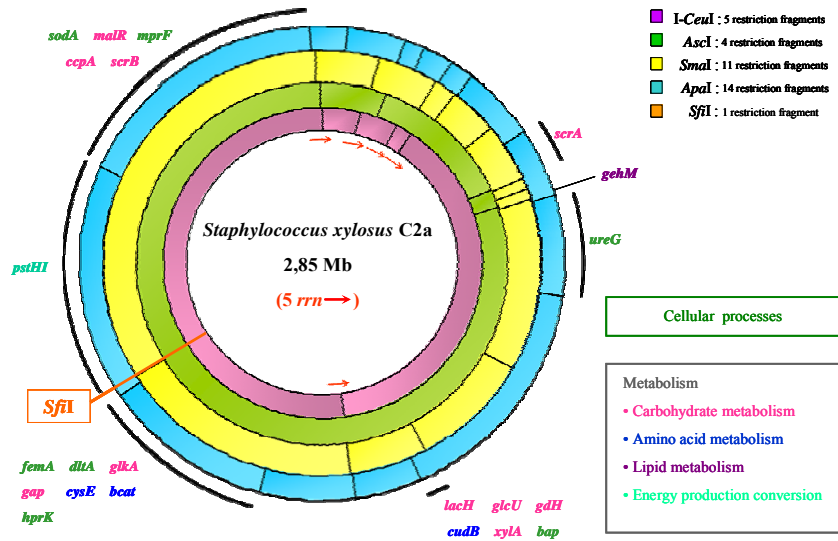
Staphylococcus xylosus is a commensal Gram positive bacteria with low GC%. It is a coagulase negative staphylococci isolated currently in food and food processing environment. It is used as a starter for meat and dairy products because of its aromatic, antioxidant and colour properties.

Historically this species has been defined as a non pathogenic bacterium. However an important diversity is demonstrated within this species and some strains are involved in animal infections like mastitis or dermatitis. Some strains isolated from food can produce enterotoxin C, D or E. Antibiotic multiresistance of some *S. xylosus* has been also reported and most of strains have the capacity to form biofilm.

To better understand the diversity within this species the genome of the reference strain *S. xylosus* C2a is being sequenced. The physical and genetic map of this organism has been constructed to help the genome assembling and compared to other *Staphylococcus* genomes.

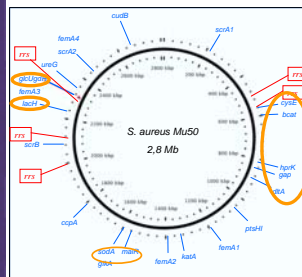


Physical and genetic map

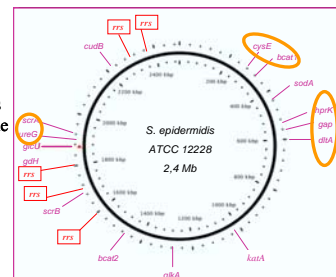


Preliminary comparison with other staphylococci


Sequenced staphylococci contain 5 to 6 ribosomal RNA operons. Three of them are usually located in a genomic area representing less of 20% of the genome.



Co-localizations of genes found in *S. xylosus* genome and present in other *Staphylococcus* genomes



7ème Congrès de la SFM, mai 2007, Nantes, FRANCE



Centre de recherche
Clermont-Ferrand Theix
UR454 Microbiologie

Emilie Dordet-Frisoni
Régine Talon
Sabine Leroy
Equipe Qualité et Sécurité des Aliments
63122 Saint-Genès Champanelle
FRANCE
sleroy@clermont.inra.fr

Trois banques de soustraction ont été constituées contenant au total 122 fragments cibles-spécifiques. Après analyse, 149 ORFs (« open reading frames ») ont été identifiées dont la majorité était des protéines du métabolisme.

