



AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Tecnologia Quimica e Biologica

Université Henri Poincaré-Nancy I
Faculté de Médecine

N° attribué par la bibliothèque

| | | | | | | | | | |
|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|
| | | | | | | | | | |
|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|

THESE

pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA
ET DE L'UNIVERSITE DE NANCY I**

Discipline : Génie Biologique et Médical

présentée et soutenue publiquement par

Julien LOUBINOUX

le 15 octobre 2001

Titre :

**LES BACTERIES SULFATO-REDUCTRICES HUMAINES :
CARACTERISATION ET POUVOIR PATHOGENE**

Directeurs de Thèse : Monsieur le Professeur Jean LE GALL
Monsieur le Professeur Alain LE FAOU

JURY

Monsieur le Professeur Jean LE GALL
Monsieur le Professeur Alain LE FAOU
Monsieur le Professeur Antonio XAVIER (rapporteur)
Monsieur le Professeur Gérard CHABANON (rapporteur)
Madame le Professeur Chantal FINANCE
Madame le Professeur Ines A.C. PEREIRA



A la mémoire du Docteur **Wee Tee**,

qui isola la première souche de *Desulfovibrio fairfieldensis*.

REMERCIEMENTS

Nous tenons à exprimer notre reconnaissance à :

- Monsieur le Professeur **Jean Le Gall** qui a été à l'origine de ce travail, a permis la collaboration avec l'Instituto de Tecnologia Quimica e Biologica, la réalisation de cette Thèse en co-tutelle avec l'Universidade Nova de Lisboa et qui nous a transmis une partie de son expérience et de sa passion pour les bactéries sulfato-réductrices.

- Monsieur le Professeur **Alain Le Faou** pour son aide, ses conseils et son soutien pour la réalisation de ce travail ainsi que pendant les années passées dans son Service en tant qu'Interne et Assistant Hospitalo-Universitaire.

- Monsieur le Professeur **Antonio Xavier** qui nous a aidé lors de nos séjours au Portugal et qui a accepté de juger ce travail.

- Monsieur le Professeur **Gérard Chabanon** pour avoir accepté de juger ce travail.

- Madame le Professeur **Chantal Finance** qui nous a enseigné la microbiologie et qui nous a soutenu pendant nos études.

- Madame le Professeur **Ines A.C. Pereira** pour la collaboration continue pendant ces années de Thèse ainsi que son accueil chaleureux lors de nos séjours au Portugal.

Nous tenons également à remercier :

- **D. Meng** et **A.M. Carpentier** du Laboratoire de Bactériologie-Virologie de la Faculté de Médecine de Nancy pour leur disponibilité et leur aide pour les cultures et les isolements de bactéries sulfato-réductrices, ainsi que pour le plaisir que nous avons eu à travailler dans la bonne humeur en leur compagnie.

- **M. Thirion** ainsi que le Docteur **B. Jaulhac**, le Professeur **Y. Piémont** et le Professeur **H. Monteil** du Laboratoire de Bactériologie du CHU de Strasbourg pour la réalisation d'une recherche spécifique de bactéries sulfato-réductrices dans les collections thoraco-abdominales arrivant dans leur Laboratoire.

- le Professeur **P. Grimont** pour son aide et ses conseils en matière de taxonomie bactérienne.

- les Professeurs **M.A. Bigard** et **J.P. Bronowicki** et **tout le personnel du Service d'Hépatogastro-Entérologie** de l'Hôpital de Brabois-Adultes, CHU de Nancy, pour son aide pour le recueil des selles de patients.

TABLE DES MATIERES



| | |
|---|-----------|
| INTRODUCTION | 13 |
| PREMIERE PARTIE : LES BACTERIES SULFATO-REDUCTRICES | 16 |
| 1. INTRODUCTION | 17 |
| 2. TAXONOMIE | 17 |
| 3. METABOLISME ENERGETIQUE | 18 |
| 3.1. Croissance en présence d'un composé organique et de sulfates | 18 |
| 3.1.1. La réduction des sulfates en sulfures | 18 |
| 3.1.2. Le catabolisme des composés organiques | 20 |
| 3.1.3. Bilan de la croissance en présence d'un composé organique et de sulfates | 21 |
| 3.2. Croissance en présence d'un composé organique et de nitrates | 22 |
| 3.3. Croissance en présence d'H ₂ | 22 |
| 3.4. Rendements du métabolisme énergétique en fonction du substrat | 23 |
| 4. SENSIBILITE A L'OXYGENE | 23 |
| 5. CONDITIONS DE CULTURE | 24 |
| 6. LES BACTERIES SULFATO-REDUCTRICES DE L'ENVIRONNEMENT | 24 |
| 6.1. Importance écologique des BSR : le cycle du soufre | 25 |
| 6.2. Importance économique des BSR | 26 |
| 6.2.1. Corrosion des canalisations métalliques | 26 |
| 6.2.2. Pollution des eaux et des sols | 26 |
| 6.2.3. Action dépolluante | 27 |
| 7. LES BACTERIES SULFATO-REDUCTRICES HUMAINES ET ANIMALES | 28 |
| 7.1. Introduction | 28 |
| 7.2. Caractères bactériologiques du genre <i>Desulfomonas</i> | 28 |
| 7.3. Caractères bactériologiques du genre <i>Desulfovibrio</i> | 29 |
| 7.4. Pouvoir pathogène des BSR | 31 |
| 7.4.1. Chez l'animal | 31 |
| 7.4.1.1. Atteintes inflammatoires intestinales | 31 |

| | |
|---|----|
| 7.4.1.2. Bactériémie | 31 |
| 7.4.1.3. Polioencéphalomalacie | 32 |
| 7.4.2. Chez l'homme | 32 |
| 7.4.2.1. Maladies inflammatoires chroniques intestinales | 32 |
| 7.4.2.2. Parodontites et caries | 32 |
| 7.4.2.3. Pathologies infectieuses chirurgicales | 33 |
| 7.5. Physiopathologie | 33 |
| 7.5.1. Physiologie des BSR dans le tube digestif | 33 |
| 7.5.2. Facteurs de virulence | 34 |
| 7.5.2.1. Métabolite cytotoxique : H ₂ S | 34 |
| 7.5.2.2. Autres facteurs pouvant intervenir dans la virulence | 35 |
| 7.6. Diagnostic bactériologique des infections à BSR | 37 |
| 7.6.1. Prélèvements biologiques | 37 |
| 7.6.2. Culture | 38 |
| 7.6.3. Identification | 38 |
| 7.6.4. Sensibilité aux antibiotiques | 40 |
| 8. <i>BILOPHILA WADSWORTHIA</i> | 43 |

SECONDE PARTIE : MALADIES INFLAMMATOIRES CHRONIQUES INTESTINALES ET PARODONTITES 44

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUCTION | 45 |
| 2. LES MALADIES INFLAMMATOIRES CHRONIQUES INTESTINALES HUMAINES | 45 |
| 2.1. Introduction | 45 |
| 2.2. Prévalence des maladies inflammatoires chroniques intestinales | 45 |
| 2.3. Aspects cliniques | 47 |
| 2.3.1. La maladie de Crohn | 47 |
| 2.3.2. La rectocolite hémorragique | 49 |
| 2.3.3. Les manifestations cliniques extraintestinales | 49 |
| 2.4. Physiopathologie | 51 |
| 2.4.1. Modèles animaux | 51 |
| 2.4.2. Facteurs immunologiques | 51 |

| | |
|---|-----------|
| 2.4.3. Facteurs génétiques et environnementaux | 52 |
| 2.4.4. Facteurs microbiens | 52 |
| 2.5. Aspects thérapeutiques | 52 |
| 3. LES PARODONTITES HUMAINES | 53 |
| 3.1. Introduction | 53 |
| 3.2. Prévalence des parodontites | 53 |
| 3.3. Aspects cliniques | 54 |
| 3.3.1. Histopathologie des parodontites | 54 |
| 3.3.2. Formes cliniques des parodontites | 54 |
| 3.3.3. Critères cliniques d'évaluation de l'atteinte parodontale | 55 |
| 3.4. Physiopathologie | 57 |
| 3.4.1. Facteurs bactériens | 57 |
| 3.4.2. Facteurs individuels | 57 |
| 3.5. Aspects thérapeutiques | 58 |
| | |
| TROISIEME PARTIE : MATERIEL ET METHODES | 59 |
| 1. SOUCHES BACTERIENNES | 60 |
| 1.1. Souches de collection | 60 |
| 1.2. Souches cliniques | 60 |
| 2. METHODES | 61 |
| 2.1. Cultures bactériennes | 61 |
| 2.1.1. Milieux de culture | 61 |
| 2.1.2. Conditions de culture | 62 |
| 2.2. Etude phénotypique | 62 |
| 2.3. Etude génotypique | 63 |
| 2.3.1. Extraction de l'ADN | 63 |
| 2.3.2. Détermination du contenu en G+C de l'ADN | 64 |
| 2.3.3. Séquençage du gène de l'ARN ribosomal 16S | 65 |
| 2.3.4. Identification par PCR de <i>Dm. pigra</i> , <i>D. desulfuricans</i> et <i>D. fairfieldensis</i> | 67 |
| 2.3.5. Séquençage de la région de l'ADN comprise entre les gènes des ARN ribosomiaux 16S et 23S | 69 |

| | |
|---|------------|
| QUATRIEME PARTIE : RESULTATS ET DISCUSSION | 71 |
| 1. POUVOIR PATHOGENE DES BACTERIES SULFATO-REDUCTRICES | 72 |
| 1.1. Bactériémie à <i>Desulfovibrio fairfieldensis</i> | 72 |
| 1.2. <i>Desulfovibrio fairfieldensis</i> : une nouvelle espèce pathogène pour l'homme? | 77 |
| 1.3. Les bactéries sulfato-réductrices chez l'homme et leur association aux maladies inflammatoires chroniques intestinales | 81 |
| 1.4. Isolement de <i>Desulfovibrio fairfieldensis</i> de poches parodontales | 101 |
| 1.5. Isolement des bactéries sulfato-réductrices dans des collections purulentes abdominales | 113 |
| 1.6. Commentaires | 125 |
| 2. ETUDE TAXONOMIQUE DES BACTERIES SULFATO-REDUCTRICES | 126 |
| 2.1. Reclassification de <i>Desulfomonas pigra</i> dans le genre <i>Desulfovibrio</i> | 126 |
| 2.2. Commentaires | 143 |
| | |
| CONCLUSION | 144 |
| | |
| BIBLIOGRAPHIE | 151 |



LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

Publications

- P₁. LOUBINOUX J, MORY F, PEREIRA IAC, LE FAOU AE. Bacteremia caused by a strain of *Desulfovibrio* related to the provisionally named *Desulfovibrio fairfieldensis*. J. Clin. Microbiol., 2000, 38 : 931-934.
- P₂. LOUBINOUX J, MORY F, PEREIRA IAC, LE FAOU AE. *Desulfovibrio fairfieldensis* : a new human pathogen ? Review Series Infectious Diseases, 2000, 4 : 17-18.
- P₃. LOUBINOUX J, BRONOWICKI JP, PEREIRA IAC, MOUGENEL JL, LE FAOU AE. Convenient methods for detection and identification of sulfate-reducing bacteria in human feces. FEMS Microbiol. Ecol. n° 01118, soumis.
- P₄. LOUBINOUX J, BISSON-BOUTELLIEZ C, MILLER N, LE FAOU AE. Isolation of the provisionally named *Desulfovibrio fairfieldensis* from human periodontal pockets. J. Clin. Microbiol. n° 873-01, soumis.
- P₅. LOUBINOUX J, VALENTE FMA, PEREIRA IAC, COSTA A, GRIMONT PAD, LE FAOU AE. Reclassification of *Desulfomonas pigra* as *Desulfovibrio pigrum* comb. nov. and suppression of the genus *Desulfomonas*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. n° 02175, soumis.
- P₆. LOUBINOUX J, JAULHAC B, PIEMONT Y, MONTEIL H, LE FAOU AE. Isolation of sulfate-reducing bacteria from human thoraco-abdominal collections. En préparation.

Communications

- C₁. LOUBINOUX J, MORY F, PEREIRA IAC, LE FAOU AE. Différentes espèces de *Desulfovibrio* pourraient être impliquées dans les infections humaines. Microbiologie anaérobie (SFM), Université Claude Bernard, Villeurbanne, 05 avril 2000 (communication orale).
- C₂. COELHO AV, MATIAS P, CANTO A, PEREIRA IAC, LOUBINOUX J, LE FAOU AE, LE GALL J, CARRONDO MA. Structure determination of split-soret cytochrome from a *Desulfovibrio* species isolated from a human abdominal abscess. XII Congresso Nacional de Bioquímica, Povoá do Varzim, Portugal, 28-30 septembre 2000 (communication affichée, résumé dans : Eur. J. Biochem., 2001, 268 (Suppl. 1) : 231).
- C₃. LOUBINOUX J. Place de *Desulfovibrio* en pathologie digestive humaine. 20^{ème} Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse, Paris, 7-8 décembre 2000 (communication affichée).

LISTE DES ABBREVIATIONS



- ADNr 16S** : gène de l'ARN ribosomal 16S
- ADP** : adénosine diphosphate
- AMP** : adénosine monophosphate
- ANCA** : "anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies", autoanticorps dirigés contre un déterminant antigénique du cytoplasme des polynucléaires neutrophiles
- APS** : adénosine phosphosulfate
- ASCA** : "anti-*Saccharomyces cerevisiae* mannan antibodies", anticorps dirigés contre un déterminant antigénique pariétal (mannane) de *Saccharomyces cerevisiae*
- ATCC** : "american type culture collection"
- BSR** : bactéries sulfato-réductrices
- CLHP** : chromatographie liquide haute performance
- CRM** : coefficient de réponse massique
- EDTA** : acide éthylène diamine tétraacétique
- G+C%** : contenu en guanine et cytosine de l'ADN
- H₂S** : hydrogène sulfuré
- HLA** : "human leucocyte antigen", déterminant antigénique des leucocytes
- ICAM** : "intercellular adhesion molecule", molécule d'adhésion intercellulaire
- IL** : interleukine
- ITS** : "internally transcribed spacer", région de l'ADN comprise entre les gènes des ARN ribosomaux 16S et 23S
- LPS** : lipopolysaccharide
- m6dA** : N⁶-méthyldésoxyadénosine
- MC** : maladie de Crohn
- MICI** : maladies inflammatoires chroniques intestinales
- Pi** : phosphate inorganique
- PPi** : pyrophosphate inorganique
- RCH** : rectocolite hémorragique
- SDS** : "sodium dodecyl sulfate"
- TE** : tampon tris EDTA
- Th** : lymphocytes T "helpers"
- TNF α** : "tumor necrosis factor α "
- UV** : ultra-violet

LISTE DES FIGURES



| | |
|---|----|
| Figure 1 : Schéma général de l'assimilation du sulfate | 20 |
| Figure 2 : Le cycle biologique du soufre | 27 |
| Figure 3 : L'appareil digestif humain | 46 |
| Figure 4 : Les localisations intestinales de la maladie de Crohn | 48 |
| Figure 5 : Les localisations intestinales de la rectocolite hémorragique | 50 |



LISTE DES TABLEAUX

| | |
|---|----|
| Tableau I : Composition des milieux de culture pour bactéries sulfato-réductrices | 39 |
| Tableau II : Sensibilité aux β -lactamines de 14 isolats de <i>Desulfovibrio</i> | 42 |
| Tableau III : Les scores de l'Indice de Plaque de Silness et Loë | 56 |
| Tableau IV : Les scores de l'Indice Gingival de Loë et Silness | 56 |
| Tableau V : Variation de la composition de la phase mobile au cours de la séparation chromatographique des désoxyribonucléosides | 65 |
| Tableau VI : Amorces consensus pour l'amplification et le séquençage de l'ADNr 16S de <i>Desulfomonas</i> et de <i>Desulfovibrio</i> | 67 |
| Tableau VII : Amorces spécifiques de <i>Dm. pigra</i> , <i>D. desulfuricans</i> et <i>D. fairfieldensis</i> | 68 |
| Tableau VIII : Couples d'amorces pour l'identification de <i>Dm. pigra</i> , <i>D. desulfuricans</i> et <i>D. fairfieldensis</i> | 69 |
| Tableau IX : Amorces consensus pour l'amplification et le séquençage de l'ITS de <i>Desulfomonas</i> et de <i>Desulfovibrio</i> | 70 |

INTRODUCTION

Les bactéries sulfato-réductrices (BSR) sont des microorganismes anaérobies à métabolisme oxydatif caractérisés par la production d'énergie par la réduction des sulfates en sulfures. Ce sont surtout des bactéries de l'environnement et elles sont isolées du sol, des eaux douces et marines, des eaux d'égouts, des boues et des puits de gaz et de pétrole. Elles peuvent également être isolées du tube digestif de l'animal et de l'homme (*Desulfomonas* et *Desulfovibrio*). Du fait de leur métabolisme, les BSR produisent en grande quantité de l'hydrogène sulfuré (H₂S), composé corrosif et cytotoxique. De ce fait, elles ont un impact industriel et environnemental néfaste. Elles sont responsables de la corrosion des canalisations en acier (industrie du pétrole) et peuvent également provoquer une pollution des eaux de surface, détruisant la faune et la flore aquatiques. Ces bactéries sont donc responsables de pertes économiques importantes, ce qui peut expliquer que les espèces environnementales soient mieux connues que les espèces humaines. Récemment, des travaux en nombre limité ont décrits l'isolement de BSR au cours de processus infectieux chez l'homme. Ces études ne décrivent le plus souvent que l'isolement des BSR et les espèces isolées ne sont pas caractérisées. En effet, les BSR sont difficiles à isoler et elles sont souvent présentes au sein d'une flore plurimicrobienne d'origine digestive.

Chez l'animal, les BSR ont été mises en cause dans des atteintes entériques caractérisées par une diarrhée aqueuse sanglante, avec perte de poids et anorexie, pouvant entraîner la mort. Chez l'homme, leur rôle dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (la rectocolite hémorragique et la maladie de Crohn) et dans les parodontites a été envisagé du fait de l'augmentation significative de la prévalence de ces bactéries et de la concentration d'H₂S chez les malades par rapport à la population témoin. Dans ce travail, nous avons entrepris une étude taxonomique ainsi qu'une étude du pouvoir pathogène de BSR isolées de pathologies chirurgicales chez l'homme. Tout d'abord, nous avons essayé de montrer que ces bactéries

appartiennent à des espèces différentes de celles de l'environnement. Ensuite, nous avons recherché systématiquement ces bactéries dans les selles et les prélèvements abdominaux de patients hospitalisés. Enfin, une étude sur leur association aux atteintes parodontales a également été menée.

PREMIERE PARTIE :
LES BACTERIES SULFATO-REDUCTRICES

1. INTRODUCTION

C'est en 1895 que la première espèce sulfato-réductrice a été isolée d'un canal hollandais et décrite par W.M. Beijerinck (7). Il avait constaté que la formation de sulfures dans les canaux de Delft était sujette à des variations saisonnières, atteignant un maximum pendant les mois de juillet, août et septembre. La multiplication des BSR avait pour conséquence le dégagement d'une odeur très nauséabonde. Les colonies que Beijerinck a réussi à obtenir au sein d'un milieu gélosé étaient caractérisées par leur couleur noire, résultant de la formation d'un précipité de sulfure de fer. La bactérie ainsi isolée, incurvée et mobile, réduisait les sulfates en sulfures. L'existence de formes spiralées a amené Beijerinck à proposer le nom de *Spirillum desulfuricans*. Le changement de nom du genre *Spirillum* en *Desulfovibrio* a été proposé par A.J. Kluyver en 1936 (48).

2. TAXONOMIE

Les BSR peuvent, sur la base des séquences du gène de l'ARN ribosomal 16S, être divisées en 4 taxons très différents : *Archaea* (*Archaeoglobus fulgidus*), Thermotogales (*Thermodesulfovibrio* et *Thermodesulfobacterium*), *Clostridia* et apparentés (*Desulfotomaculum*) et δ *Proteobacteria* (*Desulfomonas* et *Desulfovibrio*) (12). La présence d'une réduction des sulfates chez des bactéries aussi différentes pourrait résulter de transferts de gènes entre espèces ou de l'existence d'un ancêtre commun aux *Archaea* et aux *Eubacteria* (111).

Les *Archaea* sulfato-réductrices comprennent 2 espèces marines thermophiles, *Archaeoglobus fulgidus* et *Archaeoglobus profundus*, dont la température optimale de croissance est supérieure à 80°C.

Les Thermotogales sulfato-réductrices sont des bacilles à Gram négatif, ayant une température optimale de croissance comprise entre 65 et 70°C et dont les espèces les mieux connues, d'origine hydrique, sont *Thermodesulfobacterium commune* et *Thermodesulfovibrio yellowstonii*.

Les espèces du genre *Desulfotomaculum* sont des bacilles à Gram positif mobiles. Ce sont les seules BSR qui sporulent. Comme les *Clostridium* et les *Bacillus*, elles ont un faible contenu en G+C de l'ADN (48 à 52%). Certaines espèces de *Desulfotomaculum* sont thermophiles, mais leur température optimale de croissance (entre 40 et 65°C) est inférieure à celle des

Thermotogales.

Les δ *Proteobacteria* sulfato-réductrices sont des espèces mésophiles à Gram négatif qui appartiennent à la famille des *Desulfovibrionaceae* ou des *Desulfobacteriaceae*. *Desulfobulbus*, *Desulfobacter*, *Desulfobacterium*, *Desulfococcus*, *Desulfosarcina*, *Desulfomonile* et *Desulfonema* constituent un ensemble hétérogène de BSR de formes variées et qui font partie des *Desulfobacteriaceae*. *Desulfomicrobium*, *Desulfomonas* et *Desulfovibrio* constituent un ensemble plus homogène que le précédent appartenant à la famille des *Desulfovibrionaceae*.

3. METABOLISME ENERGETIQUE

3.1. Croissance en présence d'un composé organique et de sulfates

L'appellation "bactéries sulfato-réductrices" provient de la voie principale de production de l'énergie chez ces microorganismes. La réduction des sulfates, ou d'autres composés soufrés (sulfites, thiosulfates), est effectuée grâce à la production d'électrons du fait de l'oxydation d'un composé organique (lactate). C'est un processus dissimilatif, et la majeure partie du soufre est rejetée dans l'environnement extérieur sous forme de sulfures.

3.1.1. La réduction des sulfates en sulfures

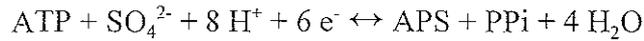
✓ Pénétration des sulfates dans le cytoplasme de la cellule

Le mécanisme de transport des sulfates à travers la membrane cytoplasmique n'est pas connu. Cependant, l'affinité du transporteur pour les sulfates varie en fonction de leur concentration extracellulaire (l'affinité est plus grande à faible concentration) (45). L'entrée des sulfates dans la cellule est accompagnée d'une entrée de protons ou d'ions sodium selon que la souche provient d'eau douce ou d'eau marine (système de symport) (17, 18). Les analogues structuraux de l'ion sulfate (sélénate, molybdate et monofluorophosphate) inhibent la pénétration des sulfates dans la cellule.

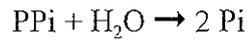
✓ Activation des sulfates

L'ion sulfate n'est pas un bon accepteur d'électrons en raison du très faible potentiel redox du couple $\text{SO}_4^{2-}/\text{HSO}_3^-$ (< -500 mV) (114). Avant d'être réduit, l'ion sulfate doit donc être activé. L'ATP **sulfurylase** (ou sulfate adénylyl transférase, EC 2.7.7.4) utilise l'adénosine-5'-triphosphate

(ATP) pour former de l'adénosine-5'-phosphosulfate (APS) et du pyrophosphate inorganique (PPi) selon la réaction suivante :

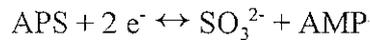


L'équilibre de la réaction n'est pas en faveur de la formation d'APS, c'est pourquoi une **pyrophosphatase** (EC 3.6.1.1) doit intervenir en hydrolysant le pyrophosphate en phosphate inorganique (62) :



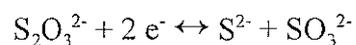
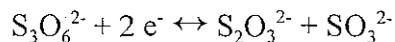
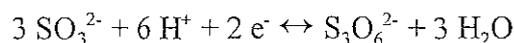
✓ Réduction de l'adénosine-5'-phosphosulfate

L'**APS réductase** (ou adényl sulfatase réductase, EC 1.8.99.2) effectue un clivage réductif de l'APS en sulfite et adénosine-5'-monophosphate (AMP) selon la réaction réversible suivante:

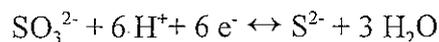


✓ Réduction des sulfites

La formation de sulfures à partir de sulfites fait intervenir une **sulfite réductase** (EC 1.8.99.3). Les sulfite réductases des BSR appartiennent à 4 classes selon leur spectre d'absorption dans le visible : désulfovirdine, désulforubidine, désulfofuscidine ou P-582 (77). La réduction des sulfites pourrait être effectuée soit en 1 étape grâce à 1 sulfite réductase, soit en 3 étapes. *In vitro*, les produits de cette réduction sont le trithionate ($\text{S}_3\text{O}_6^{2-}$), le thiosulfate ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$) et le sulfure (S^{2-}). L'hypothèse d'une réduction en 3 étapes avec la formation de ces intermédiaires et l'intervention de 3 enzymes (sulfite réductase, trithionate réductase et thiosulfate réductase) a donc été émise (45, 77, 82). Dans cette hypothèse, les 3 réductions consécutives seraient les suivantes :

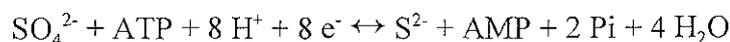


Le bilan de la réduction des sulfites en sulfures est :



En présence de protons, les sulfures sont éliminés dans l'atmosphère sous forme d' H_2S .

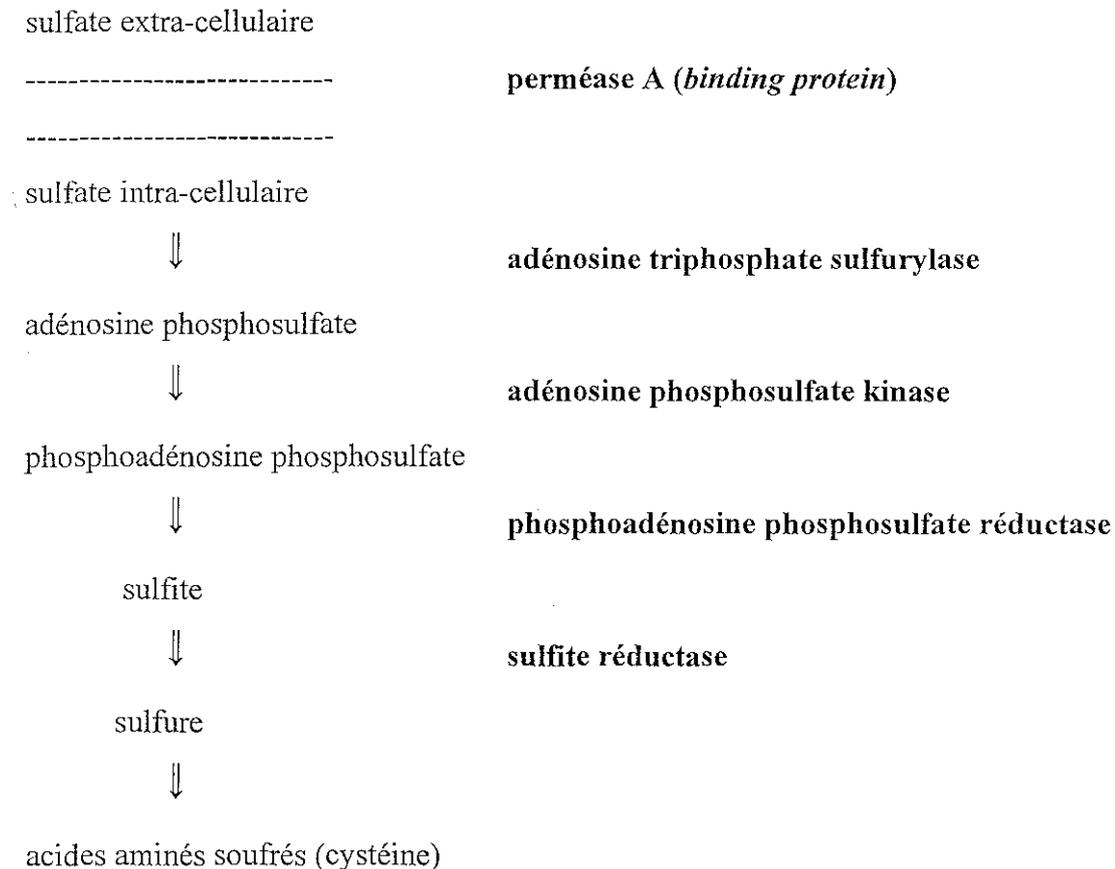
✓ Bilan de la réduction des sulfates en sulfures



✓ La réduction assimilative des sulfates en sulfures

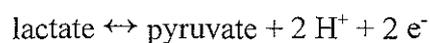
Chez les bactéries non sulfato-réductrices, la réduction des sulfates en sulfures est effectuée uniquement pour la synthèse des acides aminés soufrés (Figure 1).

Figure 1 : Schéma général de l'assimilation du sulfate

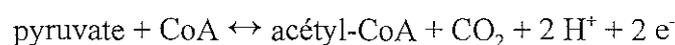


3.1.2. Le catabolisme des composés organiques

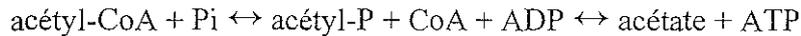
L'oxydation des composés organiques (lactate, pyruvate) permet l'apport d'électrons et d'ATP pour la réduction des sulfates. Le lactate est le substrat le plus couramment utilisé pour la culture de ces bactéries. Il est d'abord oxydé en pyruvate par une lactate déshydrogénase NAD(P) indépendante localisée du côté interne de la membrane cytoplasmique (110, 114):



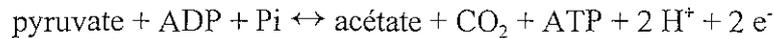
Le pyruvate est ensuite oxydé par une pyruvate déshydrogénase :



L'acétyl-CoA est converti en acétate par une phosphoacétyltransférase (EC 2.3.1.8) et une acétate kinase (EC 2.7.2.1) :



Le bilan de l'oxydation du pyruvate est :

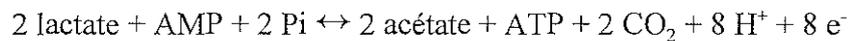


✓ Bilan du catabolisme du lactate

Compte tenu de la conversion par une adénylate kinase (EC 2.7.4.3) :

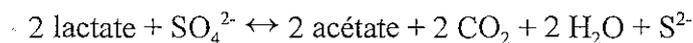


Le bilan est :

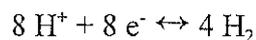


3.1.3. Bilan de la croissance en présence d'un composé organique et de sulfates

✓ En présence de lactate

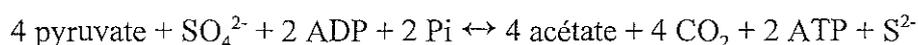


Le bilan énergétique est nul. La synthèse d'ATP nécessite la création d'un gradient de protons de part et d'autre de la membrane cytoplasmique et l'intervention d'une ATPase (33, 76). Pour expliquer la génération de ce gradient de protons, J.M. Odom et H.D. Peck ont proposé la théorie du recyclage de l'hydrogène (74). Les électrons résultant de l'oxydation du lactate ne seraient pas utilisés directement pour la réduction des sulfates mais pour la formation d'hydrogène grâce à une hydrogénase cytoplasmique:



L'hydrogène diffuserait ensuite librement à travers la membrane cytoplasmique jusqu'au périplasma, où il serait oxydé par une hydrogénase périplasmique, avec à nouveau formation d'ions H^+ et d'électrons. Cette hypothèse repose sur l'étude de sphéroplastes de *D. gigas*. Les sphéroplastes lavés sont incapables de réduire les sulfates en présence de lactate, mais cette activité est restaurée par l'addition d'hydrogénase et de cytochrome c_3 purifiés.

✓ En présence de pyruvate



L'utilisation du pyruvate comme donneur d'électrons entraîne la formation d'ATP par

phosphorylation au niveau du substrat (réaction phosphoroclastique). L'oxydation du pyruvate est également associée à une translocation de protons, suivie de leur import dans le cytoplasme avec synthèse d'ATP (110). Ce mécanisme explique la croissance en présence de pyruvate et en l'absence de sulfates par un processus fermentatif.

✓ Conclusion

Le métabolisme énergétique peut donc être décomposé en 3 parties : catabolisme d'un composé organique (source de carbone) avec génération d'ATP et d'électrons, transport des électrons dans la chaîne respiratoire de la membrane cytoplasmique avec génération d'ATP et enfin réduction intracellulaire des sulfates en sulfures avec consommation d'ATP et d'électrons (82). L'ATP généré par le catabolisme organique est consommé par la réduction des sulfates en sulfures. Le gain énergétique provient donc des phosphorylations oxydatives lors du transport des électrons dans la membrane cytoplasmique (création d'un gradient de protons) et des réactions de phosphorylation au niveau du substrat.

3.2. Croissance en présence d'un composé organique et de nitrates

Quelques souches de BSR (e.g., *Desulfovibrio desulfuricans* subsp. *desulfuricans* MB ATCC 27774) sont capables de croissance en présence d'un composé organique et d'ions nitrates en tant qu'accepteurs des électrons générés par le catabolisme organique. La réduction des nitrates est moins bien connue que la réduction des sulfates. Une nitrate réductase, puis une nitrite réductase liée à la membrane cytoplasmique (77), interviennent successivement pour former NH_3 .

3.3. Croissance en présence d' H_2

Les BSR possèdent une ou plusieurs hydrogénase(s) dont la localisation varie en fonction des espèces et des souches (45). L'hydrogénase est souvent une enzyme présente dans la membrane cytoplasmique du côté périplasmique, mais il existe également des hydrogénases cytoplasmiques. Trois types d'hydrogénases ont été décrites selon leur structure : [Fe], [NiFe] et [NiFeSe]. Les BSR peuvent donc utiliser l'hydrogène gazeux issu des fermentations bactériennes pour leur production d'énergie (15, 16, 37, 39). L'hydrogène constitue alors le composé donneur d'électrons pour la réduction des sulfates en sulfures. Il est oxydé par l'hydrogénase périplasmique qui a une forte affinité pour son substrat ($K_m = 1 \text{ à } 3 \mu\text{M}$) (82). Les électrons produits sont

transportés par les protéines membranaires vers l'accepteur d'électrons (sulfates) dans le cytoplasme, tandis que les protons restent dans l'espace périplasmique (114, 110). Le transport des électrons est associé à la création d'un gradient de protons nécessaire à la synthèse électrochimique d'ATP (ATPase).

3.4. Rendements du métabolisme énergétique en fonction du substrat

Les rendements suivants ont été estimés par mole de substrat utilisé (45) :

- lactate : 0,33 mole ATP,
- pyruvate : 0,83 mole ATP,
- hydrogène : 0,16 mole ATP.

C'est la croissance avec le pyruvate qui permet d'obtenir le meilleur rendement énergétique.

4. SENSIBILITE A L'OXYGENE

Le degré de sensibilité à l'oxygène est très variable d'une espèce bactérienne anaérobie à une autre (103). Depuis leur découverte, les BSR étaient considérées comme des bactéries anaérobies strictes, c'est-à-dire des bactéries qui vivent sans oxygène et qui sont tuées par l'oxygène (75). Il est vrai que la présence d'oxygène empêche leur croissance, mais les BSR survivent à une exposition à l'oxygène pendant 3 heures à plusieurs jours (45, 58). Elles manifestent donc une tolérance à l'oxygène qui n'existe pas chez d'autres bactéries anaérobies strictes. Leur isolement d'environnements oxygénés (eaux superficielles et sédiments aérés) suggère que l'oxygène pourrait avoir un rôle physiologique. Les isolats provenant de tels environnements appartiennent surtout au genre *Desulfovibrio* et semblent mieux adaptés à l'oxygène (19). Les BSR possèdent des enzymes telles que la catalase et la superoxyde dismutase, qui sont impliquées dans la dégradation des métabolites cytotoxiques de l'oxygène (O_2^- et H_2O_2) (58). J.R. Postgate avait constaté l'oxydation de composés organiques (lactate, pyruvate) en présence d'oxygène comme accepteur d'électrons (82). Il considérait déjà à l'époque le métabolisme des espèces de *Desulfovibrio* comme proche d'un métabolisme aérobie facultatif, en l'absence cependant de croissance en présence d'oxygène. La plupart des BSR sont effectivement capables de phosphorylation oxydative avec génération d'ATP en présence d'air (19, 20, 25, 59). Chez *D. gigas*, la dégradation du polyglucose pour former de l'ATP est associée à la réduction

de l'oxygène en eau par une rubrédoxine oxydase (92). Cette capacité pourrait constituer un mécanisme de défense contre l'oxygène et expliquer la survie des BSR dans des environnements oxygénés.

