



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>

UFR DE MEDECINE

ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE SANTE ET ENVIRONNEMENT

THESE

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARE

Mention : Génomique

par

Corentine ALAUZET

Le 06 Novembre 2009

TAXONOMIE DES BACTERIES ANAEROBIES :
DE LA RECLASSIFICATION
A LA DECOUVERTE DE NOUVEAUX PATHOGENES

MEMBRES DU JURY :

Rapporteurs :

Monsieur le Professeur Benoît JAULHAC

Université Louis Pasteur, Strasbourg

Monsieur le Professeur Jean-Louis PONS

Université de Rouen

Examineurs :

Madame le Professeur Estelle JUMAS-BILAK

Université Montpellier I

Monsieur le Professeur Pierre LEBLOND

Nancy Université

Monsieur le Professeur Alain LOZNIIEWSKI

Nancy Université, Directeur de thèse

Madame le Docteur Francine MORY

Nancy Université, Co-directeur de thèse

Sommaire

LISTE DES TABLEAUX	9
INTRODUCTION GENERALE	14
DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES	17
TAXONOMIE MIXTE ET CONSENSUELLE BACTERIENNE	18
I. <i>Historique de la classification des êtres vivants</i>	18
II. <i>La phylogénie bactérienne</i>	22
1. De l'approche morphologique à l'approche moléculaire	22
2. ARN ribosomiques et horloges moléculaires	25
a) Généralités sur l'ARNr 16S	25
b) Nouvelle place des bactéries dans l'arbre du vivant.	26
c) Radiation explosive des phyla	27
3. Les marqueurs alternatifs à l'ARNr 16S pouvant être utilisés en phylogénie	32
4. Approches phylogénétiques intégrées	35
a) Notion de séquences signatures	35
b) Phylogénie de gène / phylogénie d'organisme	36
5. L'évolution des bactéries est-elle une arborescence : prise en compte des transferts latéraux	38
III. <i>L'unité taxonomique de base : la notion d'espèce bactérienne</i>	40
IV. <i>La taxonomie bactérienne</i>	44
1. Intérêt d'une taxonomie bactérienne	44
2. Caractères utilisés pour la classification des bactéries	45
a) Méthodes phénotypiques	47
b) Méthodes génomiques et génétiques	52
3. Méthodes phylogénétiques appliquées à la taxonomie ou phylotaxonomie	58
a) Les méthodes	58
b) La phylogénomique	67
4. Approche taxonomique mixte et consensuelle	69
5. Les classifications actuelles	70
a) Le <i>Bergey's Manual of Systematic Bacteriology</i>	71
b) La <i>List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN)</i>	72
c) Les règles de description et de publication des nouveaux organismes	73
6. La nomenclature bactérienne	74
LES <i>FIRMICUTES</i> : UN PHYLUM EN PLEIN REMANIEMENT	76
I. <i>Généralités</i>	76
1. Historique et diversité des <i>Firmicutes</i>	76
2. Classification actuelle des <i>Firmicutes</i>	78
a) Révisions du phylum <i>Firmicutes</i>	78
b) Exemples de remaniements taxonomiques au sein des <i>Clostridia</i>	79
II. <i>Cas particulier des Clostridium spp.</i>	86
1. Les <i>Clostridiaceae</i> : une bien grande famille !	86
2. Les outils taxonomiques utilisables avec les <i>Clostridium spp.</i>	89
3. <i>Clostridium</i> , structure de paroi et coloration de Gram	90
4. <i>Clostridium</i> et sporulation	91
5. <i>Clostridium</i> et résistance aux glycopeptides	92
a) Les glycopeptides : mécanismes d'action et de résistance	92
b) Sensibilité diminuée à la vancomycine chez certains <i>Clostridium</i>	97

6. <i>Clostridium hastiforme</i> ou <i>Tissierella praeacuta</i> ? Une histoire pleine de rebondissements !	98
7. <i>Clostridium orbiscindens</i> : to be or not to be a <i>Clostridium</i> ?	99
LE GENRE <i>PREVOTELLA</i> : UN GROUPE TAXONOMIQUE COHERENT	102
I. <i>Données générales</i>	102
1. Habitat	102
2. Facteurs de virulence	102
3. Pouvoir pathogène chez l'homme	103
II. <i>Classification des Prevootella spp.</i>	105
III. <i>Identification des bactéries du genre Prevootella.</i>	109
1. Caractères morphologiques	109
2. Caractères métaboliques	109
3. Caractères génétiques	112
a) Données génomiques	112
b) Données génotypiques	113
IV. <i>Sensibilité aux antibiotiques au sein du genre Prevootella.</i>	115
1. Résistance aux antibiotiques des <i>Prevootella spp.</i>	115
2. Cas particulier du métronidazole	117
a) Mécanisme d'action des 5-nitroimidazolés	117
b) Mécanismes de résistance au métronidazole chez les bactéries anaérobies	118
c) Résistance au métronidazole chez <i>Prevootella spp.</i>	121
3. Gènes <i>nim</i> et évolution	122
PROBLEMATIQUES	124
MATERIEL ET METHODES	126
SOUCHES BACTERIENNES ET CONDITIONS DE CULTURE	127
I. <i>Tissierella spp. et genres apparentés</i>	127
1. Souches cliniques et souches de référence	127
2. Conditions de culture et de conservation	129
II. <i>Clostridium orbiscindens et Eubacterium plautii</i>	130
1. Souches cliniques et souches types	130
2. Conditions de culture et de conservation	130
III. <i>Prevootella spp.</i>	131
1. Souches cliniques	131
2. Souches types	132
3. Conditions de culture et de conservation	132
IV. <i>Souches utilisées en tant que contrôles</i>	132
ETUDE DES CARACTERES PHENOTYPIQUES	134
I. <i>Détermination des caractères morphologiques, cultureux et métaboliques</i>	134
1. Caractères morphologiques, cultureux et biochimiques	134
2. Détermination de la composition en acides gras cellulaires	134
II. <i>Détermination des caractères structuraux</i>	135
1. Composition du peptidoglycane de <i>Tissierella praeacuta</i>	135
a) Courbes de croissance	135
b) Extraction du peptidoglycane	136
c) Digestion du peptidoglycane et réduction des mucopeptides	138
d) Séparation des mucopeptides par CLHP en phase inverse	138
e) Analyse des mucopeptides en spectrométrie de masse	139
f) Composition en acides aminés et sucres aminés	139
2. Etude de l'ultrastructure de la paroi bactérienne	140

a) Préparation des échantillons.....	140
b) Réalisation et observation des coupes.....	140
III. Résistance aux antibiotiques	141
1. Détermination de la sensibilité <i>in vitro</i> aux antibiotiques.....	141
a) Détermination des CMI par la méthode de dilution en milieu gélosé.....	141
b) Détermination des CMI par la méthode du Etest.....	142
c) Interprétation des CMI	143
2. Détection des populations hétérogènes par méthodes de diffusion.....	143
3. Etude de l'inductibilité et de la stabilité de la résistance aux antibiotiques.....	144
a) Méthode en milieu liquide	144
b) Méthode en milieu solide.....	144
ETUDE DES CARACTERES GENETIQUES	146
I. Extraction de l'ADN	146
II. Marqueurs phylogénétiques	146
1. Gène de l'ARNr 16S	146
2. Gènes de ménage.....	148
III. Gènes de résistance aux antibiotiques	149
1. Recherche des gènes de résistance aux glycopeptides	149
a) Recherche des gènes <i>van</i> décrits dans la littérature	149
b) Recherche d'une D:Alanine-D:X ligase et détermination de son environnement génétique	151
2. Recherche des gènes de résistance au métronidazole	151
a) Recherche des gènes <i>nim</i> et des séquences d'insertion associées.....	151
b) Localisation des gènes <i>nim</i>	153
IV. Séquençage des différents gènes	154
ANALYSES PHYLOGENETIQUES ET ANALYSES MULTILOCUS.....	155
I. Traitement des séquences	155
II. Alignement des séquences	155
III. Construction des arbres phylogénétiques	156
1. La méthode de Neighbor-Joining.....	156
2. La méthode du maximum de vraisemblance.....	157
3. La méthode de parcimonie	157
4. Visualisation des arbres phylogénétiques.....	157
IV. Détermination des séquences types.....	157
V. Détermination des complexes clonaux et clusterisation par arbre de recouvrement minimal.....	158
VI. Analyses de la diversité génétique, du déséquilibre de liaison et de la recombinaison	158
ETUDE DES CARACTERES GENOMIQUES	159
I. Hybridation ADN-ADN.....	159
II. Détermination du G+C%.....	159
III. Etude génomique par électrophorèse en champ pulsé.....	160
1. Préparation et lyse des plugs	160
2. Digestion enzymatique.....	160
3. Migration électrophorétique.....	161
4. Etude du squelette <i>rrn</i> par hybridation.....	161
RESULTATS PARTIE I. ANALYSE D'UN GROUPE TAXONOMIQUE EN PLEIN REMANIEMENT.....	163
<i>TISSIERELLA PRAEACUTA</i> – <i>CLOSTRIDIUM HASTIFORME</i> : UNE SEULE ET MEME ESPECE ?.....	164
I. Résultats préliminaires	164

II. Caractères phénotypiques	166
III. Caractères structuraux.....	168
1. Etude de l'ultrastructure de <i>Tissierella</i> spp.....	168
2. Analyse de la composition du peptidoglycane par chromatographie liquide haute performance et spectrométrie de masse (CLHP-SM).....	171
a) Courbes de croissance	171
b) Extraction du peptidoglycane	173
c) Analyse des mucopeptides par CLHP-SM	174
IV. Organisation chromosomique	177
1. Electrophorèse en champ pulsé	177
2. Organisation des opérons <i>rrn</i> par Southern blot	181
V. Place de <i>Tissierella</i> au sein des différents niveaux taxonomiques	183
1. Les séquences d'ADNr 16S et des gènes de ménage analysés	183
2. Stratégie de sélection des séquences à inclure dans les différents arbres	184
3. Comment se situe <i>T. praeacuta</i> par rapport aux taxons de haut niveau ?.....	186
4. Comment se situe <i>T. praeacuta</i> au sein des <i>Firmicutes</i> ?	190
5. Comment se situe <i>T. praeacuta</i> au sein des <i>Peptostreptococcaceae</i> ?	194
6. Comment se situe <i>T. praeacuta</i> au sein de ses plus proches voisins ?.....	198
7. Gènes de ménage et approche multilocus	203
a) Souches cliniques et gènes de ménage choisis.....	203
b) Arbres phylogénétiques	204
c) Définition des différents profils alléliques (STs).....	206
d) Analyse eBurst	207
e) Arbre de recouvrement minimal	207
f) Réseau phylogénétique	209
g) Analyse génétique des différents loci	210
VI. Approche mixte et consensuelle : proposition de reclassification de <i>T. praeacuta</i> .	214
VII. <i>Tissierella</i> spp. et résistance à la vancomycine	217
ETUDE DU MODELE <i>CLOSTRIDIUM ORBISCINDENS</i> – <i>EUBACTERIUM PLAUTII</i> : UNE NOUVELLE ESPECE ?.....	219
I. Analyse phénotypique	219
II. Analyse phylogénétique et génétique.....	221
III. Taxonomie mixte et consensuelle : reclassification	222
RESULTATS PARTIE II. APPLICATION DE L'UTILISATION D'UNE APPROCHE MIXTE ET CONSENSUELLE EN BACTERIOLOGIE CLINIQUE	223
RESULTATS PRELIMINAIRES.....	224
I. Identification des isolats cliniques de <i>Prevotella</i> spp.....	224
II. Sensibilité au métronidazole.....	224
1. Détermination des CMI et recherche des gènes <i>nim</i>	224
2. Sélection <i>in vitro</i> de mutants résistants au métronidazole	226
III. Deux cas d'échecs thérapeutiques liés à une résistance au métronidazole.....	227
1. Bactériémie causée par une souche résistante au métronidazole appartenant à une nouvelle espèce de <i>Prevotella</i>	227
2. Echec thérapeutique lié à une souche de <i>Prevotella buccae</i> résistante au métronidazole lors d'un épisode de pancréatite aiguë.....	229
APPLICATION DE LA TAXONOMIE MIXTE ET CONSENSUELLE A LA DESCRIPTION D'UNE NOUVELLE ESPECE IMPLIQUEE EN PATHOLOGIE HUMAINE : <i>PREVOTELLA NANCEIENSIS</i>	231
I. Etude des caractères phénotypiques	231
1. Caractères morphologiques et ultrastructure.....	231
2. Caractères métaboliques.....	232

3. Composition en acides gras cellulaires	234
<i>II. Etude des caractères génomiques</i>	235
1. Détermination du G+C%	235
2. Détermination de la taille du chromosome et du profil de restriction ribosomique par électrophorèse en champ pulsé.....	235
<i>III. Analyse phylogénétique</i>	236
<i>IV. Approche mixte et consensuelle : description de la nouvelle espèce <i>Prevotella nanceiensis</i></i>	238
<i>PREVOTELLA SPP. ET RESISTANCE AU METRONIDAZOLE : DESCRIPTION D'UN NOUVEAU GENE NIM INTRINSEQUE A L'ESPECE PREVOTELLA BARONIAE</i>	240
<i>I. Identification du gène nim de P. baroniae</i>	240
<i>II. Analyse de l'environnement génétique du gène nimI</i>	241
<i>III. Localisation du gène nimI</i>	242
<i>IV. Caractère intrinsèque du gène nimI ?</i>	243
DISCUSSION	245
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	260
BIBLIOGRAPHIE	263
ANNEXES	299

Liste des figures

Figure 1. La première esquisse d'un arbre évolutif tirée du carnet de notes de Charles Darwin, « <i>First Notebook on Transmutation of Species</i> » (1837).	20
Figure 2. Arbre phylogénétique de Haeckel (1866) représentant les règnes <i>Plantae</i> , <i>Protista</i> et <i>Animalia</i> (367).	23
Figure 3. Arbre phylogénétique universel défini par Woese et adapté par Wheelis (361) classant les êtres vivants en trois domaines : <i>Archae</i> , <i>Bacteria</i> et <i>Eucarya</i>	27
Figure 4. Représentation schématique des phyla décrits au sein des <i>Bacteria</i> en 1998 et comparaison avec les données de Woese en 1987 (158).	28
Figure 5. Arbre phylogénétique basé sur l'alignement de séquences concaténées de 22 gènes monocopies issus de 280 génomes bactériens.	29
Figure 6. Arbre phylogénétique montrant les relations évolutives de 310 espèces bactériennes appartenant aux phyla majeurs (différenciés par des couleurs).	30
Figure 7. Arbre phylogénétique du domaine <i>Bacteria</i> montrant les phyla acceptés (<i>italique</i>) ainsi que les phyla "candidats" sans représentant cultivé.	31
Figure 8. Relations évolutives parmi les êtres vivants se basant sur les caractéristiques structurales des organismes selon l'approche de R.S. Gupta basée sur l'analyse de signatures protéiques (A) (134) ou selon l'approche de T. Cavalier-Smith basée sur les évolutions majeures en terme de structure cellulaire (B) (41).	37
Figure 9. L'Anneau de Vie selon Rivera & Lake (282).	37
Figure 10. Visualisation des échanges génétiques en utilisant des réseaux phylogénétiques (splitsgraph ou réseau réticulé) entre différentes espèces d'abeilles.	39
Figure 11. Représentation en trois dimensions du réseau de vie selon Kunin et coll. (2005) (A) (191) ou selon Dagan et coll. (2008) (B) (57).	39
Figure 12. Comparaison entre l'homologie de séquences d'ADNr 16S (S) et le taux d'hybridation ADN-ADN (D) selon Stackebrandt et coll. (A) (317) ou Keswani et coll. (B) (179).	41
Figure 13. Pouvoir discriminant de certaines techniques pouvant être utilisées dans une approche taxonomique mixte et consensuelle.	46
Figure 14. Chromatogrammes après analyse en CPG des acides gras volatils et non volatils de <i>Clostridium difficile</i> (A) et de <i>Clostridium malenominatum</i> (B).	49
Figure 15. Représentation schématique de l'opéron ribosomique bactérien et du site de restriction de l'endonucléase I-CeuI.	55
Figure 16. Comparaison des dendrogrammes montrant les relations de sept espèces de <i>Bacteroides</i> spp. (299)	56
Figure 17. Représentation schématique de l'arbre de vie incluant les avancées et les futurs challenges (cercles rouges) de la phylogénomique (62).	68
Figure 18. Dendrogramme illustrant les relations phylogénétiques de la famille <i>Syntrophomonadaceae</i> et des ordres <i>Halanaerobiales</i> et <i>Thermoanaerobacterales</i> (216).	81
Figure 19. Arbre phylogénétique montrant les relations entre les séquences des trois isolats formant la nouvelle espèce <i>Moryella indoligenes</i> et celles des bactéries apparentées.	82
Figure 20. Dendrogramme illustrant les relations phylogénétiques d'une partie des membres de l'ordre <i>Clostridiales</i> au sein de la classe <i>Clostridia</i> (216).	85
Figure 21. Arbre phylogénétique montrant les relations entre les séquences des <i>Clostridium</i> spp. du cluster I et de certaines espèces apparentées (50).	88
Figure 22. Représentation schématique de la synthèse du peptidoglycane et du mode d'action des glycopeptides.	93

Figure 23. Arbre phylogénétique basé sur les séquences protéiques de diverses D-Ala:D-Ala ligases et enzymes apparentées (55).....	96
Figure 24. Schéma comparant l'épaisseur de la paroi chez les VSSA (A) et les VISA (B).....	97
Figure 25. Photographies d'une coloration de Gram des souches <i>Clostridium hastiforme</i> ATCC 33268 ^T (A) et <i>Tissierella praeacuta</i> ATCC 25539 ^T (B).....	98
Figure 26. Arbre basé sur les séquences d'ADNr 16S montrant les relations phylogénétiques entre l'espèce <i>P. paludivivens</i> et les autres espèces du genre <i>Prevotella</i> (342).....	107
Figure 27. Mécanisme d'action et de résistance au métronidazole.....	118
Figure 28 Relations phylogénétiques entre 48 souches de <i>Clostridium</i> basées sur l'analyse des séquences d'ADNr 16S partielles.....	165
Figure 29. Photographie d'une culture de la souche <i>C. hastiforme</i> ATCC 33268 ^T sur milieu BBA avec apparition de colonies dans la zone d'inhibition du Etest et du disque de vancomycine après 96 h d'incubation.....	166
Figure 30. Images en coupe de la paroi de <i>Clostridium perfringens</i> ATCC 13124 ^T (A) et de <i>Prevotella</i> sp. nov. LBN 293 ^T (B) (échelle = 50 nm).....	169
Figure 31. Images en coupe de la paroi de <i>C. hastiforme</i> ATCC 33268 ^T (A et B), de <i>Tissierella</i> sp. LBN 295 (C), et de <i>T. praeacuta</i> ATCC 25539 ^T (D) (échelle = 50 nm).....	169
Figure 32. Graphiques représentant l'évolution de la DO ou de la concentration bactérienne en fonction du temps pour les souches <i>C. difficile</i> 630, <i>C. hastiforme</i> ATCC 33268 ^T et <i>Tissierella</i> sp. LBN 295.....	172
Figure 33. Chromatogrammes obtenus après CLPH en phase inverse sur colonne Hypersyl PEP100 pour les souches <i>C. hastiforme</i> 33268 ^T , <i>T. praeacuta</i> 25539 ^T et <i>Tissierella</i> sp. LBN 295.....	175
Figure 34. Structure du peptidoglycane d' <i>E. coli</i> (349) similaire à la structure observée pour les <i>Tissierella</i> spp. testées.....	176
Figure 35. Photographies de la migration électrophorétique en champ pulsé après digestion par I-CeuI.....	177
Figure 36. Photographies de la migration électrophorétique en champ pulsé après digestion par I-CeuI.....	179
Figure 37. Photographies de la migration électrophorétique en champ pulsé après digestion par I-CeuI.....	179
Figure 38. Photographies de la migration électrophorétique en champ pulsé après digestion par I-CeuI (A) et de l'hybridation du gel avec une sonde ciblant l'ADNr 16S (B).....	181
Figure 39. Exemples de cartes génomiques hypothétiques schématisant le nombre et l'orientation des opérons <i>rrn</i> sur le chromosome après digestion par I-CeuI.....	182
Figure 40. Résultat de la recherche de la position taxonomique de <i>T. praeacuta</i> proposé par <i>Greengenes</i> selon la classification de Hugenholtz.....	184
Figure 41. Arbre phylogénétique montrant les relations évolutives entre cinq souches de <i>Tissierella</i> spp. et d'autres représentants des <i>Firmicutes</i> et d'autres phyla.....	189
Figure 42. Arbre phylogénétique montrant les relations évolutives entre la souche type de <i>T. praeacuta</i> et d'autres représentants des <i>Firmicutes</i>	193
Figure 43. Arbre phylogénétique montrant les relations évolutives entre quatre souches de <i>T. praeacuta</i> et d'autres représentants du clade <i>Peptostreptococcaceae</i> selon Hugenholtz.....	196
Figure 44. Arbre phylogénétique montrant les relations évolutives entre la séquence d'ADNr 16S de <i>T. praeacuta</i> DSM 5675 ^T (X80841), 59 des 100 séquences les plus proches phylogénétiquement et la séquence d' <i>Anaerococcus prevotii</i> (AF542232) qui sert à enraciner l'arbre.....	199
Figure 45. Arbre phylogénétique montrant les relations évolutives entre les 19 souches cliniques de cette étude, <i>T. praeacuta</i> ATCC 25539 ^T , <i>C. hastiforme</i> ATCC 33268 ^T , et les souches types de deux espèces et quatre genres apparentés.....	200

Figure 46. Photographie de l'électrophorèse des produits de PCR des gènes <i>tpi</i> , <i>recA</i> et <i>spo0A</i> pour les souches <i>C. hastiforme</i> ATCC 33268 ^T (1), <i>Tissierella</i> sp. LBN 295 (2) et <i>T. creatinini</i> DSM 9508 ^T (3).	203
Figure 47. Arbres phylogénétiques montrant les relations évolutives entre les souches étudiées.....	205
Figure 48. Résultat de l'analyse eBurst sur les 21 souches testées.	207
Figure 49. Arbre de recouvrement minimal montrant les relations hypothétiques entre les STs.....	208
Figure 50. Splitsgraph représentant le réseau phylogénétique établissant les liens entre l'ensemble des souches étudiées.....	209
Figure 51. Graphes construits via Xyplot montrant sous forme cumulative l'évolution du nombre de substitutions synonymes et non synonymes tout au long du gène <i>recA</i> (A), <i>spo0A</i> (B) et <i>tpi</i> (A).	211
Figure 52. Arbre phylogénétique construit par ML à partir de séquences protéiques partielles de D-Ala:D-X ligases bactériennes (298 acides aminés).....	218
Figure 53. Test de quenching de la fluorescence de la DPH par la quercétine.	220
Figure 54. Arbre phylogénétique montrant les relations phylogénétiques entre les souches cliniques et les souches types de <i>C. orbiscindens</i> et <i>E. plautii</i> , et d'autres espèces et genres apparentés.	221
Figure 55. Historique des prélèvements et des traitements antibiotiques du cas d'échec thérapeutique lié à une souche de <i>P. buccae</i> ayant développé une résistance au métronidazole (MTZ) <i>in vivo</i>	229
Figure 56. Photographie de la migration électrophorétique en champ pulsé après digestion par <i>XbaI</i> de la souche <i>P. buccae</i> LBN 465 (MTZ-S) et de la souche <i>P. buccae</i> MTZ-R.....	230
Figure 57. Photographie de la culture de la souche <i>Prevotella</i> sp. nov. LBN 293 ^T sur milieu BBA. .	232
Figure 58. Photographies des observations de la souche LBN 293 ^T	232
Figure 59. Photographie de la migration électrophorétique en champ pulsé du chromosome bactérien intact (A) ou après digestion par I-CeuI (B).	236
Figure 60. Arbre phylogénétique montrant les relations évolutives entre les trois souches cliniques constituant la nouvelle espèce <i>Prevotella nanceiensis</i> et les espèces du genre <i>Prevotella</i> . 237	237
Figure 61. Photographies de l'électrophorèse après digestion par <i>EcoRI</i> (A) et de l'hybridation de ce gel sur membrane de nylon et révélation par une sonde <i>nimI</i> (B).....	242
Figure 62. Arbre phylogénétique basé sur l'alignement des séquences d'acides aminés des NimI et des principales nitroimidazoles réductases décrites dans le monde bactérien.....	243
Figure 63. Dendrogrammes montrant les relations évolutives de l'espèce <i>T. praeacuta</i> / <i>C. hastiforme</i> avec les membres du cluster I (A) et des clusters XI, XII, XIII et XV (B) selon Collins et coll. (50, 102).	250
Figure 64. Photographie de la migration électrophorétique en champ pulsé après digestion par I-CeuI, notamment des souches de <i>C. difficile</i> CD33 (1) et CD34 (2).	251

Liste des tableaux

Tableau 1. Nombre de taxons inclus dans les trois dernières versions en ligne du <i>Bergey's Manual of Systematic Bacteriology</i>	72
Tableau 2. Genres bactériens inclus dans la famille <i>Peptostreptococcaceae</i> selon la classification consultée : celle du <i>Bergey's Manual</i> , documents en ligne de 2004 (116) et de 2009 (216), celle du <i>NCBI Taxonomy Browser</i> ou la LPSN.....	84
Tableau 3. Genres bactériens inclus dans la famille <i>Clostridiaceae</i> selon la classification consultée : celle du <i>Bergey's Manual</i> , documents en ligne de 2004 (116) et de 2009 (216), celle du <i>NCBI Taxonomy Browser</i> ou la LPSN.....	87
Tableau 4. Récapitulatif des différents phénotypes et génotypes de résistance aux glycopeptides retrouvés chez les bactéries à Gram + (55, 359).....	95
Tableau 5. Liste des espèces du genre <i>Prevotella</i> décrites au 20 juin 2009.....	108
Tableau 6. Caractères orientatifs pour l'identification des bacilles à Gram négatif anaérobies.....	110
Tableau 7. Caractéristiques des principales espèces non pigmentées de <i>Prevotella</i> spp. (82, 167, 286).	111
Tableau 8. Caractéristiques des principales espèces pigmentées de <i>Prevotella</i> spp. (167).....	111
Tableau 9. Projets en cours de séquençage de génomes complets de <i>Prevotella</i> spp.	113
Tableau 10. Marqueurs moléculaires utilisés pour l'étude du genre <i>Prevotella</i>	114
Tableau 11. Tableau récapitulatif des résultats de sensibilité de <i>Prevotella</i> spp. à certains antibiotiques des principales études publiées depuis janvier 2008.....	116
Tableau 12. Principales caractéristiques des gènes <i>nimA</i> à <i>nimG</i>	120
Tableau 13. Pourcentage d'identité (gras) et de similarité (<i>italique</i>) entre les séquences des nitroimidazole réductases décrites chez <i>Bacteroides</i> spp. et <i>D. radiodurans</i> (Nim Dr)..	122
Tableau 14. Liste et origine des souches de <i>Tissierella</i> spp. et des genres apparentés étudiées.	128
Tableau 15. Liste et origine des souches de <i>C. orbiscindens</i> et des espèces apparentées étudiées.	130
Tableau 16. Distribution des espèces de <i>Prevotella</i> spp. en fonction du type d'infection.	131
Tableau 17. Liste des souches types de <i>Prevotella</i> spp. étudiées.....	132
Tableau 18. Liste des souches contrôles de cette étude et de leur utilisation.....	133
Tableau 19. Amorces utilisées pour l'amplification du gène de l'ARNr 16S.....	147
Tableau 20. Gènes cibles et amorces testées sur les souches de <i>Tissierella</i> spp. et apparentées.	148
Tableau 21. Mélanges réactionnels des PCR ciblant les gènes <i>recA</i> , <i>spo0A</i> et <i>tpi</i>	149
Tableau 22. Protocoles d'amplification des gènes <i>recA</i> , <i>spo0A</i> et <i>tpi</i>	149
Tableau 23. Amorces et protocoles d'amplification utilisés pour la détection des gènes <i>van</i> chez <i>Tissierella</i> spp., <i>C. orbiscindens</i> et les genres apparentés.	150
Tableau 24. Mélanges réactionnels des PCR de détection des gènes <i>van</i> chez <i>Tissierella</i> spp., <i>C. orbiscindens</i> et les genres apparentés.....	150
Tableau 25. Amorces et protocoles d'amplification utilisés pour la détection des gènes <i>nim</i> et des séquences d'insertion associées chez <i>Prevotella</i> spp.....	152
Tableau 26. Mélanges réactionnels des PCR de détection des gènes <i>nim</i> et des séquences d'insertion associées chez <i>Prevotella</i> spp.	152
Tableau 27. Paramètres utilisés lors de la migration électrophorétique en champ pulsé.	161
Tableau 28. Principales caractéristiques phénotypiques des souches de <i>Tissierella</i> spp. et des genres apparentés.	167
Tableau 29. Epaisseur des différents éléments structuraux de la paroi des souches observées en MET.	170

Tableau 30. Rendements de l'extraction du peptidoglycane des souches <i>C. hastiforme</i> ATCC 33268 ^T , <i>T. praeacuta</i> ATCC 25539 ^T et <i>Tissierella</i> sp. LBN 295 (manipulation de novembre 2006 ☉ ou de juin 2007 ☉).....	173
Tableau 31. Récapitulatif du nombre d'opérons ribosomiques observés ainsi que des tailles approximatives des fragments obtenus après digestion par l'enzyme I-CeuI et de la taille estimée du génome des souches testées.....	180
Tableau 32. Numéros d'accèsion des séquences des gènes de l'ARNr 16S, de la triosephosphate isomérase, de la recombinaison A et du facteur d'initiation de la sporulation.....	183
Tableau 33. Récapitulatif des principales caractéristiques des bibliothèques utilisées dans cette étude phylogénétique.....	186
Tableau 34. Matrice de distance obtenue après alignement des séquences d'ADNr 16S des souches étudiées à l'aide du logiciel BioEdit.....	202
Tableau 35. Liste des différents allèles obtenus pour chaque gène ainsi que le ST correspondant à chaque souche.....	206
Tableau 36. Proportion de substitutions synonymes (dS) et non synonymes (dN) et rapports entre ces deux types de mutations.....	210
Tableau 37. Diversité génétique moyenne (H) et de chaque locus (h).....	212
Tableau 38. Compositions en G+C des gènes <i>tpi</i> , <i>recA</i> et <i>spo0A</i> déterminées à l'aide du logiciel BioEdit et du génome de <i>T. praeacuta</i> et apparentées (150, 259).....	213
Tableau 39. Caractéristiques phénotypiques et génotypiques des souches de <i>C. orbiscindens</i> et <i>E. plautii</i> étudiées.....	219
Tableau 40. CMI des souches <i>nim</i> -positives et des souches <i>nim</i> -négatives présentant une sensibilité réduite au métronidazole.....	225
Tableau 41. Induction et stabilité de la résistance au métronidazole chez 11 souches cliniques de <i>Prevotella</i> spp., chez <i>P. baroniae</i> DSM 16972 ^T et chez <i>B. fragilis</i> ATCC 25285 ^T	226
Tableau 42. Résultats des différents tests obtenus avec les galeries Rapid ID 32A et API 20A pour les souches LBN 293 ^T , LBN 297 et LBN 298. +, positif ; -, négatif ; v, variable.....	233
Tableau 43. Pourcentage relatif des acides gras cellulaires des souches <i>Prevotella</i> sp. nov. LBN 293 ^T (1), <i>P. loescheii</i> JCM 8530 ^T (2), <i>P. shahii</i> EHS11 ^T (3) et <i>P. marshii</i> E9.34 ^T (4) (82, 286). -, non détecté.....	234
Tableau 44. Principales caractéristiques phénotypiques permettant de différencier <i>Prevotella</i> sp. nov. des espèces les plus proches de <i>Prevotella</i> spp.	238
Tableau 45. Types d'infection et numéros d'accèsion des souches de <i>P. baroniae</i>	241

Liste des annexes

Annexe A : Protocole de préparation des milieux de culture spécifiques	300
Annexe B : Liste des séquences d'ADNr 16S utilisées dans l'étude phylogénétique de <i>Tissierella</i> spp.	303
Annexe C. Sensibilité au métronidazole de <i>Prevotella</i>	316
Annexe D. Publication N°1	318
Annexe E. Publication N°2	337
Annexe F. Publication N°3.....	342
Annexe G. Publication N°4.....	348

Liste des abréviations

A, T, G, C	Adénine, Thymines, Guanine, Cytosine
ADNg/r	Acide DésoxyriboNucléique génomique/ ribosomique
AFLP	<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>
AIP	Collection des bactéries Anaérobies de l'Institut Pasteur
AP-PCR	PCR utilisant des amers arbitraires (<i>Arbitrarily Primed – PCR</i>)
ARDRA	<i>Amplified rDNA Restriction Analysis</i>
ARNr	Acide RiboNucléique ribosomique
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATPase	Adénosine TriPhosphatase
BBA	Milieu solide Brucella (<i>Brucella Blood Agar</i>)
BBE	Milieu liquide Brucella enrichi (<i>Brucella Broth Enrichi</i>)
BHI	Milieu liquide coeur-cerveau (<i>Brain Heart Infusion</i>)
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BSA	Albumine sérique bovine (<i>Bovine Serum Albumine</i>)
CA-SFM	Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie
CCL	Colonie à Croissance Lente
CCUG	<i>Culture Collection, University of Göteborg</i>
CHU	Centre Hospitalier Universitaire
CIP	Collection de l'Institut Pasteur
CLHP-SM	Chromatographie Liquide Haute Performance -Spectrométrie de Masse
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
CPG	Chromatographie en Phase Gazeuse
Da	Dalton
DDBJ	<i>DNA Data Bank of Japan</i>
DIBOP	Diversité génomique et biologique des Bactéries Opportunistes
dNTP	Désoxy Nucléotide TriPhosphate
DO	Densité Optique
DPH	1,6-diphényl-1,3,5-hexatriène
DSMZ	<i>Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen</i>
dUTP	Désoxy Uracile TriPhosphate
eBURST	<i>Based Upon Related Sequence Types</i>
ECP	Electrophorèse en Champ Pulsé
EDTA	Ethylène Diamine Tétracétate
EF-Tu	Facteur d'élongation des protéines (Tu : <i>temperature unstable</i>)
EMBL	<i>European Molecular Biology Laboratory</i>
ERIC-PCR	<i>Enterobacterial Repetitive Intragenic Consensus - PCR</i>
FAME	<i>Fatty Acid Methyl Ester</i>
GTR	<i>General Time Reversible</i>
HGT	Transfert génétique horizontal (<i>Horizontal Gene Transfert</i>)
HMP	Projet Microbiome Humain (<i>Human Microbiome Project</i>)
HSP	Protéine de choc thermique (<i>Heat Shock Protein</i>)
ICSP	Comité International de Systématique des Procaryotes (<i>International Committee on Systematics of Prokaryotes</i>)

IJSEM	<i>International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology</i>
INRA	Institut National pour la Recherche Agronomique
IS	Séquence d'Insertion
LBN	Laboratoire de Bactériologie de Nancy
LBP	Laboratoire de Bactériologie de Poitiers
LBR	Laboratoire de Bactériologie de Rouen
LPS	Lipopolysaccharide
LPSN	<i>List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature</i>
MALDI-TOF	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation-Time Of Flight</i>
mDAP	Acide <i>meso</i> -diaminopimélique
MET	Microscopie Electronique à Transmission
ML	Maximum de vraisemblance (<i>Maximum Likelihood</i>)
MLEE	<i>MultiLocus Enzyme Electrophoresis</i>
MLSA/MLST	<i>MultiLocus Sequence Analysis / MultiLocus Sequence Typing</i>
MP	Maximum de Parcimonie
MTZ	Métronidazole
Nb / N°	Nombre / Numéro
UTO/OTU	Unités Taxonomiques Opérationnelles / Operational Taxonomic Unit
pb, Kb, Mb	Paire de base, kilobase, mégabase
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PFGE	Electrophorèse en Champ Pulsé (<i>Pulsed-Field Gel Electrophoresis</i>)
PMSF	Phénylméthylsulfonyl fluoride
POR	Pyruvate-ferrédoxine/flavodoxine OxydoRéductases
Qsp	Quantité suffisante pour
RAPD	<i>Randomly Amplified Polymorphic DNA</i>
RDP	<i>Ribosomal Database Project</i>
Ref.	Références
REP-PCR	<i>Repetitive Extragenic Palindrome - PCR</i>
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RND	<i>Resistance Nodulation Division</i>
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méthicilline
SASP	<i>Small Acid Soluble Protein</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i>
SNAP	<i>Synonymous Non-synonymous Analysis Program</i>
SSC	Tampon Standard Saline Citrate
ST	Séquence Type
TGY	Trypticase Glucose Yeast
Tm	Température de fusion (<i>Melting temperature</i>)
TOBA	Taxonomie en ligne (<i>Taxonomic Outline of the Bacteria and Archae</i>)
UFC	Unité Formant Colonie
UPGMA	<i>Unweight Pair Group Method with Arithmetic mean</i>
UV	Rayons UltraViolets
VISA	Vancomycin Intermediate <i>Staphylococcus aureus</i>
VPI	<i>Virginia Polytechnic Institute</i>
VRSA	Vancomycin Resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
VSSA	Vancomycin Susceptible <i>Staphylococcus aureus</i>

INTRODUCTION GENERALE

La taxonomie bactérienne, qui se définit comme l'étude des relations qui existent entre les bactéries, englobe leur classification, leur nomenclature et leur identification. Ces trois parties consistent à établir des taxons, groupes bactériens présentant des caractères communs, qui devront être nommés et identifiés sur la base de critères définis. Grâce aux progrès de la biologie moléculaire, cette classification bactérienne est en perpétuel bouleversement, notamment au sein des bactéries anaérobies, groupe encore mal connu de par la lourdeur et la difficulté de culture. Ces dernières années ont vu la création de très nombreuses nouvelles espèces, de nouveaux genres et même de nouvelles familles, ordres voire classes de bactéries anaérobies. Par ailleurs, l'utilisation d'outils plus performants a mené à la reclassification d'espèces ou de genres déjà connus et de nombreux grands remaniements taxonomiques restent à venir.

Cette classification des microorganismes est une discipline majeure permettant de rendre intelligible l'immense diversité de ces derniers, de développer des procédures systématiques pour leur identification et de mettre en place une nomenclature informative. L'identification, c'est à dire l'affiliation d'une bactérie à une espèce donnée, reste un des aspects les plus délicats en particulier parce que la notion d'espèce est mal définie chez les bactéries. Mais c'est aussi un des aspects les plus importants, notamment en microbiologie clinique. Une classification et une nomenclature fiables et actualisées sont indispensables aux microbiologistes pour identifier et différencier les microorganismes pathogènes. Il faut donc adapter les outils et les méthodes de classification aux méthodes d'identification. A l'heure actuelle, des outils moléculaires sont utilisés en complément des méthodes phénotypiques pour identifier les bactéries impliquées en pathologie humaine. Cette approche mixte devra s'appuyer sur une taxonomie tenant compte de caractères moléculaires et phénotypiques, appelée taxonomie mixte et consensuelle (anciennement taxonomie polyphasique). Une identification claire des espèces bactériennes sera non seulement un préalable nécessaire à la compréhension des facteurs impliqués dans leur virulence et leur résistance aux antibiotiques, mais permettra également de faciliter leur détection et l'étude de leur sensibilité aux antibiotiques en pratique clinique.

Les bactéries de la famille *Clostridiaceae*, et particulièrement celles appartenant au genre *Clostridium*, forment majoritairement des groupes polyphylétiques et paraphylétiques. Un réel problème quant à la fiabilité de leur identification se pose donc, notamment quand ces organismes sont impliqués dans des infections humaines. Parmi ces espèces, deux groupes ont attiré notre attention car ils présentent un bas niveau de résistance à la vancomycine, antibiotique utilisé dans les infections sévères à bactéries à Gram positif. Il s'agit de deux espèces de *Clostridium*, *C. hastiforme* et *C. orbiscindens*, dont la position taxonomique n'est pas claire puisque la première vient d'être reclassée en *Tissierella praeacuta*, initialement décrit comme étant un bacille à Gram négatif non sporulé. *C. orbiscindens* se confond quant à lui phylogénétiquement à l'espèce non sporulée *Eubacterium plautii*. Il nous a donc semblé nécessaire d'étudier les relations phylogénétiques et les positions taxonomiques de ces espèces afin de proposer les remaniements adéquats.

Le genre *Prevotella* est, à l'inverse, un groupe taxonomiquement fiable. Cependant, la fréquence des infections dues à ces bactéries et la diversité de ces espèces au sein des sources d'infections que représentent les flores commensales de l'hôte expliquent la découverte croissante de nouvelles espèces posant des problèmes d'identification et ayant parfois développé de nouveaux mécanismes de résistance aux antibiotiques. Dans le cadre d'une étude portant sur un large panel d'isolats cliniques de *Prevotella* spp., nous avons observé des phénomènes de résistance au métronidazole chez des souches dont la position taxonomique restait à déterminer.

Dans une première partie introductive portant sur la systématique bactérienne, nous avons décrit les différentes méthodes nécessaires à une approche mixte de la taxonomie bactérienne. Puis, après avoir présenté les données bibliographiques permettant d'éclairer notre travail expérimental, nous avons exploré les relations évolutives des bactéries du genre *Tissierella* ainsi que la position taxonomique de l'espèce *Clostridium orbiscindens*. Nous avons ensuite utilisé cette approche taxonomique en l'appliquant au genre *Prevotella*, évaluant conjointement le lien avec l'évolution de la résistance au métronidazole.

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

Taxonomie Mixte et Consensuelle Bactérienne

I. HISTORIQUE DE LA CLASSIFICATION DES ETRES VIVANTS

En sciences naturelles, la systématique correspond à la science des classifications. Sa première tâche est l'identification, la description et l'inventaire des êtres vivants dans la nature présente et passée. La seconde est leur classement taxonomique qui permet de rendre intelligible leur immense diversité. Le mot taxonomie, ou taxinomie, du grec *taxis* (ordre, arrangement) et *nomos* (loi) désigne la science des lois de la classification des êtres vivants. Bien que ce terme ne soit apparu qu'au XIX^{ème} siècle, la nécessité d'inventorier et de classer les êtres vivants s'est ressentie dès l'Antiquité, notamment dans le domaine des plantes afin de permettre de répertorier et différencier les plantes aromatiques, alimentaires, médicinales et vénéneuses (199). Le Grec Théophraste (372-287 av. JC) peut être considéré comme le fondateur de la Botanique à travers son *Histoire des plantes*. Pline l'Ancien (23-79), auteur d'un *Historia Naturalis*, propose également une classification utilitaire. Malgré une conception utilitaire de la classification et divine de l'origine de la vie, les Grecs, avec Anaximandre et Platon, percevaient l'aspect dynamique et évolutif du vivant. Le Moyen Age et la Renaissance ont été marqués par les travaux d'anatomie comparée des médecins arabes. Ces derniers, en montrant les similitudes de caractères entre les animaux et l'homme, ont préparé les esprits à la notion de continuité évolutive qui émergera bien plus tard.

Le milieu du XVII^{ème} siècle a vu le retour d'un idéal de classification naturelle, reflet de l'organisation de la Nature, basée sur les caractères des plantes plutôt que sur leur utilisation. Le montpelliérain Joseph Pitton de Tournefort commença à utiliser les caractéristiques de la fleur comme caractères distinctifs et définit une unité de base de la classification : le genre. La codification claire de niveaux hiérarchiques est apparue au XVIII^{ème} siècle sous l'influence du botaniste Carl von Linné qui définit règne, classe, ordre, genre, espèce et variété. Le fait de nommer un organisme par son nom de genre suivi de son nom d'espèce constitue la nomenclature binomiale. L'intention de Linné de recenser et de classer le monde biologique connu à son époque commença en 1753 avec son *Species plantarum*, suivi en 1758 par son

Systema naturae qui incluait aussi les animaux. A cette époque, les biologistes tendirent dans leur ensemble vers un but : trouver une logique qui permette d'accéder à la classification naturelle. Bernard de Jussieu et son neveu, Antoine-Laurent de Jussieu, émirent le principe qu'il vaut mieux définir un taxon par peu de caractères qui, constants, sont partagés par l'ensemble des espèces ainsi réunies, que par de nombreux caractères labiles qui n'amènent à aucun résultat solide. Ces progrès de la nomenclature et de la classification des organismes vivants se sont faits par nécessité au détriment du développement de la notion de continuité évolutive des êtres vivants, la classification s'accommodant difficilement de l'aspect dynamique des caractères qu'elle étudie.

C'est sans doute avec Pierre Louis Moreau de Maupertuis qu'apparaît la première expression d'une vision évolutionniste de la nature vivante (122). En 1751, dans son livre *Système de la nature*, il avance l'hypothèse que les variations héréditaires accidentelles surgissant dans les espèces pourraient être la source de leur modification et leur diversification. Au début du XIX^{ème} siècle, Jean-Baptiste Lamarck soutient dans *La philosophie zoologique* que les espèces descendent les unes des autres et se modifient indéfiniment. Au même moment, le paléontologue Georges Cuvier prouve que de nombreuses formes fossiles sont des traces d'espèces d'animaux désormais éteintes. Tout en rejetant féroceement les théories de Lamarck, il montre la nécessité de représenter la classification des vivants comme une ramification, avec des embranchements, plutôt que comme une série. Cuvier rejoint la vision fixiste de Linné, proche de la vision créationniste actuelle, selon laquelle les espèces, créées par Dieu lors de la Genèse, restent identiques tout au long de leur existence. Le géologue Charles Lyell prolonge en 1830 les travaux de paléontologie de Cuvier en les replaçant dans l'histoire des modifications de la croûte terrestre. En 1835, le jeune Charles Darwin embarque sur le Beagle pour un tour du monde naturaliste emportant avec lui le traité *Principle of Geology* de Charles Lyell. Ces observations des variations de caractères entre espèces proches, les pinsons en particulier, mises en perspective de l'évolution géologique, lui permettent de jeter très vite les bases de sa théorie de l'évolution. Ce n'est qu'en 1859 qu'il publie *De l'origine des espèces*, proposant l'idée de descendance avec modification qui structure désormais la pensée phylogénétique, et plus largement la pensée en biologie. Utilisant le modèle de l'économiste Thomas Malthus, il suggère que pour toutes les espèces, et pour de nombreux caractères de celles-ci, il existe très probablement un processus de sélection naturelle préservant les variations favorables et éliminant les variations défavorables. D'après Darwin, le fil directeur est à chercher en étudiant non pas les variations des caractères acquis, mais celles des seuls

caractères héréditaires, transmis aux générations suivantes. Il en découle que la communauté de descendance est le lien caché qui explique la ressemblance d'espèces, donc leur regroupement au sein d'un même taxon. Il prédit l'existence d'une généalogie commune de tous les êtres vivants pouvant être schématisée sous la forme d'un arbre de vie, ou plutôt d'un corail, étant donné que « la base des branches est morte » (Figure 1). Le terme de phylogénie sera proposé en 1866 par Haeckel à la place de la généalogie.

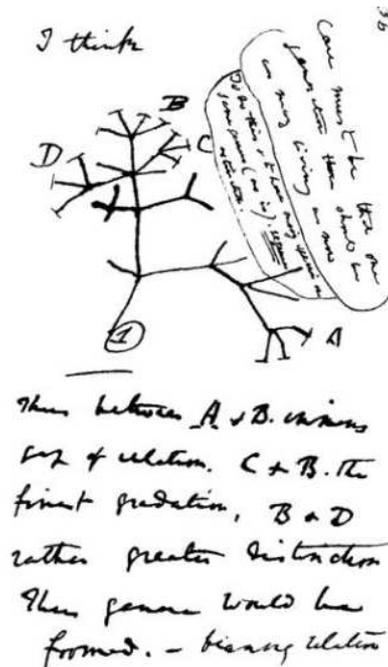


Figure 1. La première esquisse d'un arbre évolutif tirée du carnet de notes de Charles Darwin, « *First Notebook on Transmutation of Species* » (1837).

Les travaux de Gregor Mendel étant demeurés confidentiels, Darwin ne put appliquer sa théorie aux lois de l'hérédité. La redécouverte de la génétique au début du XX^{ème} siècle mena, entre autres, au développement du néo-darwinisme (August Weismann) et à l'élaboration de la théorie synthétique de l'évolution (Theodosius Dobzhansky) (196). Ces généticiens considèrent qu'au sein des populations, les variations héréditaires, fruits de mutations génétiques minimes, sont sous l'emprise de la sélection naturelle qui modifie les fréquences des gènes dans ces populations. Ces changements entraîneraient peu à peu une meilleure adaptation des organismes.

Le darwinisme et le néo-darwinisme placent l'instabilité et l'évolution comme essences du vivant. La systématique et la taxonomie s'accommodent mal de ces théories dynamiques. Ce n'est que dans la deuxième moitié du XX^{ème} siècle que les taxonomistes tentent d'intégrer l'histoire évolutive des organismes sur Terre à la classification naturelle tant recherchée. En

se basant sur la théorie synthétique de l'évolution, l'entomologiste allemand Willi Hennig crée en 1950 la systématique phylogénétique ou cladistique. Cette méthode se propose de rassembler les espèces en groupes monophylétiques, c'est à dire en groupes comportant un ancêtre commun et la totalité de ses descendants, en exploitant avec rigueur le concept darwinien de descendance avec modification. Une ressemblance de caractère ne signifie pas forcément une homologie, certaines ressemblances étant des convergences, c'est à dire le résultat d'acquisitions indépendantes d'un même caractère au cours de l'évolution. On ne peut donc formuler au départ que des hypothèses d'homologie sur les caractères menant à la construction d'arbres explicitant tous les chemins d'évolution possibles et faisant apparaître le moins d'évènements possible. Cela revient à maximiser la contiguïté des états de caractères identiques dans l'arbre et mène à la construction d'un arbre consensus le plus parcimonieux possible qui correspond à la représentation la plus simple, la plus économique en hypothèses de transformations. Mais un arbre phylogénétique obtenu sur un caractère ne sera pas forcément confirmé lors de l'étude d'un autre caractère ou d'autres espèces.

La découverte de la fluidité des génomes et des transferts horizontaux de gènes (HGT) minimise le rôle des mutations ponctuelles et la vision graduelle de l'évolution chères à la théorie synthétique de l'évolution. De plus, en 1967, la théorie neutraliste de l'évolution moléculaire de Motoo Kimura soutient que certains gènes mutants sans aucun avantage sélectif peuvent se répandre dans une population. Ce phénomène, nommé "dérive aléatoire", joue un rôle évolutif crucial dans des petites populations au sein desquelles un gène "neutre" pourra s'établir durablement et entraîner des modifications de l'organisme. Le modèle évolutif actuel allie principalement la sélection négative, qui élimine les individus non adaptés, et la dérive, qui introduit des mutations génétiques neutres d'un point de vue adaptatif au sein de petites populations. Paradoxalement, la sélection positive n'interviendrait qu'à la marge. Cette évolution neutraliste est à la base de la notion d'horloge moléculaire : dans certains gènes, les mutations non soumises à pression de sélection se produisent de façon aléatoire et s'accumulent au fil du temps. Ces mutations neutres permettront de retracer l'évolution du gène et par extension de l'organisme qui le porte.

Outre les réponses qu'elle apporte au simple désir de connaître et de comprendre les liens évolutifs entre les êtres vivants, la systématique est vitale par ses applications, quelles soient écologiques, géologiques, agronomiques, médicales, ... En effet, la lutte contre les infections, et notamment les infections bactériennes responsables de plusieurs millions de morts dans le monde, ne saurait progresser sans une bonne systématique des espèces bactériennes en cause.

De nombreux développements dans les domaines du diagnostic, de la prévention ou du contrôle des maladies infectieuses bénéficient directement des avancées de la connaissance de la biodiversité microbienne.

Quelles sont les relations évolutives chez les bactéries et comment peut-on les étudier ?

II. LA PHYLOGENIE BACTERIENNE

1. De l'approche morphologique à l'approche moléculaire

Au XVIII^{ème} siècle, les êtres vivants étaient scindés en deux règnes, le règne végétal et le règne animal, les bactéries étant classées parmi les plantes. Très rapidement, ces regroupements apparaissant simplistes et trop restrictifs, un troisième règne est créé par Haeckel en 1868, le règne des Protistes qui regroupe mycètes, algues, protozoaires et bactéries (Figure 2) (367).

Puis Robert H. Whittaker propose de diviser les organismes sur la base de trois critères principaux : le type cellulaire principalement basé sur la structure nucléaire (procaryote ou eucaryote) et sur la composition de la paroi cellulaire, le niveau d'organisation (solitaire ou unicellulaire, en colonie ou multicellulaire) et le type de nutrition. Il définit ainsi pour la première fois la classification des organismes vivants en cinq règnes : *Monera* ou *Procaryotae*, *Protista*, *Fungi*, *Animalia* et *Plantae* (362). Comme pour l'arbre de Haeckel, les procaryotes n'occupent qu'une toute petite place au niveau des racines de l'arbre. Ceci s'explique par le faible nombre de caractères morphologiques disponibles chez ces microorganismes mais également par la quasi-absence de fossiles de procaryotes alors que pour les eucaryotes, une grande quantité et une grande diversité de traces fossiles sont disponibles. Ceci permet d'expliquer la bonne connaissance de leur évolution même jusqu'à des périodes reculées car ces fossiles permettent de retrouver les caractéristiques morphologiques des ancêtres.

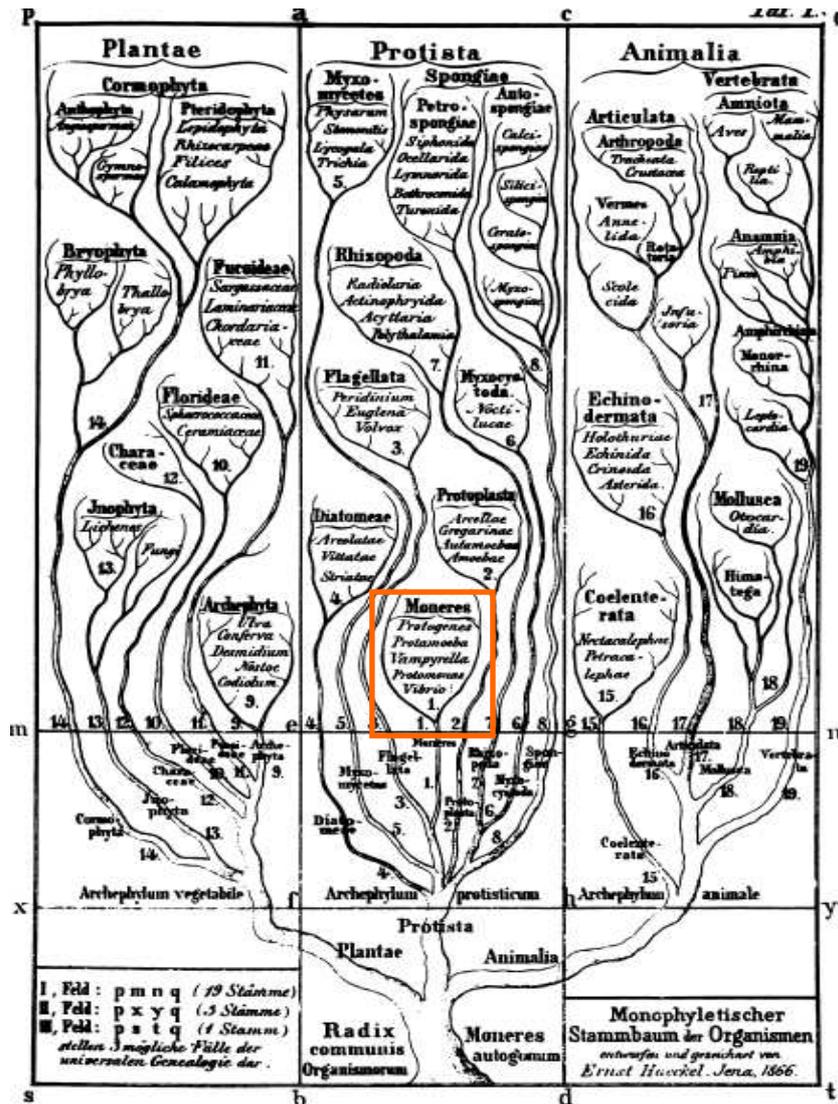


Figure 2. Arbre phylogénétique de Haeckel (1866) représentant les règnes *Plantae*, *Protista* et *Animalia* (367).

Les procaryotes (*Monera*) sont indiqués en orange.

Il a fallu attendre l'avènement des techniques de biologie moléculaire et la détermination des séquences nucléotidiques de certains gènes, horloges moléculaires, pour combler les lacunes concernant le passé évolutif procaryote. Au cours du temps, ces séquences ont subi des mutations, neutres pour la plupart, qui ont modifié le génome d'un individu. On dit que ces mutations sont fixées si tous les individus d'une même population ont acquis ces modifications. Deux individus ayant divergé récemment ont des séquences très similaires. Chaque séquence accumule des mutations à un rythme qui lui est propre. La phylogénie moléculaire tente de reconstituer les filiations évolutives aboutissant aux séquences ADN, ARN ou protéiques (molécules dites sémantiques car apportant des informations concernant la reproduction, le comportement, la survie...) actuelles, en faisant appel à des comparaisons de

séquences moléculaires. Pour résumer, la phylogénie moléculaire est donc basée sur les principes suivants :

- les mutations se produisent au hasard,
- les mutations s'accumulent au cours du temps,
- les mutations se produisant chez un individu se fixent dans sa descendance.

Pour reconstituer des phylogénies, on peut utiliser différents gènes, ou les protéines correspondantes, appelés marqueurs phylogénétiques. En fonction de la molécule choisie, le taux de mutation est plus ou moins élevé et on peut ainsi accéder à un passé plus ou moins lointain. Des gènes ayant un taux de mutation faible permettent d'accéder à un passé lointain tandis que des gènes présentant des taux de mutation élevés permettent d'étudier des événements de divergence proche. Il s'agit de la théorie de l'horloge moléculaire développée par Zuckerkandl et Pauling en 1965. Bien que des arguments soient développés contre cette notion d'horloge moléculaire (inconstance et fonctionnement épisodique de l'horloge), il semble qu'elle fonctionne assez bien sur de longues périodes évolutives, pour des gènes ayant des taux de mutation relativement faibles. La vitesse d'évolution est très variable selon les gènes considérés. Ces différences de vitesse dépendent à la fois de la probabilité d'apparition d'une mutation et de sa compatibilité avec la survie de l'organisme. La phylogénie moléculaire permet ainsi d'estimer le temps de divergence d'espèces en comparant leur diversité moléculaire (185, 328).

Un certain nombre de critères définissent le parfait chronomètre moléculaire (215, 218, 373). La molécule choisie doit tout d'abord être distribuée universellement dans le groupe bactérien étudié et doit présenter les mêmes fonctions chez tous les membres du groupe. Elle doit être le moins possible soumise aux phénomènes de transfert latéral et de recombinaison. Il est également indispensable que ce marqueur possède des régions conservées afin de permettre l'alignement des séquences de toutes les bactéries. Enfin, la séquence de la molécule choisie doit refléter l'ensemble des changements évolutifs de l'organisme et être adaptée à la question évolutive posée. Plus la distance phylogénétique à mesurer est grande et plus le marqueur utilisé devra avoir une évolution lente afin de ne pas brouiller le signal par un taux de modification trop important. De nombreux marqueurs ont été proposés comme horloges moléculaires, apportant chacun des informations plus ou moins pertinentes selon les groupes bactériens étudiés et les types de relations étudiées (anciennes et récentes). Les plus utilisés et

les mieux renseignés sont les gènes des ARN ribosomiques (ARNr), notamment celui de l'ARNr 16S.

L'utilisation des méthodes moléculaires a ouvert de nouvelles voies pour les sciences de l'évolution et notamment de l'évolution bactérienne. Cependant, malgré l'apport indéniable des séquences nucléiques pour clarifier les relations phylogénétiques entre les bactéries, l'émergence de nouvelles techniques de biochimie structurale pourra à l'avenir permettre d'exprimer la diversité structurale des bactéries (248).

2. ARN ribosomiques et horloges moléculaires

a) Généralités sur l'ARNr 16S

De nombreux travaux ont montré que les ARNr étaient de bons outils phylogénétiques pour établir les liens de parenté entre tous les êtres vivants. Tout d'abord parce que toutes les cellules contiennent des ARNr. En effet, les cellules eucaryotes possèdent des ARNr 28S, 18S, 5.8S et 5S tandis que les cellules procaryotes possèdent des ARNr 23S, 16S et 5S. Leurs gènes s'organisent en opérons pouvant être présents en mono- ou multi-copies dans les génomes. Les ARNr sont des molécules ayant évolué plus lentement que le reste du génome et constituent de ce fait une horloge moléculaire lente. De par la qualité de l'information phylogénétique qu'ils fournissent, ce sont principalement les gènes codant l'ARN de la petite sous-unité du ribosome, c'est-à-dire le gène de l'ARNr 16S chez les procaryotes ou de l'ARNr 18S chez les eucaryotes, qui sont utilisés comme marqueurs phylogénétiques. Le gène de l'ARNr 16S a comme avantages d'être constitué de domaines hautement conservés entourant des domaines variables, de présenter une taille de 1540 nucléotides aisément séquençables et d'avoir une séquence suffisamment informative (215, 317, 367). Ces régions hautement conservées servent de cibles pour des amorces dites "universelles" servant à l'amplification *in vitro* par PCR (Polymerase Chain Reaction) puis au séquençage (357). Cependant, la présence de plusieurs copies du gène au sein d'un génome peut conduire à des hétérogénéités de séquences entre les copies. Ce phénomène, pouvant être problématique pour établir la phylogénie dans certains groupes bactériens (224), est souvent compensé par des phénomènes d'évolution concertée par conversion génique (206). De plus, bien que cela soit

rarement décrit pour ce gène, l'ADN ribosomique (ADNr) 16S peut être soumis à des transferts latéraux (343). VanBerkum et coll. (2003) ont montré qu'une petite portion de la séquence du gène de l'ARNr 16S de *Bradyrhizobium elkanii* provenait du génome de *Mesorhizobium* spp. par transfert latéral (343). Les contradictions entre les phylogénies fondées sur l'ADNr 16S et 23S pour les genres *Ochrobactrum* et *Brucella* suggèrent également des phénomènes de recombinaison (331).

Le nombre de séquences des gènes d'ARNr 16S est sans cesse en très forte augmentation dans les banques informatiques de données. En effet, en 2009, la *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>) met à disposition plus d'un million de séquences d'ADNr 16S (21). Cette banque est mise à jour régulièrement grâce à des échanges quotidiens de séquences avec la banque européenne *EMBL* (European Molecular Biology Laboratory) (190) et la banque japonaise *DDBJ* (DNA Data Bank of Japan) (235). Il faut également noter l'existence de banques spécialisées dans les séquences de gènes codant les ARNr comme les bases de données *RDP* (*Ribosomal Database Project*) (49, 220) ou *Greengenes* (67), respectivement consultables sur <http://rdp.cme.msu.edu/> et <http://greengenes.lbl.gov/>, et qui permettent d'obtenir des séquences vérifiées et de bonne qualité d'ADNr 16S d'eubactéries et d'archées. *Greengenes* permet par ailleurs de détecter les éventuelles séquences chimères, séquences artéfactuelles produites par le protocole d'amplification, et propose un accès aux différentes taxonomies actuellement proposées par différents auteurs. La base de données *SILVA* (du latin *silva* qui signifie forêt), disponible sur le site <http://www.arb-silva.de/>, met quant à elle à disposition des séquences des gènes d'ARNr 16S et 23S d'eubactéries et d'archées mais également des gènes ribosomiques eucaryotes (273).

b) Nouvelle place des bactéries dans l'arbre du vivant.

Basées sur l'étude de l'ARNr 16S, les études phylogénétiques menées par Woese depuis les années 1970 remettent en cause la classification des êtres vivants en cinq règnes de Whittaker (368). Woese et coll. ont étudié les relations phylogénétiques entre plus de 500 espèces de procaryotes et d'eucaryotes, en termes de similarité entre les séquences d'ADNr 16S et 18S. A partir des données obtenues, des modèles phylogénétiques ont été construits et ont conduit à la découverte en 1977 d'un troisième domaine constitué de procaryotes particuliers, appelés archaebactéries qui sont aussi éloignées des eucaryotes que des eubactéries. On y retrouve des organismes aérobies mais aussi un grand nombre d'anaérobies, tous capables de vivre dans un

environnement très hostile (pH, température, salinité,...). Ces résultats rejetant une classification des organismes vivants en cinq règnes, les auteurs ont proposé un arbre phylogénétique universel classant tous les êtres vivants en trois domaines (taxon le plus élevé) indépendants : *Bacteria* (ou *Eubacteria*), *Archaea* (ou *Archaeobacteria*) et *Eucarya* (Figure 3) (361, 367, 369).

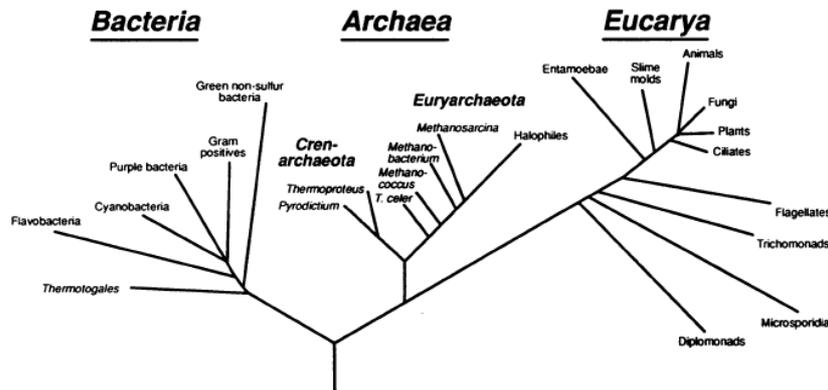


Figure 3. Arbre phylogénétique universel défini par Woese et adapté par Wheelis (361) classant les êtres vivants en trois domaines : *Archae*, *Bacteria* et *Eucarya*.

Cette nouvelle classification a démontré que les procaryotes n'occupaient pas juste les racines de l'arbre du vivant mais en constituaient environ les deux-tiers.

c) Radiation explosive des phyla

Cette même méthode basée sur l'analyse des séquences d'ADNr 16S a également permis à Woese et coll. de différencier des phyla et subphyla au sein de chaque domaine (367, 369). Ils ont défini 12 phyla ou divisions dans le domaine *Eubacteria* :

- les bactéries synthétiques pourpres et apparentées ou protéobactéries
- les bactéries à Gram positif à bas G+C%
- les bactéries à Gram positif à haut G+C% (actinobactéries)
- les cyanobactéries
- les bactéries sulfureuses vertes (*Chlorobium* et apparentés)
- les spirochètes et apparentés
- les *Bacteroides*, *Flavobacteria* et apparentés
- les *Planctomyces* et apparentés
- les *Chlamydiae*

- les microcoques radio-résistant (*Deinococcus* et apparentés)
- les bactéries vertes non sulfureuses (*Chloroflexus* et apparentés)
- les *Thermotoga* et *Thermosulfobacterium*

Progressivement, un certain nombre de phyla supplémentaires ont été décrits. Par exemple, en 1992, Burggraf et coll. ont caractérisé *Aquifex pyrophilus* et le phylum *Aquificae* qui représentent le branchement le plus ancien sur l'arbre des *Eubacteria* (32). En 1998, directement à partir de l'extraction d'ADN de sédiments d'une source d'eau chaude du parc national Yellowstone, Hugenholtz et coll. ont décrit l'existence de 12 phyla supplémentaires appelés OP 1 à OP 12 et représentés dans la Figure 4 (158).

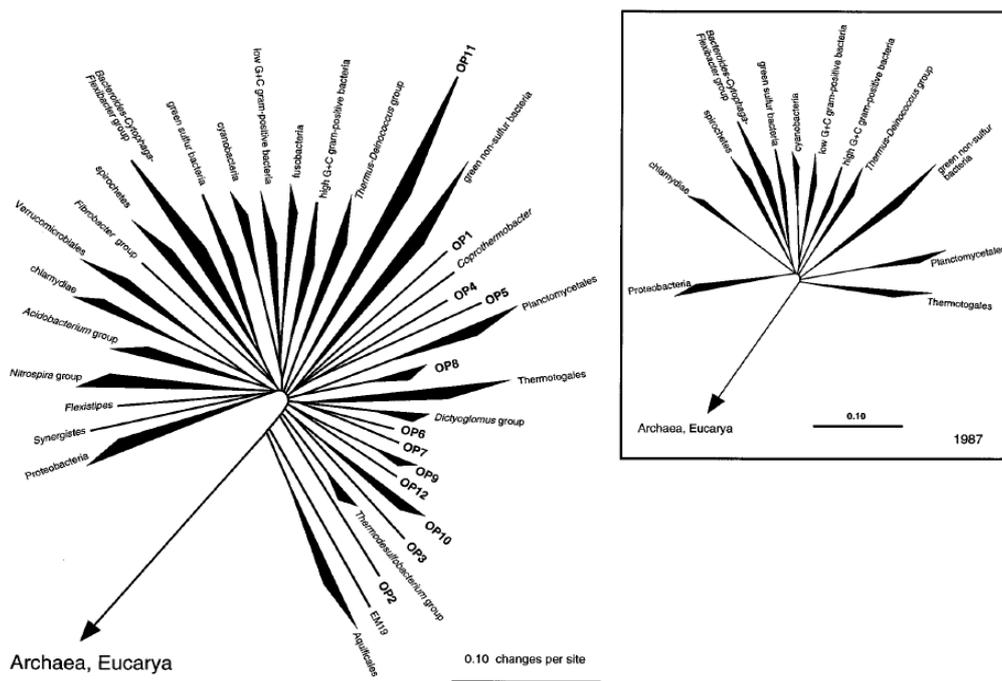


Figure 4. Représentation schématique des phyla décrits au sein des *Bacteria* en 1998 et comparaison avec les données de Woese en 1987 (158)

Depuis les premiers travaux de Woese, de très nombreuses études ont confirmé l'intérêt de l'ARNr 16S en tant qu'outil de phylogénie car il reflète bien la diversité et l'évolution bactérienne. Cependant plusieurs limites sont à souligner quant à l'utilisation de ce marqueur. Par exemple, il a été montré que, pour certains groupes bactériens, il n'est pas suffisamment discriminant lorsqu'il s'agit d'élucider les relations entre taxons de bas niveau (espèce, genre) comme c'est le cas par exemple pour les entérobactéries ou les mycobactéries (144, 236, 319), ou, à l'inverse, entre taxons de haut niveau (phylum, classe, ordre). Par ailleurs, il est risqué d'utiliser un seul marqueur pour analyser les relations évolutives entre organismes d'autant

plus qu'une phylogénie basée sur l'ARNr 16S seul ne prend absolument pas en compte la notion de transferts latéraux qui sera abordée dans un chapitre ultérieur (373). Il va donc falloir corroborer les résultats obtenus en associant l'étude de marqueurs protéiques alternatifs. Les arbres construits récemment à partir des séquences totales de génomes bactériens confirment globalement l'organisation du monde bactérien basée sur l'analyse des ARNr 16S (Figure 5) (149).

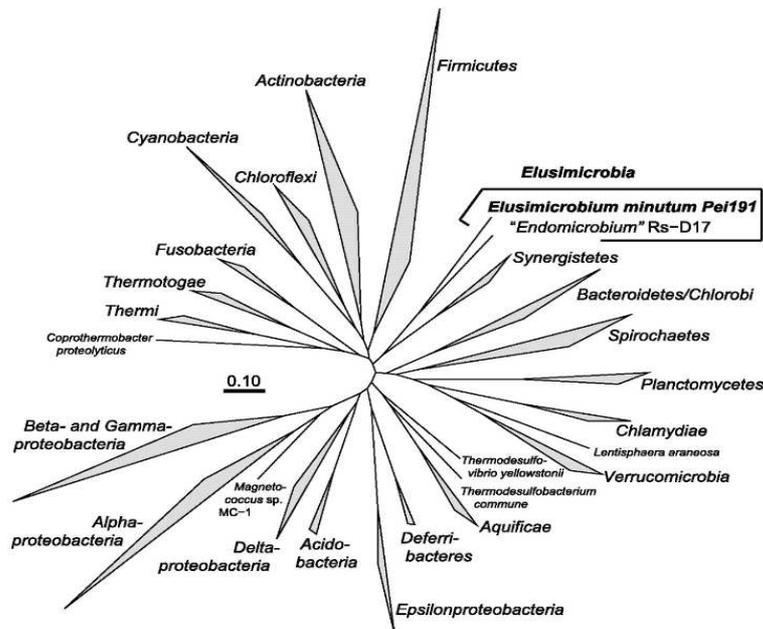


Figure 5. Arbre phylogénétique basé sur l'alignement de séquences concaténées de 22 gènes monocopies issus de 280 génomes bactériens.

Cet arbre concorde globalement avec l'arbre ARNr 16S de la Figure 4. Il a été généré par la méthode du maximum de vraisemblance. Les groupes monophylétiques sont représentés par les triangles (149).

En alternative aux ARNr, certains gènes codant pour des protéines conservées ont été proposés comme outils de phylogénie. Peuvent alors être utilisées la séquence nucléotidique ou la séquence peptidique. D'une façon générale, la séquence peptidique est préférée puisqu'elle permet d'éviter un certain nombre de biais inhérents au G+C% de l'organisme étudié ainsi qu'à la dégénérescence sur le troisième nucléotide du codon (135). Elle représente ainsi un outil plus discriminant pour analyser les relations entre organismes très proches. En général, l'utilisation de marqueurs phylogénétiques protéiques conforte les relations phylogénétiques établies sur la base de l'ADNr 16S (315). En effet, les arbres correspondent à ceux obtenus avec l'ADNr 16S, aussi bien du point de vue des principaux phyla que de la répartition des organismes dans les phyla respectifs et que de l'existence des divisions phylogénétiques de bas niveau. Wu et coll. (2008) ont récemment décrit un nouveau programme (AMPHORA) permettant de construire de grands arbres phylogénétiques à partir

d'alignements de séquences protéiques concaténées de gènes de ménage (373). Dans ce cadre, ils ont étudié les relations phylogénétiques des 578 espèces bactériennes ayant leur génome entièrement séquencé à l'automne 2008 en concaténant les séquences de 31 protéines différentes. L'arbre construit à partir de 310 de ces espèces (Figure 6) montre que la majeure partie des phyla définis précédemment par l'analyse de l'ADNr 16S sont bien séparés en groupes monophylétiques. Bien que les relations inter-phyla ne soient pas toujours supportées par de bonnes valeurs de bootstrap, les branchements de rangs inférieurs sont robustes.

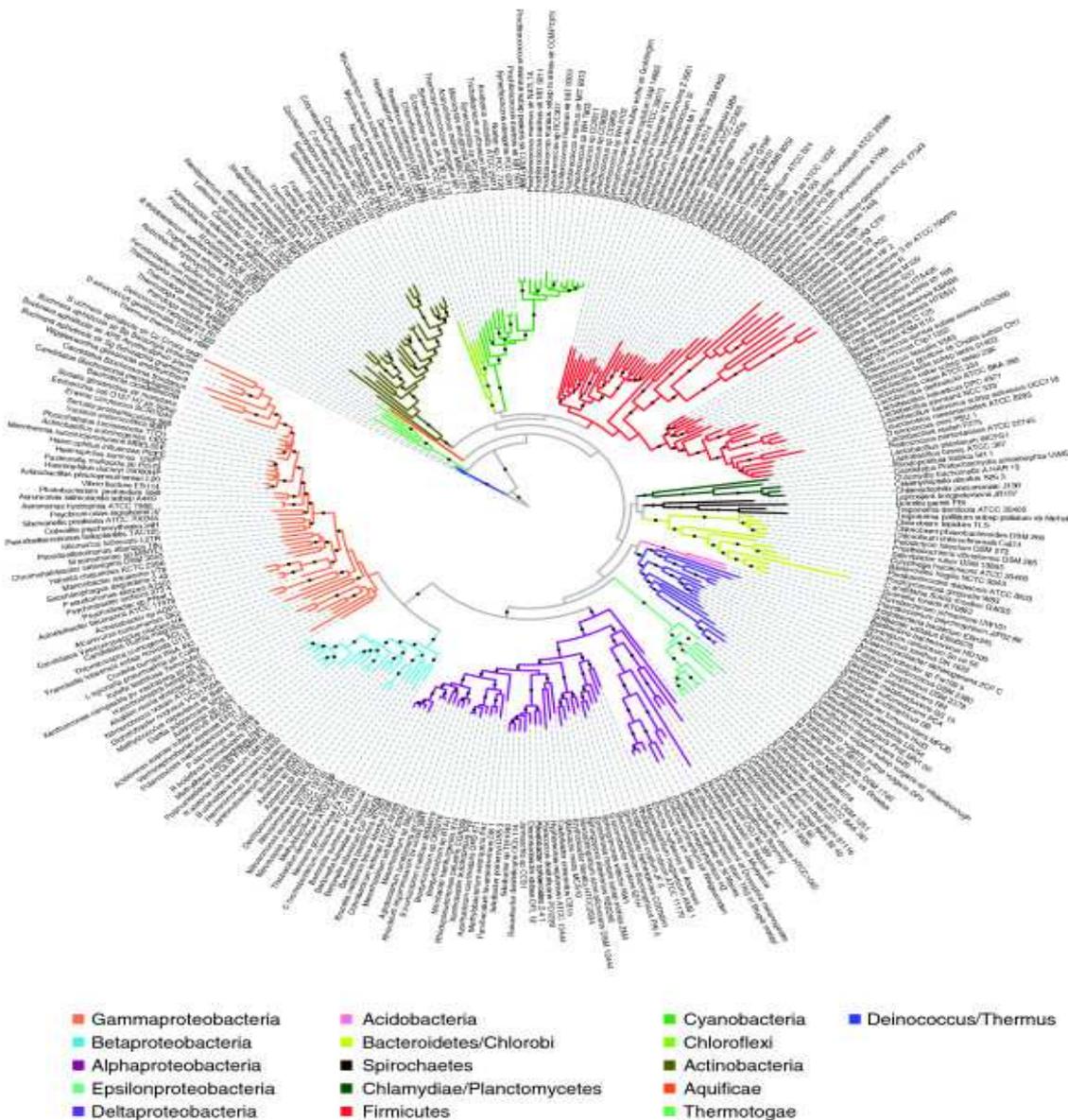


Figure 6. Arbre phylogénétique montrant les relations évolutives de 310 espèces bactériennes appartenant aux phyla majeurs (différenciés par des couleurs). Cet arbre a été généré par la méthode du maximum de vraisemblance (ML) à partir des séquences protéiques concaténées de 31 gènes de ménage. Les branches ayant des valeurs de bootstrap supérieures à 80 (pour 100 ré-échantillonnages effectués) sont indiquées par un point noir (373).

L'utilisation depuis quelques années d'une approche de métagénomique a entraîné une explosion de la description de nouveaux phyla. Cette approche consiste à analyser collectivement la séquence et la fonction des génomes de communautés microbiennes contenues dans un échantillon environnemental. Les acides nucléiques totaux de l'échantillon sont extraits et clonés sous forme de longs fragments dans des chromosomes artificiels bactériens ou séquencés directement par la technologie 'shotgun'. Actuellement, les nouvelles technologies de pyroséquençage permettent de s'affranchir de cette étape de clonage et d'obtenir rapidement des quantités énormes de séquences environnementales. Ces approches sont utilisées pour étudier les relations microbiennes au sein d'un écosystème. Elles permettent également de décrire la diversité phylogénétique en contribuant largement à la découverte de nouveaux taxons de rangs plus ou moins élevés (30).

A ce jour, plus d'une quarantaine de phyla ont été décrits dont seulement près de la moitié à partir de souches ayant été cultivées en laboratoire et le reste à partir de séquences environnementales n'ayant, à ce jour, jamais été cultivées (Figure 7) (149, 223, 292, 308).

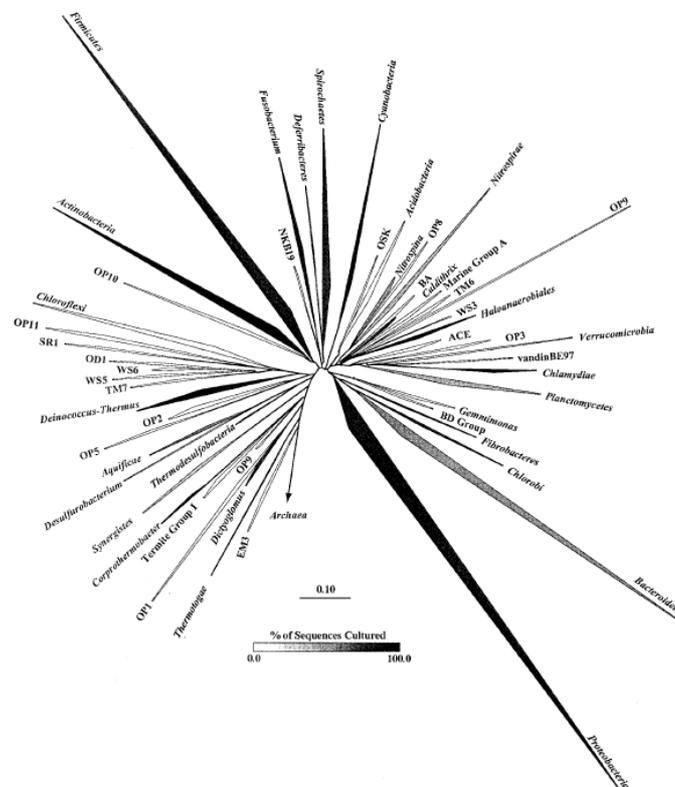


Figure 7. Arbre phylogénétique du domaine *Bacteria* montrant les phyla acceptés (*italique*) ainsi que les phyla "candidats" sans représentant cultivé. La largeur de la branche indique l'abondance des séquences dans chaque phylum. L'opacité de chaque branche correspond à la proportion de séquences issues de bactéries cultivées (292).

Un bon chronomètre moléculaire étant commun à l'ensemble des bactéries étudiées, il était intéressant de rechercher parmi les procaryotes quels seraient les gènes que l'on pourrait retrouver de façon systématique chez tous les individus. L'ensemble de ces gènes est défini par le terme de *core genome* ou de *minimal set*. L'avancée spectaculaire en terme de séquençage de génomes entiers permet de rechercher un nombre minimal de gènes présents chez toutes les bactéries qui pourraient être utilisés par la suite pour étudier de façon plus représentative les relations évolutives au sein du domaine *Bacteria* (33). Cependant, les premiers travaux sur différents groupes bactériens comme les streptocoques ou les cyanobactéries ont montré que le nombre de gènes constituant ce *core genome* était fonction du nombre et de la diversité des organismes comparés. Il faut donc de nombreuses études sur de nombreuses souches d'espèces diverses et variées pour arriver à déterminer ce *minimal set* tant recherché.

Bien qu'une approche basée sur plusieurs marqueurs ait montré son intérêt et soit actuellement recommandée en taxonomie, les résultats de métagénomique et les premières analyses comparatives à partir des *core genomes* semblent supporter les résultats de l'évolution bactérienne dérivés de l'analyse de l'ARNr 16S, surtout en ce qui concerne les taxons de haut rang (phyla, classes) (215, 216). Cette observation a mené au développement du projet « *All-Species Living Tree* » qui regroupe plusieurs grands taxonomistes actuels et le journal *Systematic and Applied Microbiology* (376). Le but de ce projet est de construire un arbre unique constitué des séquences d'ADNr 16S de toutes les souches types de l'ensemble des espèces des domaines *Bacteria* et *Archaea*. Cet arbre doit être réactualisé en ajoutant les nouvelles espèces validées tous les mois. La base de données mise à jour ainsi que l'arbre qui en résulte sont disponibles sur le site www.arb-silva.de/living-tree. La dernière mise à jour (octobre 2008!) faisait état de 10244 séquences dont 7006 issues de souches types (les 3238 restantes correspondent à des séquences supplémentaires de souches non type servant à stabiliser l'arbre).

3. Les marqueurs alternatifs à l'ARNr 16S pouvant être utilisés en phylogénie

Comme mentionné plus haut, les différents génomes totaux disponibles à ce jour montrent la présence d'un *core genome* constitué d'un petit nombre de gènes essentiels, apparemment

acquis verticalement (215). Ces gènes, appelés gènes de ménage, sont en général impliqués dans l'expression et la maintenance de l'information génétique au niveau de la transcription (ARN polymérase) ou de la traduction (ARN et protéines ribosomiques, facteurs d'initiation et d'élongation). Il s'agit également de molécules ayant un rôle dans les processus de conformation ou de réparation de l'ADN (topoisomérases, gyrases, recombinaison A), dans des processus énergétiques (ATPases, gènes de la glycolyse) ou dans des processus de gestion du stress (protéines de choc thermique ou HSP). Chaque gène ayant une vitesse d'évolution qui lui est propre, il faut également différencier les gènes dits "rapides", qui vont varier au sein d'une même espèce, des gènes dits "lents", qui sont très peu polymorphes, même au sein de taxons de haut rang. Des études ont montré que parmi ces marqueurs "universels", les ARNr, les ATPases, les HSP et le facteur d'élongation EF-Tu permettaient d'analyser les relations à des niveaux taxonomiques très hauts, en révélant des phénomènes évolutifs très anciens (5, 8, 16, 129, 216, 348). Les gènes "universels" de type *rpoA* ou *rpoB* (sous-unités alpha et bêta de l'ARN polymérase), *recA* (recombinaison A), *gyrB* (sous-unité B de l'ADN gyrase), *tpi* (triosephosphate isomérase), *ddl* (D-Alanine:D-Alanine ligase) ont été utilisés pour répondre à des questions phylogénétiques du niveau de la famille à celui de l'espèce, voire parfois d'un niveau inférieur à l'espèce (60, 88, 111, 180, 204, 236). Enfin, d'autres protéines plus spécifiques de certains groupes bactériens ont été utilisées pour étudier les relations phylogénétiques des membres de ces groupes. C'est le cas du gène de la superoxyde dismutase (*sodA*) ou du gène *spo0A* impliqué dans l'initiation de la sporulation (29, 253, 269). Ces deux derniers gènes ainsi que cinq autres vous sont rapidement présentés ci-dessous car ils ont été utilisés dans le cadre de ce travail.

- les protéines de choc thermique : elles sont impliquées dans l'assemblage des protéines pendant et après la traduction, quel que soit l'environnement thermique. Deux d'entre elles sont principalement utilisées comme marqueurs phylogénétiques. Il s'agit des Heat Shock Proteins HSP60 et HSP70 codées respectivement par les gènes *cpn60* et *dnaK*. Ces protéines sont retrouvées dans les trois domaines du vivant (8, 129, 348). Leurs séquences ont prouvé leur utilité pour définir les relations entre les grandes lignées bactériennes (8, 348). Les arbres phylogénétiques obtenus à partir de ces séquences recourent globalement les arbres basés sur les séquences d'ARNr 16S.
- la protéine RecA : elle est codée par le gène *recA* (environ 1600 pb). Cette protéine est l'un des facteurs essentiels mis en jeu lors du déclenchement de la réponse SOS qui permet aux bactéries de réparer leur ADN (88). Chez les protéobactéries, les résultats

obtenus sont cohérents avec ceux obtenus à l'époque avec les séquences d'ADNr 16S (121).

- La sous-unité bêta de l'ARN polymérase : associée à la sous-unité alpha (gène *rpoA*), elle est indispensable à l'intégrité de la structure de l'ARN polymérase. Elle est codée par le gène *rpoB* (≈ 4000 nucléotides), qui est hautement conservé dans les domaines *Archaea* et *Bacteria*. Les comparaisons des séquences ont permis de clarifier la taxonomie de certains groupes bactériens (22, 180, 236). De plus, les séquences partielles de *rpoB* permettent l'identification des bactéries et sont à la base du premier système d'identification bactérienne sur puce à ADN (124).
- la triosephosphate isomérase : codée par le gène *tpi*, cette enzyme est impliquée dans la glycolyse (25). Ce gène a été utilisé par l'équipe de Jean-Louis Pons à Rouen en tant que marqueur taxonomique alternatif à l'ADNr 16S. Cette équipe a montré chez 12 espèces de *Clostridium* que ce gène était phylogénétiquement en accord avec l'ADNr 16S (71) puis ils l'ont inclus dans un schéma de MLST (Multilocus Sequence Typing) qu'ils ont utilisé pour étudier les relations génétiques ainsi que la structure des populations chez *Clostridium difficile* (204).
- le facteur d'initiation de la sporulation : codé par le gène *spo0A*, ce facteur de transcription va initier la cascade enzymatique impliquée dans le processus complexe de la sporulation. Ce gène est présent à la fois chez les bactéries sporulées mais également chez certaines espèces ayant perdu cette capacité (29, 253). Son évolution a été étudiée au sein des deux grands groupes de bactéries sporulées, les *Clostridium* et les *Bacillus* (138).
- la superoxyde dismutase : c'est une métalloprotéine, codée par le gène *sodA*, qui catalyse la dismutation de l'ion superoxyde en O_2 et H_2O_2 , jouant un rôle essentiel dans la défense contre les radicaux libres. Son gène est présent chez les bactéries aérobies (sauf certains lactobacilles) mais également chez certains genres anaérobies. Il a été utilisé pour étudier les relations évolutives notamment des cocci à Gram positif ainsi que de certains *Clostridium* spp. (204, 269).

Dans une étude phylogénétique, le choix des gènes de ménage testés est fondamental afin de répondre au mieux à la question évolutive posée. En effet, de nombreux gènes bactériens sont actuellement connus mais la plupart d'entre eux ne sont présents que chez un nombre limité de souches et certains de ces gènes évoluent beaucoup trop vite pour être utilisés dans des études phylogénétiques. Par ailleurs, selon leur rôle dans la cellule (réplication, transcription,

traduction ou métabolisme), ils vont donner des informations de niveaux taxonomiques différents. De plus, les difficultés pour cloner la plupart des gènes de ménage de diverses espèces (absence d'amorces réellement universelles) font que l'ADNr 16S reste le marqueur de référence (373). Enfin, ces marqueurs ne doivent pas être influencés par des facteurs environnementaux et être le moins possible sujets à des transferts latéraux.

4. Approches phylogénétiques intégrées

Certains auteurs ont choisi d'intégrer à l'approche phylogénétique classique des marqueurs supplémentaires de l'évolution afin de prendre en compte de façon plus globale les échanges et interactions entre les microorganismes. Il s'agit essentiellement de l'utilisation de séquences protéiques signatures ou de l'utilisation de caractères essentiels comme la présence ou le type de paroi.

a) Notion de séquences signatures

Les séquences protéiques présentées ci-dessus peuvent servir de base à la construction d'arbres phylogénétiques reflétant les relations évolutives entre les bactéries étudiées en se basant sur la divergence de ces séquences. Toutefois, elles permettent également la réalisation d'études phylogénétiques par recherche de séquences dites signatures (134). Ces séquences signatures sont des régions dans l'alignement des séquences où intervient un changement spécifique dans la structure primaire de la protéine de tous les membres d'un ou plusieurs taxons et non dans les autres taxons. Dans tous les cas, la séquence signature doit être flanquée par des régions conservées dans toutes les séquences considérées. Ces régions conservées servent d'ancrage pour s'assurer que la signature observée n'est pas un artefact dû à un mauvais alignement des séquences ou à des erreurs de séquences. Elles ont récemment été proposées comme marqueurs phylogénétiques par Gupta, se basant sur le principe suivant : l'hypothèse la plus vraisemblable pour expliquer l'observation d'une même séquence signature chez plusieurs bactéries est que cette séquence a été acquise par une souche qui l'a secondairement transmise à toute sa descendance. On peut ainsi distinguer les groupes bactériens contenant la séquence signature étudiée des groupes ne la possédant pas. En terme d'évolution bactérienne, toutes les espèces descendant de l'ancêtre commun ayant acquis la

séquence signature la posséderont; à l'inverse, les espèces existant avant cet événement ne posséderont pas la séquence signature considérée. Ces travaux ont permis de montrer sur 60 génomes entiers que les résultats obtenus concordaient avec la phylogénie basée sur l'ARNr 16S (137). Le traçage des séquences signatures permet de mettre en évidence plus facilement des phénomènes d'HGT. Ces signatures étant spécifiques d'un groupe donné, leur présence dans un autre groupe signe directement un événement d'HGT. En se basant sur la séquence protéique entière, le signal phylogénétique peut être brouillé par des régions moins spécifiques que la région signature et donc rendre la détection de transferts latéraux moins évidente.

b) Phylogénie de gène / phylogénie d'organisme

Depuis les années 1980, de nombreux travaux réalisés par Tom Cavalier-Smith remettent en question la classification phylogénétique du vivant en trois domaines. Ces travaux ont été synthétisés dans une proposition pour une nouvelle classification publiée dans l'*International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (IJSEM) (42). La base théorique des travaux de Cavalier-Smith est une vision globale de l'être vivant ne se limitant pas à une simple accumulation de séquences géniques. Ainsi, on ne pourra comprendre l'évolution du vivant sans élucider l'évolution de l'organisation et de la reproduction cellulaire en plus de l'évolution des molécules elles-mêmes. L'intégration de données morphologiques, paléontologiques et moléculaires a conduit au regroupement de tous les procaryotes dans un seul règne, *Bacteria* contenant deux sous-règnes, *Negibacteria* (les bactéries avec deux membranes ou bactéries à Gram négatif) et *Unibacteria* (les bactéries avec une seule membrane ou bactéries à Gram positif et archées). *Negibacteria* serait le taxon le plus ancestral à partir duquel les *Unibacteria* auraient émergé conduisant à l'individualisation tardive de la branche eucaryote à partir des archaebactéries. Les archées et les eucaryotes forment ainsi un groupe d'apparition récente nommé *Neomura*. L'ensemble des cellules procaryotes et eucaryotes ne possédant qu'une membrane est regroupé sous le nom d'*Unimembrana*. Cette hypothèse d'évolution contredit les arbres basés uniquement sur des données moléculaires. Elle s'oppose aussi à la théorie d'évolution proposée par Gupta (134), basée sur l'analyse de signatures protéiques, qui place les bactéries à Gram positif et les archaebactéries en position ancestrale alors que les bactéries à Gram négatif, en particulier les protéobactéries, formeraient un groupe d'apparition récente (Figure 8).

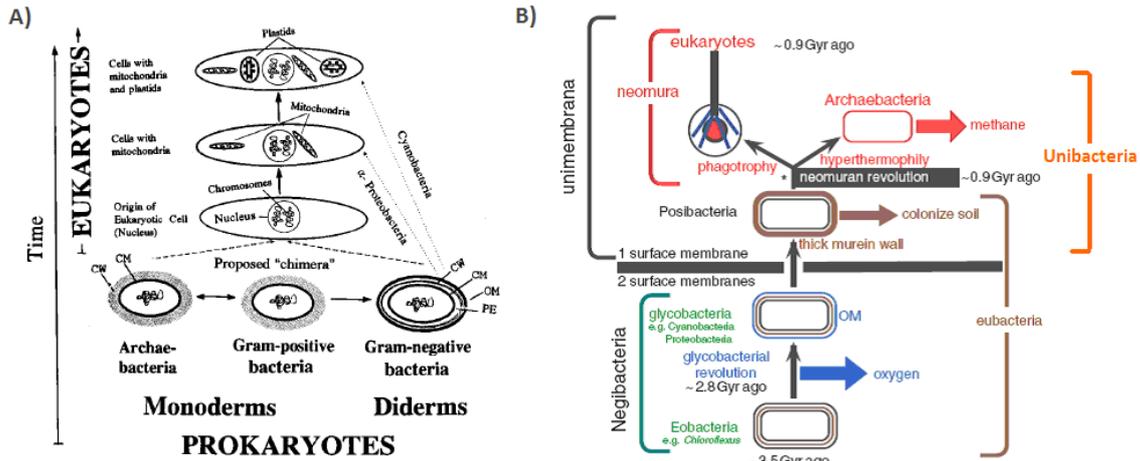


Figure 8. Relations évolutives parmi les êtres vivants se basant sur les caractéristiques structurales des organismes selon l'approche de R.S. Gupta basée sur l'analyse de signatures protéiques (A) (134) ou selon l'approche de T. Cavalier-Smith basée sur les évolutions majeures en terme de structure cellulaire (B) (41).

Les deux auteurs séparent les cellules possédant une seule membrane (monodermes ou *Unibacteria*) de celles en possédant deux, c'est à dire avec une membrane externe (didermes ou *Negibacteria*).

Récemment, Rivera & Lake ont proposé une nouvelle vision des évènements évolutifs à l'origine de l'organisation actuelle du monde vivant, en utilisant une approche génomique (282). Chaque génome étudié a été comparé aux autres sur la base de la présence ou de l'absence d'un gène. Le génome a donc été considéré comme une séquence génique et chaque gène traité comme un caractère phylogénétique. Cette approche allie donc la phylogénie sur alignement de séquences et la présence/absence de gènes signatures. Les échanges génétiques parfois associés à des évènements de fusion d'organismes (*Bacteria/Archaeae* à l'origine d'*Eucarya*) sont tels que les auteurs ont proposé de remplacer la représentation sous forme d'arbre par une représentation sous forme de cercle, dite du "Ring of Life", pour symboliser les relations phylogénétiques entre les trois domaines (Figure 9).

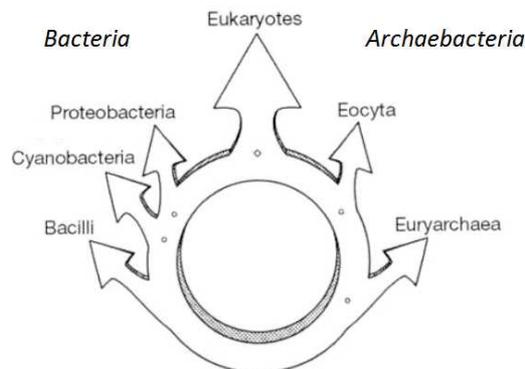


Figure 9. L'Anneau de Vie selon Rivera & Lake (282).

Il montre que les eucaryotes sont le produit de la fusion entre une eubactérie et une archée. Les ancêtres définissant des groupes majeurs sont indiqués par de petits cercles sur l'anneau.

5. L'évolution des bactéries est-elle une arborescence : prise en compte des transferts latéraux

Bien avant l'ère génomique, les microbiologistes avaient déjà mis en évidence la capacité qu'ont les bactéries d'échanger du matériel génétique via le phénomène d'HGT ou transfert latéral. En effet, ces organismes possèdent dans leur génome de nombreux types d'éléments mobiles facilitant ces échanges tels les transposons, les séquences d'insertion ou les intégrons. Plusieurs mécanismes moléculaires ont été mis en évidence comme l'échange de plasmides par conjugaison, la transduction par l'intermédiaire d'un bactériophage ou la transformation. Jusqu'à récemment, ce phénomène n'était pas considéré comme impactant l'évolution bactérienne. Cependant, l'analyse des génomes complets a montré que chez certaines bactéries, une importante partie du génome a été acquise par HGT et non par transfert vertical (185). Ces échanges génétiques peuvent être visualisés par l'utilisation de différentes techniques telles que la génomique comparée, l'électrophorèse en champ pulsé (ECP), les études de population ou la phylogénomique. Associées à l'accroissement des bases de données génétiques, ces techniques ont permis de montrer que ces transferts latéraux semblaient ubiquitaires dans le monde bactérien. Il n'y a en effet que très peu voire aucun groupe de gènes orthologues dont l'évolution est dépourvue d'HGT (128). De tels échanges génétiques ont bien entendu des rôles importants dans la transmission de gènes de virulence ou de résistance aux antibiotiques et ils doivent donc être pris en compte dans les analyses phylogénétiques.

Comme décrit précédemment, le modèle classique de représentation de l'évolution des espèces ou des gènes, est l'arbre phylogénétique. Celui-ci s'avère insuffisant pour représenter les transferts horizontaux de gènes, les recombinaisons ou les hybridations. Ces échanges génétiques créent des irrégularités dans les phylogénies: deux gènes d'une même espèce n'auront pas la même provenance, et auront donc un arbre phylogénétique différent. De plus, la phylogénie d'un groupe d'espèces ne sera pas la même que la phylogénie d'un gène chez ces espèces. Il est actuellement possible de représenter ces deux phylogénies sur un même graphe en utilisant un réseau phylogénétique qui prendra en compte les éventuels HGT (114, 159). Par exemple, les données de séquences de différents gènes peuvent être traitées par le logiciel SplitsTree (<http://www.splitstree.org/>) qui permet de visualiser les phénomènes biologiques de recombinaison sous la forme de réseaux réticulés ou de splitsgraphs (Figure 10).

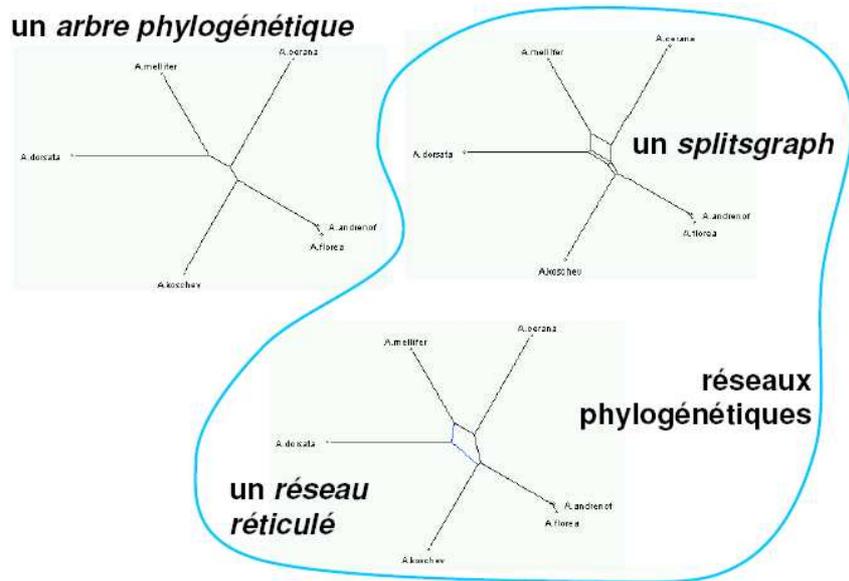


Figure 10. Visualisation des échanges génétiques en utilisant des réseaux phylogénétiques (splitsgraph ou réseau réticulé) entre différentes espèces d'abeilles.