La distribution des 122 fragments cibles-spécifiques chez une vingtaine de souches de *S. xylosus* a été recherchée. L'analyse de cette distribution nous a permis de distinguer deux grands groupes de souches. Le groupe I comprend uniquement des souches isolées d'infections opportunistes. Ces souches ont en commun 8 fragments d'ADN cibles-spécifiques. Le groupe II contient toutes les souches utilisées comme ferment et des souches isolées de mammite, soit 18 souches. Ce groupe diffère du groupe I notamment par le polymorphisme de la séquence du régulateur *agrC*. Au sein du groupe II, deux sous-groupes se distinguent, le sous-groupe IIa très hétérogène où aucun fragment n'est retrouvé commun à toutes les souches et le sous-groupe IIb plus homogène. Ce dernier est constitué d'une grande partie des souches utilisées comme ferment. Ces souches ont de nombreux fragments cibles-spécifiques en commun, notamment des ORFs impliqués dans le métabolisme fermentatif ou le catabolisme du myo-inositol. Ces fragments spécifiques pourront être utilisés ultérieurement pour des études épidémiologiques.

Les fragments cibles spécifiques ont été positionnés sur les chromosomes des souches cibles correspondantes. Chez les trois souches cibles, la grande partie des fragments est localisée dans un fragment *SmaI* de 300 à 400 kb qui correspond à la région de l'origine de réplication (*oriC*). Cette zone d'insertion privilégiée correspond chez les staphylocoques à une zone de spéciation. Chez *S. xylosus*, elle est également une région souche-spécifique et le site de nouvelles acquisitions génétiques importantes pour l'adaptation de l'espèce.

La première séquence complète d'un génome d'une souche de *S. xylosus* sera bientôt disponible. En effet, le séquençage du génome de la souche *S. xylosus* C2a a été réalisé par notre équipe en collaboration avec le Génoscope et les unités INRA FLEC et MIG (Jouy-en Josas). Il est actuellement en cours d'annotation.

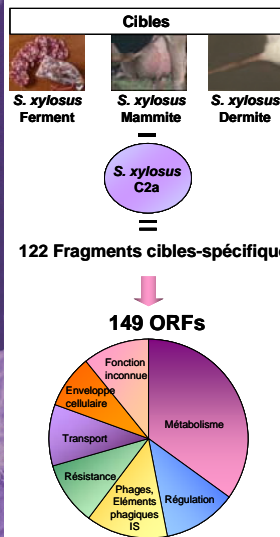
<http://www.genoscope.cns.fr/>

Les multiples facettes de *Staphylococcus xylosus*

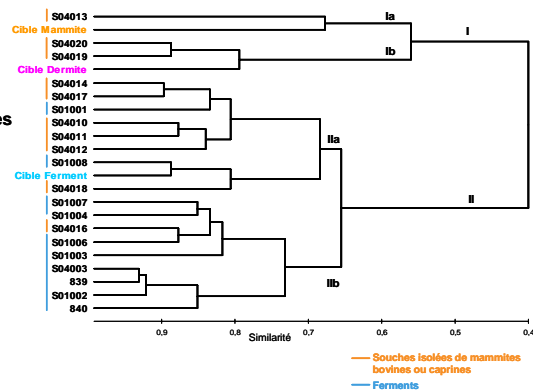
Staphylococcus xylosus appartient au vaste groupe des staphylocoques à coagulase négative. C'est une bactérie commensale de la peau et des muqueuses de l'homme et des animaux. Elle est utilisée comme ferment pour les produits carnés et laitiers, jouant un rôle majeur dans le développement de la couleur et de la flaveur des produits fermentés. Elle est souvent mentionnée comme espèce dominante dans les ateliers agroalimentaires. Sa capacité à former des biofilms sur des surfaces abiotiques pourrait expliquer sa persistance dans ces environnements. Au sein de cette espèce, il existe une très grande diversité des souches tant phénotypique que génotypique. Si *S. xylosus* est virtuellement une espèce reconnue comme non pathogène, quelques souches pourraient présenter un risque potentiel. Certaines sont impliquées dans des pathologies animales telles que des mammites ou des dermatites, d'autres isolées d'aliments produisent des entérotoxines. Quelques rares cas d'infections opportunistes humaines dues à *S. xylosus* ont également été rapportés.