5. CONDITIONS DE CULTURE

Les milieux de culture contiennent habituellement un composé organique donneur d'électrons (lactate) et des ions ferreux. La croissance des BSR est alors détectée du fait de la formation d'un précipité noir de sulfure de fer dans le milieu. En l'absence de composés sulfatés et en présence de sources organiques appropriées (pyruvate), une croissance peut être observée.

Les milieux de culture doivent contenir un agent réducteur (Na_2S , thioglycollate, ascorbate) car le pré-requis à leur croissance est un bas potentiel redox (- 100 mV). La simple exclusion de l'air n'est donc pas suffisante pour assurer la croissance.

Le pH des milieux de culture doit être compris entre 7 et 7,5.

La salinité du milieu de culture et la température optimale de croissance sont fonction de l'environnement naturel de la souche à isoler. Les souches halophiles requièrent l'adjonction de 2,5% de NaCl (p/vol) dans le milieu. Les souches thermophiles requièrent une incubation des milieux à une température comprise entre 40 et 80°C.

La croissance des BSR est lente (temps de génération de 3 à 6 heures), notamment lors du primo-isolement. Les milieux de culture doivent donc être incubés pendant 1 mois. Une des raisons expliquant cette croissance lente est que la concentration en H_2S influence le taux de croissance et pourrait, à forte concentration, arrêter la croissance (82, 85). Ce phénomène est lié à la toxicité intrinsèque de l' H_2S et au fait que les sulfures rendent le fer peu soluble, donc non disponible pour la bactérie, en formant un précipité de sulfure de fer. La croissance de ces bactéries est ainsi fréquemment plutôt linéaire qu'exponentielle.

6. LES BACTERIES SULFATO-REDUCTRICES DE L'ENVIRONNEMENT

Les BSR peuvent être isolées de sources environnementales très variées en terme de température, salinité, pression atmosphérique, pH et conditions osmotiques (82). Elles survivent

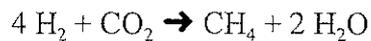
pendant plusieurs jours dans un milieu aérobie. Elles sont fréquemment isolées des sols et des eaux douces et marines. La forte teneur en sulfates des eaux marines et des eaux polluées explique leur prévalence élevée et leur multiplication dans ces écosystèmes. Les conditions nécessaires à leur développement sont habituellement la présence de sulfates, de matière organique et l'existence d'un bas potentiel rédox. Les conséquences de cette multiplication dans l'environnement sont multiples. L'accumulation de sulfures entraîne la chute du potentiel rédox du milieu autour de -320 mV. Dans un tel environnement, l'oxygène ne peut être présent qu'à de très faibles concentrations et de manière transitoire. Par conséquent, la flore bactérienne aérobie disparaît au profit des anaérobies qui vont fermenter les composés organiques. La putréfaction de la faune et de la flore, tuées par l'H₂S, augmente encore la matière organique disponible pour les bactéries anaérobies. La formation de composés organiques de faible poids moléculaire et d'hydrogène assure la présence de substrats donneurs d'électrons pour le métabolisme énergétique des BSR. La majorité des sulfures produits par les BSR forme de l'H₂S, mais une partie des sulfures en solution dans l'eau forme HS⁻ et OH⁻ ($S^{2-} + H_2O \leftrightarrow HS^- + OH^-$) (82). Le pH de l'environnement devient donc basique. En présence de métaux, des précipités de sulfures métalliques se forment. Ainsi, la richesse en ions ferreux du sol et des eaux permet la formation de sulfure de fer qui entraîne un noircissement du milieu et qui est le témoin de la multiplication des BSR.

6.1. Importance écologique des BSR : le cycle du soufre

Les processus physico-chimiques qui mettent en jeu l'atome de soufre dans la biosphère constituent le cycle du soufre. Les BSR contribuent de manière substantielle au cycle du soufre (Figure 2, p. 27) (55, 82). Elles réduisent les sulfates, mais aussi le soufre élémentaire (30), et génèrent ainsi de grandes quantités de sulfures dans l'environnement. Les sulfures permettent la croissance à la fois de bactéries anaérobies photosynthétiques (bactéries sulfureuses filamenteuses, *Beggiatoceae* et *Leucotrichaceae*) et de bactéries aérobies chimiolithotrophes (*Thiobacteriaceae*). Au sein du *sulfuretum*, les BSR se multiplient donc au niveau le plus bas, aussi bien dans les eaux que dans les sols. Au dessus de ce niveau et en remontant vers la surface, on observe successivement d'abord la multiplication des bactéries anaérobies photosynthétiques à un niveau où la lumière pénètre, puis la multiplication des bactéries aérobies chimiolithotrophes. Ces microorganismes permettent à nouveau la formation de sulfates pour la croissance des BSR.

Les bactéries méthanogènes sont des *Archaea* chimiolithotrophes qui produisent leur

énergie par la réaction suivante :



Ce sont des bactéries anaérobies strictes (*Methanococcus*, *Methanobacterium*, *Methanobrevibacter*, *Methanosarcina*) isolées des mêmes écosystèmes environnementaux que les BSR. Au sein de ces écosystèmes, les microorganismes anaérobies constituent une chaîne alimentaire, les produits du métabolisme d'un groupe de microorganisme servant de substrats pour la croissance d'un autre groupe (41). Les BSR et les bactéries méthanogènes sont en compétition pour l'utilisation des produits finaux du catabolisme organique au bout de la chaîne alimentaire. Si les sulfates sont en quantité suffisante (eaux marines), les BSR se multiplient aux dépens des bactéries méthanogènes car les BSR peuvent utiliser une plus grande variété de substrats et ont une affinité plus grande pour l'hydrogène. Par contre, dans les eaux douces, la méthanogénèse l'emporte le plus souvent sur la sulfurogénèse.

6.2. Importance économique des BSR

6.2.1. Corrosion des canalisations métalliques

La corrosion des canalisations souterraines en fer ou en acier qui assurent le transport du gaz, de l'eau ou du pétrole est responsable du préjudice économique le plus important et le mieux connu des BSR (82). Le mécanisme de la corrosion anaérobie des canalisations métalliques met en jeu la dépolarisation cathodique du fer par l'hydrogénase bactérienne. Une surface constituée d'atomes de fer réagit avec l'eau pour se recouvrir rapidement d'un film d'atomes d'hydrogène qui dépolarise la surface. Les BSR sont capables d'utiliser l'hydrogène comme substrat donneur d'électrons grâce à leur hydrogénase avec formation d'hydroxyde de fer et de sulfure de fer. Les sulfures formés sont responsables de la corrosion du fait de la chélation des ions métalliques.

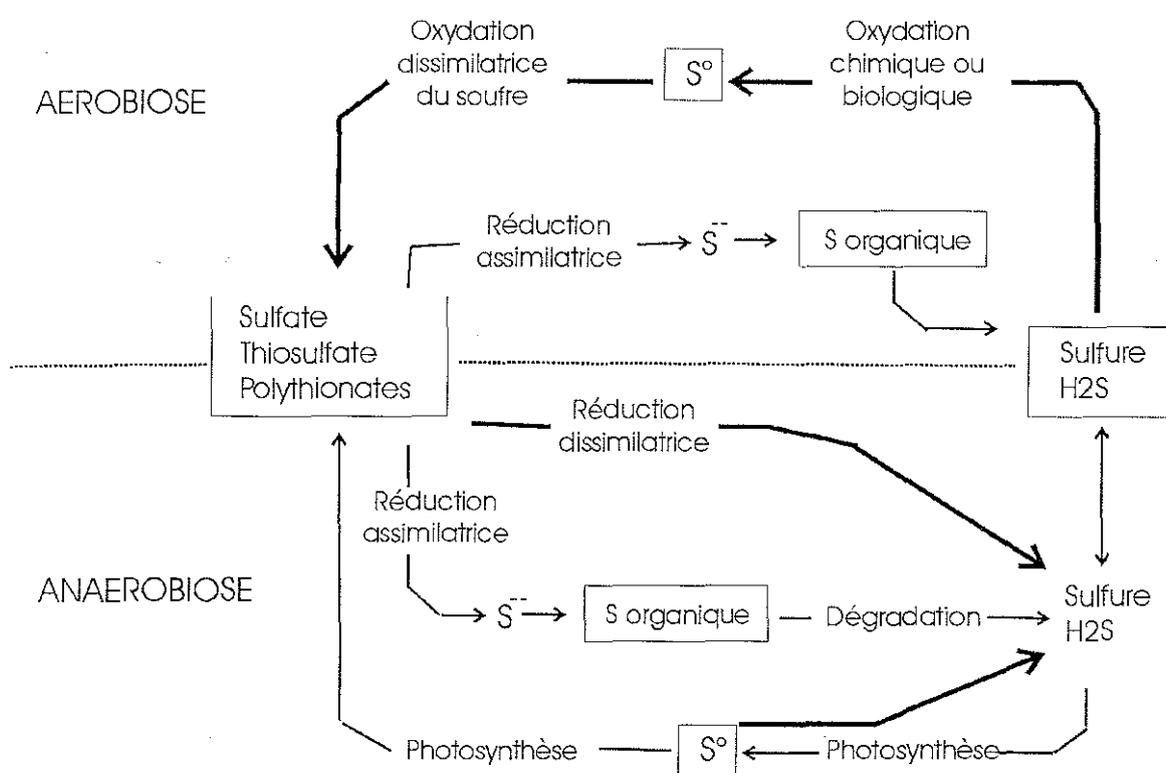
6.2.2. Pollution des eaux et des sols

Les BSR se multiplient dans les eaux et dans les sols en l'absence d'oxygène, le plus souvent en profondeur. Leur multiplication dans les eaux des canaux et des ports est fréquente du fait de la concentration élevée en sulfates dans les eaux marines et de la présence de déchets organiques d'origine humaine. La multiplication de ces bactéries est responsable d'une odeur très nauséabonde. Les cités lacustres constituent donc des endroits privilégiés, surtout pendant l'été, pour le développement des BSR.

6.2.3. Action dépolluante

Les BSR peuvent également avoir une action dépolluante dans les eaux où se répandent les déchets provenant des villes et des industries. L'aniline, le résorcinol, les mono- et dichlorophénols peuvent être utilisés par ces bactéries comme donneurs d'électrons pour la réduction des sulfates.

Figure 2 : Le cycle biologique du soufre (d'après Le Faou A *et al.*)



7. LES BACTERIES SULFATO-REDUCTRICES HUMAINES ET ANIMALES

7.1. Introduction

Les BSR sont présentes en grande quantité dans la partie distale du côlon, en moyenne $10^7/g$ de selles (39, 117). Parmi les BSR, les genres *Desulfotomaculum*, *Desulfobacter*, *Desulfobulbus*, *Desulfomonas* et *Desulfovibrio* ont été isolés du tube digestif de l'homme, mais les genres prédominants sont *Desulfomonas* et *Desulfovibrio* (6, 37, 38, 70). La prévalence de *Desulfovibrio* dans les selles est fonction de la population étudiée et de la technique de détection utilisée. Jusqu'à présent, toutes les recherches ont été effectuées par cultures et environ 1 personne en bonne santé sur 2 est porteuse de ces bactéries (39).

7.2. Caractères bactériologiques du genre *Desulfomonas*

Moore a créé en 1976, sur la base d'arguments phénotypiques, le genre *Desulfomonas* (*Dm.*) avec une espèce unique *Desulfomonas pigra* (70). Il avait obtenu à partir de selles humaines 11 isolats de BSR proches du genre *Desulfovibrio* mais en bâtonnets et immobiles. Depuis cette époque, *Dm. pigra* est considéré comme une espèce commensale du tube digestif de l'homme, mais elle reste mal connue puisqu'elle n'a fait l'objet que de 2 publications (70, 100).

Desulfomonas a pour espèce type *Dm. pigra* ATCC 29098^T (isolée de selles humaines). Elle est prise comme modèle de description.

✓ Morphologie (82, 115)

Dm. pigra est un bacille droit à Gram négatif de 0,8 à 1,0 μm de diamètre sur 2,5 à 10 μm de long. Il est immobile et non sporulé.

✓ Caractères cultureux

Dm. pigra est une espèce mésophile. La température optimale de croissance est de 34 à 37°C.

✓ Caractères biochimiques

La sulfite réductase de *Dm. pigra* est une désulfovirdine (100). C'est une hémoprotéine cytoplasmique de couleur verte très abondante chez *Desulfomonas* et *Desulfovibrio*. Par rapport

aux autres sulfites réductases des BSR, elle est caractérisée par son maximum d'absorption dans le visible à 628 nm. C'est un hétéro-oligomère d'environ 200 kDa qui est constitué de 3 sous-unités α , β et γ ($\alpha_2\beta_2\gamma_2$) respectivement de 50, 40 et 11 kDa (77). *Dm. pigra* est également caractérisé par ses cytochrome et ménaquinone principaux, respectivement de type c_3 et MK-6 (82, 100). Le cytochrome c_3 contient 4 hèmes par molécule et est présent dans la membrane cytoplasmique du côté périplasmique. C'est le premier cytochrome découvert chez une bactérie anaérobie stricte non photosynthétique (81). La ménaquinone MK-6 (vitamine K_2) est un transporteur d'électrons de la chaîne respiratoire de la membrane cytoplasmique.

Dm. pigra réduit les sulfates grâce à l'oxydation d'un composé donneur d'électrons en acétate. Cette oxydation est dite incomplète car elle s'arrête à la formation d'acétate (22, 115). Ceci est dû à l'absence de mécanisme d'oxydation de l'acétyl-CoA qui est caractéristique de *Desulfomonas* et *Desulfovibrio*. Par conséquent, ces bactéries ne peuvent pas utiliser l'acétate en tant que source de carbone. Les principaux donneurs d'électrons utilisés par *Dm. pigra* sont le lactate, le pyruvate, l'hydrogène et l'éthanol. *Dm. pigra* fermente le pyruvate (82).

Dm. pigra est non saccharolytique et non protéolytique.

✓ Caractères génomiques

Le contenu moyen en G+C du génome de *Dm. pigra* est de 66% (70, 82).

7.3. Caractères bactériologiques du genre *Desulfovibrio*

Le genre *Desulfovibrio* comprend actuellement 30 espèces. *D. desulfuricans* et *D. vulgaris* sont divisées en sous-espèces, respectivement subsp. *aestuarii* et subsp. *desulfuricans* ainsi que subsp. *oxamicus* et subsp. *vulgaris*. *Desulfovibrio* a pour espèce type *D. desulfuricans* subsp. *desulfuricans* Essex 6 ATCC 29577^T (isolée du sol). Elle est prise comme modèle de description.

✓ Morphologie (82, 115)

D. desulfuricans est un bacille à Gram négatif incurvé, typiquement en forme de virgule, de 0,5 à 1,0 μm de diamètre sur 3,0 à 5,0 μm de long. La morphologie est très influencée par l'âge et l'environnement. Des formes spiralées, résultant de la juxtaposition de plusieurs corps bactériens, peuvent être observées, notamment dans les cultures vieilles ou stressées (antibiotiques, déficit en Mg^{2+}). *D. desulfuricans* est mobile par un flagelle polaire et non sporulé.

Il existe une espèce de grande taille (*D. gigas*) (57) et une espèce immobile (*D. carbinolicus*) (72).

✓ Caractères cultureux

D. desulfuricans est une espèce mésophile. La température optimale de croissance est de 34 à 37°C, mais une croissance peut être observée de 25 à 45°C.

✓ Caractères biochimiques

La sulfite réductase de *D. desulfuricans* est une désulfovirdine (56). Comme *Dm. pigra*, *D. desulfuricans* est caractérisé par ses cytochrome et ménaquinone principaux, respectivement de type *c*₃ et MK-6 (68, 82, 100).

D. desulfuricans réduit les sulfates, sulfites, thiosulfates et tétrathionates (22, 115). Certaines souches de *D. desulfuricans* réduisent les nitrates (*D. desulfuricans* subsp. *desulfuricans* MB ATCC 27774). Ces réductions se font grâce à l'oxydation incomplète d'un composé donneur d'électrons en acétate (115). Les principaux donneurs d'électrons utilisés par *D. desulfuricans* sont le lactate, le pyruvate, l'hydrogène, l'éthanol, le formate, le fumarate, le succinate, le malate, le valérate, la choline, le méthanol, le propanol et le butanol. *D. desulfuricans* fermente le pyruvate, la choline, le malate et le fumarate (82).

D. desulfuricans est non saccharolytique et non protéolytique.

La comparaison des esters méthylés des acides gras cellulaires de souches de *D. desulfuricans* intestinales (6 souches) et environnementales (9 souches dont la souche de collection *D. desulfuricans* subsp. *desulfuricans* Essex 6^T) par chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse a montré l'homogénéité des souches intestinales de *Desulfovibrio* (26).

✓ Caractères génomiques

La taille du génome de *D. desulfuricans* est de 2,1.10⁶ paires de bases (82). *D. gigas* et *D. vulgaris* ont un génome plus petit, d'environ 1,7.10⁶ paires de bases (110). Certaines souches de *D. desulfuricans* contiennent des plasmides (115). Le contenu moyen en G+C du génome de *D. desulfuricans* est de 59% (22, 70, 82). Le contenu moyen en G+C du génome varie de 49 à 65% à l'intérieur du genre *Desulfovibrio* (12) alors que la variation maximale au sein d'un même genre devrait être de 10% (109).

7.4. Pouvoir pathogène des BSR

Encore récemment, les BSR étaient considérées comme non pathogènes pour l'homme (82). Cependant, leur isolement répété du tube digestif de l'homme et de l'animal a amené à penser qu'elles pourraient être associées à des pathologies inflammatoires chroniques d'étiologies inconnues (maladies inflammatoires chroniques intestinales et parodontites). D'autre part, des souches de *Desulfovibrio* ont été isolées au cours de processus infectieux, le plus souvent d'abcès abdominaux ou d'hémocultures. Le nom de *D. fairfieldensis* a récemment été proposé pour plusieurs isolats, obtenus le plus souvent en culture pure, dont les caractères les différencient des autres BSR et qui n'ont jamais été isolés de l'environnement jusqu'à présent.

7.4.1. Chez l'animal

7.4.1.1. Atteintes inflammatoires intestinales

Chez le furet et le hamster, *Desulfovibrio* a été mis en cause dans des atteintes intestinales caractérisées par une diarrhée aqueuse sanglante, avec anorexie et perte de poids, pouvant entraîner la mort de l'animal (34, 61). L'examen histopathologique montre une prolifération et une hyperplasie des cellules à mucus et un infiltrat inflammatoire. La recherche et le séquençage du gène de l'ARN ribosomal 16S (ADNr 16S) a montré que des bactéries du genre *Desulfovibrio* sont présentes dans les cellules épithéliales. L'espèce de *Desulfovibrio* phylogénétiquement la plus proche de cet agent pathogène est *D. desulfuricans*. Chez le porc, une pathologie intestinale voisine existe (35, 54). Sa nature infectieuse et transmissible par voie orale a été démontrée. L'étude de l'ADNr 16S a montré que l'agent infectieux en cause, initialement appelé "*Ileal Symbiont Intracellularis*", est phylogénétiquement proche des espèces de *Desulfovibrio*. Il possède cependant des différences phénotypiques avec ces dernières, notamment son caractère intracellulaire obligatoire. Il a été inclus dans la famille des *Desulfovibrionaceae*, mais a reçu le nom de *Lawsonia intracellularis* (67).

7.4.1.2. Bactériémie

Une souche de *Desulfovibrio* a été isolée en culture pure d'une hémoculture effectuée chez un chien (98). L'altération grave de l'état général du chien est à l'origine de la réalisation de cet examen. La souche a été identifiée comme étant un *D. desulfuricans* par séquençage de l'ADNr 16S.

7.4.1.3. Polioencéphalomalacie

L'H₂S pourrait être responsable d'une maladie métabolique neurologique des ruminants, la polioencéphalomalacie ou nécrose cérébrocorticale (14, 42, 43). Les principaux symptômes de cette maladie sont la désorientation, la perte de l'appétit, l'ataxie, l'aveuglement progressif et les convulsions. La polioencéphalomalacie atteint le plus souvent de jeunes animaux et peut être mortelle. L'étiologie de cette maladie n'est pas connue, mais une des causes possibles est une production importante d'H₂S par les BSR intestinales du fait d'une surcharge alimentaire en composés soufrés. La toxicité nerveuse de l'H₂S expliquerait les symptômes observés au cours de la maladie. Cependant, la polioencéphalomalacie pourrait également résulter d'un déficit en thiamine ou d'une intoxication par le plomb.

7.4.2. Chez l'homme

7.4.2.1. Maladies inflammatoires chroniques intestinales

Les BSR ont été mises en cause dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), notamment dans la rectocolite hémorragique (RCH) (16, 37, 39, 117). Cependant, les différentes études cliniques se sont contentées de rechercher et de numérer les BSR dans les selles de malades et de témoins, sans identifier les espèces. Il a ainsi été montré que la prévalence de *Desulfovibrio* est plus importante dans les selles de sujets atteints de RCH que dans celles de personnes saines (39). Une concentration d'H₂S plus élevée dans les selles de malades que dans les selles de sujets sains a également été rapportée (79).

Ces microorganismes pourraient être responsables, comme chez l'animal, d'atteintes locales par envahissement de l'épithélium intestinal. *Lawsonia intracellularis* a donc été recherché dans les biopsies rectales de patients atteints de RCH par immuno-histochimie à l'aide d'anticorps monoclonaux murins spécifiques (78). Cette recherche a été négative, cependant, elle ne permet pas d'exclure l'existence de souches humaines invasives de BSR du fait des différences antigéniques probables entre les souches humaines et animales.

7.4.2.2. Parodontites et caries

Récemment, les BSR ont également été mises en cause dans les parodontites. La fréquence de détection des BSR est significativement augmentée au sein des poches parodontales par rapport aux régions buccales saines (50, 51). La prévalence des BSR augmente avec la sévérité de l'atteinte parodontale, notamment avec la profondeur de la poche. L'étude des substrats donneurs

d'électrons utilisables par les BSR isolées a montré que le principal genre bactérien est *Desulfovibrio*, mais les espèces n'ont pas été identifiées (108, 116). Les BSR ont également été isolées de caries dentaires (97).

7.4.2.3. Pathologies infectieuses chirurgicales

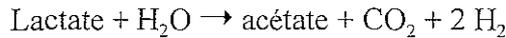
Jusqu'à présent, 15 isollements de BSR ont été décrits. Parmi ceux-ci, 13 ont été identifiés en tant que *D. fairfieldensis* (7 souches), *D. desulfuricans* (5 souches) et *D. vulgaris* (1 souche) (3, 47, 49, 64, 65, 66, 80, 94, 104). Ces bactéries proviennent d'abcès intra-abdominaux et de paroi abdominale (8 souches), d'hémocultures (5 souches), d'un abcès cérébral et d'une urine. Toutes ces infections sont à point de départ digestif. L'infection urinaire a été observée chez une femme et résulte probablement d'une contamination par la flore fécale. Quatre isollements en culture pure ont été rapportés (*D. fairfieldensis* : 3 souches et *D. desulfuricans* : 1 souche). Dans les autres cas, la souche de BSR était associée à une flore souvent polymorphe, d'origine digestive.

7.5. Physiopathologie

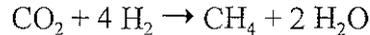
7.5.1. Physiologie des BSR dans le tube digestif

Pour assurer la production d'énergie, les BSR nécessitent soit des sulfates, soit du pyruvate. La source d'ions sulfates est double : exogène par l'alimentation et/ou endogène par clivage de résidus sulfatés de glycoprotéines. La réduction des sulfates nécessite un apport d'électrons qui peut être obtenu par l'oxydation de substrats organiques de faible poids moléculaire ou d'hydrogène. Dans le tube digestif, ces composés proviennent des fermentations bactériennes (15). Au sein du tube digestif, les BSR interviennent en bout de chaîne, après la dégradation organique par les bactéries anaérobies fermentatives. L'hydrogène gazeux est le donneur d'électrons le plus fréquemment utilisé par les BSR (15). Il peut être métabolisé par les BSR ou par les bactéries méthanogènes (15, 40, 82). Il existe donc une compétition entre ces 2 groupes de bactéries pour l'utilisation de l'hydrogène. Les ions sulfates disponibles permettent aux BSR de se développer aux dépens des bactéries méthanogènes car les BSR ont une affinité plus grande pour l'hydrogène. Quand les ions sulfates sont présents à de très faibles concentrations, un transfert interspécifique d'hydrogène peut se mettre en place et une croissance à la fois des BSR et des bactéries méthanogènes est observée (10, 105). Dans ce cas, une association

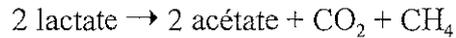
symbiotique existe entre BSR et méthanogènes. Les BSR utilisent un composé organique (lactate) pour former de l'hydrogène en petites quantités pour la croissance des méthanogènes :



La réaction n'est pas favorable sur le plan thermodynamique, mais l'hydrogène formé sert de substrat, ce qui déplace l'équilibre de la réaction vers la formation de l'hydrogène par les BSR:



Bilan du transfert interspécifique d'hydrogène :



7.5.2. Facteurs de virulence

Les facteurs de virulence correspondent aux structures, enzymes, toxines et résidus du métabolisme des bactéries qui contribuent à l'expression du pouvoir pathogène. Ils sont habituellement divisés en facteurs favorisant la colonisation et l'invasion des tissus de l'hôte (e.g., fimbriae et capsule) et en facteurs responsables d'effets délétères pour l'hôte (e.g., enzymes hydrolytiques et toxines) (91). Jusqu'à présent, aucun facteur de virulence n'a été décrit chez les BSR mis à part l'H₂S. Ces bactéries ne sont donc pas considérées comme des agents pathogènes, mais plutôt comme des bactéries commensales pouvant, dans certaines circonstances, être responsables d'infections ou de maladies.

7.5.2.1. Métabolite cytotoxique : H₂S (5)

L'H₂S est un gaz irritant et asphyxiant pour l'homme à de faibles concentrations. Il provoque une action locale d'irritation et d'inflammation des yeux et du tractus respiratoire à partir de 50 ppm . A cette concentration, sa présence est détectable du fait de son odeur caractéristique. Par contre, à partir de 100 ppm, une perte de la sensation de cette odeur survient du fait de la toxicité nerveuse de l'H₂S. A partir de 500 ppm, il a une action nerveuse systémique avec paralysie du centre respiratoire. A partir de 900 ppm, la mort est instantanée. Comme le cyanure, l'H₂S est un puissant inhibiteur des chaînes respiratoires cellulaires. Il inhibe *in vitro* la cytochrome *c* oxydase et l'anhydrase carbonique (73).

Les BSR ont été impliquées dans les MICI et dans les parodontites du fait d'une production importante d'H₂S dans le côlon et dans les poches parodontales. L'H₂S pourrait participer à l'initiation et/ou à l'entretien, voire l'aggravation, des lésions observées au cours de ces pathologies (60, 90). *In vitro*, l'H₂S provoque une inhibition de l'oxydation du butyrate par

les cellules épithéliales coliques (16, 79). Le butyrate est un acide gras volatile produit lors de la fermentation des sucres par les bactéries intestinales. C'est un facteur de différenciation cellulaire qui possède une action trophique sur les cellules coliques et représente environ 70% des sources énergétiques de ces cellules. L'H₂S entraînerait ainsi un déficit énergétique intracellulaire aboutissant à la souffrance, voire à la mort cellulaire. Il a été avancé que la RCH serait une maladie métabolique qui pourrait être due à un tel processus (89).

7.5.2.2. Autres facteurs pouvant intervenir dans la virulence

✓ Tolérance à l'oxygène

Le pouvoir pathogène des souches de *Bacteroides fragilis* tolérantes à l'oxygène est plus important que celui des souches sensibles à l'oxygène. La tolérance à l'oxygène des BSR leur donne un avantage sélectif par rapport à d'autres bactéries anaérobies.

✓ Mobilité

La mobilité joue un rôle dans les interactions entre les bactéries et l'hôte. Seules des espèces mobiles de BSR ont été isolées chez l'homme en culture pure dans des processus infectieux en dehors du tube digestif.

✓ Adhérence et colonisation de l'hôte

La première étape de l'établissement d'une infection provient de la capacité de la bactérie à adhérer aux cellules de l'hôte. Cette adhérence résulte habituellement de l'interaction entre des protéines bactériennes (adhésines) et des récepteurs cellulaires. La formation de biofilms du fait de l'existence chez la bactérie d'une matrice polysaccharidique extracellulaire peut également être en cause. La capacité des BSR à adhérer aux cellules épithéliales digestives n'est pas connue.

✓ Acquisition du fer

Le fer participe à la constitution des protéines impliquées dans le métabolisme respiratoire des BSR (hydrogénases, cytochromes). Chez l'homme, il n'y a pas de fer libre disponible pour les bactéries puisqu'il est lié à des protéines (lactoferrine, transferrine, ferritine et hémine). Pour survivre dans l'organisme humain, les bactéries possèdent habituellement des protéines capables de chélater le fer avec une plus grande affinité que les protéines humaines (sidérophores). Des protéines ayant ce rôle n'ont jamais été décrites chez les BSR.

✓ Variation antigénique

Le mimétisme moléculaire permet d'expliquer l'échappement au système immunitaire de l'hôte de bactéries pathogènes à tropisme digestif (*Helicobacter pylori*) (29). Au cours de ce phénomène, les antigènes bactériens varient sous la pression du système immunitaire de l'hôte. Les BSR ont été associées aux MICI et aux parodontites, au cours desquelles les périodes non symptomatiques et les périodes de rechute alternent. Le système immunitaire de l'hôte ainsi que la flore bactérienne digestive jouent certainement un rôle dans ces pathologies (32). L'alternance de périodes non symptomatiques et de périodes de rechute pourrait résulter de la variation d'antigènes de bactéries digestives. Les périodes de rechutes correspondraient à une réponse inappropriée du système immunitaire contre un ou plusieurs antigènes bactériens.

✓ Enzymes hydrolytiques

Contrairement aux autres bactéries anaérobies du tube digestif, les espèces de *Desulfomonas* et de *Desulfovibrio* ne possèdent pas d'enzymes hydrolytiques. Une hypothèse séduisante serait qu'elles possèdent une sulfatase, qui contribuerait à la production d'énergie en cas de déficit en sulfates en hydrolysant les résidus sulfatés de la mucine. La mucine est une glycoprotéine dont la teneur en sulfate varie de 0,4 à 7% (p/p) (88). La sulfatation de cette molécule est plus importante dans les zones du tube digestif où la colonisation bactérienne est la plus dense. La sulfatation participe à l'action de défense anti-bactérienne de la mucine, notamment en augmentant sa viscosité et sa résistance à l'action des enzymes bactériennes (e.g., glycosidases) (88, 107). Une diminution de la sulfatation de la mucine rectale dont l'origine n'est pas connue a été montrée chez des patients atteints de RCH (84). La désulfatation du mucus protecteur pourrait avoir un rôle dans la physiopathologie des MICI. Des sulfatases ont été décrites chez différentes espèces appartenant aux genres *Bacteroides*, *Prevotella* et *Streptococcus* (86, 87, 88, 106). Les BSR pourraient également posséder ces enzymes, qui leur fourniraient un avantage métabolique en leur permettant d'obtenir le substrat pour leur métabolisme énergétique.

✓ Endotoxine

L'endotoxine est un lipopolysaccharide (LPS) appartenant à la membrane externe de toutes les bactéries à Gram négatif et qui est donc présent chez les espèces de *Desulfomonas* et de *Desulfovibrio*.

✓ Résistance aux antibiotiques

Les isolats humains de *D. fairfieldensis* sont résistants aux β -lactamines (49, 64, 66, 104). Par rapport aux espèces sensibles aux β -lactamines, cette résistance confère un avantage sélectif pour la colonisation de patients en milieu hospitalier.

7.6. Diagnostic bactériologique des infections à BSR

Il n'existe pas de tests commercialisés pour effectuer le diagnostic (direct ou indirect) d'une infection à BSR à partir de prélèvements biologiques humains.

7.6.1. Prélèvements biologiques

✓ Nature

Les principaux prélèvements à partir desquels les BSR peuvent être isolées au cours d'infections sont les collections purulentes (abcès abdominaux et cérébraux, liquides péritonéaux), le sang, les urines, les selles et les prélèvements de poches parodontales.

✓ Traitement

Les collections purulentes sont prélevées, après décontamination de la surface, par aspiration à l'aide d'une aiguille montée sur une seringue. L'échantillon recueilli est injecté dans un milieu de transport anaérobie (Portagerm® [bioMérieux, Marcy l'Etoile, France]), après avoir chassé les bulles d'air et adapté une nouvelle aiguille stérile sur la seringue pour éviter une contamination. Les flacons d'hémocultures anaérobies sont utilisés pour le sang. Les urines et les selles sont prélevées dans des récipients stériles en évitant les contaminations. Les prélèvements de poches parodontales sont effectués à l'aide d'une pointe de papier endodontique stérile, placée ensuite dans un milieu de transport ou un milieu de culture liquide.

Les prélèvements doivent être mis en culture le plus rapidement possible de manière à limiter le temps d'exposition à l'oxygène. Un milieu de transport protégeant l'échantillon des effets délétères de l'oxygène est recommandé. Il est préférable de laisser le prélèvement au frigo (+4°C) dans l'attente de la culture.

7.6.2. Culture

✓ Milieux non spécifiques

Les BSR poussent sur certains milieux usuels de bactériologie médicale (milieux enrichis tels que flacons d'hémocultures anaérobies ou géloses Wilkins-Chalgren [Oxoid, Dardilly, France] contenant 5% de sang de mouton).

✓ Milieux spécifiques

Les milieux de culture spécifiques des BSR contiennent des sulfates, des ions ferreux et un composé organique donneur d'électrons et source de carbone, en général du lactate (Tableau I) (82, 115). Les milieux spécifiques peuvent être liquides ou solides. Il n'existe pas de milieu sélectif pour l'isolement des BSR.

7.6.3. Identification

✓ Caractères cultureux

La croissance des BSR humaines nécessite l'absence d'oxygène et une incubation des milieux à 37°C. Cette croissance est lente (5 à 10 jours lors du primo-isolement). Sur milieu gélosé de Wilkins-Chalgren contenant 5% de sang de mouton, les colonies de *Dm. pigra* sont brunes, non hémolytiques, de 0,5 mm de diamètre, et les colonies de *D. fairfieldensis* ou de *D. desulfuricans* sont translucides, grises ou brunes, non hémolytiques, en tête d'épingle. En milieu liquide spécifique, la croissance des BSR est détectée par l'apparition d'un précipité noir de sulfure de fer. En milieu solide spécifique, les colonies de BSR sont noires. Les cultures de ces bactéries ont une odeur nauséabonde caractéristique.

Tableau I : Composition des milieux de culture pour bactéries sulfato-réductrices

| Constituants (g.L ⁻¹) | Milieux de culture ^a | | | | |
|---------------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|----------|----------|----------|
| | Milieu de Starkey | Milieux de Postgate ^b | | | |
| | | Milieu B | Milieu C | Milieu D | Milieu E |
| NH ₄ Cl | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| MgSO ₄ .7 H ₂ O | 2 | 2 | 0,06 | | |
| Na ₂ SO ₄ | 4 | | 4,5 | | 1 |
| K ₂ HPO ₄ | 0,5 | | | | |
| Extrait de levure | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Lactate de sodium | 4,5 | 3,5 | 6 | | 3,5 |
| Oligoéléments ^c | 1 ml | | | | |
| Résazurine | 6 gouttes | | | | |
| CaCl ₂ .2 H ₂ O | | | | 0,1 | |
| CaCl ₂ .6 H ₂ O | | | 0,06 | | 1 |
| Citrate de sodium.2 H ₂ O | | | 0,3 | | |
| Acide thioglycolique | | 0,1 | | | 0,1 |
| Acide ascorbique | | 0,1 | | | 0,1 |
| FeSO ₄ .7 H ₂ O | | 0,5 | 0,004 | 0,004 | 0,5 |
| CaSO ₄ | | 1 | | | |
| MgCl ₂ .6 H ₂ O | | | | 1,6 | |
| MgCl ₂ .7 H ₂ O | | | | | 2 |
| Pyruvate de sodium | | | | 3,5 | |
| KH ₂ PO ₄ | | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 |
| Agar | | | | | 15 |

^a Ajuster le pH des milieux entre 7 et 7,5.