D'après Philippe Gambette (<http://philippe.gambette.free.fr/Tuebingen/PresentationCachan.pdf>).

En phylogénie bactérienne, la construction de réseaux phylogénétiques tenant compte de tous les événements d'HGT donne lieu à des représentations d'interprétation difficile, s'apparentant plus à des "buissons" qu'à des arbres (Figure 11) (57, 191). Dagan et coll. (2008) proposent des "buissons" pour lesquels l'extrémité des branches se retrouvent sur un plan horizontal, montrant bien que chaque être vivant actuel présente le même niveau d'évolution (57).

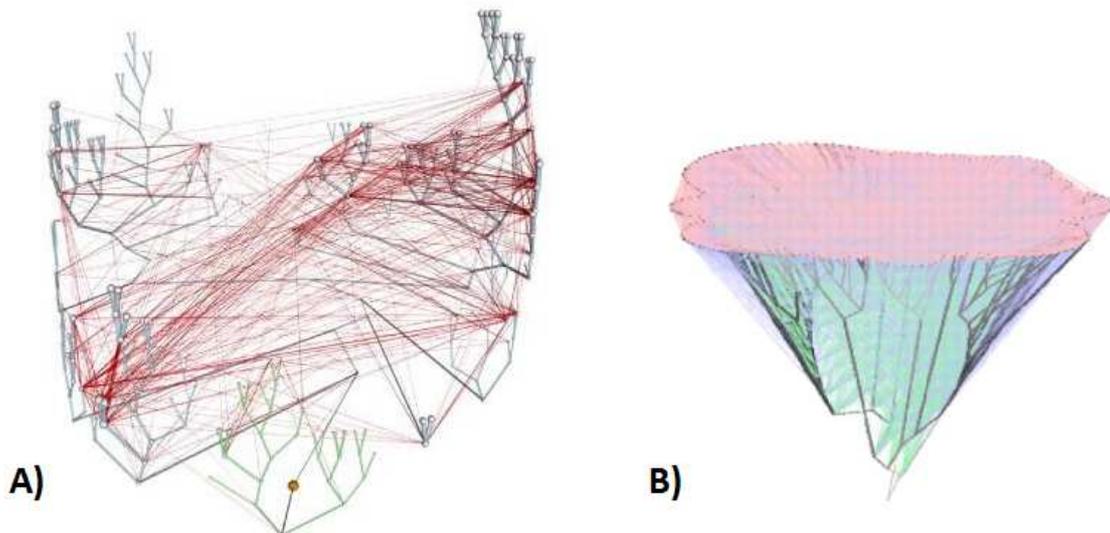


Figure 11. Représentation en trois dimensions du réseau de vie selon Kunin et coll. (2005) (A) (191) ou selon Dagan et coll. (2008) (B) (57).

Les transferts latéraux sont représentés par les lignes rouges (A) ou bleues ciel (B). La surface délimitée en rose (A) correspond à l'ensemble des êtres vivants actuels.

La complexité de ces "buissons phylogénétiques" pousse à affiner nos représentations pour tenir compte des HGT sans pour autant obtenir des schèmes inintelligibles. Les méthodes phylogénétiques et graphiques telles que le Ring of Life proposé par Rivera & Lake (Figure 9) vont dans ce sens.

III. L'UNITE TAXONOMIQUE DE BASE : LA NOTION D'ESPECE BACTERIENNE

L'espèce représente l'unité de base de la classification du vivant. Concept scientifique, c'est aussi une production naturelle de l'esprit humain. L'espèce biologique se confond avec nos propres catégories intuitives de pensée. De ce fait, la définition de l'espèce reste un sujet de débat épistémologique (205). La notion d'espèce évolue et de nombreuses définitions ont été successivement publiées par les plus grands auteurs philosophes ou scientifiques : Platon, Aristote, Buffon, Lamarck, Darwin... C'est au XVIII^{ème} siècle que Buffon élabore un concept de l'espèce à partir de la descendance et de l'interfécondité. Cette définition a été précisée par Ernst Mayr dans les années 1930 : « Une espèce est une communauté reproductrice de populations, isolée des autres communautés (les membres de la communauté ne se reproduisent pas avec les membres des autres communautés) et occupant une niche particulière dans la nature » (227). Aujourd'hui, les mots clé de la définition d'une espèce découlent des définitions précédentes et sont : ressemblance, descendance (les enfants sont de la même espèce que les parents) et fécondation. De ces éléments, la fécondation est le seul critère précis et dichotomique : il y a possibilité de fécondation ou non. Le concept d'espèce, bien que discuté, reste donc d'un maniement assez simple en ce qui concerne les êtres vivants sexués.

Cette définition n'est cependant pas applicable aux êtres vivants non sexués, en particulier aux bactéries. Prévot, en 1933, exprimait déjà l'opinion selon laquelle l'espèce bactérienne n'a rien de commun avec l'espèce botanique, puisque privée des caractères de l'hérédité biparentale. Il proposa alors sa définition de l'espèce comme un « ensemble de clones identiques entre eux, définis par leur morphologie, leur physiologie, leurs propriétés biochimiques et pathogéniques, en bref, une mosaïque d'enzymes et d'antigènes, tronçon d'évolution mesurable à partir du moment où on l'isole, jusqu'au moment où elle commence à

donner des mutants ». Il conclut que l'espèce n'a pas d'existence réelle mais qu'elle est plutôt l'idée abstraite que nous nous faisons d'une catégorie d'organismes (272). Cette idée abstraite doit toutefois structurer notre réflexion scientifique et permettre le développement des sciences microbiologiques appliquées à la médecine, l'agro-alimentaire, l'industrie, etc...

L'espèce bactérienne ne répondant à aucun critère dichotomique de définition comme la fécondation, les taxonomistes ont dû fixer des seuils permettant de chiffrer un niveau de ressemblance entre les membres d'une même espèce. L'application des méthodes d'hybridation moléculaire a alors permis de donner une définition génomique de l'espèce bactérienne prenant en compte le taux d'homologie et la stabilité thermique des hybrides obtenus entre les ADN de deux isolats bactériens. Des isolats appartenant à une même espèce sont caractérisés par des homologies au niveau de leur ADN se traduisant par des pourcentages d'hybridation supérieurs ou égaux à 70% et une stabilité des hybrides formés inférieure à 5°C (187, 344, 355). Cette définition est toujours reconnue par les comités internationaux de taxonomie bactérienne.

Le développement du séquençage de l'ADN a ensuite conduit à la détermination d'un seuil permettant de définir l'espèce sur la base de la similarité de séquences géniques, en se basant initialement sur le gène de l'ARNr 16S. Différents auteurs ont alors comparé les résultats obtenus par cette technique à ceux obtenus par hybridation ADN-ADN (Figure 12) (179, 317).

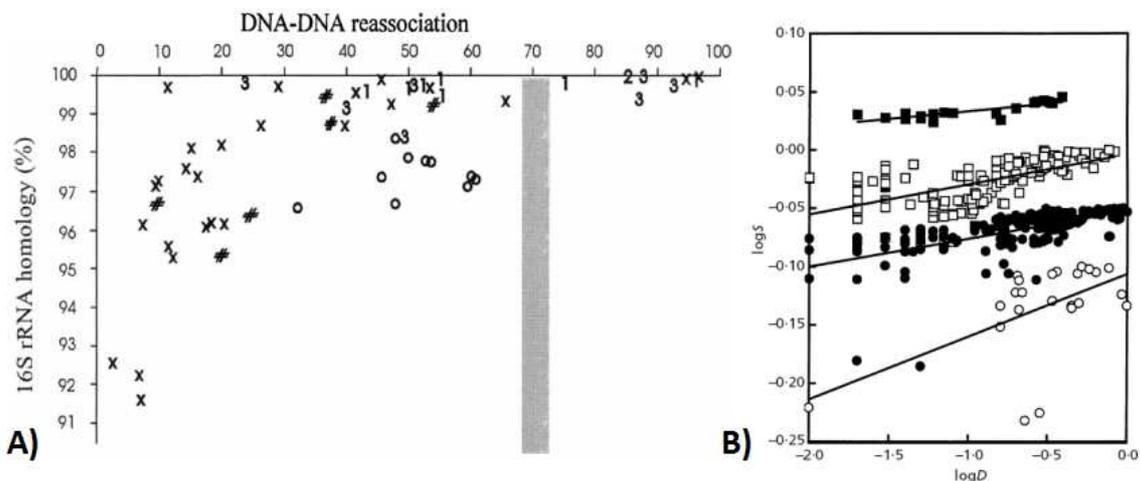


Figure 12. Comparaison entre l'homologie de séquences d'ADNr 16S (S) et le taux d'hybridation ADN-ADN (D) selon Stackebrandt et coll. (A) (317) ou Keswani et coll. (B) (179).

A) Méthodes des filtres (x), de renaturation thermique (#, 1, 2, 3) ou de la nucléase S1 (O). B) Méthodes des filtres (O), de renaturation thermique (□), à l'hydroxyapatite (■) ou de la nucléase S1 (●).

Stackebrandt et coll. (1994) ayant montré qu'en général, des souches ayant plus de 3% de divergence au niveau de leur ADNr 16S montrent moins de 70% de ré-association ADN/ADN, un seuil de 97% de similarité a d'abord été retenu (317). Néanmoins, il est important de noter que l'inverse n'est pas vrai, puisque certains membres d'une même espèce possèdent des séquences très proches, voire identiques (30). Par ailleurs, ces travaux n'ont été effectués que sur un certain nombre de genres bactériens et ce seuil n'est pas applicable à toutes les espèces. Depuis, des propositions non définitivement validées ont été faites pour élever le seuil de similarité à 99% (179). Certains auteurs quant à eux ont préféré remplacer la notion d'espèce par le terme d'UTO, désignant des Unités Taxonomiques Opérationnelles (OTU en anglais) du niveau de l'espèce définies sur la base des séquences nucléiques (30, 67).

La taxonomie, et plus particulièrement la définition d'espèce, imposent une affectation stable dans un taxon, étant ainsi difficilement conciliables avec les connaissances actuelles de l'évolution et de la dynamique des populations bactériennes. Pourtant, la systématique phylogénétique ou phylotaxonomie s'est peu à peu imposée et, actuellement, toute description de nouvelle espèce s'accompagne de la reconstruction d'une phylogénie. En phylotaxonomie, l'espèce bactérienne est définie comme un ensemble d'isolats issus d'une population ancêtre commune (un clade) soumise à diversification génétique. Cette définition cladistique ne fixe pas le niveau de branchement de l'ancêtre commun d'un clade correspondant à une espèce. Un seuil de similarité entre les séquences utilisées pour reconstruire la phylogénie est à nouveau nécessaire à la définition de l'espèce.

Comme décrit précédemment, si elle n'est basée que sur une phylogénie monolocus, cette approche phylotaxonomique se heurte aux phénomènes de recombinaisons génétiques. L'ADNr 16S est actuellement le gène le plus utilisé pour établir des parentés entre espèces à des fins taxonomiques ou de définition d'espèce. Cette utilisation présuppose sa transmission de façon uniquement verticale (31). Les phénomènes de transferts latéraux de ce gène (343) et l'hétérogénéité entre les opérons *rrn* (224) vont brouiller l'information évolutive, montrant que les espèces bactériennes ne sont pas génétiquement isolées, y compris pour des gènes supposés indispensables à l'intégrité de l'espèce. Afin de répondre, du moins en partie, à ce problème, un nouveau concept d'espèce phylogénomique est en train de voir le jour (319). Il consiste en une approche phylogénétique basée sur les séquences de différents marqueurs (cinq à huit gènes selon le groupe bactérien étudié), issues des données de génomiques, et qui vont être étudiées séparément, en tandem ou sous forme concaténée. Cette MLSA (Multilocus

Sequence Analysis) a été proposée afin d'analyser l'existence éventuelle de frontières nettes entre les espèces (30). Elle permet d'obtenir des informations tant au niveau de l'ADN que de l'organisation génomique des bactéries, et elle peut permettre de visualiser des phénomènes d'HGT. Par exemple, elle a permis de distinguer les espèces *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pseudopneumoniae*, *Streptococcus mitis* et *Streptococcus oralis* qui sont très difficilement différenciables, d'une part d'un point de vue phénotypique, et d'autre part en utilisant l'ADNr 16S seul (319). L'application croissante de cette nouvelle approche taxonomique suggère que des groupes nettement démarqués phylogénétiquement, et correspondant en général assez bien à la définition actuelle de l'espèce bactérienne, existent bel et bien (30).

Le séquençage de l'ADN étant aujourd'hui génomique, d'autres auteurs se sont appliqués à définir les espèces bactériennes sur la base de leur séquence génomique. Un concept de génome d'espèce est alors proposé par Lan & Reeves qui distinguent le *core genome*, constitué de gènes dits cardinaux qui sont présents dans plus de 95% des souches d'organismes donnés, et les gènes auxiliaires qui sont présents chez 1 à 95% de ces souches (192). Les génomes évoluant le plus rapidement vont varier au niveau de leurs gènes auxiliaires alors que les gènes cardinaux, probablement indispensables au maintien d'une espèce particulière, restent stables. L'exemple du séquençage de 17 souches d'*Escherichia coli* montre que le *core genome* de cette espèce contient 2 200 gènes, soit 50% du génome moyen d'*E. coli*. Le *pangenome*, c'est à dire le répertoire de tous les gènes retrouvés dans cette espèce, s'étend à 13 000 gènes (277). L'utilisation taxonomique du génome d'espèce peut se faire de deux façons : soit l'espèce est définie par le génome cardinal, soit l'espèce est définie par le *pangenome*. Le *pangenome* considéré comme un pool de gènes communs et/ou échangeables par HGT au sein de l'espèce permettrait de se rapprocher de la définition "sexuelle" de l'espèce.

Par ailleurs, l'écologie est également une notion importante à prendre en compte pour définir une espèce. Chez les eucaryotes supérieurs, l'espèce est un groupe d'organismes dont la divergence évolutive est limitée par une force de cohésion constituée à la fois par la sexualité et par la notion de niche écologique. Cette définition correspond en fait à la notion d'écotype dans le monde bactérien : une population d'organismes occupant la même niche écologique, toute divergence étant éliminée par la sélection naturelle (48). Dans le cas des bactéries à génome dynamique, chaque écotype présentera une organisation génomique et donc un contenu génétique particulier. L'exemple des remaniements taxonomiques du genre *Brucella*

est à ce titre particulièrement informatif. Tous les critères de similarité génotypique indiquaient que ce genre était mono-spécifique (345) et les six espèces classiques de brucelles ont été abaissées au rang taxonomique de sous-espèces ou biovars appartenant tous à l'espèce *Brucella melitensis*, seule espèce validée du genre (355). Or chacune des anciennes espèces ou sous-espèces actuelles possède une organisation génomique particulière et stable entre isolat, associée à une niche écologique représentée par un hôte mammifère préférentiel (233, 234). L'ancienne classification en six espèces était donc particulièrement cohérente, excepté qu'elle ne respectait pas les seuils de similarité génétique arbitrairement fixés. Elle correspondait en fait à la notion d'écotype, proche de la notion d'espèce eucaryote (329).

Enfin, d'autres auteurs, en général chercheurs en phylogénie théorique, pensent quant à eux que l'espèce n'existe pas chez les bactéries et que le concept d'espèce nuit à notre réflexion (80). Quelle que soit la pertinence du concept d'espèce bactérienne, il est nécessaire d'arriver à un consensus pour une meilleure définition, tout du moins une définition appliquée à nos besoins en matière de connaissance de la biodiversité bactérienne et d'identification.

IV. LA TAXONOMIE BACTERIENNE

1. Intérêt d'une taxonomie bactérienne

La taxonomie bactérienne a pour but d'établir des groupes de bactéries présentant des caractères communs, les taxons, auxquels elle va attribuer un nom. Son application principale est l'identification qui consiste à étudier les caractères d'un organisme afin de pouvoir le placer dans un taxon préalablement décrit ou dans un nouveau taxon (320). Il n'existe pas de classification officielle des procaryotes, d'une part parce que la taxonomie poursuit des buts pratiques et, selon l'application voulue, plusieurs classifications peuvent coexister. Par exemple, pour des raisons pratiques et/ou didactiques, les bactéries d'intérêt médical ou vétérinaire peuvent être classées selon leurs caractères phénotypiques or cette classification est différente de celle adoptée par la deuxième édition du *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (320) mais elle ne peut être considérée comme fautive ou désuète; elle a simplement un objectif qui n'est pas celui du *Bergey's Manual*. D'autre part, la taxonomie

étant une science dynamique en perpétuel bouleversement, elle est sujette à de nombreux changements en fonction des données disponibles et elle va suivre l'évolution des techniques d'identification bactérienne (215). De plus, les opinions des bactériologistes sont divergentes. Enfin, l'absence de définition précise des rangs hiérarchiques est un obstacle majeur à une taxonomie universelle. Il faut également se rappeler que nous ne connaissons encore qu'un faible pourcentage des espèces bactériennes existantes. Il n'y aura donc jamais de classification définitive (344).

Les premiers essais de classification des microorganismes remontent aux travaux de Muller en 1773 qui les répartissaient en deux groupes différents : *Vibrio* et *Monas* sur des critères de mobilité. Par la suite, l'invention de la coloration de Gram en 1883 a permis de diviser le monde bactérien en bactéries à Gram négatif et bactéries à Gram positif. A ses débuts, la taxonomie bactérienne suivait les règles édictées pour la classification des organismes supérieurs (végétaux et animaux), en s'appuyant sur l'étude du phénotype exprimé et sur les variations morphologiques existant entre les bactéries. Progressivement, il a été reconnu que la classification bactérienne devait également refléter le plus fidèlement possible les relations naturelles entre les bactéries car ces dernières présentent des relations de parenté ou de phylogénie. Ces relations phylogénétiques entre les espèces ont été difficiles à appréhender mais, comme décrit dans les paragraphes précédents, les progrès de la biologie moléculaire ont permis d'estimer l'évolution bactérienne à l'aide de marqueurs qualifiés "d'horloges moléculaires universelles".

Après avoir présenté les différents caractères (phénotypiques, génomiques, génétiques et phylogénétiques) pouvant être utilisés pour la classification des bactéries, nous présenterons l'intérêt d'utiliser une approche mixte et consensuelle associant une compilation de ces caractères pour une classification et une nomenclature bactérienne fiables.

2. Caractères utilisés pour la classification des bactéries

Certaines des méthodes décrites ci-dessous sont classiquement utilisées en taxonomie bactérienne parce qu'elles sont considérées comme des méthodes de référence (hybridation ADN-ADN, détermination du G+C%, séquençage du gène de l'ARNr 16S) et/ou parce qu'elles sont aisées à mettre en place. D'autres sont beaucoup moins utilisées, soit de par leur

lourdeur et/ou leur coût (analyse des esters méthylés d'acides gras, composition du peptidoglycane, ...), soit parce qu'elles ne sont applicables qu'à certains groupes bactériens (détermination des métabolites terminaux ou des profils protéiques, ...), soit parce qu'il s'agit de techniques nouvelles et/ou mal connues de l'ensemble de la communauté scientifique (spectrométrie de masse, détermination du squelette *rrn*, séquençage de nouveaux gènes de ménages, ...).

Chacune de ces méthodes apportera des informations particulières applicables à des niveaux taxonomiques variables. La Figure 13 montre le niveau d'information taxonomique de certaines techniques. Selon les groupes étudiés, le pouvoir discriminant de chaque technique peut se déplacer vers la gauche ou la droite.

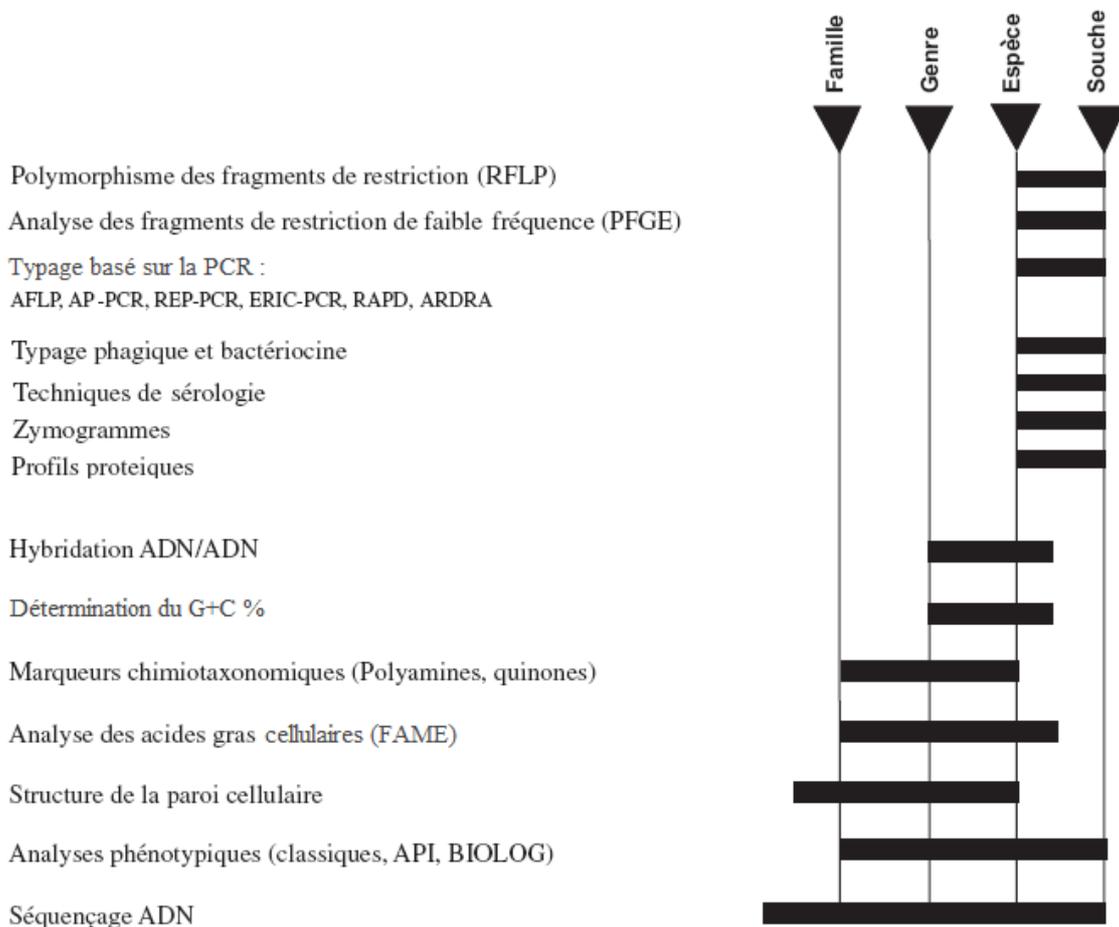


Figure 13. Pouvoir discriminant de certaines techniques pouvant être utilisées dans une approche taxonomique mixte et consensuelle.

Adapté de Zakhia et coll. (2006) et de Vandamme et coll. (1996) (344, 377).

RFLP, restriction fragment length polymorphism ; PFGE, pulsed-field gel electrophoresis ; AFLP, amplified fragment length polymorphism ; AP-PCR, arbitrarily primed PCR ; REP-PCR, repetitive extragenic palindrome PCR ; ERIC-PCR, enterobacterial repetitive intragenic consensus PCR ; RAPD, randomly amplified polymorphic DNA ; ARDRA, amplified rDNA restriction analysis ; MLEE, multilocus enzyme electrophoresis ; FAME, fatty acid methyl ester.

Les techniques de typage basées sur la PCR (génomotypie) ne seront pas traitées dans les chapitres suivants car, apportant des réponses à un niveau inférieur à l'espèce, elles ne sont généralement pas utilisées en taxonomie. Cependant, dans certains cas, elles peuvent permettre d'accéder à des rangs taxonomiques supérieurs comme, par exemple, dans le cadre de la différenciation des espèces du genre *Brucella* par une technique de RAPD (157). Les approches multilocus de type MLST sont de plus en plus utilisées pour l'identification de clades du niveau de l'espèce.

a) Méthodes phénotypiques

Les méthodes phénotypiques comprennent toutes les techniques ne faisant pas appel aux acides nucléiques et reposant sur la détermination de caractéristiques morphologiques, physiologiques et biochimiques des bactéries via des techniques standardisées. Les tests sont basés soit sur les critères classiques ou traditionnels utilisés dans les schémas d'identification pratiqués dans la plupart des laboratoires de microbiologie, soit sur des tests spécialisés réservés à certains laboratoires (64).

i- Caractères présomptifs d'orientation

L'aspect des colonies observées sur la boîte de culture permet dans certains cas d'orienter l'identification vers un groupe de bactéries. La taille, la forme, la couleur (opaque, translucide, pigmentée...), l'état de la surface (lisse ou rugueuse), l'odeur éventuelle ainsi que la présence et le type d'hémolyse sur gélose au sang constituent des critères orientatifs d'identification.

L'examen microscopique fournit les renseignements concernant la morphologie des bactéries (cocci, bacilles, spirales, à bords parallèles ou non, à extrémités arrondies ou effilées ...) ainsi que leur taille. Un examen à l'état frais entre lame et lamelle indiquera la présence et le type de mobilité. La coloration de Gram ou de Ziehl-Neelsen permettra de les classer en bactéries à Gram positif ou à Gram négatif ou acido-alcolorésistantes ainsi que d'observer des arrangements particuliers (diplocoques, palissades, chaînettes, cordes...), la présence ou non de flagelles, et la localisation d'une éventuelle endospore.

ii- Caractères physiologiques

L'identification bactérienne repose sur la détermination des sources de carbone, d'énergie et d'azote, les profils d'oxydation ou de fermentation des substrats carbonés (oxydatif ou fermentatif), l'utilisation des acides organiques, la production d'enzymes diverses et/ou de gaz, la sensibilité à certains inhibiteurs métaboliques ou aux antibiotiques, les conditions de croissance, les exigences en CO₂...

Certains critères sont plus facilement et rapidement accessibles que d'autres comme par exemple la recherche d'une catalase ou d'une oxydase sur une culture ainsi que la mise en évidence de l'utilisation de divers sucres ou substrats ou du métabolisme respiratoire en utilisant des milieux appropriés. Devant l'ampleur des caractères à étudier, des systèmes miniaturisés et/ou automatisés contenant une batterie de réactifs déshydratés ont été commercialisés afin de permettre la réalisation simultanée de différents tests phénotypiques (notamment l'étude des fermentations glucidiques et du contenu enzymatique). L'addition d'un inoculum bactérien standardisé déclenche les différentes réactions et permet l'obtention d'un profil qui pourra être comparé aux bases de données afin de rechercher l'espèce la plus proche.

iii- Détermination des métabolites terminaux

Chez les bactéries anaérobies, les produits résultant des différentes voies métaboliques (oxydo-réduction, décarboxylation, désamination) sont des alcools, des acides volatiles, des acides aromatiques, des diacides ... Selon les espèces, ces métabolites varient qualitativement et quantitativement. L'identification et le dosage des produits terminaux du métabolisme par chromatographie en phase gazeuse (CPG) dans des conditions parfaitement standardisées permettent l'obtention de profils qui reflèteront une espèce bactérienne par comparaison aux bases de données. A un profil métabolique donné va correspondre un genre ou une espèce (Figure 14) (167).

Ne possédant pas de groupements actifs (OH, CO), les acides à courtes chaînes sont suffisamment volatils pour être directement analysés après extraction par un solvant. Les autres (acides pyruvique, lactique, succinique, phénylacétique...) doivent être dérivés en composés plus volatils. La méthode la plus courante consiste à estérifier les acides organiques en incubant directement le milieu de culture en présence de méthanol-HCl ou de méthanol-

H₂SO₄, puis d'extraire par un solvant. Les difficultés techniques et la nécessité d'une base de données importante limitent l'utilisation de cette technique à des laboratoires spécialisés.

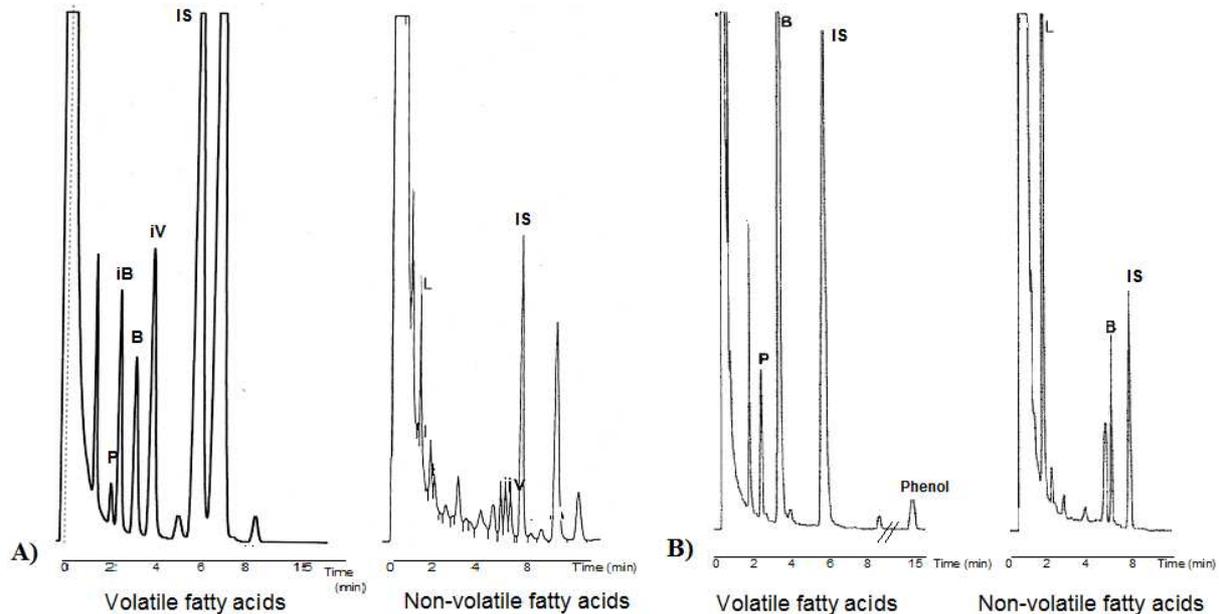


Figure 14. Chromatogrammes après analyse en CPG des acides gras volatils et non volatils de *Clostridium difficile* (A) et de *Clostridium malenominatum* (B).

D'après Jean-Philippe Carlier, données personnelles. **R**, front de solvant ; **B**, acide butyrique ; **iB**, acide iso-butyrique ; **L**, acide lactique ; **P**, acide propionique ; **iS**, acide iso-succinique ; **iV**, acide iso-valérique.

iv- Détermination des profils protéiques

Les principales méthodes d'étude des protéines purifiées sont basées sur la détermination des profils électrophorétiques d'un ensemble de protéines bactériennes. Ces protéines proviennent soit d'un extrait cellulaire total, soit, le plus souvent, d'une structure particulière (membranes, ribosomes). La plupart des techniques sont applicables à un nombre limité de bactéries et réservées à des laboratoires spécialisés.

On peut utiliser l'électrophorèse en gel de polyacrylamide, essentiellement la technique appelée SDS-PAGE (pour sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis), qui consiste à extraire les protéines cellulaires totales (environ 2 000 protéines différentes par bactérie) que l'on sépare par électrophorèse en condition dénaturante. Le profil électrophorétique d'une souche est le reflet du bagage génétique de la bactérie et sa comparaison avec les profils d'autres bactéries permet de mesurer leur degré de parenté. Deux

microorganismes très proches doivent avoir des profils similaires ou identiques. Certaines études ont montré une corrélation entre une forte similarité du profil protéique total et l'hybridation ADN-ADN (344). Cependant, le pouvoir discriminant de cette technique est variable selon les groupes bactériens étudiés et elle pose parfois des problèmes de reproductibilité inter-laboratoire, limitant son utilisation (377).

L'électrophorèse des iso-enzymes ou multilocus enzyme electrophoresis (MLEE) apprécie quant à elle les différences de mobilité des enzymes qui sont révélées par leur activité enzymatique et témoignent de l'existence d'un polymorphisme au niveau des gènes codant pour les enzymes étudiées (allozymes = variants de la même enzyme codés par un même gène mais par des allèles différents) (296). Par Western Blot, on peut également révéler des bandes qui portent un déterminant antigénique particulier. Cette technique, de moins en moins utilisée actuellement, a été appliquée à de nombreux groupes bactériens, essentiellement dans le cadre d'études de typage épidémiologique (377).

v- Détermination des spectres de masse

La spectrométrie de masse est une technique permettant d'identifier les molécules en fonction de leur masse (précision de 0.2 Da), qui est utilisée dans plusieurs domaines de microbiologie notamment la caractérisation de constituants bactériens (acides gras, peptidoglycanes, structures antigéniques...) et l'étude de mécanismes de virulence ou de résistance à des composés antimicrobiens (54, 147, 226). Une application récente est son utilisation pour l'identification bactérienne par l'analyse de leurs protéines totales ou de leurs acides nucléiques (241, 284). La technique la plus utilisée dans ce cadre est la spectrométrie de masse MALDI-TOF (pour Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation - Time Of Flight) qui permet d'obtenir des spectres de masses à partir d'une ou plusieurs colonies bactériennes. Les spectres protéiques accumulés et moyennés dans la gamme de masse souhaitée (en général 2 000 à 20 000 Da) sont comparés à ceux d'une banque de données contenant les spectres de différents genres et espèces bactériennes. L'équipe de Grosse-Herrenthey et coll. 2008) (132) a utilisé la spectrométrie de masse pour distinguer les espèces de *Clostridium*. L'analyse de 64 souches de référence représentant 31 espèces de *Clostridium* par spectrométrie de masse MALDI-TOF donne des profils de spectres concernant les protéines ribosomiques caractéristiques d'espèce. L'utilisation de ces profils permet une identification de l'espèce de *Clostridium* de la même façon qu'après séquençage de l'ADNr 16S. Cette technique a montré

des résultats satisfaisants pour une application à l'identification bactérienne en routine hospitalière (241, 284). Cependant, elle nécessite un appareillage coûteux, une bonne standardisation de la méthode ainsi que des bases de données fiables et représentatives.

vi- Analyse des acides gras cellulaires

Les acides gras sont les composants majoritaires des lipides cellulaires. La caractérisation des types et des proportions d'acides gras présents dans les membranes bactériennes est utilisée par certains laboratoires pour identifier les bactéries (218, 377). En effet, la composition en acides gras des procaryotes peut être très variable, que ce soit au niveau de la longueur des chaînes d'acides gras ou de la présence ou non de doubles liaisons, de noyaux aromatiques, de chaînes ramifiées ou de groupements hydroxyles (344). Un profil d'acide gras peut donc être caractéristique d'un genre ou d'une espèce bactérienne. Ainsi les *Lactobacillus* spp. ont des acides gras à nombre pair d'atomes de carbone et à courte chaîne droite alors que les espèces du genre *Bacillus* ont des acides gras à nombre impair de carbones et à chaîne ramifiée.

La détermination de ces profils est effectuée par la technique FAME (pour Fatty Acid Methyl Ester). Elle consiste dans un premier temps à extraire les acides gras à partir d'hydrolysats de cellules d'une culture en conditions standardisées puis à obtenir chimiquement les esters méthylés dérivés. Ces esters volatiles sont ensuite identifiés par CPG en comparant le chromatogramme obtenu à une base de données contenant les profils de milliers de souches de référence cultivées dans les mêmes conditions. Les profils d'acides gras d'un organisme pouvant varier en fonction de la température, de la phase de croissance voire du milieu de culture, cette technique n'est applicable qu'aux bactéries cultivables dans des conditions standards. Elle n'est utilisée que par des laboratoires spécialisés.

vii- Structure et composition de la paroi bactérienne

Le peptidoglycane étant très répandu dans le monde bactérien (hors *Tenericutes*, *Chlamydiae* et *Planctomycetes*), la composition de la paroi cellulaire peut être déterminée dans un but taxonomique. En effet, bien qu'ayant une partie glucidique très conservée entre les différents microorganismes, le peptidoglycane présente une grande variabilité structurale. De plus, une vingtaine d'enzymes étant impliquées dans sa synthèse, cette molécule constitue un bon reflet du génome bactérien. La détermination de sa composition est surtout utilisée pour les

bactéries à Gram positif chez lesquelles elle peut être caractéristique d'un genre ou d'une espèce bactérienne particulière (291, 358). La partie peptidique ainsi que le type et la composition du pont interpeptidique varient considérablement. Le type de peptidoglycane chez les bactéries à Gram négatif est plutôt uniforme et ne présente que peu d'intérêt taxonomique.

Les acides teichoïques enchâssés dans ce peptidoglycane peuvent également être utilisés en tant que marqueurs phénotypiques après extraction, purification et analyse par chromatographie (108). Leur absence chez *Micrococcus* spp. permet de distinguer ces bactéries des *Staphylococcus* spp. Au sein de ce genre, le type d'acide teichoïque permet de différencier *Staphylococcus aureus* des autres espèces de staphylocoques (291).

b) Méthodes génomiques et génétiques

Ces méthodes sont basées sur l'analyse des molécules d'ADN ou d'ARN, soit au niveau de l'ensemble du génome, soit en ciblant certains fragments du chromosome ou du plasmide bactérien. En effet, l'hybridation ADN-ADN, le pourcentage de G+C ou la cartographie chromosomique après ECP apportent des informations sur le génome bactérien dans sa globalité. On pourra également s'intéresser plus particulièrement à certains gènes qui reflèteront l'évolution bactérienne dans une approche phylogénétique et pourront être ultérieurement utilisés en tant qu'outils d'identification.

i- Mesure du contenu en guanine et cytosine

Le premier élément des acides nucléiques ayant été utilisé en taxonomie est le G+C%, c'est à dire le nombre de couples "guanine + cytosine" pour 100 couples de bases dans la molécule d'ADN (exprimé en mol%) (377). Sa détermination est considérée comme l'une des méthodes génotypiques les plus classiques et fait partie intégrante de la description standard d'un taxon bactérien. Ce pourcentage peut être déterminé de différentes manières, en mesurant la température de fusion de l'ADN ou par chromatographie liquide haute performance (CLHP) (218).

Parmi le monde vivant, c'est au sein des bactéries que les valeurs les plus dispersées du coefficient G+C% sont retrouvées. En effet, alors que le contenu en G+C des animaux et des

plantes supérieures varie entre 30 et 50%, il présente chez les procaryotes des valeurs allant de 23.7% chez *Mycoplasma sualvi* à 79% pour le genre *Pseudonocardia*. En général, les différences de G+C% observées au sein d'un même genre ne dépassent pas 10% et un seuil inférieur à 5% de différence est recommandé pour considérer que deux isolats appartiennent à la même espèce (218, 271, 344). Le contenu en G+C peut donc être déterminé afin de séparer deux taxons ayant des valeurs de G+C% éloignées. Cependant, si ces deux valeurs sont identiques, la preuve que les deux taxons descendent d'un ancêtre commun ne pourra être apportée qu'en étudiant plus précisément leurs séquences nucléotidiques car deux séquences très différentes peuvent être construites avec les mêmes proportions des paires de bases AT et GC (215, 218, 377). Les données de contenu en G+C ont donc une valeur taxonomique car elles peuvent confirmer ou infirmer un schéma taxonomique obtenu sur d'autres bases.

ii- Détermination des taux d'hybridation ADN-ADN

La valeur d'hybridation entre les ADN totaux de deux souches est un indicateur de la similarité des séquences entre génomes entiers (218, 377). Les techniques utilisées pour réaliser ces expérimentations d'hybridation ADN-ADN sont basées sur le phénomène de renaturation de l'ADN dû à la propriété des brins complémentaires de deux molécules dénaturées d'ADN de se ré-associer s'ils présentent une analogie dans leurs séquences. La stabilité thermique des hybrides obtenus, reflet de la proportion de mésappariements, doit ensuite être déterminée par élévation de la température et comparaison de la stabilité thermique des duplex homologues à celle des duplex hétérologues (ΔT_m) en conditions standardisées. Il a été montré que la stabilité thermique diminuait de 1 à 2.2% pour chaque 1% de mésappariement (344). Des valeurs d'hybridation au moins égales à 70% sont recommandées pour considérer que deux isolats appartiennent à la même espèce et des valeurs supérieures à 25% d'hybridation sont nécessaires pour affirmer que ces isolats peuvent être placés dans le même genre (218). Par ailleurs, le ΔT_m obtenu ne doit pas dépasser 5°C chez les souches d'une même espèce (355). Si le ΔT_m est $>$ à 7-8°C, on peut admettre que les deux ADN appartiennent à des espèces différentes (377).

Jusqu'à présent, le pourcentage d'hybridation ADN-ADN reste un critère majeur pour la délimitation des espèces (244). Cependant, sa détermination nécessite des techniques longues à mettre en œuvre et des quantités importantes d'ADN; les conditions physico-chimiques sont essentielles dans la réalisation de telles expérimentations et les résultats obtenus avec les

différentes techniques ne sont pas superposables. Par ailleurs, les différentes méthodes utilisées n'apportent pas toujours le même résultat de pourcentage d'hybridation et ce seuil de 70% de relation semble être plus indicatif qu'absolu (215, 344). De plus, bien que de nouvelles méthodes soient développées, les données d'hybridation ne sont pas disponibles pour tous les groupes bactériens connus, en particulier pour les bactéries de culture difficile ou impossible et les bactéries intracellulaires. Ces nombreux inconvénients remettent donc en question son caractère incontournable.

iii- Étude de la structure génomique par électrophorèse en champ pulsé

Mise au point au début des années quatre vingt, l'ECP ou PFGE (pour Pulsed Field Gel Electrophoresis) permet de séparer et d'analyser des fragments d'ADN de grande taille (> 50 Kb). Le principe de cette technique repose sur l'application alternée de champs électriques dont les directions différentes imposent à la molécule d'ADN des étapes de réorientation appelées temps de pulse. La réorientation sera plus ou moins longue en fonction de la taille du fragment d'ADN et déterminera le temps de migration effectif par reptation à travers les mailles du gel d'agarose (6). L'ECP permet ainsi de séparer des fragments d'ADN d'une taille allant jusqu'à une dizaine de mégabases (Mb). Pour ce type d'électrophorèse, il n'est pas possible d'utiliser des ADN purifiés par les techniques classiques car ces techniques les cassent en fragments d'une taille inférieure à 100 Kb. Après inclusion d'une suspension bactérienne dans un bloc d'agarose appelé plug ou insert, l'extraction d'ADN est réalisée par diffusion des réactifs dans cet insert.

Les applications de l'ECP sont vastes car cet outil permet de manipuler de très grands fragments d'ADN. En bactériologie médicale, l'ECP est considérée comme la méthode de référence pour le typage épidémiologique en comparant des profils de restriction ou pulsotypes de différentes souches bactériennes (142, 327). D'un point de vue taxonomique, cette technique va permettre d'étudier le génome bactérien dans sa globalité. En effet, une détermination du nombre de chromosomes, de mégaplasmides et/ou de grands plasmides ainsi que leur taille et leur conformation (circulaire ou linéaire) est possible après électrophorèse de l'ADN intact (2, 172, 299, 330). Certains auteurs utilisent cette technique pour étudier la plasticité génomique en ciblant des régions spécifiques de l'ADN après Southern blot et hybridation (120, 197, 331). L'ECP va également permettre la construction de cartographies, physiques et génétiques, des chromosomes ou la détermination du squelette ribosomique

d'une bactérie, c'est à dire du nombre d'opérons ribosomiques ainsi que de leur organisation hypothétique les uns par rapport aux autres sur le chromosome bactérien (178, 299, 330).

La taille du génome bactérien ainsi que le nombre de ces opérons ribosomiques sont variables selon les espèces. Ainsi l'on retrouve des génomes allant de 144 Kb (α -protéobactérie endosymbiotique d'insecte *Candidatus Hodgkinia cicadicola*) à plus de 13 000 Kb (bactérie du sol *Sorangium cellulosum*) et possédant de 1 à 15 copies d'opérons ribosomiques (200, 228, 270). Étant donné le rôle de ces opérons chez la bactérie, on peut penser que leur nombre et leur organisation dans le chromosome bactérien sont peu polymorphes au sein de souches phylogénétiquement proches et plusieurs équipes ont testé cette hypothèse. Ce squelette ribosomique ou squelette *rrn* peut être déterminé en utilisant l'enzyme de restriction I-CeuI. C'est une endonucléase codée par un intron du gène de l'ARNr 18S chez l'algue verte unicellulaire *Chlamydomonas moewusii* (anciennement *C. eugametos*). Elle reconnaît une séquence de 19 paires de base spécifique du gène codant l'ARNr 23S (Figure 15) (225).

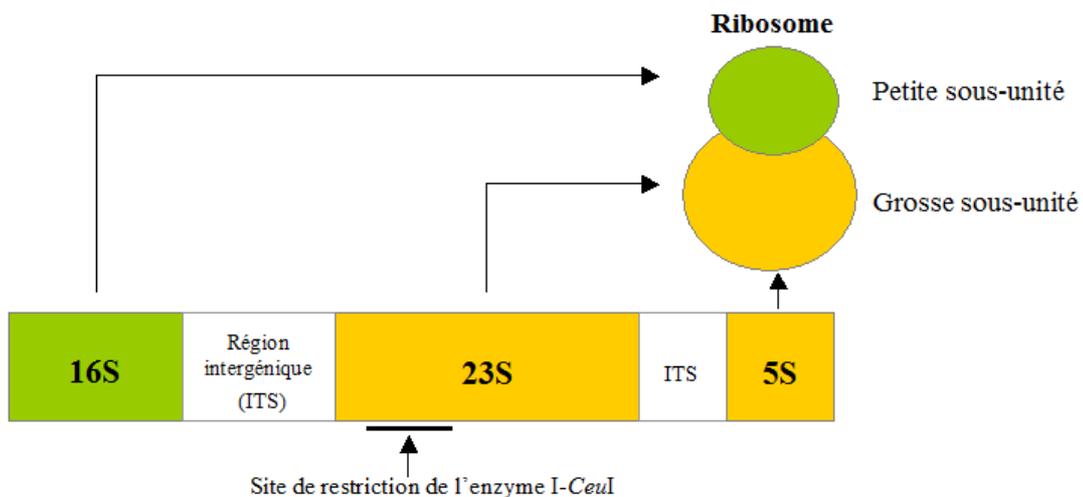


Figure 15. Représentation schématique de l'opéron ribosomique bactérien et du site de restriction de l'endonucléase I-CeuI.

Liu et coll. (1993) (209) ont pu établir qu'un site de restriction d'I-CeuI est présent dans chaque copie *rrn* et seulement à cet endroit du génome. Des travaux ultérieurs sur différents groupes bactériens ont montré que le pulsotype obtenu après digestion par cette enzyme était un outil intéressant pour étudier les relations phylogénétiques des bactéries (210, 299). Shaheduzzaman et coll. (1997) montrent qu'un dendrogramme construit en se basant sur la taille du génome, le nombre de copies de l'opéron *rrn* et le profil de restriction I-CeuI à partir

de sept espèces de *Bacteroides* spp. est très similaire d'un arbre phylogénétique basé sur les séquences des gènes d'ARNr 16S de ces mêmes espèces (Figure 16) (299).

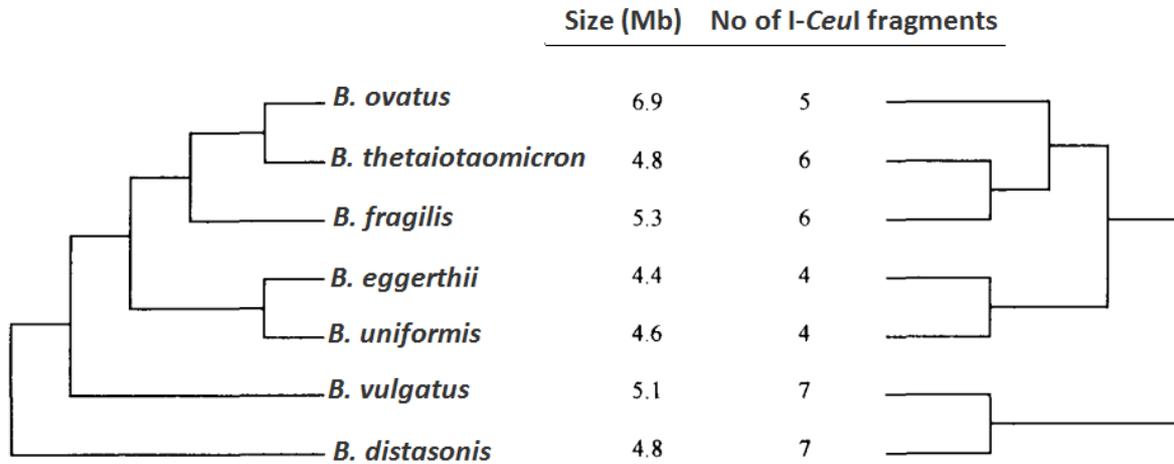


Figure 16. Comparaison des dendrogrammes montrant les relations de sept espèces de *Bacteroides* spp. (299)

basé sur les séquences d'ADNr 16S (A) et basé sur la taille du génome, le nombre de copies de l'opéron *rrn* et la similarité des pulsotypes obtenus après digestion par l'enzyme I-CeuI (B).

Cet outil ECP-I-CeuI, encore peu répandu, a été utilisé en taxonomie, notamment par l'équipe montpelliéraine d'Estelle Jumas-Bilak pour étudier la diversité et les relations évolutives des bactéries du genre *Veillonella* ou pour décrire deux nouvelles espèces de *Dialister*, *Dialister micraerophilus* et *Dialister propionifaciens* (170, 224). De plus, si l'électrophorèse est suivie par une étape de Southern blot en utilisant une sonde dirigée contre l'ADNr 16S, il est possible de schématiser l'organisation hypothétique des opérons *rrn* les uns par rapport aux autres sur le chromosome. Ceci a permis de montrer qu'au sein du genre *Ochrobactrum*, possédant deux chromosomes, l'orientation de ces opérons les uns par rapport aux autres pouvait varier entre les espèces *O. intermedium*, *O. anthropi*, *O. grignonense*, *O. tritici* et *O. gallinifacis* (330). Ainsi, l'organisation du grand chromosome est globalement conservée, alors que les squelettes *rrn* des petits chromosomes diffèrent entre les espèces.

On va également pouvoir déterminer le nombre d'opérons ribosomiques en utilisant d'autres endonucléases qu'I-CeuI, à condition de vérifier qu'elles ne coupent pas dans le gène cible de la sonde utilisée pour le Southern blot (ADNr 16S). Cette approche est plus rapide que la précédente car elle ne nécessite qu'une électrophorèse classique après la digestion enzymatique puis une hybridation.

iv- Séquençage total des génomes et génomique comparée

Depuis le séquençage complet du premier génome bactérien par le groupe de Craig Venter (TIGR) en 1995, le nombre de séquences de génomes de procaryotes ne cesse d'augmenter. A ce jour, près de 2000 génomes d'eubactéries ont été entièrement séquencés (données obtenues le 06 août 2009 sur le site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=genome>) et, de par l'extension de techniques rapides de séquençage, il faut s'attendre à une explosion future du nombre de génomes complets. Cette abondance de données a révolutionné nos connaissances sur l'organisation et le contenu génétique des génomes bactériens. En l'absence de fossiles bactériens, l'analyse des génomes des espèces actuelles est l'unique moyen d'évaluer les caractères ancestraux et évolués et de reconstruire le passé évolutif (45). La comparaison des génomes permet de comprendre la manière dont ils ont évolué : comment se créent et se transmettent les gènes, comment se créent les espèces et qu'est-ce qui les différencie, comment s'adaptent-elles ?

Au sein du Laboratoire de Génétique et Microbiologie, UMR INRA 1128, de la Faculté des Sciences de Nancy, la comparaison des génomes de *Streptomyces ambofaciens*, *S. coelicolor* et *S. avermitilis* a révélé l'existence d'une structure génétique extrêmement compartimentée, unique à ce jour dans le monde bactérien (46). Leur chromosome, linéaire, possède une région "core" centrale présentant un niveau élevé de synténie parmi le genre *Streptomyces* et dont la taille est inversement liée à la distance phylogénétique séparant les espèces. En revanche, les régions terminales de ces chromosomes, caractérisées par des répétitions terminales inversées, sont très variables entre les espèces et leur taille semble augmenter avec l'évolution des espèces. Ces régions, représentant jusqu'à 20% du génome, sont le siège d'un flux important et constant d'informations génétiques issues du transfert horizontal et concentrent les gènes d'adaptation. L'approche par génomique comparée a permis de confirmer des résultats expérimentaux antérieurs qui démontraient une instabilité particulièrement forte des régions terminales, notamment chez *S. ambofaciens*.

3. Méthodes phylogénétiques appliquées à la taxonomie ou phylotaxonomie

a) Les méthodes

Les méthodes de reconstruction phylogénétique nous permettent de générer des arbres phylogénétiques, représentatifs de l'évolution entre les différents taxons, à partir des séquences nucléotidiques ou protéiques d'un marqueur phylogénétique. Les méthodes de reconstruction phylogénétique actuelles ont bénéficié des énormes progrès de l'amplification génique, du séquençage et de la bioinformatique.

i- L'obtention des séquences du marqueur choisi pour l'étude phylogénétique

Les séquences peuvent être obtenues soit par séquençage des gènes cibles sur un nombre de souches assez important pour que l'arbre soit interprétable, soit en allant chercher ces séquences dans les différentes bases de données citées dans un chapitre antérieur. Dans le cas des protéines, la séquence nucléotidique obtenue est traduite par des logiciels de type TRANSLATE (<http://www.expasy.ch>). Le bon cadre de lecture est alors choisi par comparaison aux banques de données. Qu'elles soient issues d'une banque ou du séquençage d'une souche au laboratoire, ces séquences doivent répondre à différents critères de qualité tels qu'une taille adéquate ou un nombre minimal d'ambiguïtés. La possibilité que ces séquences soient chimériques, c'est à dire résultant d'une amplification à partir de séquences d'ADN différentes et menant à l'obtention d'un amplicon hybride, doit être éliminée. Des logiciels tels que CHIMERA CHECK (<http://rdp.cme.msu.edu>) et BELLOROPHON (<http://greengenes.lbl.gov>) permettent la détection des séquences chimériques. Par ailleurs, les séquences doivent être sélectionnées en fonction de leur taux de polymorphisme et/ou de leur vitesse d'évolution afin de répondre aux questions évolutives posées.

ii- Les alignements multiples de séquences

Pour être comparées, les séquences nucléotidiques ou protéiques obtenues pour les différents individus doivent d'abord être alignées. Cet alignement pose l'hypothèse d'homologie

primaire permettant de comparer des caractères comparables. Des logiciels tels que ClustalW ou MUSCLE, accessibles gratuitement en ligne (<http://www.phylogeny.fr/>) ou en téléchargement, peuvent réaliser l'alignement de ces différentes séquences (89, 333). Ces programmes effectuent des alignements globaux, c'est à dire réalisés sur toute la longueur de la séquence, progressifs. L'alignement débute au niveau des séquences les plus proches puis continue progressivement jusqu'aux séquences les plus éloignées. L'algorithme procède en trois étapes. Dans un premier temps, il aligne toutes les paires de séquences possibles afin d'établir une matrice de distance basée sur les scores des alignements. Dans un deuxième temps, le logiciel construit un "arbre guide" représentant les liens de parenté entre les différentes séquences. Dans un troisième temps, l'algorithme va parcourir l'arbre des feuilles à la racine : à chaque étape, il prend les deux séquences les plus proches, réalise un alignement global et calcule une séquence consensus qui va venir remplacer les deux séquences alignées. L'alignement global de ces séquences conduit à la mise en évidence de résidus identiques ou similaires, conservés dans un groupe d'organismes, appelés caractères signatures ou piliers d'alignement. Le programme d'alignement multiple NAST a été spécialement conçu pour faciliter la comparaison de séquences d'ADNr 16S (68). En prenant en compte la structure secondaire de l'ARNr 16S, ce programme est utilisé par l'application *Greengenes* afin de maintenir l'alignement de toutes les séquences de la banque, permettant d'aligner rapidement l'ensemble de ces séquences à la séquence étudiée. Ces alignements tenant compte de la structure secondaire sont particulièrement recommandés pour reconstruire des phylogénies de haut niveau qui impliquent la comparaison de séquences très polymorphes. La structure secondaire, souvent conservée, sert alors de guide permettant un alignement de meilleure qualité.

L'utilisation d'éditeurs de séquences comme BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/>) (335) ou SeaView (113) permet de repérer rapidement des signatures au niveau d'un alignement. En pratique, ces alignements doivent être vérifiés manuellement et les zones d'alignement douteux doivent être exclues des analyses phylogénétiques. Afin d'assurer une meilleure reproductibilité à cette étape de correction de l'alignement, il est possible d'utiliser un logiciel comme Gblocks disponible sur le site <http://www.phylogeny.fr/> (39). En se basant sur des règles simples, Gblocks permet l'obtention d'un alignement épuré en enlevant les positions jugées trop éloignées tout en minimisant les informations perdues par cette manipulation. Les alignements de séquences peptidiques sont en général plus faciles à réaliser et nécessitent peu d'améliorations manuelles (135). Les erreurs sur les gènes exprimés en

protéines sont plus faciles à détecter. La correction de l'alignement est une étape cruciale car la qualité de l'alignement sous-tend toute l'analyse et les principales incohérences entre les arbres publiés sont dues à des alignements différents des séquences.

Une fois l'alignement réalisé, l'hypothèse d'homologie primaire est posée et l'hypothèse secondaire ou ascendante, c'est-à-dire trouver les ancêtres communs et construire l'arbre, peut être abordée.

iii- Les méthodes de génération d'arbres phylogénétiques

Les séquences ainsi alignées sont ensuite comparées et servent à la construction d'arbres phylogénétiques. Pour cela, chaque position nucléotidique alignée est considérée comme un caractère. Les méthodes phylogénétiques ou cladistiques sont basées sur l'étude des caractères et s'intéressent au nombre de mutations (substitutions, insertions, délétions) qui affectent chacune des positions nucléotidiques de la séquence c'est-à-dire chaque caractère. Ces méthodes peuvent être :

- exhaustives : chaque arbre possible est analysé, permettant d'obtenir de façon certaine le meilleur arbre. Ce type de méthode ne s'applique qu'à des petits jeux de données (<dix taxa).
- heuristiques : des algorithmes parcourent l'ensemble de l'espace des arbres mais pas chaque arbre possible. Ces méthodes d'approximation permettent de trouver rapidement des courts alignements présentant une forte similarité et à partir desquels s'ancre la recherche de l'alignement complet.
- stochastiques : des algorithmes recherchent les similarités de façon aléatoire dans l'espace des arbres (algorithmes bayésiens).

La cladistique est basée sur la notion d'homologie. On n'établira des relations de parenté que sur la base du partage des états dérivés d'un caractère ancestral. Lorsqu'une nouveauté évolutive apparaît chez un organisme, elle sera transmise à tous ses descendants. Donc si plusieurs êtres vivants partagent une même nouveauté évolutive (appelée aussi homologie ou synapomorphie), c'est qu'ils l'ont héritée d'un même ancêtre, qui leur est propre (ancêtre commun), et chez qui cette nouveauté est apparue. Cette hypothèse ne prend pas en compte les phénomènes de transferts horizontaux de gènes qui contredisent ce modèle. Pour appliquer

la méthode cladistique, il faut identifier les différents états d'un caractère, et distinguer l'état primitif (ou ancestral ou plésiomorphe) de l'état évolué (ou dérivé ou apomorphe).

Les méthodes cladistiques aboutissent à l'obtention d'un ou plusieurs arbres nommés "cladogrammes". Sur chacun de ces cladogrammes, on distingue des groupes de séquences appelés clades. Un clade est donc un groupe monophylétique, comprenant un ensemble d'organismes et leur ancêtre commun qui partagent en exclusivité une même nouveauté évolutive (nouveau caractère ou état évolué d'un caractère).

Le plus souvent, les arbres obtenus par les méthodes phylogénétiques ne sont pas racinés. Dans de nombreux cas, il est nécessaire d'ajouter une séquence extérieure au groupe d'organismes étudiés, que l'on nomme extragroupe ou *outgroup*, afin de raciner artificiellement l'arbre. Les méthodes intégrant l'horloge moléculaire placent la racine de l'arbre sans confrontation avec un extragroupe.

Les méthodes de construction d'arbres phylogénétiques sont des méthodes mathématiques basées sur des approches arithmétiques (distance), probabilistes (maximum de vraisemblance, méthodes bayésiennes) ou algorithmiques (parcimonie). Contrairement aux méthodes phénétiques de clusterisation, une méthode phylogénétique permet la détermination des caractères ancestraux et dérivés. Ces méthodes permettent la comparaison des séquences, leur clusterisation et la détermination des ancêtres communs.

La parcimonie est basée sur un algorithme exprimant d'emblée des conditions d'optimalité basées sur le principe épistémologique de la parcimonie. Les autres méthodes demandent l'implémentation d'un modèle d'évolution sur une méthode mathématique.

Les modèles de substitution

Les modèles d'évolution sont des modèles de substitution. Plusieurs sont applicables. Le modèle de Jukes & Cantor (1968) est le plus ancien et le plus simple puisqu'il suppose que tout changement (transition ou transversion) est équiprobable sur n'importe quelle position. Le modèle Kimura-2 paramètres (1982) tient compte des taux de transversion et des taux de transition auxquels il donne plus de poids. Le modèle F84 (1984) a les mêmes propriétés que le modèle précédent mais permet en plus d'affecter des fréquences différentes pour chaque nucléotide, donc de tenir compte du G+C% de l'organisme considéré. Toutes ces méthodes permettent l'affectation d'un taux variable de substitution selon les sites après calcul d'une γ -

distribution sur les séquences alignées. Il existe également d'autres modèles tels que le modèle HKY (145) qui se rapproche du modèle F84, le modèle TN93 qui prend en compte les différents taux de transversion et de transition ainsi que des deux types de transition (325) ou le modèle GTR (General Time Reversible) (375). Ce dernier modèle est le plus riche actuellement disponible. Il autorise des taux différents pour les six types de substitutions possibles et s'accompagne de quatre fréquences en A, C, G, et T propres à chaque nucléotide. Les taux de substitutions peuvent être estimés par une loi statistique (distribution gamma). Il est possible d'autoriser des fractions des sites à être invariables alors que les taux de substitution des autres sites sont distribués selon cette loi gamma. Il tient aussi compte du taux de sites invariants.

Plus le modèle choisi sera proche des conditions sous lesquelles les séquences évoluent, plus l'hypothèse d'homologie ascendante sera proche des relations réelles entre les organismes étudiés. Le choix du modèle peut être guidé par des logiciels de détermination du meilleur modèle de substitution par détermination du critère d'Akaike (MODELTEST).

Les méthodes basées sur l'analyse de matrices de distance

La méthodologie générale est la suivante : l'étape initiale consiste à établir une matrice de distance entre séquences prises deux à deux en tenant compte du fait que les distances sont mesurées indépendamment et que ces distances s'additionnent. Dans le package informatique PHYLIP (105) qui regroupe plusieurs programmes de phylogénie, DNADIST et PROTDIST permettent de calculer cette matrice de distance à partir d'un ensemble de séquences alignées, respectivement nucléiques ou protéiques.

Après calcul de la matrice de distance, les programmes de construction d'arbre procèdent par regroupements successifs depuis la paire des séquences les plus proches aux plus éloignées : il s'agit d'une méthode de "clusterisation". Un arbre unique sans racine, appelé phénogramme ou dendrogramme, est obtenu.

Parmi les différentes méthodes fondées sur les distances, la méthode UPGMA (Unweight Pair Group Method with Arithmetic mean), la plus simple, est basée sur l'hypothèse que les taux de mutation et donc les vitesses d'évolution sont identiques sur les différentes branches de l'arbre. Il ne s'agit donc pas d'une méthode phylogénétique puisqu'elle ne détermine pas d'ancêtre commun. La méthode du Neighbor-Joining développée par Saitou et Nei (285) est une amélioration de la précédente autorisant un taux de mutation différent entre branches.

C'est actuellement la plus utilisée pour reconstruire des phylogénies par méthode de distance. On la retrouve dans le programme NEIGHBOR du package PHYLIP. BIONJ et Weighbor Tree sont des méthodes améliorées, dérivées du Neighbor-Joining, recommandées pour analyser des alignements montrant de forts taux de substitution.

Il existe aussi des méthodes dérivées où l'arbre sélectionné est celui présentant la somme la plus faible des carrés des écarts entre les distances observées et les distances calculées. Deux programmes du package PHYLIP utilisent ces méthodes. Il s'agit des programmes FITCH et KITSCH qui dérivent de la méthode de Fitch et Margoliash (109).

Les programmes FITCH et Neighbor-Joining expriment des degrés de ressemblance entre taxons et n'intègrent pas la notion d'horloge moléculaire ; ils n'ont donc pas de contraintes sur la longueur des branches. En revanche une horloge moléculaire est prise en compte par le programme KITSCH. Il considère que toutes les séquences analysées sont contemporaines et la même vitesse d'évolution (horloge) est affectée à chacune. La longueur des branches est donc calculée de telle manière que la distance entre la racine et l'extrémité de la branche de chaque séquence est identique pour toutes les séquences de l'arbre. L'arbre est forcément raciné. Le degré d'évolution de chaque lignée est ainsi considéré comme proportionnel au temps.

Les méthodes de construction de matrice de distance et de regroupement des plus proches sont rapides et donnent de bons résultats pour des séquences ayant une forte similarité. Il est intéressant de les utiliser pour explorer les données ou pour optimiser et appuyer les résultats obtenus par d'autres méthodes.

Les méthodes basées sur l'analyse de données discrètes

Les méthodes suivantes ne demandent pas de construction de matrice, elles sont toutes basées sur l'analyse de données discrètes. Chaque position des séquences alignées est traitée comme une donnée discrète (un caractère indépendant des autres) jusqu'au bout de l'analyse. Ces méthodes nécessitent la définition de critères d'optimalité, en général par une approche statistique ou probabiliste.

Le maximum de vraisemblance (Maximum Likelihood)

En se fondant sur le taux de substitution pour chaque caractère au cours du temps, la méthode du maximum de vraisemblance (ML) estime la vraisemblance de chaque position et de la

longueur des branches de l'arbre. Les conditions d'optimalité ne sont pas définies par avance comme nous le verrons pour la parcimonie, mais sont calculées au cours de l'analyse elle-même. La vraisemblance est la probabilité d'observer les données (séquences alignées) en connaissant un arbre phylogénétique hypothétique. Cet arbre hypothétique est construit *a priori*, en début d'analyse, en général par une méthode de distance. Le ML est une méthode robuste et consistante (plus on ajoute de données, plus elle converge vers la bonne topologie d'arbre). Elle prend en compte les substitutions multiples ainsi que la complexité du processus de substitution, ce qui la rend très puissante. Le choix du modèle est un facteur crucial à l'obtention d'un arbre consistant.

Sa performance et ses propriétés statistiques séduisantes en font la méthode la plus utilisée à l'heure actuelle dans les domaines de l'évolution moléculaire et de la reconstruction phylogénétique. Cependant, c'est une technique qui nécessite des temps de calcul très longs. Par exemple, avec un ordinateur personnel actuel, il faut environ 10 h pour analyser une centaine de séquences de 650 pb avec le logiciel DNAML du package PHYLIP. Certains logiciels récents comme PHYML (133) améliorent les temps de calcul grâce à des astuces mathématiques.

L'approche bayésienne

L'approche bayésienne conçoit les caractéristiques de l'arbre (topologie et longueurs de branche) comme la réalisation d'une variable aléatoire. Les conditions d'optimalité sont calculées au cours de l'analyse elle-même. Cette méthode probabiliste est fondée sur le calcul de probabilités postérieures des arbres phylogénétiques selon le théorème de Thomas Bayes (1702-1761) par la combinaison d'une probabilité *a priori* avec la fonction de vraisemblance. Plus simplement, la probabilité postérieure d'un arbre est la probabilité que cet arbre soit vrai en connaissant les données. Les inférences sont réalisées à partir de la distribution de probabilité postérieure des différents arbres évalués au cours de l'analyse. L'analyse progresse selon une marche au hasard de type Monte Carlo et une chaîne de Markov permet d'atteindre l'état d'équilibre de distribution (63).

Ces techniques numériques permettent l'implémentation de modèles d'évolution des séquences complexes (identiques à ceux utilisés pour la méthode ML), incorporant un nombre élevé de paramètres en un temps de calcul raisonnable, même sur des jeux de données importants. L'approche bayésienne apparaît donc particulièrement prometteuse pour le futur de la reconstruction phylogénétique.

La méthode du maximum de parcimonie (MP)

Contrairement aux approches ML et bayésiennes, la détermination du maximum de parcimonie (MP) a des conditions d'optimalité définies par avance selon le grand principe épistémologique de la parcimonie. Ce principe, énoncé au XIV^{ème} siècle par Guillaume d'Ockham, et connu sous le nom du rasoir d'Ockham, est le suivant : « *entia non sunt multiplicanda praeter necessitatem* », c'est à dire que l'explication d'un phénomène doit être la plus simple possible. Les conditions d'optimalité de l'arbre sont donc explicites : l'arbre qui donne la meilleure estimation des relations phylogénétiques est celui qui implique le moins d'évènements évolutifs.

Cette approche recherche l'arbre qui, en passant de la séquence ancestrale (hypothétique, tronc de l'arbre) aux séquences actuelles (feuilles de l'arbre), supposera à chaque nœud un minimum d'évènements mutationnels nouveaux. Il s'agit donc de construire le réseau le plus économique en substitution. Les arbres les plus parcimonieux sont les arbres "les plus courts" c'est-à-dire ceux dont la topologie requiert le minimum de "pas" nécessaires totalisés sur l'ensemble des sites pour passer d'une séquence à l'autre. Cette méthode correspond aux programmes DNAPARS et PROTPARS du package PHYLIP (105). Cette méthode est utilisée pour des séquences relativement éloignées les unes des autres. Jusqu'à une époque récente, c'était la seule méthode largement utilisée pour l'estimation phylogénétique pour des données morphologiques car elle tient compte des états ancestraux.

Cette approche a certains inconvénients qui la rendent de moins en moins utilisée. En particulier, le MP est considéré comme peu robuste car il est sensible à l'ordre d'ajout des espèces dans l'analyse. De plus, pour des phylogénies complexes, le MP va donner plusieurs arbres équivalents ("les plus parcimonieux") mais de topologies différentes sans possibilité de choix.

iv- L'évaluation statistique de la robustesse des arbres phylogénétiques

Les méthodes de génération d'arbres présentent de nombreuses variantes qui donnent fréquemment des arbres ayant des topologies différentes. Cependant, quelle que soit la méthode utilisée, il faut noter qu'il s'agit toujours d'une estimation et par conséquent la fiabilité d'un arbre doit toujours être statistiquement établie. La robustesse des arbres phylogénétiques peut être évaluée, entre autres, grâce au test statistique de "bootstrap" (92).

Ce test permet de ré-échantillonner les données introduites dans les programmes de calcul (ré-échantillonnage des caractères) en construisant autant d'arbres qu'il y a eu de ré-échantillonnages. Chaque ré-échantillonnage est un tirage au sort des caractères avec remise. Chaque réplication produit donc un nouvel alignement (pseudo-alignement) qui est utilisé pour construire un pseudo-arbre. Il faudra alors soumettre ces pseudo-arbres à un programme de construction d'arbre consensus. Celui-ci construira l'arbre le plus probable en allouant à chaque branche une valeur correspondant au nombre de pseudo-arbres présentant ce branchement parmi tous les pseudo-arbres construits. Une analyse de bootstrap peut être réalisée avec des approches de distance (1000 réplifications recommandées), de ML (100 réplifications recommandées) ou de MP. Dans l'approche bayésienne, c'est la probabilité postérieure elle-même qui donne une évaluation de la robustesse. Cette probabilité postérieure étant à la base même de l'analyse, on ne réalise pas de test de robustesse supplémentaire. Il s'agit d'une valeur entre zéro et un. Plus la probabilité postérieure est proche de un, plus la branche est robuste.

En conclusion, pour construire un arbre correct, il est toujours indispensable d'avoir à l'esprit que la qualité et le nombre des données provoquent plus de variations au sein d'un arbre qu'un changement de méthode de construction. En particulier, le plus grand soin doit être apporté à la réalisation d'un alignement correct excluant les zones de mauvais alignement. En outre, les arbres phylogénétiques sont des constructions dynamiques dont la topologie est sensible à toute addition de nouvelles séquences. Ainsi une hypothèse phylogénétique sera considérée comme forte si trois méthodes différentes donnent les mêmes grands regroupements pour le ou les branchements considérés. Dans tous les cas, il est nécessaire et indispensable d'ajouter une ou plusieurs séquences "extragroupes" afin d'enraciner l'arbre. Enfin selon le gène utilisé comme marqueur phylogénétique, les arbres obtenus peuvent être différents car tous les gènes n'ont pas la même vitesse d'évolution et il existe également des phénomènes de recombinaison et de transfert latéral de gènes. Si les séquences sont sujettes à ces HGT, un modèle en arbre n'est pas pertinent et il faut utiliser un réseau phylogénétique.

b) La phylogénomique

Avec l'avènement du séquençage de génomes entiers, la phylogénie entre dans une nouvelle ère : l'ère de la phylogénomique. Les études phylogénomiques se proposent de reconstruire la phylogénie d'un ensemble de taxons en utilisant un grand nombre de gènes homologues, c'est à dire appartenant à une même famille génique. Elles permettent de disposer d'un nombre de caractères, et donc d'informations, beaucoup plus important pour reconstruire un arbre que les approches de phylogénie moléculaire traditionnelles, comme celle basée sur les ARNr. En effet, la phylogénie basée sur un seul gène peut, comme illustré précédemment, présenter une résolution limitée (erreur stochastique) (62). Par ailleurs, la phylogénie d'un gène peut être différente de la phylogénie des espèces de par les phénomènes de paralogie cachée, de transferts horizontaux et du polymorphisme ancestral. Cette approche, visant à minimiser l'effet délétère de la recombinaison sur la phylogénie, est la base de la méthode d'analyse de séquences multiples (MLSA) (30).

Il existe différentes approches de phylogénomique basées soit sur l'analyse simultanée de plusieurs caractères, soit sur l'analyse de génomes entiers.

La première approche consiste à concaténer différents gènes afin d'obtenir un unique alignement sur lequel on applique une méthode standard de reconstruction phylogénétique menant à l'obtention d'une supermatrice. Très intuitive, cette technique, dite de *total evidence*, permet de travailler directement sur les états de caractère des différents gènes. Cependant, elle est limitée par l'apparition de données manquantes, due à l'absence ou à l'impossibilité d'amplification de certains gènes, plus ou moins bien gérées suivant la méthode de reconstruction utilisée. Ces séquences absentes peuvent être remplacées par des points d'interrogation et plusieurs auteurs avancent qu'un certain taux (de 12 à 25%) de données manquantes peut être toléré (62). Par ailleurs, les gènes évoluant sous des contraintes différentes, l'hétérogénéité des vitesses et des modes d'évolution représente une difficulté supplémentaire à l'interprétation de ces arbres concaténés (56).

La seconde approche, plus informatique par ses aspects fortement ancrés dans l'algorithmique, tente de combiner le signal évolutif en travaillant sur des collections d'arbres phylogénétiques. Cette approche consiste à construire des arbres séparés pour chaque caractère puis à rassembler ces arbres dans un arbre consensus : le superarbre. Pour cela, il existe différentes

méthodes et la plus populaire est la méthode de parcimonie MRP (59, 62). Cette approche est principalement utilisée pour combiner des arbres obtenus de caractères différents (par exemple, données morphologiques et moléculaires) afin d'étudier la phylogénie d'un groupe d'individus.

La dernière approche est basée sur la comparaison du contenu génique ou de l'ordre des gènes ou de séquences signatures au sein de génomes entiers. En utilisant des modèles statistiques supplémentaires, la méthode basée sur le contenu génique permet de prendre en compte les transferts latéraux de gènes (354) et de minimiser le biais lié à la perte de certains gènes au cours de l'évolution (exemple des bactéries intracellulaires) (62). Cette approche reste cependant limitée aux organismes pour lesquels le génome a été totalement séquencé.

La phylogénomique permet de se focaliser sur des nœuds plus profonds et plus difficiles à résoudre mais elle était limitée jusqu'à une date assez récente par l'absence de données génomiques dans la plus grande partie de l'arbre des animaux. Ces données se multipliant de façon exponentielle, les études phylogénomiques se généralisent et ont déjà permis en 2005 à Frédéric Delsuc, de l'Institut des Sciences de l'Évolution de Montpellier, de construire l'arbre de vie à partir des données de phylogénomiques disponibles (Figure 17) (62). Il est intéressant de noter que, pour les procaryotes, cet arbre vient confirmer l'évolution proposée par l'analyse des gènes de l'ARNr 16S.

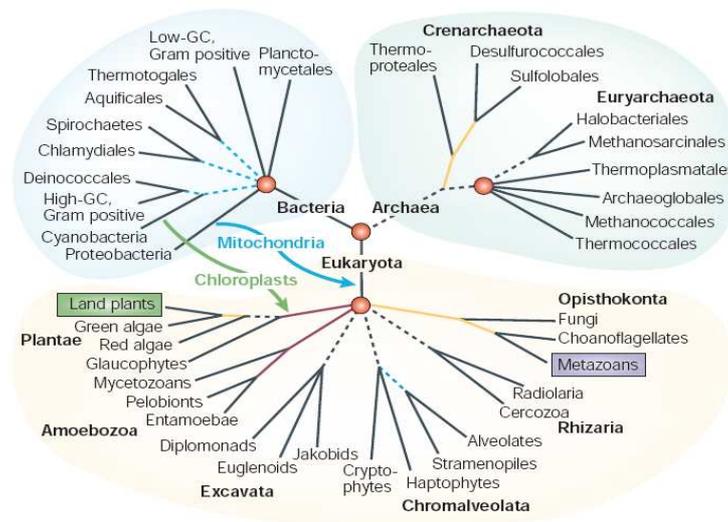


Figure 17. Représentation schématique de l'arbre de vie incluant les avancées et les futurs challenges (cercles rouges) de la phylogénomique (62).

Les relations hypothétiques sont indiquées en pointillés. Les branches violettes et jaunes ont été respectivement découvertes ou confirmées par une approche phylogénétique. Les deux événements endosymbiotiques (mitochondrie et chloroplaste) sont représentés par des flèches.

4. Approche taxonomique mixte et consensuelle

Depuis une trentaine d'années, les taxonomistes bactériens reconnaissent la nécessité de ne plus baser le système de classification des bactéries sur des similarités de fonctions, et d'adopter une approche rassemblant le maximum de données pour déterminer les groupes taxonomiques. Les termes de "polyphasic taxonomy" ont été introduits en 1970 par Colwell pour faire référence à une classification qui tient compte d'un maximum de données : données génétiques, données phénotypiques, données chimiotaxonomiques, données écologiques... (52). Progressivement, il a été reconnu que cette classification devait refléter le plus fidèlement possible les relations naturelles entre les bactéries. Les données phylogénétiques ont donc été incluses dans ces approches de taxonomie polyphasique. Ces approches étant susceptibles d'avoir l'agrément d'un maximum de bactériologistes, J.P. Euzéby propose de traduire "polyphasic taxonomy" par "taxonomie mixte et consensuelle" (96). Les informations génotypiques, génomiques et phylogénétiques sont fournies par l'analyse des acides nucléiques via différentes méthodes, tandis que les informations phénotypiques sont déterminées via les protéines et leurs fonctions ou en utilisant d'autres marqueurs chimiotaxonomiques. La combinaison des résultats obtenus de ces différents niveaux cellulaires permet une classification consensus des microorganismes étudiés.

Cette approche intègre les différents éléments la composant de manière variable. Dans certains cas, les données génétiques ont permis l'éclatement des genres bactériens et la reclassification de certaines espèces dans des genres différents. Ainsi, le genre *Peptostreptococcus* a été divisé en trois nouveaux genres bactériens, *Peptoniphilus*, *Anaerococcus* et *Gallicola*, qui ont été définis sur la base des séquences nucléotidiques des gènes codant l'ARNr 16S mais aussi en tenant compte de la structure du peptidoglycane et du métabolisme bactérien (pouvoir glucidolytique, production d'acide butyrique) (100). A l'inverse, pour les bactéries d'intérêt médical ou vétérinaire, l'écologie et/ou le pouvoir pathogène peuvent prendre le pas sur les critères génétiques, ce qui conduit parfois à conserver des nomenclatures distinctes pour des taxons très proches sur le plan génétique (96). C'est le cas par exemple d'*E. coli* et des quatre espèces de *Shigella* qui, présentant toutes (exceptée *Shigella boydii* sérotype 13) une homologie de leurs ADN supérieure à 70%, auraient du se trouver regroupées en une seule et même espèce au lieu des cinq actuellement existantes (30). Ce regroupement semble ne pas avoir eu lieu uniquement pour éviter la confusion qu'il aurait semée au sein de la communauté médicale.

Cette approche polyphasique a considérablement modifié la perception que les taxonomistes bactériens avaient des relations entre divers groupes de microorganismes. L'association de plusieurs techniques appliquées à plusieurs caractères permet de révéler à la fois des diversités génétiques au sein de groupes bactériens considérés jusqu'alors comme homogènes et des relations taxonomiques entre groupes très éloignés (377). L'extrapolation de ce concept à la majorité des taxons bactériens est déjà amorcée et l'on commence même à parler d'identification polyphasique et de classification polyphasique. Actuellement l'identification de bactéries inconnues passe obligatoirement par l'application de ce concept de taxonomie mixte et consensuelle faisant appel à une combinaison des différentes techniques décrites précédemment, car cette approche est actuellement la plus satisfaisante scientifiquement (215).

5. Les classifications actuelles

De 200 nouvelles espèces annuelles dans les années 1990, nous arrivons actuellement à près de 600 nouveaux noms décrits en 2008, aboutissant début août 2009 à un total d'environ 10 100 espèces bactériennes validées depuis 1980. Il est donc difficilement concevable de pouvoir assimiler toutes ces nouveautés et/ou reclassifications, aussi en pratique courante il est possible d'avoir recours à des bases de données dont les deux principales sont les suivantes :

- un ouvrage de systématique bactérienne, le *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, qui est très utilisé par les bactériologistes, bien que celui-ci soit non officiel et rarement réactualisé.
- une base de données informatisée créée en 1997 par J.P. Euzéby, disponible sur Internet depuis 1998 sous la dénomination « *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature* » (ou LPSN) sur le site suivant : <http://www.bacterio.cict.fr> (99) et mise à jour régulièrement.

Il est également possible d'utiliser la base de données du site *NCBI Taxonomy Browser* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=taxonomy>) qui contient les noms de tous les organismes représentés dans la *GenBank* par au moins une séquence nucléotidique ou protéique. Ce site donne un aperçu de la nomenclature et de la classification avec l'historique

des différents noms pour chaque espèce ainsi qu'un renvoi à la publication de description ou un avertissement si l'espèce n'a pas été validée.

Enfin, une classification actualisée peut être accessible sur les sites de différentes collections de souches comme par exemple la collection allemande DSMZ (*Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen*) qui donne accès à une nomenclature mise à jour mensuellement et que l'on peut télécharger (<http://www.dsmz.de/>).

a) Le *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*

En 1923, David Bergey, Professeur de Bactériologie à l'Université de Pennsylvanie, a publié une classification des bactéries qui pouvait être utilisée pour l'identification des espèces bactériennes, le *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, qui en est actuellement à sa 9^{ème} édition (<http://www.bergeys.org/>). Puis est apparu un ouvrage beaucoup plus détaillé contenant les descriptions de toutes les espèces bactériennes identifiées, le *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Ce livre de référence des taxonomistes bactériens reposait jusqu'à récemment sur la classification phénotypique des bactéries c'est-à-dire sur leurs caractères apparents et ne fournissait aucun détail sur l'évolution naturelle des bactéries les unes par rapport aux autres. Ainsi, le règne *Procaryotae* du *Bergey's Manual* correspondait au règne *Monera* défini par Whittaker et rassemblait non seulement toutes les espèces bactériennes, mais aussi les organismes appartenant désormais au domaine *Archaea*. Ce manuel, divisé en quatre volumes et 33 sections, regroupait des bactéries ayant en commun quelques caractères facilement déterminables (forme, morphologie, coloration de Gram, métabolisme respiratoire, mobilité, présence d'endospores, ...). Les réponses à la coloration de Gram jouaient un rôle particulièrement important dans cette classification qui distinguait principalement les bactéries à Gram positif des bactéries à Gram négatif.

L'utilisation des séquences des gènes d'ARNr, tout particulièrement celles de l'ADNr 16S, est à l'origine d'un des plus grands bouleversements survenus dans l'histoire de la microbiologie. La classification phylogénétique basée sur l'ARNr 16S est présentée dans la nouvelle édition du *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Les procaryotes sont alors divisés en deux domaines *Archaea* et *Bacteria*. Les niveaux de hiérarchisation restent les mêmes que pour la classification phénotypique excepté pour le niveau le plus élevé qui est le phylum. Cette seconde édition est publiée en plusieurs volumes. Le premier concerne les archaebactéries, les

bactéries des branches les plus anciennes et les bactéries phototrophes (119). Le second cible les *Proteobacteria* (117) alors que le troisième, axé sur les *Firmicutes*, et le quatrième, traitant de dix phyla (*Bacteroidetes*, *Planctomycetes*, *Chlamydiae*, *Spirochaetes*, *Fibrobacteres*, *Fusobacteria*, *Acidobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Dictyoglomi* et *Gemmatimonadetes*) sont en cours d'édition. Les manuscrits de ces deux derniers volumes sont actuellement disponibles en accès libre sur Internet à l'adresse <http://www.bergeys.org/outlines.html>. Enfin, un cinquième volume sur les *Actinobacteria* est prévu pour 2010.

Depuis 2001, des versions réactualisées de cette classification, gratuitement accessibles en ligne, appelées "Taxonomic Outline of the Prokaryotes", sont également disponibles sur le site www.cme.msu.edu/Bergeys/. En 2007, un nouveau projet a vu le jour et a entraîné la transformation de ce résumé taxonomique. Il s'intitule actuellement "Taxonomic Outline of the *Bacteria* and *Archaea*" (TOBA) et est basé sur une phylogénie à partir des séquences d'ADNr 16S des souches types des différentes espèces validées (<http://www.taxonomicoutline.org/>). L'augmentation croissante des séquences et des espèces décrites entraîne un accroissement des données disponibles qui est résumé dans le Tableau 1.

Tableau 1. Nombre de taxons inclus dans les trois dernières versions en ligne du *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*.
D'après Garrity et coll. (2004, 2005 et 2007) (116-118).

Rang	<i>Taxonomic Outline of the Prokaryotes</i>		
	version 5.0	version 6.0	version 7.7
Domaine	2	2	2
Phylum	26	27	27
Classe	42	42	44
Ordre	94	94	97
Famille	244	249	260
Genre	1253	1320	1553
Espèce	6747	7158	8233

b) La *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature* (LPSN)

La citation d'un nom sur cette liste signifie que la description du taxon est conforme aux règles du Code de Nomenclature (193) et que la nomenclature proposée a fait l'objet d'une publication validante. Pour chacun des taxons présentés figurent la nomenclature type (ordre type, genre type, espèce type ou souche type) ainsi que les références complètes de la publication descriptive. Il faut à ce propos souligner l'importance de deux articles publiés par

J.P. Euzéby qui explicitent l'ensemble des sigles utilisés dans ces listes (97, 99). Par exemple, une flèche signifie que la description d'un taxon a été modifiée et de nombreuses notes apportent les informations complémentaires nécessaires à une compréhension optimale. Cette liste présente, alphabétiquement et chronologiquement, la nomenclature et les changements de nomenclature valides; elle est mise à jour à chaque parution d'un nouveau volume de l'IJSEM, c'est à dire mensuellement.

c) Les règles de description et de publication des nouveaux organismes

Le Comité International de Systématique des Procaryotes (ou ICSP) créé dans les années 1970 est constitué de sous-comités de taxonomie qui ont pour fonction d'établir les recommandations minimales pour la description d'un nouveau taxon incluant la liste des caractères à évaluer et des méthodes nécessaires à cette description. Ces recommandations sont très bien définies pour certains groupes bactériens comme *Brucella* spp., *Helicobacter* spp. ou les mycobactéries. Pour les genres non documentés, l'ICSP recommande de suivre les recommandations du groupe le plus proche. Les recommandations concernant les bactéries sporulées aérobies strictes viennent d'être publiées mais ne s'appliquent pas aux bactéries du genre *Clostridium* et apparentées (212).

Il existe cependant un certain nombre de règles valables pour tous les taxons (96, 316) :

- la description d'une espèce doit être effectuée selon un plan cohérent et standardisé, défini et réglementé par la règle 27(2) du Code de Nomenclature. La description d'une espèce doit comporter tous les caractères, phénotypiques et génotypiques, permettant un diagnostic différentiel. Les techniques utilisées doivent être décrites de telle manière que tous les microbiologistes soient capables de les reproduire et d'obtenir les mêmes résultats.
- toute description d'une nouvelle espèce doit inclure au minimum la séquence complète de l'ADNr 16S de la souche type. Les séquences des gènes ribosomiques 16S doivent avoir une taille minimale de 1300 pb et présenter moins de 0.5% de positions ambiguës.
- la détermination du contenu en G+C doit être effectuée pour la souche type de l'espèce type d'un nouveau genre (G+C% optionnel si la nouvelle espèce appartient à un genre déjà décrit).

- l'étude des pourcentages d'hybridation ADN-ADN ainsi que la stabilité thermique des hybrides demeurent la référence pour définir une espèce bactérienne lorsque les séquences des ARNr 16S des souches présentent plus de 97% d'homologie. Cependant, de par la lourdeur de cette technique, l'utilisation d'autres techniques permettant l'obtention de résultats comparables à ceux des hybridations ADN-ADN est encouragée.
- la description d'une nouvelle espèce doit reposer, autant que possible, sur plusieurs souches.
- la souche type de toute nouvelle espèce doit obligatoirement avoir été déposée dans deux collections reconnues de deux pays distincts.

Ces règles ne sont que des recommandations de l'ICSP et, bien qu'il soit préférable de les respecter, la nomenclature d'une espèce ne peut être considérée comme illégitime au prétexte que la description de l'espèce ne respecte pas une ou plusieurs recommandations formulées par les comités *ad hoc* (96). C'est pour cela que de nombreuses espèces sont encore décrites avec seulement une souche. Il est alors difficile de conclure sur les caractéristiques de ces espèces qui n'ont été déterminées que sur un seul représentant.

6. La nomenclature bactérienne

La nomenclature est la branche de la systématique la plus ignorée des scientifiques. Elle est souvent considérée comme un ensemble de règles apparemment compliquées, obscures, relevant plus du domaine juridique et du domaine linguistique que du domaine scientifique. Pourtant, loin d'être ésotérique ou absurde, la nomenclature est vitale pour la systématique. Son but est d'attribuer un nom à un taxon, permettant de le désigner sans être obligé de décrire tous ses caractères (98).

Il existe des règles universelles gouvernant la nomenclature bactérienne qui sont rassemblées dans le Code International de Nomenclature des Bactéries établi par l'ICSP. La dernière version de ce Code a été rédigée en 1990 (193). Seule la commission judiciaire de l'ICSP est apte à valider les propositions de modification du Code International de Nomenclature des Bactéries. Toute modification est publiée dans l'IJSEM. Chaque espèce est représentée par une souche type et chaque genre par une espèce type. La nomenclature suit le système

binomial découlant des lois de Linné : un nom latin de genre avec la première lettre en majuscule précède le nom d'espèce écrit en minuscules. C'est souvent une épithète spécifique qui réfère à une propriété importante de la bactérie ou à l'histoire de sa découverte (339). Le principe de priorité prévoit que le nom correct d'un taxon est celui qui lui a été attribué en premier, à condition que celui-ci soit valide. Un nom d'espèce n'est valide qu'à la condition qu'il soit publié dans la revue IJSEM ou qu'il figure sur une liste de validation régulièrement publiée par l'ICSP dans cette même revue (334). Depuis 1991, la commission judiciaire de l'ICSP publie également des listes de notification citant toutes les nouvelles nomenclatures et les modifications de nomenclature validement publiées dans le précédent numéro de l'IJSEM. La liste des noms approuvés pour les taxons décrits avant 1980 a été publiée dans "*Approved Lists of Bacterial Names*" (306) et "*Approved Lists of Bacterial Names. Amended Edition*" (307). En parallèle du nom latin, les microorganismes peuvent avoir un ou plusieurs noms informels ou vernaculaires : ces noms rappellent le microbiologiste qui les a décrits, l'affection qu'ils causent ou une caractéristique biochimique ou culturelle.

Le Code de Nomenclature reconnaît les groupes taxonomiques suivants : classe, sous-classe, ordre, sous-ordre, famille, sous-famille, tribu, sous-tribu, genre, sous-genre, espèce et sous-espèce. Bien que certains phyla aient été cités dans des *Approved Lists of Bacterial Names*, les rangs supérieurs à la classe ne sont pas réglementés par le Code International de Nomenclature des Bactéries. Les "*Candidatus*", correspondant à des taxons bien caractérisés mais non cultivables, ne sont pas non plus régis par ce code mais l'ICSP a reconnu la validité de ce concept (99). Le terme *Incertae sedis* ("de siège incertain") est utilisé pour désigner un taxon dont la position dans la classification n'est pas encore totalement définie.

Cette nomenclature actualisée est disponible dans les bases de données citées dans le chapitre précédent.

Les Firmicutes : un phylum en plein remaniement

I. GENERALITES

Le phylum, appelé aussi division ou embranchement, est le rang taxonomique le plus haut dans les trois domaines du vivant et par conséquent, la seule caractéristique phylogénique que partagent deux bactéries de deux différents phyla est d'appartenir au domaine *Bacteria* (173, 243). D'un point de vue phylogénétique, un phylum bactérien est défini comme un groupe de séquences monophylétiques n'étant pas affiliées à un autre phylum mais se situant au sein du domaine *Bacteria* (158). Comme décrit précédemment, l'avènement de la métagénomique a entraîné une explosion de la description de nouveaux phyla qui sont passés de 11 décrits à la fin des années 1980 (367) à plus de quarante en 2004 (292). À ce jour, les banques de données de séquences bactériennes, telles que *Greengenes* (<http://greengenes.lbl.gov>), indiquent une centaine de taxons bactériens de premier niveau pouvant correspondre à la définition du phylum. Parmi eux, seulement une quarantaine ont une nomenclature montrant qu'ils ont fait l'objet d'une description plus ou moins complète. Les autres groupes candidats correspondent souvent à des séquences de clones non cultivés obtenus lors d'études métagénomiques. Ces banques de données confirment l'explosion des phyla bactériens et soulignent la nécessité des travaux de systématique sur les taxons de haut niveau.

Parmi les phyla décrits, nous allons nous intéresser plus particulièrement au phylum complexe des *Firmicutes* qui pose de nombreux problèmes de systématique. Il contient notamment deux groupes bactériens qui vont être étudiés plus en détail dans le cadre de ce travail.

1. Historique et diversité des *Firmicutes*

Le phylum *Firmicutes* (*Firmus cutis* : peau dure) a été décrit en 1978 par Gibbons et coll. comme regroupant les bactéries à Gram positif (123, 243, 306). Il a ensuite été divisé en deux

pour séparer les bactéries à bas G+C% (inférieur ou proche de 55 mol%), de celles à haut G+C% qui sont aujourd'hui classées dans le phylum *Actinobacteria* (271, 314). Ce dernier taxon comprend entre autres les actinomycètes et streptomycètes, les corynébactéries, les mycobactéries, *Nocardia* spp., *Propionibacterium* spp. et *Bifidobacterium* spp.

Initialement basée sur l'étude des caractères phénotypiques, la classification des *Firmicutes* s'est ensuite trouvée bouleversée par l'utilisation des séquences du gène de l'ARNr 16S. Ainsi, selon la seconde édition du *Bergey's Manual* (117), les *Firmicutes* se divisent en trois classes, *Bacilli*, *Clostridia* et *Mollicutes*, comprenant respectivement deux ordres et 17 familles, trois ordres et dix familles, cinq ordres et six familles.

Le phylum *Firmicutes* tel qu'il est décrit par Garrity en 2005 est un phylum hétérogène (117). Comme la plupart des phyla, il groupe des bactéries diverses du point de vue de leur physiologie (aérobies ou anaérobies, phototrophes) et de leur morphologie (bacilles, cocci). De façon plus exceptionnelle, on retrouve dans ce phylum des bactéries présentant différents types de paroi. En effet, même s'ils sont toujours désignés sous le nom de « groupe des bactéries à Gram positif à faible G+C% », les *Firmicutes* comprennent également des bactéries ayant une paroi de type Gram-négatif, c'est à dire possédant une membrane externe, et même des bactéries dépourvues de paroi. Ces dernières, regroupées dans la classe des *Mollicutes*, avaient été rattachées en 2004 au phylum des *Firmicutes* sur la base d'une analyse phylogénétique des séquences protéiques de la phosphoglycérate kinase (370). Cependant, les travaux de Ludwig et coll. (2009) ont rapidement ressorti cette classe des *Firmicutes* pour la transférer dans son phylum d'origine, les *Tenericutes* (216). Par ailleurs, il est intéressant de souligner que l'on retrouve également une diversité au niveau de la structure du peptidoglycane des *Firmicutes* monoderms. En effet, le muropeptide varie considérablement, tant au niveau du type d'acide aminé en position 3 du pentapeptide qu'au niveau de la nature du pont interpeptidique (271).

La structure pariétale des bactéries est considérée comme un caractère phylogénétique fort. En particulier, la dichotomie monoderme (une seule membrane) /diderme (présence d'une membrane externe) reflète des événements évolutifs anciens impliquant les ancêtres communs de chacun des trois domaines du vivant. Gupta et Cavalier-Smith ont ainsi proposé des sub-domaines (niveau phylotaxonomique situé entre le domaine et le phylum) : *Negibacteria* (42) ou *Didermata* (134) pour les bactéries à membrane externe et *Unibacteria* (42) ou *Monodermata* (134) pour les bactéries à paroi de type Gram-positif (Figure 8). Il est

intéressant de souligner qu'une structure de paroi monoderme n'est retrouvée que chez deux phyla d'eubactéries, les *Firmicutes* et les *Actinobacteria*. Au sein des *Firmicutes*, les *Bacilli*, les *Thermolithobacteria* et les '*Erysipelotrichi*' sont entièrement constitués de bactéries monodermes alors que la classe *Clostridia* contient à la fois des bactéries monodermes et didermes. La coexistence dans un même phylum bactérien voire dans une même classe d'organismes présentant cette dichotomie essentielle du monde vivant interpelle et montre la nécessité d'améliorer encore la systématique dans le phylum *Firmicutes*.

En termes d'évolution plus récente, plusieurs lignées ont émergé au sein de ce phylum et elles se regroupent en fonction de leur métabolisme respiratoire. Les branchements les plus anciens sont constitués par des bactéries anaérobies strictes. La capacité d'utiliser l'oxygène est apparue dans une des lignées, menant dans un premier temps à l'apparition de bactéries anaérobies facultatives (streptocoques, lactobacilles, ...) puis, dans un deuxième temps, à l'émergence d'espèces aérobies (staphylocoques, *Listeria* spp., *Bacillus* spp., ...) (314).

Le phylum *Firmicutes* comprend actuellement plus de 300 genres bactériens dont plusieurs ont un rôle important en pathologie humaine ou dans plusieurs domaines des activités humaines (agroalimentaire, industrie, médecine, ...). Une étude récente de la flore digestive humaine montre que près de 80% des espèces bactériennes présentes sont des *Firmicutes* (326). Ce phylum représente un des plus gros challenges pour les taxonomistes en termes de reclassification (314) et de nombreux travaux sont en cours. Cette taxonomie est par ailleurs en perpétuelle évolution avec la description permanente de nouvelles bactéries et de nombreuses reclassifications.

2. Classification actuelle des *Firmicutes*

a) Révisions du phylum *Firmicutes*

Depuis 1980, à travers ses deux éditions et ses différents volumes, le *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* tente de donner et réactualiser la taxonomie des procaryotes. Un des derniers volumes disponibles en ligne concerne justement les *Firmicutes* (http://www.bergeys.org/outlines/Bergeys_Vol_3_Outline.pdf) (216). Utilisant les outils du logiciel ARB (217) appliqués à la base de séquences des petites sous-unités d'ARNr du projet

SILVA (273), Ludwig et coll. ont construit un arbre phylogénétique montrant les relations évolutives entre 14 000 bactéries appartenant au phylum *Firmicutes* et 1 000 représentants d'autres phyla ou d'autres domaines. Cet arbre leur a permis de commencer à réorganiser le phylum *Firmicutes* et à proposer de nombreuses perspectives de reclassification des membres de ce phylum.

En ce qui concerne la classe *Bacilli*, peu de remaniements sont suggérés car, comme cela a été montré par d'autres auteurs, c'est une classe phylogénétiquement bien définie constituée de deux ordres, *Bacillales* et *Lactobacillales*, supportés par des nœuds robustes (223). Dans leur étude, Ludwig et coll. n'intègrent pas la classe *Thermolithobacteria*, regroupant des bacilles à Gram positif thermophiles et chimiolithotrophes, sans doute trop récemment décrite (313). En revanche, ils suggèrent la création d'une nouvelle classe. En effet, lors du transfert des *Mollicutes* dans le phylum *Tenericutes* (216), la famille *Erysipelotrichaceae*, qui était incluse dans ce phylum, a été maintenue au sein des *Firmicutes* d'après les analyses phylogénétiques et la présence d'une paroi de type Gram-positif. Ludwig et coll. proposent que cette famille soit élevée au rang de classe qui se nommerait '*Erysipelotrichi*'. Au sein d'une unique famille, *Erysipelotrichaceae*, ce taxon contiendrait huit genres ainsi que des espèces appartenant initialement aux genres *Clostridium* (dont *C. innocuum*) ou *Eubacterium*. Cette nouvelle classe n'a pas encore été validée par le Comité International de Systématique des Procaryotes et ne figure actuellement ni dans la LPSN ni dans le NCBI Taxonomy Browser.