Afin de mieux comprendre la versatilité de l'espèce *S. xylosus*, une approche par Hybridation Soustractive et Suppressive (SSH) a été menée. Trois souches cibles représentant au mieux la diversité, à la fois écologique et génétique, de *S. xylosus* ont été sélectionnées : S04002 une souche utilisée comme ferment, S04009 une souche isolée de mammite bovine et 00-1747 une souche responsable de dermatite murine. Le génome de la souche modèle *S. xylosus* C2a, commensale de la peau humaine, a été soustrait au génome de chacune des trois souches cibles permettant la construction de trois banques de soustraction. Nous avons évalué la distribution des fragments souches-spécifiques sur 20 autres souches de *S. xylosus*. La localisation de ces fragments sur le génome de *S. xylosus* a été déterminée.

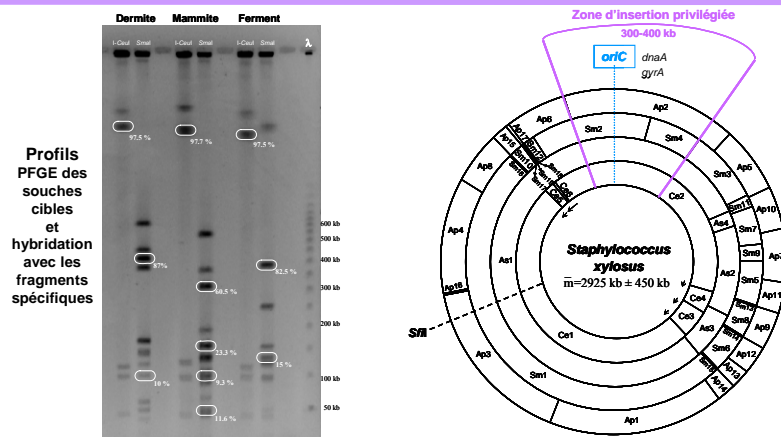
Identification et distribution des fragments cibles-spécifiques



Distribution au sein de l'espèce *S. xylosus*



Localisation des fragments sur le chromosome



Étude financée par l'ANR, projet « Genoferment » ANR-05-PNRA-020

**DOCUMENTS OU PRESENTATIONS A VOCATION DE TRANSFERT
OU RELATIFS A L'ANIMATION DE LA RECHERCHE****SPECIFICITE ET DIVERSITE DE *STAPHYLOCOCCUS XYLOSUS* : CARTE PHYSIQUE ET GENETIQUE UNE PREMIERE ETAPE**

Dordet Frisoni E. ; Leroy S. ; Talon R.

Staphylococcus xylosus est une bactérie Gram positive riche en AT commensale de la peau de l'homme et des animaux. *S. xylosus* est utilisé comme ferment pour les produits carnés et laitiers. Il est souvent mentionné comme espèce dominante dans les ateliers agroalimentaires et joue un rôle majeur dans le développement de la couleur et de la saveur des produits fermentés. Ainsi, *S. xylosus* a essentiellement été étudié pour ses activités métaboliques. Cependant, au sein de cette espèce, il existe une très grande diversité des souches : certaines souches isolées de lait et de jambon cru produisent des entérotoxines D, C ou E et peuvent présenter un risque de pathogénicité. D'autres souches de *S. xylosus* sont pathogènes pour l'animal. De plus en plus de souches de *S. xylosus* sont résistantes aux antibiotiques. Ce microorganisme très utilisé en agroalimentaire est de plus en plus associé à des pathologies impliquant des staphylocoques à coagulase négative. Le génome de la souche *Staphylococcus xylosus* C2a va être séquencé courant 2005. Pour préparer ce projet et faciliter l'étape d'assemblage, la carte physique et génétique de cette souche a été établie. La taille du chromosome de *S. xylosus* C2a a été estimée à 2,8 Mb et 5 opérons *rrn* sont présents sur son génome. La carte physique a été construite par PFGE et 46 sites de restriction obtenus avec les enzymes *SmaI*, *AscI*, *SfiI*, *SacII*, *ApaI* et *IceI* ont été positionnés. Pour la carte génétique, 23 gènes correspondant essentiellement à des gènes du métabolisme ont été localisés. Cette carte nous a permis de visualiser l'organisation globale du génome de *S. xylosus* C2a et de la comparer avec celle de *S. aureus* et *S. epidermidis*. Le séquençage de *S. xylosus* C2a permettra de déterminer le % du génome conservé entre les différentes espèces de staphylocoques séquencées et d'établir la spécificité de *S. xylosus*. Parallèlement la diversité au sein de l'espèce *S. xylosus* sera déterminée par hybridation soustractive. La souche *S. xylosus* C2a sera comparée avec plusieurs souches : une souche utilisée comme ferment industriel, une souche isolée de mammite de vache et une souche responsable de dermite chez la souris.