^b B : milieu usuel pour le diagnostic et la conservation à long terme des souches, C : milieu pour la culture de masse (le citrate limite l'apparition du précipité de sulfure de fer), D : milieu sans sulfate pour le diagnostic, E : milieu solide pour l'isolement et la numération.

^c Composition de la solution d'oligoéléments (g.L⁻¹) : MgO : 10,75 ; CaCO₃ : 2 ; citrate de fer : 6 ; ZnSO₄.7 H₂O : 1,44 ; MnSO₄.4 H₂O : 1,12 ; CuSO₄.5 H₂O : 0,25 ; CoSO₄.7 H₂O : 0,9 ; H₃BO₃ : 0,06 ; Na₂MoO₄.2 H₂O : 0,1 ; NiCl₂.6 H₂O : 0,1 ; Na₂SeO₃ : 0,05 ; HCl concentré : 51,3 mL.

✓ Aspect après coloration de Gram

Dm. pigra est un bacille à Gram négatif en bâtonnet. *D. fairfieldensis* et *D. desulfuricans* sont des bacilles à Gram négatif de forme incurvée.

✓ Mobilité

Dm. pigra est immobile. *D. fairfieldensis* et *D. desulfuricans* sont mobiles par un flagelle polaire.

✓ Caractères biochimiques

Les espèces de *Desulfomonas* et de *Desulfovibrio* sont asaccharolytiques, non protéolytiques, réduisent les sulfates en sulfures et possèdent une désulfovirdine. Le test de la désulfovirdine est effectué sur un culot bactérien (pas obligatoirement pur) auquel on ajoute quelques gouttes de NaOH 2N. En cas de positivité, l'observation rapide du culot sous une lampe ultra-violette (365 nm) montre une fluorescence rouge provoquée par la libération d'un chromophore : la sirohydrochlorine (82, 113). *D. desulfuricans* et *D. fairfieldensis* ne peuvent pas être distingués par les tests biochimiques et sont donc le plus souvent identifiés comme *Desulfovibrio* sp.

✓ Biologie moléculaire

Seule la détermination de la séquence de l'ADNr 16S permet actuellement de différencier *D. fairfieldensis* de *D. desulfuricans*. La recherche de BSR peut également être effectuée par amplification génique d'une partie du gène de l'APS réductase (21, 118).

7.6.4. Sensibilité aux antibiotiques

Les BSR humaines sont des bactéries anaérobies à croissance lente. Leur sensibilité aux antibiotiques doit donc être interprétée après une incubation prolongée (au minimum 72 heures), quand la croissance est suffisante. La méthode de référence est la technique par dilution.

✓ Techniques

- Diffusion en milieu gélosé de Wilkins-Chalgren contenant 5% de sang de mouton, avec un inoculum de turbidité équivalente à celle du standard de Mac Farland n° 1 (10^8 CFU/mL) et une incubation en chambre anaérobie à 37°C pendant 96 heures.

- Dilution en milieu gélosé de Wilkins-Chalgren contenant 5% de sang de mouton, avec un inoculum de 6.10^5 CFU/spot et une incubation en chambre anaérobie à 37°C pendant 96 heures.

✓ Résultats

Parmi 14 isolats de *Desulfovibrio* étudiés, toutes les souches étaient sensibles à l'imipenem (Tableau II) (Mory F, Weber M, Lozniewski A ; communication affichée, 20^{ème} Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Antiinfectieuse, 7-8 décembre 2000, Paris). Treize souches résistaient à une ou plusieurs β -lactamines. Cinq isolats possédaient une β -lactamase mise en évidence par le test à la nitrocéfine et la restauration de l'activité antibiotique en présence d'inhibiteurs de β -lactamase. La résistance des autres souches résultait probablement d'un mécanisme différent. Cette résistance aux β -lactamines mettant en jeu plusieurs mécanismes peut également être observée par comparaison des profils de sensibilité aux antibiotiques de 4 souches de *D. fairfieldensis* (49, 64, 66, 104).

Tous les isolats de *Desulfovibrio* décrits étaient sensibles au métronidazole et à la clindamycine, antibiotiques fréquemment prescrits pour lutter contre les infections à bactéries anaérobies.

**Tableau II : Sensibilité aux β -lactamines de 14 isolats de *Desulfovibrio*
(d'après F. Mory *et al.*)**

| Antibiotiques | CMI (mg.L ⁻¹) | | | % de souches sensibles ^a |
|--------------------------|---------------------------|------|------|-------------------------------------|
| | Intervalle | 50% | 90% | |
| Pénicilline G | 1-64 | 32 | 64 | 0 |
| Amoxicilline | 0,5-128 | 64 | 128 | 7 |
| Amoxicilline-clavulanate | 0,25-32 | 8 | 32 | 43 |
| Ticarcilline | 2-256 | 256 | 256 | 29 |
| Ticarcilline-clavulanate | 2-256 | 128 | 256 | 43 |
| Piperacilline | 128->256 | >256 | >256 | 0 |
| Piperacilline-tazobactam | 64->256 | >256 | >256 | 0 |
| Céfotaxime | 2-256 | 64 | 128 | 21 |
| Céfotaxime-sulbactam | ≤0,06-256 | 64 | 128 | 43 |
| Céfoxitine | 32->256 | 256 | >256 | 0 |
| Céfotetan | 4-256 | 128 | 256 | 7 |
| Imipenem | 0,25-2 | 0,5 | 1 | 100 |

^aSelon les recommandations du Comité de L'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie.

8. *BILOPHILA WADSWORTHIA*

Bilophila wadsworthia est un bacille anaérobie strict, à coloration de Gram négative, immobile, asporulé, asaccharolytique, dont la croissance est stimulée par la bile (1, 4). Toutes les souches sont positives pour la recherche de catalase et environ 75% sont positives pour la recherche d'uréase. *B. wadsworthia* est isolé du tube digestif de l'homme et des animaux et est présent dans environ 50% des selles humaines. Il a été isolé de poches parodontales canines et également de l'environnement (52). L'étude du gène de l'ARN ribosomal 16S a montré que *B. wadsworthia* est phylogénétiquement proche de *Desulfovibrio*, c'est pourquoi il appartient à la famille des *Desulfovibrionaceae*. D'ailleurs, une étude de la prévalence des différents genres sulfato-réducteurs dans l'environnement a abouti à la définition d'une sonde spécifique de *Desulfovibrio*, correspondant à une région du gène de l'ARN ribosomal 16S, qui est également spécifique de *B. wadsworthia* (24). *B. wadsworthia* ne réduit pas les sulfates, mais réduit les sulfites et les thiosulfates en sulfures (52). Il possède une sulfite réductase qui est une désulfovirdine (53) et une chaîne de transport d'électrons (présence de cytochrome *c* et de ménaquinone). *B. wadsworthia* pourrait donc descendre d'un ancêtre sulfato-réducteur et avoir perdu un ou plusieurs gène(s) indispensable(s) à la réduction des sulfates en sulfites.

B. wadsworthia a été initialement décrit en 1988 au sein de la flore de liquides péritonéaux et d'appendices au cours d'appendicites perforantes (1, 2, 31). Il était isolé d'environ 1 prélèvement sur 2. *B. wadsworthia* est la troisième espèce isolée par ordre de fréquence dans ces prélèvements abdominaux au cours d'appendicites compliquées. Depuis lors, il a été isolé de sources cliniques variées (le plus souvent de pus intra-abdominaux, de liquides péritonéaux et d'hémocultures) et est reconnu comme une bactérie pathogène pour l'homme (4). Les facteurs de virulence de *B. wadsworthia* sont mal connus, cependant, une capacité d'adhérence aux cellules intestinales ainsi qu'une activité endotoxinique et cytotoxique ont été mises en évidence (36, 71, 96). *B. wadsworthia* est le plus souvent résistant aux β -lactamines du fait de la production d'une β -lactamase (céphalosporinase) par environ 97% des isolats (101).

SECONDE PARTIE :
MALADIES INFLAMMATOIRES
CHRONIQUES INTESTINALES
ET PARODONTITES

1. INTRODUCTION

Les maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI) et les parodontites sont des atteintes inflammatoires chroniques, d'évolution lente, d'étiologie inconnue, et qui sont dites d'origine plurifactorielle ou idiopathique. Au cours de ces maladies, une réaction inflammatoire et immunitaire incontrôlée apparaît dans une ou plusieurs régions du tube digestif. Les facteurs qui initient et entretiennent cette réaction chronique sont inconnus, mais la flore bactérienne digestive pourrait jouer un rôle important dans ce processus au cours duquel interviennent également des facteurs génétiques et environnementaux.

2. LES MALADIES INFLAMMATOIRES CHRONIQUES INTESTINALES HUMAINES

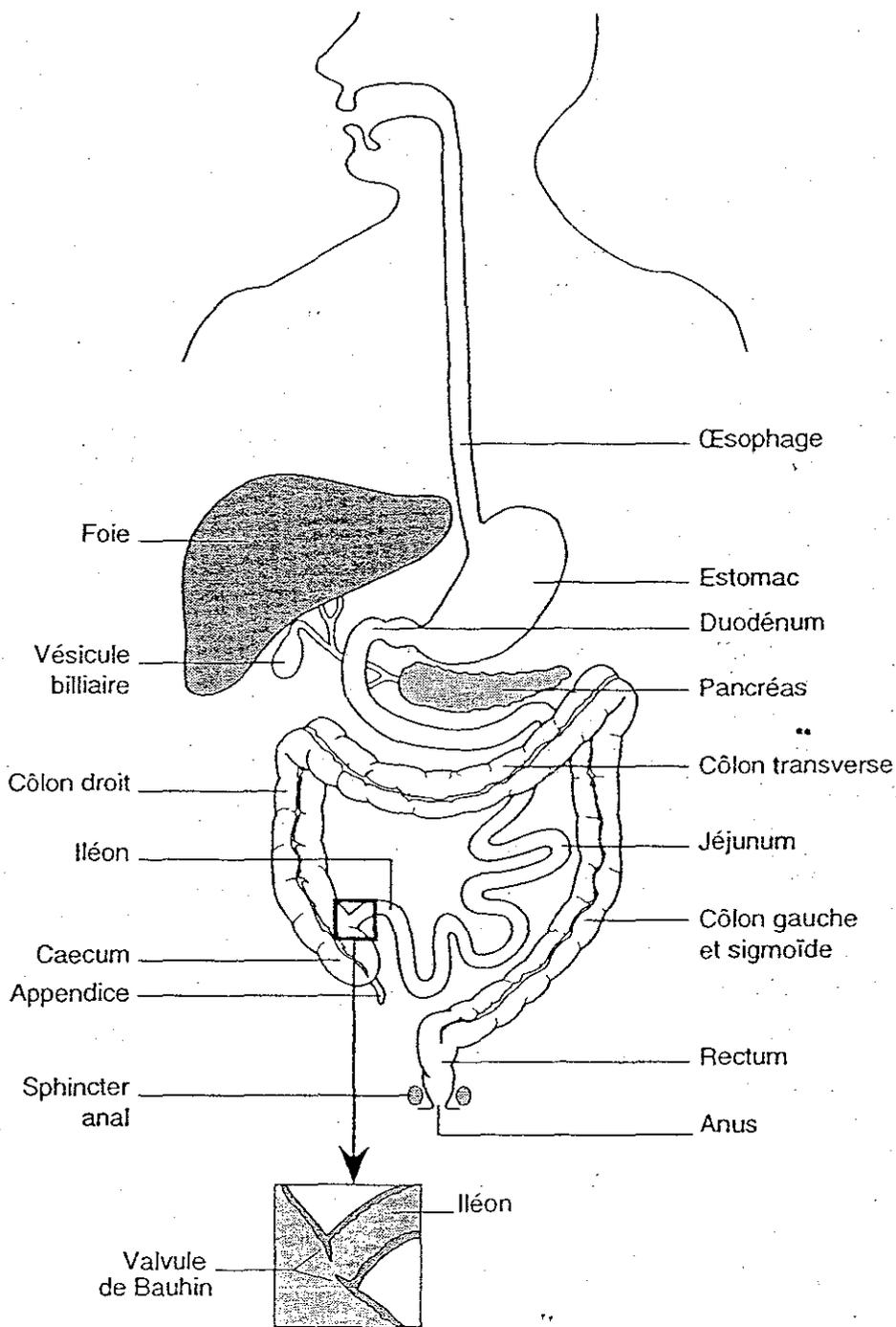
2.1. Introduction

Les MICI comprennent la maladie de Crohn (MC) et la rectocolite hémorragique (RCH). Dans leurs formes typiques, la MC et la RCH atteignent 2 régions distinctes de l'intestin, respectivement la région iléo-caecale et le rectum (Figure 3) (112). Ces maladies évoluent le plus souvent lentement et cycliquement, des périodes symptomatiques alternant avec des périodes de rémission.

2.2. Prévalence des maladies inflammatoires chroniques intestinales

Les MICI ont une prévalence plus importante dans le nord que dans le sud de la France et de l'Europe. Les prévalences de la MC et de la RCH sont respectivement d'environ 1 et 2 pour mille habitants (112). La prévalence est identique dans les 2 sexes. La MC atteint davantage les individus de race blanche. Le début de la MC ou de la RCH peut survenir à tout âge, avec une plus grande fréquence entre 20 et 40 ans. Depuis 50 ans, l'incidence de la MC a augmenté tandis que celle de la RCH est restée stable (83).

Figure 3 : L'appareil digestif humain (d'après Weill JP *et al.*)



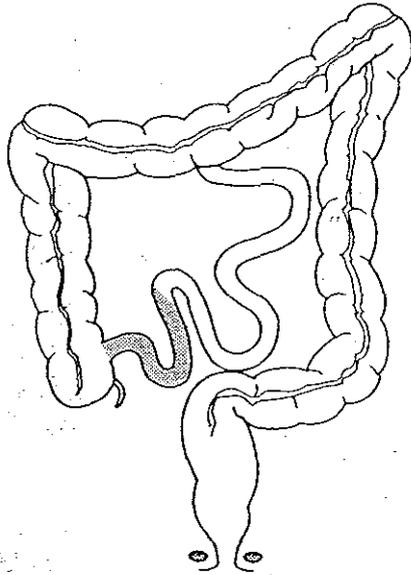
2.3. Aspects cliniques

2.3.1. La maladie de Crohn

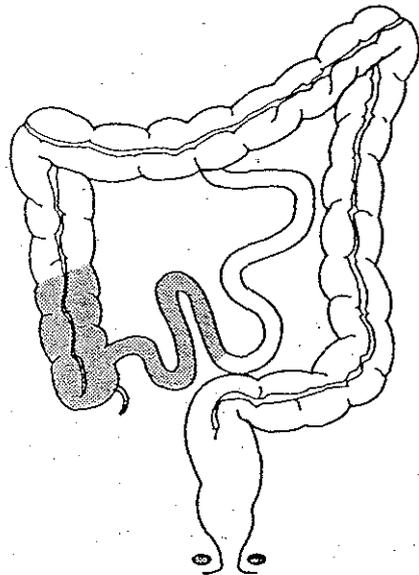
La MC a été initialement décrite par BB Crohn en 1932 à New York comme une maladie de l'iléon terminal caractérisée par une inflammation nécrosante et cicatrisante qui conduit fréquemment à l'obstruction intestinale, associée à la formation de fistules. Cette maladie atteignait surtout les adultes jeunes qui consultaient leur médecin pour diarrhée, fièvre et amaigrissement. La MC peut en fait atteindre toutes les parties du tube digestif, de la bouche à l'anus, avec une prédilection pour la région iléo-caecale et le côlon (Figure 4) (112). Les lésions sont présentes dans toute l'épaisseur de la paroi intestinale qui s'en trouve épaissie. Par rapport à la RCH, la présence de plusieurs sites lésionnels, sous la forme de foyers (atteinte focale), séparés par des zones saines est caractéristique mais pas toujours observée. Le degré de l'atteinte est très variable d'un individu à un autre. Le début de la maladie est souvent progressif. Les symptômes les plus courants sont non spécifiques : douleurs digestives (typiquement localisées dans la région appendiculaire), diarrhée et atteinte de l'état général (fièvre, manque d'appétit, perte de poids, fatigue, anémie). Le diagnostic est donc souvent tardif.

Les principales complications intestinales de la MC sont la sténose et la suppuration. Elles sont les conséquences du processus inflammatoire qui entraîne la formation d'une ulcération dans la paroi intestinale. L'ulcération peut cicatriser moyennant un rétrécissement du calibre intestinal pouvant aboutir à une sténose, voire à une occlusion. Inversement, l'ulcération peut s'étendre et provoquer une fissure dans la paroi intestinale avec constitution d'un abcès, voire d'une fistule. La survenue d'une fistule entraîne l'écoulement d'une partie du contenu intestinal vers une autre anse intestinale, la vessie, le vagin ou la peau. La survenue d'un cancer de l'intestin grêle ou du côlon est plus rare au cours de la MC que de la RCH.

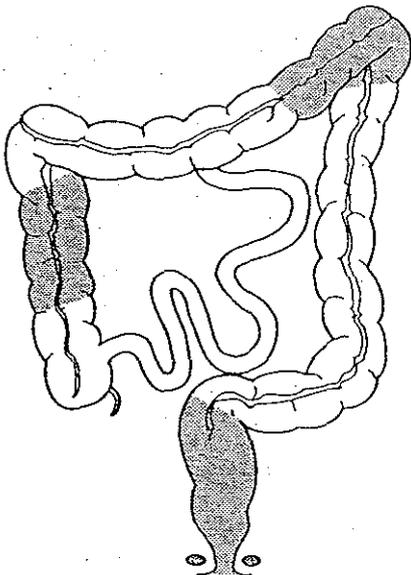
Figure 4 : Les localisations intestinales de la maladie de Crohn (d'après Weill JP *et al.*)



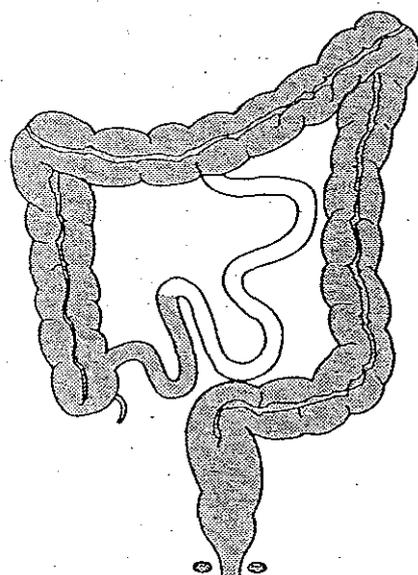
iléite terminale



iléocolite droite



lésions coliques plurisegmentaires



pancolite avec iléite

2.3.2. La rectocolite hémorragique

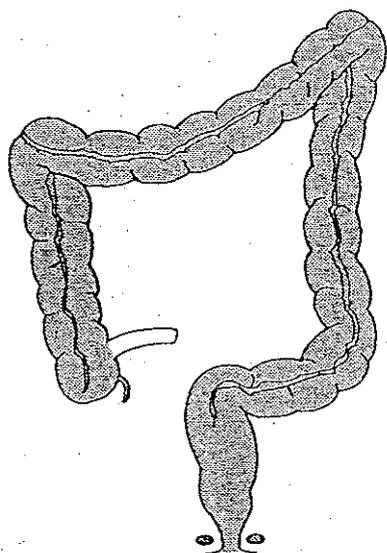
La RCH atteint le côlon et le rectum est presque toujours atteint (Figure 5) (112). Les lésions sont uniquement présentes dans la muqueuse, c'est-à-dire la partie la plus superficielle de la paroi intestinale. A la différence de la MC, il n'existe qu'un site lésionnel unique sans intervalle de muqueuse saine. L'atteinte est continue et diffuse. Les lésions sont inflammatoires et ulcératives, d'où la présence de sang dans les selles. Les symptômes non spécifiques observés dans la MC peuvent également être présents dans la RCH.

Les principales complications intestinales de la RCH sont la perforation intestinale, le mégacôlon toxique, l'hémorragie intestinale massive et le cancer colique. Le mégacôlon toxique et l'hémorragie intestinale sont des complications survenant plutôt au début de la maladie, au cours d'une poussée aiguë, et qui nécessitent une intervention chirurgicale en urgence (colectomie). Le mégacôlon toxique associe une dilatation du diamètre colique à un tableau clinique grave (état de choc). Le cancer colique est un risque majeur au cours de l'évolution d'une RCH. Ce risque augmente avec la longueur du côlon atteint et la durée de la maladie.

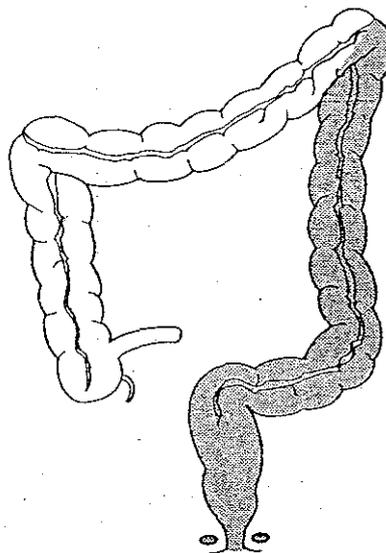
2.3.3. Les manifestations cliniques extraintestinales

Des symptômes extraintestinaux, communs à la MC et à la RCH, sont couramment observés. Ils résultent d'atteintes articulaires (arthrites), cutanées (érythème noueux), buccales (aphtes, ulcérations), hépatiques (cholestase), rénales (néphrite, lithiase) et oculaires (uvéite). L'origine de ces manifestations n'est pas connue.

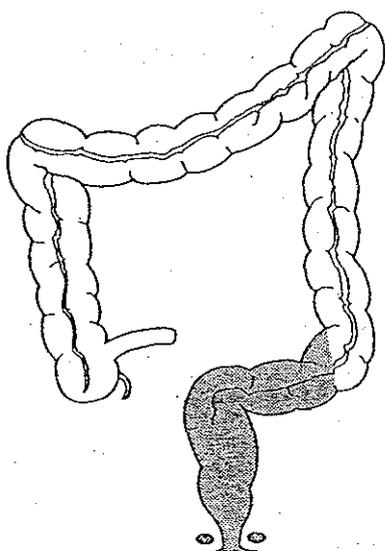
Figure 5 : Les localisations intestinales de la rectocolite hémorragique (d'après Weill JP *et al.*)



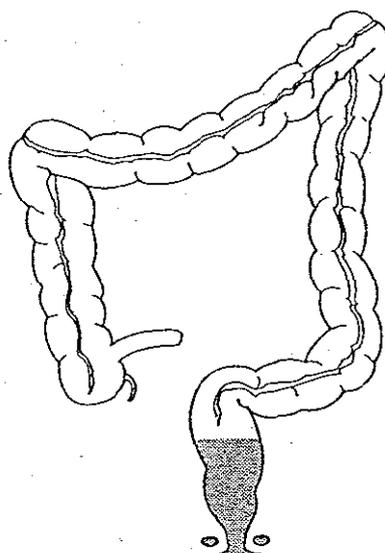
Pancolite



Rectocolite gauche



Rectosigmoïdite



Rectite (proctite)

2.4. Physiopathologie

Les lésions intestinales observées au cours des MICI sont la conséquence d'une activation non ou mal régulée du système immunitaire muqueux. Ce phénomène met en jeu à la fois des facteurs individuels (facteurs génétiques) et la flore bactérienne intestinale, indispensable à la survenue de ces maladies.

2.4.1. Modèles animaux

Ce sont des modèles murins transgéniques qui ont permis d'étudier l'influence de facteurs immunologiques et de la flore bactérienne dans la survenue des MICI. Le rôle des lymphocytes T Helpers ou des cytokines produites par les cellules immunitaires dans l'apparition d'une colite chronique chez la souris a été montré par l'étude d'animaux déficients en T Cell Receptor α ou en une cytokine donnée (28). Les modèles animaux ont également permis de montrer que la flore intestinale est indispensable au développement d'une colite chronique (27).

2.4.2. Facteurs immunologiques

Les MICI sont caractérisées par une inflammation intestinale muqueuse médiée par une activation de l'immunité humorale et cellulaire d'origine inconnue (32). Cette activation de l'immunité est à prédominance cellulaire dans la MC ou à prédominance humorale dans la RCH. Dans la MC, l'activation des cellules immunitaires (monocytes, macrophages et polynucléaires neutrophiles) entraîne une augmentation locale de la production de cytokines proinflammatoires, tel que le TNF α , qui explique la récente mise sur le marché d'anticorps anti-TNF α pour le traitement de cette maladie. Une diminution de la production des cytokines antiinflammatoires (IL 10) et une augmentation de la production des molécules d'adhésion (ICAM-1) impliquées dans la diapédèse sont également observées (95). La MC pourrait résulter d'un déséquilibre entre les réponses immunitaires des sous-populations lymphocytaires Th 1 et Th 2 en faveur de Th 1 (27). L'hypothèse d'une origine autoimmune de ces maladies a également été évoquée du fait de la présence d'autoanticorps sériques, dirigés contre des antigènes du cytoplasme des polynucléaires neutrophiles (pANCA) ou de *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA), chez les patients atteints respectivement par la RCH ou la MC (13).

2.4.3. Facteurs génétiques et environnementaux

L'étude de la transmission des MICI au sein de familles a montré une forte prédisposition familiale, notamment pour la MC (32). Des facteurs à la fois génétiques et environnementaux pourraient expliquer ce fait. Des différences d'incidence ont permis de montrer également l'existence de facteurs ethniques (population juive) prédisposants au MICI. Plusieurs gènes ont été associés à la MC (gène de l'antigène B12 du système HLA), à la RCH (gène de l'antigène A7 du système HLA) ou aux 2 maladies (gènes localisés sur les chromosomes 12 et 16 non identifiés pour l'instant) (46).

L'augmentation de l'incidence de la MC depuis 50 ans ainsi que la très inégale répartition géographique des MICI pourraient résulter de l'influence de facteurs environnementaux (32). Dans la MC, le tabagisme actif augmente le risque d'apparition et d'aggravation de la maladie. Inversement, dans la RCH, le tabagisme actif diminue le risque d'apparition et d'aggravation de la maladie. L'alimentation et le mode de vie (stress) pourraient également jouer un rôle dans l'apparition de ces maladies.

2.4.4. Facteurs microbiens

La flore digestive serait donc nécessaire à l'apparition des MICI et jouerait un rôle dans la physiopathologie de ces atteintes (11, 32, 69, 102). Les MICI pourraient résulter de la réponse immunitaire de l'organisme face à l'agression d'un agent pathogène spécifique (permanent ou transitoire) ou d'une réponse immunitaire inappropriée (93). Plusieurs microorganismes, dont des virus, ont été proposés comme agents déclenchant les MICI (e.g., *Mycobacterium paratuberculosis* et le virus de la rougeole). Mais aucune preuve n'est venue conforter cette hypothèse. Cependant, le rôle d'un agent infectieux spécifique dans la survenue de ces maladies reste possible.

2.5. Aspects thérapeutiques

Le traitement médical de la MC et de la RCH est essentiellement symptomatique et comprend l'utilisation d'antispasmodiques, d'antidiarrhéiques, d'anti-inflammatoires (dérivés salicylés et corticoïdes), d'antibiotiques (métronidazole) et d'immunosuppresseurs (azathioprine et anti-TNF α). Des précautions alimentaires sont également nécessaires du fait de l'atteinte intestinale et de la prise de certains médicaments (corticoïdes).

Le traitement chirurgical repose sur la résection du segment intestinal malade, le plus souvent en cas de complications ou d'échec du traitement médical.

3. LES PARODONTITES HUMAINES (8)

3.1. Introduction

Le parodonte est constitué par l'ensemble des tissus qui entourent et soutiennent la dent. Il comprend la gencive, l'os alvéolaire, le ligament alvéolo-dentaire et le cément. La gencive est constituée d'un épithélium gingival et d'un tissu conjonctif sous-jacent. L'os alvéolaire est la partie de l'os maxillaire et de l'os mandibulaire qui contient les alvéoles dentaires. Le ligament alvéolo-dentaire (desmodonte) est constitué de tissu conjonctif fibreux qui entoure la racine dentaire et qui attache la dent à l'alvéole osseuse. Le cément est le tissu conjonctif calcifié qui entoure la racine dentaire. Il ressemble à l'os, mais il n'est ni vascularisé ni innervé.

Le sillon gingivo-dentaire (sillon marginal), d'une profondeur de 0,5 à 2 mm, comprend l'espace le plus souvent virtuel situé entre l'émail dentaire et la partie interne de l'épithélium gingival. Le fluide gingival est le liquide qui suinte du sillon gingivo-dentaire dans lequel il peut être prélevé à l'aide de papier filtre. Il contient des cellules épithéliales desquamées, des polynucléaires, des lymphocytes, des plasmocytes et également des bactéries provenant de la plaque sous-gingivale. La plaque dentaire est un agrégat bactérien adhérent à la dent. Dès qu'une surface dentaire propre est accessible à la salive, une structure non minéralisée composée de glycoprotéines, la pellicule acquise, y adhère. C'est le premier stade de la formation de plaque dentaire. Des bactéries peuvent se fixer sur cette pellicule. La formation de polysaccharides (dextranes et levanes) par les bactéries produit une matrice qui permet la colonisation bactérienne de la dent. La plaque dentaire peut être de localisation supra- ou sous-gingivale. C'est la plaque sous-gingivale qui est à l'origine des maladies parodontales.

3.2. Prévalence des parodontites

La prévalence et la sévérité des parodontites augmentent avec l'âge. Le sexe n'influence pas la prévalence des maladies parodontales. Les populations noires et asiatiques sont plus sujettes à cette maladie que la population caucasienne. Dans la population blanche européenne et nord-américaine, la parodontite chez l'enfant et le jeune adulte a une prévalence de 0,1%. Chez l'adulte

après 35 ans, la prévalence varie selon le degré de l'atteinte parodontale. La prévalence de la parodontite sévère (patients avec des poches de 6 mm ou plus) est de 10%.

3.3. Aspects cliniques

3.3.1. Histopathologie des parodontites

La parodontite débute par l'accumulation de plaque dans le sillon gingivo-dentaire. Les premières lésions consistent en une dilatation des vaisseaux sanguins suivie d'une diapédèse des polynucléaires neutrophiles, monocytes et lymphocytes. Ces cellules s'accumulent dans le sillon gingivo-dentaire. C'est la lésion initiale et précoce qui s'accroît si le développement de la plaque n'est pas contrôlé. En l'absence d'élimination de la plaque, la vasodilatation et l'infiltrat inflammatoire augmentent et une lyse du tissu conjonctif gingival se produit en association avec une prolifération de l'épithélium gingival, ce qui augmente la profondeur du sillon gingivo-dentaire. Ce stade histologique correspond à une gingivite. L'aggravation des lésions entraîne une destruction de l'os alvéolaire avec perte de l'attache dentaire. Une poche se forme à la place du sillon gingivo-dentaire. C'est la parodontite. Toute parodontite commence par une gingivite. En revanche, une gingivite ne conduit pas toujours à une parodontite. Les parodontites se caractérisent par une perte osseuse et une migration de l'épithélium de jonction le long de la surface radiculaire. Elles affectent donc les tissus parodontaux profonds (os alvéolaire, cément et desmodonte).

3.3.2. Formes cliniques des parodontites

✓ Parodontites de l'enfant et du jeune adulte (parodontites pré-pubertaires et juvéniles)

Les atteintes parodontales peuvent être généralisées ou localisées, lorsque seulement certaines dents sont touchées. L'atteinte la mieux connue est la parodontite juvénile localisée. Elle est caractérisée par la présence de poches et une destruction osseuse localisées surtout aux incisives et aux premières molaires. La rapidité d'évolution et l'importance de la destruction osseuse contrastent avec le peu de dépôts bactériens présents et la discrétion de la réaction inflammatoire. Les lésions sont souvent bilatérales et symétriques, avec dans les poches une flore bactérienne polymorphe associée fréquemment à *Actinobacillus actinomycetemcomitans*.

✓ Parodontites à progression rapide

Elles touchent des adultes jeunes, le plus souvent entre 20 et 35 ans. Les lésions sont multiples et de topographie non systématisée. L'inflammation peut être discrète ou très marquée. Ces parodontites sont caractérisées par l'évolution rapide des destructions et la présence, au sein des poches, d'une flore bactérienne polymorphe dont *Porphyromonas gingivalis* est un élément fréquent.

✓ Parodontites de l'adulte

Elles atteignent des patients âgés de plus de 35 ans et constituent la majorité des cas de parodontites. Leur évolution est lente. Les périodes de rémission et d'activité de la maladie alternent. Les destructions tissulaires, correspondant aux périodes d'activité de la maladie, sont en relation avec la présence dans les poches parodontales d'une flore polymorphe avec surtout des anaérobies à Gram négatif.

✓ Parodontites associées à des maladies systémiques

Les patients immuno-déprimés (diabétiques, sidéens) sont plus exposés aux maladies parodontales que les individus en bonne santé.

✓ Parodontites réfractaires

Elles regroupent les parodontites à progression rapide et les parodontites de l'adulte dont l'état ne s'améliore pas après un traitement.

3.3.3. Critères cliniques d'évaluation de l'atteinte parodontale

Les paramètres cliniques sont évalués à l'aide de sondes et constituent des éléments objectifs d'appréciation de l'atteinte parodontale et de la destruction tissulaire. Des indices ont été déterminés. Ils reflètent des paramètres cliniques tels que la présence de plaque, l'inflammation, le saignement au sondage, la profondeur de la poche et la mobilité de la dent.

✓ Indices d'hygiène bucco-dentaire

Il existe une corrélation directe entre le niveau d'hygiène et le degré d'atteinte parodontale. L'Indice de Plaque repose sur l'évaluation de la quantité de plaque sur la dent (Tableau III) (99).

Tableau III : Les scores de l'Indice de Plaque de Silness et Loë

| Scores | Signes cliniques |
|--------|--|
| 0 | Pas de plaque |
| 1 | Un film adhère à la surface dentaire au niveau du rebord gingival. La plaque n'est détectée qu'en passant la sonde sur la surface dentaire |
| 2 | Accumulation modérée de plaque visible à l'oeil nu |
| 3 | Plaque abondante |

✓ Indices d'inflammation

L'Indice Gingival permet d'apprécier l'état clinique de la gencive et prend en considération l'oedème, l'hyperémie et le saignement au sondage (Tableau IV) (63). L'inflammation tissulaire rend les tissus plus susceptibles à l'hémorragie lors du sondage. Le saignement au sondage est un des signes cliniques les plus précoces de l'inflammation et il permet d'objectiver simplement la réponse au traitement parodontal.

Tableau IV : Les scores de l'Indice Gingival de Loë et Silness

| Scores | Signes cliniques |
|--------|--|
| 0 | Gencive saine |
| 1 | Légère inflammation, léger changement de forme et de couleur, pas de saignement au sondage |
| 2 | Inflammation modérée, rougeur, oedème, saignement au sondage et à la pression |
| 3 | Inflammation sévère, rougeur et oedème, tendance au saignement spontané, éventuellement ulcération |

✓ Profondeur de la poche et perte d'attache de la dent

La profondeur au sondage est un critère important dans l'instauration du traitement et l'évaluation de la réponse à ce traitement.

3.4. Physiopathologie

Les parodontites sont des maladies plurifactorielles. Les lésions inflammatoires résultent d'une agression bactérienne au niveau de l'espace gingivo-dentaire et dépendent du système immunitaire de l'hôte qui en détermine l'évolution.

3.4.1. Facteurs bactériens

Les lésions parodontales contiennent une flore variée et constituent donc une infection polymicrobienne. Des espèces bactériennes pourraient provoquer des lésions tissulaires directement, en élaborant des substances toxiques pour les tissus, ou indirectement, du fait d'une réponse immunitaire inappropriée chez l'hôte. L'analyse bactériologique de la flore associée aux parodontites est difficile du fait de la diversité des espèces bactériennes au sein des poches parodontales, de la multiplicité des sites lésionnels chez un individu malade et de la contamination fréquente de l'échantillon de plaque sous-gingivale par les bactéries de la plaque supra-gingivale. Le passage d'un état gingival sain à une parodontite s'accompagne du passage progressif d'une flore riche en bactéries aérobies et aéro-anaérobies facultatives à Gram positif à une flore riche en bactéries anaérobies à Gram négatif. La comparaison des flores isolées de poches parodontales en phase de destruction active et de poches en phase de quiescence a permis d'associer l'activité destructrice à plusieurs espèces bactériennes dont *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Treponema denticola*, *Bacteroides forsythus* et *Prevotella intermedia*.

3.4.2. Facteurs individuels

✓ Facteurs buccaux

La présence de tartre, les particularités anatomiques (mauvaise position des dents, espace inter-dentaire étroit, furcation), les appareils orthodontiques et les prothèses favorisent la rétention mécanique, l'accumulation de plaque et la colonisation bactérienne.