En ce qui concerne la classe *Clostridia*, Ludwig et coll. suggèrent de nombreux remaniements. Ces résultats confirment les données de travaux antérieurs soulignant la mauvaise classification de très nombreux taxons au sein de cette classe, certains d'entre eux appartenant même à d'autres phyla ou formant de nouveaux phyla. Quatre de ces remaniements sont présentés dans le paragraphe suivant, après quoi nous reviendrons plus particulièrement sur la famille *Clostridiaceae* et les deux groupes sur lesquels a porté notre approche taxonomique mixte et consensuelle.

b) Exemples de remaniements taxonomiques au sein des *Clostridia*

i- Explosion de la famille Syntrophomonadaceae et création du phylum Synergistetes

La famille *Syntrophomonadaceae*, créée en 1993 par Zhao et coll. (378), regroupait des bactéries anaérobies vivant en association syntrophique avec des bactéries méthanogènes. Elles sont isolées préférentiellement d'environnements où la matière organique est totalement dégradée en méthane ou CO₂ tels que les réacteurs anaérobies, les sources d'eau chaude ou les fosses sous-marines (173, 310). La source d'énergie de ces bactéries est l'oxydation d'acides carboxyliques normalement couplée à la production d'hydrogène moléculaire ou de formate qui sera consommé par la bactérie méthanogène associée. Cette famille, appartenant au phylum *Firmicutes* et à l'ordre *Clostridiales*, contenait jusqu'à récemment 16 genres bactériens (*Syntrophomonas*, *Aminiphilus*, *Aminobacterium*, *Aminomonas*, *Anaerobaculum*, *Anaerobranca*, *Caldicellulosiruptor*, *Carboxydocella*, *Dethiosulfovibrio*, *Pelospora*, *Syntrophothermus*, *Thermaerobacter*, *Thermanaerovibrio*, *Thermohydrogenium*, *Thermosyntropha*, *Thermovirga*) (72, 118).

Des travaux récents soulignent l'incohérence de cette famille qui regroupe des bactéries pouvant être phylogénétiquement très éloignées et qui ne correspondent plus à la description initiale, en particulier en ce qui concerne la notion de métabolisme syntrophique. Lors de la description en 2007 du genre *Jonquetella*, l'équipe montpelliéraine DIBOP (Diversité Génomique et Biologique des Bactéries Opportunistes, EA 3755) d'Estelle Jumas-Bilak a proposé la reclassification de plusieurs membres des *Syntrophomonadaceae* dans un nouveau phylum nommé *Synergistetes* (169, 173). Leurs analyses phylogénétiques ont montré que ce nouveau phylum était constitué des genres *Aminiphilus*, *Aminomonas*, *Anaerobaculum*, *Aminobacterium*, *Dethiosulfovibrio*, *Jonquetella*, *Thermanaerovibrio* et *Thermovirga* issus de la famille *Syntrophomonadaceae* ainsi que de l'espèce *Synergistes jonesii*, qui avait été classée dans le phylum *Deferribacteres* (3). De plus, ces résultats sont appuyés par une ultrastructure de paroi diderme au sein de ce nouveau phylum *Synergistetes*, alors que les autres membres des *Syntrophomonadaceae* possèdent une paroi de type monoderme, sans membrane externe. La très fine couche de peptidoglycane présente dans la paroi de ces derniers peut expliquer la coloration de Gram négative observée pour certains membres de cette famille (173). L'analyse des relations évolutives de ces *Syntrophomonadaceae* montre qu'ils appartiennent bien au phylum *Firmicutes* au sein duquel ils forment un clade avec des branchements profonds mais supportés par de faibles valeurs de bootstrap. Associée aux résultats phylogénétiques, le type de paroi a été un argument supplémentaire menant l'équipe montpelliéraine à proposer d'élever le rang taxonomique du groupe formé par l'ensemble de ces genres. Cette reclassification a permis de regrouper de façon cohérente les genres

syntrophiques *Syntrophomonas*, *Syntrophothermus* et *Thermosyntropha* ainsi que le genre *Pelospora* dans la famille *Syntrophomonadaceae sensu stricto*.

Ces travaux sont en accord avec ceux obtenus par Ludwig et coll. (216) dans le cadre de la réorganisation du phylum des *Firmicutes*. Ils décrivent également une famille *Syntrophomonadaceae* constituée des quatre genres cités ci-dessus et transfèrent les autres genres dans les familles *Incertae sedis* III, XIV, XV et XVII (Figure 18).

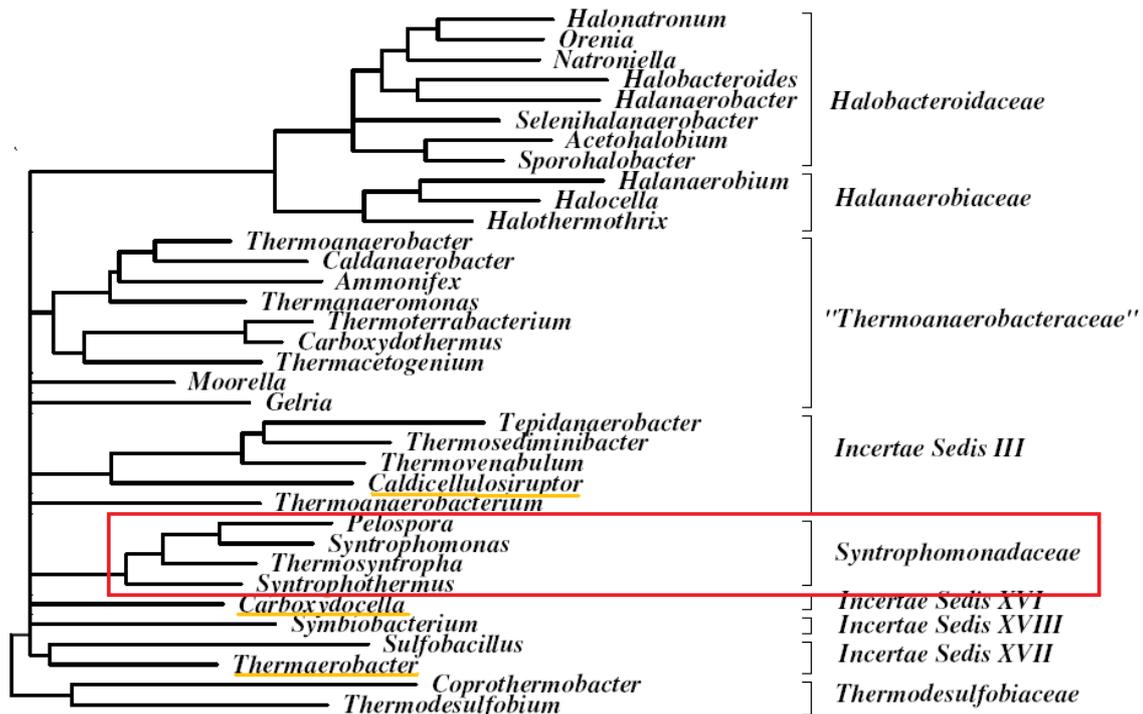


Figure 18. Dendrogramme illustrant les relations phylogénétiques de la famille *Syntrophomonadaceae* et des ordres *Halanaerobiales* et *Thermoanaerobacterales* (216).

Les genres surlignés en orange appartenaient à la famille *Syntrophomonadaceae* selon Garrity et coll. (2007) (118).

ii- Les Lachnospiraceae, une famille qui s'agrandit

La famille *Lachnospiraceae*, phylum *Firmicutes*, ordre *Clostridiales*, comprend actuellement 20 genres bactériens constitués de bacilles ou cocci possédant une paroi de type Gram-positif (99, 216). Les travaux de Ludwig et coll. montrent que de nombreuses espèces de *Clostridium* (n=32), d'*Eubacterium* (n=9), de *Ruminococcus* (n=7) ainsi que *Desulfotomaculum guttoideum* sont phylogénétiquement reliés à cette famille et devraient y être reclassés. Ces problèmes de classification avaient déjà été pointés du doigt lors de la description des genres *Oribacterium* et *Moryella* appartenant à cette famille (35, 36). En effet, l'étude

phylogénétique des isolats appartenant à la nouvelle espèce *Moryella indoligenes* montre que cette dernière constitue un groupe robuste avec les représentants de la famille *Lachnospiraceae*, ce groupe contenant également d'autres espèces de *Clostridium* ou d'*Eubacterium* (Figure 19).

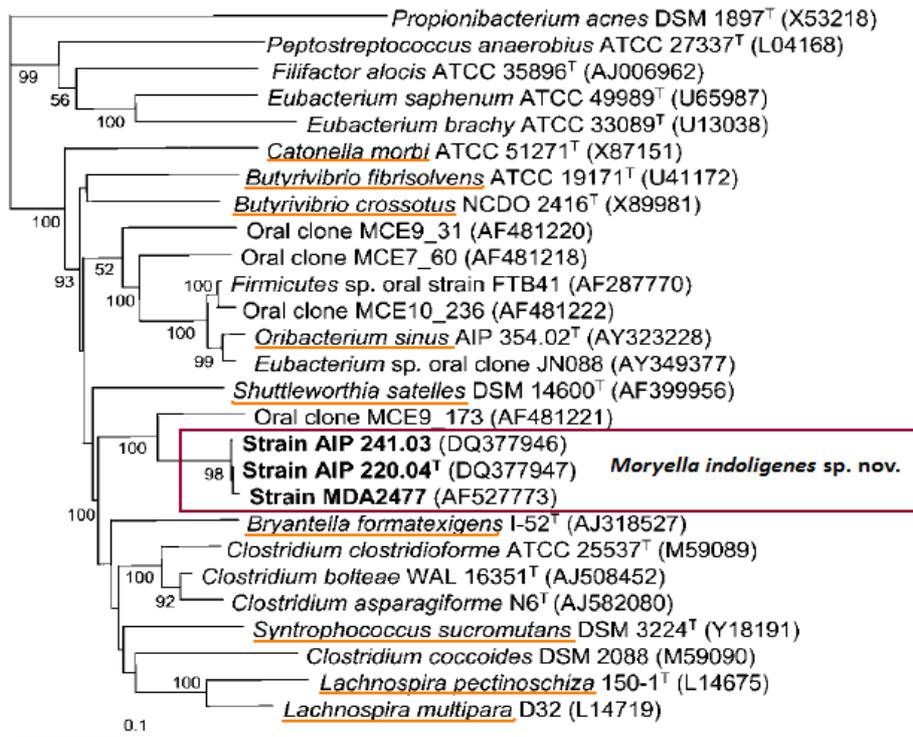


Figure 19. Arbre phylogénétique montrant les relations entre les séquences des trois isolats formant la nouvelle espèce *Moryella indoligenes* et celles des bactéries apparentées. Cet arbre, basé sur les séquences d'ADNr 16S, a été construit par la méthode de Neighbor-Joining. Les espèces soulignées en orange appartiennent à la famille des *Lachnospiraceae* (36). L'échelle représente dix substitutions pour 100 nucléotides.

iii- Reclassification des cocci à Gram négatif anaérobies de la famille Veillonellaceae

La famille *Veillonellaceae*, anciennement nommée *Acidaminococcaceae*, regroupe des cocci et des bacilles ayant une paroi de type Gram-négatif alors qu'elle se situe phylogénétiquement dans le phylum *Firmicutes*, défini comme le phylum des bactéries à Gram positif. Elle comprend 31 genres si l'on inclut *Megamonas* spp. qui est affilié aux *Veillonellaceae* dans la LPSN ainsi que dans le NCBI Taxonomy Browser, alors qu'il ne figure pas dans les deux dernières éditions "outline" du *Bergey's Manual* (116, 216). Parmi ces genres, plusieurs changements ont eu lieu en termes de classification. Par exemple, le genre *Dialister* constitué de bacilles à Gram négatif était initialement classé dans la famille *Bacteroidaceae*, phylum

Bacteroidetes. L'analyse phylogénétique des séquences du gène de l'ARNr 16S a montré que, malgré la présence d'une membrane externe dans sa paroi, ce genre appartenait au phylum *Firmicutes* (364). En effet, il forme un groupe avec les représentants de la branche *Sporomusa* au sein du cluster IX des *Clostridium* défini par Collins et coll. en 1994 (50). Cet auteur soulevait déjà à l'époque le problème lié à l'hétérogénéité extraordinaire du genre *Clostridium* et aux divers problèmes de classification.

Dans le cadre de la description de *Negaticoccus* sp. nov., nouveau genre de cocci à Gram négatif anaérobies stricts appartenant à la famille *Veillonellaceae*, l'équipe montpelliéraine DIBOP a étudié les relations phylogénétiques entre les membres de cette famille ainsi qu'avec des représentants des différents phyla (223). Les différents arbres construits ont permis de mettre en évidence que les membres de cette famille formaient un clade avec un branchement profond au sein des *Firmicutes*. En effet, le groupe correspondant aux *Veillonellaceae* branche de façon robuste (bootstrap de 99%) et monophylétique à un niveau équivalent par rapport aux autres classes de ce phylum (*Bacilli*, *Thermolithobacteria* et '*Erysipelotrichi*'). Ce clade est clairement distinct de la classe *Clostridia* dans laquelle les *Veillonellaceae* étaient initialement classées. Marchandin et coll. (2009) proposent donc d'élever ce taxon au rang de classe qu'ils nomment *Negativicutes* classis nov., car regroupant les *Firmicutes* possédant une paroi de type Gram-négatif avec une membrane externe observée en microscopie électronique. Par ailleurs, au sein de cette classe, ils redéfinissent la famille *Veillonellaceae*, restreinte à six genres ainsi qu'une nouvelle famille *Acidaminococcaceae* composée de quatre genres. Les 21 autres genres appartiennent à des familles qu'il reste à définir.

iv- Du rangement à prévoir dans la famille Peptostreptococcaceae

La famille *Peptostreptococcaceae* nous intéresse particulièrement car elle comprend entre autres l'espèce *Tissierella praeacuta*, un des exemples de reclassification proposés dans ce travail. Cette famille, appartenant à l'ordre *Clostridiales*, est constituée selon la classification consultée de trois à 12 genres, comme résumé dans le tableau suivant.

Tableau 2. Genres bactériens inclus dans la famille *Peptostreptococcaceae* selon la classification consultée : celle du *Bergey's Manual*, documents en ligne de 2004 (116) et de 2009 (216), celle du *NCBI Taxonomy Browser* ou la LPSN.

Genres bactériens	Année de description	Bergey's outline 2004	Bergey's outline 2009	NCBI Taxonomy Browser	LPSN
<i>Anaerococcus</i>	2001	×	<i>Incertae sedis</i> XI	<i>Incertae sedis</i> XI	×
<i>Filifactor</i>	1994	×	×	×	×
<i>Fingoldia</i>	2000	×	<i>Incertae sedis</i> XI	<i>Incertae sedis</i> XI	×
<i>Fusibacter</i>	1999	×	<i>Incertae sedis</i> XII	<i>Incertae sedis</i> XII	×
<i>Gallicola</i>	2001	×	<i>Incertae sedis</i> XI	<i>Incertae sedis</i> XI	×
<i>Helcococcus</i>	1993	×	<i>Incertae sedis</i> XI	<i>Incertae sedis</i> XI	×
<i>Parvimonas</i>	2000	×	<i>Incertae sedis</i> XI	<i>Incertae sedis</i> XI	×
<i>Peptoniphilus</i>	2001	×	<i>Incertae sedis</i> XI	<i>Incertae sedis</i> XI	×
<i>Peptostreptococcus</i>	1036	×	×	×	×
<i>Sedimentibacter</i>	2002	×	<i>Incertae sedis</i> XI	<i>Incertae sedis</i> XI	×
<i>Sporanaerobacter</i>	2002	×	<i>Incertae sedis</i> XI	<i>Incertae sedis</i> XI	×
<i>Tissierella</i>	1986	×	<i>Incertae sedis</i> XI	<i>Incertae sedis</i> XI	×
<i>Tepidibacter</i>	2003	<i>Clostridiaceae</i>	×	×	<i>Clostridiaceae</i>
<i>Sporacetigenium</i>	2006	NP	×	<i>Clostridiaceae</i>	<i>Clostridiaceae</i>

NP, genre bactérien non publié ou publié trop récemment pour être inclus dans la classification.

Parmi les 12 genres définis dans la classification de la seconde édition du *Bergey's* (117), Ludwig et coll. ont transféré la plupart d'entre eux dans une nouvelle famille dénommée *Incertae sedis* XI (Figure 20), notamment les genres *Tissierella* et *Sporanaerobacter* (216).

Ce transfert a permis d'obtenir une famille *Peptostreptococcaceae sensu stricto* beaucoup plus homogène et monophylétique constituée de quatre genres principaux (*Filifactor*, *Peptostreptococcus*, *Tepidibacter* et *Sporacetigenium*). Cependant, on y retrouve associées 13 espèces de *Clostridium* (*C. bartlettii*, *C. bifermentans*, *C. difficile*, *C. ghonii*, *C. glycolycum*, *C. hiranonis*, *C. irregulare*, *C. litorale*, *C. lituseburense*, *C. manganotii*, *C. paradoxum*, *C. sordellii* et *C. sticklandii*) ainsi que deux espèces d'*Eubacterium* (*E. tenue* et *E. yurii*) qu'il faudrait renommer. Ceci souligne un problème de nomenclature important lié à l'évolution perpétuelle de la taxonomie bactérienne dont les reclassifications : peut-on faire disparaître l'espèce *Clostridium difficile* au profit de *Peptostreptococcus difficile* ? Cette question s'est posée à plusieurs reprises pour des grands pathogènes humains tels *Yersinia pestis* ou *Shigella dysenteriae* qui ne sont, d'un point de vue évolutif, que des clones particuliers des espèces *Yersinia pseudotuberculosis* et *E. coli*, respectivement (30, 96). La systématique et en particulier la nomenclature doivent certes refléter au mieux les relations naturelles et fondamentales entre les êtres vivants, mais elles doivent aussi rester utiles dans différents domaines d'application. Par exemple, l'impact en médecine de routine de certains

changements de nomenclature serait tel qu'ils ne sont pas envisageables, du moins pour le moment...

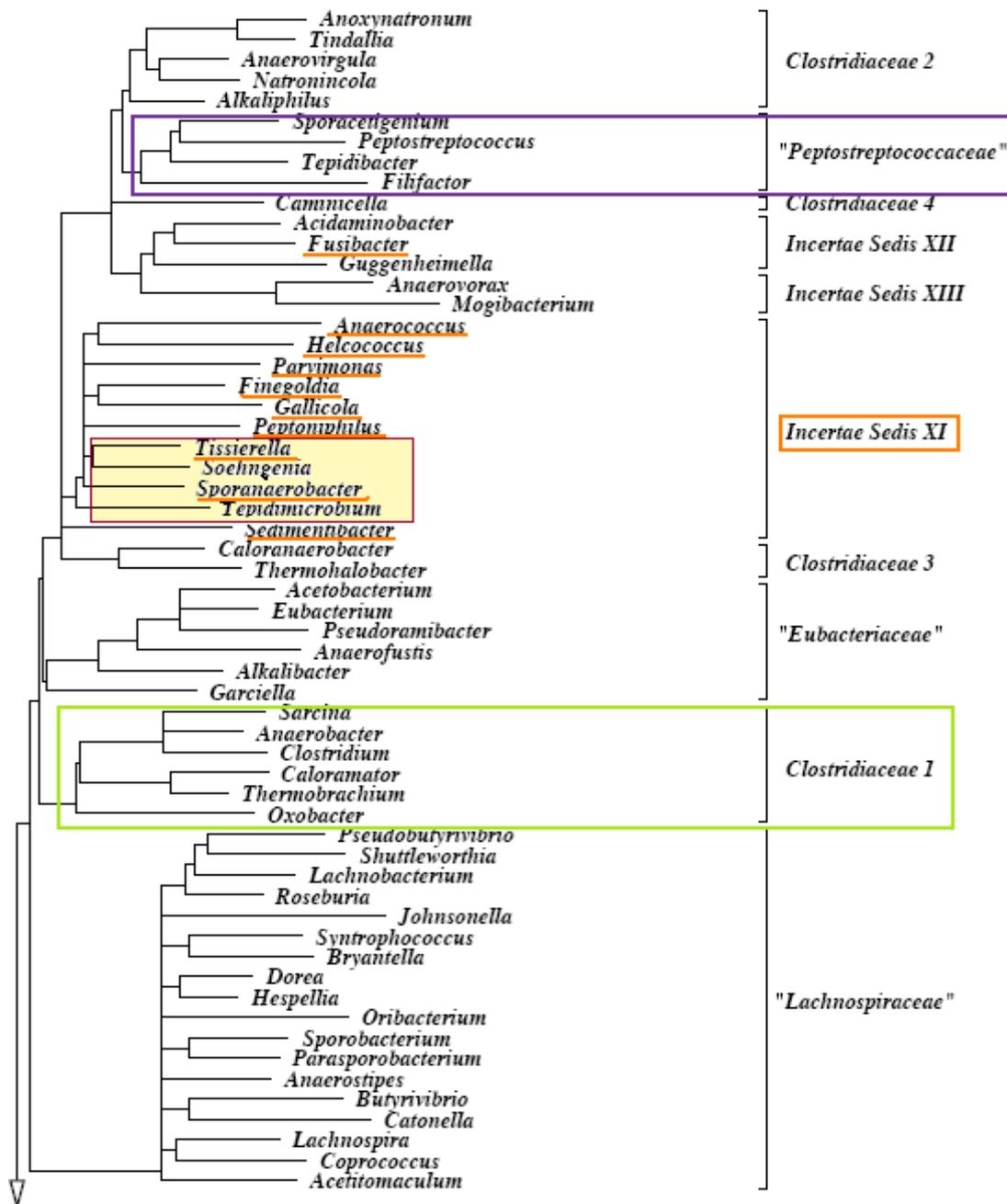


Figure 20. Dendrogramme illustrant les relations phylogénétiques d'une partie des membres de l'ordre *Clostridiales* au sein de la classe *Clostridia* (216). Les genres entourés en violet constituent la famille *Peptostreptococcaceae sensu stricto*. Les genres surlignés en orange appartenaient à cette famille selon Garrity et coll. (2007). Les genres entourés en vert constituent la famille *Clostridiaceae sensu stricto*. (118).

II. CAS PARTICULIER DES *CLOSTRIDIUM* SPP.

1. Les *Clostridiaceae* : une bien grande famille !

La famille *Clostridiaceae* comprend actuellement 28 genres bactériens mais, comme plusieurs membres de la classe *Clostridia*, c'est un taxon qui a subi de nombreux remaniements et certains d'entre eux sont présentés dans le Tableau 3. Certaines de ces reclassifications ont déjà été validées, d'autres ont été proposées, notamment par Ludwig et coll. qui montrent que cette famille est en fait scindée en quatre sous-ensembles (*Clostridiaceae* 1 à 4) (Figure 20). Le sous-ensemble *Clostridiaceae* 1 regroupent les genres *Anaerobacter*, *Caloramator*, *Clostridium*, *Oxobacter*, *Sarcina* et *Thermobrachium* qui avaient déjà été définis par Wiegel et coll. (2006) (363) comme étant les seuls genres constituant la famille *Clostridiaceae sensu stricto*. Les anciens membres de cette famille n'appartenant pas à un de ces sous-ensembles devront être intégrés dans d'autres familles, voire d'autres classes.

Qu'est-ce qui peut expliquer la nécessité de tels remaniements au sein de cette famille bactérienne ? La principale réponse est liée au genre *Clostridium*.

Le genre *Clostridium* a été décrit pour la 1^{ère} fois par Prazmowski en 1880 et est actuellement classé dans le phylum *Firmicutes*, classe *Clostridia*, ordre *Clostridiales* et famille *Clostridiaceae* (40). Il est constitué de bactéries largement répandues dans le sol, l'eau et les sédiments marins. Parmi elles, de grands pathogènes humains tels *Clostridium tetani* ou *Clostridium botulinum*, mais également de nombreux organismes ayant des applications industrielles ou biotechnologiques (132). Avant l'ère de l'ARNr 16S, le genre *Clostridium* était défini par un métabolisme anaérobie strict, la formation de spores, la structure de paroi de type Gram-positif et l'absence de réduction des sulfates (363). Ainsi, pendant des années, tout bacille à Gram positif anaérobie strict et sporulé était un *Clostridium* sp., menant à 195 le nombre d'espèces décrites à ce jour (99). Le genre *Clostridium* défini sur le phénotype ne forme pas un clade au sens de groupe monophylétique robuste. Il est évident dans ce cas qu'une approche mixte est nécessaire à une meilleure classification des différents membres de ce groupe.

Tableau 3. Genres bactériens inclus dans la famille *Clostridiaceae* selon la classification consultée : celle du *Bergey's Manual*, documents en ligne de 2004 (116) et de 2009 (216), celle du *NCBI Taxonomy Browser* ou la *LPSN*.

Genre bactérien	Année de description	Bergey's outline 2004	Bergey's outline 2009	NCBI Taxonomy Browser	LPSN
<i>Clostridium</i>	1880	×	×	×	×
<i>Acetivibrio</i>	1980	×	<i>Ruminococcaceae</i>	<i>Ruminococcaceae</i>	<i>Ruminococcaceae</i>
<i>Acidaminobacter</i>	1985	×	<i>Incertae sedis XII</i>	<i>Incertae sedis XII</i>	×
<i>Alkaliphilus</i>	2001	×	×	×	×
<i>Anaerobacter</i>	1996	×	×	×	×
<i>Anaerospobacter</i>	2007	NP	NP	<i>Clostridium</i> sp.	×
<i>Anoxynatronum</i>	2003	NP	×	×	×
<i>Anaerotruncus</i>	2004	×	<i>Ruminococcaceae</i>	<i>Ruminococcaceae</i>	<i>Ruminococcaceae</i>
<i>Marvinbryantia</i>	2004	×	<i>Lachnospiraceae</i>	<i>Lachnospiraceae</i>	<i>Lachnospiraceae</i>
<i>Butyricoccus</i>	2008	NP	NP	×	×
<i>Caldanaerocella</i>	—*			×	
<i>Caloramator</i>	1994	×	×	×	×
<i>Caloranaerobacter</i>	2001	×	×	×	×
<i>Camnicella</i>	2002	×	×	×	×
<i>Clostridiisalibacter</i>	2008	NP	NP	×	×
<i>Coprobacillus</i>	2000	×	<i>Erysipelotrichaceae</i>	<i>Erysipelotrichaceae</i>	<i>Erysipelotrichaceae</i>
<i>Dorea</i>	2002	×	<i>Lachnospiraceae</i>	<i>Lachnospiraceae</i>	<i>Lachnospiraceae</i>
<i>Ethanoligenens</i>	2006	NP	<i>Ruminococcaceae</i>	×	×
<i>Faecalibacterium</i>	2002	×	<i>Ruminococcaceae</i>	<i>Ruminococcaceae</i>	<i>Ruminococcaceae</i>
<i>Garciella</i>	2003	NP	<i>Eubacteriaceae</i>	<i>Eubacteriaceae</i>	×
<i>Geosporobacter</i>	2007	NP	NP	×	×
<i>Guggenheimella</i>	2005	NP	<i>Incertae sedis XII</i>	<i>Incertae sedis XII</i>	×
<i>Hespellia</i>	2004	×	<i>Lachnospiraceae</i>	<i>Lachnospiraceae</i>	<i>Lachnospiraceae</i>
<i>Lactonifactor</i>	2007	NP	NP	×	×
<i>Linmingia</i>	—*			×	
<i>Lutispora</i>	2008	NP	NP	<i>Clostridium</i> sp.	×
<i>Natronincola</i>	1999	×	×	×	×
<i>Oxobacter</i>	1994	×	×	×	×
<i>Parasporobacterium</i>	2004	×	<i>Lachnospiraceae</i>	<i>Lachnospiraceae</i>	<i>Lachnospiraceae</i>
<i>Sarcina</i>	1842	×	×	×	×
<i>Soehngenia</i>	2003	×	<i>Incertae sedis XI</i>	<i>Incertae sedis XI</i>	×
<i>Sporacetigenium</i>	2006	NP	<i>Peptostreptococcaceae</i>	×	×
<i>Tepidibacter</i>	2003	×	<i>Peptostreptococcaceae</i>	<i>Peptostreptococcaceae</i>	×
<i>Tepidimicrobium</i>	2006	NP	<i>Incertae sedis XI</i>	×	×
<i>Thermobrachium</i>	1996	×	×	×	×
<i>Thermohalobacter</i>	2000	×	×	×	×
<i>Thermotalea</i>	2009	NP	NP	×	×
<i>Tindallia</i>	1999	×	×	×	×

* —, genre bactérien n'ayant jamais été publié en dehors de la *GenBank*.

NP, genre bactérien non publié ou publié trop récemment pour être inclus dans la classification.

Le genre *Clostridium* représente un groupe d'organismes phylogénétiquement très diversifiés avec un G+C% allant de 21 à 54% (69, 165). La première étude phylogénétique étendue de ce genre (77 souches représentant 56 espèces) a été réalisée en 1975 par Johnson et Francis (165) et montrait déjà une grande hétérogénéité au sein des *Clostridium*, en se basant sur l'homologie ADN/ARNr. Puis les travaux de Collins et coll. (1994) basés sur les séquences des gènes d'ARNr 16S ont permis d'étudier de façon approfondie la diversité génétique de ce groupe (50). L'étude des relations évolutives de près de 160 espèces de *Clostridium* et d'autres espèces de bactéries à Gram positif a mené à la construction d'un arbre phylogénétique se divisant en 19 clusters (I à XIX). Le cluster I contient l'espèce type du genre, *C. butyricum*, ainsi que plusieurs espèces pathogènes (Figure 21).

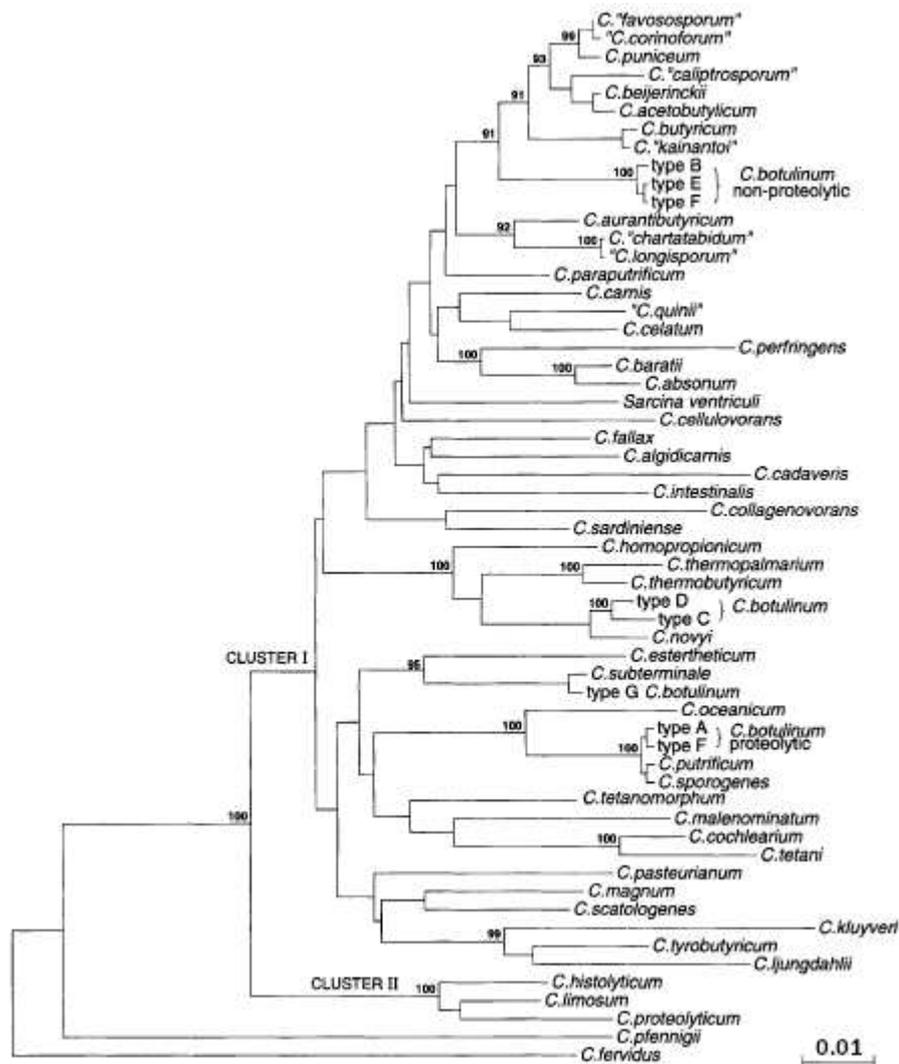


Figure 21. Arbre phylogénétique montrant les relations entre les séquences des *Clostridium* spp. du cluster I et de certaines espèces apparentées (50).

Cet arbre, basé sur les séquences d'ADNr 16S, a été construit par la méthode de Neighbor-Joining.

Les valeurs de bootstrap ont été calculées après 1000 ré-échantillonnages. La barre d'échelle représente une substitution pour 100 nucléotides.

Cet arbre soulève certains problèmes sur le plan phylogénétique en démontrant le caractère polyphylétique et paraphylétique du genre *Clostridium*. En effet, certains de ses membres vont appartenir à des clusters très éloignés comme, par exemple, le cluster XII qui contient *C. hastiforme* ou le cluster XVIII qui contient *C. ramosum*; alors que d'autres vont être reliés à d'autres genres bactériens non sporulés tels *Eubacterium*, *Ruminococcus* ou *Peptostreptococcus*. Certains de ces clusters vont contenir des bactéries à Gram négatif comme *Fusobacterium necrogenes* dans le cluster XIX.

Depuis, de nombreux auteurs ont également soulevé le problème posé par la taxonomie du genre *Clostridium*. De Stackebrandt à Ludwig, en passant par Gupta, de grands noms de la taxonomie bactérienne se sont penchés sur ce chantier de reclassification qui est d'une telle envergure qu'il ne pourra se faire que petit à petit (136, 216, 318). Dans la nouvelle classification outline du *Bergey's Manual*, Ludwig propose de restreindre le genre aux 67 espèces de *Clostridium* ayant un ancêtre commun avec *C. butyricum*. Ce clade correspondrait en partie au cluster I défini initialement par Collins. Il contiendrait également cinq espèces d'*Eubacterium*.

2. Les outils taxonomiques utilisables avec les *Clostridium* spp.

L'identification des bactéries du genre *Clostridium* est réalisée dans un premier temps sur la base des caractères biochimiques et enzymatiques ainsi que par l'étude des produits terminaux du métabolisme par CPG. Ces propriétés phénotypiques ne reflètent pas toujours le degré de ressemblance génomique ni les différences phylogénétiques au sein des clostridies. Cela s'observe surtout si les deux propriétés classiques, morphologie et formation de spores, sont prises en compte. Par ailleurs, il faut souligner que de nombreuses espèces de ce genre ne sont représentées que par une seule souche : quelle valeur peut-on accorder aux caractères biochimiques décrits si l'on se base sur la variation naturelle intraspécifique des processus métaboliques? La CPG semble être une bonne technique de différenciation des espèces de *Clostridium* mais elle est difficile d'utilisation car nécessite des milieux et des conditions très standardisées. L'équipe de Grosse-Herrenthey et coll. (2008) a utilisé l'approche de la spectrométrie de masse pour distinguer les espèces de *Clostridium* spp. (132). L'analyse de représentants de 31 espèces de *Clostridium* (dont *C. hastiforme* ATCC 33268^T) donne des profils de spectres de masse concernant les protéines ribosomiques caractéristiques d'espèce.

L'utilisation de ces profils permet une identification d'espèce de la même façon que par séquençage de l'ADNr 16S. Praticué par de plus en plus de laboratoires de bactériologie médicale, le séquençage des gènes ribosomiques est sans doute l'approche la plus discriminante puisqu'elle permettra d'identifier toutes les espèces existantes mais également de détecter de nouvelles espèces non encore décrites.

3. *Clostridium*, structure de paroi et coloration de Gram

La structure de la paroi et notamment la composition du peptidoglycane, constituant essentiel de cette paroi, sont des caractères très importants d'un point de vue évolutif (42, 134, 291, 358). Au XIX^{ème} siècle, elle a permis aux bactériologistes de classer phénotypiquement les bactéries en deux groupes en utilisant la coloration différentielle de Gram. Les bactéries dites à Gram négatif ayant une paroi fine et riche en lipides vont être décolorées par l'alcool alors que la paroi épaisse des bactéries dites à Gram positif empêche cette décoloration. La microscopie électronique à transmission (MET) ainsi que les études phylogénétiques ont cependant montré que le résultat de la coloration de Gram n'était pas toujours le reflet du type de paroi. En effet, une épaisse couche de polysaccharides autour de la paroi de certaines α -protéobactéries du genre *Azospirillum* peut empêcher le passage de l'alcool et faire apparaître ces bactéries violettes à la coloration de Gram alors qu'elles possèdent une membrane externe (99). Certaines bactéries ayant une paroi monoderme typique vont, à l'inverse, se décolorer et des espèces, longtemps considérées comme des bactéries didermes, ont en fait une ultrastructure typiquement monoderme (44, 153, 166, 173). Ceci s'explique, du moins en partie, par la faible épaisseur de la couche de peptidoglycane (12-18 nm pour *Butyrivibrio fibrisolvens*) observée chez ces espèces en comparaison aux valeurs connues pour les bactéries monodermes (valeurs extrêmes : 20 à 80 nm) (261).

Au sein du genre *Clostridium*, plusieurs espèces phylogénétiquement liées aux différents clusters selon Collins montrent une coloration de Gram négative (*C. symbiosum*, *C. clostridioforme*, *C. hathewayi*, ...) ou variable (*C. ramosum*, *C. hastiforme*, *C. orbiscindens*, ...) (50, 166). Par ailleurs, il est intéressant de souligner une variabilité au niveau de la composition du peptidoglycane, même au sein du cluster I, c'est à dire du genre *Clostridium sensu stricto*. En effet, *C. paradoxum* et *C. thermoalcaliphilum*, partageant 98% de leurs positions sur l'ADNr 16S, possèdent une paroi contenant respectivement de l'acide

meso-diaminopimélique (mDAP) (comme la grande majorité des *Clostridium* spp.) ou de la L-Ornithine (102, 363). Enfin, comme présenté précédemment, les *Clostridia* représentent la seule classe des *Firmicutes* contenant à la fois des bactéries monoderms et des bactéries diderms.

Toutes ces données soulèvent à nouveau les problèmes liés d'une part à l'incohérence taxonomique de ce groupe bactérien et d'autre part à la difficulté d'une identification fiable de ces bactéries.

4. *Clostridium* et sporulation

Les *Clostridium* spp. ont toujours été phénotypiquement définis comme étant des bacilles à Gram positif sporulés. La sporulation est un des processus les plus complexes du monde bactérien, retrouvé essentiellement chez les bactéries à Gram positif. Les rares bactéries diderms produisant des spores appartiennent au phylum *Firmicutes* et semblent être situées dans la nouvelle classe *Negativicutes* (23, 188). Il a été montré chez *Bacillus* spp. que plus de 150 gènes étaient impliqués dans le phénomène de sporulation, ce qui explique la vulnérabilité d'un tel processus car la moindre mutation dans un de ces gènes pourra stopper l'ensemble de la machinerie (253). Jusqu'à récemment, la capacité de sporuler était utilisée comme une caractéristique morphologique essentielle dans la classification de nouveaux isolats dans des genres comme *Bacillus* ou *Clostridium*. Les analyses phylogénétiques basées sur l'ADNr 16S ont montré que le genre *Clostridium* était constitué d'espèces sporulées associées à des espèces pour lesquelles on n'avait pas observé de formation de spore (comme *C. thermoalcaliphilum*) (50, 102). Cette observation est encore plus vraie lorsque l'on s'intéresse aux différents clusters définis par Collins en 1994 puisqu'il est possible de retrouver au sein d'un même cluster des espèces produisant des spores et d'autres n'en produisant pas, par exemple les espèces *Tissierella praeacuta* (cluster XII) et *Eubacterium plautii* (cluster IV) sur lesquelles nous allons revenir dans un chapitre ultérieur (50).

Ce phénomène soulève l'hypothèse que ces espèces avaient probablement perdu leur capacité de sporulation mais possédaient les gènes sous forme plus ou moins intègre. En 1997, Brill et coll. ont donc proposé de différencier les bactéries asporulées (*asporogenic* ou *cryptic spore-former*) qui possèdent la majorité des gènes de sporulation mais dont le processus de sporulation est altéré, des bactéries non-sporulées qui ne possèdent pas de gène de sporulation

(comme *E. coli* ou *Pseudomonas aeruginosa*) (29). Pour cela, ils proposent d'utiliser la présence ou l'absence de certains gènes de la sporulation notamment *spo0A*, *sspa/β*-type et *dpaA/B*. Ces trois gènes codent respectivement un facteur de transcription de l'initiation de la sporulation, les protéines SASPs (pour Small Acid Soluble Proteins) qui entourent et protègent l'ADN des spores, ainsi que la dipicolinate synthétase qui permet la synthèse de dipicolinate de sodium impliqué dans le maintien de la déshydratation de la spore. En utilisant les génomes complets de 52 eubactéries et archaebactéries, Onyenwoke et coll. (2004) ont décrit la présence de gènes similaires chez la plupart des *Firmicutes*, dont différents membres des *Negativicutes*, mais également chez des membres d'autres phyla (253). Une telle distribution a mené les auteurs à suggérer que ces gènes ne devraient plus être considérés comme marqueurs de la sporulation et qu'ils pourraient être impliqués dans d'autres processus pour les bactéries n'appartenant pas aux *Firmicutes*.

5. *Clostridium* et résistance aux glycopeptides

a) Les glycopeptides : mécanismes d'action et de résistance

Les glycopeptides (vancomycine, teicoplanine) sont des antibiotiques tri- ou tétracycliques qui vont bloquer la synthèse du peptidoglycane bactérien en se liant au dipeptide D-Alanine-D-Alanine terminal des précurseurs pentapeptidiques néosynthétisés (Figure 22). Cette liaison va empêcher l'action des transglycosylases et des transpeptidases, enzymes participant à l'intégration des précurseurs dans la paroi bactérienne. Il s'ensuit l'arrêt de la synthèse du peptidoglycane, l'inhibition de la croissance bactérienne et la déstructuration lente de la paroi (65). Ce sont des antibiotiques qui n'agissent que sur les bactéries à Gram positif. En effet, leur grande taille et leur hydrophobicité les empêchent d'atteindre leur cible car ils ne passent pas à travers la membrane externe des bactéries à Gram négatif, ces dernières étant donc naturellement résistantes. Il est intéressant de souligner que cette résistance naturelle est notamment utilisée en bactériologie de routine pour différencier les bactéries à Gram négatif de celles à Gram positif. Par ailleurs, d'autres résistances naturelles sont observées chez les *Nocardia* spp., les mycobactéries et certains cocci à Gram positif (*Leuconostoc* spp., *Pediococcus* spp., ...) (55).

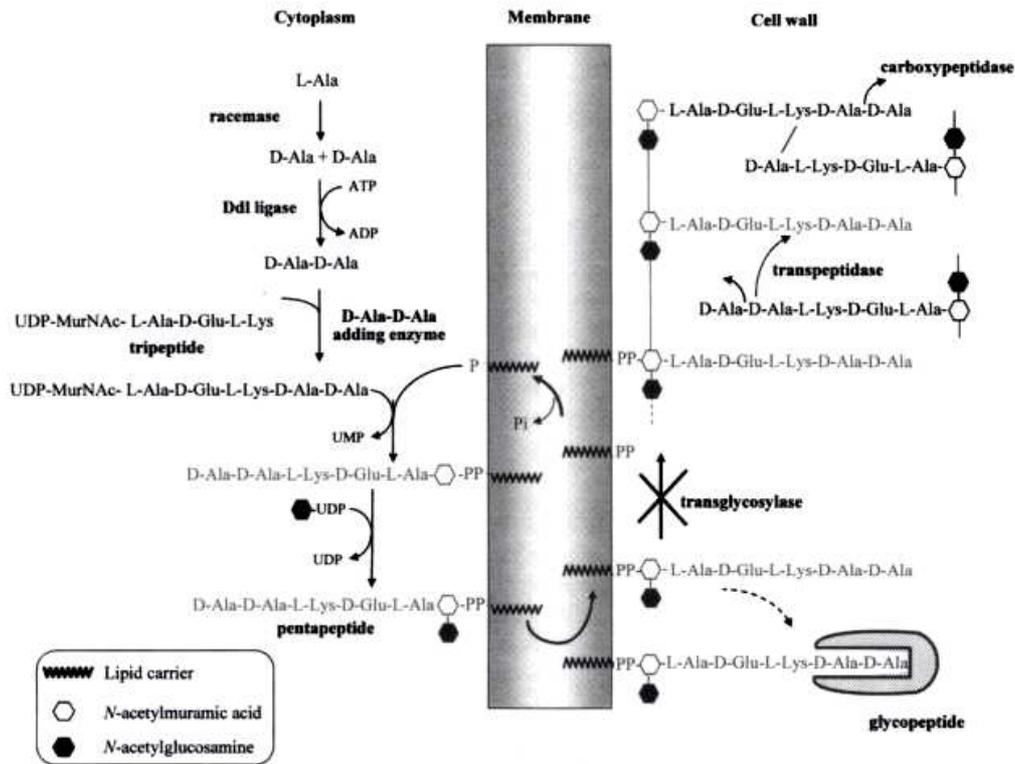


Figure 22. Représentation schématique de la synthèse du peptidoglycane et du mode d'action des glycopeptides.

En se fixant sur le dipeptide D-Ala-D-Ala, l'antibiotique empêche la transglycosylation. Il inhibe également l'action des transpeptidases et des carboxypeptidases. D'après Depardieu et coll. (2005) (65).

La vancomycine, produite par un streptomycète isolé d'un échantillon de sol dans les années 1950, n'a été que peu utilisée à ses débuts de par son importante toxicité rénale et auditive. Les années 80 ont par la suite connu un regain d'intérêt pour cet antibiotique qui peut s'expliquer par : i) l'augmentation de l'incidence des souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méthicilline (SARM) en milieu hospitalier, ii) l'augmentation du nombre de patients immunodéprimés et donc des infections opportunistes notamment à staphylocoques à coagulase négative ou à corynébactéries, iii) l'amélioration des procédés de purification de la molécule atténuant la toxicité. Le deuxième glycopeptide utilisé en médecine humaine, la teicoplanine, a été découvert en 1984. Cette classe d'antibiotique, à prescription exclusivement hospitalière, est utilisée dans le traitement des infections sévères à bactéries à Gram positif multi-résistantes (endocardite, méningite, bactériémie, ...). La vancomycine est également employée par voie orale dans le traitement des colites pseudo-membraneuses à *Clostridium difficile* (198).

L'utilisation accrue de la vancomycine a débouché rapidement sur l'isolement des premières souches bactériennes résistantes. Leclercq et coll. ont décrit en 1988 une souche d'*Enterococcus faecium* ayant acquis une résistance par modification de la cible des glycopeptides (55, 65). Cette résistance est liée à la production de précurseurs se terminant par D-Ala-D-Lac ou D-Ala-D-Ser n'ayant plus ou beaucoup moins d'affinité pour l'antibiotique. Ces précurseurs modifiés sont synthétisés sous l'action de ligases différentes de la D-Ala:D-Ala ligase normale et codés par des gènes *van* organisés en opérons, clusters de plusieurs gènes impliqués dans la résistance aux glycopeptides. Huit génotypes de résistance ont été décrits à ce jour : *vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanD*, *vanE*, *vanF*, *vanG* et *vanL* (65, 359). Le type de précurseur, le niveau de résistance ainsi que les molécules touchées vont varier selon l'opéron (Tableau 4). De plus, ces gènes peuvent se situer sur des éléments transposables, présentant un risque important de dissémination à d'autres bactéries. Ces mêmes gènes ou des apparentés ont été mis en évidence, mais de façon plus sporadique, chez d'autres espèces bactériennes, faisant redouter notamment un passage chez *Staphylococcus aureus* (303).

L'acquisition d'un gène *vanB*, *vanD* ou *vanG* a ainsi été décrite à plusieurs reprises chez des bactéries anaérobies des genres *Clostridium*, *Eggerthella* et *Ruminococcus* isolées dans le tube digestif (17, 75, 76, 78, 79). Par ailleurs, des gènes similaires sont retrouvés chez des bactéries environnementales, qu'elles soient productrices des glycopeptides (*Amycolatopsis orientalis*, *Streptomyces toyocaensis*), ou non (*Streptomyces coelicolor*, *Desulfitobacterium hafniense*) (55, 156, 174). De nombreuses questions se posent quant à l'origine de ces gènes *van*. Les relations évolutives entre les D-Ala:D-Ala ligases de diverses espèces bactériennes et les ligases modifiées responsables de la résistance aux glycopeptides sont présentées dans la Figure 23. Les sources potentielles de ces gènes de résistance pourraient être les espèces productrices des glycopeptides, les espèces naturellement résistantes, les espèces environnementales ou les bactéries anaérobies du tube digestif. Bien qu'aucune de ces hypothèses n'ait été vérifiée, toutes ces bactéries représentent un réservoir potentiel de gènes *van* qui pourront être disséminés aux espèces avoisinantes.

Tableau 4. Récapitulatif des différents phénotypes et génotypes de résistance aux glycopeptides retrouvés chez les bactéries à Gram + (55, 359).

Résistance	ACQUISE					NATURELLE				
	Haut niveau	Niveau variable	Niveau modéré		Bas niveau		Bas niveau	Haut niveau		
Phénotype	VanA	VanB^a	VanD^a	VanF	VanG^a	VanE	VanL	VanC^a	NA	
CMI (µg/ml)	vancomycine teicoplanine	16 - 1000 (4) 16 - 512	4 - 32 (1000) 0,5 - 1	64-128 4 - 64	8 < 1	16 0,5	8 - 32 0,5	8 S ^c	2 - 32 0,5 - 1	≥ 1000 ≥ 256
Transfert par conjugaison	+/-	+/-	-	NR ^d	+	-	-	-	-	
Support génétique	Tn1546	Tn1547, Tn1549, Tn5382	inconnu	NR	inconnu	inconnu	NR	inconnu	inconnu	
Expression	inductible		constitutive	NR	inductible		inductible ou constitutive	constitutive		
Localisation	plasmide / chromosome		chromosome	NR	chromosome		chromosome	chromosome		
Espèces ^b	<i>B. circulans</i>	<i>E. durans</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>P. popilliae</i>	<i>E. faecalis</i>		<i>E. casseliflavus</i>	<i>Lactococcus</i>		
	<i>E. avium</i>	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. faecium</i>				<i>E. gallinarum</i>	<i>Leuconostoc</i>		
	<i>E. casseliflavus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. raffinosus</i>				<i>E. flavescens</i>	<i>Pediococcus</i>		
	<i>E. durans</i>	<i>E. faecium</i>								
	<i>E. faecalis</i>	<i>S. bovis</i>								
	<i>E. faecium</i>									
	<i>E. gallinarum</i>									
	<i>E. hirae</i>									
	<i>E. mundtii</i>									
	<i>E. raffinosus</i>									
	<i>P. apiarius</i>									
	<i>S. aureus</i>									
Cible modifiée	D-Ala-D-Lac				D-Ala-D-Ser			D-Ala-D-Lac		

^a Présence de sous-types (*vanB1-3*, *vanC1-3*, *vanD1-5*, *vanG1-2*) ; ^b E, *Enterococcus* ; S, *Staphylococcus* ; B, *Bacillus* ; P, *Paenibacillus* ; S, *Streptococcus* ;

^c S, sensible à la teicoplanine (concentration minimale inhibitrice (CMI) non disponible) ; ^d NR, non reporté.

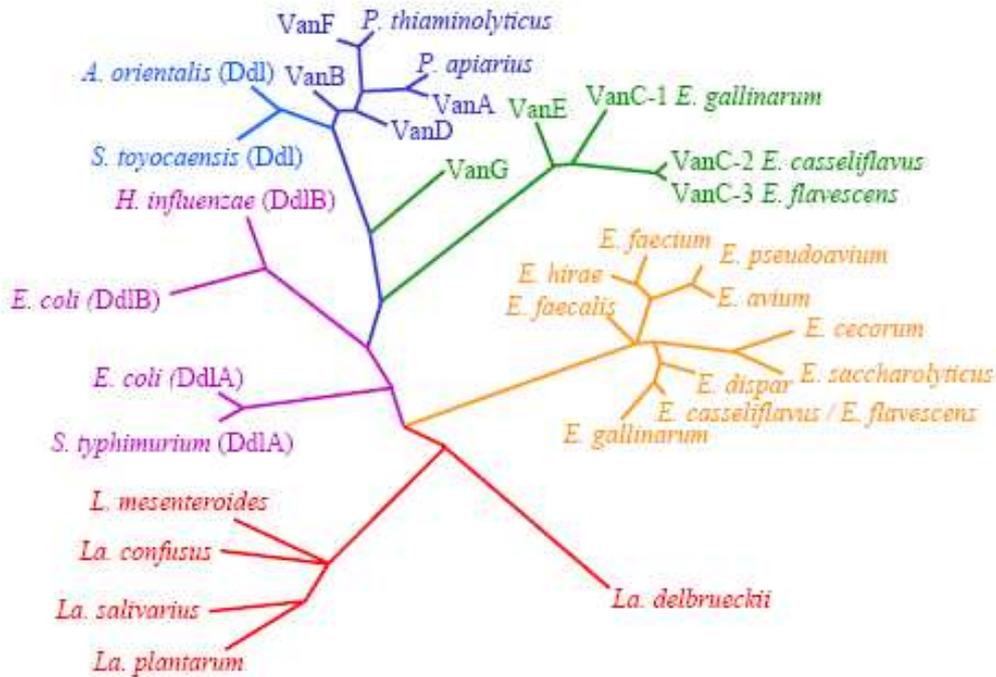


Figure 23. Arbre phylogénétique basé sur les séquences protéiques de diverses D-Ala:D-Ala ligases et enzymes apparentées (55).

Une résistance aux glycopeptides par blocage de l'accès de l'antibiotique à sa cible a par ailleurs été décrite. En 1997, Hiramatsu et coll. isolent la première souche de SARM ayant une sensibilité diminuée à la vancomycine (152). Cette souche, dénommée VISA (pour Vancomycin Intermediate *Staphylococcus aureus*), s'est ensuite répandue à travers le monde avec des concentrations minimales inhibitrices (CMI) à la vancomycine de 8 à 16 µg/ml. Des souches plus résistantes avec des CMI ≥ 32 µg/ml ont également été décrites sous le nom de VRSA (pour Vancomycin Resistant *Staphylococcus aureus*) (9). Plusieurs mécanismes ont été impliqués dans ce phénomène dont l'épaississement de la paroi des bactéries avec une augmentation des résidus D-Alanyl-D-Alanine. Elles expriment alors à leur surface de nombreux résidus D-Ala-D-Ala sur lesquels se fixent les antibiotiques. Ce phénomène, appelé séquestration, bloque l'accès des autres molécules de vancomycine aux précurseurs du peptidoglycane (Figure 24). La synthèse de la paroi peut donc continuer.

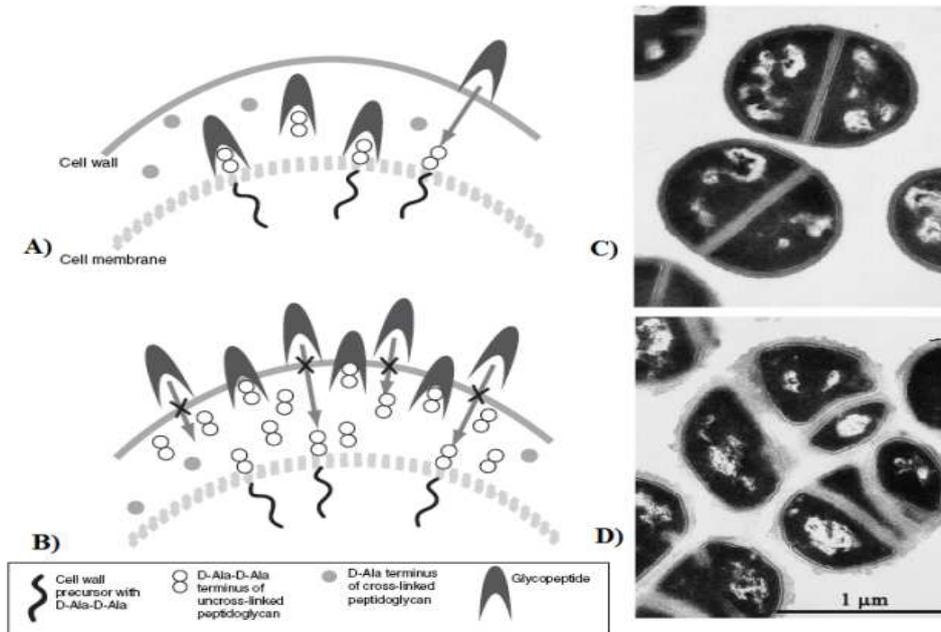


Figure 24. Schéma comparant l'épaisseur de la paroi chez les VSSA (A) et les VISA (B) (D'après Appelbaum et coll., 2006) (9).

Photographies de l'observation en MET de coupes de culture de VSSA (C) et de VISA (D) (302).
VSSA, Vancomycin Susceptible *Staphylococcus aureus* ; VISA, Vancomycin Intermediate *Staphylococcus aureus*.

b) Sensibilité diminuée à la vancomycine chez certains *Clostridium*

Outre l'acquisition de gènes *vanB* ou *vanD* par certains *Clostridium* (*C. boltae*, *C. hathewayi*, *C. symbiosum*, *Clostridium* sp.) présentée ci-dessus, un gène apparenté au gène *vanC* a été mis en évidence chez *C. innocuum* (61). C'est le Dr Francine Mory du Laboratoire de Bactériologie du CHU de Nancy qui a décrit pour la première fois la présence d'une résistance de bas niveau à la vancomycine chez 28 isolats cliniques de cette espèce qui présentaient des CMI pour cet antibiotique de 8-16 μg/ml (240). Le mécanisme a ensuite été élucidé dans le cadre de la thèse d'exercice de Véronique David qui a montré, chez la souche type et chez deux souches cliniques de *C. innocuum*, que la résistance était due à un cluster de gènes permettant la synthèse de D-Ala:D-Ser. En déterminant la sensibilité à la vancomycine de 415 souches cliniques de *C. difficile* isolées entre 1993 et 2000, l'équipe espagnole de Pelaez a décrit 3.1% de souches de sensibilité diminuée (4-16 μg/ml) sans que les gènes *van* aient été recherchés (262). Par ailleurs, Domingo et coll. (2009) viennent de décrire une nouvelle espèce, *Clostridium lavalense*, isolée du tube digestif humain (77). Cette espèce, proche de *C. boltae*, présente une résistance de haut niveau à la vancomycine (> 256 μg/ml) associée à la présence d'un gène *vanB2*, illustrant la problématique liée à un réservoir

anaérobie de ces gènes, d'autant plus qu'un transfert du gène *vanB2* de *Clostridium symbiosum* à des entérocoques a déjà été mis en évidence dans le tube digestif de la souris (195).

L'observation au Laboratoire de Bactériologie du CHU (Centre Hospitalier Universitaire) de Nancy par le Dr Francine Mory de phénomènes similaires chez deux espèces de *Clostridium*, *C. hastiforme* et *C. orbiscindens*, nous a mené à nous intéresser au mécanisme de cette résistance. Cependant, comme décrit précédemment, la taxonomie des bactéries du genre *Clostridium* est souvent obscure, et les paragraphes suivants montrent que nos deux groupes n'échappent pas à ce problème.

6. *Clostridium hastiforme* ou *Tissierella praeacuta* ? Une histoire pleine de rebondissements !

L'espèce *C. hastiforme* a été initialement décrite en 1939 par MacLennan en tant que bacille à Gram positif anaérobie strict sporulé, bien qu'il ait tendance à se décolorer lors de la coloration de Gram (Figure 25A) (40). Cette espèce est phénotypiquement très proche de *C. subterminale*. Contrairement à cette dernière, les souches de *C. hastiforme* (cluster XII selon Collins) produisent des spores terminales et ne produisent pas de dihydrogène (H_2). Cependant, il n'est pas évident de distinguer ces deux types de sporulation au microscope optique et la production d' H_2 n'est pas un caractère qui puisse être testé en laboratoire de routine. L'identification de *C. hastiforme* par des techniques classiques reste donc fastidieuse et nécessite une approche génotypique

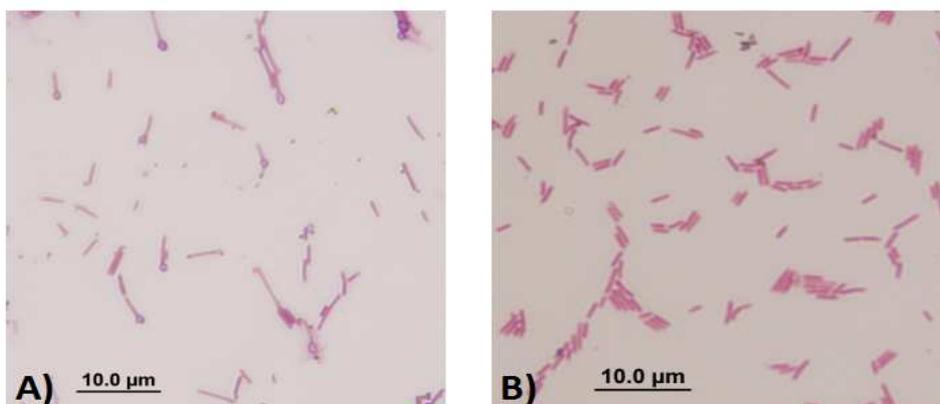


Figure 25. Photographies d'une coloration de Gram des souches *Clostridium hastiforme* ATCC 33268^T (A) et *Tissierella praeacuta* ATCC 25539^T (B).

L'espèce *T. praeacuta* a été initialement décrite sous le nom de *Coccobacillus praeacutus* par Tissier en 1908 en tant que bacille à Gram négatif anaérobie non sporulé (Figure 25B) (155). L'histoire taxonomique de cette bactérie a été fort mouvementée avec reclassifications successives dans les genres *Zuberella*, puis *Fusobacterium*, *Bacteroides* et enfin *Tissierella* en 1986, tout en restant dans la famille *Bacteroidaceae* (51). En 1995, Farrow et coll. ont souhaité clarifier la position taxonomique du genre *Tissierella* en comparant les séquences d'ADNr 16S de la souche type de *T. praeacuta* et celles d'autres bactéries anaérobies à Gram négatif (102). *Tissierella* n'était en fait que très faiblement reliée à ces dernières alors qu'un fort niveau de similarité a été observé avec des bactéries à Gram positif, notamment avec certains *Clostridium*. Ils ont en effet montré que *T. praeacuta* partageait 99.9% de sa séquence d'ADNr 16S avec *C. hastiforme* et se retrouvait groupée avec d'autres espèces appartenant au cluster XII selon Collins. A cette occasion, ils ont décrit la deuxième espèce du genre *Tissierella*, *T. creatinini*. Cette espèce, ainsi que *T. creatinophila* décrite en 1998, sont des bactéries environnementales isolées de boues de stations d'épuration (102, 143). En 2004, Bae et coll., partant du fait que les souches *C. hastiforme* 33268^T et *T. praeacuta* 25539^T présentaient 96.5% de similarité par hybridation ADN-ADN d'une part, et qu'elles n'étaient pas distinguables du point de vue de leurs caractères biochimiques d'autre part, les ont associées en une seule et même espèce génomique, *T. praeacuta* (15). Cependant, aucune donnée concernant l'ultrastructure de la paroi ne permet d'affirmer de façon certaine qu'il s'agisse réellement d'une bactérie à Gram positif, d'autant plus que des espèces possédant une paroi de type Gram négatif ont été décrites dans la classe *Clostridia*. Bien qu'une différence de sporulation n'exclut pas l'appartenance à une même espèce (253), aucune étude concernant la sporulation n'explique cette différence. Une approche taxonomique mixte et consensuelle devrait donc permettre de clarifier définitivement la position et la description de cette espèce bactérienne.

7. *Clostridium orbiscindens* : to be or not to be a *Clostridium*?

En 1989, une étude portant sur le métabolisme des flavonoïdes par la flore intestinale humaine a mené à l'isolement de quatre souches capables de cliver la quercétine (365). Cette molécule, présente chez les végétaux, est un excellent anti-oxydant qui a fait ses preuves en tant que protecteur notamment vis-à-vis des processus inflammatoires et carcinogènes (242). Ces

souches ont été regroupées dans une nouvelle espèce, *Clostridium orbiscindens*, en tant que bacilles anaérobies stricts, sporulés, mobiles, à coloration de Gram variable (366). Ils font état dans cette description d'une résistance à la vancomycine. A notre connaissance, cette espèce n'avait à ce jour jamais été associée à un phénomène infectieux chez l'homme. Une étude récente de l'activité de la rifamixine et d'autres molécules, menée sur 92 espèces de bactéries anaérobies (198 souches à Gram négatif et 338 souches à Gram positif), décrit des CMI pour la vancomycine de 8 µg/ml chez les dix isolats de *C. orbiscindens* testés (106).

L'espèce *Eubacterium plautii* a été initialement décrite par Seguin en 1928 en tant que *Fusobacterium plauti* (sic), un bacille à Gram négatif mobile non sporulé (238). Hofstad & Aasjord (1982) ont observé une membrane typique de bactéries à Gram positif en microscopie électronique et ont transféré cette espèce dans le genre *Eubacterium* sur la base des caractères biochimiques. Des résultats contradictoires sur l'ultrastructure de cette paroi font que la définition du *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* vol. 1 (1986) n'est pas claire. L'équipe de Hofstad a publié en 1988 des résultats complémentaires appuyant l'hypothèse de la paroi de type Gram-positif (14). A notre connaissance, seuls deux cas d'infections chez l'homme ont été décrits dans la littérature. Le premier est un cas de choc septique avec purpura fulminans suite à une morsure de chien chez un patient splénectomisé pour lequel *E. plautii* a été isolé dans le sang et le liquide céphalo-rachidien (115). Plus récemment, Orlando et coll. (2008) ont décrit, chez un patient transplanté hépatique, un cas d'épanchement pleural associé à une bactériémie à *E. plautii* dont l'origine hypothétique serait une translocation intestinale (254).

Si l'on compare les séquences d'ADNr 16S des souches types de *C. orbiscindens* (n° d'accèsion Y18187) et *E. plautii* (n° d'accèsion AY724678), elles partagent 99.7% de leurs nucléotides. Ce sont donc deux espèces très proches, phylogénétiquement indifférenciables sur la base des séquences d'ADNr 16S. D'un point de vue phénotypique, elles ont de nombreux caractères en commun, notamment une sensibilité diminuée à la vancomycine. D'un point de vue structural, l'une produit des spores et l'autre non (106, 238, 366) mais cette différence n'exclut pas l'appartenance à une seule et même espèce (253). La première question concernant ce groupe bactérien porte donc sur cette notion d'espèce : est-on en présence d'une seule et même espèce ?

Par ailleurs, selon Stackebrandt et coll. (1999), *C. orbiscindens* appartient au cluster IV défini par Collins (50, 318). Ce cluster regroupe des espèces très variées, appartenant ou non au

genre *Clostridium*, sporulées ou non, voire des espèces définies comme étant à Gram négatif comme *Bacteroides capillosus*. Selon Ludwig et coll. (2009), *C. orbiscindens* devrait être exclu de la famille des *Clostridiaceae* et transféré dans une famille qu'il propose de créer, les '*Ruminococcaceae*', qui regrouperait de nombreux genres issus d'autres familles de *Clostridiales* (216). Une question supplémentaire se pose donc quant à la légitimité de l'appellation *Clostridium* pour cette espèce.

La réponse à ces deux questions ne pourra être apportée que par l'utilisation d'une approche mixte et consensuelle.

Le genre *Prevotella* : un groupe taxonomique cohérent

I. DONNEES GENERALES

1. Habitat

Chez l'Homme, les *Prevotella* spp. font partie de la flore normale de l'oropharynx, de l'intestin et du vagin. Au niveau de la flore buccale, on retrouve surtout les espèces appartenant au groupe *oris-buccae* et des espèces pigmentées telles que *P. intermedia*. Des espèces décrites plus récemment, comme *P. baroniae*, *P. marshii* et *P. multisaccharivorax* ont été isolées de la cavité orale. Au niveau de la flore vaginale, ce sont surtout *P. bivia*, *P. disiens* et des *Prevotella* pigmentées qui sont rencontrées. Dans la flore intestinale, diverses espèces peuvent être observées, en particulier des espèces pigmentées (167). On peut également rencontrer certaines espèces chez les animaux, notamment *P. ruminicola* et les espèces apparentées, qui participent à la digestion des protéines et des hydrates de carbone au niveau du rumen et de l'intestin chez certains mammifères (12). Bien que le réservoir des *Prevotella* spp. soit essentiellement représenté par la flore permanente des muqueuses humaines et animales, il a été montré que *P. intermedia* pouvait survivre et se multiplier dans des amibes libres (350). Par ailleurs certaines espèces peuvent être retrouvées dans l'environnement comme *P. paludivivens* qui a été isolée du riz (342).

2. Facteurs de virulence

Selon les espèces, de nombreux facteurs de virulence ont été décrits et étudiés. La majorité des travaux a été effectuée au niveau de la sphère oropharyngée puisque c'est une niche importante de *Prevotella* spp. Ayant une paroi de type Gram-négatif, ces bactéries exposent à

leur surface des molécules de lipopolysaccharides (LPS). Outre les propriétés classiques connues du LPS, il a été montré chez *P. nigrescens* et *P. intermedia* que cette molécule pouvait stimuler la production d'ostéoclastes et inhiber l'ostéosynthèse, expliquant en partie les phénomènes de lyse osseuse associés aux parodontopathies (264). Différentes adhésines de type fimbriae ont été décrites chez les espèces pigmentées, en particulier *P. intermedia*, *P. denticola*, *P. loescheii* et *P. melaninogenica*. Elles peuvent être impliquées dans des phénomènes d'hémagglutination ou de co-agrégation avec d'autres espèces bactériennes, associés notamment à la formation de la plaque dentaire (250, 300). Il a été montré que *P. intermedia* était capable d'envahir certaines cellules buccales et que *P. bivia* pouvait entrer dans les cellules épithéliales du col de l'utérus (81, 323). Certaines espèces, notamment *P. intermedia*, ont un pouvoir hémolytique important qui pourrait être impliqué dans la progression de la parodontopathie (250). Les *Prevotella* spp. vont par ailleurs synthétiser des enzymes diverses et variées qui vont faciliter leur diffusion ou leur survie. Certaines espèces vont produire des protéases leur permettant d'échapper aux défenses immunitaires alors que d'autres vont développer des systèmes de captation du fer de l'hôte (86, 268).

3. Pouvoir pathogène chez l'homme

Les bactéries anaérobies font partie des flores endogènes normales de l'homme. A l'occasion de traumatismes, d'interventions chirurgicales ou de processus dégénératifs voire nécrotiques, elles peuvent sortir de leur confinement et causer des dommages. Il est reconnu que les bactéries anaérobies sont impliquées dans des infections de sévérité variable pouvant être responsables d'une morbidité et d'une mortalité élevées. Il s'agit le plus souvent d'infections de contiguïté, au voisinage d'une muqueuse colonisée par une flore normale. Dans le cadre d'une étude portant sur 1050 patients ayant développé des infections impliquant une ou plusieurs bactéries anaérobies, les espèces du genre *Prevotella* représentaient 9.4% des isolats, en 3^{ème} position après *Bacteroides* spp. (41.8%) et *Clostridium* spp. (11.8%) (258).

Parmi les nombreuses espèces de la flore oropharyngée, *P. intermedia* est un pathogène impliqué dans les parodontites ou les abcès dentaires (164, 280). Par ailleurs, des infections profondes, arthrite septique ou abcès hépatique, à point de départ bucco-dentaire sont

également décrites (103, 201). Oh et coll. (2005) rapportent, chez un patient toxicomane, un cas d'endocardite impliquant trois espèces de la flore buccale, *P. melaninogenica*, *Actinomyces odontolytica* et *Veillonella* sp. D'après les auteurs, la contamination serait due au léchage de l'aiguille avant l'injection de drogue par le patient, ce geste lui permettant d'avoir une idée de la concentration en cocaïne (249). Il est intéressant de souligner que l'ADNr 16S de *P. intermedia* et *P. nigrescens* a été détecté à la fois dans des échantillons vasculaires et oropharyngés de patients atteints de la maladie de Buerger (161). Malgré des études contredisant cette association entre la maladie parodontique et une pathologie cardiovasculaire, une méta-analyse récente semble aller dans ce sens (245). Les *Prevotella* spp. peuvent également être à l'origine de sinusites, d'otites chroniques, d'infections cervico-faciales, de pneumopathies d'inhalation, d'abcès pulmonaires, de pleurésies purulentes, d'infections du système nerveux central et d'infections consécutives à des morsures (167, 288). Dans ce dernier type d'infection, les bactéries du genre *Prevotella* sont isolées deux fois plus fréquemment dans les morsures humaines que dans les morsures animales (346).

Les espèces de la flore digestive sont responsables d'infections intra-abdominales incluant les péritonites ou les abcès intra-abdominaux. Ces infections sont le plus souvent secondaires à des altérations de la barrière intestinale (chirurgie, traumatisme ou néoplasie). Au niveau de la flore uro-génitale, les espèces les plus fréquemment retrouvées sont *P. bivia* et *P. disiens*. Elles peuvent être notamment responsables de salpingites, chorio-amniotites, endométrites et urétrites. Les bactéries du genre *Prevotella* sont retrouvées chez 44% des patientes présentant une vaginose bactérienne (295). On relève également des cas d'infections de tissus mous, préférentiellement sur des terrains débilisés (diabète, escarre, immunodépression ...), et plus rarement, des cas d'infections osseuses ou des cas d'endocardites chez des sujets non toxicomanes (246).

Enfin, les *Prevotella* spp. peuvent être à l'origine de bactériémies avec éventuellement métastases septiques secondaires. Les bactériémies à anaérobies sont relativement rares mais semblent être sous-estimées en raison des difficultés d'isolement et d'identification. Dans une étude américaine, Weinstein et coll. (1997) ont montré que les bactéries anaérobies strictes étaient à l'origine de 3.9% des épisodes bactériémiques survenant chez des patients adultes

hospitalisés dans les années 1990 (356). Bien que l'impact clinique de ces bactériémies à anaérobies soit discuté, une étude rétrospective réalisée sur 12 ans à la clinique Mayo a mis en évidence une augmentation de leur incidence (194). En effet, ces auteurs ont montré que les bactéries anaérobies étaient impliquées dans 5.4% des bactériémies en 1993 et dans 10.4% des cas en 2004. Parmi les espèces rencontrées, on retrouve un taux stable et prépondérant de *Bacteroides* du groupe *fragilis* ainsi qu'un accroissement du groupe "*Prevotella* – *Porphyromonas*" dont l'incidence a presque doublé en 12 ans. Une telle augmentation des bactériémies à bactéries anaérobies semble associée à l'accroissement du nombre de patients présentant des pathologies cancéreuses, hématologiques ou non.

II. CLASSIFICATION DES *PREVOTELLA* SPP.

La majorité des bactéries à Gram négatif anaérobies appartiennent à la famille *Bacteroidaceae*, initialement classées au sein du seul genre *Bacteroides*. Les analyses phylogénétiques de ce groupe bactérien ont profondément modifié leur classification avec redistribution de nombreuses espèces dans plusieurs genres, notamment *Prevotella*, *Porphyromonas* ou *Fusobacterium* (252).

Le genre *Prevotella* a été créé en 1990 par Shah et Collins sur la base de données phénotypiques et génomiques, incluant l'hybridation ADN-ADN et le contenu en G+C du chromosome bactérien (297). Il regroupait les anciens *Bacteroides* du groupe *oralis-melaninogenicus* présentant une sensibilité à la bile au sein de la famille *Prevotellaceae*, ordre *Bacteroidales*, phylum *Bacteroidetes*. L'espèce type de ce genre est *P. melaninogenica*.

Ce genre a ensuite évolué à l'occasion de descriptions de nouvelles espèces ou de nombreux remaniements (222). Certaines espèces, phénotypiquement hétérogènes, ont été scindées et ont mené à la création de plusieurs espèces comme *P. intermedia* qui a donné lieu à la création de *P. nigrescens* (298), ou *P. ruminicola* qui a conduit à la description de *P. albensis*, *P. brevis* et *P. bryantii* (12). Certaines bactéries appartenant à d'autres genres ont été reclassées comme les deux espèces *Hallella sergens* et *Mitsuokella dentalis* qui, réunies, ont mené à la création de l'espèce *P. dentalis* (364). Avec l'utilisation plus répandue du

séquençage de l'ADNr 16S, le genre *Prevotella* a connu une évolution importante, d'autant plus que pour ce genre, ce marqueur taxonomique est fortement polymorphe et donc très discriminant (222). En effet, deux espèces de *Prevotella* ne partagent pas plus de 96.4% de similarité pour ce gène. L'analyse des séquences d'ADNr 16S représente donc un excellent outil pour l'identification bactérienne et permet de distinguer aisément les éventuelles nouvelles espèces. Ce marqueur a également permis d'établir un genre cohérent et taxonomiquement fiable.

Il est intéressant de noter qu'en se basant sur une phylogénie du gène de l'ARNr 16S, les espèces *P. heparinolytica* et *P. zoogloformans* devraient être exclues du genre *Prevotella* car elles partagent plus de similarité de séquences avec les membres du genre *Bacteroides* (260). Cette suggestion avait été acceptée lors du *Comité International de Systématique des Procaroyotes* de juillet 2000 par la section des "bacilles à Gram négatif anaérobies" qui recommandait de désigner ces deux espèces sous les noms *Bacteroides heparinolyticus* et *Bacteroides zoogloformans*, tout en soulignant que des analyses plus poussées utilisant d'autres marqueurs que l'ARNr 16S étaient nécessaires pour valider cette reclassification (252). Cependant, bien que le problème ait été à nouveau soulevé par ce même comité en 2002 (251), rien n'a encore été validé à ce jour et ces espèces sont toujours classées au sein du genre *Prevotella*. Par ailleurs, les membres de ce comité ont suggéré que l'espèce *P. tanneriae* n'appartenait également pas au genre *Prevotella* sur la base de l'étude des séquences d'ADNr 16S, de la composition en acides gras cellulaires et d'autres caractères phénotypiques (251). La Figure 26 montre la position de ces espèces au sein du genre *Prevotella* avec un regroupement des espèces *P. heparinolytica* et *P. zoogloformans* avec la souche type de *Bacteroides fragilis* ainsi que la présence d'un représentant d'un autre genre, *Xylanibacter*, intercalé entre ces deux espèces, *P. tanneriae* et l'ensemble des autres membres du genre *Prevotella*.

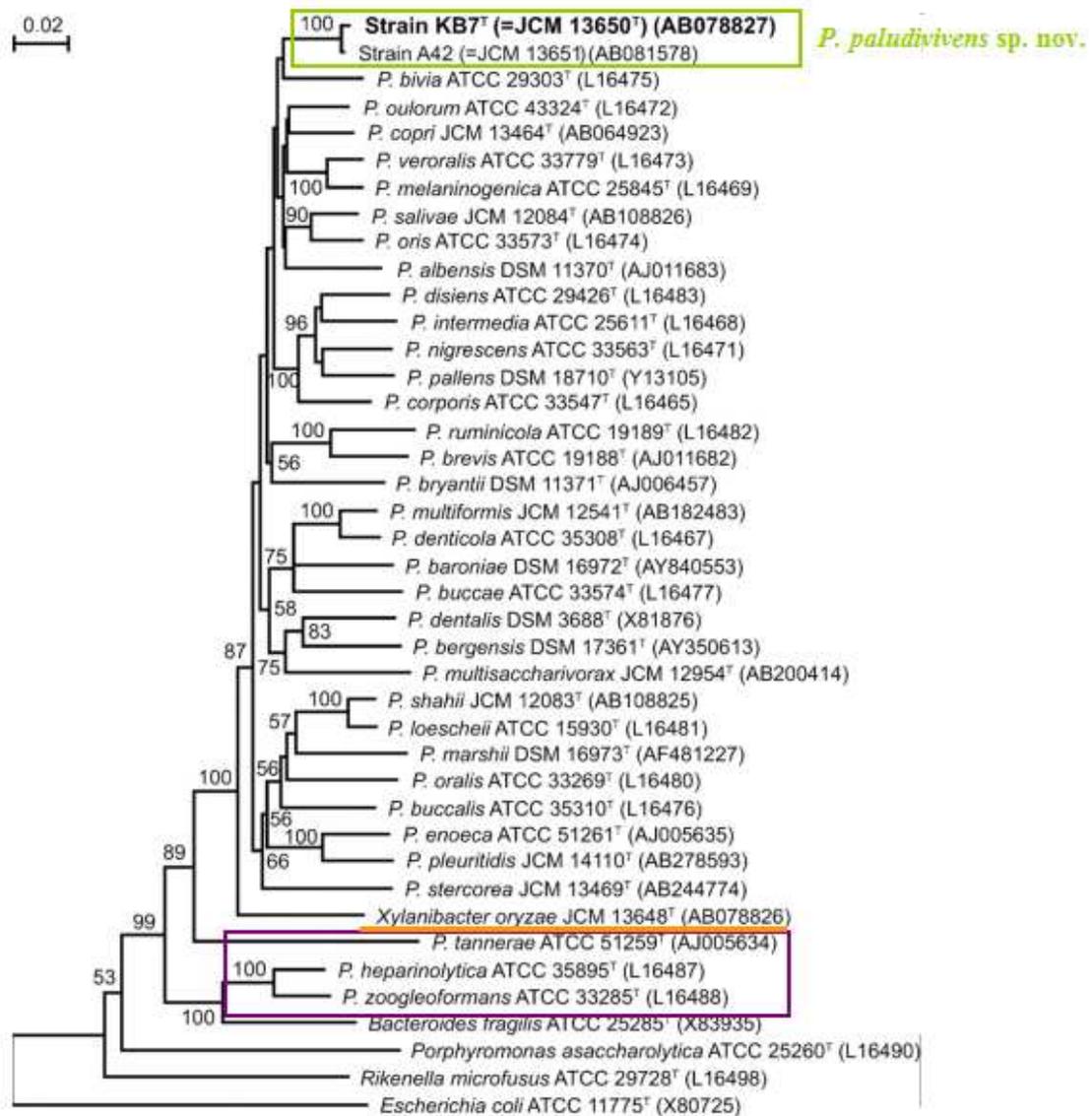


Figure 26. Arbre basé sur les séquences d'ADNr 16S montrant les relations phylogénétiques entre l'espèce *P. paludivivens* et les autres espèces du genre *Prevotella* (342). L'échelle représente 2% de différence entre les séquences nucléotidiques.

A l'heure actuelle, le genre *Prevotella* compte 45 espèces publiées dont 44 sont validées, notamment l'espèce *P. nanceiensis* ayant fait l'objet d'une partie de ce travail (Tableau 5). Dix d'entre elles, notamment *P. auriantica* et *P. dentasini* qui sont actuellement sous presse, ont été décrites au cours des deux dernières années. L'espèce '*P. massiliensis*' publiée en 2005 dans *Research in Microbiology* n'a toujours pas été validée par l'ICSP (22).

Mis à part les rares remaniements décrits plus haut, les membres du genre *Prevotella* forment un groupe taxonomique homogène et cohérent.

Tableau 5. Liste des espèces du genre *Prevotella* décrites au 20 juin 2009.

Espèces	Date de description	Pigmentation	G+C%	Site d'isolement*
<i>P. albensis</i>	avril 1997	non	39.4-43.8	A (tube digestif)
<i>P. amnii</i>	janvier 2008	non	ND	H (liquide amniotique)
<i>P. aurantiaca</i>	sous presse	oui	NA	H (oral)
<i>P. baroniae</i>	juillet 2005	non	52.0	H (oral)
<i>P. bergensis</i>	mars 2006	non	48.0	H (peau et tissus mous)
<i>P. bivia</i>	octobre 1977	non	40.0	H (divers)
<i>P. brevis</i>	avril 1997	non	45.3-50.6	A (tube digestif) → H
<i>P. bryantii</i>	avril 1997	non	39.2-42.1	A (tube digestif)
<i>P. buccae</i>	janvier 1982	non	50-52	H (oral, autre)
<i>P. buccalis</i>	1981	non	≈ 45	H (oral)
<i>P. copri</i>	mai 2007	non	45.3	H (tube digestif)
<i>P. corporis</i>	janvier 1983	oui	43-46	H (génital, oral, autre)
<i>P. dentalis</i>	octobre 1995	non	56-60	H (oral)
<i>P. dentasini</i>	sous presse	oui	NA	A (oral)
<i>P. denticola</i>	1981	oui	50.5	H (oral)
<i>P. disiens</i>	octobre 1977	non	40.0	H (génital)
<i>P. enoeca</i>	octobre 1994	non	47.0	H (oral)
<i>P. falsenii</i>	février 2009	oui	45.2	A (oral)
<i>P. heparinolytica</i>	octobre 1985	non	47-49	H (oral, morsure) + A (oral)
<i>P. histicola</i>	août 2008	var	43	H (oral)
<i>P. intermedia</i>	1970	oui	≈ 44	H (divers)
<i>P. loescheii</i>	octobre 1982	oui	46.9	H (oral)
<i>P. maculosa</i>	décembre 2007	non	48	H (oral)
<i>P. marshii</i>	juillet 2005	non	51.0	H (oral)
' <i>P. massiliensis</i> '	décembre 2005	non	ND	H (sang)
<i>P. melaninogenica</i>	1921	oui	41.1	H (oral)
<i>P. micans</i>	avril 2009	oui	46	H (oral)
<i>P. multiformis</i>	mars 2005	non	51.1-51.3	H (oral)
<i>P. multisaccharivorax</i>	septembre 2005	non	49.9	H (oral)
<i>P. nanceiensis</i>	octobre 2007	non	39.4	H (respi)
<i>P. nigrescens</i>	octobre 1992	oui	40-44	H (oral)
<i>P. oralis</i>	novembre 1964	non	43.1	H (oral)
<i>P. oris</i>	janvier 1982	non	42-46	H (oral)
<i>P. oulorum</i>	avril 1985	non	45.1	H (oral)
<i>P. pallens</i>	janvier 1998	oui	ND	H (oral)
<i>P. paludivivens</i>	août 2007	non	39.2	E (racines de riz)
<i>P. pleuritidis</i>	août 2007	non	45.4	H (respiratoire)
<i>P. ruminicola</i>	novembre 1957	non	46.5-50.6	A (tube digestif) → H
<i>P. salivae</i>	mai 2004	non	41.3	H (oral)
<i>P. shahii</i>	mai 2004	non	44.3	H (oral)
<i>P. .stercorea</i>	mai 2007	non	48.2	H (tube digestif)
<i>P. tanneriae</i>	octobre 1994	v	45.0	H (oral)
<i>P. timonensis</i>	avril 2007	non	ND	H (abcès sein)
<i>P. veroralis</i>	janvier 1983	non	42.1	H (oral)
<i>P. zoogloiformans</i>	juillet 1937	non	47.0	H (oral)

* de la souche type (selon <http://www.atcc.org/>, <http://www.dsmz.de/> et <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) ; NA, non applicable (article sous presse) ; ND, non déterminé ; v, caractère variable ; A, origine animale ; H, origine humaine ; E, origine environnementale.

III. IDENTIFICATION DES BACTERIES DU GENRE *PREVOTELLA*

Le genre *Prevotella* regroupe plus d'une quarantaine d'espèces dont la croissance nécessite des milieux au sang enrichis en hémine. Il est divisé en espèces non pigmentées et en espèces pigmentées. Ces dernières produisent une protoporphyrine responsable d'une pigmentation noire sur milieu au sang après une incubation de durée variable selon l'espèce (95, 222).

1. Caractères morphologiques

Les *Prevotella* spp. sont des bacilles à Gram négatif anaérobies immobiles, non sporulés et polymorphes. Certaines espèces telles que *P. bivia* et *P. disiens* peuvent se présenter sous forme de coccobacilles. La croissance de ces bactéries est assez lente et peut nécessiter plus de 48 h d'incubation. La température de croissance optimale est de 35°C. L'aspect des colonies est très variable selon les espèces. Ainsi, les colonies de *P. oris* et *P. buccae* présentent un aspect muqueux alors que celles de *P. heparinolytica* et *P. zoogloformans* adhèrent à la gélose et celles de *P. dentalis* forment des colonies en goutte d'eau (167).

Les espèces pigmentées produisent un pigment qui apparaît en deux à cinq jours, voire plus, sur milieu au sang enrichi en vitamine K1 (phytoménadione) et en hémine. La pigmentation apparaît plus rapidement sur milieu au sang laqué (95). Cette pigmentation est précédée d'une fluorescence rouge sous excitation UV.

2. Caractères métaboliques

L'identification et la différenciation des bacilles à Gram négatif anaérobies en routine sont basées dans un premier temps sur la détermination de caractères phénotypiques d'orientation (Tableau 6). La croissance des *Prevotella* spp. est inhibée par la bile à 20% et par le vert brillant (28, 64). Des disques d'antibiotiques peuvent être utilisés comme aide à l'identification. Les *Prevotella* spp. sont résistantes à la kanamycine et à la vancomycine. La sensibilité à la colistine (10 µg) varie selon les espèces (53).

Tableau 6. Caractères orientatifs pour l'identification des bacilles à Gram négatif anaérobies.
v, caractère variable ; -, caractère négatif ; +, caractère positif.

Groupes	Catalase	Pigment noir ^b	Sensibilité (S) ou résistance (R) à :			
			Bile (1 mg)	Vert brillant (100 mg)	Kanamycine (1 mg)	Vancomycine (5 µg)
<i>Bacteroides</i> du groupe <i>fragilis</i>	v	-	R	S	R	R
<i>Prevotella</i>	- ^a	v	S	S	R	R
<i>Porphyromonas</i>	v	+	S	S	R	S
<i>Fusobacterium</i>	-	-	V	R	S	R

^a sauf *P. oulorum* qui produit une catalase (167) ; ^b pigmentation observée après culture sur milieu au sang.

L'identification d'espèce repose également sur l'étude de la fermentation des sucres et du pouvoir protéolytique (Tableaux 7 et 8). Toutes les espèces sont glucidolytiques mais seules certaines d'entre elles fermentent les pentoses. La production d'indole et de lipase est variable. Pour l'étude de la fermentation des sucres et de la production d'indole, des galeries miniaturisées, API 20A (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France) par exemple, peuvent être utilisées. Il existe également des galeries enzymatiques telles que la galerie Rapid ANA II (Remel, Santa Fe Drive, USA) et la galerie Rapid ID 32A (bioMérieux).

La détermination des produits terminaux majeurs du métabolisme par la technique de CPG peut permettre d'identifier certaines espèces. Seuls quelques laboratoires spécialisés disposent de cette technique. Les principaux acides produits sont les acides acétique et succinique. Certaines espèces produisent en plus des acides isobutyrique, isovalérique, lactique ou plus rarement propionique (167).

Tableau 7. Caractéristiques des principales espèces non pigmentées de *Prevotella* spp. (82, 167, 286).

Espèces bactériennes	Fermentation des sucres													
	Indole	Hydrolyse de l'esculine	Arabinose	Cellobiose	Glucose	Lactose	Salicine	Saccharose	Xylose	α -fucosidase	β -galactosidase	β -NAG*	β -xylosidase	Colistine
Espèces fermentant les pentoses														
<i>P. buccae</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	S
<i>P. dentalis</i>	-	v	+	+	+	+	-	f	v	-	+	+	v	R/S
<i>P. heparinolytica</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	R/S
<i>P. oris</i>	-	+	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	R
<i>P. zoogloiformans</i>	-	+	v	+	+	+	v	+	v	+	+	+	+	R/S
Espèces ne fermentant pas les pentoses :														
<i>P. baroniae</i>	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	nd	nd
<i>P. buccalis</i>	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	nd
<i>P. enoeca</i>	-	v	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	R
<i>P. marshii</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	nd	nd
<i>P. oralis</i>	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	R/S
<i>P. oulorum</i>	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	nd
<i>P. shahii</i>	-	-	-	-	+	+	-	+		f	f	+	nd	nd
<i>P. veroralis</i>	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	nd
Espèces protéolytiques														
<i>P. bivia</i>	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	R
<i>P. disiens</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	R/S

* β -NAG, β -N-acétylglucosaminidase.

+, réaction positive ; -, réaction négative ; f, réaction faiblement positive ; v, réaction variable ; R, résistant ; S, sensible ; nd, non disponible.

Tableau 8. Caractéristiques des principales espèces pigmentées de *Prevotella* spp. (167).

Espèces bactériennes	Fermentation des sucres												
	Indole	Lipase	Glucose	Cellobiose	Lactose	Saccharose	Hydrolyse de l'esculine	α -fucosidase	α -galactosidase	β -galactosidase	β -NAG	Trypsine	Chymotrypsine
<i>P. corporis</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>P. denticola</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>P. intermedia</i>	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
<i>P. loescheii</i>	-	v	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>P. melaninogenica</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>P. nigrescens</i>	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
<i>P. pallens</i>	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
<i>P. tanneriae</i>	-	-	+	-	+	v	-	+	-	+	+	-	-

* β -NAG, β -N-acétylglucosaminidase.

+, réaction positive ; -, réaction négative ; v, réaction variable.

Cependant, une identification phénotypique fiable au rang d'espèce des membres du genre *Prevotella* peut poser des problèmes en pratique courante et nécessiter l'utilisation de techniques de biologie moléculaire, comme le séquençage de l'ADNr 16S. Cette technique permet la différenciation de certaines espèces ainsi que la découverte de nouvelles espèces (126, 222, 287).

3. Caractères génétiques

a) Données génomiques

Le Projet Microbiome Humain (HMP), qui a vu le jour en décembre 2007, utilise une approche de métagénomique appliquée aux flores commensales humaines afin de déterminer, entre autres, s'il existe un "*core microbiome*" humain et quelles sont les variations au sein de ces flores ainsi que leurs conséquences sur le développement et la santé (<http://nihroadmap.nih.gov/hmp/>). Dans le cadre de ce projet, plusieurs souches de *Prevotella* spp. appartenant à ces différentes flores sont en cours de séquençage total. Parmi ces projets, six sont au stade de l'assemblage des séquences mais aucun d'entre eux n'est terminé ou disponible en accès libre à ce jour (Tableau 9).

Avant le début de ce travail, le genre *Prevotella* n'avait fait l'objet d'aucune étude concernant le nombre d'opérons *rrn* ou la structure du squelette ribosomique par ECP. Cette technique a depuis été utilisée par l'équipe montpelliéraine DIBOP dans le cadre de l'étude d'isolats appartenant à une nouvelle espèce de *Prevotella*, proche de *P. buccalis*, et a permis de montrer que celle-ci possédait quatre opérons ribosomiques sur un chromosome ayant une taille moyenne estimée à 2.85 Mb (222). Ce travail leur a également permis de différencier de manière nette cette nouvelle espèce de l'espèce *P. buccalis* dont la souche type possédait trois opérons *rrn* sur un chromosome de 3.45 Mb.

Tableau 9. Projets en cours de séquençage de génomes complets de *Prevotella* spp. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=genomeprj&cmd=search&term=prevotella>).

Espèce	Souche	Site d'isolement	Taille ^a du génome (Mb)	N° d'accession
<i>P. bergensis</i> ^b	DSM 17361 ^T	tissus mous	3.2	NZ_ACKS00000000
<i>P. buccae</i>	D17	oral	nd ^d	nd ^d
<i>P. bivia</i>	JCVIHMP010	vagin	2	nd ^d
<i>P. bivia</i>	JCVIHMP011	peau	2	nd ^d
<i>P. copri</i> ^b	DSM 18205 ^T	selles	3.3	NZ_ACBX00000000
<i>P. intermedia</i> ^c	st. 17	poche parodontale	2.7	nd ^d
<i>P. melaninogenica</i> ^b	ATCC 25845 ^T	crachat	3.2	NZ_ACSI00000000
<i>P. melaninogenica</i>	JCVIHMP012	peau	2	nd ^d
<i>P. oris</i> ^b	F0302	nd ^d	3.2	NZ_ACUZ00000000
<i>P. ruminicola</i> ^c	st. 23 ^T	rumen (bovin)	3.6	nd ^d
<i>Prevotella</i> sp.	JCVIHMP051	nd ^d	2	nd ^d
<i>Prevotella</i> sp.	F0108	bouche	nd ^d	nd ^d
<i>Prevotella</i> sp.	F0295	oral	nd ^d	nd ^d
<i>P. tanneræ</i> ^b	ATCC 51259 ^T	bouche	2.5	NZ_ACIJ00000000
<i>P. veroralis</i> ^b	F0319	nd ^d	3.0	NZ_ACVA00000000

^a taille approximative estimée à partir des résultats préliminaires de séquençage ; ^b génomes au stade d'assemblage des séquences ; ^c séquençage non effectué dans le cadre du HMP ; ^d nd, non disponible.

b) Données génotypiques

Plusieurs marqueurs moléculaires ont été utilisés pour l'analyse génotypique des bactéries du genre *Prevotella* (Tableau 10). Étant un préalable à toute description d'espèce, les séquences des gènes codant les ARNr 16S ont été déposées pour toutes les espèces. Le gène codant la protéine de choc thermique HSP 60 (*cpn60*) ou celui codant la sous-unité β de l'ARN polymérase (*rpoB*) ont été fréquemment utilisés pour l'étude de ce genre bactérien (22, 151). Ponctuellement, le gène de la protéine de choc thermique HSP 70 (*dnaK*) ou celui codant la recombinase A (*recA*) ont été séquencés pour certaines espèces.

Tableau 10. Marqueurs moléculaires utilisés pour l'étude du genre *Prevotella*.
D'après <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=nucore>.

Espèces	ADNr 16S	<i>cpn60</i>	<i>rpoB</i>	Autres marqueurs
<i>P. albensis</i>	×		×	<i>dnaK</i>
<i>P. amnii</i>	×			
<i>P. auriantica</i>	×	×		
<i>P. baroniae</i>	×			
<i>P. bergensis</i>	×			
<i>P. bivia</i>	×	×	×	
<i>P. brevis</i>	×			
<i>P. bryantii</i>	×			
<i>P. buccae</i>	×	×	×	
<i>P. buccalis</i>	×	×		
<i>P. copri</i>	×			
<i>P. corporis</i>	×	×	×	
<i>P. dentalis</i>	×			
<i>P. dentasini</i>	×			
<i>P. denticola</i>	×	×	×	
<i>P. disiens</i>	×	×	×	
<i>P. enoeca</i>	×	×		
<i>P. falsenii</i>	×	×		
<i>P. heparinolytica</i>	×	×		
<i>P. histicola</i>	×			
<i>P. intermedia</i>	×	×	×	
<i>P. loescheii</i>	×	×		<i>dnaK</i>
<i>P. maculosa</i>	×			
<i>P. marshii</i>	×		×	
' <i>P. massiliensis</i> '	×		×	
<i>P. melaninogenica</i>	×	×	×	ITS 16S-23S
<i>P. micans</i>	×			
<i>P. multiformis</i>	×			
<i>P. multisaccharivorax</i>	×			
<i>P. nanceiensis</i>	×		×	
<i>P. nigrescens</i>	×	×	×	
<i>P. oralis</i>	×	×		<i>gyrB</i>
<i>P. oris</i>	×	×	×	
<i>P. oulorum</i>	×		×	
<i>P. pallens</i>	×	×		
<i>P. paludivivens</i>	×			
<i>P. pleuritidis</i>	×			
<i>P. ruminicola</i>	×	×		<i>recA</i>
<i>P. salivae</i>	×			
<i>P. shahii</i>	×		×	
<i>P. stercorea</i>	×			
<i>P. tanneriae</i>	×	×		
<i>P. timonensis</i>	×			
<i>P. veroralis</i>	×	×		
<i>P. zoogloiformans</i>	×	×		

IV. SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES AU SEIN DU GENRE *PREVOTELLA*

1. Résistance aux antibiotiques des *Prevotella* spp.

En tant qu'anaérobies strictes, les bactéries du genre *Prevotella* sont naturellement résistantes aux aminosides par défaut de transport membranaire de ces antibiotiques. Elles sont également naturellement résistantes à l'aztréonam, au triméthoprim, aux sulfamides, aux quinolones, à la fosfomycine, aux glycopeptides et à l'acide fusidique (53, 84).

Chez *Prevotella* spp., la résistance acquise aux β -lactamines est essentiellement due à la production d'une céphalosporinase appartenant à la famille des CfxA qui hydrolyse les aminopénicillines, les céphalosporines de première génération, le céfuroxime ainsi que les céphalosporines de troisième génération orales. La ticarcilline, la céfoxitine, et l'imipénème ne sont pas touchés par cette enzyme. Cette β -lactamase de classe A, décrite chez les espèces *P. bivia*, *P. buccae*, *P. denticola*, *P. disiens*, *P. intermedia*, *P. melaninogenica* et *P. oralis*, est sensible à l'action des inhibiteurs de β -lactamase (53, 84, 125, 267). Les CMI de l'amoxicilline sont inférieures à 0.5 $\mu\text{g/ml}$ pour les souches non productrices de β -lactamase (53, 110, 305). Cette résistance peut être mise en évidence par un test chromogénique à la nitrocéphine (28). Cependant, l'interprétation de ce test n'est pas toujours aisée chez les *Prevotella* spp., soit à cause de la pigmentation de certaines espèces qui peut gêner la lecture, soit par une production de la β -lactamase à bas niveau ou si cette enzyme présente une affinité diminuée (53). Bien que la prévalence de cette céphalosporinase semble globalement augmenter chez *Prevotella* spp. (239), des taux variables sont retrouvés selon les études (Tableau 11). La dernière étude française montre que 57% des souches de *Prevotella* isolées en 2003 étaient productrices de β -lactamases (85, 305). De très rares souches de *P. bivia* produisant une autre β -lactamase de classe A hydrolysant la céfoxitine ont également été rapportées (267). Une souche résistante à l'imipénème (CMI, 16 $\mu\text{g/ml}$) vient d'être décrite (208). Le gène *cfiA* codant une carbapénémase chez *Bacteroides fragilis* (283) n'a pas été décrit, du moins à notre connaissance, chez *Prevotella* spp.