Journées de l'Ecole Doctorale, avril 2005, Clermont-Ferrand, France

CARTE PHYSIQUE ET GENETIQUE DE *STAPHYLOCOCCUS XYLOSUS* C2A : EN ROUTE POUR LE SEQUENÇAGE DU GENOME COMPLET !

Dordet Frisoni E., Leroy S., Talon R.

Unité INRA UR370 Microbiologie, CR de Clermont-Ferrand Theix, 63122 Saint-Genès Champanelle

Staphylococcus xylosus est une bactérie Gram positive riche en AT commensale de la peau de l'homme et des animaux. Utilisée comme ferment pour les produits carnés et laitiers, elle est souvent mentionnée comme espèce dominante dans les ateliers agroalimentaires. Au sein de cette espèce, il existe une très grande diversité des souches : certaines isolées de lait et de jambon cru produisent des entérotoxines D, C ou E et peuvent présenter un risque de pathogénicité. De plus en plus de souches de *S. xylosus* sont associées à des pathologies impliquant des staphylocoques à coagulase négative et sont décrites comme résistantes aux antibiotiques. Le génome de la souche *Staphylococcus xylosus* C2a va être séquencé en 2005. Sa carte physique et génétique a été établie. La taille du chromosome de *S. xylosus* est estimée à 2,8 Mb et 5 opérons *rrn* sont présents sur son génome. 46 sites de restriction obtenus avec *Sma*I, *Asc*I, *Sfi*I, *Sac*II, *Apa*I et *Ice*uI sont positionnés et 23 gènes sont localisés. Le séquençage de *S. xylosus* C2a permettra de déterminer le % du génome conservé entre les différentes espèces de staphylocoques séquencés et d'établir la spécificité de *S. xylosus*. Par une approche de génomique globale notre objectif sera d'identifier les gènes impliqués dans la formation de biofilm, l'adaptation et la survie dans différents environnements agroalimentaires, de comprendre la fonction des produits de ces gènes et d'élucider à quels contrôles ils sont soumis.

Journée des Microbiologistes d'Auvergne, avril 2005, Clermont-Ferrand, France

CARTE PHYSIQUE ET GENETIQUE DE *Staphylococcus xylosus* C2a : UNE PREMIERE IMAGE DE L'ORGANISATION DU GENOME AVANT LA SEQUENCE COMPLETE ...

Dordet-Frisoni E., Talon R., Leroy S.

UR 454 Microbiologie, Equipe QuaSA, CR de Clermont-Ferrand Theix 63122 Saint Genès-Champanelle