✓ Facteurs systémiques

Les altérations du système immunitaire favorisent l'apparition des parodontites.

✓ Facteurs génétiques

Il existe une susceptibilité individuelle aux parodontites. Une association entre l'antigène A9 du système HLA et les parodontites à progression rapide et juvénile a été décrite.

✓ Facteurs environnementaux

Le tabagisme, le stress et la malnutrition prédisposent aux maladies parodontales.

3.5. Aspects thérapeutiques

Le traitement des parodontites repose le plus souvent sur l'élimination chirurgicale des poches parodontales. Un traitement complémentaire à l'aide d'un antiseptique (chlorhexidine) administré sous forme de bains de bouche est possible. Pour les cas où la réponse thérapeutique n'est pas satisfaisante, l'administration d'un antibiotique *per os* pendant 7 à 15 jours peut être envisagée. Le spectre d'action de l'antibiotique administré doit couvrir les bactéries anaérobies fréquemment isolées des poches. Les pénicillines du groupe A (amoxicilline + clavulanate), les cyclines, les imidazolés seuls ou en association avec un macrolide (métronidazole, métronidazole + spiramycine) et la clindamycine peuvent alors être utilisés.

TROISIEME PARTIE :
MATERIEL ET METHODES

1. SOUCHES BACTERIENNES

1.1. Souches de collection

Desulfomonas pigra ATCC 29098^T

Desulfovibrio desulfuricans subsp. *desulfuricans* Essex 6 ATCC 29577^T

Desulfovibrio desulfuricans subsp. *desulfuricans* MB ATCC 27774

Desulfovibrio fairfieldensis ATCC 700045

1.2. Souches cliniques

***Desulfomonas pigra* :**

- 34 souches isolées de selles de patients hospitalisés dans le Service d'Hépto-Gastro-Entérologie (Pr. J.P. Bronowicki, Pr. M.A. Bigard), Hôpital de Brabois-Adultes, CHU de Nancy.

- 7 souches isolées de collections purulentes abdominales provenant du Laboratoire de Bactériologie (Pr. H. Monteil), CHU de Strasbourg.

***Desulfovibrio desulfuricans* subsp. *desulfuricans* :**

- 2 souches isolées de collections purulentes abdominales au Laboratoire de Bactériologie (Mme M. Weber), Hôpital Central, CHU de Nancy.

- 1 souche isolée de collection purulente abdominale provenant du Laboratoire de Bactériologie (Pr. H. Monteil), CHU de Strasbourg.

- 1 souche isolée de collection purulente cérébrale au Laboratoire de Bactériologie (Mme M. Weber), Hôpital Central, CHU de Nancy.

- 1 souche isolée d'hémoculture au Laboratoire de Bactériologie (Mme M. Weber), Hôpital Central, CHU de Nancy.

***Desulfovibrio fairfieldensis* :**

- 15 souches isolées de selles de patients hospitalisés dans le Service d'Hépto-Gastro-Entérologie (Pr. J.P. Bronowicki, Pr. M.A. Bigard), Hôpital de Brabois-Adultes, CHU de Nancy.

- 2 souches isolées de collections purulentes abdominales au Laboratoire de Bactériologie (Mme M. Weber), Hôpital Central, CHU de Nancy.

- 4 souches isolées de collections purulentes abdominales provenant du Laboratoire de

Bactériologie (Pr. H. Monteil), CHU de Strasbourg.

- 2 souches isolées d'hémocultures au Laboratoire de Bactériologie (Mme M. Weber), Hôpital Central, CHU de Nancy.

- 1 souche isolée d'1 urine provenant du Laboratoire de Bactériologie (Pr. D. Raoult), CHU de Marseille.

- 8 souches isolées de poches parodontales de patients consultant le Département de Parodontologie et d'Implantologie (Pr. N. Miller), Faculté de Chirurgie Dentaire de Nancy.

2. METHODES

2.1. Cultures bactériennes

2.1.1. Milieux de culture

✓ Milieux liquides

- **Les test-kits Labège®** (Compagnie française de Géothermie, Orléans, France) sont utilisés pour la détection des BSR dans les échantillons biologiques. Ils sont commercialisés pour la recherche qualitative ou quantitative de BSR dans les échantillons environnementaux. Ils se présentent sous la forme de flacons contenant 9 mL d'un milieu de culture spécifique des BSR, incolore, et permettent l'injection de 1 mL d'échantillon à analyser. La composition exacte du milieu de culture n'est pas connue, mais il contient des sulfates, des ions ferreux, 2 composés organiques : le lactate et l'acétate, et un agent réducteur non soufré : le citrate de titane. Les flacons sont fermés par un bouchon en caoutchouc étanche (septum), maintenu par une capsule en aluminium. L'injection de l'échantillon est effectuée à l'aide d'une seringue et d'une aiguille au travers du septum, en évitant l'introduction d'oxygène. La présence de BSR dans l'échantillon se traduit par le noircissement du milieu (précipité de sulfure de fer). La recherche quantitative peut être effectuée par des dilutions en cascade au 1/10^{ème} de l'échantillon dans plusieurs test-kits. La plus grande dilution de l'échantillon positive pour la recherche de BSR permet d'obtenir la concentration de BSR dans l'échantillon.

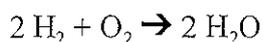
- **Le milieu B de Postgate** (cf. Tableau I) est utilisé pour l'étude génotypique des souches.

✓ Milieux solides

Les milieux de Postgate (milieu B supplémenté avec 15 g.L⁻¹ d'agar et milieu E), coulés en tubes Veillon ou en boîtes de Pétri, ainsi que le milieu gélosé de Wilkins-Chalgren (Oxoid, Dardilly, France) enrichi avec 5% de sang de mouton sont utilisés pour les isollements bactériens. Les numérations bactériennes sont effectuées par des dilutions en cascade au 1/10^{ème} de l'échantillon dans le milieu de Postgate E en tubes Veillon (82).

2.1.2. Conditions de culture

Les milieux sont incubés 1 mois, à 37°C, dans une enceinte anaérobie Forma Scientific type 1029 (Bioblock Scientific, Illkirch). L'atmosphère de l'enceinte est contrôlée par 1 lampe témoin et régulée par l'injection régulière d'un mélange anaérobie composé de 85% d'azote, 10% d'hydrogène et 5% de dioxyde de carbone (Air Liquide Santé, Paris, France). L'introduction et la sortie des milieux ou des échantillons se fait par l'intermédiaire d'un sas participant au contrôle de l'atmosphère de l'enceinte. A chaque introduction de matériel dans l'enceinte, celui-ci est déposé d'abord dans le sas. Un cycle de 3 purges/remplissages du sas, avec alternance de vide/azote (2 fois) puis vide/mélange anaérobie (1 fois), permet d'obtenir une atmosphère anaérobie dans le sas pour l'ouverture de la porte entre le sas et l'enceinte. Une lampe témoin permet de contrôler l'atmosphère anaérobie du sas avant l'ouverture de la porte interne. Le cycle de purges/remplissages du sas ne doit être mis en route que lorsque les 2 portes du sas sont fermées et il ne faut jamais que ces portes soient ouvertes en même temps. Un catalyseur, le palladium, permet l'élimination de l'oxygène résiduel dans l'enceinte selon la réaction suivante:



Il doit être régénéré 1 fois tous les 15 jours à 160°C pendant 2 heures. Du gel de silice (régénéré à 160°C pendant 4 heures) permet d'absorber l'humidité produite par les cultures bactériennes. Une solution de soude 1N permet d'absorber l'H₂S.

2.2. Etude phénotypique

L'étude des composés donneurs d'électrons pour la réduction des sulfates est effectuée dans le milieu de base dont la composition est la suivante (g.L⁻¹) : 1,5 g Na₂SO₄ ; 2 g NH₄Cl ; 1,65 g MgCl₂.6 H₂O ; 0,5 g K₂HPO₄ ; 0,2 g CaCl₂ ; 0,007 g FeCl₂.4 H₂O ; 0,1 g ascorbate ; 0,1 g thioglycollate ; 10 mL de solution d'éléments traces ; 1 mL solution résazurine à 0,2%

(p/vol) (23). La solution d'éléments traces est constituée de (g.L⁻¹) : 12,8 g acide nitrilotriacétique ; 0,21 g FeCl₂.4 H₂O ; 0,1 g MnCl₂.4 H₂O ; 0,17 g CoCl₂.6 H₂O ; 0,10 g ZnCl₂ ; 0,02 g CuCl₂ ; 0,01 g H₃BO₃ ; 0,01 g NaMoO₄ ; 0,017 g Na₂SeO₃ ; 0,028 g NiCl₂.6 H₂O. Le pH du milieu est ajusté à 7,5. Ce milieu de base est supplémenté par différents donneurs d'électrons à la concentration de 10 mM : lactate, pyruvate, acétate, butyrate, propionate, formate, fumarate, malate, benzoate, choline, éthanol, propanol et butanol. Ces composés sont ajoutés au milieu de base à partir de solutions mères stériles avant l'inoculation bactérienne (1%, vol/vol). La croissance bactérienne est contrôlée quotidiennement pendant une durée de 15 jours et considérée comme positive quand l'augmentation d'absorbance à 600 nm du milieu de culture entre 2 contrôles successifs est supérieure à 0,1 (23). Les cultures positives sont examinées au microscope à l'état frais.

L'étude de la réduction de composés accepteurs d'électrons en présence de lactate est effectuée dans le même milieu de base que celui précédemment décrit sauf le lactate qui est ajouté à la concentration de 10 mM et le Na₂SO₄ qui est remplacé par différents accepteurs d'électrons à la concentration de 10 mM : sulfite, thiosulfate et nitrate. Le critère de positivité de la croissance bactérienne est le même que celui utilisé pour l'étude des composés donneurs d'électrons.

2.3. Etude génotypique

2.3.1. Extraction de l'ADN

Le milieu de culture (1 mL) est centrifugé (20 000 x g, 20 min) puis le culot est repris par 500 µL de tampon TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8). La lyse de la paroi et de la membrane bactériennes sont obtenues par l'ajout de 30 µL de lysozyme (50 mg.mL⁻¹) suivi d'un choc thermique (glace, 15 min), puis de 40 µL de SDS (10%, p/vol) et de 60 µL de protéinase K (20 mg.mL⁻¹). Le lysat bactérien est ensuite incubé à 37°C pendant 1 heure. L'ADN est extrait par 3 mélanges successifs (vol/vol) entre l'échantillon et les solvants suivants : phénol Tris-HCl (pH 8), phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25 vol/4 vol/1 vol, pH8) et chloroforme/alcool isoamylique (9,6 vol/0,4 vol). L'ADN est ensuite précipité à -20°C par de l'alcool absolu glacé (2,5 volumes) et de l'acétate de sodium 3 M (1/10^{ème} du volume), puis recueilli par centrifugation (20 000 x g, 30 min). Le culot d'ADN est lavé par 1 mL d'alcool à 70°C, puis séché au Speed

Vac® (Savant, Farmingdale, NY, USA) et repris dans 50 µL d'eau. L'ADN extrait est dosé au spectrophotomètre par mesure de l'absorbance à 260 nm (concentration (mg.mL⁻¹) = A₂₆₀/20).

2.3.2. Détermination du contenu en G+C de l'ADN

Le G+C% est déterminé après séparation des nucléosides de l'ADN bactérien par chromatographie liquide haute performance (CLHP). Les nucléosides sont obtenus par une double hydrolyse enzymatique à l'aide de nucléase P1 (10 µg d'ADN, 10 µL de ZnCl₂ à 10 mM, 3 mU de nucléase P1, en tampon acétate 10 mM pH 5,3, à 37°C, pendant 1 nuit) et de phosphatase alcaline (1 mU, en tampon Tris-HCl 0,5 M pH 8,3, à 37°C, pendant 2 heures). L'action de la nucléase P1 permet l'obtention de nucléosides 5'-monophosphates. L'action de la phosphatase alcaline conduit à la formation de nucléosides par libération du résidu phosphate. Les désoxyribonucléosides sont séparés des ribonucléosides par chromatographie dans un gel de boronate (polyacrylamide greffé d'acide aminoéthyl-succinyl-aminophényl-boronique). Les désoxyribonucléosides sont séparés par CLHP en phase inverse avec un chromatographe Spectra Physics équipé d'une colonne de silice Supelcosil LC-18S 250 mm x 4,6 mm et d'un détecteur Spectra Focus à barrettes de diodes (Laboratoire de Biochimie Spécialisée, Hôpital d'Enfants, CHU de Dijon). Les tampons d'élution sont préparés à partir de 2 solutions mères de phosphate de potassium 1 M et de phosphate d'ammonium 1 M, ainsi que de méthanol et d'acétonitrile de qualité CLHP. Les compositions des tampons sont les suivantes:

Tampon A : méthanol 2,5%, 50 mM KH₂PO₄, pH 4

Tampon B : méthanol 20%, 50 mM KH₂PO₄, pH 4

Tampon C : acétonitrile 35%, 10 mM NH₄H₂PO₄, pH 4,9

Avant toute injection, la colonne est rééquilibrée pendant 15 minutes avec du tampon A. Le débit d'élution est de 1 mL.min⁻¹ et la séparation des désoxyribonucléosides est menée en faisant varier la composition de la phase mobile en tampons A, B et C (Tableau V).

La calibration de la colonne est réalisée par injection d'un mélange de désoxyribonucléosides standards et d'un étalon interne, la N⁶-méthyl-désoxyadénosine (m6dA). Le mélange est injecté à raison de 1 µg de chaque composé pour 200 µL injectés. Cette calibration permet de connaître le temps de rétention et le spectre UV et de déterminer le coefficient de réponse massique (CRM) pour chaque composé. Le CRM d'un nucléoside N est défini par le rapport :

$$CRM_{(N)} = S_{(N=1 \mu g)} / S_{(m6dA=1 \mu g)}$$

où - S_(N=1 µg) est la surface du pic du nucléoside N pour une quantité de 1 µg dans le

mélange standard injecté

- $S_{(m6dA=1 \mu g)}$ est la surface du pic de m6dA pour une quantité de 1 μg dans le mélange standard injecté

Tableau V : Variation de la composition de la phase mobile au cours de la séparation chromatographique des désoxyribonucléosides

| Temps (min) | Composition de la phase mobile (%) | | |
|-------------|------------------------------------|----------|----------|
| | Tampon A | Tampon B | Tampon C |
| 0 | 100 | 0 | 0 |
| 5 | 100 | 0 | 0 |
| 20 | 0 | 100 | 0 |
| 25 | 0 | 100 | 0 |
| 30 | 0 | 0 | 100 |
| 35 | 0 | 0 | 100 |
| 40 | 100 | 0 | 0 |
| 55 | 100 | 0 | 0 |

La quantité d'un désoxyribonucléoside dans un ADN hydrolysé est déterminée par le rapport:

$$Q_{(N)} = Q_{(m6dA)} \times 1/CRM_{(N)} \times S_{(N)}/S_{(m6dA)}$$

- où
- $Q_{(N)}$ est la quantité en μg du nucléoside N dans l'hydrolysate injecté
 - $Q_{(m6dA)}$ est la quantité en μg de m6dA qui a été ajoutée à l'hydrolysate
 - $S_{(N)}$ est la surface du pic du nucléoside N dans l'hydrolysate injecté
 - $S_{(m6dA)}$ est la surface du pic de m6dA dans l'hydrolysate injecté

2.3.3. Séquençage du gène de l'ARN ribosomal 16S

La séquence complète du gène de l'ARN ribosomal 16S (ADNr 16S) est déterminée après amplification de l'ADNr 16S (environ 1500 pb) par PCR avec des amorces correspondant à des régions conservées (consensus) en 5' et en 3' du gène (Tableau VI) (104). Le mélange réactionnel de 50 μL pour la PCR comprend :

- 10 pmoles de chaque amorce externe consensus 27f et 1525r,

- 10 nmoles de déoxyribonucléosides triphosphate,
- 20 nmoles de tampon Tris-HCl,
- 50 nmoles de MgCl₂,
- 1,5 U de *Taq* ADN Polymérase,
- de l'eau stérile qsp 50 µL,
- 5 µL d'ADN extrait (environ 50 ng).

Les 25 cycles de dénaturation (94°C, 1 min), hybridation (50°C, 1 min) et élongation (72°C, 1,5 min), suivis d'une élongation finale (72°C, 5 min), sont effectués dans un thermocycleur GeneAmp 2400 (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA). L'amplification génique est contrôlée par électrophorèse de 5 µL du produit d'amplification dans un gel d'agarose à 1,5% (p/vol) contenant du bromure d'éthidium (1,6 mg.mL⁻¹). Les 45 µL restant du produit d'amplification sont purifiés par passage sur 1 colonne remplie par une résine échangeuse d'anions, à l'aide du kit Wizard PCR Preps DNA Purification System (Promega Corp., Madison, Wis., USA) selon les recommandations du fournisseur. A partir d'une amorce, la séquence de 5' à 3' de l'ADNr 16S peut être déterminée de manière fiable sur une longueur maximale d'environ 400 pb, d'où le séquençage de l'ADNr 16S par plusieurs segments chevauchant à l'aide de différentes amorces internes consensus. Les séquences sont déterminées à la fois en sens et en antisens. La PCR de séquençage est effectuée selon la méthode du *dye-terminator*, en présence de déoxyribonucléotides et de didésoxyribonucléotides marqués par 4 fluorochromes différents. Le mélange réactionnel de 20 µL pour la PCR de séquençage comprend :

- 8 µL de *premix* (Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, Applied Biosystems Inc.),
- 3,2 pmoles d'1 amorce consensus,
- de l'eau stérile qsp 20 µL
- 4 µL d'ADN purifié (environ 100 ng).

La PCR consiste en 25 cycles de dénaturation (96°C, 10 sec), hybridation (50°C, 5 sec) et élongation (60°C, 4 min). Le produit de PCR est ensuite précipité à -20°C par 50 µL d'alcool absolu et 2 µL d'acétate de sodium 3 M. Le précipité est recueilli par centrifugation (20 000 x g, 20 min), puis lavé par 250 µL d'alcool à 70°C, séché au Speed Vac® et séquençé. Le séquençage de l'ADNr 16S est effectué avec un séquenceur automatique (modèle 373A, Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA).

Les amorces consensus utilisées pour le séquençage de l'ADNr 16S portent le numéro de

leur position sur l'ADNr 16S d'*Escherichia coli* qui est pris comme référence (9) (Tableau VI). Le primer consensus 900r n'amplifie aucun segment d'ADN et sa séquence est donc modifiée (900r_{mod}) en fonction de la séquence de l'ADNr 16S de *D. desulfuricans* subsp. *desulfuricans* MB (ATCC 27774) préalablement déposée dans la GenBank (n° d'accèsion M34113).

Les séquences obtenues sont alignées à l'aide du logiciel Sequence Navigator, version 1.0.1 (Applied Biosystems Inc.).

Tableau VI : Amorces consensus pour l'amplification et le séquençage de l'ADNr 16S de *Desulfomonas* et de *Desulfovibrio*

| Amorces sens (f) et antisens (r) | Séquences (de 5' à 3') | Tm (°C) | Teneur en G+C (%) |
|----------------------------------|----------------------------|---------|-------------------|
| 27f | AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG | 52 | 50 |
| 357f | CTC CTA CGG GAG GCA GCA G | 57 | 68 |
| 530f | GTG CCA GCA GCC GCG G | 56 | 81 |
| 926f | AAA CTC AAA GGA ATT GAC GG | 48 | 40 |
| 1242f | CAC ACG TGC TAC AAT GG | 47 | 53 |
| 321r | AGT CTG GAC CGT GTC TCA GT | 54 | 55 |
| 519r | GTA TTA CCG CGG CTG CTG | 52 | 61 |
| 900r _{mod} | TCT TTG AGT TTC AGC CTT | 43 | 39 |
| 1100r | GGG TTG CGC TCG TTG | 47 | 67 |
| 1392r | ACG GGC GGT GTG TAC | 47 | 67 |
| 1525r | AAG GAG GTG ATC CAG CC | 49 | 59 |

2.3.4. Identification par PCR de *Dm. pigra*, *D. desulfuricans* et *D. fairfieldensis*

Les régions variables de l'ADNr 16S permettent de définir des amorces spécifiques de *Dm. pigra*, de *D. desulfuricans* subsp. *desulfuricans* Essex 6, de *D. desulfuricans* subsp. *desulfuricans* MB et de *D. fairfieldensis* (Tableau VII). L'amorce P687r correspond à une région à la fois spécifique de *Desulfovibrio* et de *Desulfomonas*. Le mélange réactionnel de 50 µL pour la PCR comprend :

- 20 pmoles de chaque amorce (Tableau VIII),
- 40 nmoles de déoxyribonucléosides triphosphate,
- 20 nmoles de tampon Tris-HCl,
- 75 nmoles de MgCl₂,
- 1,5 U de *Taq* ADN Polymérase,
- de l'eau stérile qsp 50 µL
- 5 µL d'ADN extrait (environ 50 ng).

Une dénaturation initiale (94°C, 4 min) précède les 30 cycles de dénaturation (94°C, 1 min), hybridation (55°C, 1 min) et élongation (72°C, 2 min), suivis d'une élongation finale (72°C, 5 min). L'amplification génique est effectuée dans un thermocycleur GeneAmp 2400 (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA). Les produits de PCR sont visualisés par électrophorèse dans un gel d'agarose à 1,5% (p/vol) contenant du bromure d'éthidium (1,6 mg.mL⁻¹).

Tableau VII : Amorces spécifiques de *Dm. pigra*, *D. desulfuricans* et *D. fairfieldensis*

| Amorces sens (f) et antisens (r) | Séquences (de 5' à 3') | Tm (°C) | Teneur en G+C (%) |
|-------------------------------------|--|---------|----------------------|
| Fair f | TGA ATG AAC TTT TAG GGG AAA GAC | 52 | 37 |
| Essex f | CTA CGT TGT GCT AAT CAG CAG CGT AC | 59 | 50 |
| Pigra f | CTA GGG TGT TCT AAT CAT CAT CCT AC | 56 | 42 |
| P687 r | GAT ATC TAC GGA TTT CAC TCC TAC ACC | 58 | 44 |
| 27K f | CTG CCT TTG ATA CTG CTT AG | 50 | 45 |
| 27K r | GGG CAC CCT CTC GTT TCG GAG A | 60 | 64 |

Tableau VIII : Couples d'amorces pour l'identification de *Dm. pigra*, *D. desulfuricans* et *D. fairfieldensis*

| Espèces bactériennes | Amorces | Taille du produit de PCR (pb) |
|---|-----------------|-------------------------------|
| <i>Dm. pigra</i> | Pigra f, P687 r | 255 |
| <i>D. desulfuricans</i> subsp. <i>desulfuricans</i> Essex 6 | Essex f, P687 r | 255 |
| <i>D. desulfuricans</i> subsp. <i>desulfuricans</i> MB | 27K f, 27K r | 396 |
| <i>D. fairfieldensis</i> | Fair f, P687 r | 534 |

2.3.5. Séquençage de la région de l'ADN comprise entre les gènes des ARN ribosomaux 16S et 23S

La séquence complète de l'*internally transcribed spacer* (ITS) est déterminée après amplification de l'ITS par PCR avec des amorces correspondant à des régions conservées, respectivement en 3' et en 5', des gènes des ARN ribosomaux 16S et 23S (Tableau IX) (44). Le mélange réactionnel de 50 µL pour la PCR comprend :

- 20 pmoles de chaque amorce 1525f et 23Sr52,
- 40 nmoles de déoxyribonucléosides triphosphate,
- 20 nmoles de tampon Tris-HCl,
- 75 nmoles de MgCl₂,
- 1,5 U de *Taq* ADN Polymérase,
- de l'eau stérile qsp 50 µL
- 5 µL d'ADN extrait (environ 50 ng).

La PCR consiste en une dénaturation initiale (94°C, 4 min), suivie de 25 cycles de dénaturation (94°C, 1 min), hybridation (52°C, 1 min) et élongation (72°C, 2 min), puis d'une élongation finale (72°C, 5 min). Elle est effectuée dans un thermocycleur GeneAmp 2400 (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA). Le séquençage de l'ITS est poursuivi de manière identique au séquençage de l'ADNr 16S. Seules 2 amorces consensus sont utilisées du fait de la petite taille de l'ITS des souches étudiées (taille inférieure à 550 pb).

Les séquences obtenues sont alignées à l'aide du logiciel Sequence Navigator, version 1.0.1 (Applied Biosystems Inc.).

Tableau IX : Amorces consensus pour l'amplification et le séquençage de l'ITS de *Desulfomonas* et de *Desulfovibrio*

| Amorces sens (f) et antisens (r) | Séquences (de 5' à 3') | T _m (°C) | Teneur en G+C (%) |
|-------------------------------------|------------------------|---------------------|----------------------|
| 1525f | GGC TGG ATC ACC TCC TT | 49 | 59 |
| 23Sr52 | TGC CAA GGC ATC CAC C | 48 | 62 |

QUATRIEME PARTIE :
RESULTATS ET DISCUSSION

1. POUVOIR PATHOGENE DES BACTERIES SULFATO-REDUCTRICES

1.1. Bactériémie à *Desulfovibrio fairfieldensis*

Huit souches de *Desulfovibrio* ont été isolées d'abcès profonds (abdominaux et cérébral) et du sang par le Laboratoire de Bactériologie du CHU de Nancy (M^{me} M. Weber). Ce sont ces souches qui ont constitué le point de départ de ce travail. Le séquençage du gène de l'ARN ribosomal 16S (ADNr 16S) a permis leur identification en tant que *D. fairfieldensis* (4 souches) et *D. desulfuricans* (4 souches). Seul 1 isolat de *D. fairfieldensis* a été obtenu en culture pure d'une hémoculture chez un patient avec une péritonite d'origine appendiculaire. Compte tenu de l'existence de 3 autres isollements récents de *D. fairfieldensis* en cultures pures et en association avec des processus infectieux chez l'homme, l'hypothèse d'un pouvoir pathogène plus important de *D. fairfieldensis* par rapport aux autres espèces de *Desulfovibrio* a été émise.

Bacteremia Caused by a Strain of *Desulfovibrio* Related to the Provisionally Named *Desulfovibrio fairfieldensis*

JULIEN LOUBINOUX,¹ FRANCINE MORY,² INES A. C. PEREIRA,³ AND ALAIN E. LE FAOU^{1*}

UMR UHP-CNRS 7565, Laboratoire de Bactériologie-Virologie, Faculté de Médecine de Nancy, 54505 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex,¹ and Laboratoire de Bactériologie, Hôpital Central, CHU de Nancy, 54035 Nancy Cedex,² France, and Instituto de Tecnologia Química e Biológica, Universidade Nova de Lisboa, 2780-156 Oeiras, Portugal³

Received 5 August 1999/Returned for modification 22 September 1999/Accepted 19 November 1999

Eight isolates of *Desulfovibrio* spp. have been obtained over 5 years from abdominal or brain abscesses or blood. In seven patients these strains were part of a mixed flora. One strain was isolated in pure culture from the blood of a patient with peritonitis of appendicular origin. According to the 16S rRNA gene sequences, this strain was close to *Desulfovibrio fairfieldensis*. The present report describes the fourth isolate of this recently described species to be isolated in pure culture or as a predominant part of the flora and to be associated with infectious processes. Thus, *D. fairfieldensis* may possess a higher pathogenic potential than other *Desulfovibrio* species.

CASE REPORT

A 23-year-old man with gastric ulcer antecedents consulted his practitioner for an epigastric pain, which was suspected of being of gastric origin. On the following day, exacerbation of symptoms necessitated hospitalization at the hospital of Saint-Avoid (Lorraine region, France). Leukocytosis and abdominal tenderness, which was accentuated in the right iliac fossa, suggested a diagnosis of perforating appendicitis. This was confirmed by surgery, which consisted of appendix removal and peritoneal lavage. Abdominal drainage and empirical intravenous antibiotic therapy with cefamandole (1.5 g per day) and metronidazole (1 g per day) permitted a full recovery. Peritoneal fluid examined by routine bacteriological methods remained sterile. An anaerobic culture of blood obtained at the time of admission was positive and was sent to the Laboratory of Bacteriology of the University Hospital of Nancy for identification of the bacterium.

Bacteriological investigations. Blood samples were inoculated in anaerobic blood culture vials (Vital; bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). Subcultures were performed on Wilkins-Chalgren anaerobic agar at 37°C in an anaerobic chamber. Pinpoint, round, smooth, nonhemolytic, and greyish colonies were observed after 5 days of incubation. Gram staining of the colony showed curved gram-negative rods. The organism was motile and asaccharolytic and tested positive in catalase reactions but negative in oxidase, nitrate reduction, and urease reactions. It produced H₂S from sulfate. The desulfovibrin test was positive. Growth was detected only under anaerobic conditions at 25, 37, and 42°C. Thus, this bacterium possessed the phenotypic properties of *Desulfovibrio* spp. (16, 19).

Antibiotic susceptibility was determined by the agar dilution method with Wilkins-Chalgren medium. Because of the slow growth of this organism, MICs were determined after 96 h of

anaerobic incubation at 37°C (13). MIC results were interpreted with reference to the guidelines of the National Committee for Clinical Laboratory Standards. They indicated that the isolate was resistant to penicillin G (32 µg/ml), amoxicillin (32 µg/ml), amoxicillin-clavulanate (16 µg/ml), ticarcillin (256 µg/ml), ticarcillin-clavulanate (256 µg/ml), piperacillin (>256 µg/ml), piperacillin-tazobactam (>256 µg/ml), cefoxitin (>256 µg/ml), cefotetan (64 µg/ml), and cefotaxime (256 µg/ml). It was sensitive to metronidazole (0.25 µg/ml), imipenem (0.5 µg/ml), and clindamycin (0.5 µg/ml).

To obtain a more precise identification of this bacterium, the complete 16S rRNA gene (16S rDNA) sequence of the isolate was determined as described previously (13, 17). The 16S rDNA sequences of the reference strains *Desulfovibrio desulfuricans* Essex 6 (type strain, ATCC 29577; isolated from soil), *D. desulfuricans* MB (ATCC 27774; isolated from sheep rumen), and *Desulfomonas pigra* (type strain, ATCC 29098; isolated from human feces) were also determined for comparison. Briefly, DNA extracts were obtained from 500 µl of bacterial suspension in TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA [pH 8]) by the standard phenol-chloroform-isoamyl alcohol method. The 16S rDNA (about 1,500 nucleotides) was amplified by PCR with the consensus terminal primers 27f and 1525r (17). PCR products were purified with the Wizard PCR Preps DNA Purification System (Promega Corp., Madison, Wis.) according to the manufacturer's instructions. 16S rDNA sequencing was performed in an automated DNA sequencer (model 373A DNA sequencer; Applied Biosystems Inc., Foster City, Calif.) by the dye-labeled dideoxy chain-termination method (Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit; Applied Biosystems Inc.) with terminal and internal primers specific for 16S rDNA (17). However, the 900r consensus primer was unable to amplify a DNA segment and was then modified according to the *D. desulfuricans* MB sequence (GenBank accession no. M34113). A total of 1,542 continuous nucleotides of 16S rDNA were determined, and these corresponded to *Escherichia coli* 16S rDNA sequence positions 8 to 1540 (2). The complete 16S rDNA sequence of the clinical isolate was compared to all bacterial sequences available from the GenBank database by using the Blast, version 2.0, program (National Center for Biotechnology Institute) and showed 99.9% similarity (corresponding to 2 nucleotide differences) to

* Corresponding author. Mailing address: Laboratoire de Virologie, Hôpital de Brabois-adultes, CHU de Nancy, Route de Neufchâteau, 54511 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex. Phone: (33) 383153469. Fax: (33) 383153474. E-mail: a.lefaou@chu-nancy.fr.

TABLE 1. Characteristics of patients from whom *Desulfovibrio* strains have been isolated

| Patient | Age (yr) | Sex | Antecedent(s) | Diagnosis | Surgical treatment |
|---------|----------|--------|---|---|--------------------|
| 1 | 39 | Male | Maxillary sinusitis, alcoholism | Brain abscess | Yes |
| 2 | 3 | Female | None | Appendicitis | Yes |
| 3 | 61 | Female | Alcoholic cirrhosis, sigmoid resection | Abdominal wall abscess, peritonitis | Yes |
| 4 | 23 | Male | Gastric ulcer | Appendicitis, peritonitis | Yes |
| 5 | 59 | Female | Hemicolectomy, cholecystectomy | Intra-abdominal abscesses | Yes |
| 6 | 85 | Male | Rectorrhagia, chronic heart and renal failure | Alteration of clinical status | No |
| 7 | 65 | Male | Splenopancreatectomy | Abdominal wall abscess with fistulization | Yes |

that of *Desulfovibrio fairfieldensis* (GenBank accession no. U42221). The sequence of reference strain *D. desulfuricans* MB had 97.2% similarity (corresponding to 43 nucleotide differences) to the sequence of the same strain deposited in the GenBank database (accession no. M34113). This previously deposited sequence was identical to that determined for *D. desulfuricans* Essex 6 except for one nucleotide.

Seven other *Desulfovibrio* clinical strains have been isolated in Nancy, France, over a 5-year period. These seven strains and the strain described above were recovered from seven patients, designated patients 1 to 7 (Table 1). The strains from these patients were labeled D1 to D7, according to patient number, except for those from patient 3, from whom two strains were isolated; the two strains from patient 3 were labeled D31 and D32, respectively (Table 2). Five strains (strains D1, D2, D31, D5, and D7) were isolated from abscesses, and three strains (strains D32, D4, and D6) were isolated from blood. These eight clinical isolates differed according to their catalase, nitrate reduction, and urease reactions. Only one isolate was in pure culture (strain D4), and this strain could be isolated from the patient described above. The 16S rDNA sequences of these seven clinical isolates were also determined.

Nucleotide sequence accession numbers. The sequences of reference strains *Desulfomonas pigra*, *D. desulfuricans* Essex 6, and *D. desulfuricans* MB and of *Desulfovibrio* clinical isolate D4 can be recovered from the GenBank database under accession nos. AF192152, AF192153, AF192154, and AF192155, respectively.

The sulfate-reducing eubacteria represent a class of anaerobic microorganisms that conduct dissimilatory sulfate reduction. In this process, sulfate acts as an oxidizing agent for the dissimilation of organic matter, and the reduced sulfur is released into the external environment as sulfide, a toxic and corrosive compound. Thus, these bacteria have detrimental industrial and environmental impacts, such as anaerobic corrosion of steel. They have mostly been isolated from environmental sources (16), but they are also present in the intestinal tracts (6, 16) and mouths (18) of humans and animals. The predominant species in humans belong to the genus *Desulfovibrio* (5, 20). *Desulfovibrio* spp. have been associated with proliferative bowel disease in animals (3, 4, 10, 11), and they have been implicated in ulcerative colitis in humans because of the toxic effects of sulfide, which inhibits butyrate oxidation by colonic epithelial cells (5, 7, 14, 20). However, their role in

TABLE 2. Characteristics of *Desulfovibrio* strains isolated from clinical samples

| Patient | Strain | Site of isolation | Reactions for variable characteristics | | | Associated flora |
|---------|--------|------------------------|--|--|-----------------|--|
| | | | Catalase reaction | NO ₃ ⁻ reduction | Urease reaction | |
| 1 | D1 | Brain abscess | - | - | + | <i>Capnocytophaga ochracea</i> , <i>Eubacterium exiguum</i> , and <i>Streptococcus constellatus</i> |
| 2 | D2 | Appendicular abscess | - | - | + | <i>Bacteroides merdae</i> , <i>Eubacterium lentum</i> , <i>Escherichia coli</i> , and <i>Enterococcus</i> sp. |
| 3 | D31 | Abdominal wall abscess | + | + | - | <i>Bacteroides fragilis</i> , <i>Eubacterium lentum</i> , <i>Clostridium</i> sp., <i>Escherichia coli</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , and <i>Enterococcus</i> sp. |
| 3 | D32 | Blood | + | + | - | <i>Escherichia coli</i> , and <i>Enterobacter cloacae</i> |
| 4 | D4 | Blood | + | - | - | None |
| 5 | D5 | Abdominal abscess | + | - | - | <i>Bacteroides vulgatus</i> , <i>Eubacterium lentum</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , and <i>Streptococcus intermedius</i> |
| 6 | D6 | Blood | + | - | - | <i>Bacteroides fragilis</i> , <i>Bacteroides uniformis</i> , <i>Bacteroides vulgatus</i> , <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> , <i>Clostridium innocuum</i> , <i>Clostridium</i> sp., and <i>Enterococcus avium</i> |
| 7 | D7 | Abdominal wall abscess | + | - | - | <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> , <i>Eubacterium lentum</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Enterococcus</i> sp., and <i>Streptococcus intermedius</i> |

TABLE 3. 16S rDNA sequence similarities of reference and clinical *Desulfovibrio* strains^a

| Species or strain | % Nucleotide sequence similarity | | | | | | | |
|---------------------------------------|----------------------------------|--------------------|---------------------------------------|------------------------|--------------------------|------|------|------------------------|
| | <i>D. desulfuricans</i> | | <i>D. fairfieldensis</i> ^b | Clinical strains | | | | |
| | Essex 6 (ATCC 29577) | MB (ATCC 27774) | | D1 and D2 ^c | D31 and D32 ^c | D4 | D5 | D6 and D7 ^c |
| <i>D. pigra</i> ATCC 29098 | 95.9 | 94.5 | 95.8 | 96.1 | 94.6 | 95.7 | 95.7 | 95.6 |
| <i>D. desulfuricans</i> Essex 6 | | 97.3 | 97.1 | 99.4 | 97.3 | 97.0 | 97.0 | 96.9 |
| <i>D. desulfuricans</i> MB | | | 95.8 | 97.1 | 99.9 | 95.7 | 95.7 | 95.6 |
| <i>D. fairfieldensis</i> ^b | | | | 97.1 | 95.7 | 99.9 | 99.9 | 99.1 |
| D1 and D2 ^c | | | | | 97.2 | 97.1 | 97.2 | 97.1 |
| D31 and D32 ^c | | | | | | 95.6 | 95.6 | 95.6 |
| D4 | | | | | | | 99.8 | 99.1 |
| D5 | | | | | | | | 99.2 |

^a The complete 1,542-nucleotide sequences of the strains were compared.