Tableau 11. Tableau récapitulant les résultats de sensibilité de *Prevotella* spp. à certains antibiotiques des principales études publiées depuis janvier 2008.

Pays	Isolats					Pourcentage de résistance ^a					Réf.
	Nb de souches	Nb d'espèces	Origine	Date d'obtention	Méthode de détermination de la sensibilité aux antibiotiques	Pénicilline G	Pénicilline – inhibiteur de β-lactamase	Imipénème	Clindamycine	Métronidazole	
Belgique	81	>12	D ^b	2005-2007	Etest	68	0	nd ^d	≈23	0	(127)
Koweït	532	3	D ^b	2002-2007	Etest	77-90	5.6-7.6	0	22-32	0	(162)
France	65	>8	D ^b	2003	CMI agar	57	0	0	17	11	(305)
Suisse	326	2	O ^c	1991-2005	Etest	13	0	nd ^d	0.9	0	(189)
Grèce	141	10	nd ^d	2006-2007	Etest	69	0	0	31	8	(256)
Royaume-Uni	20	4	O ^c	nd ^d	Etest	36	7	nd ^d	36	46	(340)

^a interprétation selon le CLSI sauf pour la référence 305 (CA-SFM) ; ^b D, divers ; ^c O, orale ; ^d nd, non disponible.

La résistance à la clindamycine des *Prevotella* spp. est due à une modification enzymatique (méthylase) de la cible ribosomale (148). Les gènes impliqués (*ermF* ou *ermG*) induisent une résistance de type MLS_B retrouvée, selon l'espèce de *Prevotella*, dans 22 à 31% des souches dans l'étude de Jamal et coll. en 2009 (162). Il est à souligner que ces gènes, en particulier les gènes *ermF* sont localisés au niveau de transposons conjugatifs et qu'ils sont sous le contrôle de promoteurs portés par des séquences d'insertion (10, 279). La résistance aux streptogramines et aux kétolidés est rare (84).

Les fluoroquinolones récentes ont une activité modérée à satisfaisante sur les bactéries du genre *Prevotella*. Les molécules les plus actives sont la moxifloxacine, la trovafloxacine, ainsi que lévofloxacine pour certaines espèces (84, 321). Cependant des études récentes montrent une émergence des résistances aux fluoroquinolones. En 2006, Goldstein et coll. décrivaient que huit à 18% des *Prevotella* spp. testées présentaient une résistance à la moxifloxacine (131). Pour cette molécule, Liu et coll. (208) et Papaparaskevas et coll. (256) ont observé dans des études plus récentes (2008) des taux de sensibilité diminuée de 25 à 62%, respectivement.

Chez *Prevotella* spp., la résistance aux tétracyclines est due à une protection de la cible ribosomale par des protéines TetQ, TetM ou TetW (148, 267). La prévalence de cette résistance semble être assez élevée avec des taux allant jusqu'à 50% (10, 110, 177). Le gène

tetQ est situé sur un transposon conjugatif (10, 148). La tigécycline, n'étant pas touchée par ces phénomènes de résistance, conserve une bonne activité vis-à-vis de *Prevotella* spp. (127, 177, 374) bien que de très rares souches de sensibilité diminuée aient déjà été rapportées (130).

Les résistances au chloramphénicol ou à la rifampicine ont été exceptionnellement rapportées chez *Prevotella* spp. (183). Pour ce qui concerne le linézolide, de rares souches résistantes (CMI > 4 µg/ml) ont été rapportées (18).

2. Cas particulier du métronidazole

a) Mécanisme d'action des 5-nitroimidazolés

Les 5-nitroimidazolés sont des dérivés semi-synthétiques de l'azomycine ou 2-nitroimidazole produite par les *Streptomyces* spp. Leur action antibactérienne a été découverte fortuitement, car les dérivés de l'imidazole étaient avant tout considérés comme des antiparasitaires. En réalité, les 5-nitroimidazolés ont une action plus spécifique sur les organismes anaérobies et certains protozoaires.

Par rapport aux dérivés imidazolés qui possèdent uniquement une activité antifongique ou antiparasitaire, c'est l'addition d'un substituant nitro en position 5 qui confère à ces molécules l'activité antibactérienne ciblée spécifiquement sur les bactéries anaérobies ainsi que sur certaines espèces microaérophiles. En effet, après pénétration dans la bactérie par simple diffusion, l'antibiotique est activé par réduction de son groupement nitro par la pyruvate-ferrédoxine oxydoréductase bactérienne (Figure 27) (90, 267, 279). Au sein du complexe enzymatique POR (pyruvate-ferrédoxine/flavodoxine oxydoréductases), cette enzyme intervient dans la synthèse d'acétate qui sera utilisé par la bactérie comme source d'énergie. Elle utilise la ferrédoxine en tant qu'accepteur d'électron lors de la conversion du pyruvate en acétyl coenzyme A. Seules les bactéries anaérobies et certaines espèces microaérophiles sont à même d'opérer des réactions d'oxydo-réduction à un potentiel rédox suffisamment bas pour réduire le groupement nitro. Ces bactéries sont capables de métaboliser le pyruvate en acétylCoA en produisant de l'hydrogène par une réaction catalysée par la pyruvate-ferrédoxine oxydoréductase. La réduction du NO₂ du nitroimidazole s'opère

préférentiellement par rapport à celle des coenzymes bactériennes et conduit à une diminution du stock d'enzymes impliquées dans le métabolisme bactérien (279). Par ailleurs, certains des radicaux libres et des produits intermédiaires sont très réactifs et dès lors susceptibles de causer directement des dommages à l'ADN.

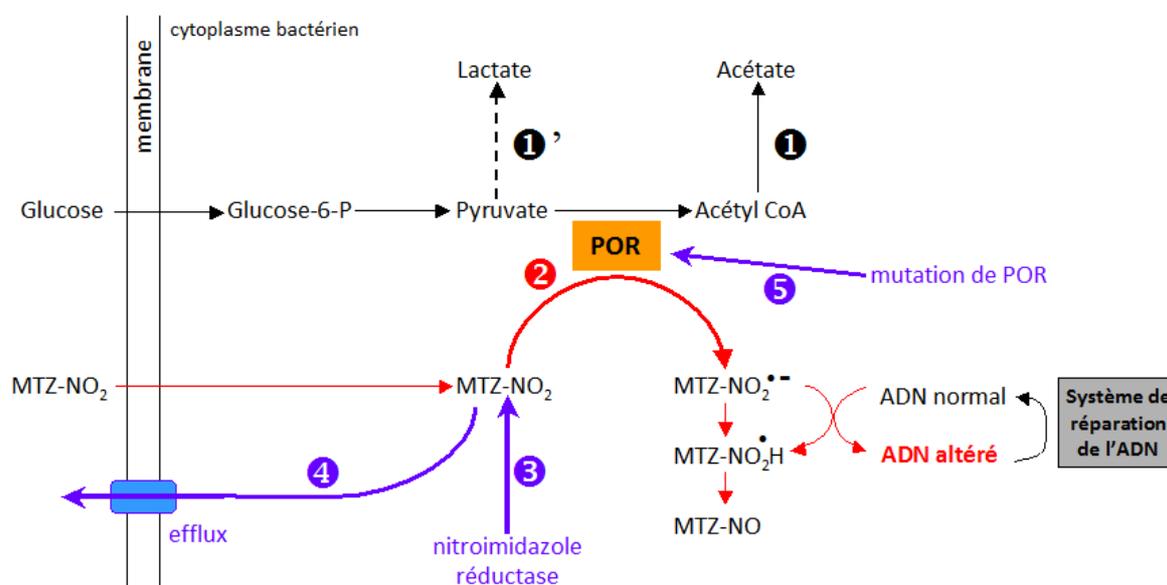


Figure 27. Mécanisme d'action et de résistance au métronidazole.

Voies classique (1) et alterne (1') d'utilisation du pyruvate pour la synthèse énergétique bactérienne.

Une fois entré par diffusion passive, le métronidazole (MTZ-NO₂) dérouté le système enzymatique POR (2) pour sa réduction en dérivés toxiques pour l'ADN. La résistance au métronidazole peut être due à une destruction de l'antibiotique (3), à son éjection hors de la cellule par une pompe à efflux (4), ou à des mutations de POR empêchant son activation (5).

Adapté de Edwards (1993) (90, 267, 276).

La nécessité d'une activation de ces antibiotiques par réduction limite le spectre des 5-nitroimidazolés aux bactéries anaérobies, ainsi qu'à quelques espèces microaérophiles (*Helicobacter* spp., *Campylobacter* spp., *Gardnerella vaginalis*) et à certains protozoaires anaérobies d'importance médicale (*Trichomonas vaginalis*, *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*,...).

b) Mécanismes de résistance au métronidazole chez les bactéries anaérobies

Selon les nouveaux seuils du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM) (53), on parle désormais de résistance au métronidazole dès lors qu'une CMI supérieure à 4 µg/ml est observée alors que pendant plusieurs années, les souches ayant des CMI de 8 ou 16 µg/ml étaient considérées comme étant de sensibilité intermédiaire.

Si l'on se réfère aux normes du CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), les souches sont considérées résistantes à partir d'une CMI > 16 µg/ml (47).

La résistance constitutive aux nitroimidazolés est rare chez les bactéries anaérobies strictes. Cependant, certaines espèces aéro-tolérantes (*Propionibacterium* spp., *Actinomyces* spp.) présentent une résistance constitutive, liée à une pénétration et/ou une réduction insuffisante de l'antibiotique dans la bactérie.

La première description en 1977 d'une souche résistante au métronidazole concernait une souche de *Bacteroides fragilis* isolée chez un patient atteint d'une maladie de Crohn qui avait été traité pendant plusieurs mois par de fortes doses de métronidazole (90). D'autres souches résistantes au métronidazole et appartenant au genre *Bacteroides* ont ensuite été décrites, bien que pour certaines d'entre elles, cette résistance a été controversée en raison de biais méthodologiques comme, en particulier, une mauvaise anaérobiose, facteur affectant l'activité des nitroimidazolés (27, 83, 279). Pour la majorité des souches pour lesquelles la résistance a été clairement établie, il a été montré que cette résistance était transférable par conjugaison et que les gènes impliqués étaient soit plasmidiques, soit chromosomiques. Au sein de l'Unité des Bactéries Anaérobies et des Toxines de l'Institut Pasteur de Paris, Reysset et coll. (1996) ont étudié les mécanismes génétiques de la résistance de ces souches. Ils ont mis en évidence trois plasmides, pIP417, pIP419 et pIP421, portant des gènes de résistance d'environ 500 pb (gènes *nim*) chez *B. vulgatus*, *B. thetaiotaomicron* et *B. fragilis*, respectivement. La localisation chromosomique d'un gène similaire a été mise en évidence chez une autre souche de *B. fragilis* (139, 140, 337). D'autres gènes *nim* (*nimA* à *nimG*) ont par la suite été décrits chez *Bacteroides* spp. et dans d'autres espèces de bactéries anaérobies (Tableau 12).

Carlier et coll. (1997) ont montré que l'introduction du gène *nimA* chez une souche de *B. fragilis* sensible au métronidazole induisait l'expression d'une résistance à cette molécule via la production d'une nitro-réductase (37). En effet, en utilisant la ferrédoxine réduite en tant que donneur d'électron, cette enzyme convertit le 5-nitroimidazole en 5-aminoimidazole, empêchant ainsi la formation de résidus nitrés toxiques (Figure 27). La structure et l'activité d'une nitro-réductase similaire (environ 20% d'identité de séquences et 45% de similarités avec les protéines Nim des bactéries anaérobies) ont été déterminées chez *Deinococcus radiodurans* (202, 203). Trinh et coll. (1995) ont décrit la présence d'une séquence d'insertion

(IS), située à quelques paires de bases du codon initiateur de la traduction, qui contient un promoteur interne responsable de l'activation du gène *nim* adjacent (337). La découverte ultérieure de gènes *nim* s'exprimant en l'absence d'IS suggère que leur présence n'est pas indispensable à l'expression de la résistance (176, 211, 312).

Tableau 12. Principales caractéristiques des gènes *nimA* à *nimG*.

Gène	Localisation ^a	Espèces	Séquence d'insertion	CMI MTZ (µg/ml)	Réf.
<i>nimA</i>	PLASMIDIQUE (7.7 Kb)	<i>Actinomyces odontolyticus</i> <i>Bacteroides</i> spp. <i>Clostridium bifermentans</i>	IS1168 IS1169	0.75 à > 256	(19, 94, 112, 139, 141, 163, 176, 211, 214, 289, 312, 324)
	Chromosomique	<i>Prevotella bivia</i> <i>Propionibacterium</i> spp.			
<i>nimB</i>	CHROMOSOMIQUE	<i>Anaerococcus prevotii</i> <i>Bacteroides</i> spp. <i>Fingoldia magna</i>	IS1168 IS612	0.5 à > 128	(13, 112, 139, 211, 214, 312, 324, 332, 338)
	Plasmidique	<i>Parvimonas micra</i> <i>Peptoniphilus asaccharolyticus</i> <i>Peptostreptococcus anaerobius</i>			
<i>nimC</i>	PLASMIDIQUE (10 Kb)	<i>Bacteroides</i> spp. <i>Prevotella oralis</i>	IS1170	1.5 à > 32	(112, 176, 312, 324, 338)
	Chromosomique	<i>Porphyromonas</i> spp.			
<i>nimD</i>	PLASMIDIQUE (7.3 Kb) et CHROMOSOMIQUE	<i>Bacteroides</i> spp. <i>Fusobacterium</i> spp.	IS1169	0.25 à > 32	(112, 176, 312, 324, 338)
<i>nimE</i>	PLASMIDIQUE (8.3 Kb)	<i>Bacteroides</i> spp. <i>Prevotella buccalis</i> <i>Prevotella oralis</i> <i>Veillonella</i> spp.	ISBf6	1.5 à 256	(112, 163, 176, 211, 221, 312, 324),
<i>nimF</i>	nd	<i>Bacteroides vulgatus</i>	NON ^b	1	(211)
<i>nimG</i>	nd	<i>Bacteroides fragilis</i>	nd	2	(112)

^a Localisation préférentielle en majuscule ; ^b après recherche des IS1168, IS1169 et IS1170 ; MTZ, métronidazole ; nd, non disponible.

Par ailleurs, la présence d'un gène *nim* ne conduit pas systématiquement à l'expression d'une résistance au métronidazole (13, 112, 214). Certaines études ont mis en évidence que l'expression de la résistance au métronidazole chez ces souches *nim* "silencieuses" pouvait être induite *in vitro* et suggèrent que ces souches pourraient être, de ce fait, à l'origine d'échecs thérapeutiques chez des patients traités par métronidazole (112, 211, 290). De telles

souches sont difficilement voire non détectables par les techniques phénotypiques utilisées en routine pour l'étude de la sensibilité aux antibiotiques. Ceci souligne l'importance de la détection des gènes *nim* par PCR, en particulier en utilisant des amorces détectant les différents génotypes (338). Par ailleurs, il a été montré *in vitro* qu'un transfert de gènes *nim* était possible de *B. fragilis* vers d'autres espèces de *Bacteroides* mais aussi vers des espèces du genre *Prevotella* (140, 312, 336). Ceci suggère qu'une dissémination de ces gènes pourrait avoir lieu au sein des flores commensales comme cela a été montré dans le tube digestif humain pour les gènes *erm* et *tet* qui ont été transmis entre espèces de *Bacteroides* et à d'autres bactéries à Gram positif (301).

Parmi les souches anaérobies résistantes au métronidazole et appartenant à diverses espèces et genres bactériens, des isolats ne possédant pas de gène *nim* ont été rapportés (112, 176, 211, 214, 257, 276, 288, 290, 352). Ceci peut s'expliquer par l'existence de génotypes *nim* non détectés par la PCR ou celle de mécanismes différents tels qu'une diminution de la perméabilité membranaire, une altération de l'activité de la pyruvate-ferrédoxine oxydoréductase ou la présence de pompes à efflux (90, 247, 276). Chez *Bacteroides* spp., il a été montré que cette résistance non associée à la présence de gène *nim* pouvait également être induite par le métronidazole (290).

c) Résistance au métronidazole chez *Prevotella* spp.

Dans des études récentes, des taux de résistance au métronidazole variant de 0 à 46% ont été rapportés au sein du genre *Prevotella* (127, 162, 189, 256, 305, 340). Cette différence pourrait s'expliquer par la variabilité du nombre de souches étudiées et de leur origine (humaines/animales, site infectieux/flore commensale, situation géographique) ainsi que par la diversité des espèces incluses. L'étude rapportant 46% de résistance a été effectuée sur 14 souches isolées de crachats de patients adultes mucoviscidosiques (340). Des souches présentant une résistance ou une sensibilité intermédiaire ont été observées chez les espèces suivantes : *P. bivia*, *P. buccae*, *P. buccalis*, *P. corporis*, *P. disiens*, *P. heparinolytica*, *P. intermedia*, *P. loescheii*, *P. oralis* et *P. melaninogenica* (7, 11, 18-20, 26, 176, 208, 213, 219, 256, 257, 288, 305, 322, 340, 360).

Cependant, au cours de ces études, la présence de gènes *nim* n'a été que rarement recherchée (176, 214, 257). Ceci pourrait expliquer, du moins en partie, que seules quatre souches de

Prevotella possédant un gène *nim* ont été rapportées à ce jour : une souche ayant un gène silencieux (*P. bivia*, *nimA*, CMI=2 µg/ml) (214) et trois autres souches résistantes au métronidazole (CMI > 32 µg/ml), possédant un gène *nimC* (*P. oralis*) ou *nimE* (*P. oralis*, *P. buccalis*) (176).

3. Gènes *nim* et évolution

Les différents sous-types de Nim détectés chez *Bacteroides* spp. partagent entre 62.5 et 83.5% des positions de leur séquence protéique (75 à 95% d'acides aminés similaires) (Tableau 13). La plus forte identité de séquences de la protéine Nim de *D. radiodurans* est obtenue avec NimA de *B. vulgatus* (23.3%), expliquant peut être pourquoi les auteurs continuent à la désigner sous le nom de NimA (202, 203).

Tableau 13. Pourcentage d'identité (**gras**) et de similarité (*italique*) entre les séquences des nitroimidazole réductases décrites chez *Bacteroides* spp. et *D. radiodurans* (Nim Dr).

Protéines	N° d'accension	Nim Dr	NimA	NimB	NimC	NimD	NimE	NimF	NimG
Nim Dr	Q9RW27	—	23.3	22.4	20.9	20.9	22.4	21.4	21.4
NimA	CAA50581	<i>48.0</i>	—	68.7	62.5	70.4	68.1	64.2	68.7
NimB	CAA50578	<i>48.0</i>	<i>82.0</i>	—	71.3	83.5	76.8	73.1	83.5
NimC	CAA54269	<i>47.0</i>	<i>77.0</i>	<i>88.0</i>	—	72.5	68.0	66.2	70.5
NimD	CAA54273	<i>47.0</i>	<i>81.0</i>	<i>95.0</i>	<i>88.0</i>	—	73.7	73.1	82.9
NimE	CAB82516	<i>43.0</i>	<i>75.0</i>	<i>87.0</i>	<i>80.0</i>	<i>84.0</i>	—	74.5	79.2
NimF	CAD56147	<i>46.0</i>	<i>78.0</i>	<i>87.0</i>	<i>84.0</i>	<i>87.0</i>	<i>88.0</i>	—	80.5
NimG	(112)*	<i>46.0</i>	<i>78.0</i>	<i>90.0</i>	<i>83.0</i>	<i>89.0</i>	<i>90.0</i>	<i>93.0</i>	—

* la séquence du gène *nimG* n'a pas été déposée dans une base de données et est disponible dans la publication de description.

Avec l'avènement de la métagénomique, des gènes similaires ont été détectés dans les génomes de plusieurs espèces, notamment *Fusobacterium nucleatum* (NP_602944 et NP_603920), *Streptomyces avermiformis* (Q827C5) ou même l'archée *Methanosarcina mazei* (Q8PT76) (175, 202). Ces protéines putatives ne partagent pas plus de 31.2% d'identité avec les nitroimidazole réductases des bactéries anaérobies. Cependant, un site actif possédant une Histidine est conservé chez l'ensemble de ces protéines.

Il est intéressant de souligner que parmi les sept gènes *nim* décrits chez *Bacteroides*, seuls *nimB* (42.7 mol%), *nimE* (41.2 mol%) et *nimG* (47.1 mol%) ont une composition en G+C compatible avec celle du génome des bactéries du genre *Bacteroides* (42-48 mol%) (279). Le G+C% des autres gènes est supérieur à 50 mol%. Par ailleurs, le fait que certains promoteurs de ces gènes soient situés sur des IS suggère que ces gènes pourraient provenir d'un organisme dont les signaux transcriptionnels ne sont pas reconnus par *Bacteroides* spp. et donc nécessitent un autre mécanisme d'activation (279). Cette hypothèse est appuyée par la présence chez ces bactéries d'autres gènes comme *ermF* ou *cfiA* qui sont sous le contrôle d'une IS. Une même IS peut activer la transcription de différents gènes de résistance comme par exemple l'IS1168 qui active à la fois la transcription du gène *cfiA* mais également celle des gènes *nimA* et *nimB* (139, 311). Ces gènes pourraient dériver d'un ancêtre commun et, après acquisition par certaines bactéries, notamment du genre *Bacteroides*, avoir évolué de façon indépendante. Leur transfert ultérieur à d'autres genres bactériens au sein des flores, comme cela a été discuté plus haut (140, 301, 312, 336), peut expliquer la prévalence actuelle de tels gènes au sein de différentes espèces bactériennes, sans que l'origine initiale ou un éventuel réservoir bactérien soient connus.

PROBLEMATIQUES

L'observation au Laboratoire de Bactériologie du CHU de Nancy de phénomènes de résistance, d'une part à la vancomycine chez des bactéries appartenant à la famille *Clostridiaceae*, et d'autre part au métronidazole chez les bactéries du genre *Prevotella*, a été à l'initiative de ce travail. La plupart de ces souches ont été impliquées dans des pathologies sévères et représentaient des facteurs potentiels d'échec thérapeutique.

La position taxonomique des espèces *Clostridium hastiforme* et *Clostridium orbiscindens*, ayant toutes deux un bas niveau de résistance à la vancomycine, est incertaine. *C. hastiforme* vient d'être reclassé en *Tissierella praeacuta* (ex *Bacteroides praeacutus*, bacille à Gram négatif non sporulé) alors que *C. orbiscindens* se confond phylogénétiquement à l'espèce *Eubacterium plautii* (ex *Fusobacterium plautii*, bacille à Gram négatif non sporulé). Par ailleurs, *T. praeacuta* a été dernièrement transférée dans la famille *Incertae Sedis XI* au sein des *Clostridia*, ce qui signifie que sa position ainsi que celle des espèces apparentées reste à définir (216). L'espèce *C. orbiscindens* devrait également être reclassée dans une nouvelle famille que Ludwig propose d'appeler '*Ruminococcaceae*'. La nature du lien de parenté que cette espèce partage avec *E. plautii* reste à déterminer.

Le premier objectif de ce travail a été de clarifier la position taxonomique de ces deux espèces comme préalable à l'étude des mécanismes de résistance à la vancomycine. Pour cela, une approche mixte et consensuelle a été utilisée afin de déterminer si *T. praeacuta* et *C. hastiforme* forment réellement une seule et même espèce et si *C. orbiscindens* et *E. plautii* représentent des espèces séparées. Nous avons également voulu définir la place de ces espèces au sein des *Clostridiaceae*, des *Clostridia*, des *Firmicutes* et du domaine *Bacteria* ainsi que les reclassifications et les créations à prévoir.

Par ailleurs, à partir d'un large panel d'isolats cliniques de *Prevotella* spp. responsables d'infections humaines, l'observation d'une résistance au métronidazole chez un groupe de souches n'appartenant à aucune des espèces décrites nous a conduit à utiliser une approche taxonomique mixte et consensuelle afin de caractériser cette nouvelle espèce. Les marqueurs impliqués dans la résistance au métronidazole chez cette nouvelle espèce ainsi que chez les autres espèces étudiées ont été déterminés et caractérisés.

MATERIEL ET METHODES

Souches bactériennes et conditions de culture

I. *TISSIERELLA* SPP. ET GENRES APPARENTES

1. Souches cliniques et souches de référence

Vingt-sept souches appartenant aux genres *Tissierella* spp. et apparentés ont été incluses dans cette étude (Tableau 14). En dehors des celles isolées au laboratoire de Bactériologie du CHU de Nancy, ces souches ont été fournies par le laboratoire de Bactériologie du CHU de Rouen et l'Institut Pasteur de Paris.

Dix-huit souches cliniques ainsi qu'une souche d'origine animale (VPI 10426) ont été sélectionnées sur la base d'une identification phénotypique les affiliant aux espèces *T. praeacuta* ou *C. hastiforme*. Afin d'étudier la position taxonomique de ce groupe de souches, nous avons sélectionné les espèces et genres les plus proches qui ont été analysés en parallèle. Pour cela, une recherche par similarité ou BLAST (pour Basic Local Alignment Search Tool) a été réalisée à partir de la séquence d'ADNr 16S de la souche type *T. praeacuta* DSM 5675^T (n° d'accèsion X80841) à l'aide du logiciel Blastn disponible sur le site <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (4). Les espèces et genres apparentés les plus proches sur la base de leur séquence d'ADNr 16S au moment de l'analyse étaient les suivants :

- *Tissierella creatinophila* X80227 (cette séquence est déposée dans les bases de données sous le nom *Tissierella* sp. Kre4)
- *Tissierella creatinini* X75909 (cette séquence est déposée dans les bases de données sous le nom *Clostridium* sp. BN11 et n'est pas référencée dans la publication de description de l'espèce)
- *Soehngenia saccharolytica* AY353956
- *Sporanaerobacter acetigenes* AF358114 (dont une mauvaise appellation sous le nom de genre *Acetanaerobacter* persiste dans les bases de données)

- *Tepidimicrobium ferriphilum* AY656718
- *Clostridium ultunense* Z69293

L'espèce *Proteiniborus ethanoligenes* n'étant alors pas validée, elle n'a pas été incluse dans la suite des analyses.

Tableau 14. Liste et origine des souches de *Tissierella* spp. et des genres apparentés étudiées.

Espèce	N° de souche ^a	Origine	Site d'isolement
<i>T. praeacuta</i> / <i>C. hastiforme</i> (identification phénotypique)	AIP 224.02	Humaine	peau et tissus mous
	AIP 249.98	Humaine	os
	AIP 285.00	Humaine	sang
	AIP 30.02	Humaine	sang
	AIP 310.01	Humaine	peau et tissus mous
	AIP 443.98	Humaine	non précisé
	AIP 488.98	Humaine	peau et tissus mous
	AIP 64.01	Humaine	sang
	LBN 290	Humaine	peau et tissus mous
	LBN 291	Humaine	peau et tissus mous
	LBN 292	Humaine	sac lacrymal
	LBR 1	Humaine	sang
	LBN 299	Humaine	peau et tissus mous
	LBN 295	Humaine	peau et tissus mous
	LBN 296	Humaine	sang
	IP Prévot 3583	Humaine	non précisé
	VPI 11497A	Humaine	sang
	VPI 12486A	Humaine	peau et tissus mous
	VPI 10426	Animale (bovin)	système nerveux central
	<i>C. hastiforme</i>	ATCC 33268 ^T	Humaine
<i>T. praeacuta</i>	ATCC 25539 ^T	Humaine	peau et tissus mous
<i>T. creatinini</i>	DSM 9508 ^T	Environnementale	boues d'épuration anaérobies
<i>T. creatinophila</i>	DSM 6911 ^T	Environnementale	boues d'épuration anaérobies
<i>C. ultunense</i>	DSM 10521 ^T	Environnementale	boues d'épuration anaérobies
<i>S. acetigenes</i>	DSM 13106 ^T	Environnementale	boues d'épuration anaérobies
<i>S. saccharolytica</i>	DSM 12858 ^T	Environnementale	boues d'épuration anaérobies
<i>T. ferriphilum</i>	DSM 16624 ^T	Environnementale	sédiments (source chaude d'eau douce)

^a AIP, Anaérobies Institut Pasteur; ATCC, American Type Culture Collection; DSM, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen; LBN, Laboratoire de Bactériologie de Nancy; LBR, Laboratoire de Bactériologie de Rouen; VPI, Virginia Polytechnic Institute.

Ces résultats ont été confirmés par une recherche via le programme SeqMatch dans la base de données *RDP* sur le site <http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp> (49) ainsi qu'après recherche de la position taxonomique proposée par la base de données *Greengenes* selon la classification de Hugenholtz sur le site <http://greengenes.lbl.gov/cgi-bin/nph-search.cgi> (67).

Ceci nous a conduit à étudier en parallèle *T. praeacuta* ATCC 25539^T, *C. hastiforme* ATCC 33268^T ainsi que les six souches types correspondant aux espèces ou genres apparentés cités ci-dessus.

2. Conditions de culture et de conservation

Les souches cliniques ainsi que les souches types de *T. praeacuta*, *C. hastiforme*, *T. creatinophila* et *S. saccharolytica* ont été mises en culture à 35°C en anaérobiose (réalisée en jarre à l'aide de sachet AnaeroGen[®], OXOID) sur milieu Brucella enrichi en vitamine K (1%), hémine (1%) et sang de mouton (5%) (BBA).

Les souches types de *T. creatinini*, *C. ultunense*, *T. ferriphilum* et *S. acetigenes* ont été ensemencées sur les milieux spécifiques recommandés par le fournisseur. Ces milieux de culture complexes et propres à chaque espèce n'étant pas commercialisés, nous les avons fabriqués au laboratoire (**Annexe A**). Les cultures sur milieux solides et liquides ont été incubées en jarres anaérobies (sachet AnaeroGen[®], OXOID) à 35°C pour *T. creatinini* et *C. ultunense* et 40°C pour *T. ferriphilum* et *S. acetigenes*.

Toutes les souches ont été congelées à -80°C en milieu Brain Heart Infusion (BHI) glycérolé à 15%.

II. *CLOSTRIDIUM ORBISCINDENS* ET *EUBACTERIUM PLAUTII*

1. Souches cliniques et souches types

Dix souches cliniques, isolées entre avril 2004 et avril 2007, ainsi que deux souches types appartenant aux espèces *C. orbiscindens* et *E. plautii* ont été incluses dans cette étude (Tableau 15).

Tableau 15. Liste et origine des souches de *C. orbiscindens* et des espèces apparentées étudiées.

Espèce	N° de souche	Isolat	Site d'isolement
<i>C. orbiscindens</i> / <i>E. plautii</i>	LBN 200		sang
	LBN 201		sang
	LBN 202		sang
	LBN 203		pus intra-abdominal
	LBN 204	clinique	peau et tissus mous
	LBN 205		pus intra-abdominal
	LBN 206		pus intra-abdominal
	LBN 207		sang
	LBN 208		sang
	AIP 201.04		pus intra-abdominal
<i>C. orbiscindens</i>	DSM 6740 ^T	souche type	selles
<i>E. plautii</i>	DSM 4000 ^T		secrétion gingivale

2. Conditions de culture et de conservation

Les souches cliniques et les souches types de *C. orbiscindens* et *E. plautii* ont été congelées à -80°C en milieu BHI glycérolé à 15% et des subcultures ont été effectuées sur milieu BBA incubé à 35°C en jarres anaérobies (sachet AnaeroGen[®], OXOID). Lors des manipulations effectuées à l'Institut Pasteur de Paris, ces souches ont été repiquées sur milieu trypticase-glucose-extrait de levure (TGY).

III. *PREVOTELLA* SPP.

1. Souches cliniques

Ce travail a porté sur 188 souches de *Prevotella* spp. isolées d'infections variées entre 2003 et 2006 (Tableau 16). Cent cinquante sept d'entre elles proviennent du Laboratoire de Bactériologie du CHU de Nancy et 31 du Laboratoire de Bactériologie du CHU de Poitiers.

Tableau 16. Distribution des espèces de *Prevotella* spp. en fonction du type d'infection.

Nb de souches selon l'espèce	Type d'infection									Nb total de souches (%)
	Tête et cou	Peau et tissus mous	Intra-abdominale	Pleuro-pulmonaire	Uro-génitale	Ostéo-articulaire	Bactériémie	Système nerveux central	Autre ^a	
<i>P. baroniae</i>	4	1	1	1	-	-	-	-	-	7 (3.7)
<i>P. bergensis</i>	-	2	-	-	-	-	-	-	-	2 (1.1)
<i>P. bivia</i>	6	16	1	-	15	1	2	-	-	41 (21.8)
<i>P. buccae</i>	12	2	6	6	1	4	3	-	1	35 (18.6)
<i>P. corporis</i>	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1 (0.5)
<i>P. denticola</i>	8	3	9	3	-	4	-	1	-	28 (14.9)
<i>P. disiens</i>	1	5	-	-	4	-	-	-	-	10 (5.3)
<i>P. heparinolytica</i>	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1 (0.5)
<i>P. intermedia</i>	1	-	-	-	-	-	1	-	-	2 (1.1)
<i>P. loescheii</i>	1	-	-	1	-	-	1	-	-	3 (1.6)
<i>P. melaninogenica</i>	4	2	7	3	-	-	-	-	1	17 (9.0)
<i>P. multiformis</i>	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1 (0.5)
<i>P. nigrescens</i>	2	1	-	-	-	1	1	-	-	5 (2.7)
<i>P. oralis</i>	-	-	1	2	-	2	-	-	-	5 (2.7)
<i>P. oris</i>	4	-	-	1	-	1	2	1	-	9 (4.8)
<i>P. salivae</i>	2	-	1	-	-	-	-	-	-	3 (1.6)
<i>P. veroralis</i>	1	1	1	-	-	-	-	-	-	3 (1.6)
<i>Prevotella</i> sp.	3	-	3	8	-	-	1	-	-	15 (8.0)
Nb total d'infections (%)	49 (26.1)	36 (19.1)	30 (16.0)	25 (13.3)	20 (10.6)	13 (6.9)	11 (5.8)	2 (1.1)	2 (1.1)	188

^a Autre: une dacryocystite, une infection sur prothèse aortique.

2. Souches types

Les souches types de *Prevotella* spp. utilisées dans cette étude sont présentées dans le tableau suivant.

Tableau 17. Liste des souches types de *Prevotella* spp. étudiées.

Espèces	Souches	Espèces	Souches
<i>P. albensis</i>	CIP 105472 ^T	<i>P. maculosa</i>	DSM 19339 ^T
<i>P. amnii</i>	CIP 109456 ^T	<i>P. marshii</i>	DSM 16973 ^T
<i>P. baroniae</i>	DSM 16972 ^T	<i>P. melaninogenica</i>	ATCC 25845 ^T
<i>P. bergensis</i>	DSM 17361 ^T	<i>P. multiformis</i>	DSM 16608 ^T
<i>P. bivia</i>	ATCC 29303 ^T	<i>P. multisaccharivorax</i>	DSM 17128 ^T
<i>P. buccae</i>	ATCC 33574 ^T	<i>P. nigrescens</i>	ATCC 33563 ^T
<i>P. buccalis</i>	ATCC 35310 ^T	<i>P. oralis</i>	ATCC 33269 ^T
<i>P. copri</i>	DSM 18205 ^T	<i>P. oris</i>	ATCC 33573 ^T
<i>P. corporis</i>	ATCC 33547 ^T	<i>P. oulorum</i>	CIP 104477 ^T
<i>P. dentalis</i>	DSM 3688 ^T	<i>P. pallens</i>	DSM 18710 ^T
<i>P. denticola</i>	ATCC 35308 ^T	<i>P. paludivivens</i>	DSM 17968 ^T
<i>P. disiens</i>	ATCC 29426 ^T	<i>P. salivae</i>	DSM 15606 ^T
<i>P. enoeca</i>	ATCC 51261 ^T	<i>P. shahii</i>	DSM 15611 ^T
<i>P. heparinolytica</i>	ATCC 35895 ^T	<i>P. .stercorea</i>	DSM 18206 ^T
<i>P. histicola</i>	DSM 19854 ^T	<i>P. tanneriae</i>	CIP 104476 ^T
<i>P. intermedia</i>	ATCC 25611 ^T	<i>P. veroralis</i>	ATCC 33779 ^T
<i>P. loescheii</i>	ATCC 15930 ^T	<i>P. zoogloformans</i>	ATCC 33285 ^T

3. Conditions de culture et de conservation

Les souches cliniques ainsi que les souches types de *Prevotella* spp. ont été cultivées sur milieu BBA et incubées à 35°C en anaérobiose (réalisée en jarre à l'aide de sachet AnaeroGen[®], OXOID). Toutes les souches ont été congelées à -80°C en milieu BHI glycérolé à 15%.

IV. SOUCHES UTILISEES EN TANT QUE CONTROLES

L'ensemble des souches bactériennes qui ont été utilisées dans ce travail en tant que contrôles pour les différentes manipulations est résumé dans le Tableau 18.

Tableau 18. Liste des souches contrôles de cette étude et de leur utilisation.

Espèce	Souche	Utilisation
<i>Bacteroides fragilis</i>	ATCC 25285 ^T	- sensibilité aux antibiotiques - souche <i>nim</i> -négative (PCR) - sélection de mutants résistants au métronidazole
	638R(pIP417)	- souche <i>nimA</i> -positive et IS1168-positive (PCR) - témoin gène <i>nim</i> plasmidique
	BF8	- souche <i>nimB</i> -positive et IS1168-positive (PCR) - témoin gène <i>nim</i> chromosomique
	638R(pIP421)	- souche <i>nimD</i> -positive et IS1169-positive (PCR)
	BF388(pBF388c)	- souche <i>nimE</i> -positive et ISBf6-positive (PCR)
	BF6712	- souche IS612-positive (PCR)
	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	ATCC 29741
BT13(pIP419)		- souche <i>nimC</i> -positive et IS1170-positive (PCR)
<i>Clostridium difficile</i>	630	- courbe de croissance (extraction du peptidoglycane)
	CIP 109239	- témoin positif <i>spo0A</i> (PCR)
	CD33*	- ECP (digestion I-CeuI)
	CD34*	- ECP (digestion I-CeuI)
<i>Clostridium perfringens</i>	ATCC 13124 ^T	- MET - ECP (digestion I-CeuI)
	<i>Enterococcus casseliflavus</i> ATCC 25788 ^T	- souche <i>vanC2</i> -positive (PCR)
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212	- sensibilité aux antibiotiques
	V583	- souche <i>vanB</i> -positive (PCR)
	BM4405	- souche <i>vanE</i> -positive (PCR)
	WCH9	- souche <i>vanG</i> -positive (PCR)
<i>Enterococcus faecium</i>	BM4147	- souche <i>vanA</i> -positive (PCR)
	BM4339	- souche <i>vanD</i> -positive (PCR)
<i>Enterococcus gallinarum</i>	BM4174	- souche <i>vanC1</i> -positive (PCR)
<i>Escherichia coli</i>	S197*	- souche <i>spo0A</i> -négative (PCR)
<i>Paenibacillus popilliae</i>	ATCC 14706 ^T	- souche <i>vanF</i> -positive (PCR)
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 29213	- sensibilité aux antibiotiques - confirmation de la présence de vancomycine dans le milieu
	NCTC 8325	- ECP (digestion <i>Xba</i> I)

* souches cliniques

Chaque souche a été cultivée selon les conditions optimales décrites pour l'espèce correspondante et elle a été conservée à -80°C en milieu BHI glycérolé à 15%.

Etude des caractères phénotypiques

I. DETERMINATION DES CARACTERES MORPHOLOGIQUES, CULTURAUX ET METABOLIQUES

1. Caractères morphologiques, cultureux et biochimiques

Après observation de l'aspect des colonies obtenues sur milieux gélosés à différents temps d'incubation, une coloration de Gram a été effectuée. Un examen à l'état frais a été effectué sur les souches de *Tissierella* spp. et genres apparentés afin de rechercher la mobilité des souches.

L'identification phénotypique a été réalisée en utilisant différents tests biochimiques, soit selon les recommandations du *Wadsworth-KTL Anaerobic Bacteriology Manual* (167) et/ou de l'*Anaerobe Laboratory Manual* (154), soit en utilisant des systèmes miniaturisés : galeries API 20A (bioMérieux, Marcy l'Etoile) (incubation 24 à 48 h à 35°C en anaérobiose), galeries Rapid ID 32A (bioMérieux, Marcy l'Etoile) pour l'étude du profil enzymatique (incubation 4 h à 35°C en anaérobiose), galeries Rapid ID ANAII (Remel, Santa Fe Drive, USA) (incubation 4 h à 35°C en aérobiose).

L'analyse des produits terminaux du métabolisme a été réalisée par CPG par l'équipe de J.P. Carlier à l'Institut Pasteur de Paris (34).

2. Détermination de la composition en acides gras cellulaires

La composition en acides gras cellulaires de la souche *Prevotella* sp. nov. LBN 293 a été déterminée par le service d'identification de la DSMZ en utilisant le système Sherlock Microbial Identification (Microbial ID Inc., Newark, Delaware, USA). La composition en acides gras cellulaires des souches *E. plautii* DSM 4000^T et *C. orbiscindens* DSM 6740^T a été déterminée par l'équipe de J.P. Carlier par CPG selon Veys et coll. (1989) (347).

II. DETERMINATION DES CARACTERES STRUCTURAUX

1. Composition du peptidoglycane de *Tissierella praeacuta*

Cette analyse, destinée à déterminer la composition du peptidoglycane des souches de *Tissierella* spp. par une méthode de chromatographie liquide haute performance couplée à de la spectrométrie de masse (CLHP-SM), a été effectuée en partenariat avec l'Unité de Biochimie Bactérienne de l'INRA de Jouy-en-Josas (Marie-Pierre Chapot-Chartier et Pascal Courtin).

a) Courbes de croissance

L'extraction du peptidoglycane s'effectue sur des souches en début de phase exponentielle de croissance. Aucune donnée n'étant disponible dans la littérature concernant le cycle de croissance de *T. praeacuta* ou des genres apparentés, les courbes de croissance de *C. hastiforme* ATCC 33268^T et *Tissierella* sp. LBN 295 ont été déterminées. *Clostridium difficile* 630 a été utilisé comme souche contrôle (70). Toutes les manipulations ont été effectuées dans des conditions strictes d'anaérobiose (chambre anaérobie Concept 1000, Ruskinn, Bridgend, UK).

Une première étape de numération bactérienne a été nécessaire afin de déterminer la correspondance entre la densité optique (DO) mesurée tout au long de la croissance et la concentration bactérienne correspondante. Pour cela, 50 ml de culture bactérienne en milieu BHI ont étéensemencés à partir de la souche en phase exponentielle de croissance (une oese). Après centrifugation à 3500 g pendant 15 min, le culot a été repris dans 2 ml de milieu BHI. Après dilutions successives, la densité optique des suspensions a été mesurée à 546 nm. Pour les dilutions 10^{-4} à 10^{-9} , 100 μ l ont étéensemencés sur milieu BBA. Après incubation de 48 h, une numération bactérienne a été réalisée par comptage visuel des colonies. L'analyse de la courbe représentant la DO en fonction de la concentration bactérienne a permis de définir la zone de linéarité pour laquelle cette concentration est proportionnelle à la DO : $DO = A \times$ concentration bactérienne (UFC/ml) où **A** représente le coefficient directeur de la droite de régression obtenue et n'est valable que dans la zone de linéarité du spectrophotomètre.

Les courbes de croissance des souches *C. hastiforme* ATCC 33268^T, *Tissierella* sp. LBN 295 et *Clostridium difficile* 630 ont ensuite été déterminées. Pour chacune des souches, une préculture de 50 ml a été réalisée en milieu BHI après ensemencement de la souche bactérienne en phase exponentielle de croissance (une oese). Après centrifugation à 3500 g pendant 15 min, le culot a été repris dans 2 ml de milieu BHI. Cette suspension a été diluée au 1/100^{ème} afin de se situer dans la zone de linéarité du spectrophotomètre. Après avoir mesuré la DO de cette suspension à 546 nm, l'inoculum a été ajusté à une concentration de 10⁷ UFC/ml.

L'évolution dans le temps de la DO de cette suspension a ensuite été mesurée toutes les demi heures puis tous les quart d'heure en fin de phase de latence. La courbe de croissance a été établie en notant la progression des DO en fonction du temps.

La pureté des cultures a été vérifiée par examen microscopique après coloration de Gram (environ toutes les 2 h) et culture sur gélose BBA (en début et en fin de manipulation) suivie d'une identification par séquençage de l'ADNr 16S.

b) Extraction du peptidoglycane

i- Cultures bactériennes

Les souches analysées étaient les suivantes : *C. hastiforme* ATCC 33268^T, *T. praeacuta* ATCC 25539^T et *Tissierella* sp. LBN 295. L'identification et la pureté de chaque souche ont été vérifiées en début de manipulation. S'agissant de bactéries à Gram positif, un protocole standard d'extraction de paroi de type Gram-positif a été utilisé (54). En raison de rendements d'extraction insuffisants, ce protocole a été remplacé par un protocole d'extraction du peptidoglycane recommandé pour les bactéries à Gram négatif, dont le rendement est plus élevé car adapté à la plus faible épaisseur de la couche de peptidoglycane.

Une préculture réalisée en BHI a été centrifugée soit 15 min à 3000 tpm (tours par minute) et à 20°C pour *C. hastiforme* 33268^T afin d'éviter que la souche ne sporule, soit 20 min à 3000 tpm et à 4°C pour les deux autres souches, ayant des colonies plus muqueuses, afin d'éviter qu'elles se remettent en suspension. Le culot a été remis en suspension dans 3 ml de BHI. Après mesure de la DO à 546 nm, un volume adapté de cette suspension a été ajouté à du milieu BHI afin d'obtenir une suspension initiale ajustée à 10⁷ UFC/ml dans un volume total

de huit ou neuf litres, selon les souches. Suite aux résultats des courbes de croissance, les cultures ont été incubées en chambre anaérobie pendant 16 h. L'identification et la pureté de chaque souche ont été vérifiées en fin de manipulation.

Après mesure de la DO, les cultures ont été centrifugées (15 min, 3000 tpm, 20°C pour *C. hastiforme* 33268^T et 20 min, 5000 tpm, 4°C pour *T. praeacuta* 25539^T et *Tissierella* sp. LBN 295). Les culots ont été remis en suspension dans de l'eau distillée stérile. Ces suspensions ont été portées à ébullition pendant 20 min afin d'inactiver les hydrolases du peptidoglycane endogènes (autolysines) des bactéries. Elles ont ensuite été centrifugées (20 min, 5000 tpm, 4°C) et les culots correspondants congelés à -20°C.

ii- Extraction du peptidoglycane

Après décongélation, chaque culot a été remis en suspension dans de l'eau distillée, puis du sodium dodecyl sulfate (SDS), préchauffé à 60°C, a été ajouté à une concentration finale de 5%. Le SDS est un détergent anionique qui solubilise les lipides cellulaires et va donc lyser les bactéries. La suspension a été portée à ébullition pendant 25 min puis ultracentrifugée pendant 30 min à 150 000 g dans une ultracentrifugeuse Optima MAX-E (Beckman-Coulter) dans un rotor MLA-80 en utilisant des tubes Thickwall polycarbonate (laboratoire MPM-Lipidomix, Professeur J.L. Olivier). Le culot, remis en suspension dans du SDS à 4% à 60°C, a été porté à ébullition pendant 15 min puis lavé à sept reprises de la manière suivante : après ultracentrifugation de 30 min à 150 000 g, le culot a été remis en suspension dans de l'eau distillée préchauffée à 45°C. Le culot a ensuite été remis en suspension dans du Tris-HCl 50 mM pH 7 contenant 2 mg/ml de pronase. La solution a été incubée à 60°C pendant 90 min. Le culot a été lavé avec de l'eau distillée puis mis en suspension dans du tampon phosphate de sodium 20 mM pH 7.8 contenant 200 µg/ml de trypsine et 0.05% d'azide de sodium. Cette solution a été incubée pendant 16 h à 37°C sous agitation. La trypsine et la pronase sont des enzymes protéolytiques qui vont hydrolyser les protéines bactériennes résiduelles. L'azide de sodium permet d'éviter les contaminations microbiennes. Le culot a été lavé avec de l'eau distillée puis remis en suspension dans du tampon Tris-HCl 20 mM pH 7 contenant du chlorure de magnésium 1 mM, 50 µg/ml de DNase, 50 µg/ml de RNase et 0.05% d'azide de sodium. La solution a été incubée pendant 4 h à 37°C sous agitation puis centrifugée à 28 000 g pendant 30 min.

Après élimination du surnageant, 1 ml d'acide fluorhydrique à 48% a été déposé sur le culot en respectant les recommandations de sécurité. Ce mélange a été mis en suspension dans un bain à ultrasons pendant 5 min puis incubé pendant une nuit dans de la glace. Cette étape permet d'éliminer les acides teichoïques liés de manière covalente au peptidoglycane. Le lendemain, la solution a été centrifugée pendant 30 min à 28 000 g, puis le culot a été lavé deux fois avec du Tris-HCl 250 mM pH 8 et quatre fois avec de l'eau distillée jusqu'à obtention d'un pH égal à 5. Le culot a ensuite été pesé puis lyophilisé : les échantillons, congelés manuellement dans de l'azote liquide, ont été branchés sur une valve d'un lyophilisateur Cryodos Telstar (Terrassa) à une pression de 0.3 mBar et une température de -80°C .

c) Digestion du peptidoglycane et réduction des muuropeptides

Le lyophilisat de peptidoglycane a été mis en suspension dans de l'eau distillée à une concentration de 20 mg/ml, puis traité aux ultrasons pour dissocier les agrégats. Deux cents microlitres (4 mg) de cette suspension ont été digérés, pendant 19 h à 37°C sous agitation, dans un volume final de 500 μl de tampon phosphate de sodium à pH 5.5 (25 mM) contenant 0.05% d'azide de sodium et 2500 U/ml de mutanolysine.

La mutanolysine a été ensuite inactivée par chauffage pendant 3 min à 100°C . La suspension a ensuite été centrifugée pendant 15 min à 13 000 rpm. Le surnageant a été traité avec du borohydrure de sodium (qui permet de réduire les disaccharides et de n'avoir qu'une seule forme de chaque molécules sucrées dans le mélange) dans du tampon borate de sodium 250 mM à pH 9 pendant 20 min. La solution a été acidifiée par l'ajout d'acide orthophosphorique à 20% afin d'éliminer l'excès de borohydrure. Puis, le pH de la solution obtenue a été ajusté à pH 4 (pH du tampon d'élution de la CLHP) et la solution filtrée sur une membrane de porosité 0.45 μm (Millipore).

d) Séparation des muuropeptides par CLHP en phase inverse

La séparation par CLHP a été réalisée sur une colonne Hypersyl PEP100 (4.6 x 250 mm, 5 μm , 100 Å, Thermo Finnigan) greffée en C18 à l'aide d'un gradient linéaire à deux phases, la première correspondant à un tampon phosphate d'ammonium ((NH_4) H_2PO_4) 10 mM

contenant 180 µl d'azide de sodium à 1% (100% à 0%), et la seconde à un tampon phosphate d'ammonium 10 mM contenant 20% de méthanol (0% à 100%), en 270 min et à un débit de 0.5 ml/min. Des fractions ont été collectées avec un collecteur de fractions toutes les minutes.

e) Analyse des muropéptides en spectrométrie de masse

Les fractions correspondant aux pics majoritaires détectés à 202 nm et/ou aux pics différents entre souches ont été déposés sur une plaque MALDI. Chaque échantillon a été mélangé à une matrice d'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique dans de l'acétonitrile et de l'acide trifluoroacétique. Les fractions moins abondantes ont été préalablement concentrées sur microcolonnes Zip-Tip C18 (Millipore). Après séchage à l'air libre des échantillons, la plaque a été ensuite insérée dans un spectromètre de masse MALDI-TOF Voyager-DE STR (Applied Biosystems, Framingham, MA). Les standards de masse utilisés étaient : le fragment 1-7 de la bradychine ($MH^+=757.3997$ Da), l'angiotensine II ($MH^+=1046.5423$ Da), le fragment 18-39 de l'hormone corticotrope ($MH^+=2465.1989$ Da) et la chaîne β de l'insuline bovine ($MH^+=3494.6513$ Da). Les résultats ont été analysés en comparant les masses expérimentales aux masses théoriques calculées pour les muropéptides résultant de la digestion du peptidoglycane d'après les données disponibles concernant la paroi de *C. hastiforme* : présence d'un mDAP en position 3 du pentapeptide et pont interpeptidique direct (40, 155, 358).

f) Composition en acides aminés et sucres aminés

Une analyse supplémentaire de la composition en acides aminés et sucres aminés a été effectuée après hydrolyse acide du peptidoglycane extrait par la méthode PicoTag Waters (54). Cette méthode a également permis de calculer le rendement de la digestion du peptidoglycane.

2. Etude de l'ultrastructure de la paroi bactérienne

L'étude de l'ultrastructure de la paroi de *Clostridium hastiforme* ATCC 33268^T, *Tissierella praeacuta* ATCC 25539^T et *Tissierella* sp. LBN 295 ainsi que *Prevotella nanceiensis* LBN 293^T a été réalisée par MET. Dans cette étude, réalisée au sein du Service de Microscopie Électronique de la Faculté de Médecine de Nancy (Professeur Foliguet), *Clostridium perfringens* ATCC 13124^T a été inclus en tant que contrôle d'une ultrastructure typique de bactérie à Gram positif.

a) Préparation des échantillons

Après culture en milieu liquide (BHI), les suspensions bactériennes ont été centrifugées. Le culot bactérien a été fixé pendant une heure à 4°C dans une solution de glutaraldéhyde à 2.5% dans un tampon cacodylate 0.1 M pH 7.2. Après deux lavages sur une durée de 3 h dans du tampon cacodylate, une fixation a été effectuée pendant une heure à 4°C dans du tampon cacodylate contenant 1% d'acide osmique. Après rinçage dans du tampon cacodylate, les échantillons ont été déshydratés par immersions successives dans des solutions d'alcools de concentrations croissantes (30° à 100°) suivies de trois bains en propylène oxyde. Les échantillons ont ensuite été pré-imprégnés pendant une heure à température ambiante dans un mélange de résine Epon et propylène oxyde (v/v) puis immergés dans de la résine Epon pure toute une nuit à température ambiante. Les échantillons ont été inclus dans des capsules coniques, centrifugés et recouverts d'Epon frais avant polymérisation à 56°C pendant au moins 48 h.

b) Réalisation et observation des coupes

Des coupes semi-fines de 1.5 µm d'épaisseur ont été réalisées à l'aide d'un ultramicrotome équipé d'un couteau de verre avec un angle de coupe de 5°. Elles ont été déposées sur une lame de verre, colorées au bleu azur et observées au microscope optique afin de vérifier la densité de l'échantillon. Puis des coupes ultrafines de 60-70 nm d'épaisseur ont été obtenues à l'aide d'un couteau de diamant avec un angle de coupe de 6°, à une vitesse de coupe de 10

mm/seconde. Les coupes ont ensuite été déposées sur une grille de cuivre de 3 mm de diamètre et contrastées avec des sels de métaux lourds : acétate d'uranyle à 3% et colorant de Reynolds (nitrate de plomb et citrate de sodium) qui se déposent sur certaines structures de la cellule (278).

Les observations des différentes coupes ont été réalisées à l'aide d'un microscope électronique Philips CM12 sous la supervision du Professeur Foliguet.

III. RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES

1. Détermination de la sensibilité *in vitro* aux antibiotiques

La sensibilité des souches de *Prevotella* spp. au métronidazole et des souches de *Tissierella* spp. aux glycopeptides (vancomycine et teicoplanine) a été évaluée en déterminant les CMI par la méthode de dilution en milieu gélosé, méthode de référence, et par la méthode du Etest. Les souches *B. fragilis* ATCC 25285^T, *B. thetaiotaomicron* ATCC 29741, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213^T et *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 ont été utilisées en tant que contrôles.

a) Détermination des CMI par la méthode de dilution en milieu gélosé

La méthode de dilution en milieu gélosé, recommandée par le CLSI pour la détermination des CMI des bactéries anaérobies, a été utilisée (47). Le principe de cette méthode consiste à étudier la croissance d'une population bactérienne (inoculum bactérien déposé sous forme d'un spot calibré à 10⁵ UFC) au contact de concentrations croissantes d'antibiotiques (progression géométrique de raison deux) préalablement incorporés dans le milieu gélosé.

La détermination des CMI a été effectuée selon les procédures recommandées par le CLSI :

- préparation des solutions d'antibiotiques : les poudres d'antibiotiques (métronidazole [Sigma], vancomycine [Sigma] et teicoplanine [Sanofi-Aventis]) ont été dissoutes en utilisant les solvants recommandés par le CLSI ou à défaut en utilisant ceux

recommandés par le fabricant. Les trois antibiotiques ont été testés à des concentrations variant de 0.06 à 256 µg/ml.

- préparation des milieux : cette opération a été réalisée extemporanément. Deux millilitres de chaque dilution d'antibiotique ont été ajoutés à 18 ml de gélose Brucella fondue, additionnée de 5% de sang de mouton laqué, d'hémine et de vitamine K₁. Les boîtes ont ensuite été séchées pendant 15 min à l'étuve à 35°C.
- Inoculum : une suspension bactérienne d'opacité équivalente au standard McFarland 0.5 ($\approx 10^8$ UFC/ml) a été réalisée en bouillon Brucella, préalablement régénéré, à partir d'une culture de 48 h sur gélose BBA.
- Ensemencement : des spots d'environ 2 µl de chaque inoculum ont été déposés à la surface des géloses à l'aide d'un inoculateur à tiges multiples (Denley, Billingham, Royaume Uni). Des boîtes témoins, sans antibiotique, ont été ensemencées avant et après la série de boîtes contenant les antibiotiques. Les boîtes ont été séchées avant incubation.
- Incubation : les boîtes ont été incubées pendant 48 h à 35°C en atmosphère anaérobie. Des boîtes témoins ont été incubées en atmosphère anaérobie (afin de vérifier la bonne pousse des souches testées) ou en atmosphère aérobie (afin de déceler une éventuelle contamination par d'autres microorganismes aérobies ou anaérobies facultatifs).
- Lecture : les CMI ont été déterminées après 48 h d'incubation. La CMI a été définie comme étant la concentration d'antibiotique la plus faible capable d'inhiber toute croissance bactérienne visible ou d'induire un changement marqué de croissance. Pour l'ensemble des molécules testées, une seconde lecture a été effectuée après sept jours d'incubation afin de détecter d'éventuelles sous-populations résistantes à croissance plus lente.

b) Détermination des CMI par la méthode du Etest

Il s'agit d'une méthode de diffusion en milieu gélosé, utilisant une bandelette appelée Etest (AB Biodisk, Solna, Suède), imprégnée d'un gradient continu de l'antibiotique à tester. La détermination des CMI a été réalisée selon les recommandations du fabricant sur gélose BBA par dépôt de la bandelette après ensemencement d'une suspension bactérienne d'opacité équivalente au standard McFarland un. La lecture des CMI a été réalisée après 48 h d'incubation à 35°C en anaérobiose. La valeur des CMI correspond au point d'intersection

entre l'ellipse d'inhibition et la bandelette en tenant également compte des colonies détectées à l'intérieur de la zone d'inhibition situées à moins de 3 mm de la bandelette et en regard du gradient de l'antibiotique.

Les boîtes ont toutes été réincubées et des lectures ont été effectuées toutes les 48 h jusqu'à huit jours afin de détecter la présence de sous-populations hétérogènes (cf paragraphe 2.).

c) Interprétation des CMI

Au cours de cette étude, nous avons choisi d'interpréter les CMI selon les recommandations du CA-SFM (53) :

- concentrations critiques pour le métronidazole : $S \leq 4 \mu\text{g/ml}$ et $R > 4 \mu\text{g/ml}$
- concentrations critiques pour la vancomycine : $S \leq 4 \mu\text{g/ml}$ et $R > 8 \mu\text{g/ml}$
- concentrations critiques pour la teicoplanine : $S \leq 4 \mu\text{g/ml}$ et $R > 8 \mu\text{g/ml}$

2. Détection des populations hétérogènes par méthodes de diffusion

Certains auteurs ont décrit la croissance tardive de sous-populations résistantes au métronidazole, non détectées après les délais d'observation classiques (48 h) des cultures bactériennes (83, 112, 263). Afin de rechercher l'existence de telles population hétérogènes en présence de glycopeptides ou de métronidazole, nous avons utilisé les méthodes de diffusion en milieu gélosé selon les recommandations du CA-SFM (disques et/ou comprimés) ou du fabricant (Etest) pour les souches de *Tissierella praeacuta* et apparentées ainsi que les *Prevotella* spp. (53). Brièvement, un inoculum d'une opacité égale à un McFarland de un a étéensemencé par écouvillonnage sur gélose BBA. Des bandelettes Etest de vancomycine ou teicoplanine (*Tissierella* spp.) ou de métronidazole (*Prevotella* spp.) ainsi que des disques de 30 μg de vancomycine et de teicoplanine (*Tissierella* spp.) ou des comprimés de 5 μg de métronidazole (*Prevotella* spp.) ont été déposés sur les boîtes. Une première observation a été effectuée après 48 h d'incubation en anaérobiose à 35°C, suivie de lectures ultérieures toutes les 48 h et jusqu'à huit jours d'incubation, à la recherche de colonies repoussant à l'intérieur de la zone d'inhibition. La sensibilité des colonies repoussant à l'intérieur de la zone d'inhibition a été déterminée par la méthode dilution en milieu gélosé (47).

3. Etude de l'inductibilité et de la stabilité de la résistance aux antibiotiques

a) Méthode en milieu liquide

Les souches *T. praeacuta* ATCC 33268^T, AIP 310.01 et LBR1, *Tissierella* sp. LBN 295, ainsi que *Prevotella* sp. nov. LBN 293 et LBN 293b ont été cultivées en présence de concentrations croissantes d'antibiotiques (vancomycine et métronidazole, respectivement) afin de sélectionner des sous-populations résistantes.

Les souches ont étéensemencées en bouillon Brucella enrichi en hémine (1%) et vitamine K1 (1%) (BBE) et incubées en anaérobiose 24 h (*Tissierella* spp.) ou 48 à 72 h (*Prevotella* spp.). Un millilitre de cette culture, préalablement ajustée à une opacité égale à un McFarland de trois, a été utilisé pour ensemenecer 9 ml de milieu BBE contenant ou non l'antibiotique à une concentration égale au quart ou à la moitié de la CMI initiale. Après 48 h d'incubation en anaérobiose à 35°C, 1 ml de chaque culture a été utilisé pour ensemenecer 9 ml de milieu BBE dans les mêmes conditions (sans antibiotique ou CMI/4 ou CMI/2). Cette opération a été répétée jusqu'à trois passages successifs en présence de métronidazole (*Prevotella* spp.) ou jusqu'à cinq passages successifs en présence de vancomycine (*Tissierella* spp.). A chaque repiquage, la sensibilité des souches a été déterminée par la méthode du Etest.

b) Méthode en milieu solide

Une méthode de sélection de mutants résistants au métronidazole en milieu solide a été appliquée à onze isolats cliniques de *Prevotella* spp. (cinq souches *nim*-positives et six souches *nim*-négatives) ainsi qu'à *Prevotella baroniae* DSM 16972^T et *B. fragilis* 25285^T (290). Pour cela, les souches ont étéensemencées sur des géloses BBA contenant du métronidazole à une concentration égale à la CMI initiale (CMI₀), à CMI₀/2 ou à CMI₀x2. Une boîte sans antibiotique a étéensemencée en parallèle. Après 48 h d'incubation, la souche poussant sur la boîte ayant la concentration la plus élevée en antibiotique (C₁) a étéensemencée sur une gélose sans antibiotique ainsi que sur des géloses contenant les concentrations d'antibiotique égales à C₁/2, C₁ ou C₁x2. Cette opération a été répétée jusqu'à absence de croissance de la souche (C_X). La souche poussant en présence de la concentration la plus élevée d'antibiotique (C_{X-1}) a été d'une part congelée, et d'autre part repiquée trois fois

sur milieu sans antibiotique afin de rechercher la stabilité de la résistance (C_S). Les valeurs des CMI correspondant à C_{X-1} , avant et après décongélation, et à C_S ont été déterminées par la méthode de dilution en milieu gélosé. Chaque souche a été testée à deux reprises. En se basant sur les travaux de Pelaez et coll. (2008) (263), la résistance a été considérée comme stable si la CMI du métronidazole était identique (à une dilution près) avant et après les passages sur milieu sans antibiotique.

Etude des caractères génétiques

I. EXTRACTION DE L'ADN

L'ADN génomique (ADNg) des différentes souches a été extrait à partir de quelques colonies isolées sur milieu de culture solide, ou après centrifugation d'un milieu de culture liquide, en utilisant le kit QIAamp DNA mini (Qiagen Inc., Hilden, Germany) selon les recommandations du fabricant. L'ADN purifié a été élué dans un tampon d'éluion du kit ou dans de l'eau distillée. Pour les manipulations d'ECP ou les digestions enzymatiques d'ADNg avant Southern blot, l'ADN a été extrait par lyse en plug d'agarose.

L'ADN plasmidique de certaines souches de *Prevotella* spp. a été extrait à partir d'une culture de 24 h en milieu BBE, en utilisant le kit Plasmid mini preparation (Qiagen) selon les recommandations du fabricant.

Les ADN extraits ont été conservés à -80°C .

II. MARQUEURS PHYLOGENETIQUES

1. Gène de l'ARNr 16S

Le marqueur moléculaire le plus utilisé dans l'analyse des relations phylogénétiques bactériennes étant l'ADNr 16S, celui-ci a été séquencé pour la quasi totalité des souches étudiées.

Les 500 premières paires de bases de l'ADNr 16S de 121 souches de *Prevotella* spp. ont été séquencées en utilisant les amorces P8 et P519 (Tableau 19) afin d'identifier génotypiquement l'espèce en comparant les séquences dans les bases de données.

Le gène complet de l'ARNr 16S (≈ 1500 pb) a été séquencé pour les souches de *Tissierella* spp. et les genres apparentés, ainsi que pour les souches de *Clostridium orbiscindens* et certaines souches de *Prevotella* (*P. baroniae*, n=8 ; *Prevotella* sp. nov., n=3). Pour cela, trois paires d'amorces ont été nécessaires afin d'obtenir trois fragments de 500 pb qui ont ensuite été assemblés pour reconstituer le gène complet (Tableau 19).

Tableau 19. Amorces utilisées pour l'amplification du gène de l'ARNr 16S.

Amorce	Direction	Séquence (5'-3')	Position*	Réf.
P8	sens	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG	9-28	(91)
P519	antisens	GTA TTA CCG CGG CTG CTG GCA C	536-515	(351)
P536	sens	CAG CAG CCG CGG TAA TAC	519-536	(91)
P1050	antisens	CAC GAG CTG ACG ACA	1069-1055	(1)
P1070	sens	TGT CGT CAG CTC GTG	1055-1069	(1)
P1525	antisens	AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA	1542-1523	(91)

* définie sur le gène de l'ARNr 16S d'*E. coli*.

Dans tous les cas, une première PCR a été effectuée sur le gène entier de l'ARNr 16S en utilisant les amorces P8 et P1525 et selon le protocole suivant :

- 2.0 μ l d'ADN
- 5.0 μ l de tampon 10X
- 2.0 μ l de $MgCl_2$ (50mM)
- 1.0 μ l de dNTPs (10 mM)
- 1.0 μ l de l'amorce P8 (40 μ M) et de l'amorce P1525 (40 μ M)
- 0.4 μ l de Taq DNA polymérase (5 U/ μ l)
- eau pour biologie moléculaire qsp 50.0 μ l

L'amplification s'est décomposée en 40 cycles constitués de 45 secondes à 92°C, 2 min à 55°C et 1 min à 72°C. La taille et la pureté du produit PCR ont été contrôlées par électrophorèse dans un gel d'agarose à 1.5% et dosage de l'ADN par spectrométrie UV. Après purification du produit PCR avec le kit QIAquick PCR purification (QIAGEN), des PCR de pré-séquencage ont été effectuées en utilisant soit les amorces P8 et P519 seules pour les 500 premières pb, soit les six amorces pour couvrir la totalité du gène (cf chapitre IV.).

2. Gènes de ménage

En ce qui concerne les souches de *Tissierella* spp. et apparentées, plusieurs gènes de ménage ont été testés dans une approche multilocus. Les amorces utilisées, les gènes cibles ainsi que les publications de référence sont disponibles dans le Tableau 20. Parmi ces gènes, seuls trois d'entre eux ont permis l'obtention d'amplicons et de séquences utilisables pour la suite des analyses en utilisant les protocoles d'amplification résumés dans les Tableaux 21 et 22.

Pour les souches de *Prevotella* sp. nov. (LBN 293, LBN 297 et LBN 298), une portion du gène *rpoB* a été amplifiée en utilisant les amorces Prev3250F et Prev3623R, puis séquencée selon Berger et coll. (2005) (22).

Tableau 20. Gènes cibles et amorces testées sur les souches de *Tissierella* spp. et apparentées.

Gène cible	Amorce	Séquence (5'-3')	Taille attendue	Réf.
<i>cpn60</i>	H279A	GAI III GCI GGI GAY GGI ACI ACI AC	600 pb	(129)
	H280A	YKI YKI TCI CCR AAI CCI GGI GCY TT		
<i>dnaK</i>	B1	ATT GAY TTA GGW ACA ACA AA	700 pb	(224)
	B2	GCT TTT TCA GCH GCD TCY TT		
<i>recA</i>	recAf	TTH ATY GAN GCH GAR CAY GC	360 pb	(88)
	recAr	CCW CCW GKW GTH GTY TCN GG		
<i>rpoB</i>	RpoBent2-f	TGA TCA ACG CCA AGC C	600 pb	(236)
	RpoBent2-r	CGG AAC GGC CTG ACG TTG CAT		
	Prev3250F*	AAC CCG TTG GGT GTG CC	370 pb	(22)
	Prev3623R*	AGI GCC CAA ACC TCC ATC TCT CC		
C2700F	CGWATGAACATYGGBCAGGT	450 pb	(180)	
C3130R	TCCATYTCRCCRAARCGCTG			
<i>sodA</i>	sodA-f	CCI TAY ICI TAY GAY GCI YTI GAR CC	480 pb	(269)
	sodA-r	ARR TAR TAI GCR TGY TCC CAI ACR TC		
<i>spo0A</i>	spo0A-f	GGI RTI CCI GCI CAY ATH AAR GGI TA	300 pb	(29)
	spo0A-r	CAT IGC DAT RAA YTC ISW RTT IGT IGG YTT		
<i>tpi</i>	tpiA	GCW GGW AAY TGG AAR ATG MAY AA	500 pb	(71)
	tpiB	TTW CCW GTW CCD ATW GCC CAD AT		

* amorces également utilisées pour amplifier le gène *rpoB* des souches de *Prevotella* sp. nov.

L'amorce sens du gène *recA* publiée par Duwat et coll. (1992) a été modifiée sur une position (Y₁₂→H) après alignement avec des génomes de certaines espèces de *Clostridium* (88).

Le gène *spo0A* a été initialement testé afin de connaître le statut "asporulé" ou "non sporulé" de *T. praeacuta* ATCC 25539^T en utilisant une souche clinique d'*E. coli* (S197) en tant que témoin "non sporulé" et la souche *C. difficile* CIP 109239 en tant que témoin "sporulé". Il a ensuite été appliqué à l'ensemble des souches de *Tissierella* spp. et apparentées dans le cadre

d'une approche MLSA. Ce gène a également été recherché pour les souches de *C. orbiscindens* et *E. plautii* en collaboration avec l'équipe de J.P. Carlier à l'Institut Pasteur.

Tableau 21. Mélanges réactionnels des PCR ciblant les gènes *recA*, *spo0A* et *tpi*.

Mélange réactionnel	Volume pour une réaction (µl)		
	<i>recA</i>	<i>spo0A</i>	<i>tpi</i>
Tampon de PCR 10X	5.0	5.0	5.0
MgCl ₂ (50 mM)	2.5	1.5	2.5
dNTPs à (10 mM)	1.0	0.5	1.0
Amorce sens (40 µM)	1.0	0.5	1.0
Amorce antisens (40 µM)	1.0	0.5	1.0
Taq polymérase (5 U/µl)	0.5	0.5	0.5
DNA	2.0	2.0	2.0
H ₂ O qsp	50.0	50.0	50.0

Tableau 22. Protocoles d'amplification des gènes *recA*, *spo0A* et *tpi*.

Gène	Etape de la PCR	Température	Durée	Nb de cycles
<i>recA</i>	Dénaturation	95°C	30 sec	30
	Hybridation	55°C	45 sec	
	Elongation	72°C	45 sec	
<i>spo0A</i>	Dénaturation	92°C	45 sec	40
	Hybridation	55°C	2 min	
	Elongation	72°C	1 min	
<i>tpi</i>	Dénaturation	95°C	30 sec	11
	Hybridation	60°C → 50°C (1°C / cycle)	30 sec	
	Elongation	72°C	30 sec	
	Dénaturation	95°C	30 sec	30
	Hybridation	50°C	30 sec	
Dénaturation	72°C	30 sec		

III. GÈNES DE RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES

1. Recherche des gènes de résistance aux glycopeptides

a) Recherche des gènes *van* décrits dans la littérature

Les gènes *vanA* à *vanG* ont été recherchés chez les souches de *Tissierella* spp. et apparentées, *C. orbiscindens* et *E. plautii* en utilisant les amorces décrites par différents auteurs (Tableau

23) (75, 87, 107, 229, 265, 281). Le gène *vanL*, décrit en juillet 2008 chez une souche d'*E. faecalis*, n'a pas été recherché dans cette étude (24). Les protocoles d'amplification ont été ajustés en utilisant les souches contrôles *E. faecium* BM4147 (*vanA*), *E. faecalis* V583 (*vanB*), *E. gallinarum* BM4174 (*vanC1*), *E. casseliflavus* ATCC 25788^T (*vanC2*), *E. faecium* BM4339 (*vanD*), *E. faecalis* BM4405 (*vanE*), *Paenibacillus popilliae* ATCC 14706^T (*vanF*) et *E. faecalis* WCH9 (*vanG*) (Tableaux 23 et 24).

Tableau 23. Amorces et protocoles d'amplification utilisés pour la détection des gènes *van* chez *Tissierella* spp., *C. orbiscindens* et les genres apparentés.

Amorce	Séquence (5'-3')	Protocole d'amplification	Taille attendue*	Réf.
vanAf	GGG AAA ACG ACA ATT GC	35 x (94°x30",	730 pb	(87)
vanAr	GTA CAA TGC GGC CGT TA	54°x30", 72°x30")		
vanB-123f	CTT AAC GCT GCG ATA GAA GC	35 x (94°x30",	170 pb	(75)
vanB-123r	CTG ATG GAT GCG GAA GAT AC	60°x30", 72°x30")		
vanC1f	GGT ATC AAG GAA ACC TC	35 x (94°x30",	820 pb	(87)
vanC1r	CTT CCG CCA TCA TAG CT	54°x30", 72°x30")		
vanC2-3f	CTC CTA CGA TTC TCT TG	35 x (94°x30",	430 pb	(87)
vanC2-3r	CGA GCA AGA CCT TTA AG	54°x30", 72°x30")		
vanD3	TAA GGC GCT TGC ATA TAC CG	30 x (94°x1',	460 pb	(265)
vanD4	TGC AGC CAA GTA TCC GGT AA	62°x1', 72°x1')		
vanE1	TGT GGT ATC GGA GCT GCA G	30 x (94°x30",	510 pb	(107)
vanE2	GTC GAT TCT CGC TAA TCC	58°x30", 72°x30")		
vanF-f	GCT GCT TGT TAT GCG GAA TA	35 x (94°x30",	610 pb	(281)
vanF-r	AAT TGC TTT CGC CGT CTC	60°x30", 72°x30")		
vanG1	CGG TTG TGC CGT ACT TGG C	30 x (94°x1',	810 pb	(229)
vanG2	GGG TAA AGC CAT AGT CTG GGG C	62°x1', 72°x1')		

* taille attendue avec les contrôles positifs de chaque gène.

Tableau 24. Mélanges réactionnels des PCR de détection des gènes *van* chez *Tissierella* spp., *C. orbiscindens* et les genres apparentés.

Mélange réactionnel	Volume pour une réaction (µl)			V1-V2
	<i>vanA</i> et <i>vanC1-C2/3</i> *	<i>vanB</i> ou <i>vanF</i>	<i>vanD</i> ou <i>vanE</i> ou <i>vanG</i>	
Tampon de PCR 10X	5.0	5.0	5.0	5.0
MgCl ₂ (50 mM)	7.0	2.0	3.5	2.0
dNTPs à (10 mM)	5.0	1.0	1.5	1.0
Amorce sens (40 µM)	1.2	1.0	1.5	5.0
Amorce antisens (40 µM)	1.2	1.0	1.5	5.0
Taq polymérase (5 U/µl)	0.5	0.4	0.4	0.5
DNA	10.0	2.0	2.0	2.0
H ₂ O qsp	40.0	50.0	50.0	50.0

* multiplex = amorces dans le même tube.

b) Recherche d'une D:Alanine-D:X ligase et détermination de son environnement génétique

Sur la base d'alignements de ligases bactériennes, Dutka-Malen et coll. (1995) ont dessiné des amorces universelles capables d'amplifier les D-Ala:D-Ala ligases et les enzymes apparentées, notamment les ligases Van (87, 107, 229, 265). Ces amorces V1 (5'-GGN GAR GAY GGN WSN HTN CAR GG) et V2 (5'-TGR AAN CCN GGN ADN GTR TT) reconnaissent un fragment d'environ 600 pb au sein du gène de ces ligases. Après de nombreuses étapes de mise au point, liées à la dégénérescence de ces amorces, ces dernières ont été utilisées sur les souches de *Tissierella* spp. et des genres apparentés selon le protocole disponible dans le Tableau 24. Le programme d'amplification s'est décomposé en 35 cycles constitués d'une étape de dénaturation de 30 secondes à 94°C, d'une étape d'hybridation de 45 secondes à 48°C et d'une étape d'élongation de 45 secondes à 72°C.

Suite à plusieurs essais non concluants de PCR-inverse ayant pour but de déterminer la séquence globale du gène de la ligase ainsi que son environnement génétique, nous avons envoyé l'ADN extrait de la souche *T. praeacuta* ATCC 25539^T au service Recherche et Développement de la société Cogenics (Meylan, France). Après avoir dessiné les amorces TPr_gv1_R_5' (5'- TCA TCA CTT TGT CCA TTG CC) et TPr_gv1_F_3' (5'- AAA TTG CTA TGG ATT AGC TCG T), complémentaires des extrémités de notre séquence V1-V2, ils ont effectués un séquençage directement sur l'ADNg en utilisant la technologie Big Dye v3.1 (Applied Biosystems). Le produit d'amplification a été purifié par précipitation à l'éthanol, mis en suspension dans du formamide et analysé sur un séquenceur ABI 3730 XL (Applied Biosystems).

2. Recherche des gènes de résistance au métronidazole

a) Recherche des gènes *nim* et des séquences d'insertion associées

Les gènes *nim* ont été recherchés en utilisant des amorces universelles capables d'amplifier l'ensemble des sous-types de *nim* décrits (338). Les séquences d'insertion ayant été décrites comme associées à un gène *nim* (IS1168, IS1169, IS1170, ISBf6 et IS612) ont été recherchées chez les souches *nim*-positives. Afin de déterminer si les IS amplifiées se situaient en amont

du gène *nim* ou ailleurs dans le génome de la bactérie, l'amorce antisens du gène *nim*, NIM-5, a été associée à l'amorce sens de l'IS détectée dans le cadre d'une PCR, comme décrit par Soki et coll. (311, 312). Les contrôles positifs utilisés étaient *B. fragilis* 638R(pIP417) (*nimA*, IS1168), *B. fragilis* BF8 (*nimB*, IS1168), *B. thetaiotaomicron* BT13(pIP419) (*nimC*, IS1170), *B. fragilis* 638R(pIP421) (*nimD*, IS1169), *B. fragilis* BF388(pBF388c) (*nimE*, ISBf6), et *B. fragilis* BF6712 (IS612). La souche *B. fragilis* ATCC 25285^T a été utilisée en tant que contrôle négatif. Les amorces utilisées pour l'ensemble de ces PCR ainsi que les protocoles sont résumés dans les Tableaux 25 et 26.

Tableau 25. Amorces et protocoles d'amplification utilisés pour la détection des gènes *nim* et des séquences d'insertion associées chez *Prevotella* spp.

Amorce	Séquence (5'-3')	Protocole d'amplification	Taille attendue*	Réf.
NIM3	ATG TTC AGA GAA ATG CGG CGT AAG CG	32 x (94°x30", 62°x1', 72°x1')	460 pb	(338)
NIM5	GCT TCC TTG CCT GTC ATG TGC TC			
IS1168-f	TTA CGG CTA CAA GCA GC	30 x (94°x30", 56°x30", 72°x30")	275 pb	(139)
IS1168-r	GGG TCT TGG ACT TGC GC			
IS1169-f	TGA GTC AGA GAA TCG TG	25 x (94°x30", 56°x30", 72°x45")	970 pb	(337)
IS1169-r	CGA CGT ATG TTA TAC AC			
IS1170-f	CTT CTG TGT GTC ATG AG	35 x (94°x30", 63°x30", 72°x45")	1200 pb	(337)
IS1170-r	GTG TTG AAG ACA TAT CC			
ISBf6-f	TGG TCG TCT TCC GTT TCT TC	30 x (94°x30", 60°x30", 72°x30")	200 pb	(312)
ISBf6-r	CTG AGC TAT GGT GCC GTG TA			
IS612-f	GAA ATT GTG TAT CAA TGC CG	30 x (94°x30", 69°x30", 72°x45")	840 pb	(312)
IS612-r	CTG ATA CCA TCC TCA GAG CC			

* taille attendue avec les contrôles positifs de chaque gène.

Tableau 26. Mélanges réactionnels des PCR de détection des gènes *nim* et des séquences d'insertion associées chez *Prevotella* spp.

Mélange réactionnel	Volume pour une réaction (µl)		
	<i>nim</i>	IS	Localisation en amont du gène <i>nim</i>
Tampon de PCR 10X	5.0	5.0	5.0
MgCl ₂ (50 mM)	2.0	3.0	2.5
dNTPs à (10 mM)	1.0	1.0	1.0
Amorce sens (40 µM)	5.0*	1.0	1.0
Amorce antisens (40 µM)	5.0*	1.0	5.0*
Taq polymérase (5 U/µl)	0.4	0.4	0.4
DNA	5.0	2.0	2.0
H ₂ O qsp	50.0	50.0	50.0
Température d'hybridation	Cf Tableau 25		59°C, 54°C, 64°C, 60°C et 60°C**

* amorces à 10 µM ; ** pour IS1168, IS1169, IS1170, ISBf6 et IS612 respectivement.

Après plusieurs tentatives infructueuses de séquençage directement sur l'ADNg afin de rechercher de nouvelles séquences d'insertion, nous avons envoyé l'ADN extrait de la souche *P. baroniae* DSM 16972^T au service Recherche et Développement de la société Cogenics (Meylan, France). Après avoir dessiné les amorces Pba_gv2_R_5' (5'-AAC TGA TGG GTA CGG CGT AG) et Pba_gv2_F_3' (5'-GCT ATC ATC CCC ATC ACG AG), complémentaires des extrémités de notre séquence *nimI*, ils ont effectué un séquençage directement sur l'ADNg en utilisant la technologie Big Dye v3.1 (Applied Biosystems). Le produit d'amplification a été purifié par précipitation à l'éthanol, mis en suspension dans du formamide et analysé sur un séquenceur ABI 3730 XL (Applied Biosystems).

b) Localisation des gènes *nim*

Afin de déterminer la localisation au sein du génome bactérien des gènes *nim* amplifiés, une extraction de l'ADNg en plug d'agarose ainsi que de l'ADN plasmidique a été effectuée pour les souches *nim*-positives. La souche *B. fragilis* 638R(pIP417) ayant un gène *nimA* plasmidique et la souche *B. fragilis* BF8 ayant un gène *nimB* chromosomique ont été utilisées en tant que contrôles. L'ADNg a ensuite été digéré par l'enzyme de restriction *EcoRI* selon le protocole suivant : le plug a été mis en contact avec 20 µl de tampon H dans 175 µl d'eau pour biologie moléculaire pendant 30 min à 4°C puis 40 U d'*EcoRI* ont été ajoutées pour une incubation de 4 h à 37°C. Après migration électrophorétique de l'ADN plasmidique intact (gel à 1% d'agarose, 5 h, 100 volts) et l'ADNg digéré (gel à 0.8% d'agarose, 20 h, 40 volts), les acides nucléiques ont été transférés par capillarité sur une membrane de nylon Hybond-N+ (Amersham Biosciences). Les membranes ont été hybridées avec des sondes *nimA*, *nimB* et *nimI* marquées à la digoxigénine au sein de l'unité DIBOP (Corinne Teyssier). Ces sondes ont été synthétisées par PCR sur les souches *P. baroniae* DSM 16972^T et *B. fragilis* 638R(pIP417) et BF8, en utilisant les amorces NIM-3 et NIM-5 avec un mélange de dNTPs contenant 0.1 mM de digoxigénine-dUTP (Roche Diagnostics). L'hybridation des sondes a été révélée en utilisant le système de chimioluminescence CSPD[®] (Roche Diagnostics).

IV. SÉQUENÇAGE DES DIFFÉRENTS GÈNES

L'ADNr 16S ainsi que les fragments des différents gènes de ménage utilisés pour la phylogénie (*tpi*, *spo0A*, *recA*, *rpoB*), du gène de la D-Ala:D-X ligase et des gènes *nim* ont été séquencés en utilisant le protocole suivant :

- 1.5 µl de produit PCR purifié en utilisant le kit QIAquick PCR purification (Qiagen)
- 4 µl de Ready Mix du Big Dye terminator sequencing kit (Applied Biosystems)
- 2 µl de tampon 5X du même kit
- 3.2 µl de l'amorce sens ou de l'amorce antisens à 1 µM
- eau pour biologie moléculaire qsp 20 µl

Le programme d'amplification s'est décomposé en 25 cycles constitués d'une étape de dénaturation de 10 secondes à 96°C, d'une étape d'hybridation et d'élongation de 4 minutes à 60°C. Le produit de la PCR a ensuite été purifié par précipitation. Pour cela, il a été mélangé à 50 µl d'éthanol à 96°, 2 µl d'acétate de sodium 3 M et 2 µl d'EDTA (Éthylène Diamine Tétra Acétate) 125 mM. Le mélange a été incubé pendant 15 min dans la glace puis centrifugé à 13 000 g pendant 20 min à 12°C. Le culot a été lavé par 250 µl d'éthanol à 70°, centrifugé à 13 000 g pendant 10 min à 4°C puis séché. Après dénaturation dans 5 µl de formamide, l'ADN a été séquencé sur un séquenceur ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems, Les Ulis, France) en utilisant des capillaires en verre de 36 cm.

Analyses phylogénétiques et analyses multilocus

I. TRAITEMENT DES SEQUENCES

Cette approche a concerné les souches de *Tissierella* spp., de *C. orbiscindens* et des genres apparentés, ainsi que les souches de *Prevotella* sp. nov. et de *P. baroniae*. Chaque gène a été séquencé trois fois sur les brins sens et antisens et les différentes séquences obtenues ont été analysées et corrigées manuellement en utilisant le logiciel SeqScape (version 2.5, Applied Biosystems). Ce logiciel a également été utilisé pour l'assemblage des trois séquences permettant de reconstituer le gène complet de l'ARNr 16S. Les séquences protéiques des gènes de ménage ont été déduites des séquences nucléotidiques en utilisant le programme TRANSLATE du serveur ExpASy (Expert Protein Analysis System) (<http://www.expasy.ch/>) puis elles ont été alignées au codon. Les séquences obtenues ont été déposées dans la *GenBank*.

Pour les souches de *Tissierella* spp. et apparentées, les séquences des gènes *tpi*, *spo0A* et *recA* ont été concaténées, dans cet ordre, de façon à obtenir un fragment d'ADN de 1122 pb qui a ensuite été utilisé dans une approche multilocus.

II. ALIGNEMENT DES SEQUENCES

Les séquences d'acides nucléiques ou de protéines ont été alignées par le programme CLUSTALW (333) disponible dans le package *BioEdit Sequence Alignment Editor* (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). Il a été montré que la qualité de l'alignement pouvait avoir un impact sur l'arbre final aussi important, voire plus, que la méthode de construction employée (373). La préparation d'alignements de qualité est donc une étape critique de toute analyse phylogénétique. Pour éviter tout biais de sélection lié à une

correction manuelle des alignements, nous avons testé, en parallèle des alignements nettoyés manuellement, des alignements nettoyés à l'aide du logiciel Gblocks, disponible sur le site <http://www.phylogeny.fr/> (39). L'alignement issu du nettoyage par Gblocks a été utilisé pour la construction des arbres, excepté lorsqu'il entraînait une perte trop importante de données.

III. CONSTRUCTION DES ARBRES PHYLOGENETIQUES

Plusieurs arbres phylogénétiques ont été construits dans cette étude sur la base des séquences nucléotidiques des gènes codant l'ARNr 16S ou des gènes de ménage. Dans tous les cas, ils ont toujours été effectués par au moins deux méthodes en parallèle : Neighbor-Joining et ML pour tous les arbres. Dans le cadre de la description de la nouvelle espèce de *Prevotella*, la méthode de parcimonie a été utilisée en supplément des deux autres. En général, seul l'arbre issu de la méthode ML est visualisé dans ce manuscrit et les nœuds communs aux différentes techniques sont indiqués par un astérisque.

Les arbres basés sur les séquences protéiques des gènes *nim* de *Prevotella* spp. et des ligases bactériennes de *Tissierella* spp. ont été construits en utilisant l'application "One Click" du site <http://www.phylogeny.fr/> (66). Cette application permet, après un alignement par le programme MUSCLE (89) et un nettoyage de cet alignement par le logiciel Gblocks (39), de construire un arbre par la méthode du maximum de vraisemblance en utilisant le modèle de substitution HKY (145).

1. La méthode de Neighbor-Joining

Selon la méthode de Neighbor-Joining (285), l'alignement des séquences a été utilisé pour construire une matrice de distance via le programme DNADIST du package informatique PHYLIP (105) en utilisant le modèle de substitution F84 (184). Le dendrogramme a ensuite été construit en utilisant le programme NEIGHBOR, disponible dans PHYLIP, permettant d'obtenir les données sous format Newick à partir duquel l'arbre peut être dessiné. La robustesse des nœuds a été évaluée par la méthode de "bootstrap" sur 100 ré-échantillonnages via les programmes SEQBOOT et CONSENSE dans PHYLIP.

2. La méthode du maximum de vraisemblance

Selon la méthode ML (Felsenstein1981), le cladogramme a été construit en utilisant le programme DNAML du package informatique PHYLIP (105). Le modèle de substitution GTR avec estimation de la γ -distribution et des sites invariables a été appliqué pour traiter les alignements, en effectuant 100 ré-échantillonnages (133).

3. La méthode de parcimonie

Selon la méthode MP, l'arbre a été construit à l'aide du programme DNAPARS du package informatique PHYLIP (105). La validité des branchements a été analysée par la méthode de "bootstrap" sur 100 ré-échantillonnages via les programmes SEQBOOT et CONSENSE dans PHYLIP.

4. Visualisation des arbres phylogénétiques

Quelle que soit la méthode de construction de l'arbre, les données ont été obtenues sous format Newick à partir duquel l'arbre a été dessiné dans les programmes Njplot ou TreeView (255, 266). Seuls les bootstraps d'une valeur supérieure à 30% ont été indiqués dans les arbres.

IV. DETERMINATION DES SEQUENCES TYPES

Les alignements obtenus pour les gènes protéiques ont été utilisés pour assigner un nombre à chaque génotype pour chaque gène. Puis ces génotypes ont été comparés pour attribuer un séquence type (ST) pour chaque souche en fonction de son profil allélique.

V. DETERMINATION DES COMPLEXES CLONAUX ET CLUSTERISATION PAR ARBRE DE RECOUVREMENT MINIMAL

Une analyse par le logiciel eBURST (Based Upon Related Sequence Types) version 3 (<http://eburst.mlst.net/>) a été menée afin de déterminer les éventuels groupes clonaux parmi les différents STs (104). L'algorithme eBURST rassemble dans un complexe clonal tous les isolats ayant au maximum un allèle qui diverge. Au sein d'un complexe, il tente de désigner le ST ancestral hypothétique. Un arbre de recouvrement minimal ou Minimum Spanning a été construit en utilisant l'algorithme de Prim qui va déterminer les liens entre les différents STs via l'outil Minimum Spanning Tree du site <http://pubmlst.org/> (43). Cet arbre permet de visualiser sous forme d'un réseau les relations entre les STs. Selon le principe de parcimonie, le réseau est construit afin d'expliquer l'arbre le plus court. Les complexes clonaux ont été définis de la même façon que pour le eBURST (\leq un allèle différent). Cet arbre permettra de mettre en parallèle les résultats obtenus par les deux techniques.

Quelle que soit la technique, les isolats n'appartenant pas à un complexe clonal (\geq deux allèles différents) sont appelés des singletons.

VI. ANALYSES DE LA DIVERSITE GENETIQUE, DU DESEQUILIBRE DE LIAISON ET DE LA RECOMBINAISON

Une matrice de distance a été générée au format Nexus à partir des profils alléliques pour chaque souche et a été analysée à l'aide du logiciel SplitsTree version 4.0 (159) permettant l'obtention d'un splitsgraph. Le programme LIAN (LInkage ANalysis) version 3.5 (146), disponible sur le site <http://pubmlst.org/>, a été utilisé pour calculer le coefficient d'association standardisé ou sI_A . LIAN 3.5 a également permis de tester l'hypothèse nulle de déséquilibre de liaison et de déterminer la diversité génétique moyenne (H) et la diversité génétique de chaque locus (h). Enfin, le nombre de substitutions synonymes (dS) et non-synonymes (dN) par site a été déterminé sur les alignements de chaque gène de ménage en utilisant le logiciel SNAP (Synonymous Non-synonymous Analysis Program, <http://www.hiv.lanl.gov>) (186).

Etude des caractères génomiques

I. HYBRIDATION ADN-ADN

Le pourcentage d'hybridation ADN-ADN entre les souches *C. orbiscindens* DSM 6740^T et *E. plautii* DSM 4000^T a été déterminé par l'équipe de Jean-Philippe Carlier de l'Institut Pasteur de Paris. L'ADN extrait a ensuite été purifié par chromatographie sur hydroxylapatite comme décrit par Cashion et coll. (1977) et l'hybridation a été effectuée selon la méthode décrite par Huß et coll. (1983) (38, 160).

II. DÉTERMINATION DU G+C%

La détermination de la composition globale en guanine et cytosine a été réalisée par CLHP par l'équipe de Jean-Philippe Carlier de l'Institut Pasteur de Paris sur les souches types *C. orbiscindens* DSM 6740^T et *E. plautii* DSM 4000^T selon la méthode de Mesbah et coll. (1989) (231). La détermination du G+C% de la souche type de la nouvelle espèce de *Prevotella* (LBN 293^T) a été réalisée selon la même méthode par le service d'identification de la DSMZ. Pour cela, nous avons cultivé la souche en milieu liquide de façon à obtenir trois grammes de biomasse qui ont été envoyés en Allemagne en flacons scellés dans un mélange eau/isopropanol (v/v).

III. ETUDE GENOMIQUE PAR ELECTROPHORESE EN CHAMP PULSE

1. Préparation et lyse des plugs

Les bactéries en phase exponentielle de croissance ont été mises en solution dans du TE 1X (Tris-EDTA) à une DO_{650nm} de 1.99. Cette DO a été ajustée en fonction des résultats obtenus pour chaque souche. Cette solution a été incorporée (v/v) dans une matrice semi-solide à 2% d'agarose de faible point de fusion maintenue en surfusion à 55°C. Cette préparation a été ensuite coulée dans des moules adéquats et rapidement solidifiée à 4°C. Les bactéries ont été lysées *in situ* par une solution d'EDTA 0.5 M pH 8 contenant 1% de SDS et 1 mg/ml de pronase à 37°C pendant au moins 48 h. L'EDTA permet d'inhiber l'action des nucléases endogènes. Après la lyse, la pronase a été inactivée par deux lavages de 1 h en TE contenant 1 mM de phénylméthylsulfonyl fluoride (PMSF). Ce premier lavage a été effectué à 37°C et le second à température ambiante. Après plusieurs lavages successifs en TE 1X permettant d'éliminer les débris cellulaires et le PMSF, l'agarose ne contenait plus que des acides nucléiques intacts.

2. Digestion enzymatique

Chaque plug a été digéré par l'endonucléase I-*CeuI*. Dans un premier temps, le plug a été placé dans le tampon de l'enzyme de restriction pendant 3 h à 4°C selon le protocole suivant :

- 5 µl de BSA (Bovine Serum Albumine) 100X
- 50 µl de tampon 10X
- eau pour préparation injectable qsp 500 µl

Puis 2.5 U d'enzyme I-*CeuI* ont été ajoutées et le tube a été incubé à 37°C pendant 3 h.

3. Migration électrophorétique

Les plugs digérés ou non ont été insérés puis scellés dans les puits d'un gel d'agarose à 0.8% préparé en Tris Borate EDTA (TBE) 0.5X. En cas de suspicion de dégradation de l'ADN par une DNase, 50 μ M de thiourée ont été ajoutés au gel. Les fragments de restriction (ou les chromosomes entiers) ont été séparés par ECP. L'appareil utilisé était un CHEF-DRIII (Bio-Rad). Le tampon de migration était du TBE 0.5X. Les différents paramètres de migration utilisés sont résumés dans le tableau suivant.

Tableau 27. Paramètres utilisés lors de la migration électrophorétique en champ pulsé.

Paramètres	ADN digéré par I-CeuI		ADN non digéré
	protocole 1	protocole 2	
Pulse initial	50 sec	90 sec	50 sec
Pulse final	100 sec	150 sec	300 sec
Voltage	5.1 V/cm	5.1 V/cm	4.5 V/cm
Temps de migration	36 h	24 h	48 h
Température du tampon de migration	10°C	10°C	10°C

Le gel a ensuite été plongé dans un bain de bromure d'éthidium à 0.5 mg/l préparé en TBE 1X puis il a été exposé aux rayons UV afin de visualiser les pulsotypes. La taille des fragments a été estimée par rapport aux marqueurs de poids moléculaire que sont les chromosomes de *Saccharomyces cerevisiae* et *Hansenula wingei*.

Une courbe reliant la distance de migration des différents fragments du marqueur utilisé à la taille de ces fragments a été construite pour chaque gel d'ECP. La taille des fragments obtenus après restriction enzymatique a ensuite été déterminée en reportant sur la courbe établie les distances de migration de chacun d'entre eux. Chaque taille a été estimée à partir d'au moins deux migrations.

4. Etude du squelette *rrn* par hybridation

Le Southern blot est une technique qui permet de visualiser un fragment d'ADN au sein d'un génome à l'aide d'une sonde spécifique complémentaire de ce fragment, après digestion enzymatique de l'ADNg. Après avoir subi plusieurs traitements de fragilisation, l'ADN

présent dans le gel d'agarose a été transféré par capillarité en tampon 20 SSC (Standard Saline Citrate) sur une membrane de nylon Hybond N+. Ensuite, la membrane a été rincée et exposée aux rayons ultraviolets (UV) afin d'optimiser la fixation de l'ADN sur cette membrane. La détection des opérons *rrn* a été réalisée à l'aide d'une sonde d'ADN synthétisée par PCR en utilisant le protocole et les amorces spécifiques P8-P1525 avec l'ADN extrait de la souche *C. hastiforme* ATCC 33268^T. La taille et la pureté du produit PCR ont été contrôlées par électrophorèse dans un gel d'agarose à 1.5%. Le produit PCR a été purifié à l'aide du kit QIAquick PCR purification (QIAGEN) afin d'éliminer toutes les impuretés qui pourraient gêner les manipulations suivantes. La sonde ainsi obtenue a été dénaturée puis marquée extemporanément à la peroxydase de Raifort à l'aide du kit ECL Direct Nucleic Acid Labelling and Detection System d'Amersham Biosciences (nouvellement GE Healthcare). L'adjonction de glutaraldéhyde a permis de lier la peroxydase de façon covalente. La sonde a ensuite été hybridée sur la membrane dans un four à hybridation toute une nuit à 42°C. La membrane a été rincée puis révélée en ajoutant le substrat de la peroxydase ainsi que du luminol qui, une fois oxydé, a entraîné la production de lumière, directement détectée sur un film photographique BioMax XAR (Kodak). Ce film a enfin été développé par un bain au nitrate d'argent. Une bande noire est apparue lorsque la sonde s'est hybridée.

**RESULTATS PARTIE I. ANALYSE
D'UN GROUPE TAXONOMIQUE EN
PLEIN REMANIEMENT**

Tissierella praeacuta – Clostridium hastiforme : une seule et même espèce ?

I. RÉSULTATS PRÉLIMINAIRES

Parmi les souches cliniques phénotypiquement identifiées comme appartenant à l'espèce *T. praeacuta*, quatre d'entre elles ont été éliminées car le séquençage des 500 premières paires de base de l'ADNr 16S a montré qu'il s'agissait de souches de *Clostridium subterminale*. Les séquençages ont été effectués en collaboration avec Ludovic Lemée du *Groupe de Recherche sur les Antimicrobiens et les Microorganismes* (GRAM) de l'UFR Médecine-Pharmacie de Rouen et les séquences ont été déposées sous les numéros d'accessions DQ911276, DQ911277, DQ911279, DQ911280, DQ911282, DQ911283, et DQ911286 à DQ911297. L'arbre phylogénétique construit à partir de ces séquences et de celles de 27 autres espèces et sous-espèces du genre *Clostridium* est représenté par la Figure 28.