Staphylococcus xylosus est une bactérie Gram positive riche en AT appartenant au groupe des Firmicutes. Elle est commensale de la peau des mammifères. *S. xylosus* est couramment utilisé pour la fermentation des produits carnés et laitiers. Il joue un rôle majeur dans le développement de la couleur et de la flaveur des produits fermentés et est souvent mentionné comme espèce dominante dans les ateliers agroalimentaires. *S. xylosus* a la capacité de former des biofilms sur des surfaces abiotiques ce qui pourrait expliquer sa présence dans les ateliers de production. Au sein de cette espèce, il existe une grande diversité. Certaines souches sont impliquées dans des pathologies animales telles que des mammites ou des dermites. D'autres isolées de lait, de fromages, de produits carnés ou de peau de chèvre produisent des entérotoxines D, C et E, ou arborent les gènes codant ces entérotoxines. Quelques rares cas d'infections opportunistes humaines dues à *S. xylosus* ont également été rapportés. De plus en plus de souches sont décrites comme multi-résistantes aux antibiotiques. Ainsi au sein de l'espèce *S. xylosus*, certaines souches peuvent être utilisées comme ferment et d'autres peuvent présenter un risque. Le séquençage aléatoire global du génome de la souche *Staphylococcus xylosus* C2a a été réalisé courant 2005 en collaboration avec le Génoscope. Pour préparer cet ambitieux projet et faciliter l'étape d'assemblage, la carte physique et génétique de la souche C2a, commensale de la peau, a été établie. La carte physique a été construite par macrorestriction, PFGE et PFGE 2D. La taille du chromosome circulaire de *S. xylosus* C2a a été estimée à 2868 ± 10 kb. Le chromosome contient six copies d'opéron ribosomal. Les opérons *rrn* ont été positionnés et orientés. Quarante sept fragments de restriction obtenus avec les enzymes *ApaI*, *AscI*, *IceuI*, *SfiI* et *SmaI* ont été ordonnés. Trente trois marqueurs génétiques ont été localisés dont 11 gènes nouvellement décrits chez cette espèce. L'origine de replication du chromosome a pu être estimée par la localisation des gènes *gyrA* et *dnaA*.

La taille du chromosome de *S. xylosus* C2a est comparable à celle des autres staphylocoques (2499-2903 kb). L'analyse comparative de la carte génétique de *S. xylosus* C2a avec les génomes complets séquencés de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* et *S. saprophyticus* montre que l'organisation globale du génome de *S. xylosus* est proche de celle de *S. saprophyticus* en dépit d'une différence de taille de de l'ordre de 350 kb. Les étapes de finition et d'annotation du génome de *S. xylosus* C2a sont en cours. La séquence complète du génome permettra d'établir les bases génétiques des propriétés spécifiques de cette espèce. Elle permettra également d'identifier les bases génétiques de l'adaptation de cette bactérie à l'environnement agroalimentaire. L'étude de ce génome nous permettra d'appréhender les différences entre les souches d'intérêt agronomique et les souches potentiellement à risque.

Rencontre des microbiologistes de l'INRA, juin 2006, Dourdan, France

STAPHYLOCOCCUS XYLOSUS : CARACTERISATION DE LA DIVERSITE AU SEIN DE L'ESPECE

Dordet Frisoni E., Talon R, Leroy S.

INRA, CR Clermont-Ferrand Theix, UR Microbiologie, Qualité et Sécurité des Aliments, 63122 Saint-Genès Champanelle, France

Staphylococcus xylosus est une espèce commensale de la peau des mammifères. Elle est naturellement présente dans divers produits fermentés. Utilisée comme ferment pour les produits carnés et laitiers, cette espèce est historiquement reconnue comme non pathogène. Cependant, certaines souches ont été associées à des pathologies telles que des mammites ou des dermites. L'analyse des profils PFGE de souches de différentes origines montre que cette espèce est très hétérogène. Afin de rechercher des propriétés spécifiques de souches selon leur origine, une approche par hybridation soustractive et suppressive a été développée. Le génome de la souche C2a, commensale de la peau et dont le génome a été séquencé récemment, a été soustrait aux génomes de 3 souches cibles d'origine variée: une utilisée comme ferment, une isolée de mammité bovine ou une responsable de dermatite chez la souris. Après soustraction, respectivement, 41, 44 et 41 fragments spécifiques des souches cibles ont été identifiés. La fréquence de ces fragments au sein de l'espèce a été étudiée chez 20 autres souches. Leur distribution a permis de déterminer 2 groupes de souches au sein de l'espèce. La localisation de ces fragments souches-spécifiques sur les chromosomes des souches cibles a révélé la présence d'une zone privilégiée d'insertion de gènes. Cette zone est proche de l'origine de réplication (*oriC*) et correspondrait à une région de spéciation chez les staphylocoques.