^b The sequence has been recovered from GenBank (accession no. U42221).

^c Strains with identical sequences.

human disease remains speculative, and their isolation from clinical samples is seldom described. To date, only eight cases of human infection with *Desulfovibrio* spp. have been documented. *D. desulfuricans* has been isolated from blood (15), and *Desulfovibrio vulgaris* has been isolated from an intra-abdominal abscess (8). *Desulfovibrio* spp. have been recovered from appendiceal tissue and peritoneal fluid (1) and from a brain abscess (12), and three *Desulfovibrio* strains have recently been isolated from a pyogenic liver abscess (17), blood (13), and a urine specimen (9). The latter three strains have provisionally been named *Desulfovibrio fairfieldensis* (17) because of their unique 16S rDNA sequences.

According to phenotypic characters and 16S rDNA sequences, the eight *Desulfovibrio* clinical strains isolated in Nancy can be distributed into three groups: strains D1 and D2 are related to *D. desulfuricans* Essex 6 (99.4% 16S rDNA similarity), strains D31 and D32 are related to *D. desulfuricans* MB (99.9% 16S rDNA similarity), and strains D4, D5, D6, and D7 are related to *D. fairfieldensis* (99.9% 16S rDNA similarity for D4 and D5 and 99.1% 16S rDNA similarity for D6 and D7). The strains in each group show less than 97.3% 16S rDNA similarity with strains of another group (Table 3). It has been suggested that a 16S rDNA sequence similarity of <98% is evidence that strains belong to separate species (17). However, it remains to be determined by more complete phenotypic and genotypic analyses whether these three groups of strains represent different species of *Desulfovibrio*.

The isolation of *Desulfovibrio* spp. from human clinical samples might seldom occur because of an absence of systematic searches for the bacteria, the slow and fastidious growth of these bacteria, and the presence of mixed flora. Thus, their prevalence in human diseases may be underestimated. In our series, the outcomes for the seven patients were always favorable once appropriate therapy was undertaken. As is often the case in anaerobic infections, a mixed flora was generally involved. *Desulfovibrio* spp. may be present in abdominal abscesses as part of the anaerobic intestinal flora. These abscesses are associated with factors that favor infection, such as cirrhosis and previous intestinal surgery, suggesting that *Desulfovibrio* strains are opportunistic agents with somewhat limited pathogenicities.

Desulfovibrio strains have seldom been isolated in pure culture from clinical samples. *D. desulfuricans* has been reported in blood (15). The four additional isolates were from a hepatic abscess, blood, and urine (9, 13, 17) and from blood, as reported above. These four strains have provisionally been

labeled *D. fairfieldensis* and have almost identical 16S rDNA sequences, despite a few phenotypic differences, such as esculin hydrolysis, growth at 25°C, and antibiotic susceptibility profile (differences in resistance or susceptibility to amoxicillin-clavulanate, imipenem, ciprofloxacin, and chloramphenicol). They were sensitive to clindamycin and metronidazole, two drugs commonly used for the treatment of anaerobic infections. These four isolates may represent different strains of the same species which remains to be ascertained by further studies. Compared to other *Desulfovibrio* spp., *D. fairfieldensis* may have unique properties that confer some invasive power and make this newly described bacterium a potential human pathogen.

We are indebted to J. Le Gall for comments and support throughout this study and thank A. Lozniewski for a critical review of the manuscript.

REFERENCES

- Baron, E. J., R. Bennion, J. Thompson, C. Strong, P. Summanen, M. McTeague, and S. M. Finegold. 1992. A microbiological comparison between acute and complicated appendicitis. *Clin. Infect. Dis.* 14:227-231.
- Brosius, J., M. L. Palmer, P. J. Kennedy, and H. F. Noller. 1978. Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:4801-4805.
- Fox, J. G., F. E. Dewhirst, G. J. Fraser, B. J. Paster, B. Shames, and J. C. Murphy. 1994. Intracellular *Campylobacter*-like organism from ferrets and hamsters with proliferative bowel disease is a *Desulfovibrio* sp. *J. Clin. Microbiol.* 32:1229-1237.
- Gebhart, C. J., S. M. Barns, S. McOrist, G. F. Lin, and G. H. K. Lawson. 1993. Ileal symbiont intracellularis, an obligate intracellular bacterium of porcine intestines showing a relationship to *Desulfovibrio* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43:533-538.
- Gibson, G. R., G. T. McFarlane, and J. H. Cummings. 1988. Occurrence of sulphate-reducing bacteria in human faeces and the relationship of dissimilatory sulphate reduction to methanogenesis in the large gut. *J. Appl. Bacteriol.* 65:103-111.
- Gibson, G. R. 1990. Physiology and ecology of sulphate-reducing bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* 69:769-797.
- Gibson, G. R., J. H. Cummings, and G. T. McFarlane. 1991. Growth and activities of sulphate-reducing bacteria in gut contents of healthy subjects and patients with ulcerative colitis. *FEMS Microbiol. Ecol.* 86:103-112.
- Johnson, C. C., and S. M. Finegold. 1987. Uncommonly encountered, motile, anaerobic gram-negative bacilli associated with infection. *Rev. Infect. Dis.* 9:1150-1162.
- La Scola, B., and D. Raoult. 1999. Third human isolate of a *Desulfovibrio* sp. identical to the provisionally named *Desulfovibrio fairfieldensis*. *J. Clin. Microbiol.* 37:3076-3077.
- Lawson, G. H. K., S. McOrist, S. Jasni, and R. A. Mackie. 1993. Intracellular bacteria of porcine proliferative enteropathy: cultivation and maintenance in vitro. *J. Clin. Microbiol.* 31:1136-1142.
- Li, X., J. Pang, and J. G. Fox. 1996. Coinfection with intracellular *Desulfovibrio* species and coccidia in ferrets with proliferative bowel disease. *Lab. Anim. Sci.* 46:569-571.

12. Lozniewski, A., P. Maurer, H. Schuhmacher, J. P. Cartier, and F. Mory. 1999. First isolation of *Desulfovibrio* sp. as part of a polymicrobial infection from a brain abscess. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 18:602-603.
13. McDougall, R., J. Robson, D. Paterson, and W. Tee. 1997. Bacteremia caused by a recently described novel *Desulfovibrio* species. *J. Clin. Microbiol.* 35:1805-1808.
14. Fitcher, M. C. L., and J. H. Cummings. 1996. Hydrogen sulphide: a bacterial toxin in ulcerative colitis? *Gut* 39:1-4.
15. Porschen, R. K., and P. Chan. 1977. Anaerobic vibrio-like organisms cultured from blood: *Desulfovibrio desulfuricans* and *Succinivibrio* species. *J. Clin. Microbiol.* 5:444-447.
16. Postgate, J. R. 1984. *The sulphate-reducing bacteria*, 2nd ed. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.
17. Tee, W., M. Dyal-Smith, W. Woods, and D. Eisen. 1996. Probable new species of *Desulfovibrio* isolated from a pyogenic liver abscess. *J. Clin. Microbiol.* 34:1760-1764.
18. Van der Hoeven, J. S., C. W. A. van den Kieboom, and M. J. M. Schaeken. 1995. Sulfate-reducing bacteria in the periodontal pocket. *Oral Microbiol. Immunol.* 10:288-290.
19. Widdel, F., and N. Pfennig. 1984. Dissimilatory sulfate- or sulfur-reducing bacteria, p. 663-679. *In* N. R. Krieg and J. G. Holt (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 1. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, Md.
20. Willis, C. L., J. H. Cummings, G. Neale, and G. R. Gibson. 1997. Nutritional aspects of dissimilatory sulfate reduction in the human large intestine. *Curr. Microbiol.* 35:294-298.

1.2. *Desulfovibrio fairfieldensis* : une nouvelle espèce pathogène pour l'homme?

La publication de la bactériémie à *D. fairfieldensis* a retenu l'attention des Editeurs de Review Series Infectious Diseases (Stockholm, Suède) qui nous ont contactés pour la rédaction d'un article discutant plus en détail de la place de *D. fairfieldensis* en pathologie humaine.

Desulfovibrio fairfieldensis: a new human pathogen?

J. Loubinoux, F. Mory, I. A. C. Pereira, A. E. Le Faou.
J Clin Microbiol 2000; 38: 931-934.

AUTHORS' SUMMARY

The isolation of *Desulfovibrio* spp. from human clinical samples is seldom described. Little is known about these bacteria, which have been reported mostly from abdominal abscesses or blood. A new species, *Desulfovibrio fairfieldensis*, was proposed in 1996 from the 16S rRNA gene sequence of a strain isolated as a predominant part of the flora from an hepatic abscess. Since 1996, three additional strains of *D. fairfieldensis* have been isolated, always in pure culture from blood, urine and blood. Compared to other *Desulfovibrio* spp., *D. fairfieldensis* has been isolated in humans only and in association with infectious processes. Thus, *D. fairfieldensis* may have unique properties that confer some invasive power, and that make this newly described bacterium a potential human pathogen.

Case report

A 23-year-old man with gastric ulcer antecedents consulted his practitioner for an epigastric pain, which was suspected of having a gastric origin. On the following day, exacerbation of symptoms necessitated hospitalization at the hospital of Saint-Avold (Lorraine region, France). Leukocytosis and abdominal tenderness, which was accentuated in the right iliac fossa, suggested a diagnosis of perforating appendicitis. This was confirmed by surgery, which consisted of appendix removal and peritoneal lavage. Abdominal drainage and empirical intravenous antibiotic therapy with cefamandole, 1.5 g per day, and metronidazole, 1 g per day, permitted a

full recovery. Peritoneal fluid remained sterile on examination by routine bacteriological methods. An anaerobic blood culture, obtained at the time of admission, was positive and was sent to the Laboratory of Bacteriology of the University Hospital of Nancy for identification of the bacterium.

Discussion

The bacterium was identified as *Desulfovibrio* sp. according to its phenotypic characteristics. To obtain a more precise identification, the complete 16S rRNA gene (16S rDNA) sequence of the isolate has been determined as described previously (1,2) and compared to all bacterial sequences available from the

GenBank database. The sequence showed 99.9% similarity to that of *Desulfovibrio fairfieldensis*, a recently proposed species (1). The genus *Desulfovibrio* belongs to the sulphate-reducing eubacteria, a class of anaerobic microorganisms that conduct dissimilatory sulfate reduction. They are isolated predominantly from environmental sources, but are also present in the intestinal tract and mouth of humans and animals.

The isolation of *Desulfovibrio* spp. from human clinical samples is seldom described. To date, 15 cases of human infection with *Desulfovibrio* spp. have been documented. Eight of these strains have been isolated in Nancy from abdominal (4 strains) or brain (1 strain) abscesses, or from blood (3 strains). The abdominal abscesses were associated with factors favoring infection, such as cirrhosis or previous intestinal surgery, suggesting that *Desulfovibrio* strains are opportunistic agents. However, 5 strains have been isolated from clinical samples in pure culture. *D. desulfuricans* has been reported only once in blood culture (3). The 4 additional isolates were from an hepatic abscess (1), blood (2), urine (4), and from blood as stated above. These 4 strains have been identified from their 16S rDNA sequences and provisionally named *D. fairfieldensis*. They may represent different strains of the same species, but this remains to be ascertained by the complete phenotypic and genotypic analyses that are currently in progress. To date, *D. fairfieldensis* has been isolated from human samples alone, suggesting that it is a specific human commensal. However, in view of the 4 infectious episodes, one may consider this species to be a potential human pathogen.

EDITORIAL BOARD COMMENT

Under optimal conditions, most non-pathogenic bacteria can probably cause disease in humans. Here, a few species of *Desulfovibrio*, called *fairfieldensis*, is demonstrated in anaerobic blood culture from a patient with a perforated appendix. This group of bacteria is part of the normal flora of the large intestine and is not a pathogen, but can also be found in the environment. Considering the rarity of its isolation from clinical samples, the importance of *Desulfovibrio fairfieldensis* as a human pathogen may be limited.

***Desulfovibrio fairfieldensis*: a new human pathogen?**

1. Tee W, Dyal-Smith M, Woods W, et al. Probable new species of *Desulfovibrio* isolated from a pyogenic liver abscess. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 1760-1764.
2. McDougall R, Robson J, Paterson D, et al. Bacteremia caused by a recently described novel *Desulfovibrio* species. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 1805-1808.
3. Porschen RK, Chan P. Anaerobic vibrio-like organisms cultured from blood: *Desulfovibrio desulfuricans* and *Succinivibrio* species. *J Clin Microbiol* 1977; 5: 444-447.
4. La Scola B, Raoult D. Third human isolate of a *Desulfovibrio* sp. identical to the provisionally named *Desulfovibrio fairfieldensis*. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3076-3077.

Isolation and characterization of vancomycin tolerant *Streptococcus pneumoniae* from the cerebrospinal fluid of a patient who developed recrudescence meningitis

1. Novak R, Henriques B, Charpentier E, et al. Emergence of vancomycin tolerance in *Streptococcus pneumoniae*. *Nature* 1999; 399: 590-3.
2. Novak R, Charpentier E, Henriques B, et al. Vancomycin tolerance in *Streptococcus pneumoniae*: transport of a signal peptide regulated by a two component system. In: *Proceedings of 38th Interscience Conference of Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (San Diego) 1998: Abstract 97-CC-145.
3. Tomasz A, Beckerdite S, McDonnell M, Elsbach P. The activity of the pneumococcal autolytic system and the fate of the bacterium during ingestion by rabbit polymorphonuclear leukocytes. *J Cell Physiol* 1977; 92: 155-60.
4. Tuomanen E, Pollack H, Parkinson A, et al. Microbiological and clinical significance of a new property of defective lysis in clinical strains of pneumococci. *J Infect Dis* 1988; 158: 36-43.

Endocarditis caused by drug-resistant *Streptococcus pneumoniae* in a child

1. Normand J, Bozio A, Etienne J, et al. Changing patterns and prognosis of infective endocarditis in childhood. *Eur Heart J* 1995; 16: 28-31.
2. Durack DT, Lukes AS, Bright DK. New criteria for diagnosis of infective endocarditis: utilization of specific echocardiographic findings. *Am J Med* 1994; 96: 200-209.
3. Bradley JS, Kaplan SL, Klugman KP, Leggiadro RJ. Consensus: management of infections in children caused by *Streptococcus pneumoniae* with decreased susceptibility to penicillin. *Pediatr Infect Dis J* 1995; 14: 1037-41.
4. Okumura A, Ito K, Kondo M. Infective endocarditis caused by highly penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*: successful treatment with cefuzonam, ampicillin and imipenem. *Pediatr Infect Dis J* 1995; 14: 327-9.

Disproportionate retrograde amnesia in a patient with herpes simplex encephalitis

1. Kopelman MD, Wilson BA., Baddeley AD. *The Autobiographical Memory Interview*. Thames Valley Test Company, Bury St Edmunds. 1990.
2. Fukatsu R, Fujii T, Sato M, et al. Influence of age on long-term memory. *Rinsho Shinkeigaku*

1994; 34: 777-781.

3. Kapur N, Young A, Bateman D, Kennedy P. Focal retrograde amnesia: A long-term clinical and neuropsychological follow-up. *Cortex* 1989; 25: 387-402.
4. Kapur N. Focal retrograde amnesia in neurological disease: A critical review. *Cortex* 1993; 29: 217-234.

1.3. Les bactéries sulfato-réductrices chez l'homme et leur association aux maladies inflammatoires chroniques intestinales

Les BSR ont été proposées comme pouvant participer à l'initiation et/ou à l'entretien des lésions observées au cours des maladies inflammatoires chroniques intestinales, mais les espèces potentiellement impliquées n'ont pas été identifiées. Ces bactéries ont donc été recherchées par culture dans les selles de patients hospitalisés dans le Service d'Hépatogastro-Entérologie du CHU de Nancy (Pr. M.A. Bigard). En l'absence de milieu commercialisé en bactériologie médicale pour la détection des BSR, un milieu utilisé jusqu'à présent uniquement pour des échantillons environnementaux a été utilisé (Test-kits Labège[®], Compagnie Française de Géothermie, Orléans, France). Grâce à nos précédents travaux de séquençage de l'ADNr 16S de souches de *Desulfomonas* et de *Desulfovibrio*, nous avons mis au point une PCR multiplexe pour l'identification de ces bactéries à partir de cultures ou de prélèvements biologiques humains.

La comparaison des séquences de l'ADNr 16S de *Dm. pigra* (A), de *D. desulfuricans* subsp. *desulfuricans* Essex 6 (B), de *D. desulfuricans* subsp. *desulfuricans* MB (C) et de *D. fairfieldensis* (D) a mis en évidence 5 régions variables entre les souches étudiées, correspondant respectivement aux positions 201 à 224, 239 à 252, 480 à 506, 657 à 677 et 1031 à 1053 de l'ADNr 16S (numérotation correspondant à l'ADNr 16S d'*Escherichia coli*) (9) :

✓ Région 1 (201-224)

| | | |
|-----|---------------------------------------|-----------------------------|
| (A) | 5'-ATG ATG AAC TTT GTG AGG AAA GGT-3' | |
| (B) | 5'-AAA ATG AAC TTT TTG AGG AAA GAT-3' | |
| (C) | 5'-AAA ATG AAC TTT TTG AGG AAA GGT-3' | |
| (D) | 5'-TGA ATG AAC TTT TAG GGG AAA GAC-3' | |
| | ... | positions variables |

✓ Région 2 (239-252)

| | |
|-----|-------------------------|
| (A) | 5'-AGC TAT CGC ATA G-3' |
| (B) | 5'-TGC TAT CGC ATA A-3' |
| (C) | 5'-TGT TAC CGT ATA A-3' |
| (D) | 5'-AGC TGT CGT ATG A-3' |
| | |

✓ Région 3 (480-506)

- (A) 5'-CTA GGG TGT TCT AAT CAT CAT CCT AC-3'
(B) 5'-CTA CGT TGT GCT AAT CAG CAG CGT AC-3'
(C) 5'-CCG CAC TGT GCT AAT CAG CAG TGC CT-3'
(D) 5'-GTG CGT GGT GCT AAT CAG CCG CGC AT-3'

✓ Région 4 (657-677)

- (A) 5'-CTG CCC TTG ATA CTG CAC GA-3'
(B) 5'-CTG CCT TTG ATA CTG CAC GA-3'
(C) 5'-CTG CCT TTG ATA CTG CTT AG-3'
(D) 5'-CTG CCC TTG ATA CTG CAT GA-3'

✓ Région 5 (1031-1053)

- (A) 5'-CTC CCG AAA ATG AGG GGT GCC C-3'
(B) 5'-CTC CCG AAA AGG AGG GGT GCC C-3'
(C) 5'-TCT CCG AAA CGA GAG GGT GCC C-3'
(D) 5'-CTC CCG AAA AGG AGG GGT GCC C-3'

Les régions variables de l'ADNr 16S ont permis de définir des amorces spécifiques de *Dm. pigra*, de *D. desulfuricans* subsp. *desulfuricans* Essex 6, de *D. desulfuricans* subsp. *desulfuricans* MB et de *D. fairfieldensis*. La spécificité des amorces a été contrôlée dans la banque de séquences de la GenBank par le programme Blast, version 2.0, du National Center for Biotechnology Institute.

L'amorce P687r correspond à une région spécifique de *Desulfomonas* et de *Desulfovibrio* (positions 708 à 735 de l'ADNr 16S) précédemment décrite (24) :

5'-GGT GTA GGA GTG AAA TCC GTA GAT ATC-3'

Convenient methods for detection and identification of sulfate-reducing bacteria in human feces

Julien Loubinoux,^{1,3*} Jean-Pierre Bronowicki,² Ines A.C. Pereira,³ Jean-Louis Mougengel,² and Alain E. Le Faou¹

¹Laboratoire de Bactériologie-Virologie UMR CNRS 7565, Faculté de Médecine, 54505 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France

²Service d'Hépatogastro-entérologie, Hôpital de Brabois-Adultes, CHU de Nancy, 54511 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France

³Instituto de Tecnologia Química e Biológica, Universidade Nova de Lisboa, 2780-156 Oeiras, Portugal

Keywords: Sulfate-reducing bacteria; *Desulfomonas*; *Desulfovibrio*; Inflammatory bowel diseases.

* Corresponding author. Mailing address: Laboratoire de Microbiologie, Hôpital de Brabois-Adultes, CHU de Nancy, 54511 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France.

Phone: (33) 3 83 15 34 68. Fax: (33) 3 83 15 34 74. E-mail: j.loubinoux@voila.fr

Abstract

Sulfate-reducing bacteria (SRB) are inhabitants of the human intestinal tract where they release hydrogen sulfide, a cytotoxic compound. Therefore, these bacteria have been proposed to play a role in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases (IBD). We searched for SRB in the feces of 110 patients from a Hepato-Gastro-Enterology Unit using a specific liquid medium (Test-kit Labège[®], Compagnie Française de Géothermie, Orléans, France). Twenty-two patients presenting with IBD were compared with 88 patients hospitalized for other lower bowel diseases (n=30) or upper digestive tract diseases (n=58). SRB were isolated from 15 patients presenting with IBD (68%), and from 33 patients with other symptoms (37%). A multiplex PCR was devised for the identification of *Desulfomonas pigra*, *Desulfovibrio desulfuricans* and *Desulfovibrio fairfieldensis*, and applied to the above isolates. The SRB strains consisted of *Desulfomonas pigra* (34 isolates) and *Desulfovibrio fairfieldensis* (15 isolates). The prevalence of *Desulfomonas pigra* was significantly higher in IBD patients (55%) as compared to patients with other symptoms (25%) ($p < 0.05$).

1. Introduction

Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC) are chronic inflammatory bowel diseases (IBD) of unknown etiology, but they are likely to rely on environmental, genetic and immune factors [1]. An infectious origin has been proposed, and many microorganisms have been implicated in the absence of any convincing arguments. However, in both syndromes, the intestinal inflammation does respond to antibiotherapy. In animal models of chronic colitis, luminal flora is an essential cofactor for the disease to occur [2, 3]. This may explain the renewed interest in the role of the bowel flora as a cause of these disorders [4, 5, 6].

Sulfate-reducing bacteria (SRB) are anaerobic microorganisms that conduct dissimilatory sulfate reduction to obtain energy, resulting in the release of a great quantity of sulfide. They are commonly isolated from environmental sources, but are also present in the digestive tract of animals and humans. Human isolates consist mostly of *Desulfomonas* (*Dm.*) and *Desulfovibrio* (*D.*) species [7, 8, 9, 10]. Recent findings suggest that SRB may have a role in human diseases. They have been associated with the clinical severity of human periodontitis [11], and isolated from profound abscesses (abdominal or brain), blood or urine [12, 13, 14, 15]. In these settings, most strains have been identified as *D. fairfieldensis*, a recently proposed new species [15], by 16S ribosomal RNA gene (16S rDNA) sequencing. The implication of SRB in IBD has also been suggested as their metabolic end-product, hydrogen sulfide, is a toxic compound [8, 16, 17, 18]. This compound may act through an inhibition of butyrate oxidation, the main energy source for

colonocytes. The impairment of the functions of the intestinal epithelium would lead to cell death and chronic inflammation.

In medical laboratories, SRB are seldom isolated from human samples because of a slow growth as colonies do appear after more than 3 days incubation and are not noticed, being overgrown by the accompanying flora, unless they are the dominant or sole present species. Thus, their search in feces is difficult if a specific medium is not used. The growth of SRB in specific culture media is easily detected by hydrogen sulfide (H₂S) production. Once obtained from clinical samples, identification at the species level is difficult as the number of phenotypic traits is limited. Thus, gene amplification is a valuable tool to achieve such an identification.

To determine which SRB species may be associated with IBD if any, we evaluated a specific liquid medium (Test-kit Labège[®], Compagnie Française de Géothermie, Orléans, France) for the growth of the SRB from the feces of patients hospitalized in the Hepato-Gastro-Enterology Unit of the Centre Hospitalier et Universitaire de Nancy, France. For an identification of the isolates at the species level, we devised a multiplex PCR. The primers resulted from the analysis of the 16S rDNA sequences of *Desulfomonas* and *Desulfovibrio* strains previously described in humans.

(Part of this work was presented at the 20th interdisciplinary meeting on anti-infectious chemotherapy, 7-8th of december 2000, Paris, France.)

2. Materials and methods

2.1. Patients

Feces of 110 patients from the Hepato-Gastro-Enterology Unit of the Centre Hospitalier et Universitaire de Nancy, France, were collected. The mean age of the patients (67 men and 43 women) was 57 years (range 14-100 years). They have not had any antibiotic administration in the month before the sample was obtained. Patients were separated in 3 groups: IBD (n=22) included 17 CD and 5 UC; other lower bowel diseases (n=30) included 23 patients presenting with mild or moderate symptoms such as abdominal pain, intestinal transit troubles and rectorrhagia, and 7 patients with colic cancer; upper digestive tract diseases (n=58) included gall stones, cirrhosis, hepato-cellular carcinoma, gastric and pancreatic tumors. IBD were diagnosed on clinical, endoscopical and histological findings. Most of the IBD patients presented with an active disease (Table 1).

2.2. SRB detection and enumeration

One g of feces was mixed with 4mL of PBS buffer and centrifuged ($3000 \text{ T}\cdot\text{min}^{-1}$, 5 min). One mL of supernatant was inoculated immediately in a liquid medium (Test-kit Labège[®], Compagnie Française de Géothermie, Orléans, France) according to the manufacturer's instructions. Briefly, the Test-kits Labège[®] consist of vials containing 9 mL of a specific medium anaerobically conditioned for SRB detection. It is inoculated with a syringe through a rubber cap. This limpid and colorless medium is originally devised for SRB detection from environmental samples. It was compared to the commonly used Postgate's solid medium E [19], inoculated in parallel under anaerobic atmosphere. SRB were enumerated using long and narrow tubes filled up with the latter medium and

inoculated with decimal dilutions of the feces. All inoculated media were incubated at 37°C for 2 months. The presence of SRB was ascertained by the formation of a black precipitate (ferrous sulfide) in liquid media and by the appearance of black colonies in solid media.

2.3. Definition of PCR primers

The 16S rDNA sequences of *Desulfomonas* and *Desulfovibrio* strains available in the GenBank database were compared using the Sequence Navigator software, version 1.0.1 (Applied Biosystems Inc., Foster City, Calif., USA). It permitted to define 6 PCR primers for the identification of the previously described human SRB isolates [9, 12, 13, 14, 15], related respectively to *Dm. pigra* ATCC 29098^T, *D. desulfuricans* Essex 6 ATCC 29577^T, *D. desulfuricans* MB ATCC 27774 and *D. fairfieldensis* ATCC 700045. *D. desulfuricans* Essex 6 and *D. desulfuricans* MB were differentiated as the 16S rDNA sequences of these strains exhibit a difference of 3% [13]. The primers were 27K-F (5'-CTG CCT TTG ATA CTG CTT AG-3'), 27K-R (5'-GGG CAC CCT CTC GTT TCG GAG A-3'), Essex-F (5'-CTA CGT TGT GCT AAT CAG CAG CGT AC-3'), Fair-F (5'-TGA ATG AAC TTT TAG GGG AAA GAC-3'), Pigra-F (5'-CTA GGG TGT TCT AAT CAT CAT CCT AC-3') and P687-R (5'-GAT ATC TAC GGA TTT CAC TCC TAC ACC-3') (Table 2). The specificity of these primers was checked on all bacterial sequences available from the GenBank database using the Blast program, version 2.0 (National Center for Biotechnology Institute).

2.4. SRB identification by multiplex PCR

Collection (*Dm. pigra* ATCC 29098^T, *D. desulfuricans* Essex 6 ATCC 29577^T, *D. desulfuricans* MB ATCC 27774 and *D. fairfieldensis* ATCC 700045) and clinical (2 strains related to *D. desulfuricans* Essex 6, 2 strains related to *D. desulfuricans* MB and 8 strains

identified as *D. fairfieldensis*) strains were used as positive controls. The specificity of the PCR was checked using collection strains (*Bilophila wadsworthia* ATCC 49260^T, *D. gigas* DSM 1382^T, *D. vulgaris* DSM 644^T) and 30 common aerobic and anaerobic bacterial intestinal species (e. g., *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Enterococcus faecalis*). The sensitivity of the PCR was evaluated using dilutions of quantified collection bacterial strains suspensions.

At the end of incubation time, all the 110 inoculated Test-kits Labège[®] were checked using the multiplex PCR. DNA extracts were obtained from 500 µL of culture media, after centrifugation and resuspension in TE buffer (10 mM Tris-HCL, 1mM EDTA, pH 8), by the standard phenol/chloroform/isoamyl alcohol method. Each 50-µL PCR mixture contained 5 µL of DNA extract (approximately 50 ng of DNA) and final amounts of 0.4 µM of each primer, 0.8 mM of each deoxynucleoside triphosphate (Boehringer Mannheim Biochemicals, Mannheim, Germany), 0.4 mM of Tris-HCL buffer, 1.5 mM MgCl₂, and 1.5 U of *Taq* DNA Polymerase (Gibco-BRL Life Technologies, Paisley, United Kingdom). All reactions were carried out using the GeneAmp PCR System 2400 (Perkin-Elmer, Norwalk, CT). An initial denaturation step of 94 °C for 4 min was followed by 30 cycles of denaturation (94 °C, 1 min), annealing (55 °C, 1 min) and extension (72 °C, 2 min), and with a final extension (72 °C, 5 min). Negative (water instead of DNA extract) and positive (*D. fairfieldensis* DNA extract) controls were included in each run. Amplified products were resolved by electrophoresis in 1.5% (wt/vol) agarose gels containing ethidium bromide (1.6 mg.mL⁻¹). A 100 bp DNA Ladder was used as a size marker (Gibco-BRL Life Technologies). *Dm. pigra*, *D. desulfuricans* Essex 6, *D. desulfuricans* MB or *D. fairfieldensis*

were identified by 255, 255, 396 or 534 bp bands respectively (Fig. 1). *Dm. pigra* and *D. desulfuricans* Essex 6 were further differentiated by separate PCR assays using their respective specific primers.

3. Results

3.1. SRB detection and enumeration

According to the above criteria, the presence of SRB was ascertained in 45 and 42 feces using the Test-kit Labège® and the Postgate's medium respectively. The mean times of detection were of 2 and 6 days using the Test-kit Labège® (range 1-11 days) and the Postgate's medium (range 3-39 days) respectively. The mean count of SRB in the feces was of 10⁵/g (range 10²-10⁹/g). SRB count was not related to the clinical status of patients.

3.2. SRB identification by multiplex PCR

The specificity of the multiplex PCR was first ascertained by the absence of cross-reactions between the 4 genospecies differentiated. Each control was found positive solely with the corresponding set of primers. All strains used to check the specificity gave negative results with the 4 primers sets. The sensitivity of the multiplex PCR assay was of 50 bacteria.

The 45 culture-positive feces gave positive results with the multiplex PCR. Three additional feces were found positive by PCR. They corresponded to equivocal results after culture in the Test-kit Labège® (presence of a dark brownish precipitate). The remaining 62 feces were negative. Thus, the percentage of SRB-positive feces was of 44% (Table 3). Of the 48 positive feces, 33 contained *Dm. pigra*, 14 *D. fairfieldensis* and 1 both. No *D.*

desulfuricans was evidenced. The prevalence of *Dm. pigra* was significantly higher in patients hospitalized for IBD ($p < 0.05$).

4. Discussion

The presence of SRB in the intestinal tract of animals and humans has been recognized for a long time, although identifications at the species level have seldom been performed. In the absence of a convenient method for the identification of human SRB, most studies of intestinal SRB from IBD patients have relied on cultivation-based microbiological analysis of fecal samples [7, 8, 10]. However, recent studies have suggested that the possible role of SRB in the pathogenesis of IBD may be related to physiological and/or phylogenetic differences between SRB strains [20, 21]. Considering the difficulty of isolation and the rarity of specific searches, the prevalence of SRB in human clinical samples is certainly underestimated. The Test-kit Labège[®], developed for SRB detection from environmental samples, proved to be a suitable medium for SRB detection from feces as well as from body fluids (manuscript in preparation). It proved more sensitive than the Postgate's medium. Despite the abundant flora, the Test-kit Labège[®] permitted a rapid growth of the SRB present in stool specimens. This may be related to the quality of the medium, but also to the mode of inoculation of samples that ensures the maintenance of a strict anaerobiosis. It is likely that no isolates were lost as gene amplification failed to detect any additional positive sample besides the 3 equivocal results with the Test-kits Labège[®], which were PCR-positive.

The Test-kit Labège[®] is adapted to the growth of any SRB, and all the culture-

positive samples were identified by PCR as *Dm. pigra* or *D. fairfieldensis*. No additional species besides *Dm. pigra* and *D. fairfieldensis* was evidenced. Thus, although our multiplex PCR was limited to the species already described in humans, the presence of additional SRB species is unlikely. A mix of SRB species was present in solely one among the 48 positive samples, which suggests that the presence of more than one SRB species in feces is uncommon. However, a comparative study has to be conducted in healthy volunteers to estimate more precisely which species are present among the general population.

D. desulfuricans is commonly isolated from the environment, and has been also considered as the most prevalent *Desulfovibrio* species in humans [8, 10] until the recent description of *D. fairfieldensis* [15]. Up to now, *Dm. pigra* and *D. fairfieldensis* have been isolated solely from human samples. Thus, our results show that both species are present in and may be specific of the human intestinal tract. However, this remains to be determined by the specific search for these bacteria in other ecological niches. *Dm. pigra* has been described only once [9], and was considered as an uncommon finding in humans. Our results indicate that it may be the most common SRB in the intestinal tract. However, this species has never been described in infectious processes. On the contrary, *D. fairfieldensis*, apparently less common in human feces, has been isolated outside the colonic lumen from blood and septic collections [12, 13, 14, 15]. Thus, *D. fairfieldensis* may possess additional invasive properties as compared to *Desulfomonas* and other *Desulfovibrio* species, which would explain its recovery from clinical samples. Interestingly, in our series of patients, the prevalence of *Dm. pigra* in the feces is significantly higher in patients hospitalized for IBD than for other pathologies. This may have 2 explanations, either *Dm. pigra* has physiological

characteristics that are in cause in the onset of lesions and/or participate in the perpetuation of the chronic inflammatory processes, or colonization by this species is favored by local conditions in IBD patients. The association of SRB with IBD has already been described [8]. *Dm. pigra* has not been further considered since its first description in 1976 [9]. Thus, the finding that this bacterium, considered as a “non pathogenic” species, is a common inhabitant of the human intestinal tract and the most prevalent SRB species in IBD patients is surprising. This deserves additional studies to elucidate in which way *Dm. pigra* may be implicated in these inflammatory processes.

Acknowledgements

This work was supported in part by the Compagnie Française de Géothermie (Orléans, France) and by a FCT Grant POCTI 36562/ESP/2000 to ICP.

We are indebted to late Dr. Wee Tee (University of Melbourne, Australia) for kindly providing 4 strains of *D. fairfieldensis* (including strain ATCC 700045) and also to Pr. D. Raoult (University of Marseille, France) for providing 1 strain of *D. fairfieldensis*. We thank D. Meng and A.M. Carpentier (Laboratoire de Bactériologie-Virologie UMR CNRS 7565) for their excellent technical assistance as well as the nurses of the Hepato-Gastro-Enterology Unit for their kindness.