Cet arbre a souligné une probable division de notre ensemble de souches cliniques en deux groupes que nous avons désignés groupe A et groupe B dans la suite de ce travail. Nous avons considéré le groupe phylogénétique A comme constituant l'espèce *T. praeacuta sensu stricto*, car contenant les deux souches types ATCC 25539^T et ATCC 33268^T. Les membres du groupe B ainsi que les souches qui n'appartenaient à aucun de ces deux groupes ont été désignés en tant que *Tissierella* sp.

Après inclusion de trois isolats supplémentaires (LBN 299, AIP 285.00 et souche IP Prévot 3583), notre étude a porté sur 19 souches cliniques ainsi que les souches types *C. hastiforme* 33268^T et *T. praeacuta* ATCC 25539^T (Tableau 14).

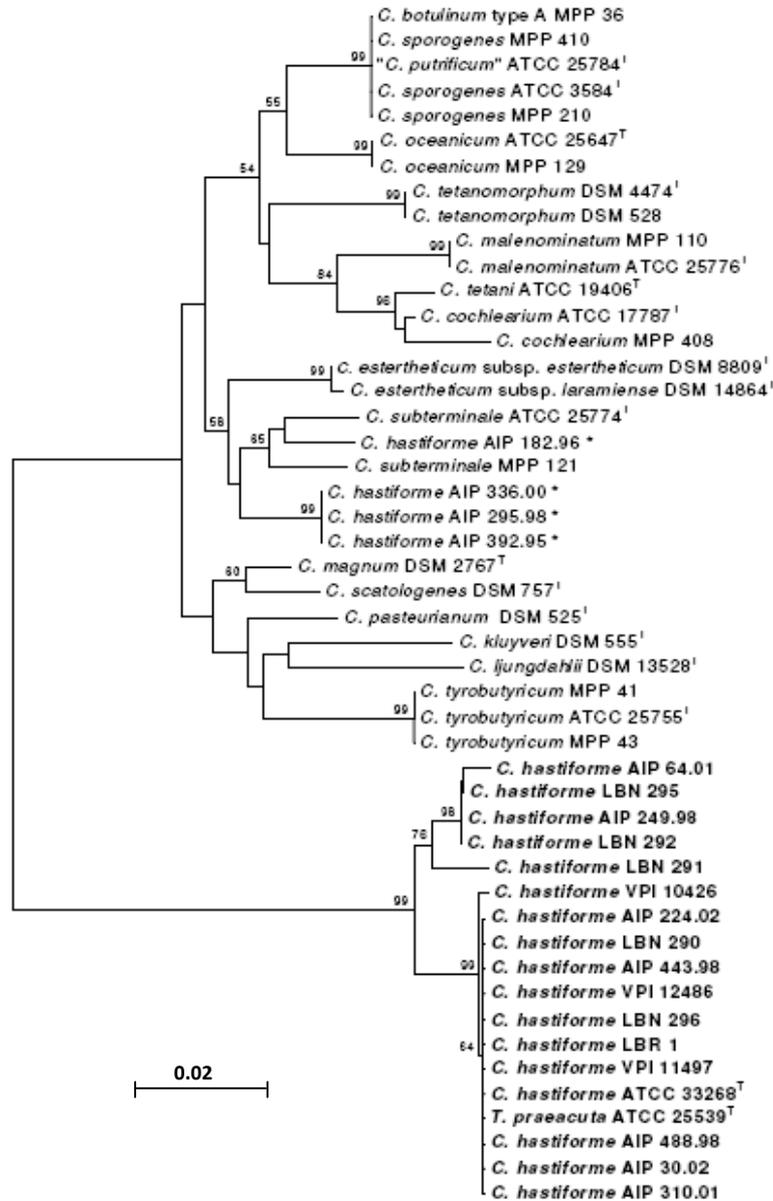


Figure 28 Relations phylogénétiques entre 48 souches de *Clostridium* basées sur l'analyse des séquences d'ADNr 16S partielles.

Les souches de *C. hastiforme* présentant une résistance de bas niveau à la vancomycine sont représentées en gras ; les souches de *C. hastiforme* mal identifiées phénotypiquement (sensibles à la vancomycine) sont suivies d'un astérisque. La barre représente une divergence de deux substitutions pour 100 nucléotides.

Présentant à 48 h une sensibilité variable à la vancomycine par la méthode de dilution en milieu gélosé (CMI, 2 à 16 µg/ml), la croissance de petites colonies à l'intérieur du diamètre d'inhibition a été observée après incubation prolongée de toutes ces souches lorsqu'elles étaient testées par la méthode des disques (30 µg) ou par la méthode du Etest (Figure 29). Les CMI de ces colonies, déterminées par la méthode de référence (47), sont de 8 ou 16 µg/ml.

Toutes les souches présentent donc une sensibilité diminuée à la vancomycine (valeurs seuils : $S \leq 4 \mu\text{g/ml}$ et $R > 8 \mu\text{g/ml}$) (53).

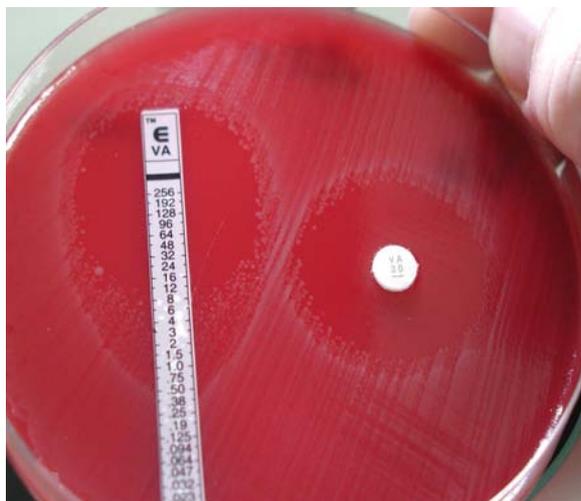


Figure 29. Photographie d'une culture de la souche *C. hastiforme* ATCC 33268^T sur milieu BBA avec apparition de colonies dans la zone d'inhibition du Etest et du disque de vancomycine après 96 h d'incubation.

Toutes les souches sont sensibles à la teicoplanine (CMI, 0.5 à 2 $\mu\text{g/ml}$) par la méthode de référence (47) et aucune d'elles n'a présenté de petites colonies par une méthode de diffusion en milieu gélosé après incubation prolongée (53).

L'hypothèse d'une altération de l'antibiotique dans le temps a été infirmée en utilisant une co-culture avec la souche de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 sensible aux glycopeptides qui a présenté les valeurs de CMI attendues (53).

Afin d'étudier la position taxonomique de ce groupe de souches par une approche mixte et consensuelle, nous avons analysé en parallèle les souches types de *Tissierella creatinophila*, *Tissierella creatinini*, *Clostridium ultunense*, *Tepidimicrobium ferriphilum*, *Sporanaerobacter acetigenes*, et *Soehngenia saccharolytica* qui constituent les espèces et genres les plus proches phylogénétiquement de *T. praeacuta*.

II. CARACTERES PHENOTYPIQUES

Les principales caractéristiques des souches étudiées sont résumées dans le tableau suivant :

Tableau 28. Principales caractéristiques phénotypiques des souches de *Tissierella* spp. et des genres apparentés.

Espèce (génotypique)	N° de souche	Coloration de Gram	Formation de spore	Mobilité	Pigmentation	Production :				
						indole	nitrate réductase	gélatinase	lécithinase	H ₂ S
<i>T. praeacuta</i>	AIP 224.02	v	+	+	non	-	+	+	-	+
	AIP 30.02	v	+	+	non	-	+	+	-	+
	AIP 310.01	v	+	+	oui	-	-	+	-	+
	AIP 443.98	v	+	+	non	-	+	+	-	+
	AIP 488.98	-	+	+	oui	-	+	+	-	+
	LBN 290	v	+	+	oui	-	+	+	-	+
	LBR1	v	+	+	oui	-	+	+	-	+
	LBN 296	v	+	+	non	-	+	+	-	+
	VPI 10426	v	+	+	oui	-	-	+	-	+
	VPI 11497A	-	+	+	oui	-	-	+	-	+
	VPI 12486A	v	+	+	non	-	-	+	-	+
	ATCC 33268 ^T	v	+	+	oui	-	v	+	-	+
	ATCC 25539 ^T	v	-	+	non	-	+	+	-	+
<i>Tissierella</i> sp.	AIP 249.98	-	+	+	oui	-	-	+	-	+
	AIP 64.01	v	+	+	oui	-	-	+	-	+
	LBN 292	-	-	+	non	-	-	+	-	+
	LBN 295	v	+	+	oui	-	-	+	-	+
	IP Prévot 3583	-	+	+	oui	-	-	+	-	+
	LBN 291	v	+	+	non	-	-	+	-	+
	AIP 285.00	-	+	+	non	-	-	-	-	+
	LBN 299	-	+	+	oui	-	-	-	-	+
<i>T. creatinophila</i>	DSM 6911 ^T	+	-	+	non	nr*	-*	nr*	nr*	nr*
<i>T. creatinini</i>	DSM 9508 ^T	+	-	-	non	-*	-*	-*	-*	nr*
<i>C. ultunense</i>	DSM 10521 ^T	-	+	+	non	+*	-*	-*	nr*	nr*
<i>T. ferriphilum</i>	DSM 16624 ^T	v	-	+	na	nr*	-*	nr*	nr*	nr*
<i>S. acetigenes</i>	DSM 13106 ^T	v	+	+	non	nr*	-*	-*	nr*	nr*
<i>S. saccharolytica</i>	DSM 12858 ^T	v	+	+	non	+*	-*	-*	nr*	+*

-, négatif(ve) ; +, positif(ve) ; v, variable ; nr, non renseigné ; na, non applicable (culture en milieu liquide exclusivement).

*, d'après Farrow et coll. (102), Harms et coll. (143), Hernandez-Eugenio et coll. (150), Parshina et coll. (259), Schnürer et coll. (293) et Slobodkin et coll. (309).

Les souches testées se sont toutes avérées mobiles à l'exception de *Tissierella creatinini*. En ce qui concerne les souches de référence, ces résultats concordent avec les observations décrites dans la littérature (102, 143, 150, 259, 293, 309).

Certaines souches étaient pigmentées et d'autres ne l'étaient pas, sans qu'il semble y avoir de lien avec un éventuel groupe taxonomique. Par exemple, les souches *T. praeacuta* ATCC 25539^T et *C. hastiforme* ATCC 33 268^T, partageant plus de 99% d'identité sur leur ADNr 16S, ne présentaient pas le même phénotype de pigmentation. L'examen de ce caractère a permis d'acquérir une information supplémentaire sur chaque souche mais ne pourra pas être utilisé pour distinguer les membres des deux groupes phylogénétiques.

Les colorations de Gram ont permis de constater qu'un grand nombre des souches cliniques étudiées présentaient un aspect de bactéries à Gram négatif. Cet aspect est discuté dans le paragraphe suivant en lien avec la structure de la paroi.

Au sein du genre *Tissierella* spp., la majorité des souches avaient la capacité de sporuler, de façon plus ou moins importante selon la souche. Aucune spore n'a pu être observée pour les souches LBN 292, ATCC 25539^T, DSM 6911^T et DSM 9508^T. Cette absence de sporulation pour les trois souches de références était en accord avec les données de la littérature (15, 102, 143).

En ce qui concerne les caractères enzymatiques, les souches des groupes A et B possédaient une gélatinase à l'inverse des souches apparentées. Les souches du groupe B ne produisaient pas de nitrate réductase alors que ce caractère était variable pour les souches du groupe A. Même si le profil "Gélatinase + / Nitrate + / H₂S +" semble plus spécifique du groupe A, il sera nécessaire d'étudier un plus grand nombre de souches appartenant aux groupes B ou ayant des caractéristiques similaires à la souche LBN 291 pour définir des règles d'identification phénotypique éventuelles.

III. CARACTERES STRUCTURAUX

1. Etude de l'ultrastructure de *Tissierella* spp.

La Figure 30 montre les images observées en MET pour les espèces témoins. *C. perfringens* ATCC 13124^T présente une paroi de type Gram-positif avec une couche épaisse de peptido-

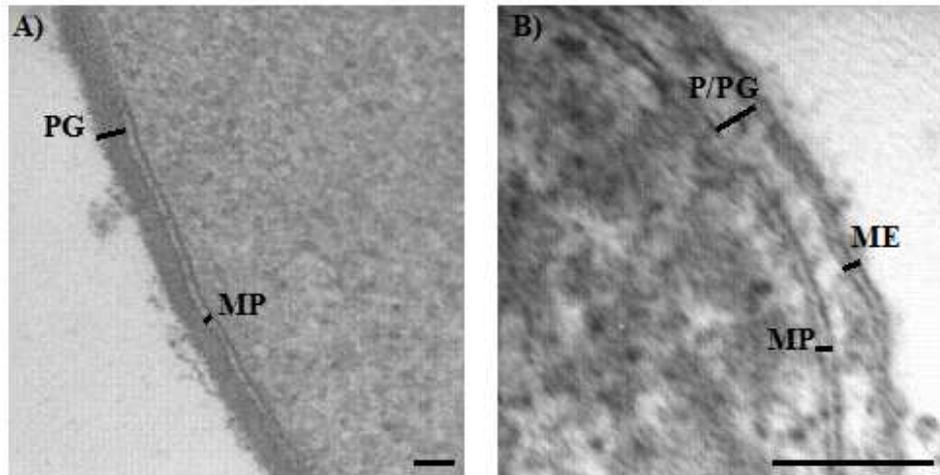


Figure 30. Images en coupe de la paroi de *Clostridium perfringens* ATCC 13124^T (A) et de *Prevotella* sp. nov. LBN 293^T (B) (échelle = 50 nm).

Les membranes plasmique et externe (MP et ME), le peptidoglycane (PG) et le périplasm (P) sont indiqués.

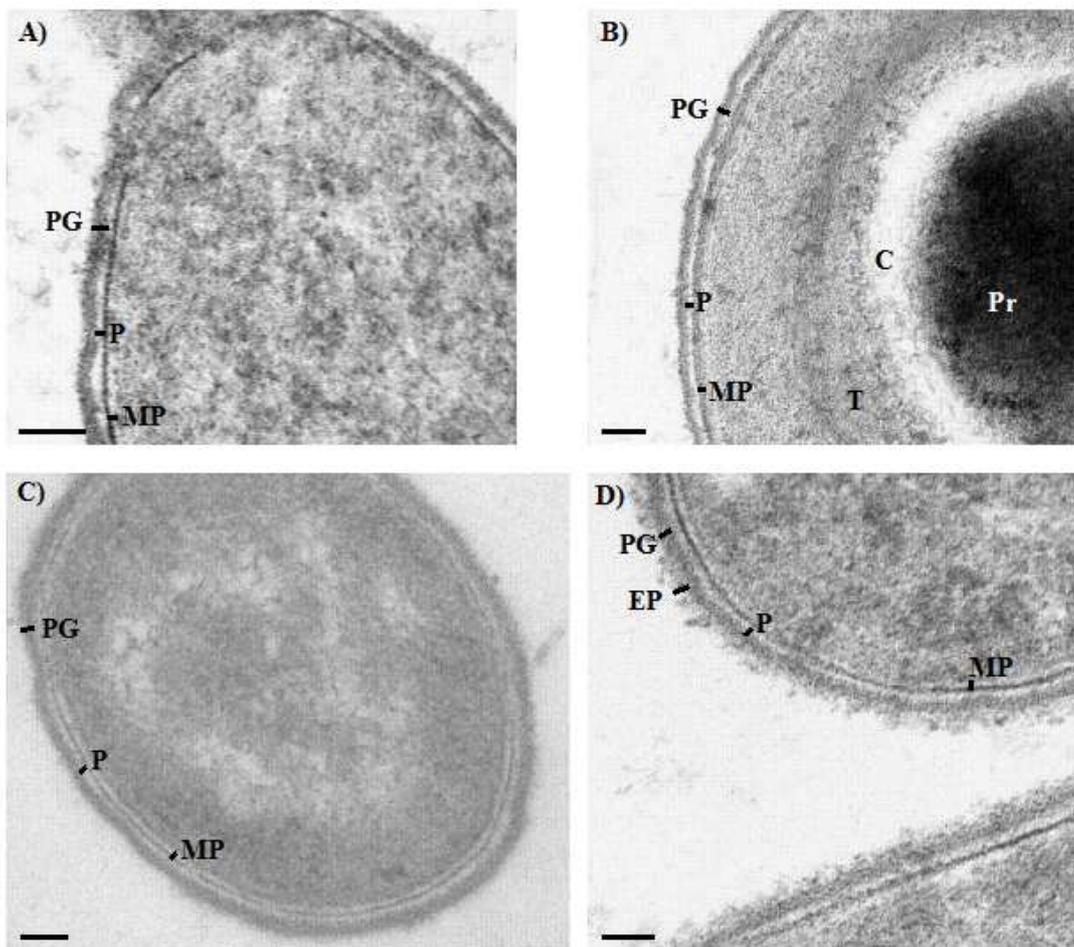


Figure 31. Images en coupe de la paroi de *C. hastiforme* ATCC 33268^T (A et B), de *Tissierella* sp. LBN 295 (C), et de *T. praeacuta* ATCC 25539^T (D) (échelle = 50 nm).

Le peptidoglycane (PG), le périplasm (P), la membrane plasmique (MP), l'exopolysaccharide extérieur (EP) sont indiqués. Une spore est visualisée dans l'image B avec ses différents constituants: les tuniques extérieures (T), le cortex (C) et le protoplaste (Pr).

glycane alors que *Prevotella* sp. nov. LBN 293^T possède une paroi tri-lamellaire de type Gram-négatif avec présence d'une membrane externe.

L'ultrastructure des souches *C. hastiforme* 33268^T, *T. praeacuta* ATCC 25539^T et *Tissierella* sp. LBN 295 est de type monoderme (Figure 31). Ces trois souches ne possèdent pas de membrane externe et présentent une ultrastructure similaire avec une fine couche de peptidoglycane (Tableau 29).

Tableau 29. Epaisseur des différents éléments structuraux de la paroi des souches observées en MET.

Souches observées	Epaisseur mesurée (en nm) :					
	membrane interne	espace périplasmique	peptidoglycane	membrane externe	paroi	exopoly-saccharide
<i>C. perfringens</i> ATCC 13124 ^T	5.2	nv	38.5	-	44	-
<i>Prevotella</i> sp. nov. LBN 293 ^T	5.1	10.2	7.7	5.2	28	-
<i>C. hastiforme</i> ATCC 33268 ^T	5.2	7.3	13.5	-	26	-
<i>T. praeacuta</i> ATCC 25539 ^T	5.5	7.1	13.0	-	26	15
<i>Tissierella</i> sp. LBN 295	6.7	8.3	15.0	-	30	-
<i>C. ultunense</i> BS ^{T*}	5.8	nv	21.8	-	28	30.8
<i>T. ferriphilum</i> SB91 ^{T*}	5.3	nv	25.1	-	33	25
<i>S. saccharolytica</i> BOR-Y ^{T*}	5.9	11.8	30	-	48	-
<i>S. acetigenes</i> Lup33 ^{T*}	5.3	9.6	18.6	-	34	-

nv, non visible ; -, absence.

*, mesurée à partir des photographies de MET publiées par Hernandez-Eugenio et coll. (150), Parshina et coll. (259), Schnürer et coll. (293) et Slobodkin et coll. (309).

Par ailleurs, *T. praeacuta* 25539^T (Figure 31D) possède un épais feutrage, probablement de nature glucidique, entourant la paroi. Des observations des souches *C. hastiforme* 33268^T et *T. praeacuta* 25539^T ont été effectuées en parallèle à l'Institut Pasteur de Paris, donnant le même type d'images.

En comparaison à *C. perfringens* qui présente une épaisseur de peptidoglycane typique de bactérie monoderme, les souches de *T. praeacuta* et *Tissierella* sp. ont une couche de peptidoglycane très fine (13 à 15 nm). Ceci pourrait expliquer l'apparence Gram-négative de ces souches après coloration de Gram. Ce phénomène a déjà été décrit pour d'autres espèces

comme *Butyrivibrio fibrisolvens* ou *Eubacterium plautii* sur lequel nous reviendrons plus bas (44, 153). Cependant, certains auteurs avancent d'autres hypothèses qui pourraient expliquer cette décoloration, comme une altération de la paroi par l'oxygène qui entraînerait le passage de l'alcool et son action décolorante (166).

Par ailleurs, les variations importantes de l'épaisseur de l'espace périplasmique (allant de non visible à 11.8 nm) pourraient s'expliquer par un biais méthodologique car certains auteurs ont souligné des altérations de la paroi par les étapes de fixation et de déshydratation entraînant l'observation d'artefacts structuraux (349).

Les souches types présentent des colorations de Gram en concordance avec les données de la littérature. Les bactéries du genre *Tissierella* et des genres apparentés ont plutôt tendance à se décolorer au Gram. D'un point de vue évolutif, il s'agit d'un groupe de souches possédant une paroi de type Gram positif avec une couche de peptidoglycane particulièrement fine. Il faut donc rester vigilant quant à l'aspect après coloration de Gram qui ne reflète pas toujours la structure réelle de la paroi bactérienne. Or cette structure est un caractère évolutif très important (291).

2. Analyse de la composition du peptidoglycane par chromatographie liquide haute performance et spectrométrie de masse (CLHP-SM)

a) Courbes de croissance

Les caractéristiques des différentes phases de croissance en milieu liquide de *Tissierella* spp. ou des genres apparentés ne sont pas connues. Sur milieu solide, ces bactéries poussent en général en 48 h, voire plus pour les genres apparentés. Nous avons effectué des courbes de croissance des souches *C. hastiforme* ATCC 33268^T et *Tissierella* sp. LBN 295 afin de déterminer le délai nécessaire pour qu'elles se situent en première partie de la phase exponentielle de croissance (DO \approx 0.7) pour extraire le peptidoglycane. La souche *C. difficile* 630 testée en parallèle lors de chaque test a permis de valider les manipulations. En effet, les courbes de croissance obtenues pour cette souche ont un aspect typique (Figure 32) et qui concorde aux données publiées pour *C. difficile* 630 (70). De plus, une DO de 0.7 correspond bien à la première partie de la phase exponentielle de croissance.

Un aspect de courbe de croissance croissance plutôt linéaire a été observé pour les souches *C. hastiforme* ATCC 33268^T (testée à deux reprises) et *Tissierella* sp. LBN 295 qui présentent une phase de latence beaucoup plus longue par rapport à celle de *C. difficile*. Ceci pourrait s'expliquer par la croissance lente de ces bactéries en comparaison à *C. difficile* (la phase stationnaire n'est pas atteinte à 30 h de culture) ou par l'utilisation d'un milieu et/ou de conditions de cultures non optimales. Une DO de 0.7 correspond à un temps de pousse d'environ 16 h (960 min) pour les deux souches testées.

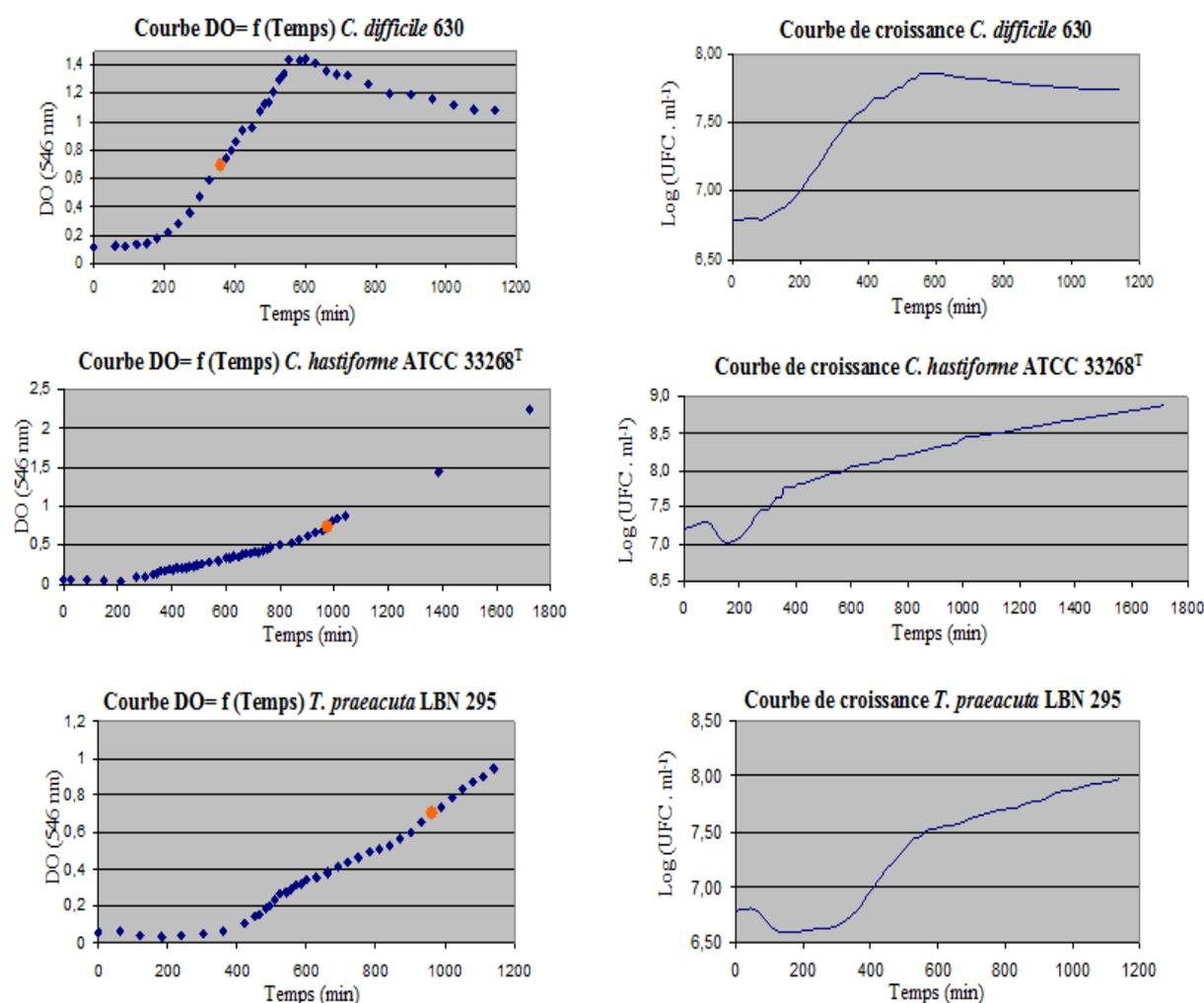


Figure 32. Graphiques représentant l'évolution de la DO ou de la concentration bactérienne en fonction du temps pour les souches *C. difficile* 630, *C. hastiforme* ATCC 33268^T et *Tissierella* sp. LBN 295. Le point orange représente le temps nécessaire pour atteindre une DO de 0.7.

b) Extraction du peptidoglycane

L'extraction du peptidoglycane a été effectuée après 17 h de culture des souches *C. hastiforme* ATCC 33268^T, *Tissierella praeacuta* ATCC 25539^T et *Tissierella* sp. LBN 295. L'observation du comportement de chaque souche a conduit à l'adaptation du protocole. Par exemple, les centrifugations initiales de la souche *C. hastiforme* ATCC 33268^T ont été effectuées à température ambiante afin de limiter sa sporulation. Les deux autres souches ayant plutôt posé des problèmes de remise en suspension et donc de perte de matériel, probablement en lien avec leur aspect muqueux, le temps de centrifugation initial a été allongé afin d'obtenir des culots bactériens de bonne qualité.

En utilisant le protocole d'extraction du muropeptide des bactéries à Gram positif (54), le rendement a été très faible (obtention de 0.2 à 1 mg de peptidoglycane après lyophilisation). Nous avons donc modifié le protocole en réalisant toutes les centrifugations à plus haute vitesse en ultracentrifugeuse (150 000 g) comme recommandé pour les bactéries à Gram négatif qui possèdent une couche très fine de peptidoglycane. Nous n'avons pas à l'époque les résultats de MET mais la décoloration de nos souches au Gram suggérait un problème lié à une faible épaisseur de peptidoglycane. Ce deuxième protocole basé sur l'utilisation de l'ultracentrifugation nous a permis d'obtenir plus de matériel. Une première manipulation d'extraction a été effectuée en novembre 2006 sur les souches *C. hastiforme* ATCC 33268^T et *Tissierella* sp. LBN 295, sans l'étape de purification par l'acide fluorhydrique. Après les résultats obtenus à Jouy-en-Josas, une seconde extraction a été réalisée sur des volumes de culture plus importants. Les rendements obtenus lors de ces extractions sont résumés dans le Tableau 30.

Tableau 30. Rendements de l'extraction du peptidoglycane des souches *C. hastiforme* ATCC 33268^T, *T. praeacuta* ATCC 25539^T et *Tissierella* sp. LBN 295 (manipulation de novembre 2006 ❶ ou de juin 2007 ❷).

Souches testées	Volume de milieu ensemencé		Masse bactérienne avant extraction		Masse de peptidoglycane lyophilisé	
	❶	❷	❶	❷	❶	❷
<i>C. hastiforme</i> 33268 ^T	2 litres	8 litres	nd	7.76 g	6.2 mg	29.5 mg
<i>T. praeacuta</i> 25539 ^T	ne	9 litres	ne	16.38 g	ne	40.9 mg
<i>Tissierella</i> sp. LBN 295	2 litres	9 litres	nd	15.71 g	2.9 mg	32.7 mg

ne, non effectué ; nd, non déterminé.

Lors de chaque expérience, l'identité et la pureté des souches sur lesquelles nous avons travaillé ont été confirmées par une coloration de Gram, le profil en galerie API 20A ainsi que le séquençage de l'ADNr 16S.

c) Analyse des mucopeptides par CLHP-SM

Les résultats obtenus après la première extraction (❶) sur les souches *C. hastiforme* ATCC 33268^T et *Tissierella* sp. LBN 295 ne nous ont pas permis d'interpréter les données. D'une part, le chromatogramme présentait de nombreux pics de faible intensité ainsi qu'un bruit de fond important. Ce phénomène pouvait s'expliquer en partie par une pureté insuffisante du peptidoglycane et/ou par la faible quantité analysée. Il fallait également s'assurer que nous avons bien extrait du peptidoglycane bactérien. Le dosage PicoTag a montré la présence d'acide N-acétylmuramique, spécifique du peptidoglycane bactérien. Il n'y avait pas de contamination majeure par des protéines. Par ailleurs, le rendement de la digestion était satisfaisant (97%).

Dans un deuxième temps, nous avons donc ré-extrait le peptidoglycane des souches *C. hastiforme* ATCC 33268^T, *Tissierella praeacuta* ATCC 25539^T et *Tissierella* sp. LBN 295 sur des volumes de culture beaucoup plus importants et en ajoutant une étape de purification à l'acide fluorhydrique qui permet d'éliminer les acides teichoïques liés de manière covalente au peptidoglycane (❷). Les résultats obtenus sur cette nouvelle préparation étaient nettement meilleurs. La CLHP en phase inverse a permis l'obtention de chromatogrammes identiques pour les souches *C. hastiforme* 33268^T et *T. praeacuta* 25539^T alors que la souche LBN 295 présente un profil chromatographique différent (Figure 33).

Les deux souches types ayant le même profil en CLHP, *T. praeacuta* 25539^T n'a pas été analysée en spectrométrie de masse. Pour chacune des deux autres souches, une trentaine de pics ont été analysés avec un spectromètre de masse MALDI-TOF. Un tableau contenant les possibilités de masses a été établi en se basant sur la présence d'un acide diaminopimélique (DAP) en 3^{ème} position, un pontage direct entre les peptides et la présence en 5^{ème} position soit d'une alanine, d'une sérine ou d'un lactate (40, 155, 358, 363).

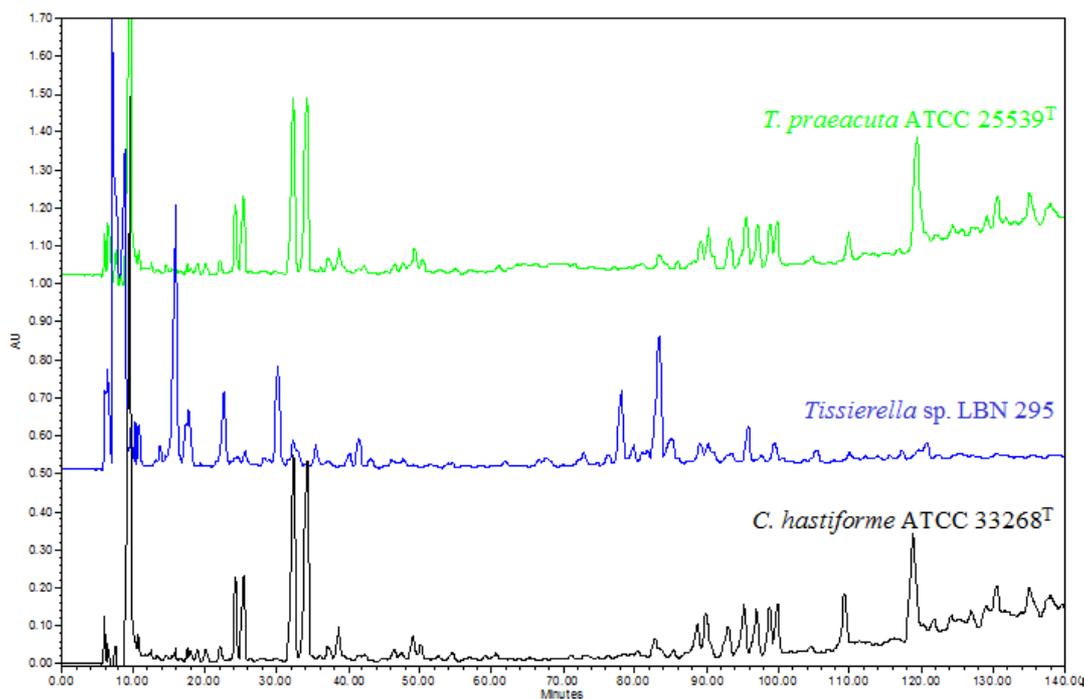


Figure 33. Chromatogrammes obtenus après CLPH en phase inverse sur colonne Hypersyl PEP100 pour les souches *C. hastiforme* 33268^T, *T. praeacuta* 25539^T et *Tissierella* sp. LBN 295.

Les masses identifiées en SM ont été comparées à ce tableau. La souche ATCC 33268^T possède essentiellement des térapeptides sous forme acétylée ou non. La souche LBN 295 possède des muuropeptides avec des chaînes tripeptidiques et térapeptidiques, acétylées ou non. Alors qu'il est décrit 11% de monomères pentapeptidiques dans le muuropeptide de *C. innocum* (61), nous n'avons pas détecté de pentapeptide chez les deux souches de *Tissierella* spp. Ce phénomène pourrait s'expliquer par une activité augmentée des transpeptidases ou des carboxypeptidases qui vont cliver l'acide aminé terminal du précurseur. Afin de vérifier cette hypothèse, il sera nécessaire de déterminer les enzymes impliquées dans la synthèse du muuropeptide ainsi que leur taux d'activité. Il sera également intéressant de déterminer le taux de liaison interpeptidique qui est lié à l'activité de ces enzymes. Ce taux peut être très variable selon l'espèce bactérienne et des valeurs allant de 20% chez *E. coli* à plus de 93% chez *S. aureus* ont été décrites (349). Enfin, pour connaître la nature exacte de l'acide aminé terminal du peptidoglycane, il sera nécessaire d'analyser les précurseurs intra-cytoplasmiques qui sont synthétisés sous forme pentapeptidique.

Ces résultats confirment les données bibliographiques sur la structure du muuropeptide de *C. hastiforme* avec du DAP en position 3 et un pontage direct entre les peptides. L'absence de pentapeptide ne nous permet pas de donner la nature de l'acide aminé terminal mais la structure **GlcNac–MurNac–L-Ala–D-Glu–DAP–D-Ala** du muuropeptide de nos souches

peut être validée. Cette structure est similaire à celle retrouvée chez *E. coli* ou chez *Bacillus* spp. (Figure 34) (349).

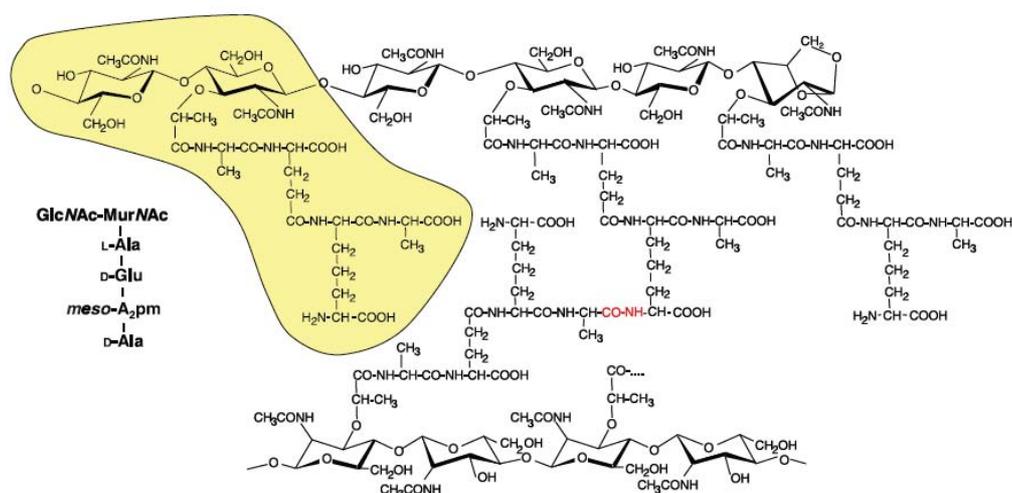


Figure 34. Structure du peptidoglycane d'*E. coli* (349) similaire à la structure observée pour les *Tissierella* spp. testées.

La partie glycane est constituée d'un enchaînement de disaccharides de N-acétylglucosamine (GlcNAc) et d'acide N-acétylmuramique (MurNAc). Le peptide est lié au niveau du MurNAc. En jaune est représenté un monomère de muropéptide. Ces monomères peuvent être directement reliés entre eux (en rouge).

Par ailleurs, d'un point de vue taxonomique, les souches *C. hastiforme* 33268^T et *T. praeacuta* 25539^T possèdent peptidoglycane avec la même composition que celui de la souche *Tissierella* sp. LBN 295, c'est à dire que la nature des acides aminés est conservée. En revanche, l'analyse de la structure fine des muropéptides qui constituent le peptidoglycane révèle des différences qui se traduisent par des profils de muropéptides complètement différents en CLHP. Ces différences peuvent s'expliquer par une maturation différente du peptidoglycane en particulier par des carboxypeptidases qui vont cliver la chaîne peptidique linéaire du peptidoglycane ou par des enzymes capables, par exemple, de déacétyler le peptidoglycane.

En ce qui concerne l'espèce *T. creatinini*, l'acide aminé en position 3 n'est pas du mDAP mais de la D-Ornithine et, à notre connaissance, aucune donnée n'est disponible pour *T. creatinophila*. Une variation dans la nature de l'acide aminé dibasique du muropéptide a déjà été décrite pour des espèces phylogénétiquement très proches comme *C. paradoxum* (mDAP) et *C. thermoalcaliphilum* (L-Ornithine) (102, 363). Cependant, une telle différence devrait avoir un rôle important d'un point de vue évolutif et l'analyse de la composition du

peptidoglycane des espèces et genres apparentés à *Tissierella praeacuta* serait nécessaire pour définir le poids taxonomique de cette structure cellulaire.

IV. ORGANISATION CHROMOSOMIQUE

1. Electrophorèse en champ pulsé

Plusieurs équipes décrivent la spécificité d'espèce des pulsotypes après digestion par I-*CeuI* c'est à dire la spécificité d'espèce du squelette *rrn* chromosomique (209, 210, 224). Nous avons dans un premier temps testé cette approche sur les souches observées en MET (*C. hastiforme* 33268^T, *T. praeacuta* 25539^T et *Tissierella* sp. LBN 295) ainsi que sur cinq souches d'espèces ou genres différents (Figure 35).

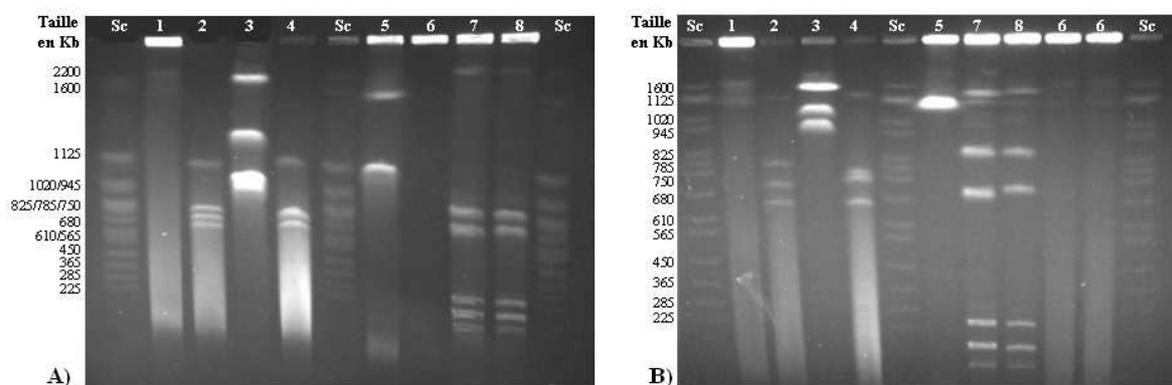


Figure 35. Photographies de la migration électrophorétique en champ pulsé après digestion par I-*CeuI*. **A)** Migration de 24 h et rampe de pulse de 90-150 secondes. **B)** Migration de 36 h et rampe de pulse de 50-100 secondes. **Sc**, chromosomes de *Saccharomyces cerevisiae* servant de marqueur de taille ; **1.** *T. creatinophila* DSM 6911^T ; **2.** *T. praeacuta* ATCC 25539^T ; **3.** *Tissierella* sp. LBN 295 ; **4.** *C. hastiforme* ATCC 33268^T ; **5.** *C. orbiscindens* DSM 6740^T ; **6.** *C. perfringens* 13124^T ; **7.** *C. difficile* CD33 ; **8.** *C. difficile* CD34.

Les résultats montrant des pulsotypes ribosomiques similaires pour deux souches cliniques de *C. difficile* (six opérons *rrn* visibles, puits 7 et 8) nous permettent de valider l'approche par restriction I-*CeuI* et ECP. En effet, ces deux souches appartenant à une même espèce présentent des profils identiques entre eux mais différents des autres espèces de *Clostridium* testées. Ces observations justifient l'utilisation de cette technique pour étudier les relations évolutives de nos souches.

En ce qui concerne les souches de *T. praeacuta sensu lato*, les résultats des premiers essais de digestion par I-CeuI nous ont permis d'observer quatre opérons *rrn* chez *T. praeacuta* 25539^T et LBN 295 avec des profils très différents alors que *C. hastiforme* 33268^T ne présentait que trois opérons (Figure 35A). Cependant, certaines bandes étant très rapprochées, il était difficile d'estimer leur taille. Après variation des temps de pulse et augmentation du temps de migration, les pulsotypes observés ont été plus faciles à interpréter avec des fragments mieux séparés (Figure 35B). Ainsi, nous pouvons observer que *C. hastiforme* 33268^T possède également quatre opérons *rrn*. Les deux souches types présentent des profils très proches, ce qui apporte un argument supplémentaire à leur appartenance à une même espèce. La souche LBN 295 présente un pulsotype très éloigné des deux autres. La pureté de la souche a été confirmée par séquençage de l'ADNr 16S.

Les autres espèces testées présentent des profils spécifiques avec deux opérons ribosomiques pour *T. creatinophila* DSM 6911^T et *C. orbiscindens* DSM 6740^T. La souche *C. perfringens* 13124^T n'a donné aucun profil malgré des variations de différents paramètres, phénomène probablement dû à une mauvaise lyse bactérienne (Figure 35, puits 6).

Puis l'approche ECP- I-CeuI a été appliquée à l'ensemble des souches de *Tissierella* spp. ainsi qu'aux genres apparentés en utilisant à chaque fois les deux protocoles de migration (Figures 36 et 37). Les tailles approximatives des différents fragments ont été calculés (Tableau 31).

L'ensemble des souches appartenant aux groupes A et B montrent quatre opérons ribosomiques visibles. Cependant, les souches du groupe A semblent partager des profils similaires et distincts des souches du groupe B. La souche LBN 291 dont la position taxonomique au sein d'un de ces groupes est incertaine possède quant à elle cinq à six opérons *rrn* (Figure 36A et B, puits 9). La pureté de cette souche a été vérifiée. Les souches LBN 299 et AIP 285.00, phénotypiquement identifiées en tant que *T. praeacuta* mais génotypiquement exclues de cette espèce présentent des pulsotypes différents avec quatre opérons. Les souches des espèces et genres apparentés présentent des pulsotypes très caractéristiques et différents de ceux observés pour les groupes A et B, avec de deux à neuf opérons *rrn*. La pureté de la souche de *S. saccharolytica* a été vérifiée.

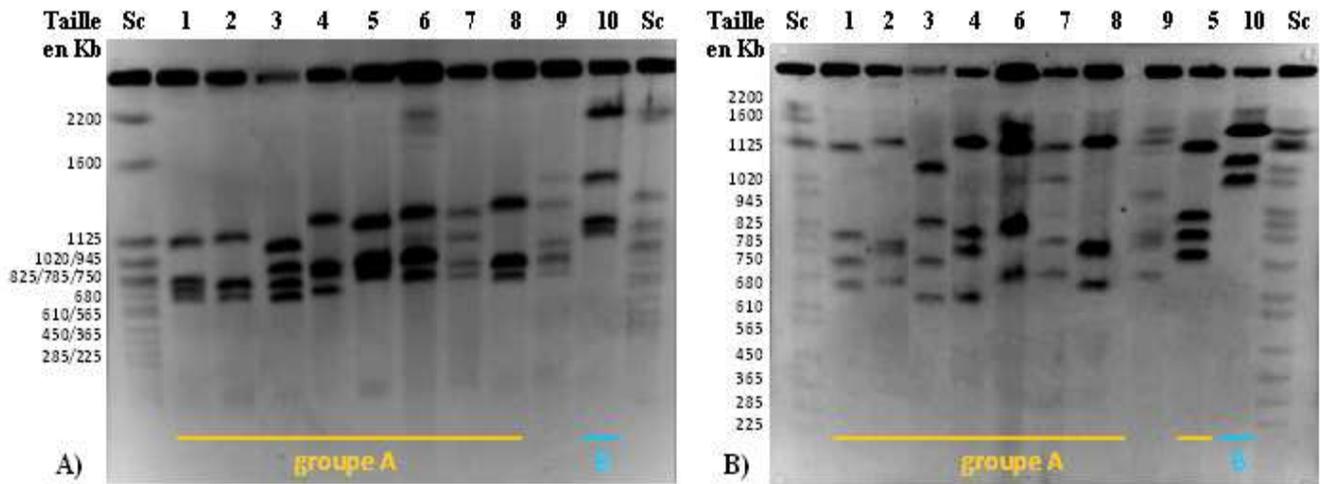


Figure 36. Photographies de la migration électrophorétique en champ pulsé après digestion par I-CeuI. **A)** Migration de 24 h et rampe de pulse de 90-150 secondes. **B)** Migration de 36 h et rampe de pulse de 50-100 secondes. **Sc**, chromosomes de *Saccharomyces cerevisiae* servant de marqueur de taille ; **1.** *T. praeacuta* 25539^T ; **2.** *C. hastiforme* 33268^T ; **3.** *T. praeacuta* AIP 310.01 ; **4.** *T. praeacuta* LBN 290 **5.** *T. praeacuta* LBR1 ; **6.** *T. praeacuta* LBN 296 ; **7.** *T. praeacuta* VPI 10426 ; **8.** *T. praeacuta* VPI 11497A ; **9.** *T. praeacuta* LBN 291 ; **10.** *Tissierella* sp. LBN 295.

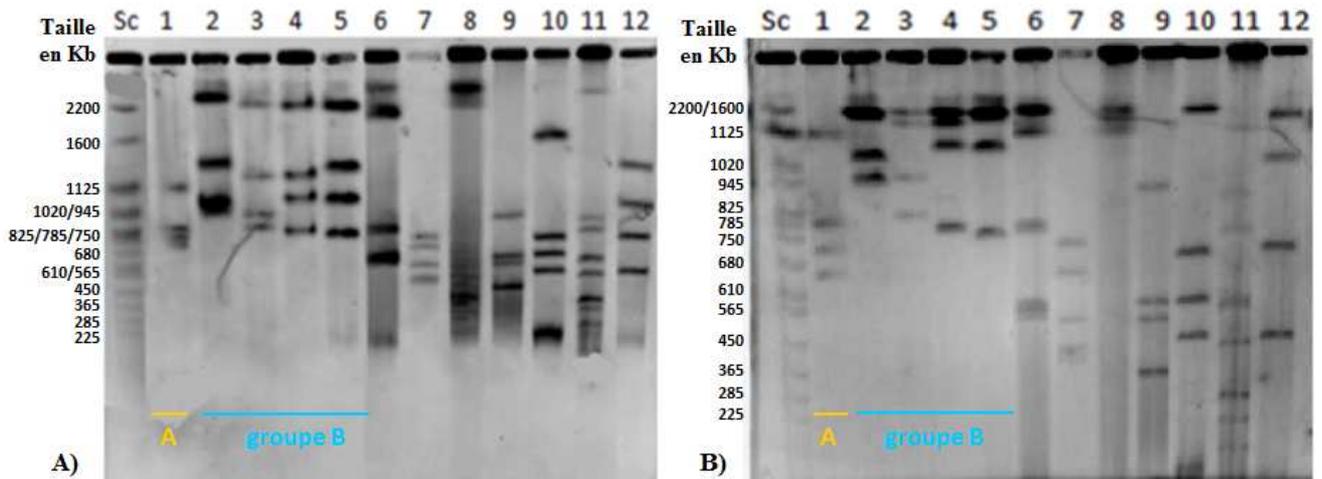


Figure 37. Photographies de la migration électrophorétique en champ pulsé après digestion par I-CeuI. **A)** Migration de 24 h et rampe de pulse de 90-150 secondes. **B)** Migration de 36 h et rampe de pulse de 50-100 secondes. **Sc**, chromosomes de *Saccharomyces cerevisiae* servant de marqueur de taille. **1.** *T. praeacuta* ATCC 25539^T ; **2.** *Tissierella* sp. LBN 295 ; **3.** *Tissierella* sp. AIP 64.01 ; **4.** *Tissierella* sp. LBN 292 ; **5.** *Tissierella* sp. IP Prévot 3583 ; **6.** *Tissierella* sp. LBN 299 ; **7.** *T. creatinini* DSM 9508^T ; **8.** *T. creatinophila* DSM 6911^T ; **9.** *T. ferriphilum* DSM 16624^T ; **10.** *S. acetigenes* DSM 13106^T ; **11.** *S. saccharolytica* DSM 12858^T ; **12.** *C. ultunense* DSM 10521^T.

Tableau 31. Récapitulatif du nombre d'opérons ribosomiques observés ainsi que des tailles approximatives des fragments obtenus après digestion par l'enzyme *I-CeuI* et de la taille estimée du génome des souches testées.

Groupe phylogénétique	Souches	Nb d'opérons <i>rrn</i>	Tailles approximatives des bandes (en Kb)**	Taille estimée du génome
A	AIP 224.02	4	1100 – 820 – 720 – 610	3250 Kb
	AIP 30.02	NA	/	/
	AIP 310.01	4	1070 – 850 – 700 – 620	3240 Kb
	AIP 443.98	4	1090 – 930 – 710 – 560	3290 Kb
	AIP 488.98	NA	/	/
	LBN 290	4	1130 – 800 – 750 – 620	3300 Kb
	LBR1	4	1100 – 820 – 760 – 700	3380 Kb
	LBN 296	4	1100 – 810* – 690	3410 Kb
	VPI 10426	4	1100 – 1010 – 770 – 680	3560 Kb
	VPI 11497A	4	1130 – 760* – 650	3300 Kb
	VPI 12486A	NA	/	/
	ATCC 33268 ^T	4	1170 – 770 – 750 – 670	3360 Kb
	ATCC 25539 ^T	4	1100 – 790 – 730 – 650	3270 Kb
B	AIP 249.98	NA	/	/
	AIP 64.01	4	2300 – 1250 – 980 – 830	5360 Kb
	LBN 292	4	2300 – 1250 – 1060 – 780	5390 Kb
	LBN 295	4	2400 – 1350 – 1050 – 950	5750 Kb
	IP Prévot 3583	4	2300 – 1300 – 1040 – 760	5400 Kb
?	LBN 291	5-6 ?	1300 – 1100 – 930 – 780* [?] – 680	4790-5570 Kb
Autres	AIP 285.00	4	2000 – 900 – 750 – 710	4360 Kb
	LBN 299	4	2160 – 780 – 580 – 550	4070 Kb
	DSM 6911 ^T	2?	2200? – 1600?	3800? Kb
	DSM 9508 ^T	4	740 – 650 – 560 – 460	2410 Kb
	DSM 10521 ^T	4	1400 – 1050 – 730 – 500	3680Kb
	DSM 16624 ^T	4	900 – 620 – 530 – 400	2450 Kb
	DSM 13106 ^T	4	1650 – 790 – 650 – 470	3560 Kb
	DSM 12858 ^T	9 ?	2300 – 900 – 800 – 680 – 580 – 450 – 290 – <225	> 6220 Kb

* bandes contenant deux fragments de taille identique.

** taille moyenne estimée à partir d'au moins deux profils de migration.

Aucun génome complet n'étant disponible pour les espèces étudiées, les tailles des génomes ont donc été estimées en calculant les tailles des différents fragments obtenus après digestion par *I-CeuI*. Ces données ont apporté des éléments supplémentaires en faveur de la différenciation des souches cliniques en deux groupes. En effet, les membres du groupe A possédaient toutes un génome d'une taille approximative se situant aux alentours de 3400 Kb. Les membres du groupe B présentaient un génome ayant une taille approximative plus importante se situant aux alentours de 5500 Kb.

En ce qui concerne les souches pour lesquelles nous n'avons obtenu aucun profil (AIP 249.98, AIP 30.02, AIP 488.98 et VPI 12486A), il est possible qu'elles aient été soit dégradées par une DNase, soit mal extraites par le protocole utilisé. Nous avons tenté de tester ces deux hypothèses en rajoutant de la thiourée (qui inhibe les DNases) et en faisant varier le protocole de lyse, sans succès pour ces quatre souches.

2. Organisation des opérons *rrn* par Southern blot

Après hybridation des fragments I-*CeuI* séparés en ECP avec la sonde correspondant à l'ADNr 16S de *C. hastiforme* 33268^T, la révélation de la membrane nous a permis d'observer trois signaux pour *T. praeacuta* 25539^T et *C. hastiforme* 33268^T et deux signaux pour *Tissierella* sp. LBN 295 (Figure 38).

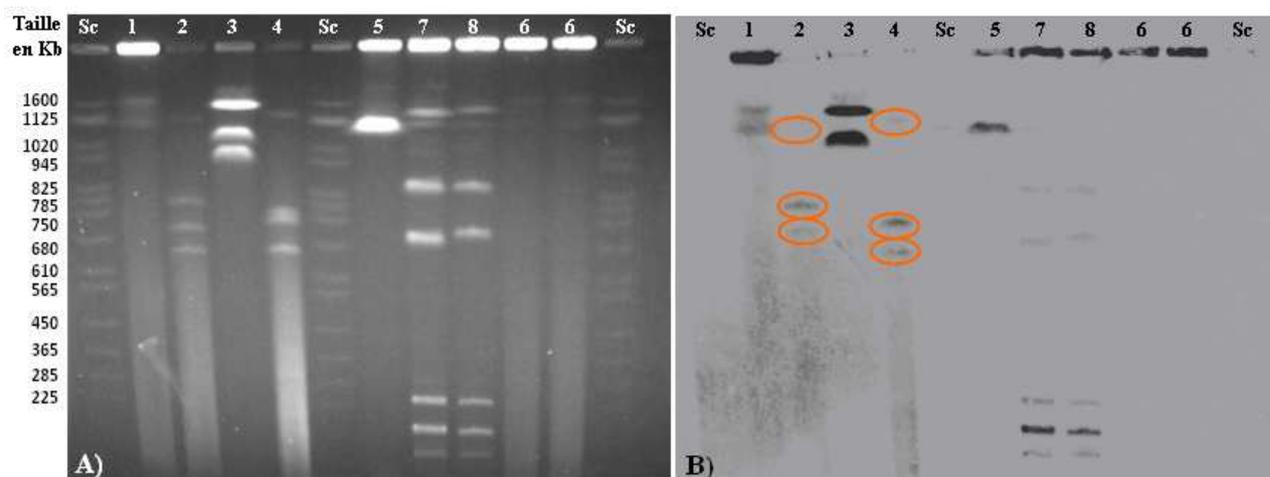


Figure 38. Photographies de la migration électrophorétique en champ pulsé après digestion par I-*CeuI* (A) et de l'hybridation du gel avec une sonde ciblant l'ADNr 16S (B).

Sc, chromosomes de *Saccharomyces cerevisiae* servant de marqueur de taille ; **1.** *T. creatinophila* DSM 6911^T ; **2.** *T. praeacuta* ATCC 25539^T ; **3.** *Tissierella* sp. LBN 295 ; **4.** *C. hastiforme* ATCC 33268^T ; **5.** *C. orbiscindens* DSM 6740^T ; **6.** *C. perfringens* 13124^T ; **7.** *C. difficile* CD33 ; **8.** *C. difficile* CD34.

La différence d'intensité des hybridations est liée à la différence de quantité d'ADN qui est également visible après coloration du gel au bromure d'éthidium, et ce malgré la calibration des plugs à une DO de 1.99. Ce phénomène pourrait s'expliquer par une différence au niveau de la lyse bactérienne pouvant être liée à la variation quantitative des constituants du muropeptide de la souche LBN 295 par rapport aux deux souches types. Il est intéressant de noter une hybridation croisée entre la sonde d'ADNr 16S de *C. hastiforme* et l'ADNr 16S

d'espèces génétiquement éloignées. Le gène *rrs* de *C. hastiforme* 33268^T (n° d'accension GQ461814) partage 93.9% d'identité avec celui de *T. creatinophila* DSM 6911^T (n° d'accension GQ461823), 80.0% avec celui de *C. orbiscindens* DSM 6740^T (n° d'accension Y18187) et 82.6% avec celui de *C. difficile* 630 (n° d'accension NC_009089).

Un exemple d'organisation hypothétique de ces opérons ribosomiques les uns par rapport aux autres sur le chromosome bactérien des souches *C. hastiforme* 33268^T, *T. praeacuta* 25539^T et *Tissierella* sp. LBN 295 est schématisé dans la Figure 39. Les fragments n'hybridant pas la sonde 16S sont obligatoirement en sens inverse et contiennent la partie C-terminale de l'opéron. Si tous les fragments sont hybridés, les opérons ribosomiques sont tous orientés dans le même sens sur le chromosome. Si seulement certains sont hybridés, il faut tester les différentes possibilités d'orientation des opérons pouvant expliquer ces hybridations.

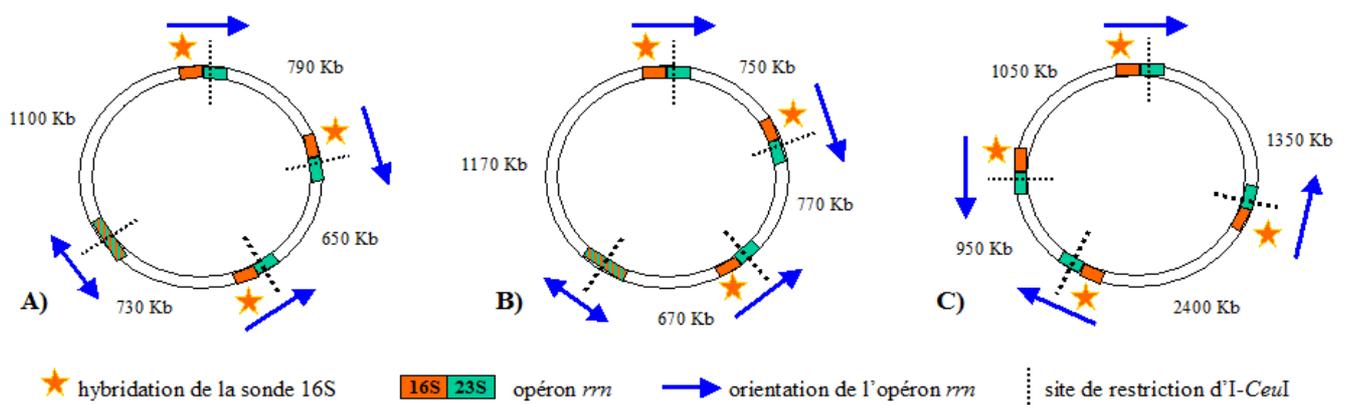


Figure 39. Exemples de cartes génomiques hypothétiques schématisant le nombre et l'orientation des opérons *rrn* sur le chromosome après digestion par I-CeuI.
A) *T. praeacuta* 25539^T. **B)** *C. hastiforme* 33268^T. **C)** *Tissierella* sp. LBN 295.

Le squelette *rrn* confirme les résultats obtenus sur les profils I-CeuI et montrent une forte similitude entre les deux souches types qui est compatible avec leur appartenance à une même espèce. Le squelette *rrn* de la souche LBN 295 suggère qu'elle appartient probablement à une espèce différente.

V. PLACE DE *TISSIERELLA* AU SEIN DES DIFFERENTS NIVEAUX TAXONOMIQUES

1. Les séquences d'ADNr 16S et des gènes de ménage analysés

Dans le cadre de l'étude de la position taxonomique de *Tissierella praeacuta*, nous avons séquencé le gène de l'ARNr 16S ainsi que plusieurs gènes de ménage (*dnaK*, *cpn60*, *recA*, *rpoB*, *sodA*, *spo0A*, *tpi*). Malgré l'utilisation de protocoles différents et de multiples variations de mise au point, seuls les gènes codant la triosephosphate isomérase (*tpi*), la recombinaise A (*recA*) et le facteur d'initiation de la sporulation (*spo0A*) ont permis d'obtenir des séquences de qualité pour un nombre suffisamment important de souches. La suite des analyses n'a donc été effectuée que sur ces trois gènes. Les numéros d'accession sous lesquels les séquences obtenues ont été déposées dans la *GenBank* sont disponibles dans le tableau suivant.

Tableau 32. Numéros d'accession des séquences des gènes de l'ARNr 16S, de la triosephosphate isomérase, de la recombinaise A et du facteur d'initiation de la sporulation.

Espèce (identification génotypique)	N° de souche	N° d'accession			
		ADNr 16S	<i>spo0A</i>	<i>tpi</i>	<i>recA</i>
<i>T. praeacuta</i>	AIP 224.02	GQ461802	GQ470923	GQ470975	GQ470946
<i>Tissierella</i> sp.	AIP 249.98	GQ461815	ND	GQ470986	GQ470957
<i>Tissierella</i> sp.	AIP 285.00	GQ461816	GQ470934	GQ470987	GQ470958
<i>T. praeacuta</i>	AIP 30.02	GQ461803	GQ470925	GQ470976	GQ470947
<i>T. praeacuta</i>	AIP 310.01	GQ461804	GQ470926	GQ470977	GQ470948
<i>T. praeacuta</i>	AIP 443.98	GQ461805	GQ470927	GQ470978	GQ470949
<i>T. praeacuta</i>	AIP 488.98	GQ461806	GQ470928	GQ470979	GQ470950
<i>Tissierella</i> sp.	AIP 64.01	GQ461817	GQ470935	GQ470988	GQ470959
<i>T. praeacuta</i>	LBN 290	GQ461807	GQ470924	GQ470980	GQ470951
<i>Tissierella</i> sp.	LBN 291	GQ461818	GQ470936	GQ470989	GQ470960
<i>Tissierella</i> sp.	LBN 292	GQ461819	GQ470937	GQ470990	GQ470961
<i>T. praeacuta</i>	LBR 1	GQ461808	GQ470929	GQ470981	GQ470952
<i>Tissierella</i> sp.	LBN 299	GQ461820	ND	GQ470991	GQ470962
<i>Tissierella</i> sp.	LBN 295	GQ461821	GQ470938	GQ470992	GQ470963
<i>T. praeacuta</i>	LBN 296	GQ461809	GQ470930	GQ470982	GQ470953
<i>Tissierella</i> sp.	IP Prévot 3583	GQ461822	GQ470939	GQ470993	GQ470964

Espèce (identification génotypique)	N° de souche	N° d'accension			
		ADNr 16S	<i>spo0A</i>	<i>tpi</i>	<i>recA</i>
<i>T. praeacuta</i>	VPI 11497A	GQ461810	GQ470932	GQ470984	GQ470955
<i>T. praeacuta</i>	VPI 12486A	GQ461811	GQ470933	GQ470985	GQ470956
<i>T. praeacuta</i>	VPI 10426	GQ461813	GQ470931	GQ470983	GQ470954
<i>C. hastiforme</i>	ATCC 33268 ^T	GQ461814	GQ470921	GQ470973	GQ470944
<i>T. praeacuta</i>	ATCC 25539 ^T	GQ461812	GQ470922	GQ470974	GQ470945
<i>C. ultunense</i>	DSM 10521 ^T	GQ461825	ND	GQ470971	GQ470966
<i>T. creatinini</i>	DSM 9508 ^T	GQ461824	GQ470941	GQ470972	GQ470965
<i>T. creatinophila</i>	DSM 6911 ^T	GQ461823	GQ470940	ND	ND
<i>S. acetigenes</i>	DSM 13106 ^T	GQ461827	GQ470943	GQ470968	GQ470967
<i>S. saccharolytica</i>	DSM 12858 ^T	GQ461828	ND	GQ470969	ND
<i>T. ferriphilum</i>	DSM 16624 ^T	GQ461826	GQ470942	GQ470970	ND

ND; séquence non déterminée de par l'absence d'amplification du gène.

2. Stratégie de sélection des séquences à inclure dans les différents arbres

En visualisant la position taxonomique selon Hugenholtz proposée par l'application *Greengenes* (<http://greengenes.lbl.gov/cgi-bin/nph-search.cgi>) (67), l'espèce *Tissierella praeacuta* constitue une OTU, équivalent du taxon de rang le plus faible qui peut être attribué. Cette OTU se positionne dans un groupe actuellement inclassable situé au sein de la famille *Peptostreptococcaceae* selon Hugenholtz (Figure 40).

Hugenholtz Taxonomy	MIL	Bel	Accession	prokMSAname	Study
Bacteria	<input checked="" type="checkbox"/>				
Firmicutes	<input checked="" type="checkbox"/>				
Clostridia	<input checked="" type="checkbox"/>				
Peptostreptococcaceae	<input checked="" type="checkbox"/>				
Unclassified	<input checked="" type="checkbox"/>				
otu_1250	<input checked="" type="checkbox"/>				
14261	<input checked="" type="checkbox"/>		X80833.1	Tissierella praeacuta str. ATCC 25539	17370
14262	<input checked="" type="checkbox"/>		X80832.1	Tissierella praeacuta str. NCTC 11158	17370
14263	<input checked="" type="checkbox"/>		X80841.1	Tissierella praeacuta str. DSM 5675	17371
14264	<input checked="" type="checkbox"/>		X77848.1	Tissierella praeacuta str. DSM 5675	16725
Unclassified	<input type="checkbox"/>				
otu_2407	<input type="checkbox"/>				
321681	<input type="checkbox"/>		EU887816.1	Tissierella praeacuta str. SN5	35361

Figure 40. Résultat de la recherche de la position taxonomique de *T. praeacuta* proposé par *Greengenes* selon la classification de Hugenholtz.

Afin de répondre aux différentes questions posées quant à la position taxonomique du genre *Tissierella*, nous avons construit plusieurs bases de séquences ou librairies.

Dans un premier temps, nous nous sommes basés sur cette classification proposée par *Greengenes* pour sélectionner un ensemble de 128 souches appartenant à la famille *Peptostreptococcaceae* définie selon Hugenholtz. L'avantage de l'outil *Greengenes* est qu'il permet de travailler sur des séquences de plus de 1200 pb de bonne qualité pour lesquelles le risque de séquences chimères est quasiment exclu. Il nous permet également de récupérer les données dans un format facilement utilisable pour les alignements et donc la phylogénie. Nous avons choisi de travailler avec des séquences provenant à la fois de souches types, d'isolats non identifiés au rang de l'espèce mais également de clones bactériens, qu'ils soient humains, animaux ou environnementaux, afin de refléter au mieux la diversité actuelle. Parmi ces séquences, quatre d'entre elles correspondaient à l'OTU *T. praeacuta* (Figure 40) et six correspondaient aux espèces et genres apparentés (*T. creatinophila*, n=1; *C. ultunense*, n=1; *S. saccharolytica*, n=1; *Sporanaerobacter* spp., n=2; *Tepidimicrobium ferriphilum*, n=1). Cette librairie de 128 séquences, appelée PEPTOSTREPTOCOCCACEAE, nous a servi à analyser la place de l'espèce *T. praeacuta* au sein de ce clade.

Dans un deuxième temps, ces séquences ont été utilisées pour étudier la position hiérarchique de nos souches au sein des taxons de rangs supérieurs. Pour cela, nous avons sélectionné 49 d'entre elles (dont *T. praeacuta*, *T. creatinophila* et *S. saccharolytica*) que nous avons associées à 110 représentants du phylum *Firmicutes*. Cette librairie de 159 séquences, appelée FIRMICUTES, nous a servi à analyser la place de l'espèce *T. praeacuta* au sein de ce phylum.

Enfin, nous avons sélectionné les séquences d'ADNr 16S de 110 membres des *Firmicutes* (dont *S. saccharolytica*) auxquelles nous avons associé les séquences des souches *T. praeacuta* ATCC 25539^T, *T. praeacuta* AIP 224.02, *Tissierella* sp. LBN 291, *Tissierella* sp. LBN 295 et *Tissierella* sp. AIP 285.00. Ces dernières ont été choisies comme représentatives de la diversité génétique de l'ensemble de nos isolats. Cette librairie, appelée PHYLA, a été complétée par 136 séquences représentant sept autres phyla du domaine *Bacteria* et cet ensemble de 251 séquences a été utilisé pour construire un arbre montrant les relations phylogénétiques de *Tissierella* spp. avec ces différents phyla.

Pour l'étude plus fine de la place taxonomique de *Tissierella praeacuta* au sein des taxons les plus proches, nous avons construit un arbre de 60 séquences sélectionnées parmi les 100 séquences les plus proches de la souche type de *T. praeacuta* (X80841) après une analyse par le logiciel Blast de la *GenBank* (NCBI). Pour enracer cet arbre, une séquence choisie hors du groupe d'étude a été utilisée, *Anaerococcus prevotii* (AF542232).

Enfin, les séquences d'ADNr 16S des souches cliniques, de *T. praeacuta* ATCC 25539^T, de *C. hastiforme* ATCC 33268^T, de *T. creatinophila* DSM 6911^T, de *T. creatinini* DSM 9508^T, et des souches types des quatre autres genres apparentés (*C. ultunense*, *S. saccharolytica*, *S. acetigenes* et *T. ferriphilum*) ont été déterminées au laboratoire. Elles ont été utilisées pour construire un arbre qui nous a permis d'étudier les relations évolutives de nos souches cliniques parmi ces différentes espèces.

Un récapitulatif de ces bibliothèques est présenté dans le Tableau 33 et les caractéristiques des 453 séquences constituant les différentes bibliothèques utilisées dans cette étude sont disponibles en **Annexe B**.

Tableau 33. Récapitulatif des principales caractéristiques des bibliothèques utilisées dans cette étude phylogénétique

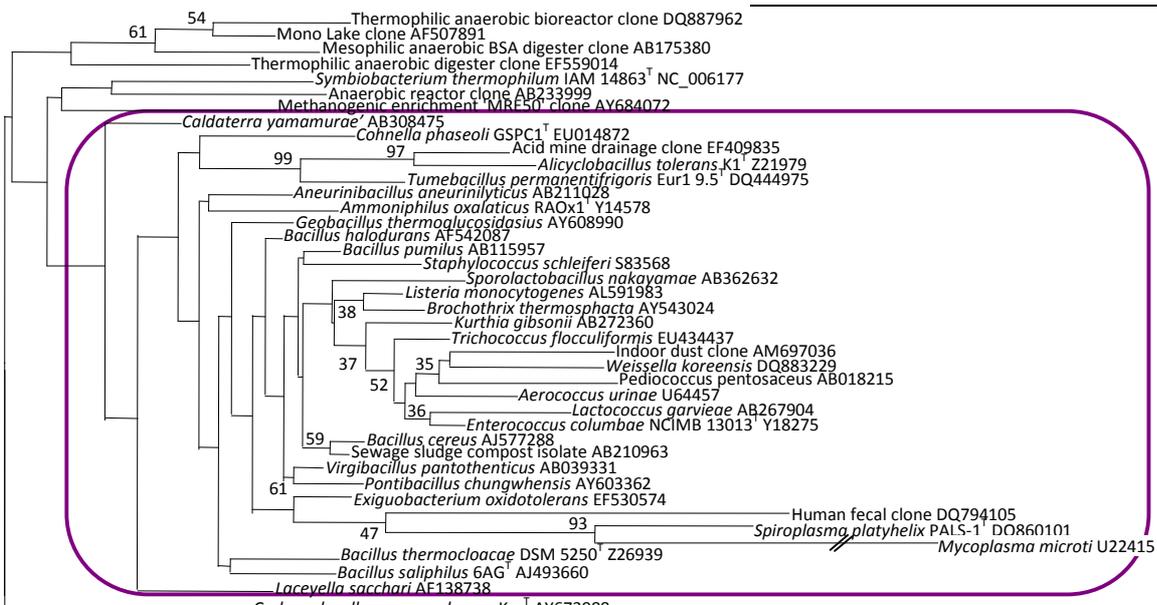
Nom de la bibliothèque	Nombre de séquences				
	Total	issues des bases de données		issues du séquençage	
		<i>Tissierella</i> spp.	genres apparentés	<i>Tissierella</i> spp.	genres apparentés
PHYLA	251	0	1	5	0
FIRMICUTES	159	2	1	0	0
PEPTOSTREPTOCOCCACEAE	128	5	5	0	0
TISSIERELLA SP.	61	7	7	0	0
TISSIERELLA PRAEACUTA	27	0	0	23	4

3. Comment se situe *T. praeacuta* par rapport aux taxons de haut niveau ?

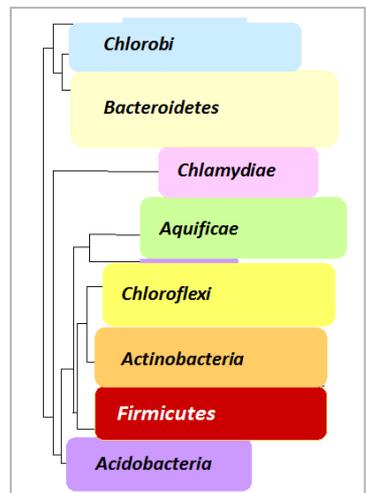
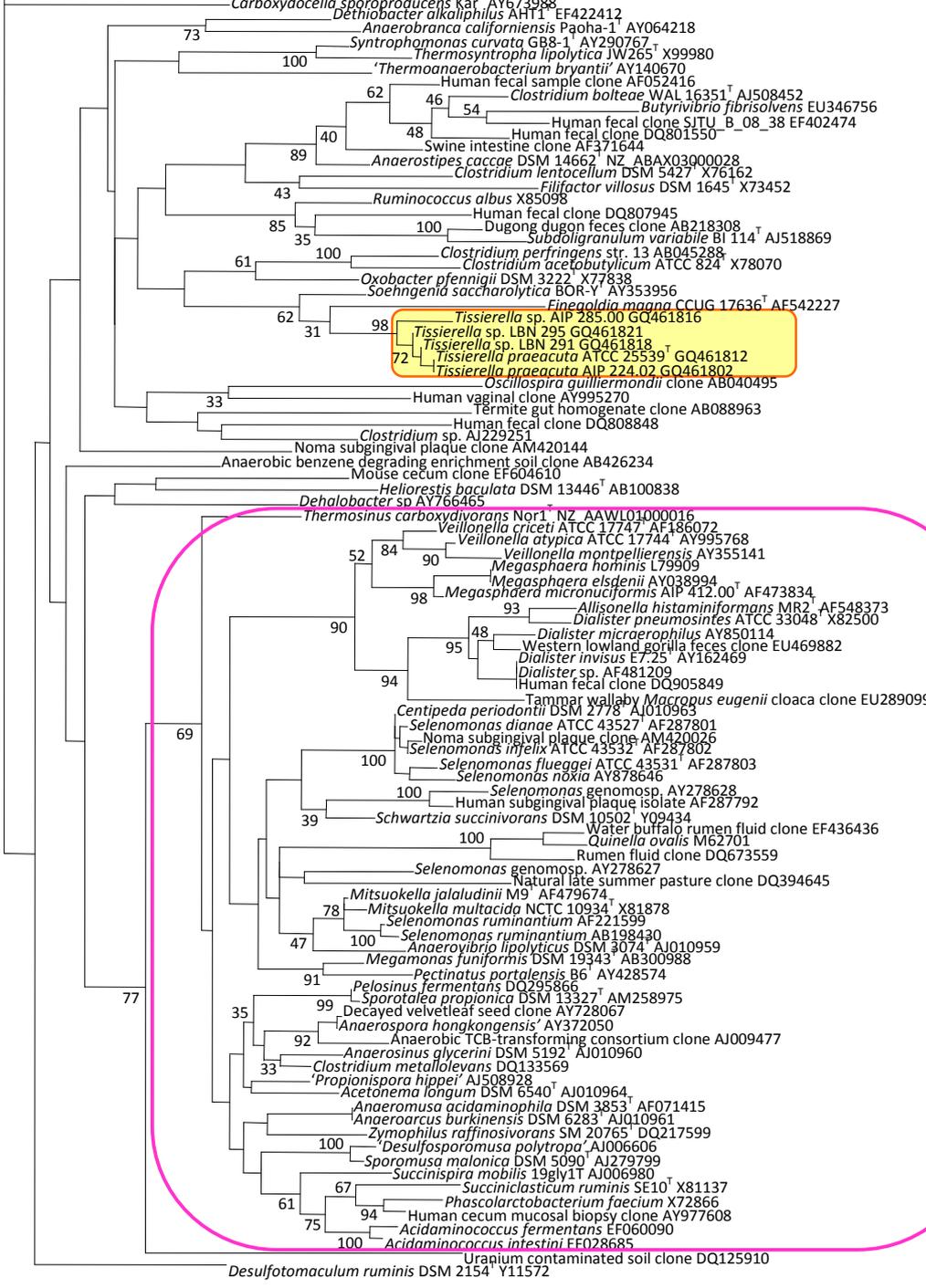
Afin d'étudier la position taxonomique de notre groupe de souches au sein des taxons de haut rang du domaine *Bacteria*, nous avons confronté les séquences de cinq d'entre elles à 246 séquences de différents phyla bactériens. L'arbre phylogénétique montrant les relations évolutives entre ces séquences est représenté par la Figure 41. Pour la construction de cet arbre, le nettoyage par le logiciel Gblocks n'a pas été retenu car la perte d'informations était trop importante.



B)



Bacilli



Negativicutes

0.1

Figure 41. Arbre phylogénétique montrant les relations évolutives entre cinq souches de *Tissierella* spp. et d'autres représentants des *Firmicutes* et d'autres phyla.

Cet arbre a été généré par ML à partir de séquences partielles d'ADNr 16S (1013 nucléotides). Un premier arbre est présenté dans sa globalité sans détailler les *Firmicutes* (A). Le sous-arbre (B) correspondant aux séquences des *Firmicutes* montre les relations entre les classes *Bacilli* (violet), *Negativicutes* (rose) et *Clostridia* (arbre global schématisé dans l'encadré gris). Les valeurs de bootstrap (pour 100 ré-échantillonnages effectués) sont indiquées au niveau des nœuds majeurs. Les échelles représentent dix substitutions pour 100 nucléotides. Les correspondances des n° d'accession sont disponibles en **Annexe B**.

Les membres des différents phyla bactériens forment des groupes monophylétiques avec, lorsqu'il s'agit de phyla bien définis comme *Aquificae*, *Chlamydiae* ou *Chloroflexi*, des branchements indépendants supportés par de bonnes valeurs de bootstrap. Cet arbre nous a donc permis de détecter les groupes au rang du phylum. Le phylum *Chlorobi* paraît moins clairement monophylétique et semble relié au phylum *Bacteroidetes*. Cette observation concorde avec les données taxonomiques actuelles puisque ce phylum est actuellement décrit sous la forme d'un groupe *Chlorobi-Bacteroidetes-Fibrobacteres* et la position taxonomique ainsi que les liens de parenté de ces trois phyla restent à clarifier. La séquence d'un clone bactérien de biofilm acide (DQ499315) apparaît clairement à l'extérieur du phylum *Actinobacteria* dans lequel elle était classée (selon *Greengenes*) et semble soit être reliée au phylum *Aquificae*, soit former un nouveau phylum non encore décrit. Il est intéressant de souligner que la base de données *NCBI Taxonomy Browser* ne classe cette séquence dans aucun des phyla décrits. La position taxonomique de cette souche ainsi que son appartenance au phylum *Actinobacteria* semblent donc incertaines. Les faibles valeurs de bootstrap observées pour certains branchements profonds montrent le manque de significativité statistique décrits pour l'analyse des taxons de haut niveau (158, 173).

L'ensemble des *Firmicutes* forme un groupe homogène, soutenu par une valeur de bootstrap moyenne (52%), pouvant refléter les problèmes actuels de classification au sein de ce groupe. En effet, les classes robustes *Bacilli* et *Negativicutes* forment des clades monophylétiques robustes alors que les membres de la classe *Clostridia* sont éparpillés à l'intérieur du phylum. Comme précédemment décrit, bien qu'ils aient été renvoyés dans leur phylum d'origine, les *Tenericutes*, les mycoplasmes (*Mycoplasma microti* U22415 et *Spiroplasma platyhelix* DQ860101) branchent en plein milieu des *Bacilli*. Notre groupe de cinq souches de *Tissierella* spp. (*T. praeacuta* ATCC 25539^T, *T. praeacuta* AIP 224.02, *Tissierella* sp. LBN 291,

Tissierella sp. LBN 295, *Tissierella* sp. AIP 285.00) forme quant à lui un groupe homogène et robuste soutenu par une forte valeur de bootstrap au sein du phylum *Firmicutes* parmi d'autres membres des *Clostridia*.

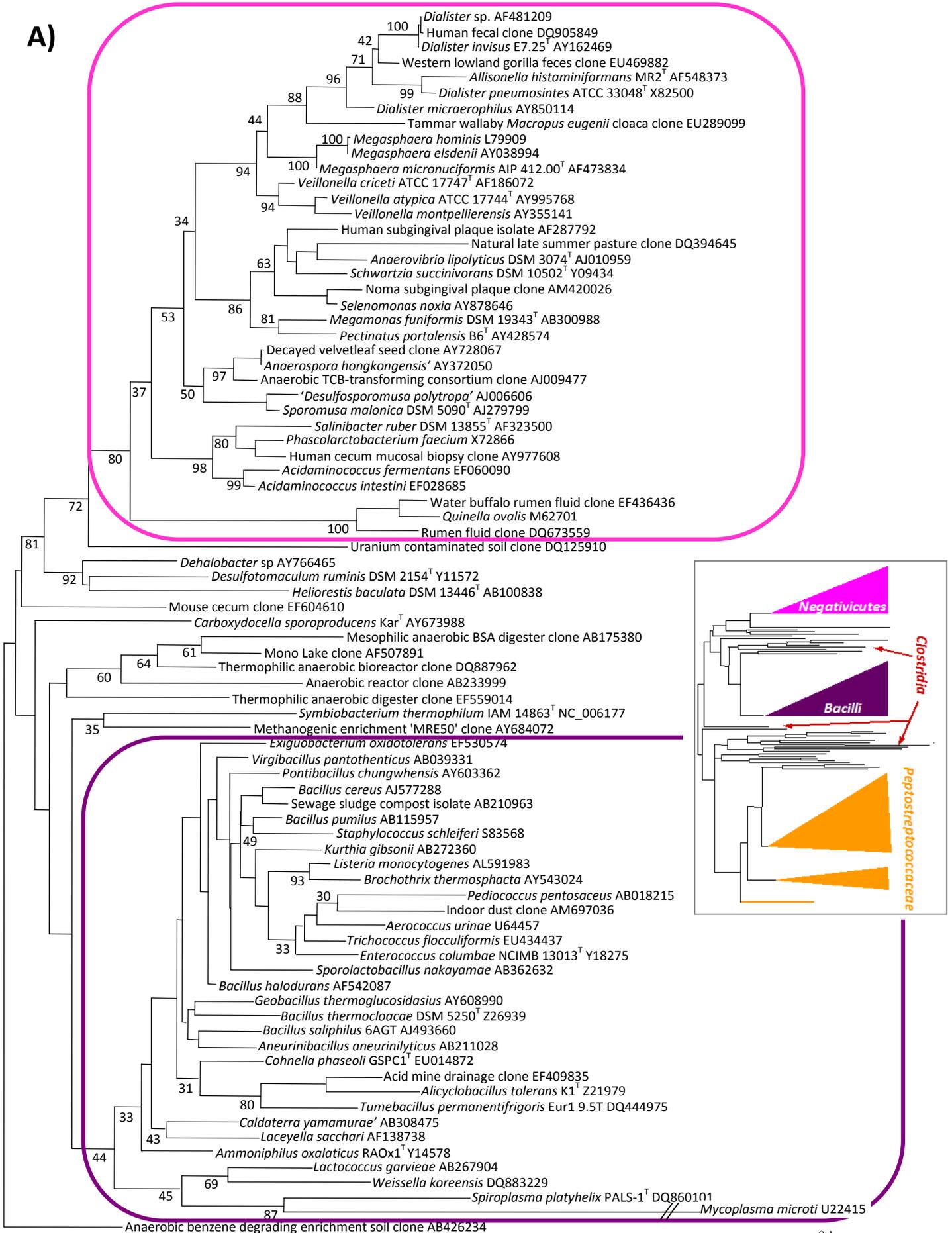
Nos souches appartiennent donc bien au phylum *Firmicutes* mais quelle position y occupent-elles ?

4. Comment se situe *T. praeacuta* au sein des *Firmicutes* ?

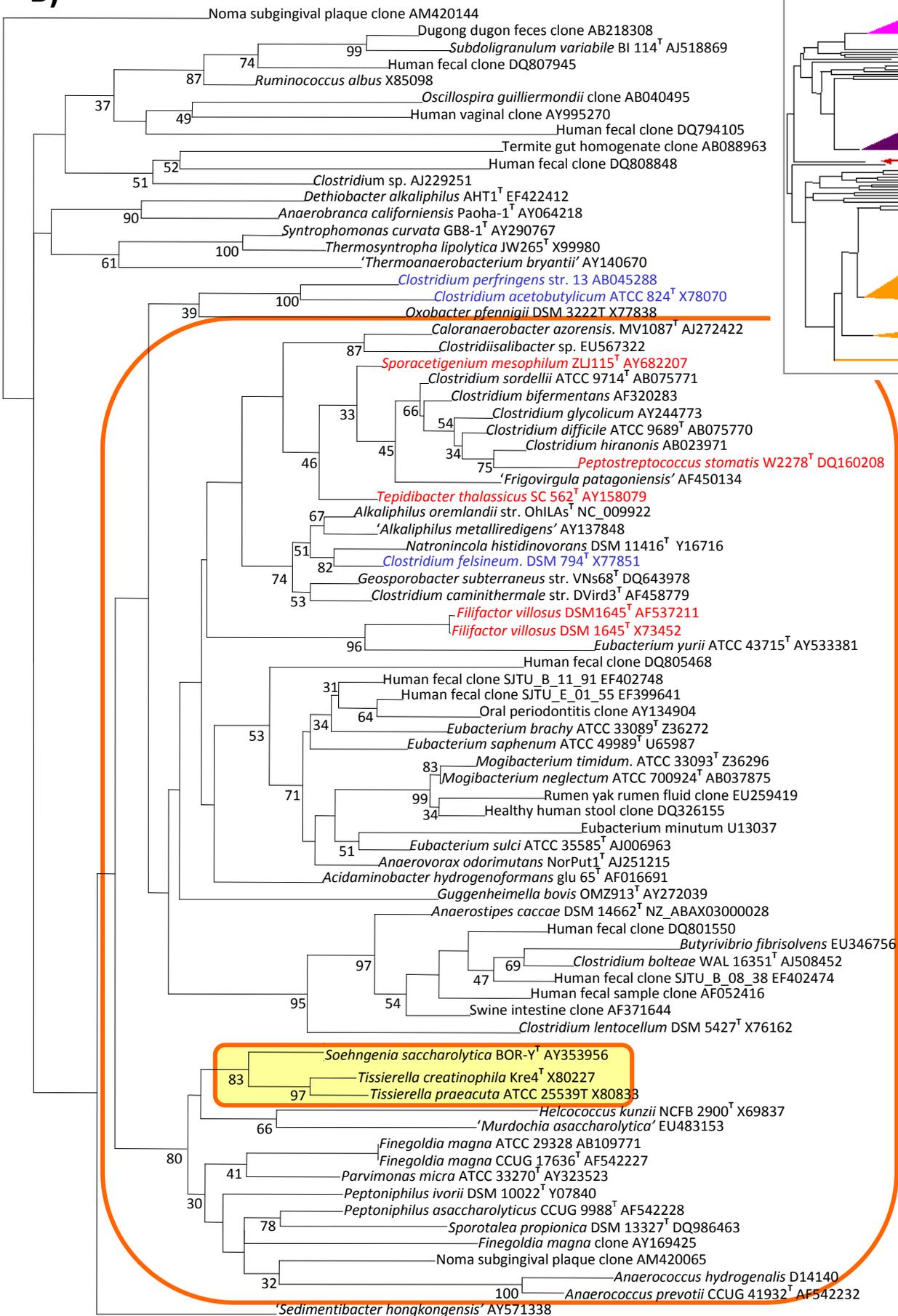
Afin de répondre à cette question, nous avons comparé la séquence d'ADNr 16S de la souche *T. praeacuta* ATCC 25539^T (X80833) à 159 séquences de membres du phylum *Firmicutes*. L'arbre phylogénétique montrant les relations évolutives entre ces séquences est représenté par la Figure 42.

Pour la construction de cet arbre, le nettoyage par le logiciel Gblocks n'a pas été retenu car la perte d'informations était trop importante.

A)



B)



0.05

Figure 42. Arbre phylogénétique montrant les relations évolutives entre la souche type de *T. praeacuta* et d'autres représentants des *Firmicutes*.

Cet arbre a été généré par ML à partir de séquences partielles d'ADNr 16S (1165 nucléotides). Il est représenté sous la forme de deux sous-arbres **A** et **B**. L'arbre global est schématisé dans l'encadré gris au niveau de chaque sous-arbre. La classe *Bacilli* est indiquée en violet. La classe *Negativicutes* est indiquée en rose. Les représentants de la famille *Peptostreptococcaceae* sont représentés encadrés en orange selon la classification de Hugenholtz (67) ou indiqués en rouge selon la classification proposée par Ludwig (216). Les représentants du genre *Clostridium sensu stricto* selon la classification de Ludwig sont indiqués en bleu. Les valeurs de bootstrap (pour 100 ré-échantillonnages effectués) sont indiquées au niveau des nœuds majeurs. Les échelles représentent cinq (**B**) et 10 (**A**) substitutions pour 100 nucléotides. Les correspondances des n° d'accession sont disponibles en **Annexe B**.

Les classes *Bacilli* et *Negativicutes* forment à nouveau des groupes homogènes avec des branchements profonds dans l'arbre. Comme décrit par Ludwig dans la dernière version outline du *Bergey's Manual*, la classe *Bacilli* ne pose pas de problème de classification et seules quelques restructurations mineures sont proposées (216). Mise à part l'exclusion des *Mollicutes* et la proposition de créer la classe des *Erysipelotrichi*, les membres de cette classe forment un groupe clair et robuste. Les bactéries ayant une paroi de type Gram négatif regroupées dans la nouvelle classe *Negativicutes* forment également un clade robuste mais leur niveau hiérarchique a été élevé du rang de la famille (anciennement *Veillonellaceae*) au rang de classe (223).

Tous les autres membres du phylum devraient donc appartenir à la classe *Clostridia* or ils ne forment pas un groupe homogène. En effet, on ne peut les regrouper sous un ancêtre commun à part si l'on remonte au rang du phylum. Il s'agit donc d'une classe polyphylétique.

Au sein de cette classe, *T. praeacuta* ainsi que *T. creatinophila* et *S. saccharolytica* appartiennent à un sous-groupe homogène constitué de cocci à Gram positif anaérobies stricts regroupant les genres *Anaerococcus*, *Fingoldia*, *Parvimonas* et *Peptoniphilus* ainsi que le genre aérobies *Helococcus*. Ce sous-groupe semble appartenir à un clade plus important constitué majoritairement des membres de la famille *Peptostreptococcaceae* selon Hugenholtz. Si l'on se fie à la classification de Ludwig (216), la famille *Peptostreptococcaceae sensu stricto* n'est composée que de quatre genres principaux (représentés en rouge dans la Figure 42). Par ailleurs, ce clade indépendant et monophylétique, sans relation avec les classes *Bacilli* et *Negativicutes*, présente un branchement au sein des *Firmicutes* de même niveau que ces deux classes.

Ces données suggèrent que le clade *Peptostreptococcaceae* défini par Hugenholtz et contenant notre groupe d'intérêt devrait être élevé au rang de classe bactérienne. Nous proposons donc une émendation de la famille des *Peptostreptococcaceae* qui devra être proposée à l'*International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* et validée par la commission judiciaire de l'ICSP. Une proposition logique serait de proposer d'organiser cette nouvelle classe autour de l'espèce type *Peptostreptococcus anaerobius*, du genre type *Peptostreptococcus*, de la famille *Peptostreptococcaceae*, de l'ordre *Peptostreptococcales* ord. nov. et de la classe *Peptostreptococci* classis nov. Cependant, cette nomenclature soulignant le caractère morphologique "cocci" de ses membres, elle ne reflèterait pas la diversité de cette nouvelle classe qui contient également des bacilles, notamment les bactéries de notre groupe d'intérêt. Une nomenclature plus représentative de ce clade est en cours d'étude.

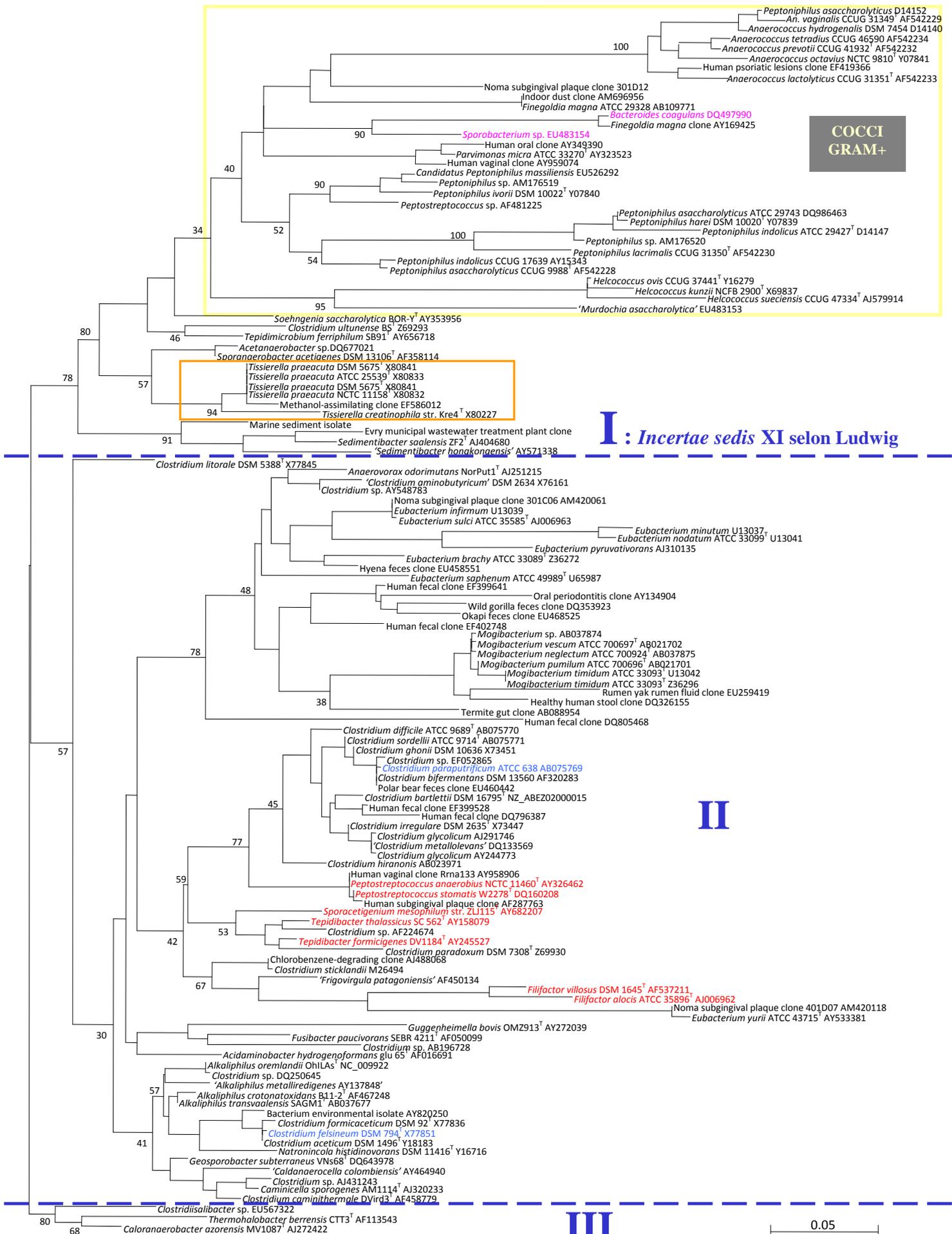
Il est donc nécessaire d'étudier plus précisément cette nouvelle classe hypothétique, plus particulièrement en ce qui concerne la position de nos souches cliniques au sein de ce clade.

5. Comment se situe *T. praeacuta* au sein des *Peptostreptococcaceae* ?

Dans ce chapitre nous considèrerons les *Peptostreptococcaceae* non pas au sens de la famille actuellement validée par l'ICSP mais au sens de la famille telle qu'elle est proposée par Hugenholtz, qui se rapproche plus de la nouvelle classe que nous proposons de créer ci-dessus (<http://greengenes.lbl.gov>).

Afin d'étudier la position taxonomique de notre groupe de souches au sein de cette nouvelle classe, nous avons confronté les séquences d'ADNr 16S déposées dans les bases de données de dix souches de *Tissierella* spp. et apparentés (dont quatre *T. praeacuta*) à 118 séquences de représentants des *Peptostreptococcaceae* selon la classification de Hugenholtz. L'arbre phylogénétique montrant les relations évolutives entre ces séquences est représenté par la Figure 43.

Résultats Partie I



**COCCI
GRAM+**

I : Incertae sedis XI selon Ludwig

II

III

Figure 43. Arbre phylogénétique montrant les relations évolutives entre quatre souches de *T. praeacuta* et d'autres représentants du clade *Peptostreptococcaceae* selon Hugenholtz. Cet arbre a été généré par ML à partir de séquences partielles d'ADNr 16S. Le groupe I est constitué des représentants de la famille *Incertae sedis* XI selon la classification proposée par Ludwig (216). Au sein du groupe des cocci à Gram positif (encadré en jaune), les bactéries bacilliformes sont représentées en rose. Les représentants de la famille *Peptostreptococcaceae sensu stricto* et du genre *Clostridium sensu stricto* selon la classification proposée par Ludwig sont indiqués en rouge et en bleu, respectivement. Les valeurs de bootstrap (pour 100 ré-échantillonnages effectués) sont indiquées au niveau des nœuds majeurs. L'échelle représente cinq substitutions pour 100 nucléotides. Les correspondances des n° d'accèsion sont disponibles en **Annexe B**.

Cette nouvelle classe semble se diviser en trois groupes distincts.

Le groupe I forme un clade monophylétique robuste comprenant l'ensemble des genres que Ludwig propose de regrouper dans la famille *Incertae Sedis* XI. Cet ensemble peut se subdiviser en trois sous-groupes : le groupe des cocci à Gram positif, le groupe contenant les genres *Tissierella* et apparentés et le groupe des *Sedimentibacter* spp.

Ce dernier contient l'espèce environnementale *Sedimentibacter saalensis* et l'espèce publiée mais non validée *Sedimentibacter hongkongensis* qui a été impliquée dans une bactériémie chez un patient ayant un cancer du colon (371). Il semble former un clade à part, ce qui concorde avec l'observation de Ludwig qui le place dans cette famille tout en signalant qu'il semble plus être apparenté à ce taxon qu'en faire partie (216).