Mots-clés : *S. xylosus*, PFGE, hybridation soustractive et suppressive, diversité

Journée des Microbiologistes d'Auvergne, mars 2007, Clermont-Ferrand, France

RÉSUMÉ

Staphylococcus xylosus est une bactérie ubiquitaire, commensale de la peau et des muqueuses de l'homme et des animaux. C'est un des principaux ferments utilisé en salaison. Ses propriétés technologiques étaient bien connues mais peu de données génétiques sur cette espèce étaient disponibles. Nous avons établi la première carte physique et génétique de la souche modèle *S. xylosus* C2a. Cette carte nous a permis d'avoir une estimation de la taille (2,89 Mb) et de l'organisation globale d'un chromosome de *S. xylosus*. Au sein de cette espèce, nous avons montré qu'il existait une grande diversité, tant au niveau des caractères phénotypiques (métabolisme des sucres, formation de colonies géantes) que génotypiques (profils génomiques, taille du chromosome). Nous avons étudié, par hybridation soustractive, la diversité du contenu génétique de souches de diverses origines. Le génome de la souche C2a a été soustrait à ceux d'un ferment et de deux souches isolées d'infections opportunistes. Au total, 78 kb de séquences d'ADN ont été identifiés, la majorité correspondant à des gènes du métabolisme. La distribution de ces fragments souches-spécifiques au sein de l'espèce *S. xylosus* révèle deux groupes dont un composé des souches présentant un risque potentiel. Ces fragments pourraient être utilisés dans des études épidémiologiques. La région de l'*oriC* est une zone d'insertion privilégiée de ces fragments sur les chromosomes de *S. xylosus*. Elle permet l'acquisition de matériel génétique important pour son adaptation à différentes niches écologiques. Le séquençage de cette zone chez différentes souches permettra d'évaluer la plasticité des génomes de *S. xylosus*.

STAPHYLOCOCCUS XYLOSUS : GENOME MAPPING AND GENETIC DIVERSITY

Staphylococcus xylosus is a ubiquitous bacterium, and a commensal of the human and animals' cutaneo-mucosa. It is one of the principal starters used in fermented meat industry. Its technological properties were well-known but few genetic data on this species were available. We established the first physical and genetic map of the *S. xylosus* C2a strain. This map allowed estimating the chromosome size (2.89 Mb) and gave first indication of the *S. xylosus* chromosome organization. Within this species we showed that there was a great diversity, at once phenotypic (sugar metabolism, giant colony formation) and genotypic (genomic profiles, size of the chromosome). Following subtractive hybridization, we studied the genetic content diversity of strains from various origins. The genome of the *S. xylosus* C2a strain was subtracted from those of a starter strain and two strains isolated from opportunist infections. A total of 78 kb of DNA sequences were identified, the majority corresponding to metabolic genes. The distribution of strain-specific fragments within the *S. xylosus* species revealed two clusters. One was composed of the potentially hazardous strains. These fragments could be used in epidemiologic studies. A majority of strain-specific fragments was colocalized on the *oriC* region of *S. xylosus* chromosomes. This region corresponded to an insertion loop which allowed the acquisition of important genetic material necessary for *S. xylosus* fitness to various ecological niches. Sequencing this area in various strains should provide a better understanding of the *S. xylosus* genome plasticity.

Discipline : Sciences des Aliments, spécialité Microbiologie

Mots-clés : *Staphylococcus xylosus* ; organisation du génome ; carte physique ; carte génétique ; hybridation soustractive et suppressive ; diversité ; bactérie ; ferment

Unité de Recherche Microbiologie - Equipe Qualité et Sécurité des Aliments
Institut National de la Recherche Agronomique - Clermont-Ferrand - Theix