References

- [1] Fiocchi, C. (1998) Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology* 115, 182-205.
- [2] Gaudio, E., Taddei, G., Vetuschi, A., Sferra, R., Frieri, G., Ricciardi, G. and Caprilli, R. (1999) Dextran sulfate sodium colitis in rats: clinical, structural and ultrastructural aspects. *Dig. Dis. Sci.* 44, 1458-75.
- [3] Okayasu, I., Hatakeyama, S., Yamada, M., Ohkusa, T., Inagaki, Y. and Nakaya, R. (1990) A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology* 98, 694-702.
- [4] Campieri, M. and Gionchetti, P. (2001) Bacteria as the cause of ulcerative colitis. *Gut* 48, 132-5.
- [5] Elson, C.O. (2000) Commensal bacteria as targets in Crohn's disease. *Gastroenterology* 119, 254-7.
- [6] Marteau, P. (2000) Role of the intestinal flora in gastrointestinal diseases. *Lancet* 356, 28.
- [7] Gibson, G.R., McFarlane, G.T. and Cummings, J.H. (1988) Occurrence of sulphate-reducing bacteria in human faeces and the relationship of dissimilatory sulphate reduction to methanogenesis in the large gut. *J. Appl. Bacteriol.* 65, 103-11.
- [8] Gibson, G.R., Cummings, J.H. and McFarlane, G.T. (1991) Growth and activities of sulphate-reducing bacteria in gut contents of healthy subjects and patients with ulcerative colitis. *FEMS Microbiol. Ecol.* 86, 103-12.

- [9] Moore, W.E.C., Johnson, J.L. and Holdeman, L.V. (1976) Emendation of *Bacteroidaceae* and *Butyrivibrio* and descriptions of *Desulfomonas* gen. nov. and ten new species in the genera *Desulfomonas*, *Butyrivibrio*, *Eubacterium*, *Clostridium*, and *Ruminococcus*. Int. J. Syst. Bacteriol. 26, 238-52.
- [10] Willis, C.L., Cummings, J.H., Neale, G. and Gibson, G.R. (1997) Nutritional aspects of dissimilatory sulfate reduction in the human large intestine. Curr. Microbiol. 35, 294-8.
- [11] Langendijk, P.S., Hanssen, J.T.J. and Van der Hoeven, J.S. (2000) Sulfate-reducing bacteria in association with human periodontitis. J. Clin. Periodontol. 27, 943-50.
- [12] La Scola, B. and Raoult, D. (1999) Third human isolate of a *Desulfovibrio* sp. identical to the provisionally named *Desulfovibrio fairfieldensis*. J. Clin. Microbiol. 37, 3076-7.
- [13] Loubinoux, J., Mory, F., Pereira, I.A.C. and Le Faou, A.E. (2000) Bacteremia caused by a strain of *Desulfovibrio* related to the provisionally named *Desulfovibrio fairfieldensis*. J. Clin. Microbiol. 38, 931-4.
- [14] Mc Dougall, R., Robson, J., Paterson, D. and Tee, W. (1997) Bacteremia caused by a recently described novel *Desulfovibrio* species. J. Clin. Microbiol. 35, 1805-8.
- [15] Tee, W., Dyal-Smith, M., Woods, W. and Eisen, D. (1996) Probable new species of *Desulfovibrio* isolated from a pyogenic liver abscess. J. Clin. Microbiol. 34, 1760-4.
- [16] Babidge, W., Millard, S. and Roediger, W. (1998) Sulfides impair short chain fatty acid beta-oxidation at acyl-CoA dehydrogenase level in colonocytes: implications for ulcerative colitis. Mol. Cell. Biochem. 181, 117-24.

- [17] Pitcher, M.C.L. and Cummings, J.H. (1996) Hydrogen sulphide: a bacterial toxin in ulcerative colitis? *Gut* 39, 1-4.
- [18] Roediger, W.E., Moore, J. and Babidge, W. (1997) Colonic sulfide in pathogenesis and treatment of ulcerative colitis. *Dig. Dis. Sci.* 42, 1571-9.
- [19] Postgate, J.R. (1984) *The sulphate-reducing bacteria*, 2nd Edn., Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.
- [20] Zinkevich, V. and Beech, J.B. (2000) Screening of sulfate-reducing bacteria in colonoscopy samples from healthy and colitic human gut mucosa. *FEMS Microbiol. Ecol.* 34, 147-55.
- [21] Pitcher, M.C.L., Beatty, E.R. and Cummings, J.H. (2000) The contribution of sulphate-reducing bacteria and 5-aminosalicylic acid to faecal sulphide in patients with ulcerative colitis. *Gut* 46, 64-72.

Table 1

Characteristics of patients with inflammatory bowel diseases (IBD)

| IBD | Age (years) | | Sex | | Staging of the disease ^a | | Patients with anti-inflammatory and/or immunosuppressive agents |
|-----------------------------|-------------|-------|---------|-------|-------------------------------------|-----------|---|
| | Mean | Range | Females | Males | Active | Remission | |
| Crohn's disease (n=17) | 40 | 18-74 | 8 | 9 | 11 | 6 | 13 |
| Ulcerative colitis (n=5) | 39 | 14-78 | 2 | 3 | 3 | 2 | 4 |

^a Activity of IBD was evaluated on clinical, endoscopical and histological findings

Table 2

Primers for the identification of *Desulfomonas* (*Dm.*) and *Desulfovibrio* (*D.*) strains

| Strains | Primers | Length of the PCR product (bp) |
|---------------------------------|-----------------|--------------------------------|
| <i>Dm. pigra</i> | Pigra-F, P687-R | 255 |
| <i>D. desulfuricans</i> Essex 6 | Essex-F, P687-R | 255 |
| <i>D. desulfuricans</i> MB | 27K-F, 27K-R | 396 |
| <i>D. fairfieldensis</i> | Fair-F, P687-R | 534 |

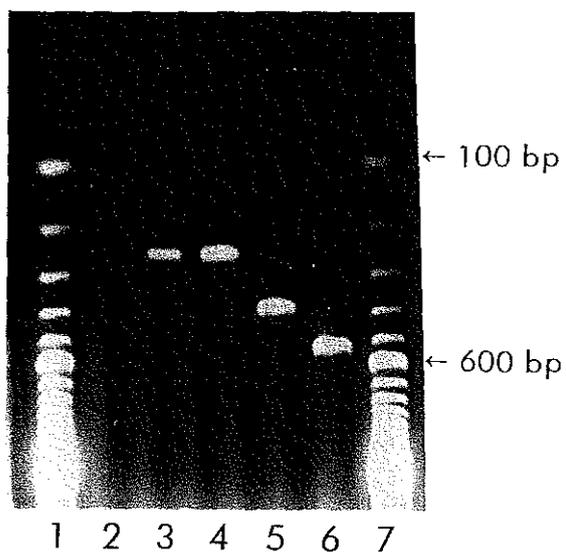
Table 3

Identification of sulfate-reducing bacteria (SRB) in feces according to the clinical status of patients

| Clinical status | SRB ^a | <i>Dm. pigra</i> | <i>D. fairfieldensis</i> |
|--|------------------|------------------|--------------------------|
| Inflammatory bowel diseases (n=22) | 15 (68) | 12 (55) | 3 (14) |
| Non inflammatory bowel diseases (n=88) | 33 (37) | 22 (25) | 12 (14) |
| Other lower bowel diseases (n=30) | 10 (33) | 6 (20) | 5 (17) |
| Upper digestive tract diseases (n=58) | 23 (40) | 16 (28) | 7 (12) |
| All patients (n=110) | 48 (44) | 34 (31) | 15 (14) |

^a Number of positive feces (%)

Fig. 1. PCR products obtained for the identification of *Desulfomonas* (*Dm.*) and *Desulfovibrio* (*D.*) strains isolated from humans. Lanes 1 and 7, 100 bp DNA Ladder (Gibco-BRL Life Technologies); lane 2, negative control (water instead of DNA extract); lane 3, *Dm. pigra* ATCC 29098^T; lane 4, *D. desulfuricans* Essex 6 ATCC 29577^T; lane 5, *D. desulfuricans* MB ATCC 27774; lane 6, *D. fairfieldensis* ATCC 700045.



1.4. Isolement de *Desulfovibrio fairfieldensis* de poches parodontales

Les BSR ont été associées aux atteintes parodontales sévères, mais les espèces potentiellement impliquées dans ce processus inflammatoire chronique n'ont pas été identifiées. La PCR multiplexe mise au point a donc été utilisée pour l'identification des souches isolées de poches parodontales de patients consultant le Département de Parodontologie et d'Implantologie de la Faculté de chirurgie dentaire de Nancy (Pr. N. Miller).

Isolation of the provisionally named *Desulfovibrio*
fairfieldensis from human periodontal pockets

JULIEN LOUBINOX,^{1,2} * CATHERINE BISSON-BOUTELLIEZ,³ NEAL
MILLER,³ AND ALAIN E. LE FAOU¹

¹Laboratoire de Bactériologie-Virologie UMR-UHP CNRS 7565, Faculté de Médecine, 54505 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France; ²Instituto de Tecnologia Quimica e Biologica, Universidade Nova de Lisboa, 2780-156 Oeiras, Portugal; ³Département de Parodontologie et d'Implantologie, Faculté de Chirurgie dentaire, 54012 Nancy Cedex.

Running title: *Desulfovibrio fairfieldensis* in periodontal pockets.

* Corresponding author. Mailing address: Laboratoire de Microbiologie, Hôpital de Brabois-Adultes, CHU de Nancy, 54511 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France. Phone: (33) 3 83 15 34 68. Fax: (33) 3 83 15 34 74. E-mail: j.loubinoux@voila.fr.

ABSTRACT

Sulfate-reducing bacteria have recently been associated with periodontitis. Eight isolates of *Desulfovibrio fairfieldensis* were obtained from periodontal pockets of five out of seven patients presenting with active periodontitis. They were identified by a home-made multiplex PCR. This finding reinforces the notion that *D. fairfieldensis*, a new proposed species, is a human bacterium that may present a pathogenic potential in periodontitis and other chronic inflammatory diseases.

Periodontitis is a destructive disease of the supporting tissues of the teeth, namely the cementum, the periodontal ligament, the alveolar bone and to a lesser extent the gingiva. The etiology of this disease is likely multifactorial. It involves the oral flora and the interaction between environmental, genetic and immune factors. The major symptom is the formation of periodontal pockets due to the loss of tissue attachment. These pockets harbor a complex bacterial flora, with a gradient of anaerobic gram-negative bacteria which increases as the pocket gets deeper (4).

Sulfate-reducing bacteria (SRB) represent a class of anaerobic microorganisms that conduct dissimilatory sulfate reduction. In this process, sulfate reduction permits the dissimilation of organic matter with the release of hydrogen sulfide, a corrosive and cytotoxic compound. SRB are commonly isolated from environmental sources (14), but they are also present into the digestive tract (mouth and gut) of animals and humans (2, 17, 19). Human isolates that consist mostly of *Desulfomonas* (*Dm.*) and *Desulfovibrio* (*D.*) have been implicated in inflammatory bowel diseases (1, 3, 13, 20). Recently, SRB have also been associated with severe periodontitis (5, 6), but bacterial identification at the species level has not yet been performed. In order to better evaluate the place of these bacteria in this inflammatory chronic process, we have undertaken a systematic search for SRB in periodontal pockets of patients presenting with periodontitis and attending the Department of Periodontology of the University Hospital of Nancy (Lorraine region, France).

Patients consulting for periodontal disease, but otherwise healthy, were included in the study according to the following criteria: periodontitis with pocket depths of at least 4 mm and absence of periodontal treatment, no antibiotic therapy during the 4 preceding

months nor current medication affecting the gingival inflammation. Baseline measurements were pocket depth, bleeding upon probing, gingival recession, tooth mobility (Mühlemann's Index) (12), amount of supragingival plaque (Plaque Index) (15) and gingival inflammation (Gingival Index) (8).

Supragingival plaque and saliva were wiped off before bacterial collection. A subgingival plaque sample was collected from the periodontal pocket using a sterile paper point. After 20 seconds, the paper point was removed from the pocket and immediately transferred into 1 mL of sterile PBS buffer. After vortexing, the 1 mL sample was inoculated through the rubber cap of a ready-to-use liquid culture medium for the detection of SRB (Test-kits Labège®, Compagnie Française de Géothermie, Orléans, France). This medium was chosen as it is more sensitive than the commonly used Postgate's medium for clinical samples (Loubinoux J., unpublished data). All inoculated media were incubated at 37°C for 1 month. The presence of SRB was ascertained by the formation of a black precipitate (ferrous sulfide). SRB were isolated in the Postgate's solid medium E (14).

For an identification at the species level, a home-made multiplex PCR was performed. This PCR targets the 16S ribosomal RNA gene and was devised in order to identify all the previously described SRB human isolates (9). Briefly, DNA extracts were obtained from 500 µL of culture medium, after centrifugation and resuspension in TE buffer (10 mM Tris H-CL, 1mM EDTA [pH 8]), by the standard phenol-chloroform-isoamyl alcohol method. Each 50-µL PCR mixture contained 5 µL of DNA extract (approximately 50 ng of DNA) and final amounts of 0.4 µM of each primer, 0.8 mM of each deoxynucleoside triphosphate (Boehringer Mannheim Biochemicals, Mannheim, Germany), 20mM Tris HCl

buffer (pH 8.4), 1.5 mM MgCL₂, and 1.5 U of *Taq* DNA Polymerase (Gibco-BRL Life Technologies, Paisley, United Kingdom). The primers were 27K-F (5'-CTG CCT TTG ATA CTG CTT AG-3'), 27K-R (5'-GGG CAC CCT CTC GTT TCG GAG A-3'), Essex-F (5'-CTA CGT TGT GCT AAT CAG CAG CGT AC-3'), Fair-F (5'-TGA ATG AAC TTT TAG GGG AAA GAC-3'), Pigra-F (5'-CTA GGG TGT TCT AAT CAT CAT CCT AC-3') and P687-R (5'-GAT ATC TAC GGA TTT CAC TCC TAC ACC-3'). All reactions were carried out using the GeneAmp PCR System 2400 (Perkin-Elmer, Norwalk, CT). An initial denaturation step of 94°C for 4 min was followed by 30 cycles of denaturation (94°C, 1 min), annealing (55°C, 1 min) and extension (72°C, 2 min), and with a final extension (72°C, 5 min). A negative (water instead of DNA extract) and positive (*D. fairfieldensis* DNA extract) controls were included in each run. Amplified products were resolved by electrophoresis in 1.5% (wt/vol) agarose gels containing ethidium bromide (1.6 mg/mL). A 100 bp DNA ladder was used as a size marker (Gibco-BRL Life Technologies). The value of the multiplex PCR was ascertained using collection strains (*Dm. pigra* ATCC 29098^T; *D. desulfuricans* strain Essex 6 ATCC 29577^T and strain MB ATCC 27774; *D. fairfieldensis* ATCC 700045) and fecal strains. *Dm. pigra*, *D. desulfuricans* or *D. fairfieldensis* are identified by a 250, 400 or 550 bp DNA band respectively.

Among the 7 patients included in the study so far, 5 patients were found to harbor *Desulfovibrio* spp. into 8 periodontal pockets (Table 1). The presence of SRB was detected in the 8 samples between 2 to 14 days. The 8 isolates were gram-negative rods, motile, asaccharolytic, producing H₂S from sulfate and positive for the desulfovridin test. Thus, they were identified as *Desulfovibrio* spp. (14, 18), and were identified by PCR as *D.*

fairfieldensis. Their presence was apparently not related to the severity of the periodontal lesions.

SRB are common inhabitants of periodontal sites (17). The identification of *D. fairfieldensis* from all the SRB-positive periodontal pockets studied may indicate that this recently proposed species is the usual SRB species in periodontal pockets. *D. fairfieldensis* has been previously isolated from blood, abdominal abscesses and a urine specimen (7, 9, 10, 16). It has been isolated mostly in pure culture or as a predominant part of the flora, and may thus possess a higher pathogenic potential than the other SRB species (9). Periodontitis is usually considered as a polymicrobial infection. The predominant bacteria in periodontal pockets are anaerobic proteolytic and fermentating bacteria (11). Their metabolic end-products (low molecular weight organic compounds and hydrogen) can be utilized as electron donors in the anaerobic respiration of sulfates by SRB. Sulfates could be obtained from the bacterial degradation of proteoglycans originating from connective tissues or from alimentation. Thus, in the periodontal pockets, SRB would rely on a complex microbiota for obtaining the substrates necessary for their own growth. This would explain the association of these bacteria with advanced cases of periodontitis (6). However, the accumulation of H₂S in periodontal pockets may also play a role in the destructive process. The limit of detection using the Test-kits Labège® is of 10 to 100 bacteria. Thus, owing to the limited volume of sample, a lack of detection of some strains is possible. An extensive survey is in progress to evaluate more precisely the prevalence of *D. fairfieldensis* in periodontal pockets. This will permit to determine if a sole SRB species is present in these sites and to what extent these bacteria are implicated in the destructive

process.

We are indebted to late Dr. Wee Tee (University of Melbourne, Australia) for kindly providing 4 strains of *Desulfovibrio fairfieldensis*, including strain ATCC 700045. We thank D. Meng and A.M. Carpentier (Laboratoire de Bactériologie-Virologie UMR-UHP CNRS 7565) for their excellent technical assistance.

REFERENCES

1. Gibson, G.R., G.T. McFarlane, and J.H. Cummings. 1988. Occurrence of sulphate-reducing bacteria in human faeces and the relationship of dissimilatory sulphate reduction to methanogenesis in the large gut. *J. Appl. Bacteriol.* **65**:103-11.
2. Gibson, G.R. 1990. Physiology and ecology of sulphate-reducing bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* **69**:769-97.
3. Gibson, G.R., J.H. Cummings, and G.T. McFarlane. 1991. Growth and activities of sulphate-reducing bacteria in gut contents of healthy subjects and patients with ulcerative colitis. *FEMS Microbiol. Ecol.* **86**:103-12.
4. Haffaje, A.D., and S.S. Sockanski. 1994. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *J. Clin. Periodontol.* **15**:390-8.
5. Langendijk, P.S., J. Hagemann, and J.S. Van der Hoeven. 1999. Sulfate-reducing bacteria in periodontal pockets and in healthy oral sites. *J. Clin. Periodontol.* **26**:596-9.
6. Langendijk, P.S., J.T.J. Hanssen, and J.S. Van der Hoeven. 2000. Sulfate-reducing bacteria in association with human periodontitis. *J. Clin. Periodontol.* **27**:943-50.
7. La Scola, B., and D. Raoult. 1999. Third human isolate of a *Desulfovibrio* sp. identical to the provisionally named *Desulfovibrio fairfieldensis*. *J. Clin. Microbiol.* **37**:3076-7.

8. Løe, H., and J. Silness. 1963. Periodontal disease in pregnancy (I). Prevalence and severity. *Acta Odontol. Scand.* **21**:533-51.
9. Loubinoux, J., F. Mory, I.A.C. Pereira, and A.E. Le Faou. 2000. Bacteremia caused by a strain of *Desulfovibrio* related to the provisionally named *Desulfovibrio fairfieldensis*. *J. Clin. Microbiol.* **38**:931-4.
10. MacDougall, R., J. Robson, D. Paterson, and W. Tee. 1997. Bacteremia caused by a recently described novel *Desulfovibrio* species. *J. Clin. Microbiol.* **35**:1805-8.
11. Moore, W.E.C. 1987. Microbiology of periodontal disease. *J. Periodontol. Res.* **22**:335-41.
12. Mühlemann, H.R. 1954. Tooth mobility. The measuring method. Initial and secondary tooth mobility. *J. Periodontol.* **25**:22-9.
13. Pitcher, M.C.L., and J.H. Cummings. 1996. Hydrogen sulphide: a bacterial toxin in ulcerative colitis? *Gut* **39**:1-4.
14. Postgate, J.R. 1984. *The sulphate-reducing bacteria*, 2nd ed. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.
15. Silness, J., and H. Løe. 1964. Periodontal disease in pregnancy (II). Correlation between oral hygiene and periodontal condition. *Acta Odontol. Scand.* **22**:112-35.
16. Tee, W., M. Dyll-Smith, W. Woods, and D. Eisen. 1996. Probable new species of *Desulfovibrio* isolated from a pyogenic liver abscess. *J. Clin. Microbiol.* **34**:1760-4.
17. Van der Hoeven, J.S., C.W.A. Van den Kieboom, and M.J.M. Schaeken. 1995. Sulfate-reducing bacteria in the periodontal pocket. *Oral Microbiol. Immunol.* **10**:288-90.

18. Widdel, F., and N. Pfennig. 1984. Dissimilatory sulfate- or sulfur-reducing bacteria, pp. 663-79. In: N.R. Krieg and J.G. Holt (ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 1. The Williams and Wilkins Co., Baltimore, Md.
19. Willis, C.L., G.R. Gibson, C. Allison, S. MacFarlane, and J.S. Holt. 1995. Growth, incidence and activities of dissimilatory sulfate-reducing bacteria in the human oral cavity. *FEMS Microbiol. Lett.* 129:267-72.
20. Willis, C.L., J.H. Cummings, G. Neale, and G.R. Gibson. 1997. Nutritional aspects of dissimilatory sulfate reduction in the human large intestine. *Curr. Microbiol.* 35:294-8.

TABLE 1. Characteristics of patients with periodontal disease and clinical findings

| Patient | Sex | Age | Smoker | Tooth | SRB ^a | Pocket depth (mm) | Bleeding upon probing | Gingival recession (mm) | Mobility Index | Plaque Index | Gingival Index |
|---------|-----|-----|--------|-------|------------------|-------------------|-----------------------|-------------------------|----------------|--------------|----------------|
| 1 | M | 71 | no | 26 | + | 7 | yes | 5 | 2 | 3 | 3 |
| 2 | M | 37 | yes | 25 | - | 7 | no | 0 | 2 | 0 | 1 |
| | | | | 44 | + | 8 | yes | 1 | 1 | 2 | 1 |
| 3 | M | 64 | no | 25 | - | 8 | yes | 3 | 3 | 3 | 3 |
| | | | | 47 | - | 8 | yes | 3 | 2 | 1 | 1 |
| | | | | 48 | - | 7 | yes | 4 | 1 | 1 | 1 |
| 4 | M | 60 | yes | 13 | - | 5 | no | 0 | 0 | 3 | 1 |
| | | | | 23 | - | 10 | no | 0 | 3 | 3 | 2 |
| 5 | M | 48 | yes | 16 | + | 4 | no | 4 | 1 | 1 | 1 |
| | | | | 26 | + | 5 | no | 0 | 0 | 2 | 1 |
| | | | | 33 | - | 6 | no | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 6 | F | 24 | no | 16 | + | 8 | no | 0 | 3 | 0 | 2 |
| | | | | 22 | + | 6 | no | 0 | 2 | 1 | 2 |
| | | | | 42 | + | 9 | no | 0 | 3 | 0 | 2 |
| 7 | M | 38 | yes | 37 | + | 8 | no | 0 | 3 | 1 | 2 |
| | | | | 45 | - | 6 | yes | 1 | 1 | 0 | 1 |

^a Isolation of sulfate-reducing bacteria from the periodontal pocket

1.5. Isolement des bactéries sulfato-réductrices dans des collections purulentes abdominales

Les BSR ne sont pas recherchées dans les prélèvements biologiques par les Laboratoires de Bactériologie médicale. Cependant, ces bactéries ont été isolées fortuitement d'abcès profonds, le plus souvent de localisation abdominale, et leur prévalence dans ces prélèvements est très probablement sous-estimée. Afin de mieux connaître la place des BSR en pathologie infectieuse chirurgicale, nous les avons recherchées spécifiquement et identifiées par PCR dans les collections pleurales et abdominales purulentes arrivant au Laboratoire de Bactériologie du CHU de Strasbourg (Pr. H. Monteil).

Isolation of sulfate-reducing bacteria from human thoraco-abdominal collections

JULIEN LOUBINOX,^{1,2} * BENOIT JAULHAC,³ YVES PIEMONT,³ HENRI
MONTEIL,³ AND ALAIN E. LE FAOU¹

¹Laboratoire de Bactériologie-Virologie UMR-UHP CNRS 7565, Faculté de
Médecine, 54505 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France; ²Instituto de Tecnologia
Quimica e Biologica, Universidade Nova de Lisboa, 2780-156 Oeiras, Portugal;
³Laboratoire de Bactériologie, Faculté de Médecine de Strasbourg, 3 rue Koeberlé,
67000 Strasbourg, France.

Running title: sulfate-reducing bacteria in thoraco-abdominal collections.

* Corresponding author. Mailing address: Laboratoire de Microbiologie, Hôpital de
Brabois-Adultes, CHU de Nancy, 54511 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France.
Phone: (33) 3 83 15 34 68. Fax: (33) 3 83 15 34 74. E-mail: j.loubinoux@voila.fr.

ABSTRACT

Sulfate-reducing bacteria (SRB) are inhabitants of the human digestive tract. Recently, they have been fortuitously isolated from profound abscesses, mainly of abdominal location, that have raised interest for these bacteria. To evaluate the place of SRB in septic processes, we have searched for these bacteria in 80 purulent pleural or abdominal collections of patients using a specific liquid media which was found very sensitive for the detection of SRB. Twelve isolates were obtained from abdominal samples. They were identified, by a home-made multiplex PCR, as *Desulfomonas pigra* (7 strains), *Desulfovibrio fairfieldensis* (4 strains) and *Desulfovibrio desulfuricans* (1 strain). All strains were part of a mixed aerobic and anaerobic flora. Thus, SRB appear to behave like many other anaerobic intestinal bacteria and are equally common in surgical infectious processes.

Sulfate-reducing bacteria (SRB) represent a class of anaerobic microorganisms that conduct dissimilatory sulfate reduction to obtain energy. In this process, sulfate reduction permits the dissimilation of organic matter with the release of hydrogen sulfide, a corrosive and cytotoxic compound. SRB are present into the digestive tract (mouth and gut) of animals and humans (3, 14, 15). Human isolates that consist mostly of *Desulfomonas* (*Dm.*) and *Desulfovibrio* (*D.*) may play a role in the onset and/or the perpetuation of inflammatory bowel diseases (2, 4, 11, 16), but whether they play a role in surgical abdominal infections is not known. However, *Desulfovibrio* spp. have been isolated from profound abscesses (abdominal or brain) (1, 5, 6, 7, 8, 9, 13) and most of these infectious processes were consecutive to digestive surgery. Their place in these infections is certainly underestimated as most clinical Bacteriology Laboratories do not search for SRB. Thus, in order to better evaluate their place in surgical infectious processes, we have undertaken a specific search for these bacteria in pleural or abdominal collections of patients. We report the preliminary results of this survey.

Pleural or abdominal collections of 80 patients from different Surgery Units of the University Hospital of Strasbourg, France, were collected. The mean age of the patients (47 women and 33 men) was 57 years (range 2-95 years). Samples were sent to the Laboratory of Bacteriology of the University Hospital of Strasbourg for bacterial cultures. Only purulent collections were included in the study. The 80 samples were collected consecutively during a period of 4 months.

An aliquot of 200 μ L of the sample was inoculated through the rubber cap of a ready-

to-use liquid culture medium for the detection of SRB (Test-kits Labège[®], Compagnie Française de Géothermie, Orléans, France). This medium was chosen as it is more sensitive than the commonly used Postgate's medium for clinical samples (Loubinoux J., unpublished data). All inoculated media were incubated at 37°C for 1 month in an anaerobic chamber. The presence of SRB was ascertained by the formation of a black precipitate (ferrous sulfide). SRB were further isolated in the Postgate's solid medium E (12).

For an identification at the species level, a home-made multiplex PCR was performed. This PCR targets the 16S ribosomal RNA gene and was devised in order to identify all the previously described SRB human isolates (7). Briefly, DNA extracts were obtained from 500 µL of culture medium, after centrifugation and resuspension in TE buffer (10 mM Tris H-CL, 1mM EDTA [pH 8]), by the standard phenol-chloroform-isoamyl alcohol method. Each 50-µL PCR mixture contained 5 µL of DNA extract (approximately 50 ng of DNA) and final amounts of 0.4 µM of each primer, 0.8 mM of each deoxynucleoside triphosphate (Boehringer Mannheim Biochemicals, Mannheim, Germany), 20mM Tris HCl buffer (pH 8.4), 1.5 mM MgCL₂, and 1.5 U of *Taq* DNA Polymerase (Gibco-BRL Life Technologies, Paisley, United Kingdom). The primers were 27K-F (5'-CTG CCT TTG ATA CTG CTT AG-3'), 27K-R (5'-GGG CAC CCT CTC GTT TCG GAG A-3'), Essex-F (5'-CTA CGT TGT GCT AAT CAG CAG CGT AC-3'), Fair-F (5'-TGA ATG AAC TTT TAG GGG AAA GAC-3'), Pigra-F (5'-CTA GGG TGT TCT AAT CAT CAT CCT AC-3') and P687-R (5'-GAT ATC TAC GGA TTT CAC TCC TAC ACC-3'). All reactions were carried out using the GeneAmp PCR System 2400 (Perkin-Elmer, Norwalk, CT). An initial denaturation step of 94°C for 4 min was followed by 30 cycles of denaturation (94°C, 1 min), annealing

(55°C, 1 min) and extension (72°C, 2 min), and with a final extension (72°C, 5 min). A negative (water instead of DNA extract) and positive (*D. fairfieldensis* DNA extract) controls were included in each run. Amplified products were resolved by electrophoresis in 1.5% (wt/vol) agarose gels containing ethidium bromide (1.6 mg/mL). A 100 bp DNA ladder was used as a size marker (Gibco-BRL Life Technologies). The value of the multiplex PCR was ascertained using collection strains (*Dm. pigra* ATCC 29098^T; *D. desulfuricans* strain Essex 6 ATCC 29577^T and strain MB ATCC 27774; *D. fairfieldensis* ATCC 700045) and fecal strains. *Dm. pigra*, *D. desulfuricans* or *D. fairfieldensis* are identified by a 250, 400 or 550 bp DNA band respectively.

The 80 samples studied were from pleural (n=5) or abdominal origin (n=75) (Table 1). SRB were isolated from 15% of the samples (10 peritoneal fluids and 2 intra-abdominal collections) in patients presenting with peritonitis, appendicitis or rectal cancer. They were identified by PCR as *Dm. pigra* (7 strains), *D. fairfieldensis* (4 strains) or *D. desulfuricans* (1 strain) (Table 2). They were all part of a mixed aerobic and anaerobic flora.

In a previous study, SRB have been isolated from 44% of the feces of 110 patients from a Hepato-Gastro-Enterology Unit of the University Hospital of Nancy, France, and identified as *Dm. pigra* (34 strains) and *D. fairfieldensis* (15 strains) (Loubinoux J., unpublished result). Both species, and in the same proportion, were isolated from abdominal samples. This renders likely the intestinal origin of these bacteria in abdominal infectious processes. *D. desulfuricans*, seldom encountered, is present in the environment. On the contrary, *Dm. pigra* and *D. fairfieldensis* have been isolated solely from human samples. If they are specific of humans deserves further studies. *Dm. pigra* has been isolated initially

from feces (10). We have shown it is present also in purulent abdominal collections. On the contrary, *D. fairfieldensis* has already been described in extra-abdominal infections (6, 7, 9, 13), and it has been proposed that it possesses a higher pathogenic potential than other SRB species (7). Thus, SRB are part of the commensal intestinal flora. Their presence in a mixed flora in abdominal purulent collections suggests that the intestinal SRB behave like other commensal anaerobes of the intestine. They are equally common in surgical infectious processes. Thus, their presence in blood as it has been described recently is not surprising (7, 9).

ACKNOWLEDGEMENTS

We are indebted to late Dr. Wee Tee (University of Melbourne, Australia) for kindly providing 4 strains of *Desulfovibrio fairfieldensis*, including strain ATCC 700045. We thank M. Thirion (Laboratoire de Bactériologie, CHU de Strasbourg) for her excellent technical assistance.

REFERENCES

1. Baron, E.J., R. Bennion, J. Thompson, C. Strong, P. Summanen, M. McTeague, and S.M. Finegold. 1992. A microbiological comparison between acute and complicated appendicitis. *Clin. Infect. Dis.* **14**:227-231.
2. Gibson, G.R., G.T. McFarlane, and J.H. Cummings. 1988. Occurrence of sulphate-reducing bacteria in human faeces and the relationship of dissimilatory sulphate reduction to methanogenesis in the large gut. *J. Appl. Bacteriol.* **65**:103-11.
3. Gibson, G.R. 1990. Physiology and ecology of sulphate-reducing bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* **69**:769-97.
4. Gibson, G.R., J.H. Cummings, and G.T. McFarlane. 1991. Growth and activities of sulphate-reducing bacteria in gut contents of healthy subjects and patients with ulcerative colitis. *FEMS Microbiol. Ecol.* **86**:103-12.
5. Johnson, C.C., and S.M. Finegold. 1987. Uncommonly encountered, motile, anaerobic gram-negative bacilli associated with infection. *Rev. Infect. Dis.* **9**:1150-62.
6. La Scola, B., and D. Raoult. 1999. Third human isolate of a *Desulfovibrio* sp. identical to the provisionally named *Desulfovibrio fairfieldensis*. *J. Clin. Microbiol.* **37**:3076-7.
7. Loubinoux, J., F. Mory, I.A.C. Pereira, and A.E. Le Faou. 2000. Bacteremia caused by a strain of *Desulfovibrio* related to the provisionally named *Desulfovibrio fairfieldensis*. *J. Clin. Microbiol.* **38**:931-4.

8. Lozniewski, A., P. Maurer, H. Schuhmacher, J.P. Carlier, and F. Mory. 1999. First isolation of *Desulfovibrio* sp. as part of a polymicrobial infection from a brain abscess. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **18**: 602-3.
9. MacDougall, R., J. Robson, D. Paterson, and W. Tee. 1997. Bacteremia caused by a recently described novel *Desulfovibrio* species. *J. Clin. Microbiol.* **35**:1805-8.
10. Moore, W.E.C., J.L. Johnson, and L.V. Holdeman. 1976. Emendation of *Bacteroidaceae* and *Butyrivibrio* and descriptions of *Desulfomonas* gen. nov. and ten new species in the genera *Desulfomonas*, *Butyrivibrio*, *Eubacterium*, *Clostridium*, and *Ruminococcus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **26**:238-52
11. Pitcher, M.C.L., and J.H. Cummings. 1996. Hydrogen sulphide: a bacterial toxin in ulcerative colitis? *Gut* **39**:1-4.
12. Postgate, J.R. 1984. The sulphate-reducing bacteria, 2nd ed. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.
13. Tee, W., M. Dyal-Smith, W. Woods, and D. Eisen. 1996. Probable new species of *Desulfovibrio* isolated from a pyogenic liver abscess. *J. Clin. Microbiol.* **34**:1760-4.
14. Van der Hoeven, J.S., C.W.A. Van den Kieboom, and M.J.M. Schaeken. 1995. Sulfate-reducing bacteria in the periodontal pocket. *Oral Microbiol. Immunol.* **10**:288-90.
15. Willis, C.L., G.R. Gibson, C. Allison, S. MacFarlane, and J.S. Holt. 1995. Growth, incidence and activities of dissimilatory sulfate-reducing bacteria in the human oral cavity. *FEMS Microbiol. Lett.* **129**:267-72.

16. Willis, C.L., J.H. Cummings, G. Neale, and G.R. Gibson. 1997. Nutritional aspects of dissimilatory sulfate reduction in the human large intestine. *Curr. Microbiol.* 35:294-8.