Le sous-groupe constitué de cocci à Gram positif aérobies (genre *Helcococcus*) et anaérobies stricts (genres *Anaerococcus*, *Finegoldia*, *Parvimonas* et *Peptoniphilus*) est le même que celui observé dans l'arbre précédent des *Firmicutes*. Il faut cependant noter la présence de deux séquences correspondant à des bacilles au milieu de ces coques : *Bacteroides coagulans* (DQ497990) et *Sporobacterium* sp. (EU483154). *Bacteroides coagulans* a été décrit par Eggerth et coll. en 1933 (93) en tant que petit bacille ovoïde à Gram négatif, anaérobie strict, mesurant de 0.5 à 1 µm de long. Il s'agit donc plutôt d'un coccobacille. De plus, nous ne disposons dans les banques de données d'aucune séquence d'ADNr 16S de la souche type de cette espèce puisque la seule séquence existant pour un gène d'ARNr 16S complet est celle incluse dans notre librairie (DQ497990) dont on ne sait rien quant à l'origine de la souche. Les hypothèses que l'on peut donc émettre sont soit que la souche initiale décrite sur la base des caractères phénotypiques n'appartient en fait pas du tout au genre *Bacteroides* et qu'il pourrait s'agir d'un cocci à Gram positif anaérobie, soit que la séquence déposée n'a pas été déterminée sur la bonne souche. En ce qui concerne la séquence de *Sporobacterium* sp., la

seule espèce validée dans ce genre est *S. olearium* pour laquelle les clichés de MET ne font aucun doute quant à sa morphologie bacilliforme (230). Cependant, si l'on se penche sur la séquence de la souche clinique de *Sporobacterium* sp. (EU483154) incluse dans notre librairie, elle ne présente que 81.3% d'homologie avec celle de *S. olearium* (AF116854). Selon la définition du genre bactérien, cette souche clinique n'appartient donc pas au genre *Sporobacterium* et pourrait tout à fait être un cocci à Gram positif. Par ailleurs, le fait de retrouver deux séquences de *Fingoldia magna* éloignées dans l'arbre s'explique par le fait qu'une des séquences provient d'un clone (AY169425) et a été mal annotée puisqu'elle ne partage que 85.5% d'identité avec la séquence de la souche ATCC 29328 (AB109771). Enfin, il en est de même pour la souche de *Peptoniphilus asaccharolyticus* (D14152) qui se retrouve au milieu du genre *Anaerococcus*. Cette séquence, également mal annotée, ne partage que 81.9% d'identité avec celle de la souche type *P. asaccharolyticus* CCUG 9988^T (AF542228).

Un vaste groupe (groupe II) rassemble des bactéries appartenant majoritairement à la classe *Clostridia* dont la phylogénie est peu claire et peu robuste. Il est constitué de nombreux genres paraphylétiques tels *Clostridium* et *Eubacterium* et leurs branchements sont souvent supportés par de faibles valeurs de bootstrap. De nombreux travaux de reclassification restent donc à effectuer au sein de ce groupe afin de déterminer les différents taxons et leur nomenclature correcte. Ce travail a été amorcé par Ludwig dans la dernière version du *Bergey's Manual* (216) qui regroupe les genres *Acidaminobacter*, *Guggenheimella* et *Fusibacter* dans la famille *Incertae sedis* XII, et les genres *Anaerovorax* et *Mogibacterium* dans la famille *Incertae sedis* XIII. Il est par ailleurs intéressant de noter que la séquence AB075769 ne correspond pas à l'espèce *Clostridium paraputrificum* comme cela était défini dans *Greengenes* mais à la souche type de *Clostridium bifermentans*, expliquant pourquoi une espèce appartenant au genre *Clostridium sensu stricto* se retrouvait classée au milieu des *Peptostreptococcaceae*.

Enfin, le groupe III, plus restreint, est formé par les genres *Clostridiisalibacter*, *Thermohalobacter* et *Caloranaerobacter* qui correspondent à des bactéries anaérobies thermophiles et halophiles de l'environnement (207). Ce groupe se retrouvait déjà distinct voire éloigné des autres membres des *Peptostreptococcaceae* dans la Figure 42 mais un nombre de séquences plus important serait nécessaire afin de déterminer de façon plus fine sa place au sein des *Firmicutes*.

Notre groupe d'intérêt et notamment l'espèce *T. praeacuta* appartiennent donc à un clade au sein d'une nouvelle famille de cette nouvelle classe. Une analyse plus fine est nécessaire pour déterminer de façon certaine si les sous-ensembles du groupe I constituent une seule et même famille comme le suggère Ludwig ou forment un clade de rang supérieur. Le clade formé par les genres *Tissierella* et *Sporanaerobacter* peut représenter soit un ordre, soit une famille. Dans ce cas, étant donné que ce clade branche au même niveau que le sous-ensemble formé par les cocci à Gram positif et celui contenant *Sedimentibacter* spp., ces trois nouvelles familles s'associeraient pour former un nouvel ordre.

Enfin, il est indispensable d'étudier les relations évolutives au sein des genres *Tissierella* et apparentés sur un nombre plus important de souches.

6. Comment se situe *T. praeacuta* au sein de ses plus proches voisins ?

Afin d'étudier la position taxonomique de *T. praeacuta* parmi les espèces et genres les plus proches, nous avons dans un premier temps construit un arbre en sélectionnant 59 séquences parmi les 99 plus proches de celle de la souche type de *T. praeacuta* (X80841) après une analyse par le logiciel Blast de la *GenBank*. Puis un deuxième arbre a été effectué afin de déterminer les relations évolutives de nos souches cliniques parmi les espèces et genres les plus proches. Les arbres montrant la phylogénie résultant de l'analyse de ces séquences sont représentés par les Figures 44 et 45.

La Figure 44 montre que les souches de *T. praeacuta* forment un clade monophylétique en association avec les deux autres espèces du genre *Tissierella* ainsi qu'avec *S. saccharolytica*. La Figure 45 présente le genre *Tissierella* comme étant monophylétique sans regroupement avec le genre *Soehngenia*. Cette dernière montre nettement la séparation des souches cliniques en deux groupes A et B. Comme décrit par Farrow et coll. (1995) et Bae et coll. (2004) (15, 102), les deux souches types ATCC 25539^T et ATCC 33268^T partagent 99.9% de leurs positions nucléotidiques (Tableau 34) et se situent dans le groupe A. Au sein de ce clade, l'ensemble des souches (n=13) présentent entre 99.9 et 100% d'identité de séquences. Ce groupe semble correspondre à celui regroupant les séquences X77848, X80832 et X80841 indiquées en orange dans la Figure 44. Le groupe B quant à lui regroupe cinq souches cliniques qui partagent 99.2 à 99.7% de leurs positions. Ce groupe semble correspondre à

celui regroupant les séquences EF202592, AF443595, EF586012 et EU887816 indiquées en bleues dans la Figure 44. En effet, ces séquences présentent respectivement 99.7, 99.0, 98.9 et 97.7% d'identité avec la séquence de *Tissierella* sp. LBN 295. Ces deux groupes sont bien distincts.

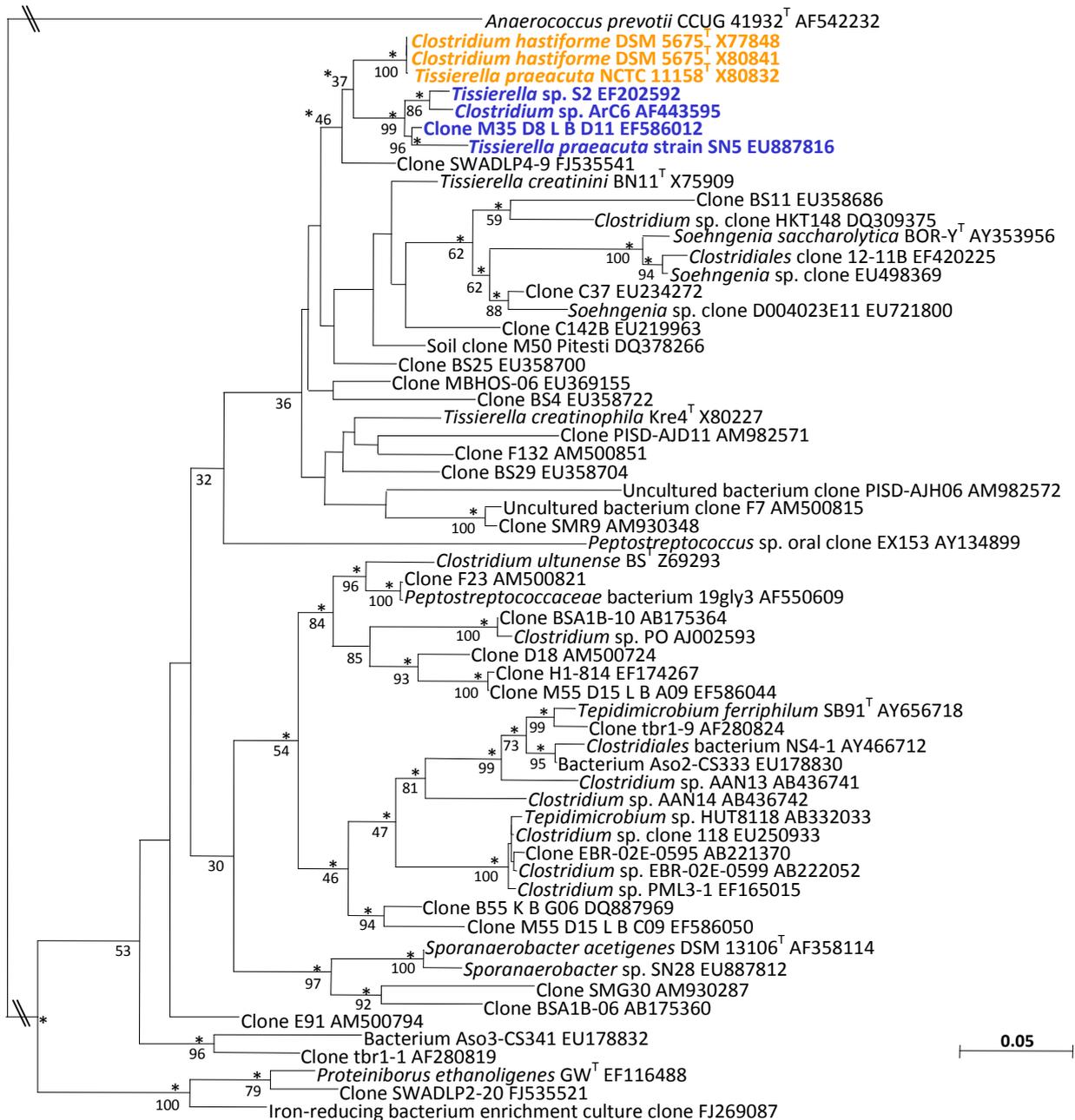


Figure 44. Arbre phylogénétique montrant les relations évolutives entre la séquence d'ADNr 16S de *T. praeacuta* DSM 5675^T (X80841), 59 des 100 séquences les plus proches phylogénétiquement et la séquence d'*Anaerococcus prevotii* (AF542232) qui sert à enracer l'arbre. Cet arbre a été généré par ML à partir de séquences partielles (1276 nucléotides) d'ADNr 16S. Les astérisques signalent les nœuds retrouvés en utilisant la méthode de Neighbor-Joining (F84). Les valeurs de bootstrap (pour 100 ré-échantillonnages effectués) sont indiquées au niveau des nœuds majeurs. L'échelle représente cinq substitutions pour 100 nucléotides. Les correspondances des n° d'accèsion sont disponibles en **Annexe B**.

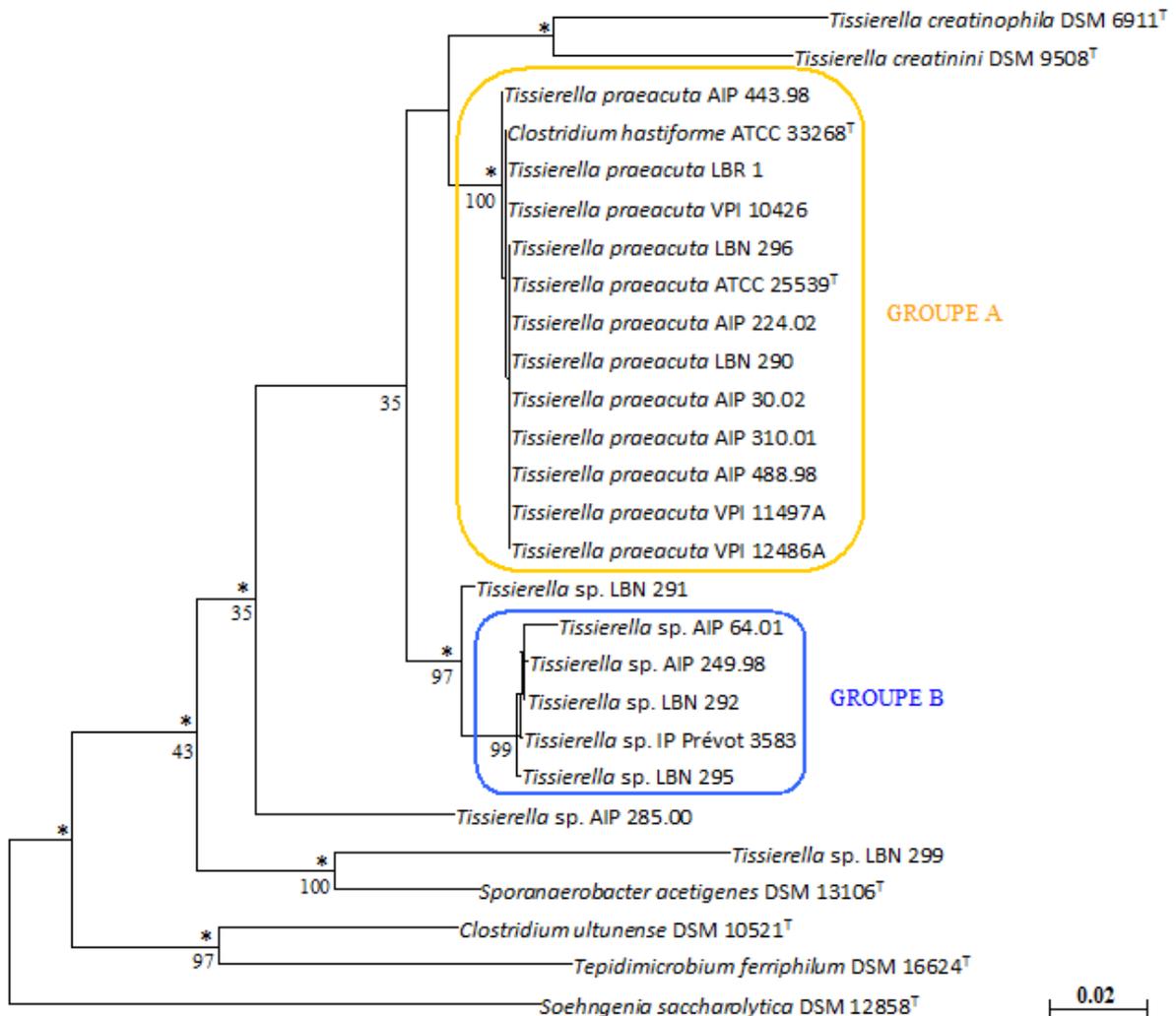


Figure 45. Arbre phylogénétique montrant les relations évolutives entre les 19 souches cliniques de cette étude, *T. praeacuta* ATCC 25539^T, *C. hastiforme* ATCC 33268^T, et les souches types de deux espèces et quatre genres apparentés.

Cet arbre a été généré par ML à partir de séquences partielles (1374 nucléotides) d'ADNr 16S. Les astérisques signalent les nœuds retrouvés en utilisant la méthode de Neighbor-Joining (F84). Les valeurs de bootstrap (pour 100 ré-échantillonnages effectués) sont indiquées au niveau des nœuds majeurs. L'échelle représente deux substitutions pour 100 nucléotides.

Ces observations confirment la division des souches cliniques de *Tissierella* spp. que nous avons présentée lors de l'étude préliminaire (Figure 28). Ces deux groupes phylogénétiques sont supportés par des valeurs de bootstrap élevées, quelle que soit la technique utilisée pour la construction des arbres. Le groupe A contenant les deux souches types de l'espèce *T. praeacuta*, nos résultats suggèrent que les membres du groupe B forment

vraisemblablement un nouveau taxon du rang de l'espèce et cette hypothèse sera confirmée dans le chapitre suivant.

La souche LBN 291 semble reliée au groupe B avec lequel elle partage 98.2 à 98.6% de ses positions alors qu'elle n'en partage que 97.3% avec le groupe A.

Un 2^{ème} clade, s'embranchant à un même niveau que le précédent dans la Figure 44, est constitué des souches de *T. ferriphilum*, *C. ultunense* et *S. acetigenes*. Les valeurs de bootstrap supportant les branchements de ces deux clades sont peu élevées. Les relations de ces différents groupes d'espèces sont donc peu claires et un nombre supérieur d'isolats et de séquences sont nécessaires pour clarifier la phylogénie de ces souches. En se basant sur la Figure 45, il est cependant possible d'affirmer que les souches cliniques LBN 299 et AIP 285.00 n'appartiennent ni à l'espèce *T. praeacuta*, ni à la nouvelle espèce (groupe B). Leur appartenance au genre *Tissierella* est également à discuter puisque les séquences d'ADNr 16S de ces espèces présentent respectivement de 88.5 à 90.9% et de 91.0 à 94.0% d'identité avec les différentes espèces du genre *Tissierella* (Tableau 34).

Enfin, un 3^{ème} clade de même rang taxonomique semble être formé par trois clones bactériens (AF280819, EU178832 et AM500794) alors que le groupe contenant la nouvelle espèce *Proteiniborus ethanologenes* semble se démarquer de l'ensemble des autres séquences (Figure 44).

Ces trois clades forment un ensemble qui pourrait correspondre à une nouvelle famille comme suggéré dans le paragraphe précédent en se basant sur la phylogénie de la classe '*Peptostreptococaceae*'. Les relations évolutives de ces souches doivent être étudiées plus en détail et plus particulièrement en ce qui concerne nos souches cliniques afin de répondre définitivement à la question suivante : est-ce que les groupes A et B constituent réellement des espèces distinctes ?

Tableau 34. Matrice de distance obtenue après alignement des séquences d'ADNr 16S des souches étudiées à l'aide du logiciel BioEdit.

Séquences d'ADNr 16S	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	
1- <i>C. hastiforme</i> ATCC 33268^T	1.000	0.999	0.999	0.963	0.936	0.999	0.999	0.999	0.999	0.973	0.999	0.964	1.000	0.968	0.898	0.965	1.000	0.999	0.999	0.966	0.999	0.936	0.905	0.941	0.907	0.922	0.909	
2- <i>T. praeacuta</i> ATCC 25539^T	---	1.000	1.000	0.963	0.936	1.000	1.000	1.000	0.999	0.973	1.000	0.964	0.999	0.968	0.898	0.965	0.999	1.000	1.000	0.966	1.000	0.937	0.904	0.941	0.908	0.922	0.910	
3- <i>T. praeacuta</i> AIP 224.02	---	---	1.000	0.963	0.936	1.000	1.000	1.000	0.999	0.973	1.000	0.964	0.999	0.968	0.898	0.965	0.999	1.000	1.000	0.966	1.000	0.937	0.904	0.941	0.908	0.922	0.910	
4- <i>Tissierella</i> sp. AIP 249.98	---	---	---	1.000	0.936	0.963	0.963	0.963	0.963	0.984	0.963	0.999	0.963	0.992	0.906	0.998	0.963	0.963	0.963	0.997	0.963	0.933	0.906	0.938	0.904	0.914	0.904	
5- <i>Tissierella</i> sp. AIP 285.00	---	---	---	---	1.000	0.936	0.936	0.936	0.936	0.941	0.936	0.937	0.936	0.935	0.905	0.938	0.936	0.936	0.936	0.938	0.936	0.910	0.913	0.917	0.906	0.924	0.888	
6- <i>T. praeacuta</i> LBN 290	---	---	---	---	---	1.000	1.000	1.000	0.999	0.973	1.000	0.964	0.999	0.968	0.898	0.965	0.999	1.000	1.000	0.966	1.000	0.937	0.904	0.941	0.908	0.922	0.910	
7- <i>T. praeacuta</i> AIP 30.02	---	---	---	---	---	---	1.000	1.000	0.999	0.973	1.000	0.964	0.999	0.968	0.898	0.965	0.999	1.000	1.000	0.966	1.000	0.937	0.904	0.941	0.908	0.922	0.910	
8- <i>T. praeacuta</i> AIP 310.01	---	---	---	---	---	---	---	1.000	0.999	0.973	1.000	0.964	0.999	0.968	0.898	0.965	0.999	1.000	1.000	0.966	1.000	0.937	0.904	0.941	0.908	0.922	0.910	
9- <i>T. praeacuta</i> AIP 443.98	---	---	---	---	---	---	---	---	1.000	0.973	0.999	0.964	0.999	0.968	0.898	0.965	0.999	0.999	0.999	0.966	0.999	0.936	0.904	0.942	0.907	0.923	0.909	
10- <i>Tissierella</i> sp. LBN 291	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.000	0.973	0.985	0.973	0.982	0.906	0.986	0.973	0.973	0.973	0.986	0.973	0.935	0.909	0.936	0.905	0.919	0.905	
11- <i>T. praeacuta</i> AIP 488.98	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.000	0.964	0.999	0.968	0.898	0.965	0.999	1.000	1.000	0.966	1.000	0.937	0.904	0.941	0.908	0.922	0.910	
12- <i>Tissierella</i> sp. LBN 292	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.000	0.964	0.993	0.907	0.999	0.964	0.964	0.964	0.997	0.964	0.934	0.906	0.939	0.905	0.914	0.904	
13- <i>T. praeacuta</i> LBR 1	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.000	0.968	0.898	0.965	1.000	0.999	0.999	0.966	0.999	0.936	0.905	0.941	0.907	0.922	0.909	
14- <i>Tissierella</i> sp. AIP 64.01	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.000	0.906	0.992	0.968	0.968	0.968	0.991	0.968	0.933	0.907	0.935	0.903	0.914	0.904	
15- <i>Tissierella</i> sp. LBN 299	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.000	0.908	0.898	0.898	0.898	0.909	0.898	0.885	0.879	0.895	0.874	0.920	0.872	
16- <i>Tissierella</i> sp. Prévot 3583	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.000	0.965	0.965	0.965	0.998	0.965	0.933	0.906	0.940	0.905	0.915	0.904	
17- <i>T. praeacuta</i> VPI 10426	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.000	0.999	0.999	0.966	0.999	0.936	0.905	0.941	0.907	0.922	0.909	
18- <i>T. praeacuta</i> VPI 11497A	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.000	1.000	0.966	1.000	0.937	0.904	0.941	0.908	0.922	0.910	
19- <i>T. praeacuta</i> VPI 12486A	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.000	0.966	1.000	0.937	0.904	0.941	0.908	0.922	0.910	
20- <i>Tissierella</i> sp. LBN 295	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.000	0.966	0.934	0.906	0.941	0.905	0.916	0.904
21- <i>T. praeacuta</i> LBN 296	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.000	0.937	0.904	0.941	0.908	0.922	0.910
22- <i>T. creatinophila</i> DSM 6911^T	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.000	0.893	0.933	0.892	0.902	0.906
23- <i>C. ultunense</i> DSM 10521^T	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.000	0.892	0.919	0.909	0.894
24- <i>T. creatinini</i> DSM 9508^T	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.000	0.894	0.906	0.920
25- <i>T. ferriphilum</i> DSM 16624^T	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.000	0.899	0.892
26- <i>S. acetigenes</i> DSM 13106^T	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.000	0.894
27- <i>S. saccharolytica</i> DSM 12858^T	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.000

7. Gènes de ménage et approche multilocus

a) Souches cliniques et gènes de ménage choisis

Parmi les huit gènes de ménage testés sur l'ensemble de nos souches (n=27), seuls trois d'entre eux ont permis d'obtenir des séquences satisfaisantes en termes de taille et de qualité pour la majorité des souches. Il s'agit du gène de la recombinaison A (*recA*), de celui de la triosephosphate isomérase (*tpi*) et du gène codant le facteur d'initiation de la sporulation (*spo0A*). Des amplicons d'environ 350 pb, 500 pb et 300 pb ont été obtenus pour *recA*, *tpi* et *spo0A*, respectivement (Figure 46).

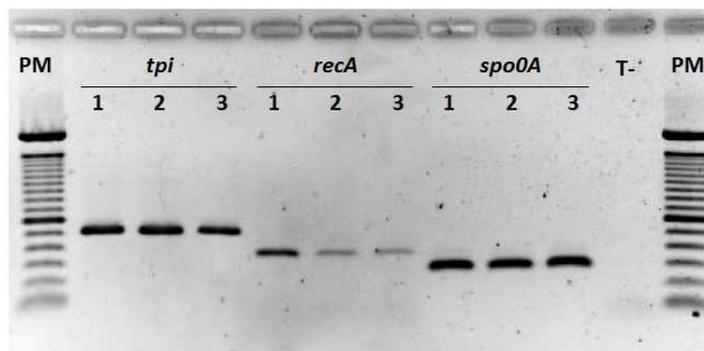


Figure 46. Photographie de l'électrophorèse des produits de PCR des gènes *tpi*, *recA* et *spo0A* pour les souches *C. hastiforme* ATCC 33268^T (1), *Tissierella* sp. LBN 295 (2) et *T. creatinini* DSM 9508^T (3).

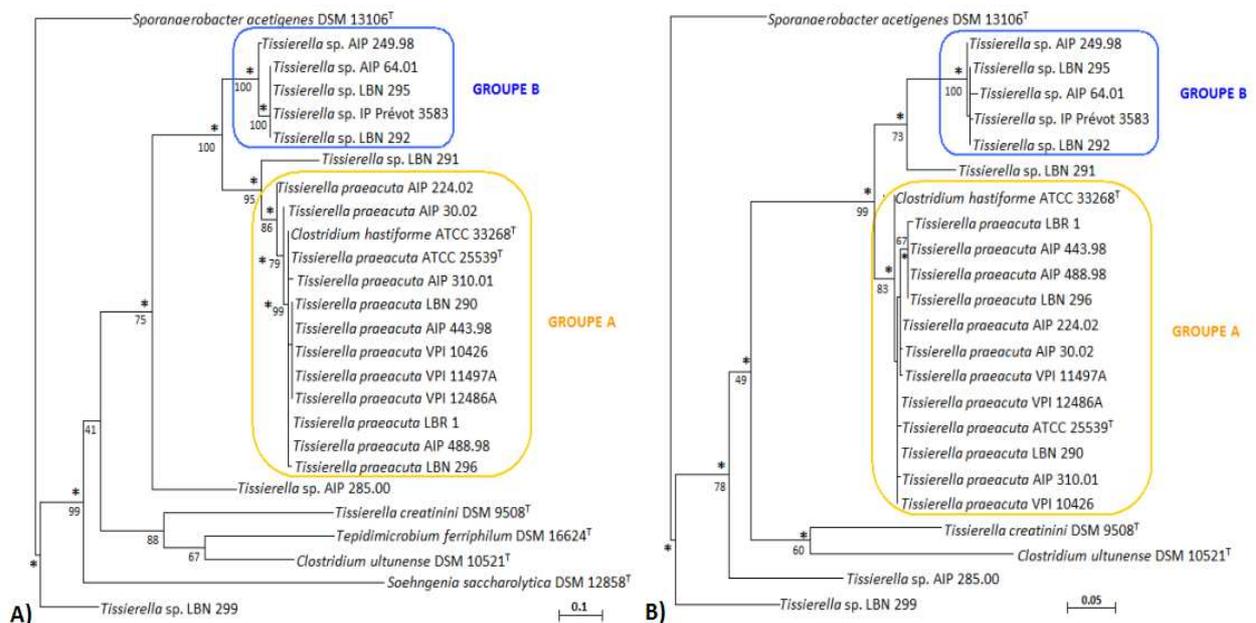
Cependant, pour certaines des souches (n=6), aucune amplification n'a pu être obtenue, même après variation de différents paramètres de la PCR pour un ou deux des gènes. Ces souches ont été exclues de l'analyse multilocus car, présentant des données manquantes, elles apportaient un biais. L'ensemble des séquences amplifiées a été utilisé pour la construction des arbres à partir des gènes isolés. L'approche multilocus a porté sur les 21 souches pour lesquelles les séquences des trois gènes ont été obtenues : 17 souches cliniques, dont 11 appartenant au groupe A et quatre au groupe B, et les souches types de *C. hastiforme*, *T. praeacuta*, *T. creatinini* et *S. acetigenes*. Les numéros d'accession sous lesquels ces séquences ont été déposées dans la *GenBank* sont disponibles dans le Tableau 32.

Il est intéressant de noter qu'une mutation de type transversion (G→T) dans la séquence du gène *spo0A* de *T. praeacuta* ATCC 25539^T entraîne l'apparition d'un codon Stop (E32→Stop). La partie amplifiée par les amorces que nous avons utilisées correspond au tiers

terminal de la protéine Spo0A (274 acides aminés). Le codon Stop est située vers le 200^{ème} acide aminé de la protéine et pourrait expliquer l'absence de sporulation observée chez cette souche. Associée à une décoloration au Gram, cette observation avait mené à classer initialement *T. praeacuta* dans le genre *Bacteroides* (51). Nous n'avons jamais visualisé de spore pour les souches LBN 292, DSM 6911^T, DSM 9508^T et DSM 16624^T, ces observations concordant avec les données de la littérature pour ce qui est des souches types (102, 143, 309). En l'absence de codon Stop dans les séquences obtenues pour ces souches, plusieurs hypothèses peuvent être émises. La première est que nous n'avons pas utilisé les conditions adéquates à la sporulation de ces souches car il a déjà été montré que certaines espèces ne sporulaient qu'en présence de facteurs bien particuliers (232). La seconde est qu'une ou plusieurs mutations altérant le phénomène complexe de sporulation ont eut lieu, soit dans la partie N-terminale non séquencée du gène *spo0A*, soit dans un des nombreux autres gènes impliqués dans ce processus.

b) Arbres phylogénétiques

Pour chaque gène de ménage, nous avons construit un arbre phylogénétique (Figures 47A, B et C). Un arbre supplémentaire a été construit après concaténation des gènes *tpi*, *recA* et *spo0A* des 21 souches pour lesquelles les séquences des trois gènes avaient été obtenues (Figure 47D).



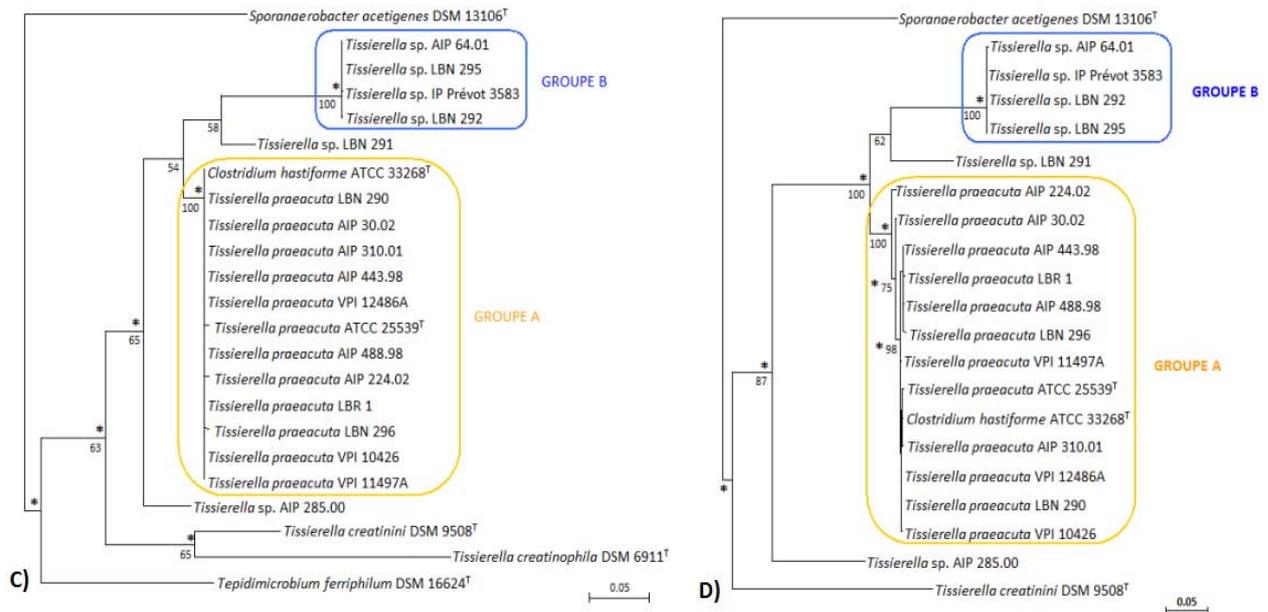


Figure 47. Arbres phylogénétiques montrant les relations évolutives entre les souches étudiées. Ces arbres ont été générés par ML à partir de séquences des gènes *tpi* (A), *recA* (B) et *spo0A* (C) et des séquences concaténées de ces mêmes gènes (D). Les astérisques signalent les nœuds retrouvés en utilisant la méthode de Neighbor-Joining (F84). Les valeurs de bootstrap (pour 100 ré-échantillonnages effectués) sont indiquées au niveau des nœuds majeurs. Les échelles représentent de cinq à dix substitutions pour 100 nucléotides.

Qu'ils aient été générés à partir des gènes isolés ou des gènes concaténés, ces arbres montrent à nouveau une organisation des souches cliniques de *Tissierella* spp. en deux groupes A et B, identiques à ceux observés à partir des séquences d'ADNr 16S, et dont les branchements sont supportés par de bonnes valeurs de bootstrap. De façon similaire à l'analyse de l'ADNr 16S, l'appartenance de la souche LBN 291 à l'un de ces groupes est ambiguë et les souches LBN 299 et AIP 285.00 sont clairement situées à l'extérieur de ces deux clades. Cette dernière semble cependant associée au genre *Tissierella* au sein duquel elle pourrait représenter une nouvelle espèce. L'obtention d'arbres congruents qui, en testant différents loci, présentent les mêmes regroupements, montre que les clades observés sont fiables.

Les arbres obtenus à partir des loci isolés montrent qu'*a priori*, il n'y a pas eu de transfert horizontal sur les gènes *spo0A* et *recA*. Par contre, nous observons un désaccord phylogénétique avec le gène *tpi* au niveau de la souche LBN 291 en comparaison avec les arbres issus des autres gènes, y compris celui de l'ARNr 16S. Cette observation pourrait correspondre à un phénomène de transfert latéral de ce gène entre le clade A et le clade B.

c) Définition des différents profils alléliques (STs)

Le Tableau 35 présente les profils alléliques ou STs déterminés en associant les trois gènes pour chaque souche.

Tableau 35. Liste des différents allèles obtenus pour chaque gène ainsi que le ST correspondant à chaque souche.

Souches	Allèles pour les gènes :			Profils alléliques
	<i>tpi</i>	<i>spo0A</i>	<i>recA</i>	
<i>T. creatinini</i> DSM 9508 ^T	1	1	1	ST1
<i>S. acetigenes</i> DSM 13106 ^T	2	2	2	ST2
<i>C. hastiforme</i> ATCC 33268 ^T	3	9	3	ST3
<i>T. praeacuta</i> AIP 310.01	4	9	4	ST4
<i>T. praeacuta</i> ATCC 25539 ^T	3	3	5	ST5
<i>T. praeacuta</i> VPI 12486A	5	9	6	ST6
<i>T. praeacuta</i> VPI 10426	5	9	6	ST6
<i>T. praeacuta</i> LBN 290	5	9	6	ST6
<i>T. praeacuta</i> VPI 11497A	5	9	7	ST7
<i>T. praeacuta</i> LBN 296	6	4	8	ST8
<i>T. praeacuta</i> LBR 1	3	9	9	ST9
<i>T. praeacuta</i> AIP 488.98	3	9	8	ST10
<i>T. praeacuta</i> AIP 443.98	5	9	8	ST11
<i>T. praeacuta</i> AIP 30.02	7	9	10	ST12
<i>T. praeacuta</i> AIP 224.02	8	5	11	ST13
<i>Tissierella</i> sp. LBN 291	9	6	12	ST14
<i>Tissierella</i> sp. LBN 292	10	7	13	ST15
<i>Tissierella</i> sp. LBN 295	10	7	13	ST15
<i>Tissierella</i> sp. IP Prévot 3583	10	7	14	ST16
<i>Tissierella</i> sp. AIP 64.01	10	7	15	ST17
<i>Tissierella</i> sp. AIP 285.00	11	8	16	ST18

Parmi les 20 souches analysées sur la base de ces trois gènes, les souches LBN 290, VPI 10426 et VPI 12486A partagent un même profil pour les trois allèles (ST6). Il en est de même pour les souches LBN 292 et LBN 295 (ST15). Toutes les autres souches présentent un profil qui leur est propre menant à un total de 18 STs. Le gène *recA* est le plus polymorphe des trois puisqu'il permet à lui seul de définir 16 allèles alors que les gènes *spo0A* et *tpi* en déterminent huit et 11, respectivement.

d) Analyse eBurst

L'analyse eBurst révèle l'organisation des souches en deux complexes clonaux (CC1 et CC2) et neuf singletons, c'est à dire neuf souches ne pouvant être regroupées au sein d'un complexe clonal (Figure 48).

```
eBURST Report - Fri Sep 04 15:23:50 CEST 2009
No. isolates = 21 | No. STs = 18 | No. re-samplings for bootstrapping = 1000
No. loci per isolate = 3 | No. identical loci for group def = 2 | No. groups = 2

Group 1: No. Isolates = 8 | No. STs = 6 | Predicted Founder = Multiple Candidates
```

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance	ST Bootstrap Group	Subgrp
11	1	3	2	0	0	1.4	33%	19%
10	1	3	2	0	0	1.4	37%	20%
6	3	2	3	0	0	1.6	4%	0%
9	1	2	3	0	0	1.6	3%	0%
7	1	2	3	0	0	1.6	9%	0%
3	1	2	3	0	0	1.6	7%	0%

```
Group 2: No. Isolates = 4 | No. STs = 3 | Predicted Founder = 15
```

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance	ST Bootstrap Group	Subgrp
15	2	2	0	0	0	1.0	7%	0%
17	1	2	0	0	0	1.0	8%	0%
16	1	2	0	0	0	1.0	13%	0%

```
Singletons: size 9
18
14
13
12
8
5
4
2
1
```

Figure 48. Résultat de l'analyse eBurst sur les 21 souches testées.

Le premier complexe clonal (CC1) comprend huit souches et six STs (ST3, ST6, ST7, ST9, ST10, ST11). Ces huit souches appartiennent au groupe phylogénétique A décrit dans les chapitres précédents (*T. praeacuta sensu stricto*).

Le second CC (CC2) comprend quatre souches représentant trois STs (ST15, ST16, ST17). Il correspond aux souches du groupe phylogénétique B, c'est à dire les *Tissierella* sp. LBN 292, LBN 295, IP Prévot 3583 et AIP 64.01.

e) Arbre de recouvrement minimal

Un arbre de recouvrement minimal (ou *minimum spanning tree*) construit à partir de ces mêmes données est représenté dans la Figure 49.

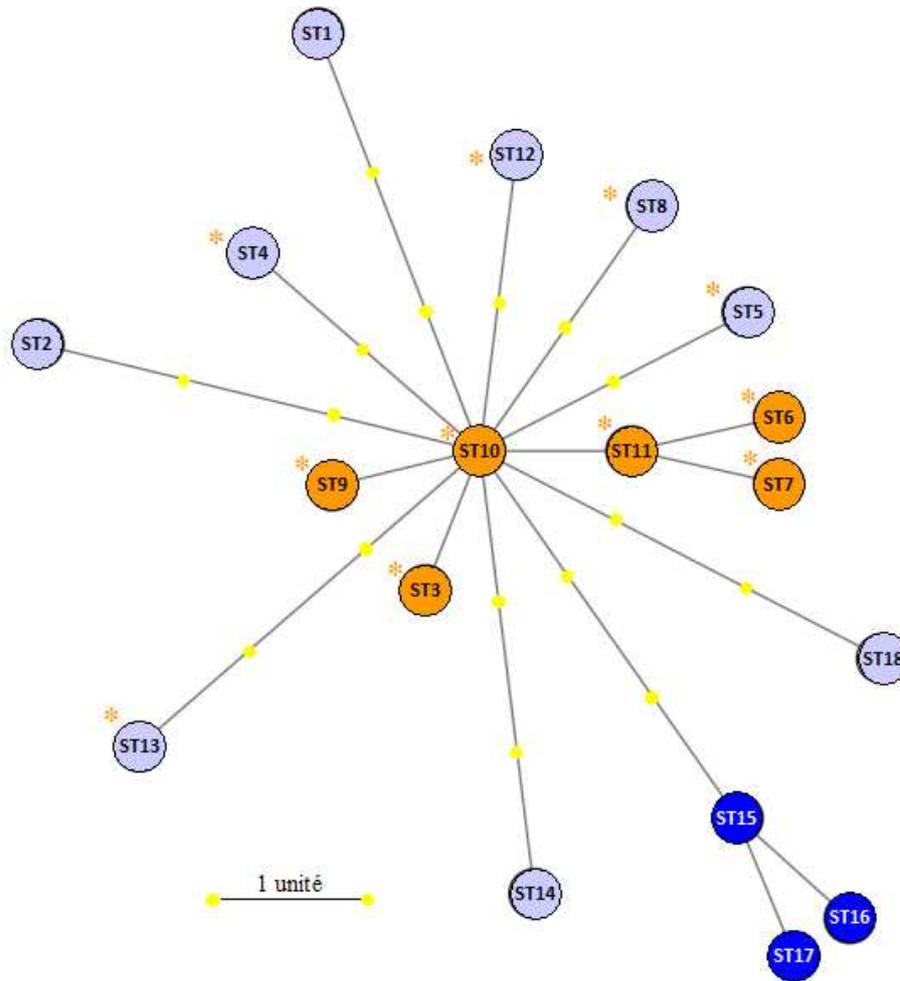


Figure 49. Arbre de recouvrement minimal montrant les relations hypothétiques entre les STs. Les complexes clonaux définis par le eBurst sont représentés en orange (CC1) et en bleu (CC2). Les singletons sont indiqués en gris-bleu. Les astérisques signifient que le ST appartient au groupe A (*T. praeacuta sensu stricto*). Les ronds jaunes matérialisent les unités de longueur correspondant à une différence dans un profil allélique.

Cet arbre représente le réseau le plus court permettant de décrire les relations entre les différents STs. Les complexes clonaux déterminés par l'analyse eBurst sont conservés puisqu'ils regroupent tous les STs n'ayant pas plus d'un allèle qui diffère (correspondant à une unité de longueur sur l'arbre). Les souches appartenant au groupe B sont regroupées (ST15, ST16 et ST17) et la souche *Tissierella* sp. LBN 291 (ST14) ne fait pas partie de ce groupe. La majorité des souches du groupe A sont également reliées. Il faut souligner que si l'on élargit les critères d'inclusion dans le complexe clonal jusqu'à deux allèles qui varient, toutes les souches du groupe A (astérisques oranges) formeraient un complexe clonal, à l'exception de la souche AIP 224.02 (ST13). Le groupe B formerait toujours un groupe à part. Les souches *Tissierella* sp. LBN 291 (ST14) et AIP 285.00 (ST18) ainsi que les espèces *T. creatinini* DSM 9508^T (ST1) et *S. acetigenes* DSM 13106^T (ST2) resteraient isolées.

f) Réseau phylogénétique

Le logiciel SplitsTree permet de représenter un réseau phylogénétique matérialisant les événements de recombinaison (114, 159). Ce réseau est représenté sous la forme d'un splitsgraph (Figure 50).

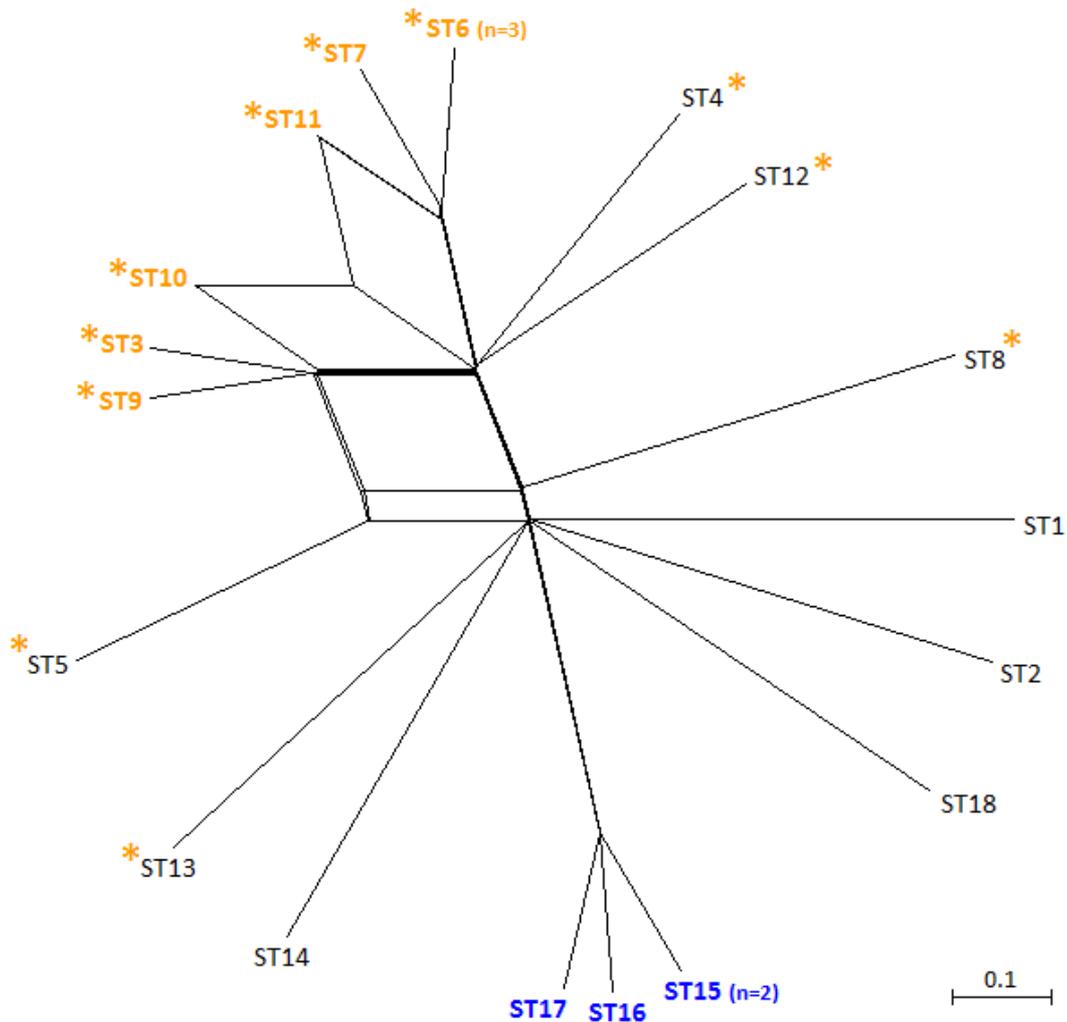


Figure 50. Splitsgraph représentant le réseau phylogénétique établissant les liens entre l'ensemble des souches étudiées.

Cet arbre a été obtenu avec le logiciel SplitsTree4 en utilisant une matrice de distance issue des 18 profils alléliques. Les complexes clonaux définis par le eBurst sont représentés en orange (CC1) et en bleu (CC2). Les astérisques indiquent les STs appartenant au groupe A (*T. praeacuta sensu stricto*).

Ce graphe présente la structuration et les échanges génétiques dans la population de souches étudiées en montrant trois types de relations entre les STs. Il est constitué d'une part de nombreuses branches indépendantes reflétant un haut niveau de diversité génétique (ST1, ST2, ST13, ST14, ST18) et qui correspondent à des singletons identifiés par l'analyse eBurst. Les STs 16 à 18 présentent une faible diversité avec des branchements courts et une absence totale de recombinaison. Ce groupe forme un clade structuré de façon clonale car il est

homogène, isolé et sans échange avec les autres groupes. Il correspond au groupe B selon l'analyse basée sur l'ADNr 16S et au CC2 selon l'analyse eBurst. Nous observons également un groupe de STs présentant de nombreux échanges génétiques, y compris entre STs présentant des niveaux de diversité élevés. Ces recombinaisons ont plus particulièrement lieu entre les STs 3, 6, 7, 9, 10 et 11 qui constituent le CC1 selon l'analyse eBurst. Ce groupe comprend la majorité des souches appartenant à *T. praeacuta sensu stricto*. La souche AIP 224.02 (ST13) appartenant à cette espèce semble ne pas participer à ces échanges génétiques et groupe plutôt à l'extérieur comme montré par l'arbre de recouvrement minimal.

g) Analyse génétique des différents loci

i- Détermination des proportions de substitutions synonymes et non synonymes

Que ce soit dans le cadre d'une approche phylogénétique ou de MLST, le choix des marqueurs s'oriente en général vers des gènes peu soumis à pression de sélection. Afin de voir si les gènes utilisés sont soumis à des mutations de type neutraliste (théorie de Kimura) ou à une pression de sélection darwinienne, nous avons déterminé les taux de mutations synonymes (dS) et non synonymes (dN) de ces gènes sur l'ensemble de nos souches (Tableau 36). Pour cela, nous avons utilisé le programme SNAP qui permet de calculer les proportions de ces deux types de substitutions au sein d'une librairie de séquences nucléotidiques. Il permet également de visualiser sous forme de graphe le cumul des mutations, synonymes et non synonymes, tout au long du gène (Figure 51). À partir de ces données, nous avons calculé pour chaque gène le rapport du taux des mutations non synonymes sur celui des mutations synonymes (dN/dS). Plus ce taux est proche de un, plus il y a de mutations non synonymes et donc plus le gène est soumis à pression de sélection.

Tableau 36. Proportion de substitutions synonymes (dS) et non synonymes (dN) et rapports entre ces deux types de mutations.

Gène	Taille (acides aminés)	dS	dN	dS/dN	dN/dS
<i>recA</i>	120	0.6933	0.0390	18.0693	0.0560
<i>spo0A</i>	91	0.5515	0.0608	10.6920	0.1102
<i>tpi</i>	163	0.8657	0.1160	7.4962	0.1300

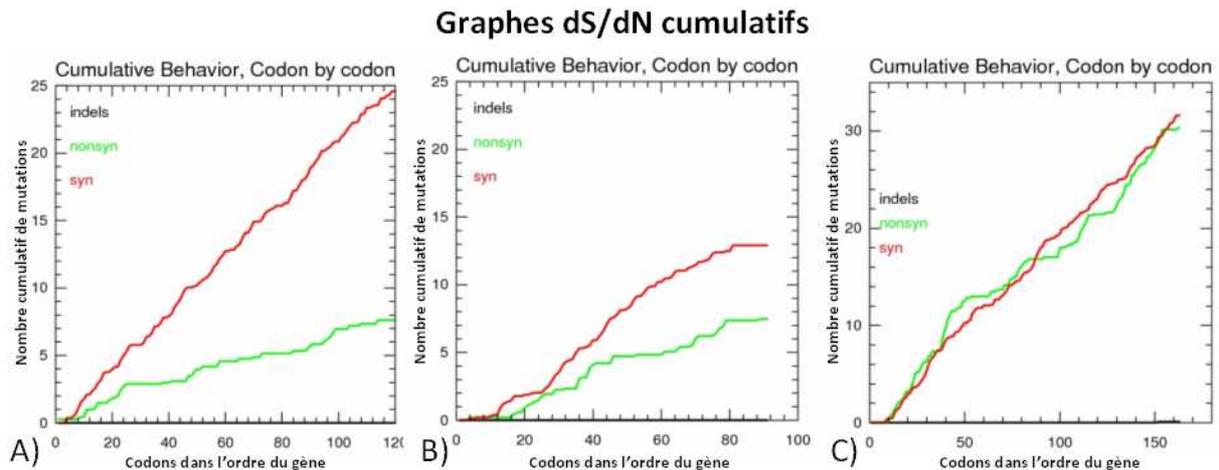


Figure 51. Graphes construits via Xyplot montrant sous forme cumulative l'évolution du nombre de substitutions synonymes et non synonymes tout au long du gène *recA* (A), *spo0A* (B) et *tpi* (C). Syn, mutation synonyme ; nonsyn, mutation non synonyme ; indels, insertion-délétions.

Aucun événement d'insertion-délétion n'est observé pour les trois gènes. Le gène *recA* présente une évolution homogène tout au long du gène (graphe A) et son rapport dN/dS est inférieur à 0.09. Il est donc soumis à une évolution par mutations neutres essentiellement. Par contre, pour les gènes *spo0A* et *tpi*, les valeurs de dN/dS sont légèrement supérieures au seuil (< 0.1). Cette donnée, associée à l'aspect des graphes pour ces deux gènes, suggère que ces derniers pourraient être influencés par l'environnement c'est à dire soumis à une pression de sélection darwinienne.

ii- Recherche d'un déséquilibre de liaison dans la population étudiée

Le déséquilibre de liaison entre les loci a été évalué par la détermination du coefficient d'association standardisé ou sI_A selon Haubold et coll. (2000) (146). Ce coefficient fluctue de façon stochastique autour de zéro en situation de panmixie, c'est à dire quand l'ensemble des gènes s'associe de façon aléatoire. Au fur et à mesure que le déséquilibre de liaison entre les loci augmente, le sI_A s'éloigne de zéro. Pour cela, nous avons analysé les allèles de chaque gène ainsi que les profils alléliques de l'ensemble de nos souches avec le programme LIAN disponible sur le site <http://pubmlst.org/>.

Avec un sI_A de 0.3147 ($p < 0.001$), significativement différent de 0, la population globale présente un déséquilibre de liaison, suggérant un taux de recombinaison relativement faible au sein de notre population de souches. Si l'on teste séparément l'ensemble des STs du groupe A (*T. praeacuta sensu stricto*) et du groupe B, des sI_A respectifs de 0.1716 ($p = 0.032$) et 0.6793 ($p < 0.001$) sont obtenus, reflétant les observations du splitsgraph (Figure 50) avec un groupe A plutôt soumis à recombinaisons, à l'inverse du groupe B.

iii- Détermination de la diversité génétique et comparaison des compositions en G+C

LIAN 3.5 a également permis de déterminer la diversité génétique moyenne (H) et la diversité génétique de chaque locus (h) (Tableau 37).

Tableau 37. Diversité génétique moyenne (H) et de chaque locus (h).

	H	h		
		<i>tpi</i>	<i>spo0A</i>	<i>recA</i>
Population globale	0.8730	0.8952	0.7571	0.9667
Groupe A	0.7137	0.7949	0.4231	0.9231
Groupe B	0.5667	0.4000	0.4000	0.9000

La population globale et le groupe phylogénétique A présentent une diversité génétique élevée. La valeur supérieure observée pour la population globale peut s'expliquer par la présence de nombreux singletons (ST1, ST2, ST13, ST14, ST18) qui correspondent, sur le splitsgraph (Figure 50), aux longues branches indépendantes reflétant un haut niveau de diversité génétique. Une diversité génétique plus faible est observée pour le groupe phylogénétique B, en accord avec les observations précédentes. Cependant, par rapport aux deux autres gènes, le gène *recA* présente une variabilité importante au sein de ce groupe, similaire à celle observée dans la population globale et dans le groupe A.

Il est à souligner que le gène *spo0A* présente quant à lui une faible diversité dans les deux groupes, contrairement à celle retrouvée dans la population globale, suggérant que ce locus pourrait être un marqueur de différenciation entre les membres des groupes A et B.

Enfin, le gène *tpi* présente une diversité génétique clairement plus élevée dans le groupe A par rapport au groupe B. Ceci aurait pu être lié au faible nombre de souches constituant ce groupe mais, dans ce cas, des résultats similaires auraient été observés pour l'ensemble des gènes. Ce phénomène, associé au fait que l'arbre phylogénétique basé sur le gène *tpi* est le seul démontrant un rapprochement de la souche LBN 291 avec le groupe A, suggère l'existence potentielle d'évènements de transferts latéraux pour ce gène.

Le Tableau 38 présente les compositions en guanine et cytosine calculées pour chaque souche à chaque locus et comparées au contenu en G+C du génome dans sa globalité.

Tableau 38. Compositions en G+C des gènes *tpi*, *recA* et *spoOA* déterminées à l'aide du logiciel BioEdit et du génome de *T. praeacuta* et apparentées (150, 259).

Espèces	Souches	Pourcentage en G+C (mol%)			
		<i>spoOA</i>	<i>recA</i>	<i>tpi</i>	GLOBAL
<i>T. praeacuta</i>	AIP 224.02	34.07	38.33	29.65	28.00
	AIP 30.02	34.43	38.89	30.06	28.00
	AIP 310.01	34.43	38.61	30.47	28.00
	AIP 443.98	34.43	38.61	30.67	28.00
	AIP 488.98	34.43	38.61	30.47	28.00
	LBN 290	34.43	38.33	30.67	28.00
	LBR 1	34.43	38.06	30.47	28.00
	LBN 296	34.43	38.61	30.88	28.00
	VPI 10426	34.80	38.33	30.67	28.00
	VPI 11497A	34.43	38.89	30.67	28.00
	VPI 12486A	34.43	38.33	30.67	28.00
	ATCC 33268 ^T	34.43	38.06	30.47	28.00
	ATCC 25539 ^T	34.07	37.78	30.47	28.00
<i>Tissierella</i> sp.	AIP 64.01*	37.36	39.17	33.54	nd
	LBN 292	37.36	38.89	33.54	nd
	LBN 295*	37.36	38.89	33.54	nd
	IP Prévot 3583*	37.36	38.61	33.54	nd
	LBN 291	35.16	40.0	30.47	nd
	AIP 285.00	34.80	38.06	32.11	nd
<i>T. creatinini</i>	DSM 9508 ^T	37.36	40.83	33.95	32.00
<i>S. acetigenes</i>	DSM 13106 ^T	39.19	36.67	31.89	32.20

*, souches appartenant au groupe B ; nd, non disponible.

Ces valeurs reflètent une forte hétérogénéité, notamment pour le gène *recA* dont la composition en G+C est nettement supérieure à celle du génome total, sans distinction entre les groupes A et B. Ce phénomène pourrait être dû à des événements de transferts latéraux au niveau de ce gène. Cette hypothèse reste toutefois à valider sur des séquences génétiques plus longues car cette observation ne pourrait être due qu'à un biais généré par la petite taille du fragment séquencé pour ce gène. Il pourrait par ailleurs être intéressant de déterminer le G+C% des souches du groupe B pour comparer aux différentes valeurs obtenues.

VI. APPROCHE MIXTE ET CONSENSUELLE : PROPOSITION DE RECLASSIFICATION DE *T. PRAEACUTA*

Appliquer une approche mixte et consensuelle à l'étude taxonomique de notre groupe de souches consiste à rassembler tous les résultats obtenus précédemment afin de clarifier la position phylogénétique de l'espèce *Tissierella praeacuta*.

Les souches *C. hastiforme* ATCC 33268^T et *T. praeacuta* ATCC 25539^T, présentant une paroi typique de monoderme, partagent un peptidoglycane qualitativement et quantitativement identique (Figure 33). Elles possèdent des caractéristiques phénotypiques identiques, mise à part l'incapacité de sporuler de la souche ATCC 25539^T. Nous avons montré que la présence d'un codon Stop arrêtant la synthèse de Spo0A permettait d'expliquer ce phénomène. Des pulsotypes ribosomiques similaires et des tailles génomiques proches ont été retrouvées pour ces deux souches types. Par ailleurs, les analyses phylogénétiques et multilocus basées sur les gènes *tpi*, *recA* et *spo0A* ont appuyé les observations de Farrow et coll. (1995) (102) et Bae et coll. (2004) (15) basées sur l'ADNr 16S. Ceci confirme l'appartenance de ces deux souches à une seule et même espèce de bactéries à Gram positif appartenant au phylum *Firmicutes*. Au sein de ce phylum, *T. praeacuta* forme un groupe robuste avec d'autres bacilles environnementaux ayant une paroi de type Gram-positif mais pouvant se décolorer à la coloration de Gram. Ce groupe semble appartenir non pas à la classe *Clostridia*, comme initialement décrit, mais à une nouvelle classe constituée des membres de l'OTU *Peptostreptococcaceae* selon la classification de Hugenholtz.

L'analyse des données concernant les 19 souches cliniques initialement identifiées en tant que *T. praeacuta* a permis de diviser l'ensemble des isolats en deux groupes sur la base des caractères phylogénétiques et génomiques. En effets, les résultats phylogénétiques obtenus avec le gène de l'ARNr 16S, confortés par ceux de l'approche multilocus, ont permis de distinguer parmi les souches deux clades. Aucun des caractères phénotypiques déterminés n'a permis de différencier les membres de ces deux groupes. En revanche, l'analyse de l'organisation chromosomique de ces souches par l'approche ECP-ICeuI a montré que les souches du groupe A présentaient des pulsotypes ribosomiques similaires entre eux et différents de ceux observés pour les souches du groupe B. Ce résultat a été appuyé par

l'estimation des tailles génomiques des souches qui a permis de distinguer ces deux clades. Une variation de taille du génome bactérien ne reflète pas à elle seule une différence d'espèce. En effet, il a été montré que celle-ci pouvait varier de façon importante au sein d'une même espèce (46, 330). Cependant, cette variabilité s'observe essentiellement au niveau des séquences plasmidiques, qu'elles soient épigénétiques ou intégrées au chromosome. Dans le cadre de notre étude, nous avons observé une différence importante (> 2 Mb) de la taille chromosomique entre les groupes A et B, caractéristique en faveur de la différenciation de ces deux groupes.

Par ailleurs, l'approche multilocus a montré une structuration de population différente pour ces deux ensembles. En effet, la majorité des souches du groupe A se rassemblent au sein d'un groupe présentant une variabilité génétique relativement importante et caractérisé par de nombreux échanges génétiques, alors que les souches du groupe B forment un groupe homogène, clonal, dépourvu d'échange génétique. Ces observations sont des arguments supplémentaires de séparation de ces deux clades. Le premier, qui a été désigné groupe A tout au long de ce travail, est constitué de 11 souches cliniques et des deux souches types, et a été considéré comme formant l'espèce *T. praeacuta sensu stricto*. Le groupe B, constitué de cinq souches cliniques, a été quant à lui considéré comme formant une nouvelle espèce désignée *Tissierella* sp. nov. en attente d'une nomenclature définitive.

La compilation de l'ensemble des résultats dans une approche mixte et consensuelle nous a donc permis de clarifier la position taxonomique des souches étudiées ainsi que celle du genre *T. praeacuta*, et de proposer la création d'une nouvelle espèce au sein de ce genre.

Trois souches cliniques présentent encore une position taxonomique ambiguë. Bien que les études phylogénétiques semblaient majoritairement relier la souche LBN 291 à l'espèce *Tissierella* sp. nov., l'analyse génomique a montré que cette souche possédait cinq ou six opérons *rrn*, contrairement à *T. praeacuta* et *Tissierella* sp. nov. qui n'en possédaient que quatre. Les souches LBN 299 et VPI 285.00 se situaient clairement à l'extérieur des deux groupes, à un niveau taxonomique équivalent aux espèces et genres apparentés. Un plus grand nombre de souches, proches de ces isolats, ainsi que des analyses complémentaires sont nécessaires afin de déterminer la position exacte de ces souches au sein du genre *Tissierella*.

La cohérence de ce genre est également à discuter. En effet, si l'on s'intéresse aux différents arbres construits à partir des ADNr 16S, les phylogrammes de haut niveau (Figures 41 à 43) présentent un genre *Tissierella* monophylétique, mais en analysant seulement deux à cinq séquences au sein de nombreuses séquences de bactéries génétiquement éloignées. Basés sur un nombre plus important de séquences, les arbres montrant les relations évolutives des *Tissierella* spp. et des genres apparentés (basés sur les gènes de l'ARNr 16S, *tpi* et *recA*) présentent un genre *Tissierella* polyphylétique avec des liens à clarifier avec les genres *Soehngenia*, *Sporanaerobacter*, *Tepidimicrobium* et l'espèce *C. ultunense*. Par ailleurs, bien que cela ait été montré pour des espèces phylogénétiquement proches et discuté dans un chapitre antérieur, il est intéressant de souligner que *T. praeacuta* et *Tissierella* sp. nov. possèdent un peptidoglycane avec du DAP alors que celui de *T. creatinini* contient de la D-Ornithine. Aucune donnée concernant la composition du peptidoglycane de *T. creatinophila* et des genres apparentés n'est disponible, du moins à notre connaissance. Des études supplémentaires phénotypiques et phylogénétiques seront nécessaires à la description d'un genre *Tissierella* taxonomiquement cohérent.

VII. *TISSIERELLA* SPP. ET RESISTANCE A LA VANCOMYCINE

C'est l'observation initiale d'un bas niveau de résistance à la vancomycine qui avait entraîné la mise en place de ce travail sur ce groupe de bactéries dont nous venons de montrer qu'il est constitué de deux espèces bactériennes distinctes.

La résistance aux glycopeptides est le plus souvent due à la présence d'un cluster de gènes (*van*) permettant de modifier la cible de l'antibiotique (65). Aucun des gènes *vanA* à *vanG* n'a été détecté pour l'ensemble des souches testées dans cette étude. Les amorces dégénérées V1/V2, amplifiant un fragment interne de D-Ala:D-X ligases (X étant n'importe quel acide aminé), ont permis d'obtenir un amplicon pour 13 des 27 souches de *Tissierella* et apparentées dont le séquençage a permis de montrer qu'il s'agissait d'une ligase bactérienne. En effet, l'arbre présentant les relations des séquences protéiques de différentes ligases bactériennes révèle que la ligase amplifiée chez *Tissierella* spp. et les genres apparentés semble se rapprocher des D-Ala:D-Ala ligases naturelles (Figure 52).

Il est intéressant de noter que dix de ces séquences sont issues de souches du groupe A, les trois autres provenant des souches *Tissierella* sp. LBN 299, *T. creatinini* DSM 9508^T et *T. ferriphilum* DSM 16624^T. Aucune souche du groupe B n'a permis pour le moment d'obtenir une séquence, soit par absence totale d'amplification, soit par obtention de profils non spécifiques à plusieurs bandes. Différents protocoles sont actuellement en cours d'essai. Cette observation pourrait être utilisée pour compléter l'approche mixte et consensuelle car elle semble à nouveau distinguer les groupes phylogénétiques A et B.

L'analyse de la structure du peptidoglycane de *T. praeacuta* et de *Tissierella* sp. nov. a permis de mettre en évidence la présence de mucopeptides de type GlcNac–MurNac–L-Ala–D-Glu–DAP–D-Ala. L'absence de pentapeptide dans le peptidoglycane mature de ces espèces ne nous a pas permis de définir la nature du substrat de la D-Ala:D-X ligase amplifiée.

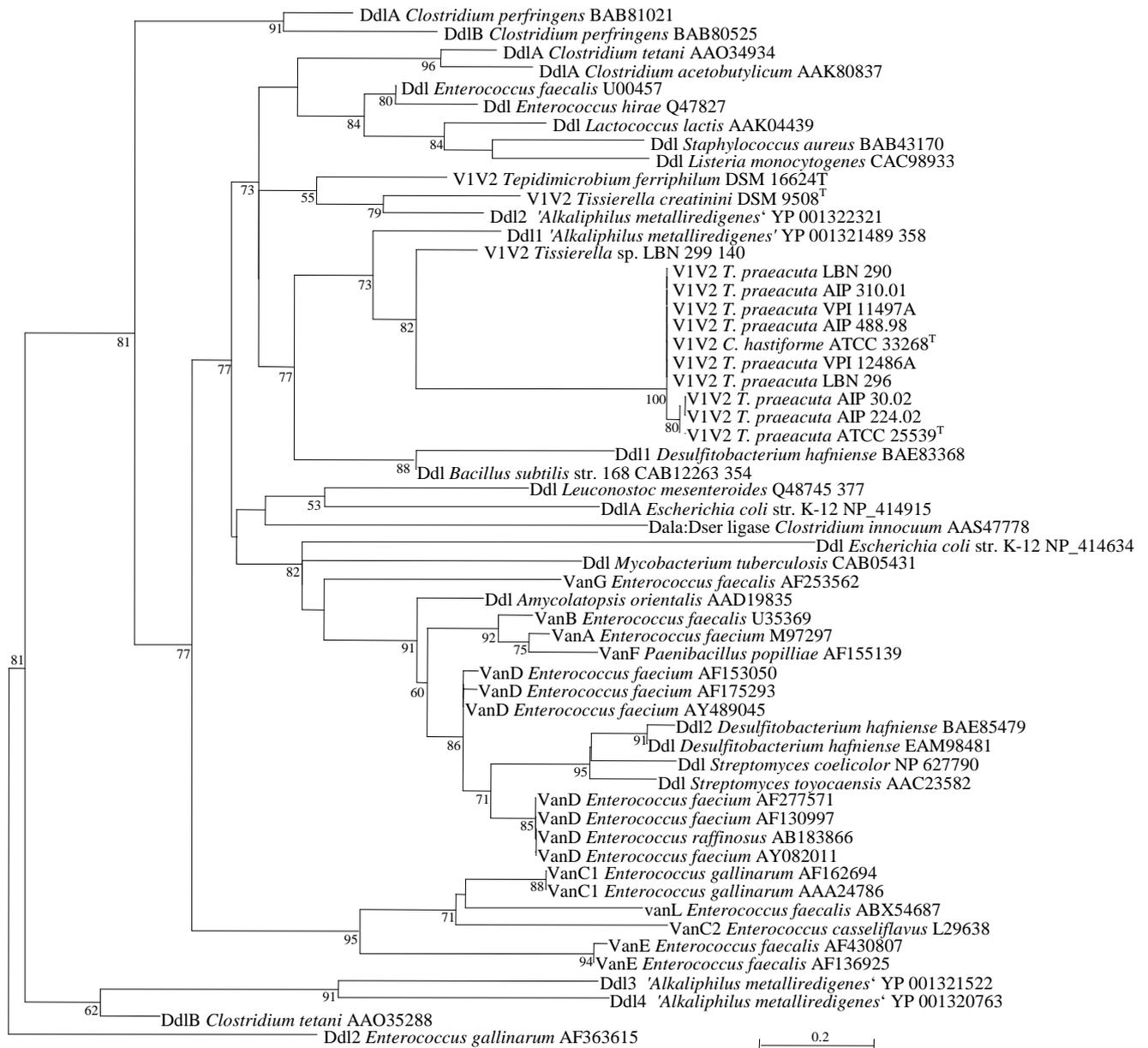


Figure 52. Arbre phylogénétique construit par ML à partir de séquences protéiques partielles de D-Ala:D-X ligases bactériennes (298 acides aminés). Les valeurs de bootstrap (pour 100 ré-échantillonnages effectués) sont indiquées au niveau des nœuds. L'échelle correspond à 20 substitutions pour 100 nucléotides.

Il est à souligner que la faible épaisseur du peptidoglycane de ces souches n'est pas en faveur d'un mécanisme de résistance par épaissement de la paroi comme cela a été décrit chez *S. aureus* (9).

Etude du modèle *Clostridium orbiscindens* – *Eubacterium plautii* : une nouvelle espèce ?

Dix souches cliniques isolées de différents sites infectieux (sang, pus intra-abdominal, tissus mous) ont été phénotypiquement et génétiquement identifiées comme appartenant aux espèces *C. orbiscindens* (souche sporulée) et *E. plautii* (souche ne produisant pas de spores) au Laboratoire de Bactériologie du CHU de Nancy ainsi qu'au Centre National de Référence des Bactéries Anaérobies et du Botulisme. Certaines de ces souches ainsi que *C. orbiscindens* DSM 6740^T et *E. plautii* DSM 4000^T ont été plus particulièrement étudiées en utilisant une approche mixte et consensuelle afin de clarifier la position taxonomique de ces deux espèces.

I. ANALYSE PHENOTYPIQUE

Les principales caractéristiques phénotypiques sont présentées dans le Tableau 39.

Tableau 39. Caractéristiques phénotypiques et génotypiques des souches de *C. orbiscindens* et *E. plautii* étudiées.

Espèce	N° de souche	Coloration de Gram	Présence de spores	Présence du gène <i>spo0A</i>	Dégradation de la quercétine	Séquences d'ADNr 16S
<i>C. orbiscindens</i> / <i>E. plautii</i>	LBN 200	variable	-*	+	ND	GU086204
	LBN 201	variable	-*	+	ND	GU086205
	LBN 202	variable	+*	+	+	EU541435
	LBN 203	variable	+*	+	ND	GU086206
	LBN 204	variable	+*	+	+	EU541436
	LBN 205	variable	-*	+	+	EU541437
	LBN 206	variable	-*	+	+	EU541439
	LBN 207	variable	-	+	ND	GU086207
	LBN 208	variable	-	+	ND	GU086208
	AIP 201.04	variable	ND	+	+	EU541438
<i>C. orbiscindens</i>	DSM 6740 ^T	variable	+	+	+	Y18187
<i>E. plautii</i>	DSM 4000 ^T	variable	-	+	+	AY724678

+, caractère positif ; -, caractère négatif ; *, visualisées par microscopie en contraste de phase ; ND, caractère non déterminé.

Une décoloration fréquente de ces souches lors de la coloration de Gram pose le même problème en terme d'identification que le groupe traité précédemment. Cette décoloration pourrait également s'expliquer par une couche de peptidoglycane très fine (14 nm) décrite pour *Eubacterium plautii* (153).

Leurs acides gras cellulaires majeurs sont l'acide myristique (C14:0 ; 34-36.9%) et l'acide palmitique (C16:0 ; 14.4-18.1%).

D'un point de vue métabolique, les principaux produits terminaux du métabolisme pour les deux souches types sont l'acide acétique et l'acide butyrique.

D'autre part, *C. orbiscindens* a la propriété de couper les liaisons C-3–C-4 du cycle aglycone de la quercétine et d'autres flavonoïdes qui sont ainsi inactivés (294, 366). Il n'existe aucune donnée concernant ce caractère pour *E. plautii*. La dégradation de la quercétine chez cette espèce a été mise en évidence en utilisant la propriété qu'ont les flavonoïdes d'inhiber la fluorescence du DHP (1,6-diphényl-1,3,5-hexatriène) (Figure 53) (294). Ce test a été effectué par l'équipe de J.P. Carlier de l'Institut Pasteur de Paris.

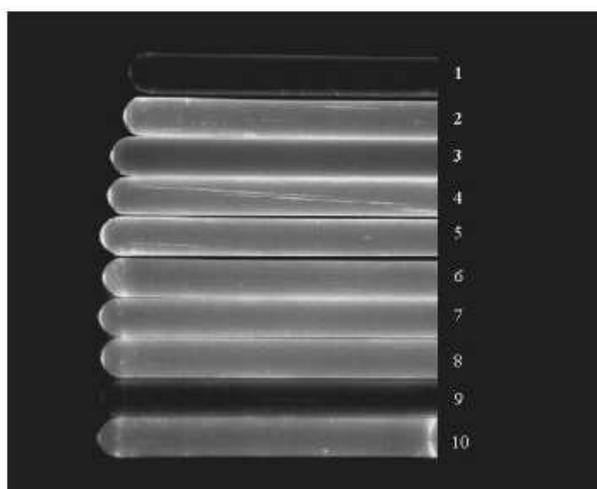


Figure 53. Test de quenching de la fluorescence de la DPH par la quercétine.

1, DPH + quercétine + *E. coli* K 12 (souche ne dégradant pas la quercétine) ; **2**, DPH + quercétine + AIP 201.04 ; **3**, DPH + quercétine + *C. orbiscindens* DSM 6740^T ; **4**, DPH + quercétine + LBN 204 ; **5**, DPH + quercétine + LBN 202 ; **6**, DPH + quercétine + *E. plautii* DSM 4000^T ; **7**, DPH + quercétine + LBN 206 ; **8**, DPH + quercétine + LBN 205 ; **9**, DPH + quercétine (contrôle négatif) ; **10**, DPH (contrôle positif).

Une sensibilité diminuée à la vancomycine (CMI, 4 à 16 µg/ml) initialement observée pour les souches cliniques a été retrouvée chez les souches types de *C. orbiscindens* et *E. plautii*. L'ensemble des souches étudiées étaient sensibles à la teicoplanine avec des CMI inférieures ou égales à 0.5 µg/ml (53).

II. ANALYSE PHYLOGENETIQUE ET GENETIQUE

Dans un premier temps, une analyse phylogénétique basée sur les séquences d'ADNr 16S (Tableau 39) a montré que les isolats cliniques LBN 200 à 208 et AIP 201.04 étaient étroitement reliés aux souches types de *C. orbiscindens* et *E. plautii* au sein du cluster IV de Collins (Figure 54) (50).

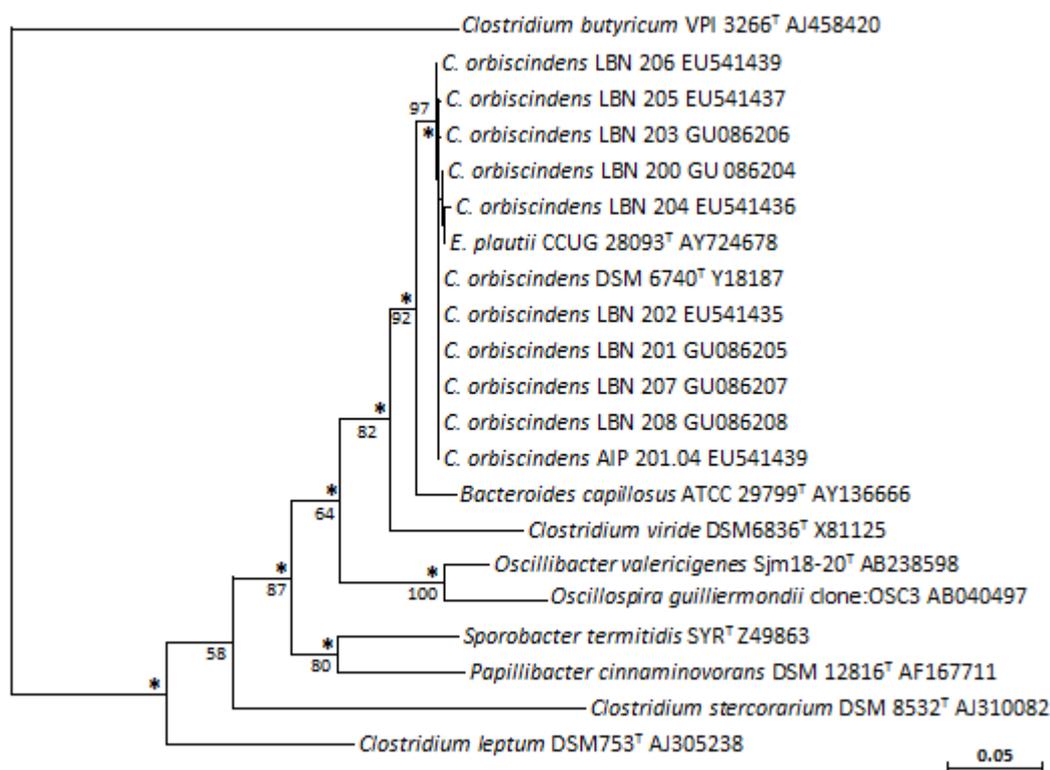


Figure 54. Arbre phylogénétique montrant les relations phylogénétiques entre les souches cliniques et les souches types de *C. orbiscindens* et *E. plautii*, et d'autres espèces et genres apparentés.

Cet arbre a été généré par la méthode de ML à partir des séquences partielles (1362 nucléotides) d'ADNr 16S. Les astérisques signalent les nœuds retrouvés en utilisant la méthode de Neighbor-Joining (F84). Les valeurs de bootstrap (100 ré-échantillonnages effectués) sont indiquées au niveau des nœuds majeurs. L'échelle indique cinq substitutions pour 100 nucléotides.

De plus, les deux souches types, *C. orbiscindens* DSM 6740^T et *E. plautii* DSM 4000^T, présentent des pourcentages en G+C similaires (58.0 mol% et 61.6 mol%, respectivement) et leur taux d'hybridation ADN-ADN est compris entre 72.6 à 76.9%.

Le gène *spo0A*, codant le facteur d'initiation de la sporulation chez *Clostridium* spp. et *Bacillus* spp., a été mis en évidence non seulement chez les souches sporulant mais également chez celles ne produisant pas de spore dont *E. plautii* DSM 4000^T. Selon Brill et coll. (1997), cette souche ne doit donc plus être définie comme une souche "non sporulée" mais comme une souche asporulée (29).

Aucun des gènes *vanA* à *vanG* impliqués dans la résistance aux glycopeptides n'a été détecté dans le génome de ces souches (78, 87, 107, 229, 265, 281).

III. TAXONOMIE MIXTE ET CONSENSUELLE : RECLASSIFICATION

L'ensemble des résultats phénotypiques, génotypiques et phylogénétiques tendent à appuyer l'hypothèse de réunification des deux espèces et suggèrent de réunir *C. orbiscindens* et *E. plautii* dans un nouveau genre, *Flavonifactor* gen. nov., comb. nov., et de proposer *Flavonifactor plautii* comme espèce type de par l'ancienneté du nom. Par ailleurs, l'analyse phylogénétique ayant mis en évidence la proximité évolutive de l'espèce *Bacteroides capillosus*, la capacité à dégrader la quercétine et la présence du gène *spo0A* ont été recherchés chez la souche *B. capillosus* CCUG 15402A^T. Les résultats obtenus, associés à ceux d'autres auteurs, permettent d'exclure cette espèce du genre *Bacteroides*. Elle ne peut cependant pas être transférée au sein du genre *Flavonifactor* dont elle se distingue par différents caractères métaboliques, notamment son incapacité à dégrader la quercétine. La création d'un nouveau genre, *Pseudoflavonifactor* gen. nov., comb. nov., a donc été proposée, avec *Pseudoflavonifactor capillosus* comme espèce type.

Ces résultats ont fait l'objet d'une publication dans l'International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.

Publication N° 1 (Annexe D) :

Proposal to unify *Clostridium orbiscindens* Winter *et al.* 1991 and *Eubacterium plautii* (Seguin 1928) Hofstad and Aasjord 1982 with description of *Flavonifactor plautii* gen. nov., comb. nov. and reassignment of *Bacteroides capillosus* to *Pseudoflavonifactor capillosus* gen. nov., comb. nov.

Carlier JP, Bedora-Faure M, K'ouas G, **Alauzet C**, Mory F.

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. Août 2009 [Epub ahead of print].

**RESULTATS PARTIE II. APPLICATION
DE L'UTILISATION D'UNE APPROCHE
MIXTE ET CONSENSUELLE EN
BACTERIOLOGIE CLINIQUE**

Résultats préliminaires

I. IDENTIFICATION DES ISOLATS CLINIQUES DE *PREVOTELLA* SPP.

L'étude a porté sur un total de 188 souches isolées de prélèvements divers chez des patients hospitalisés au CHU de Nancy (n=157 souches) et au CHU de Poitiers (n=31 souches) (Tableau 16). L'utilisation de méthodes phénotypiques, associées ou non à un séquençage de l'ADNr 16S, a permis d'identifier les espèces suivantes : *P. bivia* (n=41), *P. buccae* (n=35), *P. denticola* (n=28), *P. melaninogenica* (n=17), *Prevotella* sp. (n=15), *P. disiens* (n=10), *P. oris* (n=9), *P. baroniae* (n=7), *P. nigrescens* (n=5), *P. oralis* (n=5), *P. loescheii* (n=3), *P. salivae* (n=3), *P. veroralis* (n=3), *P. intermedia* (n=2), *P. bergensis* (n=2), *P. corporis* (n=1), *P. heparinolytica* (n=1) et *P. multiformis* (n=1).

Le séquençage a été nécessaire pour une identification fiable au niveau de l'espèce dans 65.4% des cas. Il n'a pas permis d'identifier au rang de l'espèce 15 souches (*Prevotella* sp.). Parmi ces souches, dix semblaient appartenir au même groupe formant vraisemblablement une nouvelle espèce. Parmi ces dix souches, trois (LBN 293, LBN 297 et LBN 298) ont été analysées par une approche de taxonomie mixte et consensuelle afin de caractériser cette nouvelle espèce pathogène.

II. SENSIBILITE AU METRONIDAZOLE

1. Détermination des CMI et recherche des gènes *nim*

Parmi les 188 souches étudiées, seules trois ont présenté une résistance de bas niveau au métronidazole (CMI, 8-16 µg/ml) par la méthode de référence ou par le Etest après lecture à 48 h. Pour 27 isolats supplémentaires, la présence de colonies à croissance lente (CCL) à l'intérieur de l'ellipse d'inhibition de la bandelette Etest a été observée après une incubation

de 96-144 h. Les CMI du métronidazole pour ces CCL, déterminées par la méthode de référence, variaient de 8 à 32 µg/ml (Tableau 40).

Tableau 40. CMI des souches *nim*-positives et des souches *nim*-négatives présentant une sensibilité réduite au métronidazole.

Isolats cliniques ^a		Présence d'un gène <i>nim</i>	CMI (µg/ml) déterminées par la méthode :		
			du Etest	de dilution en milieu gélosé	
				originale	CCL ^b
<i>P. baroniae</i>	LBN 427	+	0.38	4	NA ^c
	LBN 430	+	0.19	4	NA ^c
	LBN 432	+	0.094	2	NA ^c
	LBN 466	+	0.38	2	NA ^c
	LBN 475	+	2	4	NA ^c
	LBP 9	+	0.25	2	NA ^c
	LBP 19	+	0.094	1	NA ^c
<i>P. bivia</i>	LBN 330	-	1	2	16
	LBN 331	-	0.5	2	16
	LBN 332	-	0.5	4	32
	LBN 333	-	0.75	2	32
	LBN 334	-	1	2	16
	LBN 336	-	0.75	2	32
	LBN 339	-	0.75	2	16
	LBN 343	-	0.75	1	16
	LBN 346	-	0.75	1	16
	LBN 350	-	1.5	2	16
	LBN 361	-	1	2	32
	LBN 365	-	1	4	8
	LBN 371	-	1	4	32
	LBN 374	-	1	2	8
	LBN 445	-	1.5	0.5	16
	LBN 464	-	1	8	16
	LBN 467	-	1	16	32
	LBN 478	-	0.75	4	8
	LBP 4	-	0.5	2	32
	LBP 38	-	0.75	2	8
	LBP 51	-	0.38	2	32
	LBP 52	-	0.75	4	16
	LBP 65	-	1	4	32
	LBP 69	-	0.38	2	8
	LBP 78	-	0.5	4	8
	<i>P. nanceiensis</i>	LBN 293b	-	2	2
LBN 297		-	1.5	2	16
LBN 298		-	16	4	32
LBN 410		-	0.5	1	32
LBP 66		-	0.125	2	8

^a LBN, Laboratoire de Bactériologie de Nancy; LBP, Laboratoire de Bactériologie de Poitiers ; ^b CCL: colonies à croissance lente apparaissant à l'intérieur de la zone d'inhibition de la bandelette Etest après 96-144 h ; ^c NA: non applicable (absence de CCL).

Les résultats globaux de la détermination de la sensibilité au métronidazole sont disponibles en **Annexe C**.

La recherche des gènes *nim* par PCR s'est révélée positive pour sept souches, toutes génotypiquement identifiées *P. baroniae* et sensibles au métronidazole (Tableau 40). La caractérisation (nature et la localisation) de ces gènes *nim* a fait l'objet d'une étude qui sera présentée dans un chapitre ultérieur.

Il est intéressant de noter que la souche *P. nanceiensis* LBN 298 (CMI d'emblée à 16 µg/ml par la méthode du Etest) a probablement été sélectionnée *in vivo*, le patient ayant reçu du métronidazole pendant une semaine avant le prélèvement dans lequel cette souche a été isolée.

2. Sélection *in vitro* de mutants résistants au métronidazole

Les résultats de l'induction de la résistance au métronidazole après passages successifs sur des milieux contenant des concentrations croissantes d'antibiotique, ainsi que la stabilité de cette résistance après passages successifs sur des milieux sans antibiotique, sont présentés dans le tableau suivant.

Tableau 41. Induction et stabilité de la résistance au métronidazole chez 11 souches cliniques de *Prevotella* spp., chez *P. baroniae* DSM 16972^T et chez *B. fragilis* ATCC 25285^T.

Souches (présence du gène <i>nimI</i>) ^a	CMI par la méthode de référence (µg/ml)		
	originale	post-induction	post-stabilité
<i>P. baroniae</i> DSM 16972 ^T (+)	2	16	16
<i>P. baroniae</i> LBN 427 (+)	4	128	128
<i>P. baroniae</i> LBN 430 (+)	4	128	128
<i>P. baroniae</i> LBN 432 (+)	2	64	64
<i>P. baroniae</i> LBN 475 (+)	4	256	256
<i>P. baroniae</i> LBP19 (+)	1	128	128
<i>P. bivia</i> LBN 332 (-)	4	>256	>256
<i>P. bivia</i> LBN 371 (-)	4	>256	>256
<i>P. bivia</i> LBN 467 (-)	16	>256	>256
<i>P. buccae</i> LBN 465 (-)	0.5	128	64
<i>Prevotella</i> sp. nov. LBN 293b (-)	2	256	256
<i>Prevotella</i> sp. nov. LBN 410 (-)	1	256	256
<i>B. fragilis</i> ATCC 25285 ^T (-)	0.5	256	128

^a + : positive ; - : négative.

Ainsi, des mutants stables résistants à haut niveau au métronidazole ont été sélectionnés pour toutes les souches cliniques de *Prevotella* spp. testées, qu'elles possèdent le gène *nimI* ou non.

III. DEUX CAS D'ECHECS THERAPEUTIQUES LIES A UNE RESISTANCE AU METRONIDAZOLE

Dans le cadre de cette étude, deux cas d'échecs thérapeutiques en rapport avec le développement d'une résistance au métronidazole chez des souches de *Prevotella* spp. initialement sensibles ont été observés. Le premier a fait l'objet d'une publication dans le *Journal of Clinical Microbiology*.

1. Bactériémie causée par une souche résistante au métronidazole appartenant à une nouvelle espèce de *Prevotella*

Un patient de 78 ans ayant des antécédents de diabète de type 2 et de diverticulose colique a été hospitalisé pour une fièvre associée à une altération de l'état général. L'examen clinique pratiqué à son admission ainsi que le scanner abdominal étaient normaux. Le bilan biologique montrait une hyperleucocytose ($28\ 000/\text{mm}^3$) majoritairement à polynucléaires neutrophiles, une protéine C-réactive à 139 mg/l, et une glycémie à 2 g/l. Un traitement antibiotique probabiliste a été institué (céfotaxime et ofloxacine). Les hémocultures, prélevées à J₀, ont montré la présence d'*E. coli* et de *Streptococcus anginosus* sensibles à au moins un des deux antibiotiques. Le patient étant toujours fébrile à J₇, d'autres hémocultures ont été prélevées et le traitement a été complété par du métronidazole et de la teicoplanine.

Les hémocultures prélevées à J₇ ont permis d'isoler un bacille à Gram négatif de sensibilité intermédiaire au céfotaxime et résistant à l'ofloxacine. Cette souche a été considérée comme sensible au métronidazole (comprimés à 16 µg Neo-Sensitabs, Rosco) après 48 h d'incubation (53). Après 72 h d'incubation, des CCL ont été observées à l'intérieur de la zone d'inhibition du comprimé de métronidazole. Des CCL ont également été observées à l'intérieur de l'ellipse d'inhibition d'une bandelette Etest de métronidazole après 72 h d'incubation. L'étude de la sensibilité au métronidazole (méthode de dilution en milieu gélosé) de ces CCL (souche

LBN 293 = AIP 261-03) a permis de montrer qu'il s'agissait d'une sous-population résistante au métronidazole (CMI, 64 µg/ml) alors que la population majoritaire (souche LBN 293b = AIP 268-03) était sensible au métronidazole (CMI, 2 µg/ml). Pour ces deux souches, une élévation des CMI de métronidazole a été observée après passages successifs en milieu liquide contenant des concentrations subinhibitrices de cet antibiotique (LBN 293b, 24 µg/ml ; LBN 293, >256 µg/ml). Ce phénotype s'est révélé stable après plusieurs repiquages sur milieu sans antibiotique.

L'absence d'amélioration de l'état clinique et les résultats bactériologiques ont conduit à modifier le traitement à J₁₄ (pipéracilline-tazobactam et ciprofloxacine), aboutissant à la guérison du patient.

La présence d'un gène *nim* recherché par PCR s'est révélée négative. Un autre mécanisme de résistance semblait donc être impliqué. Les résultats des tests d'identification biochimique effectués sur les deux souches ont tous été identiques sauf en ce qui concerne la production d'acide lactique. En effet, la CPG a mis en évidence des taux de 44.6 mmol/l d'acide lactique pour la souche LBN 293 et de 11 mmol/l pour la souche LBN 293b. Les séquences d'ADNr 16S des souches LBN 293b (n° d'accession AY957556) et LBN 293 (n° d'accession AY957555) partagent 100% de leurs positions. Par ailleurs, ces deux souches présentent un même pulsotype après digestion par l'enzyme *XbaI* (304).

L'ensemble des caractères phénotypiques ainsi que l'analyse phylogénétique basée sur le gène de l'ARNr 16S ont montré que cette bactérie appartenait au genre *Prevotella*, mais à une espèce non décrite. Cette nouvelle espèce présente une résistance hétérogène au métronidazole, de mécanisme inconnu, et qui a été impliquée dans un échec thérapeutique au cours d'une infection grave. Cette souche, ainsi que deux autres souches découvertes ultérieurement dans le cadre de ce travail, ont fait l'objet d'une approche taxonomique mixte et consensuelle menant à la description de l'espèce *Prevotella nanceiensis* sp. nov. qui est présentée dans le chapitre suivant.

Publication N° 2 (Annexe E) :

Bacteremia caused by a metronidazole-resistant *Prevotella* sp. strain.

Mory F., Carlier J. P., Alauzet C., Thouvenin M., Schuhmacher H., Lozniewski A.

Journal of Clinical Microbiology 2005, 43:5380-5383.

2. Echec thérapeutique lié à une souche de *Prevotella buccae* résistante au métronidazole lors d'un épisode de pancréatite aiguë

Une patiente de 66 ans ayant des antécédents de diverticulose colique a été hospitalisée pour un épisode de pancréatite aiguë nécrotico-hémorragique associée à un choc septique. Le bilan biologique montrait une hyperleucocytose (14 000/mm³) et une protéine C-réactive à 357 mg/l. Cette patiente a été traitée par ornidazole et ceftriaxone. Un bacille à Gram négatif anaérobie a été isolé, associé à *Streptococcus constellatus* et *Staphylococcus epidermidis*, dans un pus pancréatique et un liquide de redon, prélevés à J₁ (Figure 55). Ce bacille, identifié comme appartenant à l'espèce *P. buccae*, était sensible au métronidazole (comprimés à 16 µg Neo-Sensitabs, Rosco) après 48 h d'incubation (53). Aucune résistance hétérogène n'a été observée après prolongation de l'incubation. Une sous-population résistante (CMI, 128µg/ml) a été sélectionnée après repiquages successifs de cette souche (LBN 465) sur milieu solide contenant des concentrations croissantes de métronidazole et ce phénotype s'est révélé stable après plusieurs repiquages sur milieu sans antibiotique.

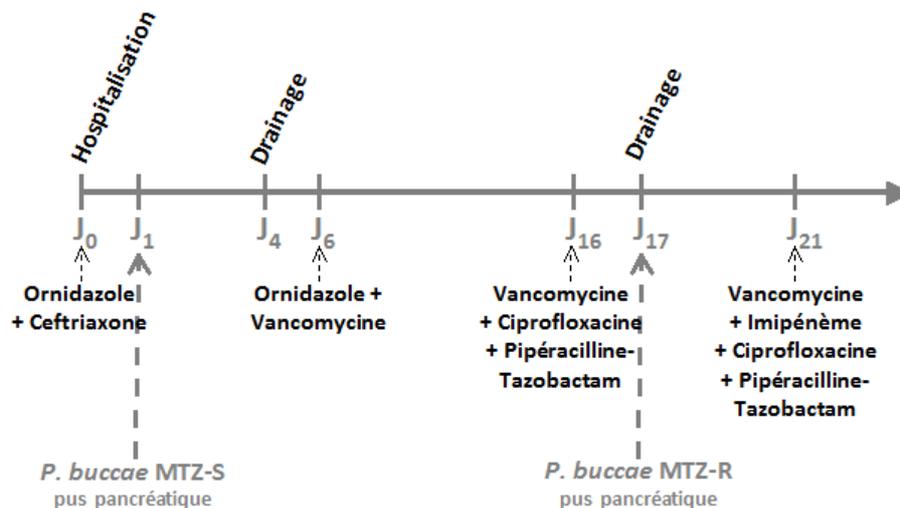


Figure 55. Historique des prélèvements et des traitements antibiotiques du cas d'échec thérapeutique lié à une souche de *P. buccae* ayant développé une résistance au métronidazole (MTZ) *in vivo*.

Devant l'absence d'amélioration et une fièvre persistante, malgré des modifications de l'antibiothérapie, la patiente a été réopérée à J₁₇. Un prélèvement per-opératoire a alors permis d'isoler une souche de *P. buccae* ayant la même sensibilité aux antibiotiques que la souche LBN 465 à l'exception du métronidazole vis à vis duquel ce nouvel isolat était résistant (CMI, 64 µg/ml). La recherche de gènes *nim* par PCR s'est révélée négative. La comparaison

des séquences d'ADNr 16S de ces deux souches ainsi que de leur pulsotype par ECP après digestion par *XbaI* ont montré que ces deux isolats représentaient un seul et même clone (Figure 56) (304).

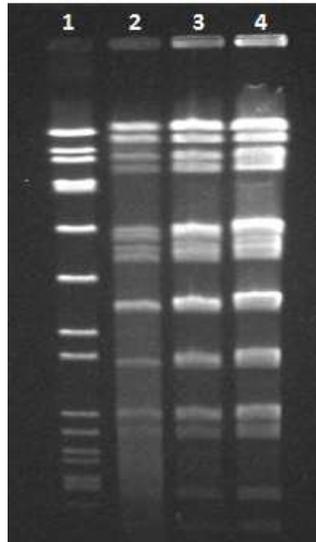


Figure 56. Photographie de la migration électrophorétique en champ pulsé après digestion par *XbaI* de la souche *P. buccae* LBN 465 (MTZ-S) et de la souche *P. buccae* MTZ-R.

1. *S. aureus* NCTC 8325 (marqueur de taille) ; 2. *P. buccae* souche sensible au MTZ ;
3. et 4. *P. buccae* souche résistante au MTZ.

Après ajout d'imipénème (souche sensible à cet antibiotique), l'état clinique de la patiente s'est stabilisé et une apyréxie a été obtenue. Cette observation suggère donc qu'il y a eu sélection *in vivo* d'une sous-population résistante, en l'absence de gène *nim*, chez une patiente ayant été traitée par ornidazole pendant 15 jours.

Application de la taxonomie mixte et consensuelle à la description d'une nouvelle espèce impliquée en pathologie humaine : *Prevotella nanceiensis*

Au cours de cette étude concernant la résistance au métronidazole chez *Prevotella* spp., nous avons identifié trois souches (LBN 293, LBN 297 et LBN 298) qui semblaient appartenir à un même groupe taxonomique sur la base de leur séquence d'ADNr 16S. En effet, ces souches partageaient plus de 99% de leurs positions au niveau de ce gène. En comparant ces séquences à celles des bases de données, les homologues les plus fortes ont été obtenues au sein des bactéries du genre *Prevotella* avec les séquences d'ADNr 16S des espèces *P. marshii* et *P. shahii* (89.8 et 89%, respectivement). Des résultats similaires ont été observés après analyse des séquences d'une portion du gène *rpoB*, montrant 83.1% d'identité avec la séquence de *P. marshii* et 82.8% avec celle de *P. shahii* (n° d'accèsion EF405531 à EF405535). Ces résultats suggèrent que ce nouveau taxon forme très probablement une nouvelle espèce appartenant au genre *Prevotella* et l'utilisation d'une approche taxonomique mixte et consensuelle nous a permis de valider cette hypothèse. La souche LBN 293^T, impliquée dans l'échec thérapeutique décrit ci-dessus, a été désignée comme étant la souche type de cette nouvelle espèce car il s'agissait de la première souche isolée. Ce travail a fait l'objet d'une publication dans l'*International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*.

I. ETUDE DES CARACTERES PHENOTYPIQUES

1. Caractères morphologiques et ultrastructure

Cette nouvelle espèce de *Prevotella* se présente sous la forme de petits bacilles à Gram négatif, anaérobies stricts, immobiles et non sporulés. Après quatre jours d'incubation en anaérobiose sur milieu BBA, ils se présentaient sous la forme de colonies circulaires de 0.5 à

1 mm de diamètre, lisses, blanches, entourées d'une zone d'hémolyse β et ne développant pas de pigmentation (Figure 57).



Figure 57. Photographie de la culture de la souche *Prevotella* sp. nov. LBN 293^T sur milieu BBA.

L'observation de la souche LBN 293^T après coloration négative, effectuée par la Plate-forme de Microscopie Électronique de l'Institut Pasteur de Paris, a montré qu'il s'agissait de bacilles de 0.4 à 0.5 μm de large sur 0.5 à 1 μm de long (Figure 58A). L'observation de cette même souche en MET (Faculté de Médecine de Nancy) a permis de mettre en évidence l'existence d'une paroi bactérienne typique de bactérie à Gram négatif avec une mince couche de peptidoglycane entourée d'une membrane externe (Figure 58B).

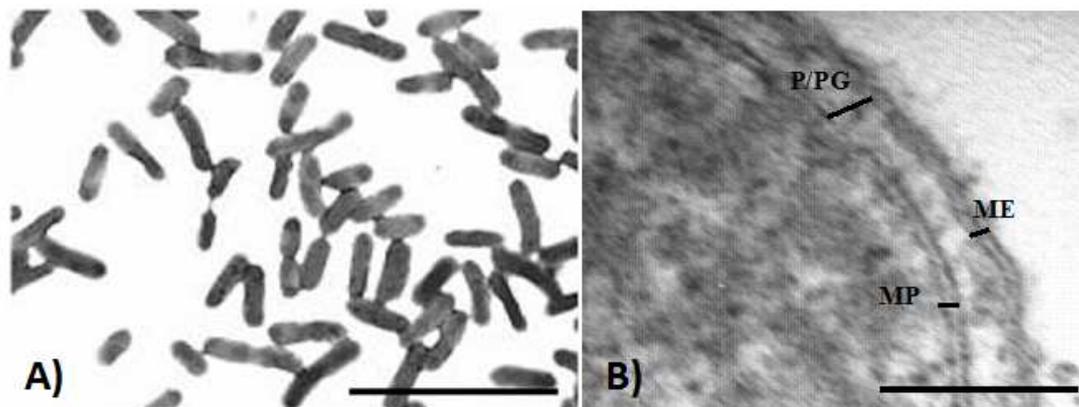


Figure 58. Photographies des observations de la souche LBN 293^T.
A) Morphologie générale après coloration négative (échelle = 5 μm). **B)** Ultrastructure de coupes ultrafines en MET (échelle = 50 nm). Les membranes plasmique et externe (**MP** et **ME**), le peptidoglycane (**PG**) et le périplasm (**P**) sont indiqués.