TABLE 1. Origins of the samples studied

| Samples | Negative for SRB ^a | Positive for SRB ^a | All samples |
|---|-------------------------------|-------------------------------|-------------|
| Pleural fluids | 5 | 0 | 5 |
| Peritoneal fluids | 37 | 10 | 47 |
| Intra-abdominal and abdominal wall collections | 26 | 2 | 28 |

^a Sulfate-reducing bacteria were detected by culture

TABLE 2. Characteristics of patients from whom sulfate-reducing bacteria were isolated

| Patients | Sex | Age | Samples | Clinical findings | SRB ^a species | Associated flora (aerobic and anaerobic) |
|----------|-----|-----|----------------------------|---------------------------|-------------------------------------|---|
| 1 | M | 64 | Peritoneal fluid | Peritonitis | <i>Desulfomonas pigra</i> | yes |
| 2 | F | 83 | Peritoneal fluid | Peritonitis | <i>Desulfomonas pigra</i> | yes |
| 3 | F | 81 | Peritoneal fluid | Rectal cancer | <i>Desulfomonas pigra</i> | yes |
| 4 | M | 32 | Peritoneal fluid | Appendicitis, peritonitis | <i>Desulfovibrio fairfieldensis</i> | yes |
| 5 | F | 88 | Peritoneal fluid | Peritonitis | <i>Desulfomonas pigra</i> | yes |
| 6 | M | 14 | Intra-abdominal collection | Appendicitis | <i>Desulfomonas pigra</i> | yes |
| 7 | M | 18 | Peritoneal fluid | Peritonitis | <i>Desulfomonas pigra</i> | yes |
| 8 | F | 29 | Peritoneal fluid | Appendicitis, peritonitis | <i>Desulfovibrio fairfieldensis</i> | yes |
| 9 | M | 9 | Peritoneal fluid | Appendicitis, peritonitis | <i>Desulfomonas pigra</i> | yes |
| 10 | F | 53 | Peritoneal fluid | Peritonitis | <i>Desulfovibrio fairfieldensis</i> | yes |
| 11 | M | 80 | Peritoneal fluid | Peritonitis | <i>Desulfovibrio desulfuricans</i> | yes |
| 12 | M | 21 | Intra-abdominal collection | Appendicitis | <i>Desulfovibrio fairfieldensis</i> | yes |

^a Sulfate-reducing bacteria were identified by PCR

1.6. Commentaires

Les BSR sont considérées comme des espèces commensales du tube digestif de l'homme et ne sont pas recherchées en bactériologie médicale courante. Cependant, l'isolement fortuit de ces bactéries au cours de processus septiques aigus nous a conduit à étudier la place éventuelle des BSR en pathologie humaine. La recherche spécifique de ces bactéries dans des collections pleurales et abdominales a montré que leur isolement au sein de prélèvements abdominaux purulents est relativement fréquent. Le point de départ de ces infections est l'intestin, ce qui explique la localisation abdominale préférentielle des foyers infectieux. Au cours de processus infectieux, les espèces *Dm. pigra*, *D. fairfieldensis* et *D. desulfuricans* ont été isolées par ordre de fréquence décroissante. *Dm. pigra* a été initialement isolé de selles humaines (70). Il peut donc également être isolé de collections purulentes abdominales. La présence des BSR au sein d'une flore mixte dans les prélèvements abdominaux suggère qu'elles se comportent comme les autres espèces anaérobies commensales de l'intestin. Elles sont aussi fréquentes que la plupart de ces espèces en pathologie infectieuse chirurgicale, ce qui explique leur présence occasionnelle dans des hémocultures.

Les BSR pourraient être impliquées dans des pathologies inflammatoires chroniques. L'identification de ces bactéries par PCR multiplexe a permis d'associer *Dm. pigra* aux maladies inflammatoires chroniques intestinales et *D. fairfieldensis* aux atteintes parodontales. Ces bactéries peuvent être présentes du fait de l'atteinte inflammatoire locale ou participer à l'initiation et/ou à l'entretien des lésions. Une meilleure connaissance de ces 2 espèces, notamment par la recherche de facteurs de virulence, devrait permettre de préciser leur rôle dans ces maladies.

2. ETUDE TAXONOMIQUE DES BACTERIES SULFATO-REDUCTRICES

2.1. Reclassification de *Desulfomonas pigra* dans le genre *Desulfovibrio*

Le genre *Desulfomonas* a été créé en 1976 sur la base de 2 différences phénotypiques avec le genre *Desulfovibrio* : la forme et la mobilité. Ces 2 genres ont cependant des caractères métaboliques communs, habituellement considérés comme critères diagnostiques du genre *Desulfovibrio* (présence de désulfovirdine, cytochrome *c3* et ménaquinone MK-6). L'étude du gène de l'ARN ribosomal 16S de *Dm. pigra* ATCC 29098^T a conduit à envisager la reclassification de cette espèce dans le genre *Desulfovibrio*, mais cela n'a jamais été formalisé. L'étude des souches de *Dm. pigra* isolées de patients a montré la stabilité du gène de l'ARN ribosomal 16S et de la région de l'ADN comprise entre les gènes des ARN ribosomaux 16S et 23S. Nous proposons donc le reclassement de *Dm. pigra* dans le genre *Desulfovibrio*, ce qui implique la suppression du genre *Desulfomonas*.

Reclassification of *Desulfomonas pigra*
as *Desulfovibrio pigrum* comb. nov. and
suppression of the genus *Desulfomonas*

Julien Loubinoux,^{1,2} Filipa M.A. Valente,² Ines A.C. Pereira,² Annie
Costa,³ Patrick A.D. Grimont⁴ and Alain E. Le Faou¹

¹ Laboratoire de Microbiologie UMR CNRS 7565, Hôpital de Brabois-Adultes, CHU de
Nancy, 54511 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France

² Instituto de Tecnologia Quimica e Biologica, Universidade Nova de Lisboa, 2780-156
Oeiras, Portugal

³ Laboratoire de Biochimie Spécialisée, Hôpital d'Enfants, CHU de Dijon, 21034 Dijon
Cedex, France

⁴ Unité Biodiversité des Bactéries Pathogènes Emergentes, U 389 INSERM, Institut Pasteur,
75724 Paris Cedex 15, France

Author for correspondence: Julien Loubinoux. Tel: + 33 3 83 15 34 68. Fax: + 33 3 83
15 34 74. e-mail: j.loubinoux@voila.fr

Running title: *Desulfovibrio pigrum* comb. nov.

Keywords: *Desulfomonas pigra*, *Desulfovibrio*, sulfate-reducing bacteria

Subject category for the Contents list: Taxonomic Note

Summary

The growth characteristics, DNA G+C contents, 16S rDNA and 16S-23S rDNA internal transcribed spacer sequences were determined for *Desulfomonas pigra* ATCC 29098^T, *Desulfovibrio desulfuricans* subsp. *desulfuricans* (strains Essex 6 ATCC 29577^T and MB ATCC 27774) and “*Desulfovibrio fairfieldensis*” ATCC 700045. Despite phenotypic differences (shape and motility) between *Desulfomonas pigra* and *Desulfovibrio* strains, the molecular analysis suggests that *Desulfomonas pigra* should be reclassified within the genus *Desulfovibrio*. Thus, we propose the reclassification of *Desulfomonas pigra* as *Desulfovibrio pigrum* comb. nov., which implies the suppression of the genus *Desulfomonas* and the emendation of the description of the genus *Desulfovibrio*.

Sulfate-reducing bacteria (SRB) are anaerobic microorganisms that conduct dissimilatory sulfate reduction to obtain energy. This process leads to the release of hydrogen sulfide, a corrosive and cytotoxic compound. SRB have been isolated mostly from environmental sources, but are also present into the digestive tract (mouth and gut) of animals and humans (Gibson, 1990; Postgate, 1984; Van der Hoeven *et al.*, 1995). Human isolates belong mostly to the genera *Desulfomonas* and *Desulfovibrio* (*D.*) (Gibson *et al.*, 1988, 1991; Moore *et al.*, 1976; Willis *et al.*, 1997). They are anaerobic gram-negative rods which contain desulfovibrin (Postgate, 1984). Both genera belong to the *Desulfovibrionaceae* family, within the δ subgroup of Proteobacteria (Castro *et al.*, 2000). They are phylogenetically closely related to several pathogens such as *Bilophila wadsworthia* (Baron *et al.*, 1989) and *Lawsonia intracellularis* (MacOrist *et al.*, 1995). Recent findings suggest that SRB may be involved in human diseases. They have been proposed to play a role in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases (Gibson *et al.*, 1988, 1991; Pitcher & Cummings, 1996; Willis *et al.*, 1997) and periodontitis (Langendijk *et al.*, 2000). *Desulfovibrio* spp. have also been isolated from profound abscesses (abdominal or brain), blood and urine (La Scola & Raoult, 1999; Loubinoux *et al.*, 2000; MacDougall *et al.*, 1997; Tee *et al.*, 1996). In these settings, most strains have been identified as “*Desulfovibrio fairfieldensis*”, a recently proposed new species (Tee *et al.*, 1996). *Desulfomonas pigra* and “*D. fairfieldensis*” have been described exclusively in humans until now, whilst *Desulfovibrio desulfuricans*, the type species of the genus *Desulfovibrio*, is also present in the environment. As compared to *Desulfovibrio*, the unique species of the genus *Desulfomonas* presents with only a limited number of different phenotypic traits (e.g., cell shape and motility) (Moore *et al.*, 1976; Postgate, 1984) and 16S

rDNA sequences analysis has led to suggest its reclassification within the genus *Desulfovibrio* (Devereux *et al.*, 1989; Widdel & Bak, 1992). Thus, we performed a phenotypic and molecular comparison of strains of *Desulfomonas pigra*, “*D. fairfieldensis*” and *D. desulfuricans* in order to propose the reclassification of *Desulfomonas pigra* within the genus *Desulfovibrio*.

Desulfomonas pigra ATCC 29098^T, *D. desulfuricans* subsp. *desulfuricans* Essex 6 ATCC 29577^T, *D. desulfuricans* subsp. *desulfuricans* MB ATCC 27774, “*D. fairfieldensis*” ATCC 700045 were studied. The strains were grown in Postgate’s medium B at 37°C under anaerobiosis for molecular analysis (Postgate, 1984). The electron donors utilized by the strains were determined in a basal medium supplemented with sterile stock solutions (10 mM) and with 10 mM sulfate as the terminal electron acceptor as previously described (Devereux *et al.*, 1990). Hydrogen was added in a mixture with CO₂ (4 vol/1 vol) by the Hungate technique into the gas phase of half-filled tubes sealed with black rubber stoppers (Widdel & Bak, 1992). The electron acceptors were determined with 10 mM sodium lactate as the electron donor. After bacterial inoculation (1%, vol/vol), cell growth was checked by absorbance at 600 nm and said positive if it exceeded 0.1 within 14 days.

DNA extraction for molecular analysis was performed using the phenol/chloroform method (Brenner *et al.*, 1982). The G+C content of DNA was determined by reverse-phase HPLC using a Spectra Physics chromatograph (Spectra Physics, San Jose, CA, USA) with a Supelcosil LC-18S column (Supelco Inc., Bellefont, PA, USA) and a forward Spectra Focus scanning detector (Spectra Physics). Enzymatic hydrolysis of DNA samples was carried out using a procedure adapted from methods previously described for tRNAs (Desgres *et al.*,

1989). The enzymatic hydrolysates were submitted to boronate chromatography to eliminate ribonucleosides (Kuo *et al.*, 1990). The resulting desoxyribonucleosides were quantified by HPLC with synthetic *N*⁶-methyldeoxyadenosine as internal standard (Gehrke *et al.*, 1990). The 16S rRNA gene was amplified using the consensus primers 27f and 1525r, and sequenced as described previously (Loubinoux *et al.*, 2000; Tee *et al.*, 1996). 16S rDNA sequences from *Desulfovibrio* and phylogenetically related strains were obtained from the GenBank database (Table 1). All 16S rDNA sequences were aligned with ClustalX and a phylogenetic tree was constructed using Dendrograf, a program of the Taxotron package (Taxolab Institut Pasteur, Paris, France). The internal transcribed spacer region (ITS) between 16S and 23S rDNAs was amplified using 1525f (5'-GGCTGGATCACCTCCTT-3') and 23Sr52 (5'-TGCCAAGGCATCCACC-3'), and sequenced as described previously (Gürtler & Stanisich, 1996).

Desulfomonas pigra ATCC 29098^T utilized less substrates than *D. desulfuricans* subsp. *desulfuricans* Essex 6^T, *D. desulfuricans* subsp. *desulfuricans* MB or “*D. fairfieldensis*” ATCC 700045 (Table 2). G+C contents of DNA from strains *Desulfomonas pigra* ATCC 29098^T, *D. desulfuricans* subsp. *desulfuricans* Essex 6^T, *D. desulfuricans* subsp. *desulfuricans* MB and “*D. fairfieldensis*” ATCC 700045 were respectively 64, 59, 59 and 62 mol%. The phylogenetic tree of *Desulfomonas pigra* strain ATCC 29098^T and phylogenetically related strains based on comparative analysis of the 16S rDNA sequences showed that *Desulfomonas pigra* is close to *Desulfovibrio* species (Fig. 1). The closest relations were “*D. fairfieldensis*” (96% similarity), *D. desulfuricans* Essex 6^T (96%), *D. desulfuricans* MB (95.5%) and *D. intestinalis* (95%). The

ITS sequences of strains *Desulfomonas pigra* ATCC 29098^T, *D. desulfuricans* subsp. *desulfuricans* Essex 6^T, *D. desulfuricans* subsp. *desulfuricans* MB and “*D. fairfieldensis*” ATCC 700045 were respectively of 274, 427, 396 and 529 bp. The ITS sequence of *Desulfomonas pigra* ATCC 29098^T contained 1 tRNA gene (Ile) whereas the sequences of *D. desulfuricans* subsp. *desulfuricans* Essex 6^T, *D. desulfuricans* subsp. *desulfuricans* MB and “*D. fairfieldensis*” ATCC 700045 contained 2 tRNA genes (Ile, Ala).

Desulfomonas pigra is a non motile straight rod whereas *Desulfovibrio* strains are usually curved, typically comma-shaped, motile rods. The creation of the genus *Desulfomonas* in 1976 relied on this phenotypic difference (Moore *et al.*, 1976). A non motile species, *D. carbinolicus*, has already been included within the genus *Desulfovibrio* (Nanninga & Gottschal, 1987). *Desulfomonas pigra* is usually considered as a human commensal bacterium, which may explain the lack of interest in this species, suggested by solely two publications (Moore *et al.*, 1976; Sperry & Wilkins, 1977). However, *Desulfomonas pigra* gained interest as it was found to be the most prevalent SRB species in the faeces of patients presenting with inflammatory bowel diseases (Loubinoux *et al.*, manuscript submitted). Despite its shape and absence of motility, *Desulfomonas pigra* shares several important phenotypic features with *Desulfovibrio*, such as the presence of desulfovirdin, cytochrome *c*3 and menaquinone MK-6 (Moore *et al.*, 1976; Postgate, 1984; Sperry & Wilkins, 1977). These biochemical characteristics are usually considered as diagnostic characters for the genus *Desulfovibrio*. Moreover, *Desulfomonas* and *Desulfovibrio* oxidize incompletely organic compounds to acetate. Thus, they are not able to grow with acetate as the carbon source (Table 2).

DNA G+C contents of strains *Desulfomonas pigra* ATCC 29098^T, *D. desulfuricans* subsp. *desulfuricans* Essex 6^T, *D. desulfuricans* subsp. *desulfuricans* MB and “*D. fairfieldensis*” ATCC 700045 vary from 59 to 64 mol%. This variation is below 10 mol%, which is currently accepted within a genus (Vandamme *et al.*, 1996). The value of 64 mol% obtained for *Desulfomonas pigra* ATCC 29098^T differs from the previously reported value of 66 mol% for the same strain (Moore *et al.*, 1976). This could be explained by the differences in the methods performed as HPLC is a more precise method than thermal denaturation midpoint method. The major argument for proposing the reclassification of *Desulfomonas pigra* within the genus *Desulfovibrio* relies on the 16S rDNA sequences analysis. Comparative analysis of the determined 16S rDNA sequence for *Desulfomonas pigra* ATCC 29098^T confirmed the inclusion of this species within the genus *Desulfovibrio*.

Thus, on the basis of previous works (Devereux *et al.*, 1989; Widdel & Bak, 1992) and our findings, it is proposed that *Desulfomonas pigra* be assigned to the genus *Desulfovibrio* as *Desulfovibrio pigrum* comb. nov. and the genus *Desulfomonas* be suppressed.

Emended description of the genus *Desulfovibrio*

Desulfovibrio (De.sul.fo.vi'bri.o. L. pref. *de* from; L. n. *sulfur* sulfur; L. v. *vibrio* to vibrate; M.L. masc. n. *Vibrio* that which vibrates, a generic name; M.L. masc. n. *Desulfovibrio* a vibrio that reduces sulfur compounds.)

The description of the genus *Desulfovibrio* is identical to that of Widdel & Pfennig (1984) except the shape and motility of rods. We propose the genus *Desulfovibrio* to include curved or straight rods, non motile or motile by means of a single or lophotrichous polar flagella.

Description of *Desulfovibrio pigrum* comb. nov.

Desulfovibrio pigrum (L. adj. *pig'rum* lazy [referring to the limited substrate utilization of the species])

The description of *Desulfovibrio pigrum* comb. nov. is identical to that of Moore *et al.* (1976) except the G+C content of the DNA, which is 64 mol%.

Nucleotide sequence accession numbers

The 16S rDNA sequences of *Desulfomonas pigra* ATCC 29098^T, *D. desulfuricans* subsp. *desulfuricans* Essex 6^T and MB have been deposited in the GenBank database under the accession numbers AF192152, AF192153 and AF192154 respectively. The ITS sequences of *Desulfomonas pigra* ATCC 29098^T, *D. desulfuricans* subsp. *desulfuricans* Essex 6^T, *D. desulfuricans* subsp. *desulfuricans* MB and “*D. fairfieldensis*” ATCC 700045 have also been deposited under the accession numbers AY033878, AY033879, AY033880 and AY033881 respectively.

Acknowledgements

Part of this work was supported by a FCT Grant POCTI 36562/ESP/2000 to ICP. We are indebted to late Dr. Wee Tee (University of Melbourne, Australia) for kindly providing the strain “*Desulfovibrio fairfieldensis*” ATCC 700045. We are grateful to Prof. J. Desgres (Laboratoire de Biochimie Spécialisée, Hôpital d'Enfants, CHU de Dijon) for DNA G+C content determinations. We thank D. Meng and A.M. Carpentier (Laboratoire de Bactériologie-Virologie UMR CNRS 7565) for their excellent technical assistance.

References

- Baron, E.J., Summanen, P., Downes, J., Roberts, M.C., Wexler, H. & Finegold, S.M. (1989). *Bilophila wadsworthia*, gen. nov. and sp. nov., a unique Gram-negative anaerobic rod recovered from appendicitis specimens and human faeces. *J Gen Microbiol* **135**, 3405-11.
- Brenner, D.J., McWhorter, A.C., Knutson, J.K. & Steigerwalt, A.G. (1982). *Escherichia vulneris*: a new species of *Enterobacteriaceae* associated with human wounds. *J Clin Microbiol* **15**, 1133-40.
- Castro, H.F., Williams, N.H. & Ogram, A. (2000). Phylogeny of sulfate-reducing bacteria. *FEMS Microbiol Ecol* **31**, 1-9.
- Desgres, J., Keith, G., Kuo, K.C. & Gehrke, C.W. (1989). Presence of phosphorylated O-ribosyl-adenosine in T-psi-stem of yeast methionine initiator tRNA. *Nucleic Acids Res* **17**, 865-82.
- Devereux, R., Delaney, M., Widdel, F. & Stahl, D.A. (1989). Natural relationships among sulfate-reducing eubacteria. *J Bacteriol* **171**, 6689-95.
- Devereux, R., He, S.-H., Doyle, C.L., Orkland, S., Stahl, D.A., Le Gall, J. & Whitman, W.B. (1990). Diversity and origin of *Desulfovibrio* species: phylogenetic definition of a family. *J Bacteriol* **172**, 3609-19.
- Gehrke, C.W., Desgres, J., Keith, G., Gerhardt, K.O., Agris, P.F., Gracz, H., Tempesta, M.S. & Kuo, K.C. (1990). Structural elucidation of nucleosides in nucleic acids. Chapter 5. In *Chromatography and modification of nucleosides*, 45A, pp. A159-223. Edited by C.W. Gehrke & K.C. Kuo. The Netherland: Elsevier Chromatography Library

Series.

Gibson, G.R., McFarlane, G.T. & Cummings, J.H. (1988). Occurrence of sulphate-reducing bacteria in human faeces and the relationship of dissimilatory sulphate reduction to methanogenesis in the large gut. *J Appl Bacteriol* 65, 103-11.

Gibson, G.R. (1990). Physiology and ecology of sulphate-reducing bacteria. *J Appl Bacteriol* 69, 769-97.

Gibson, G.R., Cummings, J.H. & McFarlane, G.T. (1991). Growth and activities of sulphate-reducing bacteria in gut contents of healthy subjects and patients with ulcerative colitis. *FEMS Microbiol Ecol* 86, 103-12.

Gürtler, V. & Stanisich, V.A. (1996). New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiology* 142, 3-16.

Kuo, K.C., Phan, D.T., Williams, N. & Gehrke, C.W. (1990). Ribonucleosides in biological fluids by a high resolution quantitative RPLC-UV method. Chapter 2. In *Chromatography and modification of nucleosides*, 45C, pp. C41-113. Edited by C.W. Gehrke & K.C. Kuo. The Netherland: Elsevier Chromatography Library Series.

La Scola, B. & Raoult, D. (1999). Third human isolate of a *Desulfovibrio* sp. identical to the provisionally named *Desulfovibrio fairfieldensis*. *J Clin Microbiol* 37, 3076-7.

Langendijk, P.S., Hanssen J.T.J. & Van der Hoeven, J.S. (2000). Sulfate-reducing bacteria in association with human periodontitis. *J Clin Periodontol* 27, 943-50.

Loubinoux, J., Mory, F., Pereira, I.A.C. & Le Faou A.E. (2000). Bacteremia caused by a strain of *Desulfovibrio* related to the provisionally named *Desulfovibrio fairfieldensis*. *J Clin Microbiol* 38, 931-4.

- MacDougall, R., Robson, J., Paterson, D. & Tee, W. (1997). Bacteremia caused by a recently described novel *Desulfovibrio* species. *J Clin Microbiol* **35**, 1805-8.
- MacOrist, S., Gebhart, C.J., Boid, R. & Barns, S.M. (1995). Characterization of *Lawsonia intracellularis* gen. nov., sp. nov., the obligately intracellular bacterium of porcine proliferative enteropathy. *Int J Syst Bacteriol* **45**, 820-5.
- Moore, W.E.C., Johnson, J.L. & Holdeman, L.V. (1976). Emendation of *Bacteroidaceae* and *Butyrivibrio* and descriptions of *Desulfomonas* gen. nov. and ten new species in the genera *Desulfomonas*, *Butyrivibrio*, *Eubacterium*, *Clostridium*, and *Ruminococcus*. *Int J Syst Bacteriol* **26**, 238-52.
- Nanninga, H.J. & Gottschal, J.C. (1987). Properties of *Desulfovibrio carbinolicus* sp. nov. and other sulfate-reducing bacteria isolated from an anaerobic-purification plant. *Appl Environ Microbiol* **53**, 802-9.
- Pitcher, M.C.L. & Cummings, J.H. (1996). Hydrogen sulphide: a bacterial toxin in ulcerative colitis? *Gut* **39**, 1-4.
- Postgate, J.R. (1984). *The sulphate-reducing bacteria*, 2nd edn. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.
- Sperry, J.F. & Wilkins, T.D. (1977). Presence of cytochrome *c* in *Desulfomonas pigra*. *J Bacteriol* **129**, 554-5.
- Tee, W., Dyal-Smith, M., Woods, W. & Eisen, D. (1996). Probable new species of *Desulfovibrio* isolated from a pyogenic liver abscess. *J Clin Microbiol* **34**, 1760-4.

- Van der Hoeven, J.S., Van den Kieboom, C.W.A. & Schaeken, M.J.M. (1995). Sulfate-reducing bacteria in the periodontal pocket. *Oral Microbiol Immunol* 10, 288-90.
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., De Vos, P., Kersters, K. & Swings, J. (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol Rev* 60, 407-38.
- Widdel, F. & Pfennig, N. (1984). Dissimilatory sulfate- or sulfur-reducing bacteria. In *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 1, pp. 663-79. Edited by N.R. Krieg & J.G. Holt. Baltimore: Williams & Wilkins.
- Widdel, F. & Bak, F. (1992). Gram-negative mesophilic sulfate-reducing bacteria. In *The Prokaryotes*, vol. IV, 2nd edn, pp. 3352-78. Edited by A. Balows, H.G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder & K.-H. Schleifer. New York: Springer-Verlag.
- Willis, C.L., Cummings, J.H., Neale, G., & Gibson, G.R. (1997). Nutritional aspects of dissimilatory sulfate reduction in the human large intestine. *Curr Microbiol* 35, 294-8.

Table 1. GenBank accession numbers for the phylogenetic tree construction

| Species | Strain designation | GenBank accession no. |
|--|----------------------------------|-----------------------|
| <i>Bilophila wadsworthia</i> | ATCC 49260 ^T | L35148 |
| <i>Desulfomonas pigra</i> | ATCC 29098 ^T | AF192152 |
| <i>Desulfovibrio acrylicus</i> | DSM 10141 ^T | U32578 |
| <i>Desulfovibrio africanus</i> | DSM 2603 ^T | X99236 |
| <i>Desulfovibrio alcoholivorans</i> | DSM 5433 ^T | AF053751 |
| <i>Desulfovibrio aminophilus</i> | DSM 12254 ^T | AF067964 |
| <i>Desulfovibrio baarsii</i> | DSM 2075 ^T | M34403 |
| <i>Desulfovibrio burkinensis</i> | DSM 6830 ^T | AF053752 |
| <i>Desulfovibrio cuneatus</i> | DSM 11391 ^T | X99501 |
| <i>Desulfovibrio desulfuricans</i> | Essex 6, ATCC 29577 ^T | AF192153 |
| <i>Desulfovibrio desulfuricans</i> | MB, ATCC 27774 | AF192154 |
| <i>Desulfovibrio fairfieldensis</i> | ATCC 700045 | U42221 |
| <i>Desulfovibrio fructosivorans</i> | ATCC 49200 ^T | AF050101 |
| <i>Desulfovibrio gabonensis</i> | DSM 10636 ^T | U31080 |
| <i>Desulfovibrio gigas</i> | DSM 1382 ^T | M34400 |
| <i>Desulfovibrio halophilus</i> | DSM 5663 ^T | U48243 |
| <i>Desulfovibrio inopinatus</i> | DSM 10711 ^T | AF177276 |
| <i>Desulfovibrio intestinalis</i> | DSM 11275 ^T | Y12254 |
| <i>Desulfovibrio litoralis</i> | DSM 11393 ^T | X99504 |
| <i>Desulfovibrio longrearchensis</i> | ACM 3958 ^T | Z24450 |
| <i>Desulfovibrio longus</i> | DSM 6739 ^T | X63623 |
| <i>Desulfovibrio profundus</i> | DSM 11384 ^T | U90726 |
| <i>Desulfovibrio salaxigens</i> | ATCC 14822 ^T | M34401 |
| <i>Desulfovibrio sapovorans</i> | ATCC 33892 ^T | M34402 |
| <i>Desulfovibrio senezii</i> | DSM 8436 ^T | AF050100 |
| <i>Desulfovibrio sulfodismutans</i> | DSM 3696 ^T | Y17764 |
| <i>Desulfovibrio termitidis</i> | DSM 5308 ^T | X87409 |
| <i>Desulfovibrio vulgaris</i> subsp. <i>oxamicus</i> | DSM 1925 ^T | AJ295677 |
| <i>Desulfovibrio vulgaris</i> subsp. <i>vulgaris</i> | DSM 644 ^T | M34399 |
| <i>Desulfovibrio zosteriae</i> | DSM 11974 ^T | Y18049 |
| <i>Lawsonia intracellularis</i> | NCTC 12656 ^T | U30147 |

Table 2. Utilization of growth substrates by *Desulfomonas pigra*

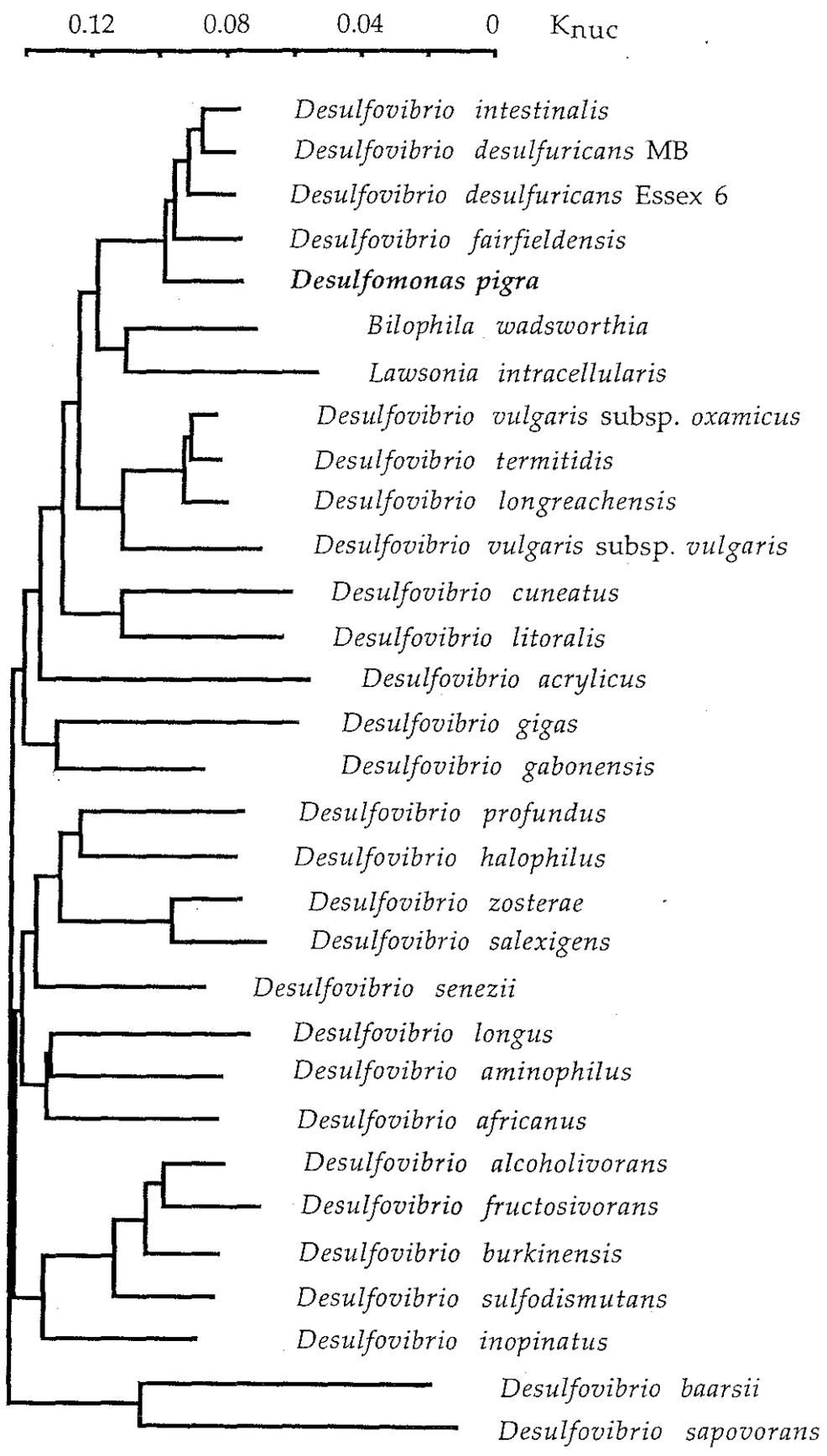
| Growth conditions | <i>Dm. pigra</i> ^a | <i>D. desulfuricans</i> subsp. <i>desulfuricans</i> ^b | " <i>D. fairfieldensis</i> " ^c |
|---|-------------------------------|---|---|
| Electron donors (+SO ₄ ²⁻): | | | |
| lactate | + | + | + |
| pyruvate | + | + | + |
| acetate | - | - | - |
| formate | - | + | + |
| malate | - | + | + |
| fumarate | - | + | + |
| ethanol | + | + | + |
| propanol | - | + | + |
| butanol | - | + | + |
| hydrogen | + | + | + |
| Electron acceptors (+ lactate): | | | |
| sulfate | + | + | + |
| sulfite | + | + | + |
| thiosulfate | + | + | + |
| nitrate | - | + | + |
| nitrite | - | - | - |

^a strain ATCC 29098^T

^b strain Essex 6 ATCC 29577^T and strain MB ATCC 27774

^c strain ATCC 700045

Fig. 1. Phylogenetic tree of *Desulfomonas pigra* strain 29098^T and phylogenetically related strains based on comparative analysis of the 16S rRNA gene sequences. The dendrogram was generated using the neighbor-joining algorithm.



2.2. Commentaires

Le séquençage du gène de l'ARN ribosomal 16S d'une souche de *Desulfovibrio* isolée d'un abcès hépatique a conduit à la proposition de création d'une nouvelle espèce, *D. fairfieldensis*, en 1996. La détermination du contenu en G+C de l'ADN de *D. fairfieldensis* ATCC 700045 et le séquençage du gène de l'ARN ribosomal des souches de *D. fairfieldensis* isolées de patients semblent confirmer l'existence à part entière de cette espèce. Cependant, ces travaux doivent être confirmés par la réalisation d'hybridations ADN-ADN entre les souches de *D. fairfieldensis* et de *D. desulfuricans*, l'espèce type du genre *Desulfovibrio*, pour prouver de manière définitive l'individualisation de *D. fairfieldensis* en tant qu'espèce à part entière.

CONCLUSION

Les maladies inflammatoires chroniques intestinales et les parodontites sont des affections chroniques qui ont un retentissement important sur l'état général et la qualité de vie des patients. Les lésions inflammatoires qui leur sont associées résultent d'une activation non ou mal régulée du système immunitaire dont l'étiologie n'est pas connue. Il est admis que la flore bactérienne a un rôle dans l'initiation et/ou l'entretien des lésions, avec peut-être l'intervention d'agents bactériens spécifiques. Pour établir la relation entre ces atteintes et une ou plusieurs bactérie(s), il faudrait pouvoir montrer la présence d'une ou de plusieurs espèce(s) spécifique(s). Or, à la surface des muqueuses buccales et intestinales, une flore abondante et extrêmement diversifiée est présente, dont seul un faible pourcentage est identifié. Ainsi, l'état physiologique de la relation entre cette flore et la muqueuse colonisée est difficile à étudier, et l'affirmation du rôle d'une espèce bactérienne dans la pathologie observée reste aléatoire.

La présence de bactéries sulfato-réductrices dans le tube digestif est connue, mais jusqu'à présent ces bactéries ont été considérées comme non pathogènes pour l'homme. Ainsi, les bactéries sulfato-réductrices ne sont pas recherchées dans le diagnostic bactériologique de routine, même si une mise en évidence des bactéries anaérobies est demandée. Les bactéries sulfato-réductrices humaines ont donc fait l'objet de peu d'études. Récemment, un regain d'intérêt pour ces bactéries s'est manifesté car il a été montré qu'elles sont associées à des atteintes intestinales chez l'animal. D'autre part, l'isolement de ces bactéries a été décrit à plusieurs reprises d'abcès profonds et d'hémocultures. Il est alors apparu que les bactéries sulfato-réductrices peuvent avoir un rôle en pathologie humaine. Ces microorganismes ont également été associés aux parodontites, et leur rôle dans les atteintes inflammatoires chroniques de l'intestin a été évoqué car la production d' H_2S pourrait expliquer une cytotoxicité locale source d'inflammation. L'identification de ces espèces n'avait jusqu'à présent pas été faite systématiquement, et les descriptions des souches isolées restent très limitées. Cependant, pour pouvoir étudier le rôle éventuel de ces bactéries dans les

atteintes inflammatoires, il est indispensable de mieux connaître les espèces présentes chez l'homme.

La culture des bactéries sulfato-réductrices est relativement aisée, et ces bactéries se multiplient dans certains milieux usuels pour la culture des bactéries anaérobies (milieu de Wilkins-Chalgren). Cependant, les prélèvements étudiés contiennent le plus souvent une flore polymorphe, et les bactéries à croissance rapide forment des colonies en 2 jours qui ne permettent pas d'observer la présence des bactéries sulfato-réductrices, de croissance lente, dont les colonies ne sont visibles qu'après 4 jours. Il est donc vraisemblable que leur présence n'est pas détectée dans certains prélèvements cliniques et que leur prévalence est sous-estimée. L'utilisation de milieux spécifiques, voire sélectifs, est donc nécessaire. Dans ce but, le milieu de Postgate, couramment utilisé, se révèle en fait moins sensible que le Test-kit Labège® (Compagnie Française de Géothermie, Orléans, France) pour la détection des bactéries sulfato-réductrices dans des prélèvements humains tels que des selles ou des collections purulentes (P_3 , cf. Liste des publications et communications p. 9). Le Test-kit Labège® pourrait donc être utilisé pour les études épidémiologique et physiopathologique visant à établir la prévalence de ces bactéries chez l'homme ainsi que leur association à différentes atteintes. En effet, à partir de ce milieu, il est possible de faire une identification bactérienne à l'aide d'une PCR multiplexe (P_3 , P_4 et P_6). L'isolement secondaire des souches dans un milieu solide de Postgate est également possible pour leur caractérisation plus complète grâce à l'étape d'enrichissement du prélèvement par l'utilisation d'un milieu liquide.

La numération des souches dans les prélèvements ne paraît pas être très intéressante car aucune relation entre le nombre de bactéries dans les selles et une pathologie inflammatoire intestinale n'a été observée (P_3). Cependant, le Test-kit Labège® permet cette détermination qui pourrait avoir un intérêt dans le cadre d'une étude longitudinale visant à suivre l'état de la flore chez des patients au cours de l'évolution d'une atteinte (e.g., y-a-t'il une relation entre les poussées

inflammatoires et le nombre de bactéries ?).

Les bactéries sulfato-réductrices isolées chez l'homme n'ont, à quelques exceptions près, jamais été isolées de l'environnement. Seules 2 espèces ont jusqu'à présent été décrites. Tout d'abord, *Desulfomonas pigra*, décrit en 1976 à partir de selles humaines, n'a fait l'objet d'aucune autre étude. La présence de *Desulfomonas pigra* dans les selles de 31% des patients du Service d'Hépatogastro-Entérologie du CHU de Nancy suggère que cette bactérie est un commensal de l'homme, certainement très commun (**P₃**). Son isolement significativement plus fréquent dans les selles de patients atteints de maladies inflammatoires chroniques intestinales par rapport aux selles de patients hospitalisés pour d'autres pathologies suggère également que *Desulfomonas pigra* pourrait jouer un rôle dans la physiopathologie des maladies inflammatoires chroniques intestinales. Cette bactérie est également présente dans les collections purulentes abdominales (**P₆**). Les caractères cultureux et génomiques de *Desulfomonas pigra* justifient son reclassement dans le genre *Desulfovibrio*. Des propositions avaient été faites dans ce sens, mais elles n'avaient jamais été formalisées jusqu'à présent. Nous avons donc proposé la reclassification de cette bactérie en tant que *Desulfovibrio pigrum* comb. nov. (**P₃**). Si *Desulfomonas pigra* n'a jamais été isolé en culture pure au cours de processus infectieux, il n'en est pas de même de la bactérie nommée provisoirement "*Desulfovibrio fairfieldensis*". Cette dernière a été décrite en culture pure successivement dans un abcès hépatique, une hémoculture, une urine et dernièrement une hémoculture au cours d'une péritonite (**P₁** et **P₂**). Le pouvoir invasif de "*Desulfovibrio fairfieldensis*" justifie l'intérêt que nous lui avons porté. "*Desulfovibrio fairfieldensis*", également présent dans les selles de patients, prédomine nettement dans les produits pathologiques. C'est la seule espèce qui a été isolée en culture pure au cours de processus infectieux (**P₁**, **P₃**, **P₄** et **P₆**). C'est aussi la seule bactérie sulfato-réductrice que nous avons isolée de poches parodontales (**P₄**), ce qui suggère que cette bactérie pourrait jouer un rôle dans la physiopathologie des atteintes

parodontales. Les différentes souches de “*Desulfovibrio fairfieldensis*” isolées jusqu’à présent présentent une forte homologie, leur caractérisation est en cours et devrait aboutir à la proposition formalisée de création d’une nouvelle espèce qui pourrait s’appeler “*Desulfovibrio teeae*”, en l’honneur et à la mémoire de Madame le Docteur Wee Tee, à l’origine de la première description de cette bactérie en 1996.

Desulfomonas pigra et “*Desulfovibrio fairfieldensis*” restent pour le moment les seules espèces de bactéries sulfato-réductrices apparemment spécifiquement humaines. Leur caractérisation complète et leur étude méritent d’être menées. En effet, elles ont probablement une place importante dans l’écologie intestinale. La production locale d’H₂S pourrait jouer un rôle essentiel dans l’apparition et/ou l’entretien des lésions inflammatoires intestinales au cours des maladies inflammatoires chroniques intestinales. La production d’H₂S au sein des poches parodontales peut contribuer aux processus destructifs locaux, notamment à la destruction osseuse, ainsi qu’à la mauvaise haleine. La source de sulfate ou de sulfite pour assurer la production d’H₂S par ces bactéries n’est pas connue. Il a été proposé que ces composés proviennent de l’alimentation (les sulfites sont utilisés comme conservateurs) ou de la dégradation de glycoprotéines présentes à la surface des muqueuses de l’hôte. L’hypothèse d’une dégradation de la mucine par des sulfatases produites par des souches de *Desulfovibrio* ne paraît pas pouvoir être retenue. Cette activité enzymatique n’a effectivement pas été détectée chez ces bactéries (Ines A.C. Pereira, communication personnelle).

Il reste encore à étudier les selles d’une population témoin saine afin de déterminer précisément la prévalence des bactéries sulfato-réductrices dans la population générale. Ceci permettrait également de confirmer leur association avec les maladies inflammatoires chroniques intestinales. En effet, notre étude s’est limitée aux patients d’un Service d’Hépatogastro-Entérologie. Malgré la relation établie entre *Desulfomonas pigra* et les maladies inflammatoires

chroniques intestinales, les autres patients de ce Service ne sont pas des témoins acceptables. Ceux-ci devraient être pris dans la population générale. Il est cependant vraisemblable que les bactéries sulfato-réductrices sont fréquentes chez l'homme. Elles pourraient se comporter comme des opportunistes à la faveur, par exemple, de conditions locales qui permettraient leur prolifération.

L'étude du pouvoir pathogène de *Desulfomonas pigra* et de "*Desulfovibrio fairfieldensis*" est difficile car, leur spécificité d'hôte, si elle était confirmée, rendrait difficile toute étude physiopathologique. Un modèle animal serait difficile à établir. Il serait par contre intéressant de savoir si leur présence est liée à l'alimentation ou au mode de vie. Il est donc indispensable de rechercher ces bactéries dans l'environnement pour savoir si elles sont spécifiques du tube digestif (une telle hypothèse est renforcée du fait de leur croissance optimale à 37°C). Parallèlement à cette recherche dans l'environnement, une recherche chez l'animal pourrait être entreprise afin de mieux connaître l'écologie de ces microorganismes. La recherche de facteurs de virulence nécessite également d'être entreprise (présence de pili, production d'enzymes) pour essayer d'expliquer le rôle éventuel de *Desulfomonas pigra* dans les maladies inflammatoires chroniques intestinales, et les propriétés invasives de "*Desulfovibrio fairfieldensis*" qui ne semblent pas exister avec les autres espèces de *Desulfovibrio*. Il faudrait également déterminer si les isollements de *Desulfovibrio desulfuricans* obtenus chez un petit nombre de patients correspondent à une colonisation passagère à partir de l'environnement où cette bactérie est présente, ou bien si seules certaines souches sont capables de coloniser le tractus digestif humain, peut-être de façon transitoire.

La présence des bactéries sulfato-réductrices au sein de la flore digestive permet de comprendre leur isolement dans les abcès abdominaux dans lesquels la flore anaérobie est le plus souvent abondante et variée. Les bactéries sulfato-réductrices ne sont alors qu'un élément parmi d'autres dans cette flore, et leur isolement ne présente aucune signification particulière et ne fait que témoigner de leur présence dans le tube digestif. Dans l'intestin, les bactéries sulfato-

réductrices sont en compétition avec les bactéries méthanogènes, également mal caractérisées, pour l'utilisation à des fins énergétiques de l'hydrogène gazeux résultant des fermentations bactériennes. Les Archaeobactéries méthanogènes pourraient ainsi jouer un rôle dans le développement des bactéries sulfato-réductrices et mériteraient donc également l'intérêt des bactériologistes.

En conclusion, notre travail contribue à montrer que les bactéries sulfato-réductrices sont fréquentes chez l'homme et ont une place encore mal connue en pathologie humaine. Ces bactéries méritent donc des études complémentaires pour mieux définir leurs potentialités métaboliques et invasives. Des études épidémiologiques devront être menées pour définir si *Desulfomonas pigra* et "*Desulfovibrio fairfieldensis*" sont bien des espèces spécifiques de l'homme et quelle est leur écologie. A partir de là, leur caractérisation permettra de mieux comprendre leur rôle éventuel dans les atteintes inflammatoires chroniques.



BIBLIOGRAPHIE



1. **Baron EJ, Summanen P, Downes J, Roberts MC, Wexler H, Finegold SM.**
Bilophila wadsworthia, gen. nov. and sp. nov., a unique Gram-negative anaerobic rod recovered from appendicitis specimens and human faeces.
J. Gen. Microbiol., 1989, 135 : 3405-11.
2. **Baron EJ, Curren M, Henderson G, Jousimies-Somer H, Lee K, Lechowicz K, Strong CA, Summanen P, Tuner K, Finegold SM.**
Bilophila wadsworthia isolates from clinical specimens.
J. Clin. Microbiol., 1992, 30 : 1882-4.
3. **Baron EJ, Bennion R, Thompson J, Strong C, Summanen P, McTeague M, Finegold SM.**
A microbiological comparison between acute and complicated appendicitis.
Clin. Infect. Dis., 1992, 14 : 227-31.
4. **Baron E.J.**
Bilophila wadsworthia : a unique Gram-negative anaerobic rod.
Anaerobe, 1997, 3 : 83-6.
5. **Beauchamp Jr RO, Bus JS, Popp JA, Boreiko CJ, Andjelkovich DA.**
A critical review of the literature on hydrogen sulfide toxicity.
Crit. Rev. Toxicol., 1984, 13 : 25-97.
6. **Beerens H, Romond C.**
Sulfate-reducing anaerobic bacteria in human feces.
Am. J. Clin. Nutr., 1977, 30 : 1770-6.
7. **Beijerinck MW.**
Über *Spirillum desulfuricans* als ursache von sulfatreduction.
Zentbl. Bakt. Parasitkde (abs. 2), 1895, 1 : 1-9, 49-59, 104-14.

8. **Bercy P, Tenenbaum H.**
Parodontologie : du diagnostic à la pratique.
De Boeck Université (ed.), 1996, Bruxelles.
9. **Brosius J, Palmer ML, Kennedy PJ, Noller HF.**
Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*.
Proc. Natl. Acad. Sci., 1978, 75 : 4801-5.
10. **Bryant MP, Campbell LL, Reddy CA, Crabill MR.**
Growth of *Desulfovibrio* in lactate or ethanol media low in sulfate in association with H₂-
utilizing methanogenic bacteria.
Appl. Environ. Microbiol., 1977, 33 : 1162-9.
11. **Campieri M, Gionchetti P.**
Bacteria as the cause of ulcerative colitis.
Gut, 2001, 48 : 132-5.
12. **Castro HF, Williams NH, Ogram A.**
Phylogeny of sulfate-reducing bacteria.
FEMS Microbiol. Ecol., 2000, 31 : 1-9.
13. **Colombel JF, Cassagnon M, Sendid B, Palain D, Reumaux D.**
ANCA and ASCA : a tool for differential diagnosis, p. 75-83.
In : Modigliani R (ed.), Maladies inflammatoires cryptogéniques de l'intestin, 2000, John
Libbey Eurotext, Paris.
14. **Cummings BA, Caldwell DR, Gould DH, Hamar DW.**
Identity and interactions of rumen microbes associated with dietary sulfate-induced
polioencephalomalacia in cattle.
Am. J. Vet. Res., 1995, 56 : 1384-9.

15. **Cummings JH, MacFarlane.**
The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon.
J. Appl. Bacteriol., 1991, 70 : 443-59.
16. **Cummings JH, McFarlane GT.**
Role of intestinal bacteria in nutrient metabolism.
Clin. Nutr., 1997, 16 : 3-11.
17. **Cypionka H.**
Uptake of sulfate, sulfite and thiosulfate by proton-anion symport in *Desulfovibrio desulfuricans*.
Arch. Microbiol., 1987, 148 : 144-9.
18. **Cypionka H.**
Characterization of sulfate transport in *Desulfovibrio desulfuricans*.
Arch. Microbiol., 1989, 152 : 237-43.
19. **Cypionka H.**
Oxygen respiration by *Desulfovibrio* species.
Annu. Rev. Microbiol., 2000, 54 : 827-48.
20. **Dannenberg S, Kroder M, Dilling W, Cypionka H.**
Oxidation of H₂, organic compounds and inorganic sulfur compounds coupled to reduction of O₂ or nitrate by sulfate-reducing bacteria.
Arch. Microbiol., 1992, 158 : 93-9.
21. **Deplancke B, Hristova KR, Oakley HA, McCracken VJ, Aminov R, Mackie RI, Gaskins HR.**
Molecular ecological analysis of the succession and diversity of sulfate-reducing bacteria in the mouse gastrointestinal tract.
Appl. Environ. Microbiol., 2000, 66 : 2166-74.

22. **Devereux R, Delaney M, Widdel F, Stahl DA.**
Natural relationships among sulfate-reducing eubacteria.
J. Bacteriol., 1989, 171 : 6689-95.
23. **Devereux R, He S-H, Doyle CL, Orkland S, Stahl DA, Le Gall J, Whitman WB.**
Diversity and origin of *Desulfovibrio* species: phylogenetic definition of a family.
J. Bacteriol., 1990, 172 : 3609-19.
24. **Devereux R, Kane MD, Winfrey J, Stahl DA.**
Genus- and group-specific hybridization probes for determinative and environmental studies of sulfate-reducing bacteria.
System. Appl. Microbiol., 1992, 15 : 601-9.
25. **Dilling W, Cypionka H.**
Aerobic respiration in sulfate-reducing bacteria.
FEMS Microbiol. Lett., 1990, 71 : 123-8.
26. **Dzierzewicz Z, Cwalina B, Kurkiewicz S, Chodurek E, Wilczok T.**
Intraspecies variability of cellular fatty acids among soil and intestinal strains of *Desulfovibrio desulfuricans*.
Appl. Environ. Microbiol., 1996, 62 : 3360-5.
27. **Elson CO.**
Commensal bacteria as targets in Crohn's disease.
Gastroenterology, 2000, 119 : 254-7.
28. **Elson CO, Cong Y, Weaver CT.**
Induced mutant mouse models of inflammatory bowel disease : new insights into disease pathogenesis, p. 47-55.
In : Modigliani R (ed.), Maladies inflammatoires cryptogéniques de l'intestin, 2000, John Libbey Eurotext, Paris.

29. **Falk PG, Hooper LV, Midtvedt T, Gordon JI.**
Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: what we know and need to know from gnotobiology.
Microbiol. Mol. Biol. Rev., 1998, 62 : 1157-70.
30. **Fauque GD, Barton LL, Le Gall J.**
Oxidative phosphorylation linked to the dissimilatory reduction of elemental sulphur by *Desulfovibrio*.
In : Sulphur in biology. Excerpta Medica (ed.), Ciba Foundation Symposium 72, 1980, 71-86.
31. **Finegold S, Summanen P, Gerardo SH, Baron E.**
Clinical importance of *Bilophila wadsworthia*.
Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 1992, 11 : 1058-63.
32. **Fiocchi C.**
Inflammatory bowel disease : etiology and pathogenesis.
Gastroenterology, 1998, 115 : 182-205.
33. **Fitz RM, Cypionka H.**
A study on electron transport-driven proton translocation in *Desulfovibrio desulfuricans*.
Arch. Microbiol., 1989, 152 : 369-76.
34. **Fox JG, Dewhirst FE, Fraser GJ, Paster BJ, Shames B, Murphy JC.**
Intracellular *Campylobacter*-like organism from ferrets and hamsters with proliferative bowel disease is a *Desulfovibrio* sp.
J. Clin. Microbiol., 1994, 32 : 1229-37.
35. **Gebhart CJ, Barns SM, McOrist S, Lin G-F, Lawson GHK.**
Ileal symbiont intracellularis, an obligate intracellular bacterium of porcine intestines showing a relationship to *Desulfovibrio* species.
Int. J. Syst. Bacteriol., 1993, 43 : 533-8.

36. **Gerardo SH, Garcia MM, Wexler HM, Finegold SM.**
Adherence of *Bilophila wadsworthia* to cultured human embryonic intestinal cells.
Anaerobe, 1998, 4 : 19-27.
37. **Gibson GR, MacFarlane GT, Cummings JH.**
Occurrence of sulphate-reducing bacteria in human faeces and the relationship of dissimilatory sulphate reduction to methanogenesis in the large gut.
J. Appl. Bacteriol., 1988, 65 : 103-11.
38. **Gibson GR.**
Physiology and ecology of the sulphate-reducing bacteria.
J. Appl. Bacteriol., 1990, 69 : 769-97.
39. **Gibson GR, Cummings JH, MacFarlane GT.**
Growth and activities of sulphate-reducing bacteria in gut contents of healthy subjects and patients with ulcerative colitis.
FEMS Microbiol. Ecol., 1991, 86 : 103-12.
40. **Gibson GR, MacFarlane S, MacFarlane GT.**
Metabolic interactions involving sulphate-reducing and methanogenic bacteria in the human large intestine.
FEMS Microbiol. Ecol., 1993, 12 : 117-25.
41. **Gottschalk G.**
Bacterial metabolism.
In : Springer-Verlag (ed.), second edition, 1986, New York, USA.
42. **Gould DH.**
In vivo indicators of pathological ruminal sulfide production in steers with diet-induced polioencephalomalacia.
J. Vet. Diagn. Invest., 1997, 9 : 72-6.

43. **Gould DH.**
Polioencephalomalacia.
J. Anim. Sci., 1998, 76 : 309-14.
44. **Gürtler V, Stanisich VA.**
New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region.
Microbiology, 1996, 142 : 3-16.
45. **Hansen TA.**
Metabolism of sulfate-reducing prokaryotes.
Antonie van Leeuwenhoek, 1994, 66 : 165-185.
46. **Hugot JP.**
Progress in the genetics of inflammatory bowel diseases, p. 1-9.
In : Modigliani R (ed.), Maladies inflammatoires cryptogéniques de l'intestin, 2000, John Libbey Eurotext, Paris.
47. **Johnson CC, Finegold SM.**
Uncommonly encountered, motile, anaerobic Gram-negative bacilli associated with infection.
Rev. Infect. Dis., 1987, 9 : 1150-62.
48. **Kluyver AJ, Van Niel CB.**
Prospects for a natural system of classification of bacteria.
Zentralbl. Bakteriologie II Abt., 1936, 94 : 369-403.
49. **La Scola B, Raoult D.**
Third human isolate of a *Desulfovibrio* sp. identical to the provisionally named *Desulfovibrio fairfieldensis*.
J. Clin. Microbiol., 1999, 37 : 3076-7.

50. **Langendijk PS, Hagemann J, Van der Hoeven JS.**
Sulfate-reducing bacteria in periodontal pockets and in healthy oral sites.
J. Clin. Periodontol., 1999, 26 : 596-99.
51. **Langendijk PS, Hanssen JTJ, Van der Hoeven JS.**
Sulfate-reducing bacteria in association with human periodontitis.
J. Clin. Periodontol., 2000, 27 : 943-50.
52. **Laue H, Denger K, Cook AM.**
Taurine reduction in anaerobic respiration of *Bilophila wadsworthia* RZATAU.
Appl. Environ. Microbiol., 1997, 63 : 2016-21.
53. **Laue H, Friedrich M, Ruff J, Cook AM.**
Dissimilatory sulfite reductase (desulfoviridin) of the taurine-degrading, non-sulfate-reducing bacterium *Bilophila wadsworthia* RZATAU contains a fused DsrB-DsrD subunit.
J. Bacteriol., 2001, 183 : 1727-33.
54. **Lawson GHK, McOrist S, Jasni S, Mackie RA.**
Intracellular bacteria of porcine proliferative enteropathy: cultivation and maintenance in vitro.
J. Clin. Microbiol., 1993, 31 : 1136-42.
55. **Le Faou A, Rajagopal BS, Daniels L, Fauque G.**
Thiosulfate, polythionates and elemental sulfur assimilation and reduction in the bacterial world.
FEMS Microbiol. Rev., 1990, 75 : 351-82.
56. **Lee JP, Peck HD Jr.**
Purification of the enzyme reducing bisulfite to trithionate from *Desulfovibrio gigas* and its identification as desulfoviridin.
Biochem. Biophys. Res. Comm., 1971, 45 : 583-9.

57. **Le Gall J.**
A new species of *Desulfovibrio*.
J. Bacteriol., 1963, 86 : 1120.
58. **Le Gall J, Xavier AV.**
Anaerobes response to oxygen: the sulfate-reducing bacteria.
Anaerobe, 1996, 2 : 1-9.
59. **Lemos RS, Gomes CM, Santana M, Le Gall J, Xavier A, Teixeira M.**
The strict anaerobe *Desulfovibrio gigas* contains a membrane-bound oxygen-reducing respiratory chain.
FEBS Letters, 2001, 24828 : 1-4.
60. **Levine J, Ellis CJ, Furne JK, Springfield J, Levitt MD.**
Fecal hydrogen sulfide production in ulcerative colitis.
Am. J. Gastroenterol., 1998, 93 : 83-7.
61. **Li X, Pang J, Fox JG.**
Coinfection with intracellular *Desulfovibrio* species and coccidia in ferrets with proliferative bowel disease.
Lab. Anim. Sci., 1996, 46 : 569-71.
62. **Liu M-Y, Le Gall J.**
Purification and characterization of two proteins with inorganic pyrophosphatase activity from *Desulfovibrio vulgaris*: rubrerythrin and a new, highly active, enzyme.
Biochem. Biophys. Res. Comm., 1990, 171 : 313-8.
63. **Løe H, Silness J.**
Periodontal disease in pregnancy (I). Prevalence and severity.
Acta Odontol. Scand., 1963, 21 : 533-51.

64. **Loubinoux J., Mory F., Pereira IAC, Le Faou A.**
Bacteremia caused by a strain of *Desulfovibrio* related to the provisionally named *Desulfovibrio fairfieldensis*.
J. Clin. Microbiol., 2000, 38 : 931-4.
65. **Lozniewski A, Maurer P, Schuhmacher H, Carlier JP, Mory F.**
First isolation of *Desulfovibrio* species as part of a polymicrobial infection from a brain abscess.
Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 1999, 18 : 602-3.
66. **MacDougall R, Robson J, Paterson D, Tee W.**
Bacteremia caused by a recently described novel *Desulfovibrio* species.
J. Clin. Microbiol., 1997, 35 : 1805-8.
67. **MacOrist S, Gebhart CJ, Boid R, Barns SM.**
Characterization of *Lawsonia intracellularis* gen. nov., sp. nov., the obligately intracellular bacterium of porcine proliferative enteropathy.
Int. J. Syst. Bacteriol., 1995, 45 : 820-5.
68. **Maroc J, Azerad R, Kamen MD, Le Gall J.**
Menaquinone (MK-6) in the sulfate-reducing obligate anaerobe, *Desulfovibrio*.
Biochim. Biophys. Acta, 1970, 197 : 87-9.
69. **Marteau P.**
Role of the intestinal flora in gastrointestinal diseases.
Lancet, 2000, 356 : 28.
70. **Moore WEC, Johnson JL, Holdeman LV.**
Emendation of *Bacteroidaceae* and *Butyrivibrio* and descriptions of *Desulfomonas* gen. nov. and ten new species in the genera *Desulfomonas*, *Butyrivibrio*, *Eubacterium*, *Clostridium*, and *Ruminococcus*.
Int. J. Syst. Bacteriol., 1976, 26 : 238-52.

71. **Mosca A, D'Alagni M, Del Prete R.**
Preliminary evidence of endotoxic activity of *Bilophila wadsworthia*.
Anaerobe, 1995, 1 : 21-4.
72. **Nanninga HJ, Gottschal JC.**
Properties of *Desulfovibrio carbinolicus* sp. nov. and other sulfate-reducing bacteria isolated from an anaerobic-purification plant.
Appl. Env. Microbiol., 1987, 53 : 802-9.
73. **Nicholson RA.**
Inhibition of respiratory and bioenergetic mechanisms by hydrogen sulfide in mammalian brain.
J. Toxicol. Environ. Health, 1998, 54 : 491-507.
74. **Odom JM, Peck Jr HD.**
Hydrogen cycling as a general mechanism for energy coupling in the sulfate-reducing bacteria, *Desulfovibrio* sp.
FEMS Microbiol. Lett., 1981, 12 : 47-50.
75. **Pasteur L.**
Animalcules infusoires vivant sans gaz oxygène libre et déterminant des fermentations.
Compt. Rendus Acad. Sci. Paris, 1861, L II : 344-47.
76. **Peck HD Jr.**
Biochem. Biophys. Res. Comm., 1966, 22 : 112.
77. **Pereira IAC, Teixeira M, Xavier AV.**
Hemeproteins in anaerobes.
Structure and Bonding, 1998, 91 : 65-89.

78. **Pitcher MCL, Goddard M, McOrist S.**
Desulfovibrio spp.: an etiological agent common to ulcerative colitis and porcine proliferative enteropathy?
Gut, 1995, 36 (suppl.) : A56.
79. **Pitcher MCL, Cummings JH.**
Hydrogen sulphide: a bacterial toxin in ulcerative colitis?
Gut, 1996, 39 : 1-4.
80. **Porschen RK, Chan P.**
Anaerobic vibrio-like organisms cultured from blood: *Desulfovibrio desulfuricans* and *Succinivibrio* species.
J. Clin. Microbiol., 1977, 5 : 444-7.
81. **Postgate JR.**
Presence of cytochrome in an obligate anaerobe.
Biochem. J., 1954, 56 : 11-2.
82. **Postgate JR.**
The sulphate-reducing bacteria.
In : Cambridge University Press (ed.), second edition, 1984, Cambridge, United Kingdom.
83. **Rambaud JC.**
In : Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, 1998, John Libbey Eurotext (ed.), Paris.
84. **Raouf AH, Tsai HH, Parker N, Hoffman J, Walker RJ, Rhodes M.**
Sulphation of colonic and rectal mucin in inflammatory bowel disease: reduced sulphation of rectal mucus in ulcerative colitis.
Clin. Sci., 1992, 33 : 623-6.

85. **Reis MAM, Almeida JS, Lemos PC, Carrondo MJT.**
Effect of hydrogen sulfide on growth of sulfate-reducing bacteria.
Biotechnology and Bioengineering, 1992, 40 : 593-600.
86. **Roberton AM, Stanley RA.**
In vitro utilization of mucin by *Bacteroides fragilis*.
Appl. Environ. Microbiol., 1982, 43 : 325-30.
87. **Roberton AM, McKenzie CG, Sharfe N, Stubbs LB.**
A glycosulphatase that removes sulphate from mucus glycoprotein.
Biochem. J., 1993, 293 : 683-9.
88. **Roberton AM, Wright DP.**
Bacterial glycosulphatases and sulphomucin degradation.
Can. J. Gastroenterol., 1997, 11 : 361-6.
89. **Roediger WEW.**
The colonic epithelium in ulcerative colitis: an energy-deficiency disease.
Lancet, 1980, ii : 712-5.
90. **Roediger WEW, Moore J, Babidge W.**
Colonic sulfide in pathogenesis and treatment of ulcerative colitis.
Dig. Dis. Sci., 1997, 42 : 1571-9.
91. **Salyers AA, Whitt DD.**
Introduction to the Host-Parasite interaction, p. 1-110.
In: Bacterial pathogenesis, a molecular approach, 1994, American Society for Microbiology
(ed.), Washington, DC.
92. **Santos H, Fareleira P, Xavier A, Chen L, Liu M-Y, Le Gall J.**
Aerobic metabolism of carbon reserves by the "obligate anaerobe" *Desulfovibrio gigas*.
Biochem. Biophys. Res. Comm., 1993, 195 : 551-7.

93. **Sartor RB.**
Microbial agents in the pathogenesis, differential diagnosis, and complications of inflammatory bowel diseases, p. 435-58.
In : Infections of the gastrointestinal tract, Blaser MJ, Smith PD, Ravdin JI, Greenberg HB, Guerrant RL (ed.), 1995, Raven Press, New York.
94. **Schoenborn L, Abdollahi H, Tee W, Dyall-Smith M, Janssen PH.**
A member of the delta subgroup of Proteobacteria from a pyogenic liver abscess is a typical sulfate reducer of the genus *Desulfovibrio*.
J. Clin. Microbiol., 2001, 39 : 787-90.
95. **Schreiber S.**
TNF α , IL 10 and ICAM-1 : role in Crohn's disease and therapeutic implications, p. 57-74.
In : Modigliani R (ed.), Maladies inflammatoires cryptogéniques de l'intestin, 2000, John Libbey Eurotext, Paris.
96. **Schumacher UK.**
Adherence of *Bilophila wadsworthia* to laminin and fibronectin.
Clin. Infect. Dis., 1997, 25 (suppl. 2) : S180.
97. **Sefer M, Calinescu I.**
Bacterii sulfatreductoare (genus *Desulfovibrio*), izolate din caria dentara, la om.
Microbiologia, Parazitologia, Epidemiologia (Hungary), 1969, 14 : 231-5.
98. **Shukla SK, Reed KD.**
Desulfovibrio desulfuricans bacteremia in a dog.
J. Clin. Microbiol., 2000, 38 : 1701-2.
99. **Silness J, Løe H.**
Periodontal disease in pregnancy (II). Correlation between oral hygiene and periodontal condition.
Acta Odontol. Scand., 1964, 22 : 121-35.

100. **Sperry JF, Wilkins TD.**
Presence of cytochrome *c* in *Desulfomonas pigra*.
J. Bacteriol., 1977, 129 : 554-5.
101. **Summanen PH.**
Comparison of effects of medium composition and atmospheric conditions on detection of *Bilophila wadsworthia* β -lactamase by cefinase and cefinase plus methods.
J. Clin. Microbiol., 2000, 38 : 733-6.
102. **Sutton CL, Kim J, Yamane A, Dalwadi H, Wei B, Landers C, Targan SR, Braun J.**
Identification of a novel bacterial sequence associated with Crohn's disease.
Gastroenterology, 2000, 119 : 23-31.
103. **Tally FP, Stewart PR, Sutter VL, Rosenblatt JE.**
Oxygen tolerance of fresh clinical anaerobic bacteria.
J. Clin. Microbiol., 1975, 1 : 161-4.
104. **Tee W, Dyall-Smith M, Woods W, Eisen D.**
Probable new species of *Desulfovibrio* isolated from a pyogenic liver abscess.
J. Clin. Microbiol., 1996, 34 : 1760-4.
105. **Traore AS, Fardeau ML, Hatchikian CE, Le Gall J, Belaich JP.**
Energetics of growth of a defined mixed culture of *Desulfovibrio vulgaris* and *Methanosarcina barkeri*: interspecies hydrogen transfer in batch and continuous cultures.
Appl. Environ. Microbiol., 1983, 46 : 1152-6.
106. **Tsai HH, Hart CA, Rhodes JM.**
Production of mucin degrading sulphatase and glycosidases by *Bacteroides thetaiotaomicron*.
Lett. Appl. Microbiol., 1991, 13 : 97-101.

107. **Tsai HH, Rhodes JM.**
Mucus, bacteria and ulcerative colitis.
Saudi Med. J., 1992, 13 : 180-8.
108. **Van der Hoeven JS, Van den Kieboom CWA, Schaeken MJM.**
Sulfate-reducing bacteria in the periodontal pocket.
Oral Microbiol. Immunol., 1995, 10 : 288-90.
109. **Vandamme P, Pot B, Gillis M, De Vos P, Kersters K, Swings J.**
Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics.
Microbiol. Rev., 1996, 60 : 407-38.
110. **Voordouw G.**
The genus *Desulfovibrio*: the centennial.
Appl. Environ. Microbiol., 1995, 61 : 2813-9.
111. **Wagner M, Roger AJ, Flax JL, Brusseau GA, Stahl DA.**
Phylogeny of dissimilatory sulfite reductases supports an early origin of sulfate respiration.
J. Bacteriol., 1998, 180 : 2975-82.
112. **Weill JP, Weill-Bousson M.**
In : La maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique, 1993, Springer-Verlag (ed.), Paris.
113. **Widdel F, Pfennig N.**
Dissimilatory sulfate- or sulfur-reducing bacteria, p. 663-79.
In : Krieg NR, Holt JG (ed.), Bergey's manual of systematic bacteriology, vol. 1, 1984, The Williams and Wilkins Co., Baltimore, Md.
114. **Widdel F, Hansen TA.**
The dissimilatory sulfate- and sulfur-reducing bacteria, p. 583-624.
In : Balows A, Trüper HG, Dworkin M, Harder W, Schleifer K-H (ed.), The Prokaryotes, vol. I, second edition, 1992, Springer-Verlag, New York Inc.



115. **Widdel F, Bak F.**
Gram-negative mesophilic sulfate-reducing bacteria, p. 3352-78.
In : Balows A, Trüper HG, Dworkin M, Harder W, Schleifer K-H (ed.), *The Prokaryotes*,
vol. IV, second edition, 1992, Springer-Verlag, New York Inc.
116. **Willis CL, Gibson GR, Allison C, MacFarlane S, Holt JS.**
Growth, incidence and activities of dissimilatory sulfate-reducing bacteria in the human oral
cavity.
FEMS Microbiol. Lett., 1995, 129 : 267-72.
117. **Willis CL, Cummings JH, Neale G, Gibson GR.**
Nutritional aspects of dissimilatory sulfate reduction in the human large intestine.
Curr. Microbiol., 1997, 35 : 294-8.
118. **Zinkevich V, Beech IB.**
Screening of sulfate-reducing bacteria in colonoscopy samples from healthy and colitic
human gut mucosa.
FEMS Microbiol. Ecol., 2000, 34 : 147-55.

Nom : Monsieur LOUBINOX
Prénom : Julien

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ, NANCY 1

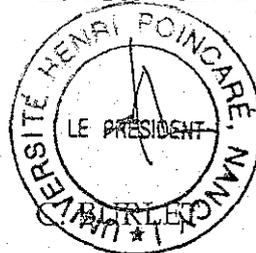
en BIOLOGIE SANTÉ ENVIRONNEMENT

Spécialité : GÉNIE BIOLOGIQUE ET MÉDICAL

VU, APPROUVÉ ET PERMIS D'IMPRIMER

Nancy, le 22 octobre 2001 n° 553

Le Président de l'Université



RESUME : Les bactéries sulfato-réductrices (BSR) sont des bactéries de l'environnement qui sont également commensales du tube digestif de l'homme. Elles ont été isolées d'abcès profonds, essentiellement abdominaux, et du sang au cours de processus septiques aigus. Elles pourraient également participer à l'initiation et/ou à l'entretien des lésions observées dans des maladies inflammatoires chroniques du fait de la cytotoxicité de l'H₂S qu'elles produisent. Cependant, les BSR humaines sont mal caractérisées. L'étude du gène de l'ARN ribosomal 16S de ces espèces a permis la mise au point d'une PCR multiplexe pour leur identification à partir de cultures ou de prélèvements biologiques humains. La recherche de ces bactéries dans des prélèvements abdominaux et de poches parodontales, ainsi que dans des selles a montré que les principales BSR isolées chez l'homme sont *Desulfomonas pigra* et *Desulfovibrio fairfieldensis*. *Desulfomonas pigra* a été associé aux maladies inflammatoires chroniques intestinales tandis que *Desulfovibrio fairfieldensis* a été associé aux parodontites. Une meilleure connaissance de ces 2 espèces permettra de savoir si elles possèdent, à côté de la production d'H₂S, des facteurs de virulence qui pourraient expliquer leur rôle dans ces pathologies.

Human sulfate-reducing bacteria : characterisation and pathogenic potential

ABSTRACT : Sulfate-reducing bacteria (SRB) are environmental bacteria that are also part of the commensal intestinal human flora. They have been isolated from profound abscesses, mostly abdominal, and blood in septic processes. They may also participate to the initiation and/or perpetuation of the lesions observed during chronic inflammatory diseases due to the cytotoxicity of the H₂S they produce. However, SRB are not well characterized. The study of 16S ribosomal RNA gene of these species has permitted to devise a multiplex PCR for their identification in cultures or human biological samples. The search for these bacteria in abdominal samples, periodontal pockets, and also in feces showed that the most common SRB in humans are *Desulfomonas pigra* and *Desulfovibrio fairfieldensis*. *Desulfomonas pigra* was associated with inflammatory bowel diseases whereas *Desulfovibrio fairfieldensis* was associated with periodontitis. A better knowledge of both species will allow to know if they possess, besides H₂S production, virulence factors that could explain their role in these pathologies.

DISCIPLINE : Biologie et Santé

MOTS-CLES : bactéries sulfato-réductrices, *Desulfomonas*, *Desulfovibrio*, ARN ribosomal 16S, maladies inflammatoires chroniques intestinales, parodontites

Instituto de Tecnologia Quimica e Biologica, Universidade Nova de Lisboa, 2780-156 Oeiras, Portugal ; Laboratoire de Bactériologie-Virologie UMR-UHP CNRS 7565, Faculté de Médecine, 54505 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France