2. Caractères métaboliques

Les souches LBN 293^T, LBN 297 et LBN 298 étaient sensibles à la bile (comprimé à 1 mg) et résistantes à la kanamycine (disque à 1 mg), à la vancomycine (comprimé à 5 μg) et à la colistine (comprimé à 10 μg). Ces souches étaient glucidolytiques. Les résultats des tests obtenus en galeries Rapid ID 32A et en galeries API 20A sont présentés dans la Tableau 42.

Tableau 42. Résultats des différents tests obtenus avec les galeries Rapid ID 32A et API 20A pour les souches LBN 293^T, LBN 297 et LBN 298. +, positif ; -, négatif ; v, variable.

Galerie Rapid ID 32A		Galerie API 20A	
Uréase (URE)	-	Production d'indole (IND)	-
Arginine Dihydrolase (ADH)	-	Uréase (URE)	-
α Galactosidase (α GAL)	+	Glucose* (GLU)	+
β Galactosidase (β GAL)	+	Mannitol* (MAN)	-
β Galactosidase-6-Phosphate (β GP)	+	Lactose* (LAC)	+
α Glucosidase (α GLU)	+	Saccharose/sucrose* (SAC)	+
β Glucosidase (β GLU)	v	Maltose* (MAL)	+
α Arabinosidase (α ARA)	-	Salicine* (SAL)	-
β Glucuronidase (β GUR)	-	Xylose* (XYL)	-
N-acétyl- β -Glucosaminidase (β NAG)	+	Arabinose *(ARA)	-
Fermentation du Mannose (MNE)	v	Hydrolyse gélatine (GEL)	-
Fermentation du RAffinose (RAF)	v	Hydrolyse esculine (ESC)	+
Ac. Glutamique Décarboxylase (GDC)	-	Glycérol (GLY)	-
Alpha Fucosidase (α FUC)	+	Cellobiose* (CEL)	v
Réduction des nitrates (NIT)	-	Mannose* (MNE)	+
Production d'Indole (IND)	-	Mélezitose* (MLZ)	-
Phosphatase Alcaline (PAL)	+	Raffinose* (RAF)	+
Arginine Arylamidase (ArgA)	-	Sorbitol* (SOR)	-
Proline Arylamidase (ProA)	-	Rhamnose* (RHA)	-
Leucyl Glycine Arylamidase (LGA)	+	Tréhalose* (TRE)	-
Phénylalanine Arylamidase (PheA)	-	Catalase (CAT)	-
Leucine Arylamidase (LeuA)	-	Formation de spores (SPOR)	-
Ac. Pyroglutamique Arylamidase (PyrA)	-	Coloration de Gram (GRAM)	-
Tyrosine Arylamidase (TyrA)	-		
Alanine Arylamidase (AlaA)	+		
Glycine Arylamidase (GlyA)	-		
Histidine Arylamidase (HisA)	-		
Glutamyl ac. Glutamique Arylamidase (GGA)	+		
Sérine Arylamidase (SerA)	-		

* Acidification

Les galeries Rapid ID 32A et API 20A ont respectivement donné les profils suivants : 4 7 0/1 1/5/7 4 4 0 2 2 2 et 4 6 1 4 4/6 2 0 0 . Le xylane n'a pas été fermenté par les souches de cette nouvelle espèce et les principaux produits terminaux du métabolisme détectés ont été les acides acétique, lactique et succinique.

3. Composition en acides gras cellulaires

La nature des acides gras cellulaires de la souche LBN 293^T déterminée par la DSMZ est présentée dans le Tableau 43 où elle est comparée à celles des espèces les plus proches sur la base du gène de l'ARNr 16S.

Tableau 43. Pourcentage relatif des acides gras cellulaires des souches *Prevotella* sp. nov. LBN 293^T (1), *P. loescheii* JCM 8530^T (2), *P. shahii* EHS11^T (3) et *P. marshii* E9.34^T (4) (82, 286). -, non détecté.

Acide gras*	1	2	3	4
Linéaires:				
C _{14:0}	1.84	2.50	10.90	1.00
C _{15:0}	1.66	0.50	1.00	8-14
C _{16:0}	21.61	16.70	16.90	1.00
3-OH-C _{16:0}	7.13	8.50	16.30	-
C _{17:0}	0.70	-	-	1.00
C _{18:0}	1.32	3.40	2.80	-
C _{18:1} ^{ω9c}	2.67	12.30	18.70	-
C _{18:2} ^{ω9,12c}	6.97	4.50	8.90	-
Branchés:				
iso-C _{13:0}	0.79	-	-	2-4
iso-C _{14:0}	4.29	2.00	4.40	5-8
iso-C _{15:0}	9.33	8.90	3.40	14-20
anteiso-C _{15:0}	16.13	22.10	6.80	54-59
iso-C _{16:0}	1.27	0.70	1.00	1.00
iso-C _{17:0}	0.89	-	-	1.00
anteiso-C _{17:0}	0.69	0.60	-	1.00
Hydroxylés:				
3-OH-C _{16:0}	7.13	8.50	16.30	-
3-OH-anteiso-C _{17:0}	0.87	-	-	-
Summed feature 1: (C _{13:1} ^{ω12c} et/ou C _{14:0} aldéhyde)	1.45	tr (<0.5%)	0.90	-
Summed feature 11: (3-OH-iso-C _{17:0} et/ou C _{18:2} diméthylacétal)	15.22	7.80	1.30	-

* les isomères ayant une configuration en *cis* sont indiqués par le suffixe *c*.

La comparaison de ce profil d'acides gras cellulaires dans la base de données MIDI (version 3.8) montre que la souche LBN 293^T ne présente qu'un faible taux de similarité avec l'espèce *P. loescheii* (0.106). Un taux important de "summed feature 11", constitué de 3-OH-iso-C_{17:0} et/ou de C_{18:2} diméthylacétal, ainsi qu'une faible proportion de C_{18:1}^{ω9c} permettent de distinguer la nouvelle espèce des espèces les plus proches.

II. ÉTUDE DES CARACTÈRES GÉNOMIQUES

1. Détermination du G+C%

La composition en G+C de la souche *Prevotella* sp. nov. LBN 293^T déterminée par la DSMZ était de 39.4 mol%. Cette valeur est compatible avec celles retrouvées pour les autres espèces du genre *Prevotella* (Tableau 5), tout en étant clairement distincte des valeurs décrites pour *P. marshii* (51.0 mol%) et *P. shahii* (44.3 mol%), les deux espèces génotypiquement les plus proches.

2. Détermination de la taille du chromosome et du profil de restriction ribosomique par électrophorèse en champ pulsé

La migration sans digestion des chromosomes bactériens intacts (Figure 59A) a montré que toutes les souches testées possédaient un chromosome circulaire unique. En effet, seuls les chromosomes linéaires peuvent entrer dans le gel d'agarose. L'aspect en bande diffuse, de haut poids moléculaire et de très faible intensité, suggère qu'il s'agit de chromosomes circulaires dont un petit nombre a été linéarisé au hasard (171). Aucun élément extra-chromosomique de grande taille n'a été détecté.

Les trois souches de la nouvelle espèce avaient un génome d'une taille approximative de 3.02 Mb (LBN 293) à 3.09 Mb (LBN 297 et 298). Ces valeurs sont similaires à la taille estimée pour la souche *P. marshii* DSM 16973^T (2.95 Mb) mais sont distinctes de celle estimée pour la souche *P. shahii* DSM 15611^T (4.01 Mb). Les pulsotypes obtenus après

digestion par l'enzyme I-CeuI (Figure 59B) ont montré que toutes les souches testées possédaient quatre opérons *rrn*. Les profils de migration des souches LBN 293^T, LBN 297 et LBN 298 étaient similaires et clairement différents de ceux observés pour les deux espèces les plus proches génétiquement.

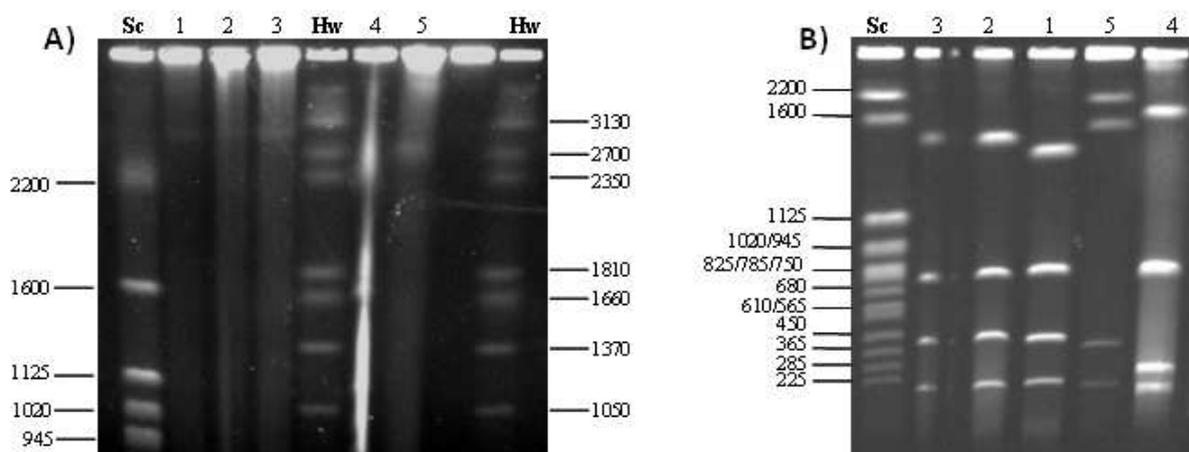


Figure 59. Photographie de la migration électrophorétique en champ pulsé du chromosome bactérien intact (A) ou après digestion par I-CeuI (B).

Marqueurs de taille (en Kb) : chromosomes de *Saccharomyces cerevisiae* (Sc) ou de *Hansenula wingei* (Hw). 1. *Prevotella* sp. nov LBN 293^T ; 2. *Prevotella* sp. nov LBN 297 ; 3. *Prevotella* sp. nov LBN 298 ; 4. *P. marshii* DSM 16973^T ; 5. *P. shahii* DSM 15611^T.

III. ANALYSE PHYLOGENETIQUE

Les relations phylogénétiques entre les séquences d'ADNr 16S des trois souches cliniques LBN 293^T (n° d'accèsion AY957555), LBN 297 (n° d'accèsion EF405529) et LBN 298 (n° d'accèsion EF405530) et celles des autres espèces de *Prevotella* décrites en mai 2007 sont représentées par la Figure 60.

Cet arbre montre que ces trois souches forment avec la séquence du clone oral BI027 (AY005064) un groupe homogène, robuste et distinct des autres groupes inclus dans le genre *Prevotella*. L'appartenance des espèces *P. tanneriae*, *P. heparinolytica* et *P. zoogloiformans* au genre *Prevotella* semble exclue par cet arbre, en accord avec des données précédentes (251, 252, 260).

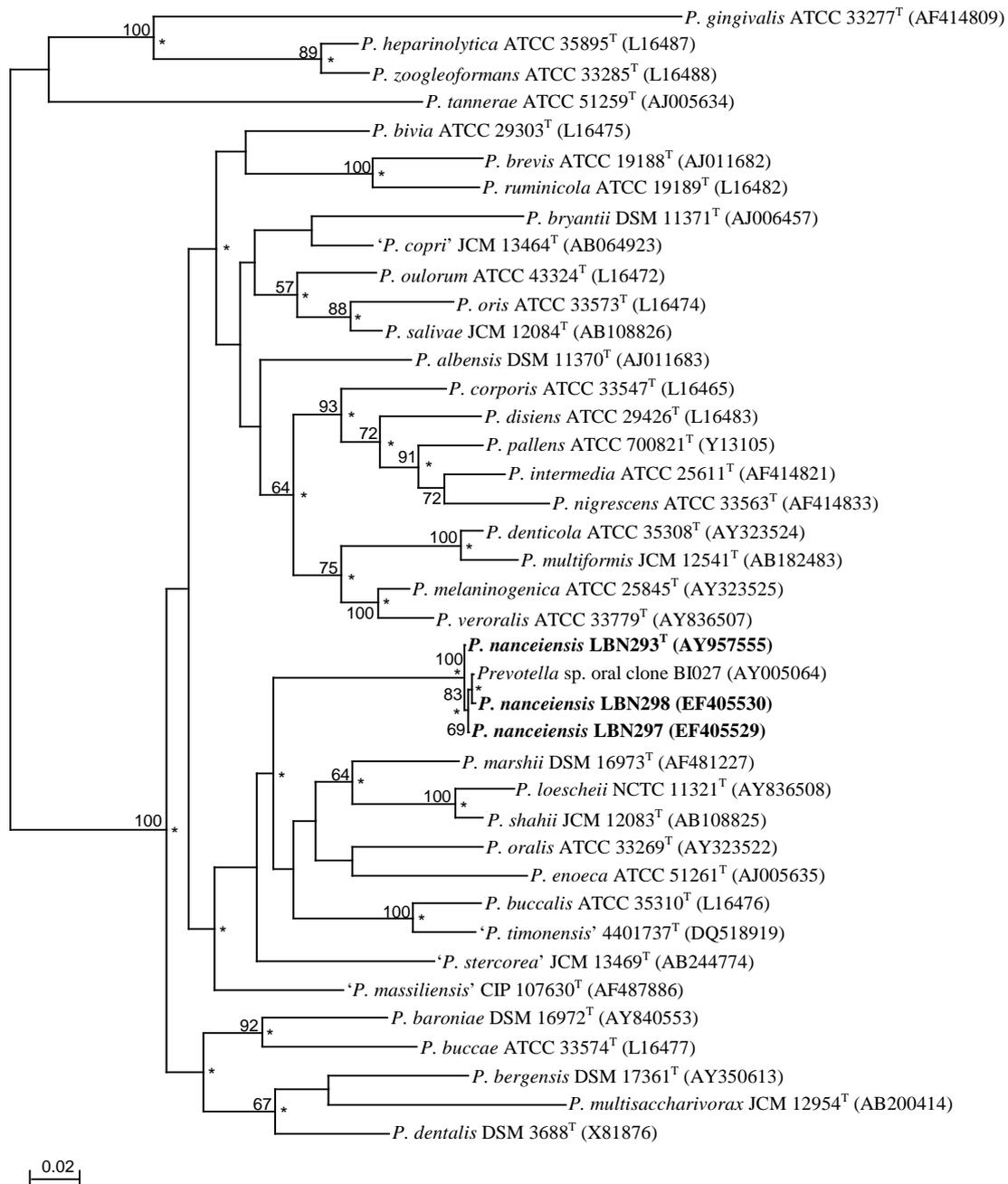


Figure 60. Arbre phylogénétique montrant les relations évolutives entre les trois souches cliniques constituant la nouvelle espèce *Prevotella nanceiensis* et les espèces du genre *Prevotella*.

Cet arbre a été généré par ML à partir de séquences partielles d'ADNr 16S. La séquence de *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277^T a été utilisée en tant qu'*outgroup*. Les astérisques signalent les nœuds retrouvés par les méthodes de Neighbor-Joining (F84) et de parcimonie. Les valeurs de bootstrap supérieures à 50 sont indiquées au niveau des nœuds majeurs. L'échelle correspond à deux substitutions pour 100 nucléotides.

IV. APPROCHE MIXTE ET CONSENSUELLE : DESCRIPTION DE LA NOUVELLE ESPECE *PREVOTELLA NANCEIENSIS*

L'intégration des résultats de ces différentes analyses nous a conduit à proposer la création d'une nouvelle espèce regroupant les souches LBN 293^T, LBN 298 et LBN 297.

Ces trois souches présentaient des profils phénotypiques similaires et compatibles avec les caractéristiques du genre *Prevotella*. Les caractères permettant de différencier les souches de cette espèce des autres espèces les plus proches phénotypiquement sont indiqués dans le Tableau 44. Ce tableau montre que les souches de la nouvelle espèce sont très proches phénotypiquement des espèces *P. buccalis* et *P. veroralis*. Cependant, contrairement à la nouvelle espèce, *P. buccalis* produit une arginine arylamidase et *P. veroralis* fermente le xylane.

Tableau 44. Principales caractéristiques phénotypiques permettant de différencier *Prevotella* sp. nov. des espèces les plus proches de *Prevotella* spp.

1, *Prevotella* sp. nov. ($n = 3$) ; **2**, *P. bivia* ; **3**, *P. disiens* ; **4**, *P. buccalis* ; **5**, *P. enoeca* ; **6**, *P. oralis* ; **7**, *P. oulorum* ; **8**, *P. veroralis* ; **9**, *P. shahii* ; **10**, *P. marshii* ; **11**, *P. loescheii* (82, 167, 286, 297, 353, 372). +, positif ; -, négatif ; v, variable ; nd, non déterminé.

Caractéristiques	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Pigmentation	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Fermentation du:											
cellobiose	v*	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+
lactose	+*	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+
mannose	+*	+	-	+	v	+	+	+	+	v	+
raffinose	+*	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+
rhamnose	-*	-	-	-	nd	+	-	-	-	-	-
salicine	-*	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
saccharose	+*	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+
xylane	-	-	nd	-	nd	-	-	+	nd	nd	v
Hydrolyse de l'esculine	+*	-	-	+	v	+	+	+	-	-	+
Hydrolyse de la gélatine	-*	+	+	-	+	v	-	v	+	+	+
Catalase	-*	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-

* résultats obtenus avec les galeries d'identification API 20 A.

Les analyses génomiques vont également dans le sens d'un groupe distinct, tant au niveau du G+C% que de la taille estimée du chromosome et du profil de restriction ribosomique. La réalisation de l'hybridation ADN-ADN n'était, dans le cas présent, pas indispensable pour confirmer l'appartenance de ces trois souches à une nouvelle espèce compte tenu du

pourcentage de similarité largement inférieur à 97% des séquences d'ADNr 16S de ces souches avec les séquences des espèces les plus proches.

Enfin, d'un point de vue phylogénétique, ces souches forment un clade robuste pouvant être défini comme une nouvelle espèce à part entière que nous avons nommée *Prevotella nanceiensis* (nan.ce.i.en'sis. N.L. fem. adj., qui est issu de *Nanceium*, l'ancien nom de la ville de Nancy). Le clone oral BI027 (AY005064) peut être proposé comme '*Candidatus Prevotella nanceiensis*'. La souche type de cette espèce est la souche LBN 293^T = AIP 261-03^T = CIP 108993^T = CCUG 54409^T. Elle a été déposée dans la collection française de l'Institut Pasteur (CIP) et dans la collection suédoise de l'Université de Göteborg (CCUG).

Parmi les 188 souches de *Prevotella* spp. étudiées, dix se sont avérées appartenir à cette nouvelle espèce (LBN 293^T, LBN 297, LBN 298, LBN 410, LBN 428, LBN 431, LBN 471, LBP 57, LBP 66, LBP 84). Cinq ont présenté une sensibilité diminuée au métronidazole, en l'absence de gène *nim*, et la souche type a été impliquée dans un échec thérapeutique en lien avec cette résistance.

Publication N° 3 (Annexe F) :

Prevotella nanceiensis sp. nov., isolated from human clinical samples.

Alauzet C., Mory F., Carlier J. P., Marchandin H., Jumas-Bilak E., Lozniewski A.

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 2007, 57:2216-2220.

Prevotella spp. et résistance au métronidazole : description d'un nouveau gène *nim* intrinsèque à l'espèce *Prevotella baroniae*

Au cours de cette étude concernant la résistance au métronidazole chez *Prevotella* spp., la présence de gènes *nim* a été détectée chez sept souches appartenant exclusivement à l'espèce *P. baroniae*. Nous avons déterminé le sous-type de gène ainsi que son environnement génétique et sa localisation au sein du génome bactérien. Nous nous sommes ensuite intéressés aux relations évolutives entre ce nouveau gène *nim* et les autres gènes codant des nitroimidazole réductases, d'une part chez les bactéries anaérobies mais également chez d'autres bactéries. Une partie de ce travail a fait l'objet d'une publication dans le journal *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.

I. IDENTIFICATION DU GÈNE *NIM* DE *P. BARONIAE*

L'amplification à l'aide des amorces universelles NIM-3 et NIM-5 a permis d'obtenir un amplicon d'environ 460 pb pour sept souches cliniques dont l'identification en tant que *P. baroniae* a nécessité le séquençage de l'ADNr 16S. Un amplicon de même taille a été détecté chez la souche type *P. baroniae* DSM 16972^T. Les numéros d'accession sous lesquels les différentes séquences ont été déposées dans la *GenBank* sont disponibles dans le Tableau 45.

L'analyse des séquences de ces huit gènes *nim* a montré qu'il s'agissait d'un seul et même gène sur la base d'une similarité de séquences variant de 97.1 à 100%. Ce gène était distinct des gènes *nimA* à -*G* déjà décrits, et du gène *nimH* en cours de description chez *B. fragilis* par Hélène Marchandin (équipe DIBOP). La séquence (FJ940883) de ce nouveau gène chez la souche type partageait 63.8% de ses nucléotides avec *nimH* (FJ969397), 63.2% avec *nimF* (AJ515145), 62.8% avec *nimD* (X76949), 62.5% avec *nimG* (112), 62.1% avec *nimC*

(X76948), 61.7% avec *nimE* (AJ244018), 60.1% avec *nimA* (X71444) et 59.7% avec *nimB* (X71443).

Tableau 45. Types d'infection et numéros d'accession des souches de *P. baroniae*.

No de souche	Type d'infection	N° d'accession	
		gène <i>nimI</i>	ADNr 16S
LBN 427	tête et cou	FJ940884	FJ940875
LBN 430	intra-abdominal	FJ940885	FJ940876
LBN 432	tête et cou	FJ940886	FJ940877
LBN 466	peau et tissus mou	FJ940890	FJ940878
LBN 475	tête et cou	FJ940887	FJ940879
LBP 9	pleuro-pulmonaire	FJ940889	FJ940880
LBP 19	tête et cou	FJ940888	FJ940881
DSM 16972 ^T	tête et cou	FJ940883	FJ940882

La séquence protéique déduite du gène *nim* de *P. baroniae* DSM 16972^T présentait 55.9 à 64.4% de similarité avec les séquences des protéines NimA à NimH. Cette nouvelle nitroimidazole réductase potentielle a été nommée NimI et son gène *nimI*. Ce gène *nimI* n'a pas été détecté chez 34 souches types des 45 autres espèces de *Prevotella* validées à ce jour (dont *P. nanceiensis*) (Tableau 17).

Il est intéressant de noter que pour les souches *nimI*-positives, les CMI du métronidazole sont comprises entre 1 et 4 µg/ml (méthode de dilution en milieu gélosé), sans apparition de CCL après incubation prolongée (méthode du Etest). Cependant, des sous-populations résistantes (CMI, 64-256 µg/ml) ont pu être sélectionnées pour les quatre souches cliniques testées (LBN 427, LBN 430, LBN 432 et LBN 475) ainsi que pour la souche type DSM 16972^T (CMI, 16 µg/ml). Nous n'avons observé en post-induction ni différence dans la séquence du gène *nim*, ni acquisition d'IS connues.

II. ANALYSE DE L'ENVIRONNEMENT GENETIQUE DU GENE *NIMI*

Les séquences d'insertion qui ont été décrites en association avec un gène *nim* (*IS1168*, *IS1169*, *IS1170*, *IS612* et *ISBf6*) ont été recherchées chez les souches *nimI*-positives. Seule l'*IS1168* a été détectée dans le génome de *P. baroniae* DSM 16972^T. Cependant, nous avons montré que cette IS ne se situait pas en amont du gène *nimI*. Par ailleurs, la séquence obtenue

après séquençage inverse à partir du fragment NIM3-NIM5 de la souche *P. baroniae* DSM 16972^T a permis de mettre en évidence l'absence de structure de type IS en amont du gène.

III. LOCALISATION DU GENE *NIM1*

Aucun plasmide n'a été détecté dans les huit souches de *P. baroniae* ainsi que dans la souche BF8 de *B. fragilis*. Un plasmide de 7-8 Kb a été extrait de la souche *B. fragilis* 638R(pIP417) et l'hybridation avec une sonde *nimA* a montré que ce plasmide était bien porteur du gène *nimA*, en accord avec les résultats attendus (Tableau 12).

L'hybridation des fragments obtenus après digestion de l'ADNg par *EcoRI* s'est révélée positive pour les huit souches *nimI*-positives en utilisant une sonde *nimI* (Figure 61), alors qu'elle ne s'est révélée positive que pour la souche BF8 en utilisant une sonde *nimB*. Aucune hybridation n'a été obtenue avec la sonde *nimA*.

Ces résultats ont montré que le gène *nimI* était présent en copie unique sur le chromosome des souches de *P. baroniae*.

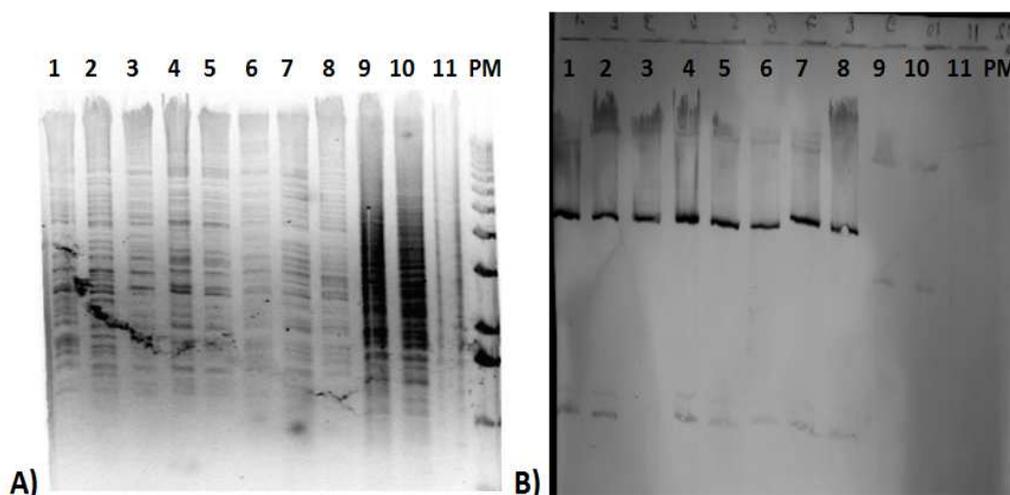


Figure 61. Photographies de l'électrophorèse après digestion par *EcoRI* (A) et de l'hybridation de ce gel sur membrane de nylon et révélation par une sonde *nimI* (B).
1, *P. baroniae* LBN 427 ; **2,** *P. baroniae* LBN 430 ; **3,** *P. baroniae* LBN 432 ; **4,** *P. baroniae* LBN 466 ;
5, *P. baroniae* LBN 475 ; **6,** *P. baroniae* LBP 19 ; **7,** *P. baroniae* LBP 9 ; **8,** *P. baroniae* DSM 16972^T ;
9 et 10, *B. fragilis* 638R(pIP417) ; **11,** *B. fragilis* BF8 ; **PM,** marqueur de poids moléculaire 1 Kb.

IV. CARACTERE INTRINSEQUE DU GENE *NIMI* ?

Ce travail a montré que tous les isolats de *P. baroniae* testés, isolés à Nancy (n=5), à Poitiers (n=2) ou au Royaume-Uni (souche type) possédaient ce nouveau gène *nimI*. Ce gène a également été détecté dans de nouvelles souches de *P. baroniae* isolées au Laboratoire de Bactériologie du CHU de Nancy alors qu'il n'a été détecté ni chez les 181 autres souches cliniques de l'étude, ni chez les 34 souches types de *Prevotella* testées.

Par ailleurs, l'arbre phylogénétique basé sur les séquences protéiques des principales nitroimidazoles réductases bactériennes montrent que les séquences de NimI forment un groupe homogène et distinct des autres sous-types de Nim (Figure 62).

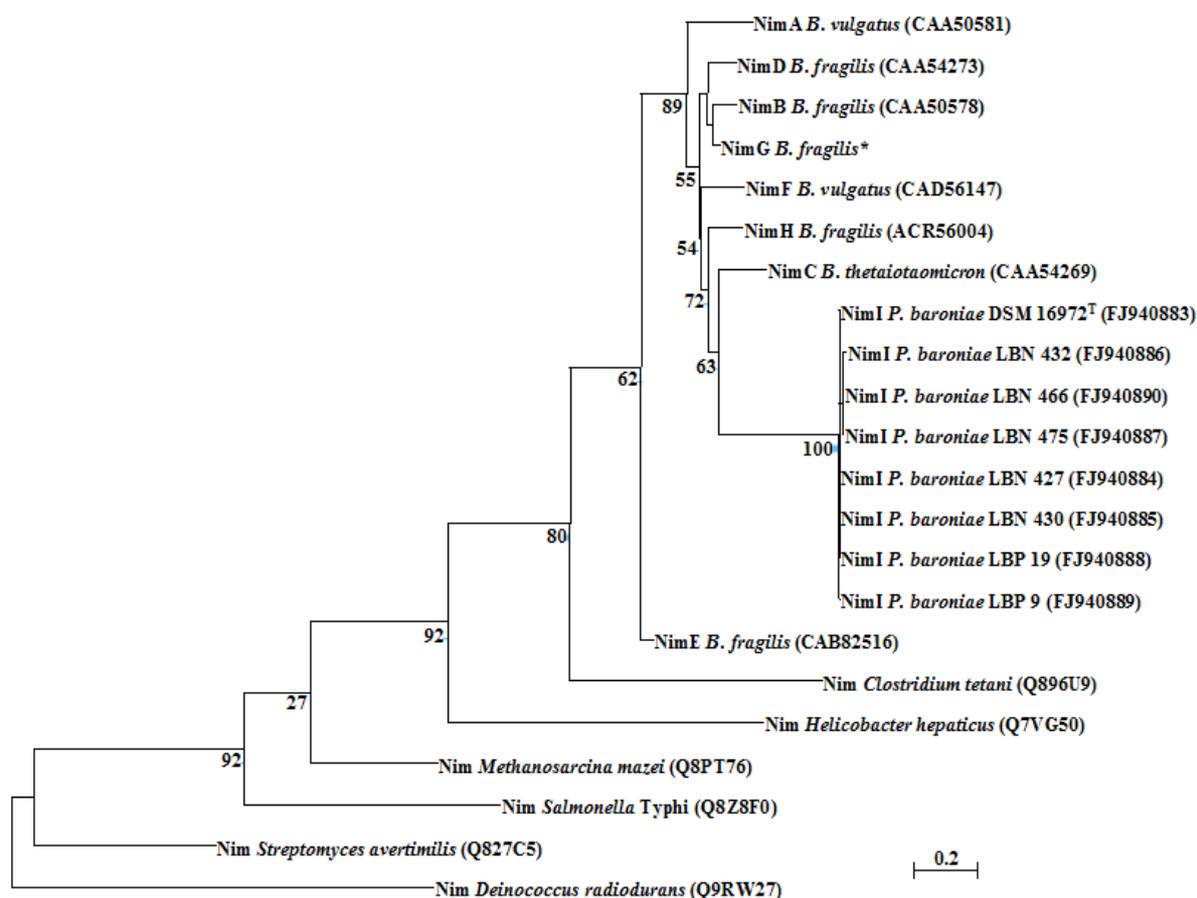


Figure 62. Arbre phylogénétique basé sur l'alignement des séquences d'acides aminés des NimI et des principales nitroimidazoles réductases décrites dans le monde bactérien.

Cet arbre a été généré par ML. Les valeurs de bootstrap (pour 100 ré-échantillonnages effectués) sont indiquées au niveau des nœuds. * La séquence de NimG a été déduite de celle de *nimG* disponible dans la publication de Gal et coll. (2004) (112). L'échelle correspond à 20 substitutions pour 100 nucléotides.

Ces résultats, ainsi que la localisation chromosomique de *nimI*, suggèrent une origine intrinsèque de ce gène chez l'espèce *P. baroniae*. A notre connaissance, l'ensemble des gènes *nim* décrits à ce jour ont été acquis par des espèces ne les possédant pas initialement (Tableau 12). Pour confirmer notre hypothèse, il sera cependant nécessaire d'étudier un plus grand nombre de souches. Une telle étude semble néanmoins difficile car *P. baroniae* est *a priori* une espèce rarement isolée, ceci pouvant s'expliquer en partie par la nécessité de recourir en routine à l'utilisation du séquençage de l'ADNr 16S pour une identification d'espèce.

Publication N° 4 (Annexe G) :

Metronidazole resistance in *Prevotella* spp. and description of a new *nim* gene in *Prevotella baroniae*.

Alauzet C., Mory F., Teyssier C., Hallage H., Carlier J. P., Grollier G., Lozniewski A. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Octobre 2009. [Epub ahead of print].

DISCUSSION

L'utilisation d'une approche mixte et consensuelle nous a permis, dans un premier temps, de clarifier la position taxonomique et la nomenclature d'un groupe de bactéries pathogènes présentant une résistance de bas niveau à la vancomycine et appartenant à une famille taxonomique en plein remaniement, les *Clostridiaceae*. Dans un deuxième temps, cette approche, appliquée dans le cadre d'une étude sur la résistance au métronidazole des *Prevotella* spp., a conduit à la découverte d'une nouvelle espèce, *Prevotella nanceiensis* (dont la résistance au métronidazole a été impliquée dans un échec thérapeutique) et à la caractérisation d'un nouveau gène codant une nitroimidazole réductase, *nimI*. Ce gène semble présent de façon intrinsèque chez *Prevotella baroniae*, espèce peu connue dont la place en pathologie humaine est encore mal définie.

Ainsi, cette approche a démontré son efficacité à la fois d'un point de vue fondamental dans le cadre de reclassifications taxonomiques, mais aussi d'un point de vue appliqué, dans le cadre d'une étude concernant un groupe bactérien taxonomiquement robuste afin de répondre à certaines questions évolutives et d'identification.

De nombreuses méthodes peuvent être utilisées afin d'étudier les caractères phénotypiques, génotypiques, génomiques et phylogénétiques des bactéries. Chaque marqueur apporte des informations particulières applicables à des niveaux taxonomiques variables. Le choix de chaque méthode est donc crucial afin de répondre au mieux aux questions évolutives posées.

Face à l'importante diversité bactérienne, les méthodes phénotypiques nécessitent d'avoir recours à des profils incluant un grand nombre de marqueurs validés sur un grand nombre de souches afin de constituer des bases de données phénotypiques robustes. Ceci se heurte à la difficulté de créer ces bases de données en raison d'un faible nombre d'isolats servant à la description des espèces et/ou à l'hétérogénéité des marqueurs utilisés en fonction des études. Une limite supplémentaire est représentée par l'existence d'espèces ne se caractérisant que par un très faible nombre de critères phénotypiques, tout du moins dans la limite des marqueurs testés par le plus grand nombre des laboratoires. Ces limites expliquent que l'approche phénotypique est difficilement applicable à certains groupes bactériens et soulignent la nécessité de recourir à des méthodes génétiques, voire génomiques, à des fins

d'identification. La limite liée à un faible nombre de souches est un phénomène récurrent pouvant être lié, du moins en partie, à la grande diversité des bactéries commensales et environnementales nouvellement décrites dont le pouvoir pathogène non spécifique peut expliquer leur faible fréquence d'isolement. Cette limite concerne en particulier la description princeps de l'espèce *P. baroniae*, dont les caractères phénotypiques n'ont pu être déterminés que sur six souches (82), ainsi que la nouvelle espèce de *Tissierella* que nous avons décrite à l'aide de cinq souches. Ceci explique que les marqueurs phénotypiques caractérisant *P. baroniae* ne permettent pas d'identifier cette espèce en routine alors que ceux décrits pour *Tissierella* sp. nov. ne permettent pas, à eux seuls, de la différencier de façon fiable de l'espèce *T. praeacuta*. Pour ce qui concerne la plupart des *Tissierella* spp. et des bactéries apparentées, un autre frein à l'étude de ces caractères est représenté par la difficulté de les obtenir en culture.

Autrefois à la base de la classification bactérienne, les caractères phénotypiques ne présentent plus le même intérêt pratique à l'heure actuelle. Ces caractères peuvent être variables selon le stade de croissance de la bactérie ou la méthodologie employée. Ils peuvent être naturellement différents au sein d'une même espèce et/ou être contrôlés par des gènes plasmidiques, sujets à perte ou gain selon les pressions de sélection environnantes, ou par des gènes silencieux. Depuis toujours, l'aspect après coloration de Gram et la capacité de sporuler ont été considérés comme des éléments essentiels de la classification phénotypique. Notre étude, ainsi que d'autres, ont montré que ces caractères ne reflétaient pas systématiquement la réalité (44, 153, 166, 173). Ainsi, une paroi de type monoderme a été observée chez *T. praeacuta* et *Flavonifractor plautii* qui avaient été anciennement et classés en tant que bacilles à Gram négatif, respectivement dans les genres *Bacteroides* et *Fusobacterium*. Dans notre étude, nous avons montré que, malgré l'absence de formation de spores par la souche *T. praeacuta* ATCC 25539^T et l'ex *Eubacterium plautii* ATCC 29863^T, celles ci possédaient les gènes impliqués dans le processus de sporulation. Ceci concorde avec leur positionnement taxonomique au sein d'espèces dont les membres sont majoritairement sporulés et souligne l'importance de différencier les bactéries asporulées des non sporulées (29, 253).

Malgré les limites de l'approche phénotypique, des marqueurs plus robustes peuvent néanmoins être utilisés pour caractériser certains taxons bactériens comme par exemple la capacité de cliver la quercétine chez *F. plautii* (ce qui le différencie de *Pseudoflavonifractor capillosus*) ou le caractère syntrophique des genres *Syntrophomonas*, *Syntrophothermus* et *Thermosyntropha* au sein de la famille *Syntrophomonadaceae* (173, 216). L'étude des

caractères phénotypiques constitue par ailleurs la base de description des taxons car ces caractères sont nécessaires pour déterminer un système de classification adapté aux besoins des microbiologistes (344, 355). Ces sont ces caractères qui sont majoritairement le point de départ, dans le monde médical comme dans ce travail, d'observations menant à la découverte de nouveaux pathogènes et/ou de nouveaux mécanismes de résistance ou de virulence (en association avec des caractères cliniques).

L'étude des caractères génétiques peut permettre de combler certaines limites de l'approche phénotypique. La détection de gènes d'intérêt est utilisée pour confirmer la nature des observations phénotypiques (exemple : mécanismes moléculaires de résistance) ou pour caractériser la présence de marqueurs de virulence ou de résistance silencieux (exemple : gène *nimI*). Le séquençage de gènes tels que celui de l'ARNr 16S, des gènes de ménage ou des gènes spécifiques d'espèces, peut être utilisé pour la détection et l'identification des espèces bactériennes. La caractérisation du gène *nimI*, spécifique *a priori* de l'espèce *P. baroniae*, ainsi que celle du gène de l'ARNr 16S de la nouvelle espèce de *Tissierella* s'inscrivent dans cette perspective. Cependant, si l'on souhaite utiliser ces marqueurs pour répondre à des questions concernant les relations évolutives des bactéries, il est nécessaire d'analyser les séquences nucléotidiques (ou protéiques) correspondantes par des approches phylogénétiques de plus ou moins grande ampleur.

Dans le cadre de ces études phylogénétiques, la première étape consiste à choisir les gènes qui permettront de répondre au mieux aux différentes questions posées. L'horloge moléculaire la plus utilisée en phylogénie bactérienne est le gène de l'ARNr 16S qui présente de nombreux avantages, décrits dans la partie introductive de ce travail, et qui permet de révéler des phénomènes évolutifs très anciens. Il a donc été utilisé dans notre étude en première intention pour l'ensemble des phylogénies effectuées. Des marqueurs alternatifs ont été utilisés pour compléter et/ou confirmer les résultats obtenus avec l'ADNr 16S. Les génomes complets des espèces étudiées n'étant pas disponibles, le choix de ces gènes s'est basé sur leur caractère "universel" ou, au contraire, spécifique d'un groupe bactérien donné, ainsi que sur leur utilisation par d'autres auteurs pour l'étude d'autres espèces (8, 22, 71, 88, 129, 180, 204, 236, 253). Dans le cadre de la description de *P. nanceiensis* sp. nov., le gène de la sous-unité β de l'ARN polymérase a permis de confirmer l'appartenance des trois souches cliniques de

Prevotella à une même nouvelle espèce. Pour l'étude des *Tissierella* spp., nous avons testé des gènes reflétant différentes fonctions cellulaires : synthèse et réparation des acides nucléiques (*rpoB*, *recA*), glycolyse (*tpi*), voie de détoxification (*sodA*), voies de signalisation intracellulaire (*dnaK*, *cpn60*) et sporulation (*spo0A*). Seuls trois gènes ayant une taille de 273 pb (*spo0A*), 360 pb (*recA*) et 489 pb (*tpi*) ont pu être utilisés pour les approches MLSA/MLST, les autres n'ayant pas permis l'obtention de séquences fiables pour un nombre suffisant de souches. Cette approche devra donc être complétée en utilisant d'autres gènes, ciblant également des fonctions cellulaires diverses et non soumis à une pression de sélection environnementale. L'idéal serait d'obtenir des séquences (400-500 pb) pour quatre gènes supplémentaires. Cependant, l'absence de données concernant le génome des genres *Tissierella* et apparentés complique fortement l'obtention de ces données.

Par ailleurs, ce travail souligne l'impact du choix des séquences dans l'interprétation de la phylogénie. En effet, l'échantillonnage taxonomique est un paramètre fondamental pour toute analyse phylogénétique (58). Il doit refléter une représentation correcte de la diversité et de l'évolution au sein du groupe d'intérêt. Pour cela nous avons sélectionné des bibliothèques de séquences spécifiques à chaque question phylogénétique posée, chacune étant constituée à la fois de séquences de souches types, d'isolats identifiés ou non au rang de l'espèce, et de clones (humains, animaux ou environnementaux). Selon les séquences avec lesquelles les gènes étudiés sont comparés, l'arbre résultant ne donnera pas les mêmes informations. Ainsi, au cours des premières analyses phylogénétiques des souches cliniques de *T. praeacuta*/*C. hastiforme*, la comparaison avait été effectuée vis à vis de 27 autres espèces ou sous-espèces de *Clostridium* appartenant au cluster I selon Collins (Figure 63A) et l'interprétation de l'arbre avait montré que ces souches formaient un groupe robuste distinct de tous les autres (50). L'arbre proposé par Farrow et coll. (1995) (Figure 63B) lors du ralliement de *T. praeacuta* au phylum *Firmicutes* ne présentait quant à lui que les relations avec des membres des autres clusters de *Clostridium* selon Collins (50, 102). La place réelle de cette espèce au sein du phylum *Firmicutes*, de la classe *Clostridia* ou de la famille *Clostridiaceae* n'est donc pas démontrée et peut ainsi être mal interprétée.

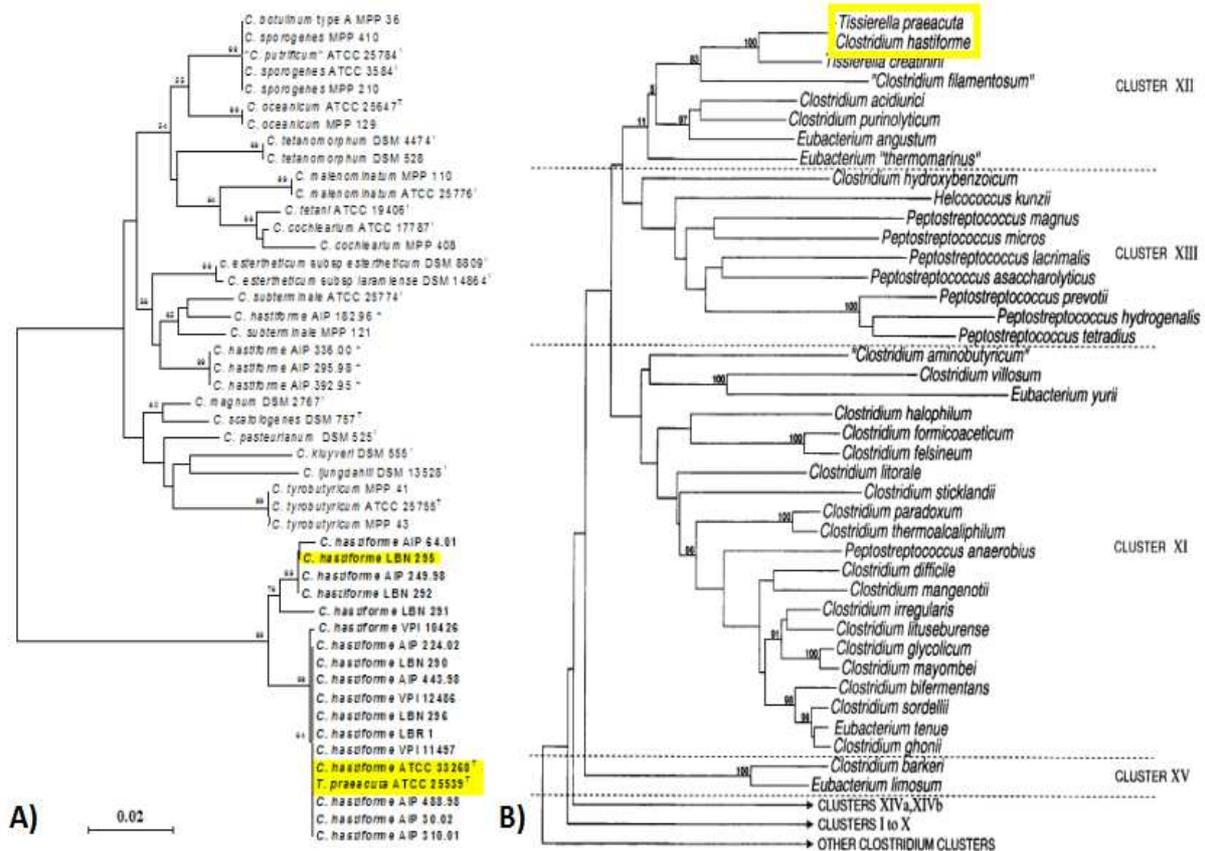


Figure 63. Dendrogrammes montrant les relations évolutives de l'espèce *T. praeacuta*/*C. hastiforme* avec les membres du cluster I (A) et des clusters XI, XII, XIII et XV (B) selon Collins et coll. (50, 102). L'arbre A avait permis de montrer que quatre isolats initialement identifiés en tant que *C. hastiforme* et présentant une sensibilité à la vancomycine étaient en réalité reliés à l'espèce *C. subterminale* (indiqués par un astérisque) et que les autres souches se divisaient probablement en deux groupes.

Parmi les 453 séquences utilisées pour l'étude des relations évolutives des souches de *Tissierella* spp., la majorité étaient disponibles dans la *GenBank*, notamment pour l'ADNr 16S. Les séquences des gènes de ménage des souches cliniques et des souches types ont dû être déterminées pour cette étude.

Enfin, pour ce qui concerne l'étude des caractères génomiques, la taxonomie bactérienne est en attente de nouveaux outils permettant de remplacer les techniques de référence actuelles que sont l'hybridation ADN-ADN et la détermination du G+C% (316, 377). Dans cette étude, l'analyse génomique par ECP après digestion par *I-CeuI* a montré à nouveau son apport en tant qu'outil taxonomique. Cette technique, encore peu utilisée dans la littérature, nous a permis de donner des arguments forts en faveur de l'appartenance des souches testées aux

nouvelles espèces de *Prevotella* et de *Tissierella* décrites dans cette étude. Comme rapporté pour *Bacteroides* spp. ou *Dialister* spp. (170, 299), des pulsotypes ribosomiques identiques ou similaires ont été obtenus pour des souches cliniques appartenant à l'espèce *Clostridium difficile*. Etant donné que la souche *C. difficile* 630 a été entièrement séquencée (n° d'accèsion NC_009089), il nous a été possible de vérifier les résultats obtenus concernant le nombre d'opérons ribosomiques. Au sein d'un génome de 4 290 252 pb, cette souche contient 11 opérons *rrn* très conservés (variation maximale de trois positions sur la séquence totale du gène codant l'ARNr 16S). L'enzyme I-CeuI coupant dans l'ARNr 23S, il a été possible de calculer les tailles de fragments d'ADN après action virtuelle de cette enzyme sur ce génome, ce qui a permis d'obtenir les possibilités suivantes : 5 394 pb, 6 947 pb, 10 549 pb, 14 212 pb, 99 127 pb, 142 656 pb, 155 885 pb, 230 015 pb, 832 038 pb, 855 148 pb, 1 938 281 pb. Les six plus gros fragments correspondent approximativement aux six bandes observées lors de l'ECP après digestion par I-CeuI (Figure 64).

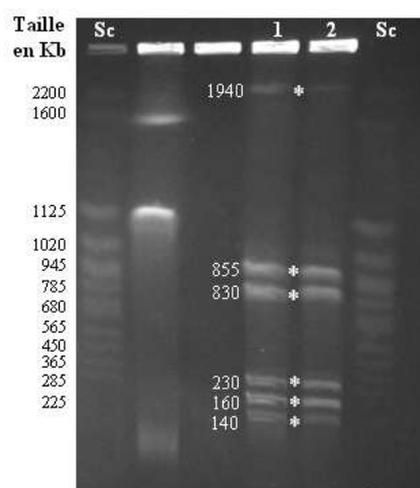


Figure 64. Photographie de la migration électrophorétique en champ pulsé après digestion par I-CeuI, notamment des souches de *C. difficile* CD33 (1) et CD34 (2).

Les bandes pouvant correspondre aux fragments attendus après analyse de la séquence génomique de *C. difficile* 630 sont indiquées par une étoile ainsi que leur taille approximative (en Kb). Sc, chromosomes de *Saccharomyces cerevisiae* servant de marqueur de taille.

Les fragments de taille inférieure à 100 000 pb ne sont pas visibles par cette technique. La cartographie chromosomique par ECP après restriction I-CeuI n'est donc pas idéale pour analyser de façon certaine le nombre d'opérons d'un génome. Cependant, en l'absence de génome total, elle apporte de nombreuses réponses au niveau génomique. Les résultats obtenus pour les fragments > 100 Kb par ECP après digestion par I-CeuI de *C. difficile* nous ont permis de valider cette approche et ont montré la corrélation entre les résultats obtenus par cette technique et ceux déduits du séquençage total du génome. Cette technique s'avère donc

être un bon outil taxonomique utilisable pour comparer les pulsotypes et estimer la taille génomique des bactéries.

Dans notre travail, l'application d'une approche taxonomique mixte et consensuelle au sein de la famille *Clostridiaceae* a conduit, d'une part, à la division d'une espèce préexistante, *T. praeacuta*, en deux espèces distinctes et, d'autre part, au rassemblement de deux espèces préexistantes en une seule, *F. plautii*.

Après une histoire pleine de rebondissements au sein des *Bacteroidetes*, Farrow et coll. avaient montré en 1995 que, bien qu'il s'agissait d'une bactérie à Gram négatif, *T. praeacuta* appartenait au phylum *Firmicutes* et partageait plus de 99% de sa séquence d'ADNr 16S avec celle de *C. hastiforme* ATCC 33268^T (102). En 2004, Bae et coll. ont regroupé ces deux espèces en une seule sur la base d'un taux d'hybridation ADN-ADN de 96.5% (15). L'observation d'un test à la potasse positif a conduit ces auteurs à considérer que *T. praeacuta* était une bactérie à Gram positif. Ce test, utilisable en cas de doute sur les résultats d'une coloration de Gram, est basé sur la propriété qu'a la potasse de lyser la paroi des bactéries à Gram négatif, entraînant la formation d'une substance visqueuse par libération de l'ADN. Cependant, aucune étude structurale n'avait été effectuée pour valider cette observation. Dans le cadre de ce travail, nous avons montré pour la première fois que cette espèce bactérienne possédait une paroi de type Gram-positif. Pour *C. hastiforme* ATCC 33268^T et *T. praeacuta* ATCC 25539^T, un peptidoglycane de composition identique a été identifié. Par ailleurs, les analyses phylogénétiques basées sur les gènes *tpi*, *recA* et *spo0A* ont confirmé que ces deux souches appartenaient à une seule et même espèce. Un codon Stop arrêtant la synthèse de Spo0A au 31^{ème} acide aminé expliquait l'absence de sporulation décrit pour la souche ATCC 25539^T (15, 102, 155). En revanche, l'analyse conjointe de la composition du mucopeptide, des pulsotypes ribosomiques, de la taille génomique estimée et des relations évolutives, basées à la fois sur l'ADNr 16S et sur les gènes *tpi*, *recA* et *spo0A*, nous a permis de montrer que la souche LBN 295, ainsi que quatre autres souches cliniques initialement reliées à l'espèce *T. praeacuta*, formaient une nouvelle espèce dont la description va prochainement faire l'objet d'une publication. *T. praeacuta* ainsi que les espèces et genres apparentés sont

des bactéries retrouvées dans des environnements particuliers (boues d'épuration, source d'eau chaude). *T. creatinini*, *T. creatinophila*, *C. ultunense*, *S. acetigenes*, *S. saccharolytica* et *T. ferriphilum* sont des espèces thermotolérantes ou thermophiles (102, 143, 150, 259, 293, 309) et une bactérie proche de *T. praeacuta* (96% d'identité de séquence d'ADNr 16S) vient d'être décrite dans un digesteur anaérobie thermophile de lisier de porc (181). A notre connaissance, seules *T. praeacuta* et la nouvelle espèce *Tissierella* sp. nov. ont été associées à des pathologies humaines. La culture des autres espèces est très difficile et a nécessité la fabrication de milieux spécifiques complexes, ceci pouvant expliquer que ces espèces ne soient pas retrouvées en bactériologie clinique. Il ne faut donc pas sous-estimer le pouvoir opportuniste de telles bactéries, d'autant plus qu'elles semblent avoir un réservoir environnemental important, notamment au niveau des boues de station d'épuration. Ce travail a également permis de montrer que ce groupe d'espèces formait une nouvelle famille ou un nouvel ordre, et qu'associé au clade regroupant majoritairement des cocci à Gram positif anaérobies, il constituait très probablement une nouvelle classe.

Ce travail a par ailleurs permis de regrouper au sein d'une unique espèce, *Flavonifractor plautii*, deux espèces sur la base de leur taux d'hybridation ADN-ADN, de leur contenu en guanine et cytosine, de leur capacité à cliver la quercétine et des résultats de l'analyse phylogénétique (ARNr 16S). En 1982, l'espèce *Eubacterium plautii* avait été créée pour remplacer *Fusobacterium plautii* car Hofstadt et coll. avaient montré la présence d'une paroi monoderme (153). L'espèce *Clostridium orbiscindens* avait été créée en 1991 sur la base de résultats d'hybridation ADN-ADN et de composition en G+C (366). Lors de ces deux publications, la séquence de l'ADNr 16S n'avait pas été déterminée, expliquant sans doute pourquoi le rapprochement taxonomique de ces deux espèces n'avait pas été effectué. Ces résultats soulignent à nouveau l'importance d'une taxonomie claire et fiable en bactériologie médicale. En effet, bien qu'aucun cas d'infection à *C. orbiscindens* n'ait été rapporté jusqu'ici, *Flavonifractor plautii* sp. nov. peut être considéré comme pathogène opportuniste eu égard à nos observations mais aussi à celles faisant mention d'infections humaines à *E. plautii* (115, 254). *Flavonifractor plautii* sp. nov., qui peut être retrouvé dans la flore intestinale humaine, a la propriété de couper les liaisons C-3-C-4 du cycle aglycone de la quercétine et d'autres flavonoïdes qui sont ainsi inactivés (294). Schoefer et coll. (2003) ont montré que cette espèce était fréquemment retrouvée au niveau de la flore intestinale de sujets sains, du moins dans la limite de la population étudiée (n=10), où elle représentait 0.12% de la flore bactérienne

fécale. Ces molécules ayant des propriétés anti-oxydantes protectrices, l'impact de la présence dans le tube digestif de *Flavonifractor plautii* et son implication dans d'éventuels phénomènes de carcinogenèse restent à explorer.

A l'inverse des *Clostridiaceae*, les bactéries du genre *Prevotella* présentent une taxonomie bien définie. Ce sont des bactéries fréquemment retrouvées dans les infections humaines à bactéries anaérobies. Ces infections sont le plus souvent en rapport avec une translocation ou une diffusion par contiguïté à partir de sites colonisés par des flores commensales. La connaissance de l'évolution de la sensibilité aux antibiotiques et des mécanismes de résistance de ces bactéries nécessite une identification précise des différentes espèces. Actuellement, l'identification au rang d'espèce des *Prevotella* par les techniques phénotypiques classiquement utilisées en bactériologie de routine n'est pas toujours satisfaisante (222). Il est donc nécessaire, en particulier dans les infections sévères, d'avoir recours à une identification moléculaire et de définir des marqueurs phénotypiques ou génotypiques fiables. Par ailleurs, l'utilisation du séquençage de l'ADNr 16S, marqueur taxonomique robuste au sein de ce genre bactérien, permet de détecter les nouvelles espèces de *Prevotella* isolées en routine, comme dans notre étude qui a conduit à la description de *Prevotella nanceiensis*. Cette espèce représentait 5.3% (10/188) de l'ensemble des isolats que nous avons étudiés. Dans tous les cas, *P. nanceiensis* a été impliquée, seule ou en association avec d'autres espèces bactériennes, dans des infections sévères (infections pleuropulmonaires, n=6 ; infections intra-abdominales, n=2 ; bactériémie, n=1 ; infection cervico-faciale, n=1). La souche type, responsable d'une bactériémie, a été impliquée dans un échec thérapeutique lié à la sélection d'une résistance au métronidazole en l'absence de gène *nim*. Nous avons montré qu'une sous-population résistante au métronidazole pouvait être sélectionnée *in vitro* par contact prolongé avec cet antibiotique, indépendamment de la présence d'un gène *nim*. Chez *Bacteroides* spp., d'autres auteurs ont rapporté qu'une exposition au métronidazole pouvait entraîner une sélection de sous-populations résistantes (112, 211, 290). Celles-ci peuvent exprimer leur résistance même après le retrait de l'antibiotique, ou redevenir sensibles en l'absence de la pression antibiotique. Dans notre étude, des sous-populations résistantes (CMI, 128 à >256 µg/ml) ont pu être sélectionnées pour toutes les souches de *Prevotella* spp. testées ainsi que pour la souche *B. fragilis* ATCC 25285^T. Le phénotype de résistance observé était stable,

comme décrit par Schaumann et coll. (2005) (290). Gal & Brazier (2004) (112) ainsi que Löfmark et coll. (2005) (211) n'ont pas sélectionné de mutants résistants chez les souches *nim*-négatives incluant *B. fragilis* ATCC 25285^T. En revanche, à l'instar de nos résultats, d'autres auteurs ont sélectionné des mutants résistants au métronidazole chez des souches de *Bacteroides* spp., notamment la souche type de *B. fragilis*, ne possédant pas de gène *nim* (74, 290). Cette discordance de résultats pourrait s'expliquer, du moins en partie, par l'utilisation de protocoles différents de sélection de sous-populations.

Chez les souches ne possédant pas de gène *nim*, la résistance au métronidazole peut s'expliquer par une modification du système enzymatique POR. Cette modification peut être liée à des mutations des gènes correspondants, entraînant l'activation du nitroimidazole par réduction de son groupement NO₂ (Figure 27). Diniz et coll. (2004) ont décrit des mutations dans le gène *porA* codant la pyruvate-ferrédoxine oxydoréductase ainsi que dans le gène *fldA* codant la flavodoxine qui peut jouer le rôle de donneur d'électrons pour PorA (74). L'inactivation du système POR, responsable d'une diminution de l'activation du métronidazole, entraîne également une diminution de la pénétration intracytoplasmique de cet antibiotique, celle-ci étant dépendante de l'activité nitroréductrice bactérienne. L'altération de ce système enzymatique va par ailleurs dévier la synthèse énergétique de la voie de l'acétate vers celle de la fermentation homolactique (74, 90, 247). Il est intéressant de noter qu'une nette augmentation (x 4) de la production de lactate a été mise en évidence entre la souche de *P. nanceiensis* sensible au métronidazole LBN 293b (11 mmol/l) et la souche métronidazole-résistante dérivée LBN 293 (44.6 mmol/l), ce qui suggère l'existence de modifications au niveau du système POR. Diniz et coll. soulignent le fait que les mutations de POR observées n'expliquent pas à elles seules le haut niveau de résistance observé chez certaines souches et suggèrent que d'autres facteurs semblent être impliqués (74).

En présence d'un système POR actif, la réduction du métronidazole entraîne de façon classique une inhibition de la voie de l'acétate associée à la production de dérivés toxiques pour l'ADN. En réponse, la bactérie active d'une part ses systèmes de réparation de l'ADN, et d'autre part sa voie des lactates pour fabriquer de l'énergie. Ceci suggère que la bactérie est capable de survivre jusqu'à ce que la concentration intracytoplasmique de métronidazole entraîne un nombre élevé de lésions nucléiques ne pouvant plus être prises en charge par le

système de réparation. Cette phase durant laquelle les bactéries présentent à la fois un switch des voies métaboliques et une augmentation de l'activité des systèmes impliqués dans la réparation de l'ADN ne pourrait être qu'une étape initiale favorisant la survie d'une partie de la population exposée au métronidazole, et de ce fait la sélection de sous-populations résistantes. Ces sous-populations auraient ainsi acquis des mécanismes leur permettant de survivre à de plus fortes concentrations d'antibiotique. Cette adaptation pourrait être la conséquence de mutations multiples, touchant un ou plusieurs systèmes impliqués dans la réponse bactérienne au métronidazole tels le système POR ou les systèmes de réparation de l'ADN et/ou la surexpression de systèmes d'efflux. Il a en effet été rapporté que *B. fragilis* possède de façon constitutive plusieurs pompes de la famille des RND (Resistance Nodulation Division) capables de transporter diverses classes d'antibiotiques (274, 275, 341). Pumbwe et coll. (2006) ont montré que des mutants stables surexprimant ces systèmes d'efflux étaient résistants à différents antibiotiques dont le métronidazole, et pouvaient être sélectionnés sous la pression antibiotique (274). En utilisant des inhibiteurs de pompes à efflux, ces auteurs n'ont pu restaurer que partiellement la sensibilité au métronidazole. Ainsi, comme cela a été évoqué pour l'altération du système POR, la surexpression de système d'efflux ne peut à elle seule expliquer les phénotypes de résistance observés. La sélection de souches présentant un haut niveau de résistance au métronidazole pourrait donc résulter de l'accumulation de plusieurs mécanismes, en particulier chez des souches ne présentant pas de gène *nim*. Pour tester l'ensemble de ces hypothèses, il sera nécessaire de mesurer les activités enzymatiques de la pyruvate-ferrédoxine oxydoréductase et de la lactate déshydrogénase chez les sous-populations résistantes. Les séquences des différents gènes impliqués dans les systèmes POR et de réparation de l'ADN ainsi que celles des éléments régulant ces systèmes devront être déterminées à la recherche d'éventuelles mutations. Il sera par ailleurs intéressant de déterminer la présence de pompes à efflux chez *Prevotella* spp.

Il a été montré qu'un haut niveau de résistance pouvait également être dû à l'expression d'un gène *nim* ou à l'activation d'un gène *nim* silencieux (mutation, insertion d'une IS portant un promoteur, création d'un promoteur par une insertion) (112, 337). Dans notre étude, nous avons observé que, chez *P. baroniae*, la présence du gène *nimI* n'était pas associée à l'expression d'une résistance au métronidazole (CMI, 1-4 µg/ml). Cependant, comme pour les souches *nim*-négatives, des souches présentant un haut niveau de résistance ont pu être sélectionnées *in vitro*. La possibilité d'une mutation qui aurait activé l'expression du gène

nimI a été exclue par comparaison des séquences de ce gène avant et après sélection par métronidazole. De plus, aucune structure de type IS n'a été détectée en amont du gène *nimI*. Ceci est en accord avec des études antérieures décrivant une résistance au métronidazole en l'absence d'IS chez des souches *nim*-positives appartenant aux genres *Prevotella* spp., *Bacteroides* spp., *Porphyromonas* spp. et *Fusobacterium* spp. (112, 176, 211).

Dans notre étude, nous avons également démontré qu'une sélection *in vivo* de souches résistantes au métronidazole était possible (*P. nanceiensis* LBN 298 et *P. buccae* LBN 465), soulignant l'importance de nos observations *in vitro*. La sélection de sous-populations résistantes à divers antibiotiques a été rapportée dans des échecs thérapeutiques impliquant différentes espèces bactériennes, mais rarement chez les bactéries anaérobies (101, 237, 263). Pelaez et coll. (2008) ont montré que la sélection de souches de *Clostridium difficile* présentant une hétérorésistance inductible au métronidazole était significativement associée à des échecs thérapeutiques (263). Bien que la sélection de sous-populations résistantes au métronidazole ait déjà été rapportée chez *Bacteroides* spp. (112, 211, 290), son impact clinique n'a jamais été démontré. Dans notre étude, nous avons non seulement montré, pour la première fois chez *Prevotella* spp., que cette sélection pouvait avoir lieu *in vivo*, mais aussi être responsable d'échec thérapeutique (LBN 465). Par ailleurs, il est également possible qu'une exposition *in vivo* au métronidazole entraîne, chez *Prevotella* spp., l'émergence de sous-populations plus virulentes comme cela a été montré pour *Bacteroides* spp. (73). En effet, Diniz et coll. (2003) ont observé que des sous-populations de *Bacteroides* résistantes au métronidazole avaient, par rapport aux souches sensibles, une survie augmentée lorsqu'elles étaient mises au contact de polynucléaires neutrophiles d'adultes sains, et un pouvoir lésionnel plus important au niveau de la muqueuse intestinale de souris axéniques. Ceci reste à démontrer pour ce qui concerne *Prevotella* spp.

Pour ce qui est des *Clostridiaceae*, c'est l'observation initiale d'une sensibilité diminuée à la vancomycine chez des isolats de *Tissierella* spp., de *Clostridium orbiscindens* et d'espèces apparentées qui avait été à l'initiative d'une partie de ce travail. Ces souches présentaient une sensibilité à la vancomycine modérément réduite, la sensibilité à la teicoplanine étant

conservée. Finegold et coll. (2009) ont récemment confirmé nos observations concernant *C. orbiscindens* (106). Ces auteurs ont en effet observé des CMI pour la vancomycine de 8 µg/ml chez l'ensemble des isolats de *C. orbiscindens* testés (n=10) dans le cadre d'une étude destinée à évaluer la sensibilité à différents antibiotiques de bactéries à tropisme intestinal (n=536). Aucune donnée concernant la sensibilité aux glycopeptides de *T. praeacuta*/*C. hastiforme* n'a, en revanche, été retrouvée dans la littérature. En effet, dans la seule étude où cette sensibilité a été évaluée (deux souches de *T. praeacuta*), les valeurs des CMI de vancomycine n'ont pas été précisées pour cette espèce, bien qu'elles soient situées dans un groupe présentant des valeurs de CMI allant de 0.5 à > 1024 µg/ml (106). Ceci souligne l'originalité de nos observations concernant ce bas niveau de résistance qui semble intrinsèque chez ces espèces bactériennes. Les résultats obtenus dans notre étude permettent également d'apporter quelques éléments de réponse à la question concernant le mécanisme d'une telle résistance.

Chez *S. aureus*, le mécanisme principal de résistance aux glycopeptides est un blocage de l'accès de l'antibiotique à sa cible par épaissement de la paroi bactérienne avec augmentation des résidus D-Alanyl-D-Alanine (Figure 24) (9, 302). Considérant qu'une paroi très fine a été observée en MET pour *T. praeacuta* et de *Tissierella* sp. nov., ce mécanisme ne semble pas impliqué dans la résistance observée chez nos souches. Il en est de même pour *F. plautii* pour lequel il a été montré que le peptidoglycane ne mesurait que 14 nm d'épaisseur (153).

La résistance aux glycopeptides est le plus souvent due à la présence d'un cluster de gènes (*van*) permettant de modifier la cible de l'antibiotique (65). Cependant, aucun des gènes *van* testés (*vanA*, *vanB1-B2-B3*, *vanC1-C2-C3*, *vanD*, *vanE*, *vanF* et *vanG*) n'a été détecté dans notre travail. Les amorces dégénérées V1/V2 nous ont permis d'amplifier une ligase bactérienne naturelle. L'absence de pentapeptide dans la paroi de ces espèces ne nous a pas permis de déterminer le substrat de cette D-Ala:D-X ligase. Pour cela, il sera nécessaire d'analyser les précurseurs intracytoplasmiques du peptidoglycane. Quel que soit le peptide terminal identifié, sa nature ne permettra cependant pas d'expliquer le phénomène de résistance à la vancomycine observé, étant donné qu'il n'a pas été détecté dans la paroi bactérienne. La vancomycine devant se fixer au niveau du dipeptide terminal du pentapeptide pour inhiber l'action des transglycosylases et des transpeptidases, l'absence de cette cible

dans le peptidoglycane des souches que nous avons étudiées pourrait expliquer à elle seule la sensibilité diminuée à cet antibiotique. Ceci suggère qu'un clivage précoce de ce peptide terminal, impliquant des transglycosylases, des carboxypeptidases ou d'autres enzymes, pourrait permettre à *Tissierella* spp. d'échapper à l'activité de la vancomycine, du moins à des concentrations modérées.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Notre travail a confirmé l'intérêt d'une approche taxonomique mixte et consensuelle en bactériologie médicale. Dans un premier temps, il a permis de mettre en évidence un groupe de souches initialement identifiées comme appartenant à l'espèce *Tissierella praeacuta* mais qui forment en réalité un nouveau taxon. L'analyse de ce groupe par une approche mixte et consensuelle a mis en avant les arguments permettant de valider cette nouvelle espèce. Par ailleurs, les études phylogénétiques ont mis en évidence que les *Tissierella* spp. appartenaient non pas à la famille *Clostridiaceae* mais au clade *Peptostreptococcaceae* (selon Hugenholtz) qui semble représenter une nouvelle classe plutôt qu'une famille au sein du phylum *Firmicutes*. Enfin, cette même approche a permis de reclasser les espèces *Clostridium orbiscindens* et *Eubacterium plautii* dans une seule et même nouvelle espèce, *Flavonifractor plautii*. Impliquées en pathologie humaine, ces nouvelles espèces présentent une sensibilité diminuée à la vancomycine. Nous avons montré chez *T. praeacuta* et *Tissierella* sp. nov. que cette résistance était liée à l'absence de dipeptide détectable au sein de leur peptidoglycane.

Au sein du genre *Prevotella*, notre étude a permis de décrire une nouvelle espèce pathogène, *Prevotella nanceiensis*. Nous avons montré, pour la première fois, qu'il était possible de sélectionner *in vitro* et *in vivo* des souches de *Prevotella*, appartenant à l'espèce *P. nanceiensis* et à d'autres espèces, résistantes au métronidazole. Celles-ci ont pu être obtenues à partir d'isolats possédant ou non un gène *nim*, confirmant que la présence d'une nitroimidazole réductase n'est pas le seul facteur impliqué dans la résistance au métronidazole chez *Prevotella* spp. Un nouveau gène chromosomique, *nimI*, exclusivement présent chez *Prevotella baroniae*, a également été décrit et semble intrinsèque à cette espèce. Nos résultats ne nous ont pas permis d'élucider le mécanisme de résistance au métronidazole impliqué chez les souches dépourvues de gène *nim* mais nous ont amené à avancer plusieurs hypothèses qu'il reste à vérifier. En effet, la découverte d'une augmentation du taux de lactate chez une souche de *Prevotella* devenue résistante au métronidazole soulève la question de l'implication des différents acteurs du métabolisme intracellulaire de cet antibiotique et de la réponse bactérienne résultante chez ces souches résistantes. Il sera également intéressant d'étudier l'impact, *in vivo*, de la sélection d'une telle résistance sur la pathogénicité et la virulence de *Prevotella* spp.

En ce qui concerne la taxonomie des *Firmicutes*, nos travaux viennent compléter ceux de Ludwig et coll. (2009) et de Marchandin et coll. (2009) qui ont amorcé les premiers grands

changements au sein de ce phylum. De très nombreux remaniements supplémentaires sont encore nécessaires pour une meilleure compréhension de ce groupe bactérien, notamment au sein des *Clostridia* et *Clostridiaceae*. Après avoir terminé la description de la nouvelle espèce de *Tissierella* et clarifié les relations évolutives de ce genre et des genres apparentés, il sera nécessaire d'approfondir nos connaissances concernant la structure pariétale de ces bactéries. Nous avons montré que, malgré l'aspect Gram négatif à la coloration, *T. praeacuta* et *Tissierella* sp. nov. possédaient une paroi de type Gram-positif ayant une particularité structurale semblant liée à une sensibilité diminuée à la vancomycine. La paroi des genres apparentés ainsi que d'autres espèces de *Clostridium* (*C. clostridioforme*, *C. ramosum*, *C. symbiosum*, *C. hathewayi*) présente la même caractéristique de décoloration. Il en est de même pour la nouvelle espèce *F. plautii* qui présente elle aussi un bas niveau de résistance à la vancomycine. L'analyse de la composition des peptidoglycanes au sein de ces groupes bactériens phylogénétiquement distants et de leur sensibilité aux glycopeptides sera donc nécessaire afin de déterminer s'il existe un lien entre cette particularité structurale, l'évolution bactérienne et une sensibilité diminuée aux glycopeptides.

BIBLIOGRAPHIE

1. **Adekambi, T., and M. Drancourt.** 2004. Dissection of phylogenetic relationships among 19 rapidly growing *Mycobacterium* species by 16S rRNA, *hsp65*, *sodA*, *recA* and *rpoB* gene sequencing. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**:2095-2105.
2. **Allardet-Servent, A., S. Michaux-Charachon, E. Jumas-Bilak, L. Karayan, and M. Ramuz.** 1993. Presence of one linear and one circular chromosome in the *Agrobacterium tumefaciens* C58 genome. *J Bacteriol* **175**:7869-7874.
3. **Allison, M. J., W. R. Mayberry, C. S. McSweeney, and D. A. Stahl.** 1992. *Synergistes jonesii*, gen. nov., sp. nov. : a rumen bacterium that degrades toxic pyridinediols. *Syst. Appl. Microbiol* **15**:522-529.
4. **Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D. J. Lipman.** 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**:3389-3402.
5. **Amann, R., W. Ludwig, and K. H. Schleifer.** 1988. Beta-subunit of ATP-synthase: a useful marker for studying the phylogenetic relationship of eubacteria. *J Gen Microbiol* **134**:2815-2821.
6. **Ameziane, N., M. Bogard, and J. Lamoril.** 2006. *Principes de biologie moléculaire en biologie clinique*. Elsevier.
7. **Andres, M. T., W. O. Chung, M. C. Roberts, and J. F. Fierro.** 1998. Antimicrobial susceptibilities of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, and *Prevotella nigrescens* spp. isolated in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* **42**:3022-3023.
8. **Antonopoulos, D. A., W. M. Russell, and B. A. White.** 2003. Phylogenetic reconstruction of Gram-positive organisms based on comparative sequence analysis of molecular chaperones from the ruminal microorganism *Ruminococcus flavefaciens* FD-1. *FEMS Microbiol Lett* **227**:1-7.
9. **Appelbaum, P. C.** 2006. The emergence of vancomycin-intermediate and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect* **12 Suppl 1**:16-23.
10. **Arzese, A. R., L. Tomasetig, and G. A. Botta.** 2000. Detection of *tetQ* and *ermF* antibiotic resistance genes in *Prevotella* and *Porphyromonas* isolates from clinical specimens and resident microbiota of humans. *J Antimicrob Chemother* **45**:577-582.
11. **Austin, M. N., L. A. Meyn, and S. L. Hillier.** 2006. Susceptibility of vaginal bacteria to metronidazole and tinidazole. *Anaerobe* **12**:227-230.

12. **Avgustin, G., R. J. Wallace, and H. J. Flint.** 1997. Phenotypic diversity among ruminal isolates of *Prevotella ruminicola*: proposal of *Prevotella brevis* sp. nov., *Prevotella bryantii* sp. nov., and *Prevotella albensis* sp. nov. and redefinition of *Prevotella ruminicola*. *Int J Syst Bacteriol* **47**:284-288.
13. **B D Vieira, J. M., R. F. Boente, K. Rodrigues Miranda, K. E. Avelar, R. M. Domingues, and M. C. Ferreira.** 2006. Decreased susceptibility to nitroimidazoles among *Bacteroides* species in Brazil. *Curr Microbiol* **52**:27-32.
14. **Baardsen, R., V. Bakken, H. B. Jensen, and T. Hofstad.** 1988. Outer membrane protein pattern of *Eubacterium plautii*. *J Gen Microbiol* **134**:1561-1564.
15. **Bae, J. W., J. R. Park, Y. H. Chang, S. K. Rhee, B. C. Kim, and Y. H. Park.** 2004. *Clostridium hastiforme* is a later synonym of *Tissierella praeacuta*. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**:947-949.
16. **Baldauf, S. L., J. D. Palmer, and W. F. Doolittle.** 1996. The root of the universal tree and the origin of eukaryotes based on elongation factor phylogeny. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:7749-7754.
17. **Ballard, S. A., K. K. Pertile, M. Lim, P. D. Johnson, and M. L. Grayson.** 2005. Molecular characterization of *vanB* elements in naturally occurring gut anaerobes. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:1688-1694.
18. **Behra-Miellet, J., L. Calvet, and L. Dubreuil.** 2003. Activity of linezolid against anaerobic bacteria. *Int J Antimicrob Agents* **22**:28-34.
19. Behra-Miellet, J., L. Calvet, F. Mory, C. Muller, M. Chomarat, M. C. Beziau, S. Bland, M. E. Juvenin, T. Fosse, F. Goldstein, B. Jaulhac, and L. Dubreuil. 2003. Antibiotic resistance among anaerobic Gram-negative bacilli: lessons from a French multicentric survey. *Anaerobe* 9:105-111.
20. **Behra-Miellet, J., L. Dubreuil, and L. Calvet.** 2006. Evaluation of the *in vitro* activity of ertapenem and nine other comparator agents against 337 anaerobic bacteria. *Int J Antimicrob Agents* **28**:25-35.
21. Benson, D. A., I. Karsch-Mizrachi, D. J. Lipman, J. Ostell, and E. W. Sayers. 2009. GenBank. *Nucleic Acids Res* 37:D26-31.
22. **Berger, P., T. Adekambi, M. N. Mallet, and M. Drancourt.** 2005. *Prevotella massiliensis* sp. nov. isolated from human blood. *Res Microbiol* **156**:967-973.

23. **Biebl, H., H. Schwab-Hanisch, C. Sproer, and H. Lunsdorf.** 2000. *Propionispora vibrioides*, nov. gen., nov. sp., a new Gram-negative, spore-forming anaerobe that ferments sugar alcohols. *Arch Microbiol* **174**:239-247.
24. **Boyd, D. A., B. M. Willey, D. Fawcett, N. Gillani, and M. R. Mulvey.** 2008. Molecular characterization of *Enterococcus faecalis* N06-0364 with low-level vancomycin resistance harboring a novel D-Ala-D-Ser gene cluster, *vanL*. *Antimicrob Agents Chemother* **52**:2667-2672.
25. **Branny, P., F. de la Torre, and J. R. Garel.** 1998. An operon encoding three glycolytic enzymes in *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, phosphoglycerate kinase and triosephosphate isomerase. *Microbiology* **144 (Pt 4)**:905-914.
26. **Bresco-Salinas, M., N. Costa-Riu, L. Berini-Aytes, and C. Gay-Escoda.** 2006. Antibiotic susceptibility of the bacteria causing odontogenic infections. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* **11**:E70-5.
27. **Breuil, J., A. Dublanquet, N. Truffaut, and M. Sebald.** 1989. Transferable 5-nitroimidazole resistance in the *Bacteroides fragilis* group. *Plasmid* **21**:151-154.
28. **Breuil, J., O. Patey, A. Dublanquet, and E. Collatz.** 1996. Identification des bactéries anaérobies., p. 144-150, Pathologies dues aux germes anaérobies. Clinique. Bactériologie. Antibiotiques. Editions Scientifiques LC, Paris.
29. **Brill, J. A., and J. Wiegel.** 1997. Differentiation between spore-forming and asporogenic bacteria using a PCR and Southern hybridization based method. *Journal of Microbiological Methods* **31**:29-36.
30. **Brisse, S.** 2008. L'espèce microbienne : nécessaire, mais pas suffisante. *Bulletin de la Société Française de Microbiologie* **23**:164-173.
31. **Broughton, W. J.** 2003. Roses by other names: taxonomy of the *Rhizobiaceae*. *J Bacteriol* **185**:2975-2979.
32. **Burggraf, S., G. J. Olsen, K. O. Stetter, and C. R. Woese.** 1992. A phylogenetic analysis of *Aquifex pyrophilus*. *Syst Appl Microbiol* **15**:352-356.
33. **Callister, S. J., L. A. McCue, J. E. Turse, M. E. Monroe, K. J. Auberry, R. D. Smith, J. N. Adkins, and M. S. Lipton.** 2008. Comparative bacterial proteomics: analysis of the core genome concept. *PLoS One* **3**:e1542.

34. **Carlier, J. P.** 1985. Gas Chromatography of fermentation products : its application in diagnosis of anaerobic bacteria. *Bull. Inst. Pasteur* **83**:57-69.
35. **Carlier, J. P., G. K'Ouas, I. Bonne, A. Lozniewski, and F. Mory.** 2004. *Oribacterium sinus* gen. nov., sp. nov., within the family 'Lachnospiraceae' (phylum *Firmicutes*). *Int J Syst Evol Microbiol* **54**:1611-1615.
36. **Carlier, J. P., G. K'Ouas, and X. Y. Han.** 2007. *Moryella indoligenes* gen. nov., sp. nov., an anaerobic bacterium isolated from clinical specimens. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**:725-729.
37. **Carlier, J. P., N. Sellier, M. N. Rager, and G. Reysset.** 1997. Metabolism of a 5-nitroimidazole in susceptible and resistant isogenic strains of *Bacteroides fragilis*. *Antimicrob Agents Chemother* **41**:1495-1499.
38. **Cashion, P., M. A. Holder-Franklin, J. McCully, and M. Franklin.** 1977. A rapid method for the base ratio determination of bacterial DNA. *Anal Biochem* **81**:461-466.
39. **Castresana, J.** 2000. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Mol Biol Evol* **17**:540-552.
40. **Cato, E. P., W. L. George, and S. M. Finegold.** 1986. Genus *Clostridium*. Prazmowski 1880, 23AL, p. 1141-1200. *In* P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe, and J. G. Holt (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 2. Williams & Wilkins, Baltimore.
41. **Cavalier-Smith, T.** 2006. Cell evolution and Earth history: stasis and revolution. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **361**:969-1006.
42. **Cavalier-Smith, T.** 2002. The neomuran origin of archaeobacteria, the negibacterial root of the universal tree and bacterial megaclassification. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**:7-76.
43. **Chazelle, B.** 2000. A minimum spanning tree algorithm with inverse-Ackermann type complexity. *Journal of the ACM* **47**:1028-1047.
44. **Cheng, K. J., and J. W. Costerton.** 1977. Ultrastructure of *Butyrivibrio fibrisolvens*: a Gram-positive bacterium. *J Bacteriol* **129**:1506-1512.
45. **Choulet, F.** 2006. Evolution du génome des *Streptomyces* : transfert horizontal et variabilité des extrémités chromosomiques. Thèse de l'Université Henri Poincaré, Nancy I.
46. Choulet, F., B. Aigle, A. Gallois, S. Mangenot, C. Gerbaud, C. Truong, F. X. Francou, C. Fourier, M. Guerineau, B. Decaris, V. Barbe, J. L. Pernodet, and P. Leblond. 2006.

- Evolution of the terminal regions of the *Streptomyces* linear chromosome. *Mol Biol Evol* 23:2361-2369.
47. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** 2007. Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria. Approved standard M11-A7, 7th ed., Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa.
48. **Cohan, F. M.** 2002. What are bacterial species? *Annu Rev Microbiol* 56:457-487.
49. Cole, J. R., Q. Wang, E. Cardenas, J. Fish, B. Chai, R. J. Farris, A. S. Kulam-Syed-Mohideen, D. M. McGarrell, T. Marsh, G. M. Garrity, and J. M. Tiedje. 2009. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Res* 37:D141-5.
50. Collins, M. D., P. A. Lawson, A. Willems, J. J. Cordoba, J. Fernandez-Garayzabal, P. Garcia, J. Cai, H. Hippe, and J. A. Farrow. 1994. The phylogeny of the genus *Clostridium*: proposal of five new genera and eleven new species combinations. *Int J Syst Bacteriol* 44:812-826.
51. **Collins, M. D., and H. N. Shah.** 1986. Reclassification of *Bacteroides praeacutus* Tissier (Holdeman and Moore) in a New Genus, *Tissierella*, as *Tissierella praeacuta* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* 36:461-463.
52. **Colwell, R. R.** 1970. Polyphasic taxonomy of the genus vibrio: numerical taxonomy of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and related *Vibrio* species. *J Bacteriol* 104:410-433.
53. **Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie.** 2009. Communiqué 2009. Société Française de Microbiologie, Paris, France. <http://www.sfm.asso.fr/>.
54. **Courtin, P., G. Miranda, A. Guillot, F. Wessner, C. Mezange, E. Domakova, S. Kulakauskas, and M. P. Chapot-Chartier.** 2006. Peptidoglycan structure analysis of *Lactococcus lactis* reveals the presence of an L,D-carboxypeptidase involved in peptidoglycan maturation. *J Bacteriol* 188:5293-5298.
55. **Courvalin, P.** 2005. Genetics of glycopeptide resistance in Gram-positive pathogens. *Int J Med Microbiol* 294:479-486.
56. **Criscuolo, A., V. Berry, E. J. Douzery, and O. Gascuel.** 2005. SDM : une méthode de distance rapide pour les études phylogénomique. p. 231-243. Présenté aux Journées Ouvertes Biologie Informatique Mathématiques.

57. **Dagan, T., Y. Artzy-Randrup, and W. Martin.** 2008. Modular networks and cumulative impact of lateral transfer in prokaryote genome evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**:10039-10044.
58. **Dalevi, D., P. Hugenholtz, and L. L. Blackall.** 2001. A multiple-outgroup approach to resolving division-level phylogenetic relationships using 16S rDNA data. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**:385-391.
59. **Daubin, V., M. Gouy, and G. Perriere.** 2002. A phylogenomic approach to bacterial phylogeny: evidence of a core of genes sharing a common history. *Genome Res* **12**:1080-1090.
60. **Dauga, C.** 2002. Evolution of the *gyrB* gene and the molecular phylogeny of *Enterobacteriaceae*: a model molecule for molecular systematic studies. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**:531-547.
61. **David, V., B. Bozdogan, J. L. Mainardi, R. Legrand, L. Gutmann, and R. Leclercq.** 2004. Mechanism of intrinsic resistance to vancomycin in *Clostridium innocuum* NCIB 10674. *J Bacteriol* **186**:3415-3422.
62. **Delsuc, F., H. Brinkmann, and H. Philippe.** 2005. Phylogenomics and the reconstruction of the tree of life. *Nat Rev Genet* **6**:361-375.
63. **Delsuc, F., and E. J. Douzery.** 2004. Les méthodes probabilistes en phylogénie moléculaire. (2) L'approche bayésienne., p. 75-86, *Avenir et pertinence des méthodes d'analyse en phylogénie moléculaire*, vol. 22. Biosystema.
64. **Denis, F., M. C. Ploy, M. Martin, E. Bingen, and R. Quentin.** 2007. *Bactériologie Médicale. Techniques usuelles.* Elsevier MASSON SAS, Issy-les-Moulineaux.
65. **Depardieu, F., and P. Courvalin.** 2005. Glycopeptide Resistance in *Enterococci*, p. 101-123. *In* D. G. White, M. N. Alekshun, and P. F. Mcdermott (ed.), *Frontiers in antimicrobial resistance : a tribute to Stuart B. Levy.* ASM Press, Washington DC.
66. Dereeper, A., V. Guignon, G. Blanc, S. Audic, S. Buffet, F. Chevenet, J. F. Dufayard, S. Guindon, V. Lefort, M. Lescot, J. M. Claverie, and O. Gascuel. 2008. Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Res* **36**:W465-9.
67. **DeSantis, T. Z., P. Hugenholtz, N. Larsen, M. Rojas, E. L. Brodie, K. Keller, T. Huber, D. Dalevi, P. Hu, and G. L. Andersen.** 2006. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl Environ Microbiol* **72**:5069-5072.

68. **DeSantis, T. Z., Jr., P. Hugenholtz, K. Keller, E. L. Brodie, N. Larsen, Y. M. Piceno, R. Phan, and G. L. Andersen.** 2006. NAST: a multiple sequence alignment server for comparative analysis of 16S rRNA genes. *Nucleic Acids Res* **34**:W394-9.
69. **Dhalluin, A.** 2004. Etude de deux gènes spécifiques d'espèces de bactéries du genre *Clostridium*, le gène domestique de la triosephosphate isomerase et un gène d'autolysine de *C. difficile*. Thèse de l'Université de Rouen, Rouen.
70. **Dhalluin, A., I. Bourgeois, M. Pestel-Caron, E. Camiade, G. Raux, P. Courtin, M. P. Chapot-Chartier, and J. L. Pons.** 2005. Acd, a peptidoglycan hydrolase of *Clostridium difficile* with N-acetylglucosaminidase activity. *Microbiology* **151**:2343-2351.
71. **Dhalluin, A., L. Lemee, M. Pestel-Caron, F. Mory, G. Leluan, J. F. Lemeland, and J. L. Pons.** 2003. Genotypic differentiation of twelve *Clostridium* species by polymorphism analysis of the triosephosphate isomerase (*tpi*) gene. *Syst Appl Microbiol* **26**:90-96.
72. **Diaz, C., S. Baena, M. L. Fardeau, and B. K. Patel.** 2007. *Aminiphilus circumscriptus* gen. nov., sp. nov., an anaerobic amino-acid-degrading bacterium from an upflow anaerobic sludge reactor. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**:1914-1918.
73. **Diniz, C. G., R. M. Arantes, D. C. Cara, F. L. Lima, J. R. Nicoli, M. A. Carvalho, and L. M. Farias.** 2003. Enhanced pathogenicity of susceptible strains of the *Bacteroides fragilis* group subjected to low doses of metronidazole. *Microbes Infect* **5**:19-26.
74. **Diniz, C. G., L. M. Farias, M. A. Carvalho, E. R. Rocha, and C. J. Smith.** 2004. Differential gene expression in a *Bacteroides fragilis* metronidazole-resistant mutant. *J Antimicrob Chemother* **54**:100-108.
75. **Domingo, M. C., A. Huletsky, A. Bernal, R. Giroux, D. K. Boudreau, F. J. Picard, and M. G. Bergeron.** 2005. Characterization of a Tn5382-like transposon containing the *vanB2* gene cluster in a *Clostridium* strain isolated from human faeces. *J Antimicrob Chemother* **55**:466-474.
76. **Domingo, M. C., A. Huletsky, M. Boissinot, K. A. Bernard, F. J. Picard, and M. G. Bergeron.** 2008. *Ruminococcus gauvreauii* sp. nov., a glycopeptide-resistant species isolated from a human faecal specimen. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**:1393-1397.
77. **Domingo, M. C., A. Huletsky, M. Boissinot, M. C. Helie, A. Bernal, K. A. Bernard, M. L. Grayson, F. J. Picard, and M. G. Bergeron.** 2009. *Clostridium lavalense* sp. nov., a glycopeptide-resistant species isolated from human faeces. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**:498-503.

78. **Domingo, M. C., A. Huletsky, R. Giroux, K. Boissinot, F. J. Picard, P. Lebel, M. J. Ferraro, and M. G. Bergeron.** 2005. High prevalence of glycopeptide resistance genes *vanB*, *vanD*, and *vanG* not associated with enterococci in human fecal flora. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:4784-4786.
79. **Domingo, M. C., A. Huletsky, R. Giroux, F. J. Picard, and M. G. Bergeron.** 2007. *vanD* and *vanG*-like gene clusters in a *Ruminococcus* species isolated from human bowel flora. *Antimicrob Agents Chemother* **51**:4111-4117.
80. **Doolittle, W. F., and R. T. Papke.** 2006. Genomics and the bacterial species problem. *Genome Biol* **7**:116.
81. **Dorn, B. R., K. L. Leung, and A. Progulske-Fox.** 1998. Invasion of human oral epithelial cells by *Prevotella intermedia*. *Infect Immun* **66**:6054-6057.
82. **Downes, J., I. Sutcliffe, A. C. Tanner, and W. G. Wade.** 2005. *Prevotella marshii* sp. nov. and *Prevotella baroniae* sp. nov., isolated from the human oral cavity. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**:1551-1555.
83. **Dublanchet, A.** 1990. *Bacteroides fragilis* with reduced susceptibility to metronidazole. An unusual phenotypic expression. *Med Mal Infect* **20**:113-116.
84. **Dubreuil, L.** 2006. Anaérobies à Gram négatif, p. 547-562. In Courvalin, P., Leclercq, R., and Bingen, E. (ed.), *Antibiogramme*, 2nd ed. Editions Eska.
85. **Dubreuil, L., J. Behra-Miellet, C. Vouillot, S. Bland, A. Sedallian, and F. Mory.** 2003. Beta-lactamase production in *Prevotella* and *in vitro* susceptibilities to selected beta-lactam antibiotics [corrected]. *Int J Antimicrob Agents* **21**:267-273.
86. **Duchesne, P., D. Grenier, and D. Mayrand.** 1999. Binding and utilization of human transferrin by *Prevotella nigrescens*. *Infect Immun* **67**:576-580.
87. **Dutka-Malen, S., S. Evers, and P. Courvalin.** 1995. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *J Clin Microbiol* **33**:24-27.
88. **Duwat, P., S. D. Ehrlich, and A. Gruss.** 1992. Use of degenerate primers for polymerase chain reaction cloning and sequencing of the *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* *recA* gene. *Appl Environ Microbiol* **58**:2674-2678.
89. **Edgar, R. C.** 2004. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics* **5**:113.

90. **Edwards, D. I.** 1993. Nitroimidazole drugs : action and resistance mechanisms. II. Mechanisms of resistance. *J Antimicrob Chemother* **31**:201-210.
91. **Edwards, U., T. Rogall, H. Blocker, M. Emde, and E. C. Bottger.** 1989. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res* **17**:7843-7853.
92. **Efron, B.** 1979. Bootstrap methods: an other look at the jackknife. *Annals of Statistics* **7**:1-26.
93. **Eggerth, A. H., and B. H. Gagnon.** 1933. The *Bacteroides* of human feces. *J Bacteriol* **25**:389-413.
94. **Elsagher, A. A., J. S. Brazier, and E. A. James.** 2003. Bacteraemia due to *Bacteroides fragilis* with reduced susceptibility to metronidazole. *J Antimicrob Chemother* **51**:1436-437.
95. **Engelkirk, P. G., J. Duben-Engelkirk, and V. R. Dowell.** 1992. Principles and practice of clinical anaerobic bacteriology. Star Publishing Company, Belmont, CA.
96. **Euzeby, J. P.** Définitions d'une genomospécies et d'une espèce bactérienne. J.P. EUZÉBY : *List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature*. [Online.] <http://www.bacterio.cict.fr/>.
97. **Euzeby, J. P.** 1998. La nomenclature bactérienne sur Internet. *Bulletin de la Société Française de Microbiologie* **13**.HS.
98. **Euzeby, J. P.** Les enjeux d'une Nomenclature Valide en Taxonomie. J.P. EUZÉBY [Online.]. <http://www.bacterio.cict.fr/envt/>.
99. **Euzeby, J. P.** 1997. List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a folder available on the Internet. *Int J Syst Bacteriol* **47**:590-592.
100. **Ezaki, T., Y. Kawamura, N. Li, Z. Y. Li, L. Zhao, and S. Shu.** 2001. Proposal of the genera *Anaerococcus* gen. nov., *Peptoniphilus* gen. nov. and *Gallicola* gen. nov. for members of the genus *Peptostreptococcus*. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**:1521-1528.
101. **Falagas, M. E., G. C. Makris, G. Dimopoulos, and D. K. Matthaiou.** 2008. Heteroresistance: a concern of increasing clinical significance? *Clin Microbiol Infect* **14**:101-104.
102. **Farrow, J. A., P. A. Lawson, H. Hippe, U. Gauglitz, and M. D. Collins.** 1995. Phylogenetic evidence that the Gram-negative nonsporulating bacterium *Tissierella*

- (*Bacteroides*) *praeacuta* is a member of the *Clostridium* subphylum of the Gram-positive bacteria and description of *Tissierella creatinini* sp. nov. Int J Syst Bacteriol **45**:436-440.
103. **Fe Marques, A., J. R. Maestre Vera, M. Mateo Maestre, F. Gonzalez Romo, and M. A. Castrillo Amores.** 2008. Septic arthritis of the knee due to *Prevotella loescheii* following tooth extraction. Med Oral Patol Oral Cir Bucal **13**:E505-7.
104. **Feil, E. J., B. C. Li, D. M. Aanensen, W. P. Hanage, and B. G. Spratt.** 2004. eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. J Bacteriol **186**:1518-1530.
105. **Felsenstein, J.** 1993. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.5c. Department of Genetics, University of Washington, Seattle.
106. **Finegold, S. M., D. Molitoris, and M. L. Vaisanen.** 2009. Study of the *in vitro* activities of rifaximin and comparator agents against 536 anaerobic intestinal bacteria from the perspective of potential utility in pathology involving bowel flora. Antimicrob Agents Chemother **53**:281-286.
107. **Fines, M., B. Perichon, P. Reynolds, D. F. Sahn, and P. Courvalin.** 1999. VanE, a new type of acquired glycopeptide resistance in *Enterococcus faecalis* BM4405. Antimicrob Agents Chemother **43**:2161-4.
108. **Fischer, W., P. Rosel, and H. U. Koch.** 1981. Effect of alanine ester substitution and other structural features of lipoteichoic acids on their inhibitory activity against autolysins of *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol **146**:467-475.
109. **Fitch, W. M., and E. Margoliash.** 1967. Construction of phylogenetic trees. Science **155**:279-84.
110. **Fosse, T., I. Madinier, C. Hitzig, and Y. Charbit.** 1999. Prevalence of beta-lactamase-producing strains among 149 anaerobic Gram-negative rods isolated from periodontal pockets. Oral Microbiol Immunol **14**:352-357.
111. **Fukushima, M., K. Kakinuma, and R. Kawaguchi.** 2002. Phylogenetic analysis of *Salmonella*, *Shigella*, and *Escherichia coli* strains on the basis of the *gyrB* gene sequence. J Clin Microbiol **40**:2779-2785.
112. **Gal, M., and J. S. Brazier.** 2004. Metronidazole resistance in *Bacteroides* spp. carrying *nim* genes and the selection of slow-growing metronidazole-resistant mutants. J Antimicrob Chemother **54**:109-116.

113. **Galtier, N., M. Gouy, and C. Gautier.** 1996. SEAVIEW and PHYLO_WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Comput Appl Biosci* **12**:543-548.
114. **Gambette, P.** 2005. La représentation des réseaux phylogénétiques, Mémoire de stage, <http://www.dptinfo.ens-cachan.fr/Archives/Stages/Rapports05/gambette.pdf>, Tübingen.
115. **Garre, M., C. le Henaff, Tande, J. Chailloux, T. Bensousan, B. Garo, and J. M. Boles.** 1991. Fulminant *Eubacterium plautii* infection following dog bite in asplenic man. *Lancet* **338**:384-385.
116. **Garrity, G. M., J. A. Bell, and T. G. Lilburn.** 2004. Taxonomic Outline of the Procaryotes. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Second Edition, Release 5.0. ed. Springer-Verlag, New York. [Online.]. (<http://141.150.157.80/bergeysoutline/main.htm>).
117. **Garrity, G. M., J. Leventhal, and T. G. Lilburn.** 2005. Taxonomic Outline of the Procaryotes. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Second Edition, Release 6.0. ed. Springer-Verlag, New York.
118. **Garrity, G. M., T. G. Lilburn, J. R. Cole, S. H. Harrison, J. Euzebly, and B. J. Tindall.** 2007. Taxonomic Outline of the Bacteria and Archaea, Release 7.7. Second Edition, Release 5.0. ed. Michigan State University Board of Trustees. [Online.]. (<http://www.taxonomicoutline.org>).
119. **Garrity, G. M., M. Winters, A. W. Kuo, and D. B. Searles.** 2001. Taxonomic Outline of the Procaryotes. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Second Edition, Release 1.0. ed. Springer-Verlag, New York. [Online.]. (<http://141.150.157.80/bergeysoutline/main.htm>).
120. **Gaudriault, S., S. Pages, A. Lanois, C. Laroui, C. Teyssier, E. Jumas-Bilak, and A. Givaudan.** 2008. Plastic architecture of bacterial genome revealed by comparative genomics of *Photorhabdus* variants. *Genome Biol* **9**:R117.
121. **Gaunt, M. W., S. L. Turner, L. Rigottier-Gois, S. A. Lloyd-Macgilp, and J. P. Young.** 2001. Phylogenies of *atpD* and *recA* support the small subunit rRNA-based classification of rhizobia. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**:2037-2048.
122. **Gayon, J.** 2009. Le darwinisme : une théorie durable., p. 12-17, Dossiers pour la Science, vol. 63.

123. **Gibbons, N. E., and R. G. E. Murray.** 1978. Proposals concerning the higher taxa of bacteria. *Int J Syst Bacteriol* **28**:1-6.
124. **Gingeras, T. R., G. Ghandour, E. Wang, A. Berno, P. M. Small, F. Drobniowski, D. Alland, E. Desmond, M. Holodniy, and J. Drenkow.** 1998. Simultaneous genotyping and species identification using hybridization pattern recognition analysis of generic *Mycobacterium* DNA arrays. *Genome Res* **8**:435-448.
125. **Giraud-Morin, C., I. Madinier, and T. Fosse.** 2003. Sequence analysis of *cfxA2*-like beta-lactamases in *Prevotella* species. *J Antimicrob Chemother* **51**:1293-1296.
126. **Glazunova, O. O., T. Launay, D. Raoult, and V. Roux.** 2007. *Prevotella timonensis* sp. nov., isolated from a human breast abscess. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**:883-886.
127. **Glupczynski, Y., C. Berhin, and H. Nizet.** 2009. Antimicrobial susceptibility of anaerobic bacteria in Belgium as determined by E-test methodology. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **28**:261-267.
128. **Gogarten, J. P., W. F. Doolittle, and J. G. Lawrence.** 2002. Prokaryotic evolution in light of gene transfer. *Mol Biol Evol* **19**:2226-2238.
129. **Goh, S. H., Z. Santucci, W. E. Kloos, M. Faltyn, C. G. George, D. Driedger, and S. M. Hemmingsen.** 1997. Identification of *Staphylococcus* species and subspecies by the chaperonin 60 gene identification method and reverse checkerboard hybridization. *J Clin Microbiol* **35**:3116-3121.
130. **Goldstein, E. J., D. M. Citron, C. V. Merriam, Y. A. Warren, K. L. Tyrrell, and H. T. Fernandez.** 2006. Comparative in vitro susceptibilities of 396 unusual anaerobic strains to tigecycline and eight other antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother* **50**:3507-3513.
131. **Goldstein, E. J., D. M. Citron, Y. A. Warren, K. L. Tyrrell, C. V. Merriam, and H. Fernandez.** 2006. *In vitro* activity of moxifloxacin against 923 anaerobes isolated from human intra-abdominal infections. *Antimicrob Agents Chemother* **50**:148-155.
132. **Grosse-Herrenthey, A., T. Maier, F. Gessler, R. Schaumann, H. Bohnel, M. Kostrzewa, and M. Kruger.** 2008. Challenging the problem of clostridial identification with matrix-assisted laser desorption and ionization-time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *Anaerobe* **14**:242-249.
133. **Guindon, S., and O. Gascuel.** 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol* **52**:696-704.

134. **Gupta, R. S.** 1998. Life's third domain (*Archaea*): an established fact or an endangered paradigm? *Theor Popul Biol* **54**:91-104.
135. **Gupta, R. S.** 1998. Protein phylogenies and signature sequences: A reappraisal of evolutionary relationships among archaeobacteria, eubacteria, and eukaryotes. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**:1435-1491.
136. **Gupta, R. S., and B. Gao.** 2009. Phylogenomic analyses of clostridia and identification of novel protein signatures that are specific to the genus *Clostridium sensu stricto* (cluster D). *Int J Syst Evol Microbiol* **59**:285-294.
137. **Gupta, R. S., and E. Griffiths.** 2002. Critical issues in bacterial phylogeny. *Theor Popul Biol* **61**:423-434.
138. **Gutiérrez-Escobar, A. J., and D. Montoya Castano.** 2009. Evolutionary analysis for functional divergence of the Spo0A protein : the key sporulation control element. *In Silico Biology* **9**: <http://www.bioinfo.de/isb/2009/09/0013/main.html>.
139. **Haggoud, A., G. Reysset, H. Azeddoug, and M. Sebald.** 1994. Nucleotide sequence analysis of two 5-nitroimidazole resistance determinants from *Bacteroides* strains and of a new insertion sequence upstream of the two genes. *Antimicrob Agents Chemother* **38**:1047-1051.
140. **Haggoud, A., G. Reysset, and M. Sebald.** 1992. Cloning of a *Bacteroides fragilis* chromosomal determinant coding for 5-nitroimidazole resistance. *FEMS Microbiol Lett* **74**:1-5.
141. **Haggoud, A., S. Trinh, M. Moumni, and G. Reysset.** 1995. Genetic analysis of the minimal replicon of plasmid pIP417 and comparison with the other encoding 5-nitroimidazole resistance plasmids from *Bacteroides* spp. *Plasmid* **34**:132-143.
142. **Hallin, M., A. Deplano, O. Denis, R. De Mendonca, R. De Ryck, and M. J. Struelens.** 2007. Validation of pulsed-field gel electrophoresis and *spa* typing for long-term, nationwide epidemiological surveillance studies of *Staphylococcus aureus* infections. *J Clin Microbiol* **45**:127-133.
143. **Harms, C., A. Schleicher, M. D. Collins, and J. R. Andreesen.** 1998. *Tissierella creatinophila* sp. nov., a Gram-positive, anaerobic, non-spore-forming, creatinine-fermenting organism. *Int J Syst Bacteriol* **48 Pt 3**:983-993.
144. **Harmsen, D., S. Dostal, A. Roth, S. Niemann, J. Rothganger, M. Sammeth, J. Albert, M. Frosch, and E. Richter.** 2003. RIDOM: comprehensive and public sequence database for identification of *Mycobacterium* species. *BMC Infect Dis* **3**:26.

145. **Hasegawa, M., H. Kishino, and T. Yano.** 1985. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J Mol Evol* **22**:160-174.
146. **Haubold, B., and R. R. Hudson.** 2000. LIAN 3.0: detecting linkage disequilibrium in multilocus data. *Linkage Analysis. Bioinformatics* **16**:847-848.
147. **Hebert, L., P. Courtin, R. Torelli, M. Sanguinetti, M. P. Chapot-Chartier, Y. Auffray, and A. Benachour.** 2007. *Enterococcus faecalis* constitutes an unusual bacterial model in lysozyme resistance. *Infect Immun* **75**:5390-5398.
148. **Hecht, D. W.** 2006. Anaerobes: antibiotic resistance, clinical significance, and the role of susceptibility testing. *Anaerobe* **12**:115-21.
149. **Herlemann, D. P., O. Geissinger, W. Ikeda-Ohtsubo, V. Kunin, H. Sun, A. Lapidus, P. Hugenholtz, and A. Brune.** 2009. Genomic analysis of "*Elusimicrobium minutum*," the first cultivated representative of the phylum "*Elusimicrobia*" (formerly termite group 1). *Appl Environ Microbiol* **75**:2841-2849.
150. **Hernandez-Eugenio, G., M. L. Fardeau, J. L. Cayol, B. K. Patel, P. Thomas, H. Macarie, J. L. Garcia, and B. Ollivier.** 2002. *Sporanaerobacter acetigenes* gen. nov., sp. nov., a novel acetogenic, facultatively sulfur-reducing bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**:1217-1223.
151. **Hill, J. E., S. L. Penny, K. G. Crowell, S. H. Goh, and S. M. Hemmingsen.** 2004. cpnDB: a chaperonin sequence database. *Genome Res* **14**:1669-1675.
152. **Hiramatsu, K., N. Aritaka, H. Hanaki, S. Kawasaki, Y. Hosoda, S. Hori, Y. Fukuchi, and I. Kobayashi.** 1997. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. *Lancet* **350**:1670-1673.
153. **Hofstad, T., and P. Aasjord.** 1982. *Eubacterium plautii* (Séguin 1928) comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* **32**:346-349.
154. **Holdeman, L. V., E. P. Cato, and W. E. C. Moore.** 1977. *Anaerobe Laboratory Manual*, 4th ed. Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, VA.
155. **Holdeman, L. V., R. W. Kelley, and W. E. C. Moore.** 1984. Genus I. *Bacteroides* Castellani and Chalmers 1919, 959AL, p. 604-631. *In* N. R. Krieg and J. G. Holt (ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 1. Williams & Wilkins, Baltimore.
156. **Hong, H. J., M. I. Hutchings, L. M. Hill, and M. J. Buttner.** 2005. The role of the novel Fem protein VanK in vancomycin resistance in *Streptomyces coelicolor*. *J Biol Chem* **280**:13055-61.

157. **Huber, B., H. C. Scholz, N. Lucero, and H. J. Busse.** 2009. Development of a PCR assay for typing and subtyping of *Brucella* species. *Int J Med Microbiol*. [Epub ahead of print].
158. **Hugenholtz, P., C. Pitulle, K. L. Hershberger, and N. R. Pace.** 1998. Novel division level bacterial diversity in a Yellowstone hot spring. *J Bacteriol* **180**:366-376.
159. **Huson, D. H., and D. Bryant.** 2006. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Mol Biol Evol* **23**:254-267.
160. **Huss, V. A. R., H. Festl, and K. H. Schleifer.** 1983. Studies on the spectrometric determination of DNA hybridization from renaturation rates. *Syst Appl Microbiol* **4**:184-192.
161. **Iwai, T., Y. Inoue, M. Umeda, Y. Huang, N. Kurihara, M. Koike, and I. Ishikawa.** 2005. Oral bacteria in the occluded arteries of patients with Buerger disease. *J Vasc Surg* **42**:107-115.
162. **Jamal, W., M. Shahin, and V. O. Rotimi.** 2009. Surveillance and trends of antimicrobial resistance among clinical isolates of anaerobes in Kuwait hospitals from 2002 to 2007. *Anaerobe*. [Epub ahead of print].
163. **Jamal, W. Y., V. O. Rotimi, J. S. Brazier, M. Johny, W. M. Wetieh, and B. I. Duerden.** 2004. Molecular characterization of nitroimidazole resistance in metronidazole-resistant *Bacteroides* species isolated from hospital patients in Kuwait. *Med Princ Pract* **13**:147-152.
164. **Jaramillo, A., R. M. Arce, D. Herrera, M. Betancourth, J. E. Botero, and A. Contreras.** 2005. Clinical and microbiological characterization of periodontal abscesses. *J Clin Periodontol* **32**:1213-1218.
165. **Johnson, J. L., and B. S. Francis.** 1975. Taxonomy of the *Clostridia*: ribosomal ribonucleic acid homologies among the species. *J Gen Microbiol* **88**:229-44.
166. **Johnson, M. J., E. Thatcher, and M. E. Cox.** 1995. Techniques for controlling variability in Gram staining of obligate anaerobes. *J Clin Microbiol* **33**:755-758.
167. **Jousimies-Somer, H., P. Summanen, D. M. Citron, E. J. Baron, H. M. Wexler, and S. M. Finegold.** 2002. Wadsworth - KTL Anaerobic Bacteriology Manual, 6th ed. Star Publishing, Belmont, CA.
168. **Jukes, T. H., and C. R. Cantor.** 1969. Evolution of protein molecules, p. 21-132. *In* M. HN (ed.), *Mammalian Protein Metabolism*. Academic Press, New York.

169. Jumas-Bilak, E., J. P. Carlier, H. Jean-Pierre, D. Citron, K. Bernard, A. Damay, B. Gay, C. Teyssier, J. Campos, and H. Marchandin. 2007. *Jonquetella anthropi* gen. nov., sp. nov., the first member of the candidate phylum 'Synergistetes' isolated from man. *Int J Syst Evol Microbiol* 57:2743-2748.
170. **Jumas-Bilak, E., H. Jean-Pierre, J. P. Carlier, C. Teyssier, K. Bernard, B. Gay, J. Campos, F. Morio, and H. Marchandin.** 2005. *Dialister micraerophilus* sp. nov. and *Dialister propionicifaciens* sp. nov., isolated from human clinical samples. *Int J Syst Evol Microbiol* 55:2471-2478.
171. **Jumas-Bilak, E., C. Maugard, S. Michaux-Charachon, A. Allardet-Servent, A. Perrin, D. O'Callaghan, and M. Ramuz.** 1995. Study of the organization of the genomes of *Escherichia coli*, *Brucella melitensis* and *Agrobacterium tumefaciens* by insertion of a unique restriction site. *Microbiology* 141 (Pt 10):2425-2432.
172. **Jumas-Bilak, E., S. Michaux-Charachon, G. Bourg, M. Ramuz, and A. Allardet-Servent.** 1998. Unconventional genomic organization in the alpha subgroup of the *Proteobacteria*. *J Bacteriol* 180:2749-2755.
173. **Jumas-Bilak, E., L. Roudiere, and H. Marchandin.** 2009. Description of 'Synergistetes' phyl. nov. and emended description of the phylum 'Deferribacteres' and of the family *Syntrophomonadaceae*, phylum 'Firmicutes'. *Int J Syst Evol Microbiol* 59:1028-1035.
174. **Kalan, L., S. Ebert, T. Kelly, and G. D. Wright.** 2009. Noncanonical vancomycin resistance cluster from *Desulfitobacterium hafniense* Y51. *Antimicrob Agents Chemother* 53:2841-2845.
175. Kapatral, V., I. Anderson, N. Ivanova, G. Reznik, T. Los, A. Lykidis, A. Bhattacharyya, A. Bartman, W. Gardner, G. Grechkin, L. Zhu, O. Vasieva, L. Chu, Y. Kogan, O. Chaga, E. Goltsman, A. Bernal, N. Larsen, M. D'Souza, T. Walunas, G. Pusch, R. Haselkorn, M. Fonstein, N. Kyrpides, and R. Overbeek. 2002. Genome sequence and analysis of the oral bacterium *Fusobacterium nucleatum* strain ATCC 25586. *J Bacteriol* 184:2005-2018.
176. **Katsandri, A., A. Avlami, A. Pantazatou, D. P. Houhoula, and J. Papaparaskevas.** 2006. Dissemination of *nim*-class genes, encoding nitroimidazole resistance, among different species of Gram-negative anaerobic bacteria isolated in Athens, Greece. *J Antimicrob Chemother* 58:705-706.

177. **Katsandri, A., A. Avlamis, A. Pantazatou, G. L. Petrikkos, N. J. Legakis, and J. Papaparaskevas.** 2006. *In vitro* activities of tigecycline against recently isolated Gram-negative anaerobic bacteria in Greece, including metronidazole-resistant strains. *Diagn Microbiol Infect Dis* **55**:231-236.
178. **Keis, S., J. T. Sullivan, and D. T. Jones.** 2001. Physical and genetic map of the *Clostridium saccharobutylicum* (formerly *Clostridium acetobutylicum*) NCP 262 chromosome. *Microbiology* **147**:1909-1922.
179. **Keswani, J., and W. B. Whitman.** 2001. Relationship of 16S rRNA sequence similarity to DNA hybridization in prokaryotes. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**:667-678.
180. **Khamis, A., D. Raoult, and B. La Scola.** 2004. *rpoB* gene sequencing for identification of *Corynebacterium* species. *J Clin Microbiol* **42**:3925-3931.
181. **Kim, W., K. Hwang, S. G. Shin, S. Lee, and S. Hwang.** 2010. Effect of high temperature on bacterial community dynamics in anaerobic acidogenesis using mesophilic sludge inoculum. *Bioresour Technol.* **101 S1**: S17-22.
182. **Kimura, M.** 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* **16**:111-120.
183. **King, A., J. Downes, C. E. Nord, and I. Phillips.** 1999. Antimicrobial susceptibility of non-*Bacteroides fragilis* group anaerobic Gram-negative bacilli in Europe. *Clin Microbiol Infect* **5**:404-416.
184. **Kishino, H., and M. Hasegawa.** 1989. Evaluation of the maximum likelihood estimate of the evolutionary tree topologies from DNA sequence data, and the branching order in hominoidea. *J Mol Evol* **29**:170-179.
185. **Koonin, E. V.** 2009. Darwinian evolution in the light of genomics. *Nucleic Acids Res* **37**:1011-1034.
186. **Korber, B.** 2000. Chapter 4. HIV Signature and Sequence Variation Analysis. *Computational Analysis of HIV Molecular Sequence*, p. 55-72. In A. G. Rodrigo and G. H. Learn (ed.), *Computational Analysis of HIV Molecular Sequence*. Kluwer Academic, Dordrecht, Netherlands.
187. **Krawiec, S.** 1985. Concept of a bacterial species. *Int J Syst Bacteriol* **35**:217-220.

188. **Kuhner, C. H., C. Frank, A. Griesshammer, M. Schmittroth, G. Acker, A. Gossner, and H. L. Drake.** 1997. *Sporomusa silvacetica* sp, nov., an acetogenic bacterium isolated from aggregated forest soil. *Int J Syst Bacteriol* **47**:352-358.
189. **Kulik, E. M., K. Lenkeit, S. Chenaux, and J. Meyer.** 2008. Antimicrobial susceptibility of periodontopathogenic bacteria. *J Antimicrob Chemother* **61**:1087-1091.
190. Kulikova, T., P. Aldebert, N. Althorpe, W. Baker, K. Bates, P. Browne, A. van den Broek, G. Cochrane, K. Duggan, R. Eberhardt, N. Faruque, M. Garcia-Pastor, N. Harte, C. Kanz, R. Leinonen, Q. Lin, V. Lombard, R. Lopez, R. Mancuso, M. McHale, F. Nardone, V. Silventoinen, P. Stoehr, G. Stoesser, M. A. Tuli, K. Tzouvara, R. Vaughan, D. Wu, W. Zhu, and R. Apweiler. 2004. The EMBL Nucleotide Sequence Database. *Nucleic Acids Res* **32**:D27-30.
191. **Kunin, V., L. Goldovsky, N. Darzentas, and C. A. Ouzounis.** 2005. The net of life: reconstructing the microbial phylogenetic network. *Genome Res* **15**:954-959.
192. **Lan, R., and P. R. Reeves.** 2000. Intraspecies variation in bacterial genomes: the need for a species genome concept. *Trends Microbiol* **8**:396-401.
193. **Lapage, S. P., P. H. A. Sneath, E. F. Lessel, V. D. B. Skerman, H. P. R. Seeliger, and W. A. Clark.** 1992. International code of nomenclature of bacteria (1990 revision). American Society for Microbiology, Washington D.C.
194. **Lassmann, B., D. R. Gustafson, C. M. Wood, and J. E. Rosenblatt.** 2007. Reemergence of anaerobic bacteremia. *Clin Infect Dis* **44**:895-900.
195. **Launay, A., S. A. Ballard, P. D. Johnson, M. L. Grayson, and T. Lambert.** 2006. Transfer of vancomycin resistance transposon *Tn1549* from *Clostridium symbiosum* to *Enterococcus* spp. in the gut of gnotobiotic mice. *Antimicrob Agents Chemother* **50**:1054-1062.
196. **Le Guyader, A.** 2009. La théorie synthétique de l'évolution revisitée, p. 22-29, *Dossiers pour la Science*, vol. 63.
197. **Leblond, P., P. Demuyter, J. M. Simonet, and B. Decaris.** 1991. Genetic instability and associated genome plasticity in *Streptomyces ambofaciens*: pulsed-field gel electrophoresis evidence for large DNA alterations in a limited genomic region. *J Bacteriol* **173**:4229-4233.
198. **Leclercq, R.** 1997. Résistance bactérienne aux glycopeptides. *Médecine thérapeutique* **3(HS1)**:77-85.

199. **Lecointre, G., and A. Le Guyader.** 2006. Classification phylogénétique du vivant. BELIN.
200. **Lee, Z. M., C. Bussema, 3rd, and T. M. Schmidt.** 2009. rrnDB: documenting the number of rRNA and tRNA genes in bacteria and archaea. *Nucleic Acids Res* **37**:D489-93.
201. **Lei, W. Y., W. H. Chang, S. C. Shih, C. J. Liu, and C. H. Shih.** 2009. Pyogenic liver abscess with *Prevotella* species and *Fusobacterium necrophorum* as causative pathogens in an immunocompetent patient. *J Formos Med Assoc* **108**:253-257.
202. **Leiros, H. K., S. Kozielski-Stuhrmann, U. Kapp, L. Terradot, G. A. Leonard, and S. M. McSweeney.** 2004. Structural basis of 5-nitroimidazole antibiotic resistance: the crystal structure of NimA from *Deinococcus radiodurans*. *J Biol Chem* **279**:55840-55849.
203. **Leiros, H. K., C. Tedesco, and S. M. McSweeney.** 2008. High-resolution structure of the antibiotic resistance protein NimA from *Deinococcus radiodurans*. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* **64**:442-447.
204. **Lemee, L., A. Dhalluin, M. Pestel-Caron, J. F. Lemeland, and J. L. Pons.** 2004. Multilocus sequence typing analysis of human and animal *Clostridium difficile* isolates of various toxigenic types. *J Clin Microbiol* **42**:2609-2617.
205. **Lherminier, P.** 2009. Le mythe de l'espèce. Ellipses, Paris.
206. **Liao, D.** 2000. Gene conversion drives within genic sequences: concerted evolution of ribosomal RNA genes in bacteria and archaea. *J Mol Evol* **51**:305-317.
207. **Liebgott, P. P., M. Joseph, M. L. Fardeau, J. L. Cayol, E. Falsen, F. Chamkh, A. I. Qatibi, and M. Labat.** 2008. *Clostridiisalibacter paucivorans* gen. nov., sp. nov., a novel moderately halophilic bacterium isolated from olive mill wastewater. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**:61-67.
208. **Liu, C. Y., Y. T. Huang, C. H. Liao, L. C. Yen, H. Y. Lin, and P. R. Hsueh.** 2008. Increasing trends in antimicrobial resistance among clinically important anaerobes and *Bacteroides fragilis* isolates causing nosocomial infections: emerging resistance to carbapenems. *Antimicrob Agents Chemother* **52**:3161-3168.
209. **Liu, S. L., A. Hessel, and K. E. Sanderson.** 1993. Genomic mapping with I-CeuI, an intron-encoded endonuclease specific for genes for ribosomal RNA, in *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, and other bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**:6874-6878.

210. **Liu, S. L., A. B. Schryvers, K. E. Sanderson, and R. N. Johnston.** 1999. Bacterial phylogenetic clusters revealed by genome structure. *J Bacteriol* **181**:6747-6755.
211. **Lofmark, S., H. Fang, M. Hedberg, and C. Edlund.** 2005. Inducible metronidazole resistance and *nim* genes in clinical *Bacteroides fragilis* group isolates. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:1253-1256.
212. Logan, N. A., O. Berge, A. H. Bishop, H. J. Busse, P. De Vos, D. Fritze, M. Heyndrickx, P. Kampfer, L. Rabinovitch, M. S. Salkinoja-Salonen, L. Seldin, and A. Ventosa. 2009. Proposed minimal standards for describing new taxa of aerobic, endospore-forming bacteria. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**:2114-2121.
213. **Lubbe, M. M., P. L. Botha, and L. J. Chalkley.** 1999. Comparative activity of eighteen antimicrobial agents against anaerobic bacteria isolated in South Africa. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **18**:46-54.
214. **Lubbe, M. M., K. Stanley, and L. J. Chalkley.** 1999. Prevalence of *nim* genes in anaerobic/facultative anaerobic bacteria isolated in South Africa. *FEMS Microbiol Lett* **172**:79-83.
215. **Ludwig, W.** 2007. Nucleic acid techniques in bacterial systematics and identification. *Int J Food Microbiol* **120**:225-236.
216. **Ludwig, W., K. H. Schleifer, and W. B. Whitman.** 2009. Revised Road Map to Phylum *Firmicutes*. *Bergey's Outline* **3**:1-32.
217. Ludwig, W., O. Strunk, R. Westram, L. Richter, H. Meier, Yadhukumar, A. Buchner, T. Lai, S. Steppi, G. Jobb, W. Forster, I. Brettske, S. Gerber, A. W. Ginhart, O. Gross, S. Grumann, S. Hermann, R. Jost, A. Konig, T. Liss, R. Lussmann, M. May, B. Nonhoff, B. Reichel, R. Strehlow, A. Stamatakis, N. Stuckmann, A. Vilbig, M. Lenke, T. Ludwig, A. Bode, and K. H. Schleifer. 2004. ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Res* **32**:1363-1371.
218. **Madigan, M., and J. Martinko.** 2007. *Brock, Biologie des Microorganismes*, 11ème Ed. ed. Pearson Education.
219. Maestre, J. R., A. Bascones, P. Sanchez, P. Matesanz, L. Aguilar, M. J. Gimenez, I. Perez-Balcahio, J. J. Granizo, and J. Prieto. 2007. Odontogenic bacteria in periodontal disease and resistance patterns to common antibiotics used as treatment and prophylaxis in odontology in Spain. *Rev Esp Quimioter* **20**:61-67.

220. Maidak, B. L., N. Larsen, M. J. McCaughey, R. Overbeek, G. J. Olsen, K. Fogel, J. Blandy, and C. R. Woese. 1994. The Ribosomal Database Project. *Nucleic Acids Res* **22**:3485-7.
221. **Marchandin, H., H. Jean-Pierre, J. Campos, L. Dubreuil, C. Teyssier, and E. Jumas-Bilak.** 2004. *NimE* gene in a metronidazole-susceptible *Veillonella* sp. strain. *Antimicrob Agents Chemother* **48**:3207-3208.
222. **Marchandin, H., F. Mory, H. Jean-Pierre, J. P. Carlier, F. Vernet, and E. Jumas-Bilak.** 2007. Genre *Prevotella* : données taxonomiques actuelles. *Bulletin de la Société Française de Microbiologie* **22**:32-37.
223. **Marchandin, H., C. Teyssier, J. Campos, H. Jean-Pierre, F. Roger, B. Gay, J. P. Carlier, and E. Jumas-Bilak.** 2009. *Negativicoccus succinicivorans* gen. nov., sp. nov., isolated from human clinical samples, emended description of the family *Veillonellaceae* and description of *Negativicutes* classis nov., *Selenomonadales* ord. nov, and *Acidaminococcaceae* fam. nov. in the bacterial phylum *Firmicutes*. *Int J Syst Evol Microbiol*. [Epub ahead of print].
224. **Marchandin, H., C. Teyssier, M. Simeon De Buochberg, H. Jean-Pierre, C. Carriere, and E. Jumas-Bilak.** 2003. Intra-chromosomal heterogeneity between the four 16S rRNA gene copies in the genus *Veillonella*: implications for phylogeny and taxonomy. *Microbiology* **149**:1493-1501.
225. **Marshall, P., and C. Lemieux.** 1992. The *I-CeuI* endonuclease recognizes a sequence of 19 base pairs and preferentially cleaves the coding strand of the *Chlamydomonas moewusii* chloroplast large subunit rRNA gene. *Nucleic Acids Res* **20**:6401-6407.
226. **Marvin, L. F., M. A. Roberts, and L. B. Fay.** 2003. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in clinical chemistry. *Clin Chim Acta* **337**:11-21.
227. **Mayr, E.** 1942. *Systematics and the origin of species*. Columbia University Press, New York.
228. **McCutcheon, J. P., B. R. McDonald, and N. A. Moran.** 2009. Origin of an alternative genetic code in the extremely small and GC-rich genome of a bacterial symbiont. *PLoS Genet* **5**:e1000565.
229. **McKessar, S. J., A. M. Berry, J. M. Bell, J. D. Turnidge, and J. C. Paton.** 2000. Genetic characterization of *vanG*, a novel vancomycin resistance locus of *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother* **44**:3224-3228.

230. **Mechichi, T., M. Labat, J. L. Garcia, P. Thomas, and B. K. Patel.** 1999. *Sporobacterium olearium* gen. nov., sp. nov., a new methanethiol-producing bacterium that degrades aromatic compounds, isolated from an olive mill wastewater treatment digester. *Int J Syst Bacteriol* **49 Pt 4**:1741-1748.
231. **Mesbah, M., and W. B. Whitman.** 1989. Measurement of deoxyguanosine/thymidine ratios in complex mixtures by high-performance liquid chromatography for determination of the mole percentage guanine + cytosine of DNA. *J Chromatogr* **479**:297-306.
232. **Meyer, M., and J. L. Tholozan.** 1999. A new growth and *in vitro* sporulation medium for *Clostridium perfringens*. *Lett Appl Microbiol* **28**:98-102.
233. Michaux-Charachon, S., G. Bourg, E. Jumas-Bilak, P. Guigue-Talet, A. Allardet-Servent, D. O'Callaghan, and M. Ramuz. 1997. Genome structure and phylogeny in the genus *Brucella*. *J Bacteriol* **179**:3244-3249.
234. Michaux-Charachon, S., E. Jumas-Bilak, A. Allardet-Servent, G. Bourg, M. L. Boschioli, M. Ramuz, and D. O'Callaghan. 2002. The *Brucella* genome at the beginning of the post-genomic era. *Vet Microbiol* **90**:581-585.
235. **Miyazaki, S., H. Sugawara, K. Ikeo, T. Gojobori, and Y. Tateno.** 2004. DDBJ in the stream of various biological data. *Nucleic Acids Res* **32**:D31-4.
236. **Mollet, C., M. Drancourt, and D. Raoult.** 1997. *rpoB* sequence analysis as a novel basis for bacterial identification. *Mol Microbiol* **26**:1005-1011.
237. **Moore, M. R., F. Perdreau-Remington, and H. F. Chambers.** 2003. Vancomycin treatment failure associated with heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in a patient with endocarditis and in the rabbit model of endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother* **47**:1262-1266.
238. **Moore, W. E. C., and L. V. Holdeman.** 1986. Genus *Eubacterium* Prévot 1938, 294 AL. In P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe, and J. G. Holt (ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2. Williams & Wilkins, Baltimore.
239. **Mory, F., S. Fougnot, and A. Lozniewski.** 2003. Sensibilité aux antibiotiques des bactéries anaérobies. *Revue Française des Laboratoires* **354**:27-32.
240. **Mory, F., A. Lozniewski, V. David, J. P. Carlier, L. Dubreuil, and R. Leclercq.** 1998. Low-level vancomycin resistance in *Clostridium innocuum*. *J Clin Microbiol* **36**:1767-1768.

241. **Moussaoui, W., C. Bouakaze, and G. Prevost.** 2009. Applications de la spectrométrie de masse MALDI-TOF à l'identification bactérienne. *Bulletin de la Société Française de Microbiologie* **24**:293-302.
242. **Murakami, A., H. Ashida, and J. Terao.** 2008. Multitargeted cancer prevention by quercetin. *Cancer Lett* **269**:315-325.
243. **Murray, R. G. E.** 1984. The higher taxa, or, a place for everything...?, p. 31-34. *In* N. R. KRIEG and J. G. HOLT (ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 1. Williams & Wilkins Co, Baltimore.
244. Murray, R. G. E., D. J. Brenner, R. R. Colwell, P. De Vos, M. Goodfellow, P. A. D. Grimont, N. Pfennig, E. Stackebrandt, and G. A. Zavarzin. 1990. Report of the *ad hoc* committee on approaches to taxonomy within the *Proteobacteria*. *Int J Syst Bacteriol* **40**:213-215.
245. **Mustapha, I. Z., S. Debrey, M. Oladubu, and R. Ugarte.** 2007. Markers of systemic bacterial exposure in periodontal disease and cardiovascular disease risk: a systematic review and meta-analysis. *J Periodontol* **78**:2289-2302.
246. **Myers, C., Y. Aggoun, A. Gervaix, B. Ninet, J. Schrenzel, and P. Kuhnert.** 2007. Postoperative Gram-negative anaerobic bacterial endocarditis. *Pediatr Infect Dis J* **26**:369.
247. **Narikawa, S., T. Suzuki, M. Yamamoto, and M. Nakamura.** 1991. Lactate dehydrogenase activity as a cause of metronidazole resistance in *Bacteroides fragilis* NCTC 11295. *J Antimicrob Chemother* **28**:47-53.
248. Norris, V., T. den Blaauwen, A. Cabin-Flaman, R. H. Doi, R. Harshey, L. Janniere, A. Jimenez-Sanchez, D. J. Jin, P. A. Levin, E. Mileykovskaya, A. Minsky, M. Saier, Jr., and K. Skarstad. 2007. Functional taxonomy of bacterial hyperstructures. *Microbiol Mol Biol Rev* **71**:230-253.
249. **Oh, S., P. R. Havlen, and N. Hussain.** 2005. A case of polymicrobial endocarditis caused by anaerobic organisms in an injection drug user. *J Gen Intern Med* **20**:C1-2.
250. **Okamoto, M., N. Maeda, K. Kondo, and K. P. Leung.** 1999. Hemolytic and hemagglutinating activities of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*. *FEMS Microbiol Lett* **178**:299-304.
251. **Olsen, I., and H. N. Shah.** 2003. International Committee on Systematics of Prokaryotes. Subcommittee on the taxonomy of Gram-negative anaerobic rods. Minutes of the meeting, 29 July 2002, Paris, France. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**:923-924.

252. **Olsen, I., and H. N. Shah.** 2001. International Committee on Systematics of Prokaryotes. Subcommittee on the taxonomy of Gram-negative anaerobic rods. Minutes of the meetings, 9 and 10 July 2000, Manchester, UK. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**:1943-1944.
253. **Onyenwoke, R. U., J. A. Brill, K. Farahi, and J. Wiegel.** 2004. Sporulation genes in members of the low G+C Gram-type-positive phylogenetic branch (*Firmicutes*). *Arch Microbiol* **182**:182-192.
254. **Orlando, G., F. Pisani, P. Mastrantonio, L. Bonanni, P. Di Cocco, M. D'Angelo, A. Tabilio, and A. Famulari.** 2008. *Eubacterium plautii* infection in a kidney transplant recipient: a noteworthy case of pleural effusion and fever. *Clin Transplant* **22**:520-524.
255. **Page, R. D.** 1996. TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput Appl Biosci* **12**:357-358.
256. **Papaparaskevas, J., A. Pantazatou, A. Katsandri, D. P. Houhoula, N. J. Legakis, A. Tsakris, and A. Avlami.** 2008. Moxifloxacin resistance is prevalent among *Bacteroides* and *Prevotella* species in Greece. *J Antimicrob Chemother* **62**:137-141.
257. **Papaparaskevas, J., A. Pantazatou, A. Katsandri, N. J. Legakis, and A. Avlami.** 2005. Multicentre survey of the *in vitro* activity of seven antimicrobial agents, including ertapenem, against recently isolated Gram-negative anaerobic bacteria in Greece. *Clin Microbiol Infect* **11**:820-824.
258. **Park, Y., J. Y. Choi, D. Yong, K. Lee, and J. M. Kim.** 2009. Clinical features and prognostic factors of anaerobic infections: a 7-year retrospective study. *Korean J Intern Med* **24**:13-18.
259. **Parshina, S. N., R. Kleerebezem, J. L. Sanz, G. Lettinga, A. N. Nozhevnikova, N. A. Kostrikina, A. M. Lysenko, and A. J. Stams.** 2003. *Soehngenia saccharolytica* gen. nov., sp. nov. and *Clostridium amygdalinum* sp. nov., two novel anaerobic, benzaldehyde-converting bacteria. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**:1791-1799.
260. **Paster, B. J., F. E. Dewhirst, I. Olsen, and G. J. Fraser.** 1994. Phylogeny of *Bacteroides*, *Prevotella*, and *Porphyromonas* spp. and related bacteria. *J Bacteriol* **176**:725-732.
261. **Paustian, T., and G. Roberts.** 2009. Chapter 2-25. The cell wall surrounds and holds in the microbe., *Through the microscope: A look at all things small*. [Online.] (http://www.microbiologytext.com/index.php?module=Book&func=toc&book_id=4). University of Wisconsin, Madison.

262. **Pelaez, T., L. Alcalá, R. Alonso, M. Rodríguez-Creixems, J. M. García-Lechuz, and E. Bouza.** 2002. Reassessment of *Clostridium difficile* susceptibility to metronidazole and vancomycin. *Antimicrob Agents Chemother* **46**:1647-1650.
263. Pelaez, T., E. Cercenado, L. Alcalá, M. Marin, A. Martín-López, J. Martínez-Alarcón, P. Catalan, M. Sánchez-Somolinos, and E. Bouza. 2008. Metronidazole resistance in *Clostridium difficile* is heterogeneous. *J Clin Microbiol* **46**:3028-3032.
264. **Pelt, P., B. Zimmermann, N. Ulbrich, and J. P. Bernimoulin.** 2002. Effects of lipopolysaccharide extracted from *Prevotella intermedia* on bone formation and on the release of osteolytic mediators by fetal mouse osteoblasts in vitro. *Arch Oral Biol* **47**:859-866.
265. **Perichon, B., P. Reynolds, and P. Courvalin.** 1997. VanD-type glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* BM4339. *Antimicrob Agents Chemother* **41**:2016-2018.
266. **Perriere, G., and M. Gouy.** 1996. WWW-query: an on-line retrieval system for biological sequence banks. *Biochimie* **78**:364-369.
267. **Podglajen, I., J. Breuil, and E. Collatz.** 2005. Anaerobes, p. 340-348. In D. G. WHITE, M. N. ALESHUN, and P. F. McDERMOTT (ed.), *Frontiers in antimicrobial resistance*. ASM Press.
268. Potempa, M., J. Potempa, T. Kantyka, K. A. Nguyen, K. Wawrzonek, S. P. Manandhar, K. Popadiak, K. Riesbeck, S. Eick, and A. M. Blom. 2009. Interpain A, a cysteine proteinase from *Prevotella intermedia*, inhibits complement by degrading complement factor C3. *PLoS Pathog* **5**:e1000316.
269. **Poyart, C., P. Berche, and P. Trieu-Cuot.** 1995. Characterization of superoxide dismutase genes from Gram-positive bacteria by polymerase chain reaction using degenerate primers. *FEMS Microbiol Lett* **131**:41-45.
270. **Pradella, S., A. Hans, C. Sproer, H. Reichenbach, K. Gerth, and S. Beyer.** 2002. Characterisation, genome size and genetic manipulation of the myxobacterium *Sorangium cellulosum* So ce56. *Arch Microbiol* **178**:484-492.
271. **Prescott, L. M., J. P. Harley, and D. A. Klein.** 1995. La taxinomie microbienne, p. 404-518, *Microbiologie*. De Boeck Université, Bruxelles.
272. **Prévot, A. R.** 1961. Problèmes généraux de systématique. *Traité de systématique bactérienne*. Dunod, Paris.

273. **Pruesse, E., C. Quast, K. Knittel, B. M. Fuchs, W. Ludwig, J. Peplies, and F. O. Glockner.** 2007. SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Res* **35**:7188-7196.
274. **Pumbwe, L., D. Glass, and H. M. Wexler.** 2006. Efflux pump overexpression in multiple-antibiotic-resistant mutants of *Bacteroides fragilis*. *Antimicrob Agents Chemother* **50**:3150-3153.
275. **Pumbwe, L., O. Ueda, F. Yoshimura, A. Chang, R. L. Smith, and H. M. Wexler.** 2006. *Bacteroides fragilis* BmeABC efflux systems additively confer intrinsic antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother* **58**:37-46.
276. **Pumbwe, L., D. W. Wareham, J. Aduse-Opoku, J. S. Brazier, and H. M. Wexler.** 2007. Genetic analysis of mechanisms of multidrug resistance in a clinical isolate of *Bacteroides fragilis*. *Clin Microbiol Infect* **13**:183-189.
277. **Rasko, D. A., M. J. Rosovitz, G. S. Myers, E. F. Mongodin, W. F. Fricke, P. Gajer, J. Crabtree, M. Sebahia, N. R. Thomson, R. Chaudhuri, I. R. Henderson, V. Sperandio, and J. Ravel.** 2008. The pangenome structure of *Escherichia coli*: comparative genomic analysis of *E. coli* commensal and pathogenic isolates. *J Bacteriol* **190**:6881-6893.
278. **Reynolds, E. S.** 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* **17**:208-212.
279. **Reysset, G., S. Trinh, J. P. Carlier, and M. Sebald.** 1996. Bases génétiques de la résistance aux 5-nitroimidazolés des *Bacteroides* spp. *Med Mal Infect* **26**:213-219.
280. **Riep, B., L. Edesi-Neuss, F. Claessen, H. Skarabis, B. Ehmke, T. F. Flemmig, J. P. Bernimoulin, U. B. Gobel, and A. Moter.** 2009. Are putative periodontal pathogens reliable diagnostic markers? *J Clin Microbiol* **47**:1705-11.
281. **Rippere, K., R. Patel, J. R. Uhl, K. E. Piper, J. M. Steckelberg, B. C. Kline, F. R. Cockerill, 3rd, and A. A. Yousten.** 1998. DNA sequence resembling *vanA* and *vanB* in the vancomycin-resistant biopesticide *Bacillus popilliae*. *J Infect Dis* **178**:584-8.
282. **Rivera, M. C., and J. A. Lake.** 2004. The ring of life provides evidence for a genome fusion origin of eukaryotes. *Nature* **431**:152-155.
283. **Ruimy, R., I. Podglajen, J. Breuil, R. Christen, and E. Collatz.** 1996. A recent fixation of *cfiA* genes in a monophyletic cluster of *Bacteroides fragilis* is correlated with the presence of multiple insertion elements. *J Bacteriol* **178**:1914-1918.

284. **Russell, S. C.** 2009. Microorganism characterization by single particle mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev* **28**:376-387.
285. **Saitou, N., and M. Nei.** 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**:406-425.
286. **Sakamoto, M., M. Suzuki, Y. Huang, M. Umeda, I. Ishikawa, and Y. Benno.** 2004. *Prevotella shahii* sp. nov. and *Prevotella salivae* sp. nov., isolated from the human oral cavity. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**:877-883.
287. **Sakamoto, M., M. Umeda, I. Ishikawa, and Y. Benno.** 2005. *Prevotella multisaccharivorax* sp. nov., isolated from human subgingival plaque. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**:1839-1843.
288. **Sandoe, J. A., J. K. Struthers, and J. S. Brazier.** 2001. Subdural empyema caused by *Prevotella loescheii* with reduced susceptibility to metronidazole. *J Antimicrob Chemother* **47**:366-367.
289. **Schapiro, J. M., R. Gupta, E. Stefansson, F. C. Fang, and A. P. Limaye.** 2004. Isolation of metronidazole-resistant *Bacteroides fragilis* carrying the *nimA* nitroreductase gene from a patient in Washington State. *J Clin Microbiol* **42**:4127-4129.
290. **Schaumann, R., S. Petzold, M. Fille, and A. C. Rodloff.** 2005. Inducible metronidazole resistance in *nim*-positive and *nim*-negative *Bacteroides fragilis* group strains after several passages metronidazole containing columbia agar plates. *Infection* **33**:368-372.
291. **Schleifer, K. H., and O. Kandler.** 1972. Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol Rev* **36**:407-477.
292. **Schloss, P. D., and J. Handelsman.** 2004. Status of the microbial census. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**:686-691.
293. **Schnurer, A., B. Schink, and B. H. Svensson.** 1996. *Clostridium ultunense* sp. nov., a mesophilic bacterium oxidizing acetate in syntrophic association with a hydrogenotrophic methanogenic bacterium. *Int J Syst Bacteriol* **46**:1145-1152.
294. **Schoefer, L., R. Mohan, A. Schwiertz, A. Braune, and M. Blaut.** 2003. Anaerobic degradation of flavonoids by *Clostridium orbiscindens*. *Appl Environ Microbiol* **69**:5849-5954.
295. **Sedallian, A., G. Antoniotti, and S. Bland.** 1995. Les germes responsables des vaginoses bactériennes. *Med Mal Infect* **25**:791-795.

296. **Selander, R. K., D. A. Caugant, H. Ochman, J. M. Musser, M. N. Gilmour, and T. S. Whittam.** 1986. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Appl Environ Microbiol* **51**:873-884.
297. **Shah, H. N., and D. M. Collins.** 1990. *Prevotella*, a new genus to include *Bacteroides melaninogenicus* and related species formerly classified in the genus *Bacteroides*. *Int J Syst Bacteriol* **40**:205-208.
298. **Shah, H. N., and S. E. Gharbia.** 1992. Biochemical and chemical studies on strains designated *Prevotella intermedia* and proposal of a new pigmented species, *Prevotella nigrescens* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **42**:542-546.
299. **Shaheduzzaman, S. M., S. Akimoto, T. Kuwahara, T. Kinouchi, and Y. Ohnishi.** 1997. Genome analysis of *Bacteroides* by pulsed-field gel electrophoresis: chromosome sizes and restriction patterns. *DNA Res* **4**:19-25.
300. **Shen, S., L. P. Samaranayake, and H. K. Yip.** 2005. Coaggregation profiles of the microflora from root surface caries lesions. *Arch Oral Biol* **50**:23-32.
301. **Shoemaker, N. B., H. Vlamakis, K. Hayes, and A. A. Salyers.** 2001. Evidence for extensive resistance gene transfer among *Bacteroides* spp. and among *Bacteroides* and other genera in the human colon. *Appl Environ Microbiol* **67**:561-568.
302. **Sieradzki, K., and A. Tomasz.** 2003. Alterations of cell wall structure and metabolism accompany reduced susceptibility to vancomycin in an isogenic series of clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **185**:7103-7110.
303. **Sievert, D. M., J. T. Rudrik, J. B. Patel, L. C. McDonald, M. J. Wilkins, and J. C. Hageman.** 2008. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in the United States, 2002-2006. *Clin Infect Dis* **46**:668-674.
304. **Simeon, D., A. Lozniewski, P. Canton, and M. Weber.** 1997. [Molecular typing by pulsed field gel electrophoresis of *Enterobacter cloacae* strains isolated from osteoarticular infections at the Nancy University Hospital 1990-1994]. *Ann Biol Clin (Paris)* **55**:465-469.
305. Singer, E., L. Calvet, F. Mory, C. Muller, M. Chomar, M. C. Bezia, S. Bland, M. E. Juvenin, H. Drugeon, T. Fosse, F. Goldstein, B. Jaulhac, H. Monteil, H. Marchandin, H. Jean-Pierre, and L. Dubreuil. 2008. [Monitoring of antibiotic resistance of Gram-negative anaerobes]. *Med Mal Infect* **38**:256-263.
306. **Skerman, V. D. B., V. McGowan, and P. H. A. Sneath.** 1980. Approved lists of bacterial names. *Int J Syst Bacteriol* **30**:225-420.

307. **Skerman, V. D. B., V. McGowan, and P. H. A. Sneath.** 1992. Approved lists of bacterial names, Amended edition. American Society for Microbiology, Washington D.C.
308. **Skophammer, R. G., J. A. Servin, C. W. Herbold, and J. A. Lake.** 2007. Evidence for a Gram-positive, eubacterial root of the tree of life. *Mol Biol Evol* **24**:1761-1768.
309. **Slobodkin, A. I., T. P. Tourova, N. A. Kostrikina, A. M. Lysenko, K. E. German, E. A. Bonch-Osmolovskaya, and N. K. Birkeland.** 2006. *Tepidimicrobium ferriphilum* gen. nov., sp. nov., a novel moderately thermophilic, Fe(III)-reducing bacterium of the order *Clostridiales*. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**:369-372.
310. **Sobieraj, M., and D. R. Boone.** 2006. Chapter 1.3.7. *Syntrophomonadaceae*, p. 1041–1049, *The Prokaryotes*, vol. 4. Springer, New York.
311. **Soki, J., E. Fodor, D. W. Hecht, R. Edwards, V. O. Rotimi, I. Kerekes, E. Urban, and E. Nagy.** 2004. Molecular characterization of imipenem-resistant, *cfiA*-positive *Bacteroides fragilis* isolates from the USA, Hungary and Kuwait. *J Med Microbiol* **53**:413-419.
312. **Soki, J., M. Gal, J. S. Brazier, V. O. Rotimi, E. Urban, E. Nagy, and B. I. Duerden.** 2006. Molecular investigation of genetic elements contributing to metronidazole resistance in *Bacteroides* strains. *J Antimicrob Chemother* **57**:212-220.
313. **Sokolova, T., J. Hanel, R. U. Onyenwoke, A. L. Reysenbach, A. Banta, R. Geyer, J. M. Gonzalez, W. B. Whitman, and J. Wiegel.** 2007. Novel chemolithotrophic, thermophilic, anaerobic bacteria *Thermolithobacter ferrireducens* gen. nov., sp. nov. and *Thermolithobacter carboxydivorans* sp. nov. *extremophiles* **11**:145-157.
314. **Stackebrandt, E.** 2004. The phylogeny and classification of anaerobic bacteria, p. 15-19. *In* M. M. Nakano and P. Zuber (ed.), *Strict and Facultative Anaerobes: Medical and Environmental Aspects*. Horizon Bioscience.
315. **Stackebrandt, E.** 2001. Phylogeny based on 16S rRNA/DNA. *Encyclopedia of Life Sciences* Nature Publishing Group. [Online.] (<http://www.els.net/>), p. 1-7.
316. **Stackebrandt, E., W. Frederiksen, G. M. Garrity, P. A. Grimont, P. Kampfner, M. C. Maiden, X. Nesme, R. Rossello-Mora, J. Swings, H. G. Truper, L. Vauterin, A. C. Ward, and W. B. Whitman.** 2002. Report of the *ad hoc* committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**:1043-1047.
317. **Stackebrandt, E., and B. M. Goebel.** 1994. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J Syst Bacteriol* **44**:846-849.

318. **Stackebrandt, E., I. Kramer, J. Swiderski, and H. Hippe.** 1999. Phylogenetic basis for a taxonomic dissection of the genus *Clostridium*. *FEMS Immunol Med Microbiol* **24**:253-258.
319. **Staley, J. T.** 2009. The phylogenomic species concept for *Bacteria* and *Archae*. *Microbe* **4**:361-365.
320. **Staley, J. T., and N. J. Krieg.** 1984. Classification of prokaryotic organisms : an overview, p. 1-3, N. R. Krieg and J. G. Holt (ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 1. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
321. **Stein, G. E., and E. J. Goldstein.** 2006. Fluoroquinolones and anaerobes. *Clin Infect Dis* **42**:1598-1607.
322. **Stephan, B., H. A. Greife, A. Pridmore, and P. Silley.** 2008. Activity of pradofloxacin against *Porphyromonas* and *Prevotella* spp. implicated in periodontal disease in dogs: susceptibility test data from a European multicenter study. *Antimicrob Agents Chemother* **52**:2149-2155.
323. Strombeck, L., J. Sandros, E. Holst, P. Madianos, U. Nannmark, P. Papapanou, and I. Mattsby-Baltzer. 2007. *Prevotella bivia* can invade human cervix epithelial (HeLa) cells. *Apmis* **115**:241-251.
324. **Stubbs, S. L., J. S. Brazier, P. R. Talbot, and B. I. Duerden.** 2000. PCR-restriction fragment length polymorphism analysis for identification of *Bacteroides* spp. and characterization of nitroimidazole resistance genes. *J Clin Microbiol* **38**:3209-3213.
325. **Tamura, K., and M. Nei.** 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol* **10**:512-526.
326. Tap, J., S. Mondot, F. Levenez, E. Pelletier, C. Caron, J. P. Furet, E. Ugarte, R. Munoz-Tamayo, D. L. Paslier, R. Nalin, J. Dore, and M. Leclerc. 2009. Towards the human intestinal microbiota phylogenetic core. *Environ Microbiol.* **11**:2574-2584
327. **Tenover, F. C., R. D. Arbeit, R. V. Goering, P. A. Mickelsen, B. E. Murray, D. H. Persing, and B. Swaminathan.** 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* **33**:2233-2239.
328. **Teyssier, C.** 2003. Les bactéries du genre *Ochrobactrum* : des bactéries opportunistes à génomes complexes et dynamiques. Thèse de l'Université Aix-Marseille II, Marseille.

329. **Teyssier, C., H. Marchandin, and E. Jumas-Bilak.** 2004. Le génome des alpha-protéobactéries : complexité, réduction, diversité et fluidité. *Can J Microbiol* **50**:383-396.
330. **Teyssier, C., H. Marchandin, A. Masnou, J. L. Jeannot, M. S. de Buochberg, and E. Jumas-Bilak.** 2005. Pulsed-field gel electrophoresis to study the diversity of whole-genome organization in the genus *Ochrobactrum*. *Electrophoresis* **26**:2898-2907.
331. **Teyssier, C., H. Marchandin, M. Simeon De Buochberg, M. Ramuz, and E. Jumas-Bilak.** 2003. Atypical 16S rRNA gene copies in *Ochrobactrum intermedium* strains reveal a large genomic rearrangement by recombination between *rrn* copies. *J Bacteriol* **185**:2901-2909.
332. **Theron, M. M., M. N. Janse Van Rensburg, and L. J. Chalkley.** 2004. Nitroimidazole resistance genes (*nimB*) in anaerobic Gram-positive cocci (previously *Peptostreptococcus* spp.). *J Antimicrob Chemother* **54**:240-242.
333. **Thompson, J. D., D. G. Higgins, and T. J. Gibson.** 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**:4673-4680.
334. **Tindall, B. J., P. Kampfer, J. P. Euzeby, and A. Oren.** 2006. Valid publication of names of prokaryotes according to the rules of nomenclature: past history and current practice. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**:2715-2720.
335. **Tippmann, H. F.** 2004. Analysis for free: comparing programs for sequence analysis. *Brief Bioinform* **5**:82-87.
336. **Trinh, S., A. Haggoud, and G. Reyssset.** 1996. Conjugal transfer of the 5-nitroimidazole resistance plasmid pIP417 from *Bacteroides vulgatus* BV-17: characterization and nucleotide sequence analysis of the mobilization region. *J Bacteriol* **178**:6671-6676.
337. **Trinh, S., A. Haggoud, G. Reyssset, and M. Sebald.** 1995. Plasmids pIP419 and pIP421 from *Bacteroides*: 5-nitroimidazole resistance genes and their upstream insertion sequence elements. *Microbiology* **141 (Pt 4)**:927-935.
338. **Trinh, S., and G. Reyssset.** 1996. Detection by PCR of the *nim* genes encoding 5-nitroimidazole resistance in *Bacteroides* spp. *J Clin Microbiol* **34**:2078-2084.
339. **Truper, H. G.** 1999. How to name a prokaryote?. Etymological considerations, proposals and practical advice in prokaryote nomenclature. *FEMS Microbiology Reviews* **23**:231-249.

340. Tunney, M. M., T. R. Field, T. F. Moriarty, S. Patrick, G. Doering, M. S. Muhlebach, M. C. Wolfgang, R. Boucher, D. F. Gilpin, A. McDowell, and J. S. Elborn. 2008. Detection of anaerobic bacteria in high numbers in sputum from patients with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* **177**:995-1001.
341. Ueda, O., H. M. Wexler, K. Hirai, Y. Shibata, F. Yoshimura, and S. Fujimura. 2005. Sixteen homologs of the mex-type multidrug resistance efflux pump in *Bacteroides fragilis*. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:2807-2815.
342. Ueki, A., H. Akasaka, A. Satoh, D. Suzuki, and K. Ueki. 2007. *Prevotella paludivivens* sp. nov., a novel strictly anaerobic, Gram-negative, hemicellulose-decomposing bacterium isolated from plant residue and rice roots in irrigated rice-field soil. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**:1803-1809.
343. Van Berkum, P., Z. Terefework, L. Paulin, S. Suomalainen, K. Lindstrom, and B. D. Eardly. 2003. Discordant phylogenies within the *rrn* loci of *Rhizobia*. *J Bacteriol* **185**:2988-2998.
344. Vandamme, P., B. Pot, M. Gillis, P. de Vos, K. Kersters, and J. Swings. 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol Rev* **60**:407-438.
345. Verger, J. M., F. Grimont, P. A. Grimont, and M. Grayon. 1987. Taxonomy of the genus *Brucella*. *Ann Inst Pasteur Microbiol* **138**:235-238.
346. Vernet, F. 2006. Taxonomie polyphasique de 7 isolats cliniques: découverte d'une nouvelle espèce du genre *Prevotella*. Thèse de l'Université Montpellier II, Montpellier.
347. Veys, A., W. Callewaert, E. Waelkens, and K. Van den Abbeele. 1989. Application of gas-liquid chromatography to the routine identification of nonfermenting Gram-negative bacteria in clinical specimens. *J Clin Microbiol* **27**:1538-1542.
348. Viale, A. M., A. K. Arakaki, F. C. Soncini, and R. G. Ferreyra. 1994. Evolutionary relationships among eubacterial groups as inferred from GroEL (chaperonin) sequence comparisons. *Int J Syst Bacteriol* **44**:527-533.
349. Vollmer, W., D. Blanot, and M. A. de Pedro. 2008. Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiol Rev* **32**:149-167.
350. Wagner, Y., B. Noack, T. Hoffmann, E. Jacobs, and P. Christian Luck. 2006. Periodontopathogenic bacteria multiply in the environmental amoeba *Acanthamoeba castellanii*. *Int J Hyg Environ Health* **209**:535-539.

351. **Walter, J., G. W. Tannock, A. Tilsala-Timisjarvi, S. Rodtong, D. M. Loach, K. Munro, and T. Alatossava.** 2000. Detection and identification of gastrointestinal *Lactobacillus* species by using denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific PCR primers. *Appl Environ Microbiol* **66**:297-303.
352. **Wareham, D. W., M. Wilks, D. Ahmed, J. S. Brazier, and M. Millar.** 2005. Anaerobic sepsis due to multidrug-resistant *Bacteroides fragilis*: microbiological cure and clinical response with linezolid therapy. *Clin Infect Dis* **40**:e67-8.
353. **Watabe, J., Y. Benno, and T. Mitsuoka.** 1983. Taxonomic study of *Bacteroides oralis* and related organisms and proposal of *Bacteroides veroralis* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **33**:57-64.
354. **Wattam, A. R., K. P. Williams, E. E. Snyder, N. F. Almeida, Jr., M. Shukla, A. W. Dickerman, O. R. Crasta, R. Kenyon, J. Lu, J. M. Shallom, H. Yoo, T. A. Ficht, R. M. Tsolis, C. Munk, R. Tapia, C. S. Han, J. C. Detter, D. Bruce, T. S. Brettin, B. W. Sobral, S. M. Boyle, and J. C. Setubal.** 2009. Analysis of ten *Brucella* genomes reveals evidence for horizontal gene transfer despite a preferred intracellular lifestyle. *J Bacteriol* **191**:3569-3579.
355. **Wayne, L. G., D. J. Brenner, R. R. Colwell, P. A. D. Grimont, O. Kandler, M. I. Krichevsky, L. H. Moore, W. E. C. Moore, R. G. E. Murray, E. Stackebrandt, M. P. Starr, and H. G. Truper.** 1987. Report of the *ad hoc* committee of reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int J Syst Bacteriol* **37**:463-464.
356. **Weinstein, M. P., M. L. Towns, S. M. Quartey, S. Mirrett, L. G. Reimer, G. Parmigiani, and L. B. Reller.** 1997. The clinical significance of positive blood cultures in the 1990s: a prospective comprehensive evaluation of the microbiology, epidemiology, and outcome of bacteremia and fungemia in adults. *Clin Infect Dis* **24**:584-602.
357. **Weisburg, W. G., S. M. Barns, D. A. Pelletier, and D. J. Lane.** 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol* **173**:697-703.
358. **Weiss, N., K. H. Schleifer, and O. Kandler.** 1981. The peptidoglycan types of Gram-positive anaerobic bacteria and their taxonomic implications. *Revue de l'Institut Pasteur de Lyon* **14**:3-12.
359. **Werner, G., T. M. Coque, A. M. Hammerum, R. Hope, W. Hryniewicz, A. Johnson, I. Klare, K. G. Kristinsson, R. Leclercq, C. H. Lester, M. Lillie, C. Novais, B. Olsson-Liljequist, L. V. Peixe, E. Sadowy, G. S. Simonsen, J. Top, J. Vuopio-Varkila, R. J.**

- Willems, W. Witte, and N. Woodford. 2008. Emergence and spread of vancomycin resistance among enterococci in Europe. *Euro Surveill* 13.(47). pii: 19046.
360. **Wexler, H. M., D. Molitoris, S. St John, A. Vu, E. K. Read, and S. M. Finegold.** 2002. *In vitro* activities of faropenem against 579 strains of anaerobic bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* **46**:3669-3675.
361. **Wheelis, M. L., O. Kandler, and C. R. Woese.** 1992. On the nature of global classification. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:2930-2934.
362. **Whittaker, R. H.** 1959. On the broad classification of organisms. *Q Rev Biol* **34**:210-226.
363. **Wiegel, J., R. Tanner, and F. A. Rainey.** 2006. Chapter 1.2.20. An Introduction to the Family *Clostridiaceae*, p. 654–678, *The Prokaryotes*, vol. 4. Springer, New York.
364. **Willems, A., and M. D. Collins.** 1995. Phylogenetic placement of *Dialister pneumosintes* (formerly *Bacteroides pneumosintes*) within the *Sporomusa* subbranch of the *Clostridium* subphylum of the Gram-positive bacteria. *Int J Syst Bacteriol* **45**:403-405.
365. **Winter, J., L. H. Moore, V. R. Dowell, and V. D. Bokkenheuser.** 1989. C-Ring cleavage of flavonoids by human intestinal bacteria. *Appl Environ Microbiol* **55**:1203-1208.
366. **Winter, J., M. R. Popoff, P. Grimont, and V. D. Bokkenheuser.** 1991. *Clostridium orbiscindens* sp. nov., a human intestinal bacterium capable of cleaving the flavonoid C-ring. *Int J Syst Bacteriol* **41**:355-357.
367. **Woese, C. R.** 1987. Bacterial evolution. *Microbiol Rev* **51**:221-271.
368. **Woese, C. R., and G. E. Fox.** 1977. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**:5088-5090.
369. **Woese, C. R., O. Kandler, and M. L. Wheelis.** 1990. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains *Archaea*, *Bacteria*, and *Eucarya*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**:4576-4579.
370. **Wolf, M., T. Muller, T. Dandekar, and J. D. Pollack.** 2004. Phylogeny of *Firmicutes* with special reference to *Mycoplasma* (*Mollicutes*) as inferred from phosphoglycerate kinase amino acid sequence data. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**:871-875.
371. **Woo, P. C., J. L. Teng, K. W. Leung, S. K. Lau, M. K. Wong, and K. Y. Yuen.** 2004. Bacteremia in a patient with colonic carcinoma caused by a novel *Sedimentibacter* species: *Sedimentibacter hongkongensis* sp. nov. *Diagn Microbiol Infect Dis* **50**:81-87.

372. **Wu, C. C., J. L. Johnson, W. E. Moore, and L. V. Moore.** 1992. Emended descriptions of *Prevotella denticola*, *Prevotella loescheii*, *Prevotella veroralis*, and *Prevotella melaninogenica*. *Int J Syst Bacteriol* **42**:536-541.
373. **Wu, M., and J. A. Eisen.** 2008. A simple, fast, and accurate method of phylogenomic inference. *Genome Biol* **9**:R151.
374. Wybo, I., D. Pierard, I. Verschraegen, M. Reynders, K. Vandoorslaer, G. Claeys, M. Delmee, Y. Glupczynski, B. Gordts, M. Ieven, P. Melin, M. Struelens, J. Verhaegen, and S. Lauwers. 2007. Third Belgian multicentre survey of antibiotic susceptibility of anaerobic bacteria. *J Antimicrob Chemother* **59**:132-139.
375. **Yang, Z.** 1994. Estimating the pattern of nucleotide substitution. *J Mol Evol* **39**:105-111.
376. **Yarza, P., M. Richter, J. Peplies, J. Euzéby, R. Amann, K. H. Schleifer, W. Ludwig, F. O. Glockner, and R. Rossello-Mora.** 2008. The All-Species Living Tree project: a 16S rRNA-based phylogenetic tree of all sequenced type strains. *Syst Appl Microbiol* **31**:241-250.
377. **Zakhia, F., and P. de Lajudie.** 2006. [Modern bacterial taxonomy: techniques review--application to bacteria that nodulate leguminous plants (BNL)]. *Can J Microbiol* **52**:169-181.
378. **Zhao, H., D. Yang, C. R. Woese, and M. P. Bryant.** 1993. Assignment of fatty acid-beta-oxidizing syntrophic bacteria to *Syntrophomonadaceae* fam. nov. on the basis of 16S rRNA sequence analyses. *Int J Syst Bacteriol* **43**:278-286.

ANNEXES

Annexe A : Protocole de préparation des milieux de culture spécifiques

I. MILIEU POUR LA CULTURE DE *CLOSTRIDIUM ULTUNENSE*

Mélanger les réactifs suivants :

- 0.40 g KH_2PO_4
- 0.43 g Na_2HPO_4
- 0.30 g NH_4Cl
- 0.30 g NaCl
- 0.10 g $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$
- 0.10 g $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$
- 10.00 g Yeast extract
- 10.00 g Peptone
- 5.00 g Lab Lemco powder (Oxoid)
- 0.40 g Starch, soluble
- 0.50 mg Resazurin
- 0.40 g Na-acetate

Compléter avec de l'eau distillée pour avoir un volume final de 940 ml puis ajuster le pH à 7. Répartir 9.4 ml de cette solution dans des tubes à vis stériles et autoclaver les tubes.

Préparer une solution contenant :

- 1 ml d'une solution contenant 10 mg de $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ dilués dans 20 ml d'éléments trace SL-10*
- 1 ml de la solution Selenite/tungstate**
- 10 ml de la solution de vitamines***
- 50 ml de Sodium bicarbonate 10% w/v (solution de 10 g / 100 ml)
- 0.30 g de $\text{Na}_2\text{S} \times 9 \text{H}_2\text{O}$

Ajouter 600 μl de cette solution dans chaque tube à vis et conserver le reste à 4°C.

* Solution d'éléments trace SL-10 :

- 1.50 g de $\text{Fe}_2\text{Cl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$
- 10 ml de HCl (25% ; 7.7 M)
- Ajouter 990 ml d'eau distillée
- Ajouter ensuite les réactifs suivants :
 - o 70 g de ZnCl_2
 - o 100 g de $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$
 - o 6 mg de H_3BO_3 (acide borique)
 - o 190 mg de $\text{CoCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$
 - o 2 mg de $\text{CuCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$
 - o 24 mg de $\text{NiCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$
 - o 36 mg de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$

** Solution Sélénite/tungstate:

- 50 mg de NaOH

- 3 ml d'une solution de $\text{Na}_2\text{SeO}_3 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ à 10 mg / 100ml d'EDS
- 4 ml d'une solution de $\text{Na}_2\text{WO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ à 10 mg / 100ml d'EDS
- eau distillée stérile qsp 100 ml

*** Solution de vitamines :

- 2 mg de biotine
- 2 mg d'acide folique
- 10 mg de pyridoxine HCl
- 5 mg de thiamine HCl x 2 H₂O (B1)
- 5 mg de riboflavin
- 5 mg d'acide nicotinique (B3)
- 5 mg de D-Ca-pantothenate
- 0.1mg de vitamine B₁₂
- 5 mg d'acide p-aminobenzoic
- 5 mg d'acide lipoic
- eau distillée stérile qsp 1 l

II. MILIEU POUR LA CULTURE DE *TISSIERELLA CREATININI*

Mélanger les réactifs suivants :

- 5.80 g de NaCl
- 0.40 g de $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$
- 0.30 g de KCl
- 0.15 g de $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$
- 0.27 g de NH_4Cl
- 0.20 g de KH_2PO_4
- 1 ml de NaHSeO_3 (à 0.1 mM)
- 10 g de yeast extract
- 0.50 g de trypcase
- 2 g de L-Serine
- 2 g de L-Thréonine

Compléter avec de l'eau distillée pour avoir un volume final de 940 ml.

Ajuster le pH à 8.3 et ajouter 4.50 g de NaHCO_3 et 0.50 g de cystéine-HCl x H₂O.

Homogénéiser et répartir 9.4 ml en tubes à vis puis les autoclaver.

Préparer une solution contenant :

- 1 ml de solution d'éléments trace SL-10*
- 10 ml de solution de vitamines***
- 60 ml d'une solution filtrée d'eau distillée stérile contenant 5.65 g de créatinine

Ajouter 600 µl de cette solution dans chaque tube à vis autoclavé et conserver le reste à 4°C.

III. MILIEU POUR LA CULTURE DE *TEPIDIMICROBIUM FERRIPHILUM*

Mélanger les réactifs suivants :

- 0.33 g KH_2PO_4
- 0.33 g NH_4Cl

- 0.33 g KCl
- 0.33 g MgCl₂ x 6 H₂O
- 10 g Trypticase peptone
- 200.00 µg NiCl₂ x 6 H₂O soit 1 ml d'une solution à 20 mg/100 ml
- 120.00 µg Na₂SeO₃ x 5 H₂O soit 1 ml d'une solution à 1.2 mg/100 ml
- 30.00 µg Na₂WO₄ x 2 H₂O soit 200 µg d'une solution à 15 mg/100 ml
- g Yeast extract
- 8.25 g Na₂-9,10-anthraquinone- 2,6-disulfonate

Compléter avec de l'eau distillé pour obtenir un volume final de 940 ml puis faire bouillir pendant quelques minutes afin de dissoudre l'antraquinone.

Laisser refroidir à température ambiante et ajouter 2 g de NaHCO₃.

Après dissolution, ajuster le pH à 7.5-87.

Répartir 9.4 ml en tubes à vis stériles puis les autoclaver.

Préparer une solution contenant :

- 0.33 g de CaCl₂ x 2 H₂O dans 49 ml d'EDS
- 10 ml de la solution de vitamines**
- 1 ml de solution d'éléments trace SL-10*

Ajouter 600 µl de cette solution dans chaque tube à vis stérile et conserver le reste à 4°C.

IV. MILIEU POUR LA CULTURE DE *SPORANAEROBACTER ACETIGENES*

Mélanger les réactifs suivants :

- 1.0 g NH₄Cl
- 0.3 g K₂HPO₄
- 0.3 g KH₂PO₄
- 0.2 g MgCl₂ x 6 H₂O
- 0.1 g CaCl₂ x 2 H₂O
- 0.1 g KCl
- 0.6 g NaCl
- 1.0 g Yeast extract
- 1.5 ml de la solution d'éléments traces SL-10***
- 0.5 mg Resazurin
- 0.5 g Cysteine-HCl x H₂O

Compléter avec de d'eau distillée pour avoir un volume final de 910 ml et ajuster le pH à 7.0.

Faire bouillir puis laisser refroidir à température ambiante.

Répartir 9.1 ml en tubes à vis stériles et les autoclaver.

Ajouter dans chaque tube:

- 0.6 ml de NaHCO₃ d'une solution à 1 g / 10 ml
- 0.2 ml de glucose d'une solution à 1 g / 10 ml
- 0.1 ml Na₂S x 9 H₂O d'une solution de 300 mg / 10 ml

Ajuster le pH du milieu à environ 7.4.

Annexe B : Liste des séquences d'ADNr 16S utilisées dans l'étude phylogénétique de *Tissierella* spp.

Phylum	prokMSA-id	Organisme	N° d'accession	Librairie				
				PHYLA	FIRMICUTES	PEPTOSTREPTOCOCCACEAE	TISSIERELLA SP.	TISSIERELLA PRAEACUTA
<i>Acidobacteria</i>	1732	<i>Holophaga foetida</i> str. DSM 6591 ^T	X77215	+				
<i>Acidobacteria</i>	1797	Soil clone S111	AF013560	+				
<i>Acidobacteria</i>	3704	<i>Acidobacterium capsulatum</i>	D26171	+				
<i>Acidobacteria</i>	93966	Soil near uranium mill tailings clone JG36-GS-146	AJ582043	+				
<i>Acidobacteria</i>	103211	Brewery bottling plant clone MTAf8	AJ619064	+				
<i>Acidobacteria</i>	103470	Pasture soil clone EB1128	AY395447	+				
<i>Acidobacteria</i>	110786	<i>Acidobacteria</i> bacterium Ellin7184	AY673350	+				
<i>Acidobacteria</i>	136613	Amazon soil clone 291-1	AY326575	+				
<i>Acidobacteria</i>	159589	Acidic cave snottite biofilm clone CV94	DQ499323	+				
<i>Acidobacteria</i>	159642	Acidic cave snottite biofilm clone CV76	DQ499315	+				
<i>Acidobacteria</i>	164534	<i>Terriglobus roseus</i> str. KBS 112	DQ660895	+				
<i>Acidobacteria</i>	206068	Aspen rhizosphere clone Amb_16S_707	EF018336	+				
<i>Acidobacteria</i>	218611	Acid mine drainage clone DBS-Clone25	DQ659200	+				
<i>Acidobacteria</i>	221649	Grassland soil clone FCPN503	EF516297	+				
<i>Actinobacteria</i>	11353	<i>Rubrobacter radiotolerans</i> str. JCM 2153 ^T	U65647	+				
<i>Actinobacteria</i>	11366	<i>Slackia exigua</i> str. ATCC 700122 ^T	AF101240	+				
<i>Actinobacteria</i>	11369	<i>Collinsella aerofaciens</i> str. JCM 7791	AB011815	+				
<i>Actinobacteria</i>	12972	<i>Lentzea waywayandensis</i> str. NRRL B-16159 ^T	AF114813	+				
<i>Actinobacteria</i>	13006	<i>Amycolatopsis thermoflava</i> str. N1165 ^T	AF052390	+				
<i>Actinobacteria</i>	35353	<i>Olsenella uli</i> str. ATCC 49627 ^T	AY005814	+				
<i>Actinobacteria</i>	35440	<i>Curtobacterium herbarum</i> str. P 420/07 ^T	AJ310413	+				
<i>Actinobacteria</i>	42596	<i>Arthrobacter aurescens</i> str. TA13	AF467106	+				
<i>Actinobacteria</i>	50941	<i>Brachybacterium fresconis</i> str. LMG 20336 ^T	AJ415378	+				
<i>Actinobacteria</i>	52125	<i>Kytococcus schroeteri</i> str. Muenster 2000 ^T	AJ297722	+				
<i>Actinobacteria</i>	83908	<i>Nocardia cyriacigeorgica</i> str. 2002-2301309	AY244782	+				
<i>Actinobacteria</i>	89206	' <i>Brevibacterium aureum</i> ' str. Enb15	AY299092	+				
<i>Actinobacteria</i>	94776	<i>Mobiluncus curtisii</i> str. CCUG 17994	AJ576075	+				
<i>Actinobacteria</i>	108583	<i>Mycobacterium chelonae</i> str. CIP 104535 ^T	AY457072	+				
<i>Actinobacteria</i>	147604	<i>Humicoccus flavidus</i> str. DS-52 ^T	DQ321750	+				
<i>Actinobacteria</i>	151466	' <i>Streptomyces rosa</i> ' str. NBRC 13436	AB184401	+				
<i>Actinobacteria</i>	159591	<i>Clavibacter michiganensis</i>	DQ507208	+				
<i>Actinobacteria</i>	170854	<i>Agromyces allii</i> str. UMS-101	DQ673874	+				

Phylum	prokMSA-id	Organisme	N° d'accession	Librairie				
				PHYLA	FIRMICUTES	PEPTOSTREPTOCOCCACEAE	TISSIERELLA SP.	TISSIERELLA PRAEACUTA
Actinobacteria	175224	<i>Cryobacterium psychrophilum</i> str. DSM 4854 ^T	AM410676	+				
Actinobacteria	192128	<i>Gardnerella vaginalis</i> str. NML 060420	EF194095	+				
Aquificae	1176	<i>Hydrogenobaculum acidophilum</i> str. 3H-1 ^T	D16296	+				
Aquificae	1195	Hydrothermal vent clone VC2.1 Bac11	AF068792	+				
Aquificae	21804	<i>Thermocrinis</i> sp. str. P2L2B	AJ320219	+				
Aquificae	25727	Travertine hot spring clone SM2G07	AF445739	+				
Aquificae	30394	<i>Persephonella marina</i> str. EX-H1 ^T	AF188332	+				
Aquificae	34570	<i>Sulfurihydrogenibium subterraneum</i> str. HG MK-1 ^T	AB071324	+				
Aquificae	83837	<i>Thermovibrio ammonificans</i> str. HB-1 ^T	AY263403	+				
Aquificae	98942	<i>Balnearium lithotropicum</i> str. 17S ^T	AB105049	+				
Aquificae	104045	<i>Thermovibrio ruber</i> str. DSM 14644 ^T	AJ316619	+				
Aquificae	106765	Hydrothermal vent clone CH1_14f_BAC_16SrRNA_9N_EPR	AY672500	+				
Aquificae	110416	Hot spring Japan clone NHS-03	AB199564	+				
Aquificae	111964	Hot spring clone SK234	AY882786	+				
Aquificae	112464	Obsidian Pool prime community clone OPPB159	AY861878	+				
Aquificae	153906	<i>Aquifex aeolicus</i> str. VF5 ^T	AE000657	+				
Aquificae	169582	<i>Hydrogenivirga</i> sp. str. 128-5-R1-6	AM285299	+				
Aquificae	169823	Arsenic circumneutral hot springs clone A3UB-E10	DQ645255	+				
Bacteroidetes	2386	<i>Capnocytophaga gingivalis</i> str. ATCC 33624 ^T	L14639	+				
Bacteroidetes	2573	<i>Persicobacter diffluens</i> str. ATCC 23140	M58765	+				
Bacteroidetes	2596	<i>Runella zaeae</i> str. NS12 ^T	AF137381	+				
Bacteroidetes	2626	<i>Thermonema lapsum</i>	L11703	+				
Bacteroidetes	28419	<i>Salinibacter ruber</i> str. DSM 13855 ^T	AF323500	+				
Bacteroidetes	40858	<i>Rhodothermus marinus</i> str. NR-32	AF217499	+				
Bacteroidetes	40883	<i>Blattabacterium clevelandi</i>	AF322472	+				
Bacteroidetes	42382	<i>Pedobacter saltans</i> str. DSM 12145 ^T	AJ438173	+				
Bacteroidetes	42810	<i>Hymenobacter</i> group clone KL-53-2-5	AF408294	+				
Bacteroidetes	51657	<i>Anaerophaga thermohalophila</i> str. Fru22 ^T	AJ418048	+				
Bacteroidetes	102384	<i>Roseivirga seohaensis</i> str. SW-152 ^T	AY739663	+				
Bacteroidetes	115032	<i>Leadbetterella byssophila</i> str. 4M15 ^T	AY854022	+				
Bacteroidetes	146310	<i>Candidatus Paenicardinium endonii</i>	DQ314214	+				
Bacteroidetes	159952	<i>Echinicola vietnamensis</i> str. KMM 6221 ^T	DQ645421	+				
Bacteroidetes	161173	<i>Pontibacter akesuensis</i> str. AKS 1 ^T	DQ672723	+				
Bacteroidetes	170995	<i>Pedobacter composti</i> str. TR6-06 ^T	AB267720	+				
Bacteroidetes	172843	<i>Segetibacter koreensis</i> str. Gsoil 664 ^T	AB267478	+				
Bacteroidetes	193885	<i>Flammeovirga kamogawensis</i> str. YML5	AB251934	+				

Phylum	prokMSA-id	Organisme	N° d'accession	Librairie				
				PHYLA	FIRMICUTES	PEPTOSTREPTOCOCCACEAE	TISSIERELLA SP.	TISSIERELLA PRAEACUTA
<i>Bacteroidetes</i>	198091	<i>Pedobacter insulae</i> str. DS-39 ^T	EF100697	+				
<i>Bacteroidetes</i>	209767	Human fecal clone SJTU_D_15_25	EF401774	+				
<i>Chlamydiae</i>	2935	<i>Simkania negevensis</i> str. Z ^T	U68460	+				
<i>Chlamydiae</i>	2936	<i>Waddlia chondrophila</i> str. WSU 86-1044 ^T	AF042496	+				
<i>Chlamydiae</i>	2946	<i>Chlamydomphila abortus</i> str. OEA	Z49872	+				
<i>Chlamydiae</i>	2948	<i>Chlamydomphila pneumoniae</i> str. TW183 ^T	L06108	+				
<i>Chlamydiae</i>	2982	<i>Chlamydomphila psittaci</i> P1315 feral pigeon	AB001797	+				
<i>Chlamydiae</i>	3036	<i>Chlamydomphila pecorum</i> str. Bo-Yokohama	AB001776	+				
<i>Chlamydiae</i>	25273	<i>Chlamydiales</i> clone P-6	AF364568	+				
<i>Chlamydiae</i>	129351	<i>Chlamydia trachomatis</i> str. Ba/Apache-2	DQ019295	+				
<i>Chlamydiae</i>	136719	Amazon soil clone 530-2	AY326519	+				
<i>Chlamydiae</i>	151827	<i>Chlamydia muridarum</i> str. Nigg	AE002160	+				
<i>Chlamydiae</i>	152689	<i>Candidatus Rhabdochlamydia crassificans</i> str. CRIB01	AY928092	+				
<i>Chlamydiae</i>	155301	<i>Chlamydomphila felis</i> str. Fe/C-56	NC_007899	+				
<i>Chlamydiae</i>	229341	' <i>Protochlamydia naegleriophila</i> ' str. KNic	DQ632609	+				
<i>Chlorobi</i>	34775	Travertine hot spring clone SM1C05	AF445662	+				
<i>Chlorobi</i>	60814	Benzene-degrading nitrate-reducing consortium clone Cart-N3	AY118152	+				
<i>Chlorobi</i>	64878	Denitrifying reactor clone 19	AJ412669	+				
<i>Chlorobi</i>	99903	Borehole water gold mine clone TTMF57	AY741701	+				
<i>Chlorobi</i>	107516	Beach mud clone K-249	AJ428451	+				
<i>Chlorobi</i>	114305	Farm soil clone AKYH1119	AY921840	+				
<i>Chlorobi</i>	132219	<i>Pelodictyon phaeoclathratiforme</i> str. BU-1 ^T	NZ_AA1K01000026	+				
<i>Chlorobi</i>	134559	<i>Chlorobium phaeobacteroides</i> str. BS1	AAIC01000044	+				
<i>Chlorobi</i>	142983	Termite gut homogenate clone M2PB4-57	AB192128	+				
<i>Chlorobi</i>	143806	<i>Pelodictyon luteolum</i> str. DSM 273 ^T	NC_007512	+				
<i>Chlorobi</i>	167260	Attached biomass denitrifying bioreactor clone DB-97	DQ836764	+				
<i>Chlorobi</i>	190755	<i>Prosthecochloris aestuarii</i> str. UdG7004Chp	EF064309	+				
<i>Chlorobi</i>	218799	<i>Chlorobaculum parvum</i> str. C	EF560701	+				
<i>Chloroflexi</i>	1266	<i>Herpetosiphon geysericola</i> str. ATCC 23076 ^T	AF039293	+				
<i>Chloroflexi</i>	2744	Chlorobenzene-degrading consortium clone SJA-58	AJ009468	+				
<i>Chloroflexi</i>	20009	' <i>Kouleothrix aurantiaca</i> '	AB079644	+				
<i>Chloroflexi</i>	44630	<i>Anaerolinea thermophila</i> str. UNI-1 ^T	AB046413	+				
<i>Chloroflexi</i>	85874	Antarctic cryptoendolith clone FBP471	AY250886	+				
<i>Chloroflexi</i>	101831	Sargasso Sea clone SAR194	AY534098	+				
<i>Chloroflexi</i>	102361	Groundwater 0.2 m-captured fraction clone KNA6-EB22	AB179693	+				
<i>Chloroflexi</i>	107011	Deep-sea mud volcano clone Napoli-3B-17; BC07-3B-17	AY592693	+				

Phylum	prokMSA-id	Organisme	N° d'accession	Librairie				
				PHYLA	FIRMICUTES	PEPTOSTREPTOCOCCACEAE	TISSIERELLA SP.	TISSIERELLA PRAEACUTA
<i>Chloroflexi</i>	109890	' <i>Dehalococcoides ethenogenes</i> ' str. 195	NC_002936	+				
<i>Chloroflexi</i>	111716	Oceanic crust clone CTD005-50B-02	AY704385	+				
<i>Chloroflexi</i>	113599	Farm soil clone AKYH1480	AY922118	+				
<i>Chloroflexi</i>	159261	Guerrero Negro hypersaline microbial mat clone 09D2Z67	DQ330186	+				
<i>Chloroflexi</i>	177331	Marine macro-alga surface clone DPC004	DQ269088	+				
<i>Chloroflexi</i>	184315	<i>Chloroflexus aggregans</i> str. DSM 9485 ^T	NZ_AAUI01000002	+				
<i>Chloroflexi</i>	193341	<i>Roseiflexus castenholzii</i> str. DSM 13941 ^T	NZ_AAUM01000026	+				
<i>Chloroflexi</i>	202745	<i>Oscillochloris trichoides</i> str. C6	DQ139400	+				
<i>Chloroflexi</i>	215669	Aspen rhizosphere clone Amb_16S_837	EF018570	+				
<i>Chloroflexi</i>	227439	Mesophilic anaerobic digester clone A35_D28_L_B_H04	EF559225	+				
<i>Firmicutes</i>	13689	<i>Thermosyntropha lipolytica</i> str. JW265 ^T	X99980	+	+			
<i>Firmicutes</i>	13803	<i>Schwartzia succinivorans</i> str. DSM 10502 ^T	Y09434	+	+			
<i>Firmicutes</i>	13805	<i>Anaerovibrio lipolyticus</i> str. DSM 3074 ^T	AJ010959	+	+			
<i>Firmicutes</i>	13806	<i>Centipeda periodontii</i> str. DSM 2778 ^T	AJ010963	+				
<i>Firmicutes</i>	13808	<i>Quinella ovalis</i>	M62701	+	+			
<i>Firmicutes</i>	13811	<i>Mitsuokella multacida</i> str. NCTC 10934 ^T	X81878	+				
<i>Firmicutes</i>	13824	<i>Veillonella criceti</i> str. ATCC 17747 ^T	AF186072	+	+			
<i>Firmicutes</i>	13827	<i>Dialister pneumosintes</i> str. ATCC 33048 ^T	X82500	+	+			
<i>Firmicutes</i>	13832	<i>Dendrosporobacter quercicolus</i> str. ATCC 25974 ^T	M59110	+				
<i>Firmicutes</i>	13837	<i>Anaerosinus glycerini</i> str. DSM 5192 ^T	AJ010960	+				
<i>Firmicutes</i>	13838	<i>Anaeroarcus burkinensis</i> str. DSM 6283 ^T	AJ010961	+				
<i>Firmicutes</i>	13839	<i>Acetonema longum</i> str. DSM 6540 ^T	AJ010964	+				
<i>Firmicutes</i>	13841	Anaerobic TCB-transforming consortium clone SJA-84	AJ009477	+	+			
<i>Firmicutes</i>	13851	<i>Anaeromusa acidaminophila</i> str. DSM 3853 ^T	AF071415	+				
<i>Firmicutes</i>	13855	<i>Succiniclasticum ruminis</i> str. SE10 ^T	X81137	+	+			
<i>Firmicutes</i>	13859	<i>Phascolarctobacterium faecium</i> ACM 681	X72866	+	+			
<i>Firmicutes</i>	13862	<i>Succinispira mobilis</i> str. 19gly1 ^T	AJ006980	+				
<i>Firmicutes</i>	13904	<i>Desulfotomaculum ruminis</i> str. DSM 2154 ^T	Y11572	+	+			
<i>Firmicutes</i>	14085	Human fecal sample clone A19	AF052416	+	+			
<i>Firmicutes</i>	14124	<i>Clostridium lentocellum</i> str. DSM 5427 ^T	X76162	+	+			
<i>Firmicutes</i>	14132	<i>Acidaminobacter hydrogenoformans</i> str. glu 65 ^T	AF016691		+	+		
<i>Firmicutes</i>	14149	<i>Eubacterium saphenum</i> str. ATCC 49989 ^T	U65987		+	+		
<i>Firmicutes</i>	14157	<i>Eubacterium brachy</i> str. ATCC 33089 ^T	Z36272		+	+		
<i>Firmicutes</i>	14160	<i>Eubacterium sulci</i> str. ATCC 35585 ^T	AJ006963		+	+		
<i>Firmicutes</i>	14163	<i>Mogibacterium timidum</i> str. ATCC 33093 ^T	Z36296		+	+		
<i>Firmicutes</i>	14169	<i>Clostridium felsineum</i> str. DSM 794 ^T	X77851		+	+		

Phylum	prokMSA-id	Organisme	N° d'accession	Librairie				
				PHYLA	FIRMICUTES	PEPTOSTREPTOCOCCACEAE	TISSIERELLA SP.	TISSIERELLA PRAEACUTA
Firmicutes	14177	<i>Filifactor villosus</i> str. DSM 1645 ^T	X73452	+	+			
Firmicutes	14261	<i>Tissierella praeacuta</i> str. ATCC 25539 ^T	X80833		+	+		
Firmicutes	14265	<i>Tissierella creatinophila</i> str. Kre4 ^T	X80227		+	+	+	
Firmicutes	14270	<i>Helcococcus kunzii</i> str. NCFB 2900 ^T	X69837		+	+		
Firmicutes	14275	<i>Peptoniphilus ivorii</i> str. DSM 10022 ^T	Y07840		+	+		
Firmicutes	14286	<i>Anaerococcus hydrogenalis</i> DSM 7454	D14140		+	+		
Firmicutes	14348	<i>Alicyclobacillus tolerans</i> str. K1 ^T	Z21979	+	+			
Firmicutes	14468	<i>Ammoniphilus oxalaticus</i> str. RAOx1 ^T	Y14578	+	+			
Firmicutes	15026	<i>Bacillus thermocloacae</i> str. DSM 5250 ^T	Z26939	+	+			
Firmicutes	15071	<i>Aerococcus urinae</i> str. G1-84	U64457	+	+			
Firmicutes	15152	<i>Pediococcus pentosaceus</i> str. LS 5	AB018215	+	+			
Firmicutes	15297	<i>Enterococcus columbae</i> str. NCIMB 13013 ^T	Y18275	+	+			
Firmicutes	16074	<i>Ruminococcus albus</i>	X85098	+	+			
Firmicutes	16084	<i>Clostridium</i> sp. str. FCB90-3	AJ229251	+	+			
Firmicutes	16106	<i>Oxobacter pfennigii</i> str. DSM 3222 ^T	X77838	+	+			
Firmicutes	16187	<i>Clostridium acetobutylicum</i> str. ATCC 824 ^T	X78070	+	+			
Firmicutes	21147	<i>Sporomusa malonica</i> str. DSM 5090 ^T	AJ279799	+	+			
Firmicutes	24677	<i>Anaerobranca californiensis</i> str. Paoha-1 ^T	AY064218	+	+			
Firmicutes	25830	<i>Laceyella sacchari</i> str. KCTC 9789	AF138738	+	+			
Firmicutes	28692	<i>Selenomonas diana</i> str. ATCC 43527 ^T	AF287801	+				
Firmicutes	29561	<i>Clostridium hiranonis</i> str. HD-17	AB023971		+	+		
Firmicutes	30519	<i>Staphylococcus schleiferi</i>	S83568	+	+			
Firmicutes	31587	<i>Oscillospira guilliermondii</i> clone OSC1	AB040495	+	+			
Firmicutes	31620	Human subgingival plaque isolate str. FNA3 oral	AF287792	+	+			
Firmicutes	34247	Swine intestine clone p-1518-b5	AF371644	+	+			
Firmicutes	35634	' <i>Desulfosporomusa polytropa</i> ' str. STP11	AJ006606	+	+			
Firmicutes	38606	<i>Megasphaera micronuciformis</i> str. AIP 412.00 ^T	AF473834	+	+			
Firmicutes	39424	<i>Selenomonas ruminantium</i> EG19	AF221599	+				
Firmicutes	41482	<i>Mitsuokella jalaludinii</i> str. M9 ^T	AF479674	+				
Firmicutes	42215	<i>Virgibacillus pantothenicus</i> str. M1-4	AB039331	+	+			
Firmicutes	42483	<i>Selenomonas infelix</i> str. ATCC 43532 ^T	AF287802	+				
Firmicutes	43181	<i>Natronincola histidinovorans</i> str. DSM 11416 ^T	Y16716		+	+		
Firmicutes	46159	<i>Mogibacterium neglectum</i> str. ATCC 700924 ^T	AB037875		+	+		
Firmicutes	46716	<i>Clostridium sordellii</i> str. ATCC 9714 ^T	AB075771		+	+		
Firmicutes	46919	<i>Megasphaera elsdenii</i> str. AW106	AY038994	+	+			
Firmicutes	49371	<i>Listeria monocytogenes</i> str. EGD-e	AL591983	+	+			

Phylum	prokMSA-id	Organisme	N° d'accession	Librairie				
				PHYLA	FIRMICUTES	PEPTOSTREPTOCOCCACEAE	TISSIERELLA SP.	TISSIERELLA PRAEACUTA
Firmicutes	51941	<i>Clostridium bifermentans</i> str. DSM 13560	AF320283		+	+		
Firmicutes	51973	' <i>Frigovirgula patagoniensis</i> ' str. PPP2	AF450134		+	+		
Firmicutes	96612	<i>Veillonella montpellierensis</i> ADV 2216.03	AY355141		+			
Firmicutes	52379	<i>Anaerovorax odorimutans</i> str. NorPut1 ^T	AJ251215		+	+		
Firmicutes	54834	<i>Clostridium perfringens</i> str. 13	AB045288	+	+			
Firmicutes	58262	<i>Allisonella histaminiformans</i> str. MR2 ^T	AF548373	+	+			
Firmicutes	58790	' <i>Alkaliphilus metalliredigens</i> ' str. QYMF	AY137848		+	+		
Firmicutes	59208	' <i>Thermoanaerobacterium bryantii</i> ' str. mel9	AY140670	+	+			
Firmicutes	59565	Oral periodontitis clone FX033	AY134904		+	+		
Firmicutes	60259	<i>Filifactor villosus</i> str. DSM1645 ^T	AF537211		+	+		
Firmicutes	62670	Mono Lake clone ML635J-14 G+C	AF507891	+	+			
Firmicutes	67640	<i>Clostridium caminithermale</i> str. DVird3 ^T	AF458779		+	+		
Firmicutes	68355	<i>Dialister</i> sp. str. E2_20	AF481209	+	+			
Firmicutes	70276	<i>Clostridium difficile</i> str. ATCC 9689 ^T	AB075770		+	+		
Firmicutes	71474	<i>Selenomonas flueggei</i> str. ATCC 43531 ^T	AF287803	+				
Firmicutes	72513	<i>Eubacterium minutum</i> str. SC 87K	U13037		+	+		
Firmicutes	76251	<i>Tepidibacter thalassicus</i> str. SC 562 ^T	AY158079		+	+		
Firmicutes	78194	Termite gut homogenate clone Rs-K21 bacterium	AB088963	+	+			
Firmicutes	81585	<i>Finegoldia magna</i> clone 1-68	AY169425		+	+		
Firmicutes	83226	<i>Clostridium bolteae</i> str. WAL 16351 ^T	AJ508452	+	+			
Firmicutes	84501	<i>Finegoldia magna</i> str. CCUG 17636 ^T	AF542227	+	+			
Firmicutes	84746	<i>Anaerococcus prevotii</i> str. CCUG 41932 ^T	AF542232		+	+	+	
Firmicutes	84857	<i>Peptoniphilus asaccharolyticus</i> str. CCUG 9988 ^T	AF542228		+	+		
Firmicutes	84941	<i>Clostridium glycolicum</i> str. 2002-87768	AY244773		+	+		
Firmicutes	85145	<i>Dialister invisus</i> str. E7.25 ^T	AY162469	+	+			
Firmicutes	85846	<i>Guggenheimella bovis</i> str. OMZ913 ^T	AY272039		+	+		
Firmicutes	86707	<i>Selenomonas</i> genomosp. C1	AY278627	+				
Firmicutes	87223	<i>Selenomonas</i> genomosp. C2	AY278628	+				
Firmicutes	87293	<i>Syntrophomonas curvata</i> str. GB8-1 ^T	AY290767	+	+			
Firmicutes	87725	<i>Finegoldia magna</i> str. ATCC 29328	AB109771		+	+		
Firmicutes	89369	<i>Bacillus cereus</i> str. ATCC 4342	AJ577288	+	+			
Firmicutes	90216	<i>Parvimonas micra</i> str. ATCC 33270 ^T	AY323523		+	+		
Firmicutes	90999	<i>Bacillus pumilus</i> str. KT1012	AB115957	+	+			
Firmicutes	91764	<i>Bacillus saliphilus</i> str. 6AG ^T	AJ493660	+	+			
Firmicutes	94086	<i>Bacillus halodurans</i> str. 314	AF542087	+	+			
Firmicutes	94360	' <i>Anaerospira hongkongensis</i> ' str. HKU15	AY372050	+	+			

Phylum	prokMSA-id	Organisme	N° d'accession	Librairie				
				PHYLA	FIRMICUTES	PEPTOSTREPTOCOCCACEAE	TISSIERELLA SP.	TISSIERELLA PRAEACUTA
Firmicutes	96612	<i>Veillonella montpellierensis</i> str. ADV 2216.03	AY355141	+				
Firmicutes	99507	<i>Sporacetigenium mesophilum</i> str. ZLJ115 ^T	AY682207		+	+		
Firmicutes	100056	<i>Geobacillus thermoglucosidasius</i> str. BGSC W9A43	AY608990	+	+			
Firmicutes	100166	<i>Subdoligranulum variabile</i> str. BI 114 ^T	AJ518869	+	+			
Firmicutes	101308	<i>Megasphaera hominis</i>	L79909	+	+			
Firmicutes	102560	<i>Pontibacillus chungwhensis</i> str. BH030080	AY603362	+	+			
Firmicutes	103139	' <i>Propionispora hippei</i> ' str. KS	AJ508928	+				
Firmicutes	103341	<i>Soehngenia saccharolytica</i> str. BOR-Y ^T	AY353956	+	+	+	+	
Firmicutes	103425	Mesophilic anaerobic BSA digester clone BSA2B-08	AB175380	+	+			
Firmicutes	103664	<i>Brochothrix thermosphacta</i> DSMZ 20599	AY543024	+	+			
Firmicutes	104334	Decayed velvetleaf seed clone S1-6-CL2	AY728067	+	+			
Firmicutes	105697	<i>Pectinatus portalensis</i> str. B6 ^T	AY428574	+	+			
Firmicutes	106035	<i>Eubacterium yurii</i> subsp. <i>margaretiae</i> str. ATCC 43715 ^T	AY533381		+	+		
Firmicutes	106726	<i>Caloranaerobacter azorensis</i> str. MV1087 ^T	AJ272422		+	+		
Firmicutes	110048	<i>Heliorestis baculata</i> str. DSM 13446 ^T	AB100838	+	+			
Firmicutes	110713	<i>Dialister micraerophilus</i> str. ADV 7057.03	AY850114	+	+			
Firmicutes	112413	<i>Selenomonas noxia</i> str. AIP 45-92	AY878646	+	+			
Firmicutes	113119	<i>Dehalobacter</i> sp. E1	AY766465	+	+			
Firmicutes	115012	' <i>Sedimentibacter hongkongensis</i> ' str. KI	AY571338		+	+		
Firmicutes	115232	Sewage sludge compost isolate str. SSCT75	AB210963	+	+			
Firmicutes	115335	<i>Aneurinibacillus aneurinilyticus</i> str. SSSC14-1	AB211028	+	+			
Firmicutes	119118	<i>Veillonella atypica</i> str. ATCC 17744 ^T	AY995768	+	+			
Firmicutes	125592	Human vagina clone FX88B4-11	AY995270	+	+			
Firmicutes	126214	Human cecum mucosal biopsy clone LC47	AY977608	+	+			
Firmicutes	128383	Methanogenic enrichment 'MRE50' clone MRE50b25	AY684072	+	+			
Firmicutes	129279	<i>Symbiobacterium thermophilum</i> str. IAM 14863 ^T	NC_006177	+	+			
Firmicutes	136950	Uranium contaminated soil clone AKAU4176	DQ125910	+	+			
Firmicutes	139963	<i>Zymophilus raffinosivorans</i> str DSM 20765 ^T	DQ217599	+				
Firmicutes	146581	<i>Peptostreptococcus stomatis</i> str. W2278 ^T	DQ160208		+	+		
Firmicutes	148583	Healthy human stool clone C049	DQ326155		+	+		
Firmicutes	148928	<i>Dugong dugon</i> feces clone dgA-101	AB218308	+	+			
Firmicutes	151965	Anaerobic reactor clone B-6	AB233999	+	+			
Firmicutes	155308	Natural late summer pasture clone SR21	DQ394645	+	+			
Firmicutes	157680	<i>Tumebacillus permanentifrigoris</i> str. Eur1 9.5 ^T	DQ444975	+	+			
Firmicutes	162667	<i>Lactococcus garvieae</i> str. NRIC 0611	AB267904	+	+			
Firmicutes	163042	Thermophilic anaerobic solid waste bioreactor clone TIBH10	DQ887962	+	+			

Phylum	prokMSA-id	Organisme	N° d'accession	Librairie				
				PHYLA	FIRMICUTES	PEPTOSTREPTOCOCCACEAE	TISSIERELLA SP.	TISSIERELLA PRAEACUTA
<i>Firmicutes</i>	163888	<i>Weissella koreensis</i> str. 405	DQ883229	+	+			
<i>Firmicutes</i>	168846	Human fecal clone 29E-f5	DQ905849	+	+			
<i>Firmicutes</i>	169556	Rumen fluid clone GRC94	DQ673559	+	+			
<i>Firmicutes</i>	170026	<i>Geosporobacter subterraneus</i> str. VNs68 ^T	DQ643978		+	+		
<i>Firmicutes</i>	172674	<i>Kurthia gibsonii</i> str. IFS1	AB272360	+	+			
<i>Firmicutes</i>	180974	Human fecal clone RL388_aao96h10	DQ801550	+	+			
<i>Firmicutes</i>	183158	<i>Peptoniphilus asaccharolyticus</i> str. ATCC 29743	DQ986463		+	+		
<i>Firmicutes</i>	184145	<i>Sporotalea propionica</i> str. TmPN3 ^T =DSM 13327 ^T	AM258975	+				
<i>Firmicutes</i>	184496	<i>Thermosinus carboxydvorans</i> str. Nor1 ^T	NZ_AAWL01000016	+				
<i>Firmicutes</i>	189077	Human fecal clone RL243_aai86b04	DQ808848	+	+			
<i>Firmicutes</i>	189338	Human fecal clone RL203_aai63a09	DQ805468		+	+		
<i>Firmicutes</i>	190129	Human fecal clone RL180_aan69e08	DQ807945	+	+			
<i>Firmicutes</i>	191985	<i>Pelosinus fermentans</i> str. UFO1	DQ295866	+				
<i>Firmicutes</i>	193360	Human fecal clone RL176_aan58b04	DQ794105	+	+			
<i>Firmicutes</i>	199297	<i>Acidaminococcus intestini</i> str. LBN 321	EF028685	+	+			
<i>Firmicutes</i>	199473	<i>Acidaminococcus fermentans</i> str. ADV 6092.03	EF060090	+	+			
<i>Firmicutes</i>	200134	<i>Carboxydocella sporoproducens</i> str. Kar ^T	AY673988	+	+			
<i>Firmicutes</i>	205119	Human fecal clone SJTU_E_01_55	EF399641		+	+		
<i>Firmicutes</i>	208509	Human fecal clone SJTU_B_08_38	EF402474	+	+			
<i>Firmicutes</i>	208539	Human fecal clone SJTU_B_11_91	EF402748		+	+		
<i>Firmicutes</i>	212487	Water buffalo (<i>Bubalus bubalis</i>) rumen fluid clone BRC150	EF436436	+	+			
<i>Firmicutes</i>	215062	Acid mine drainage clone YTW-27-06	EF409835	+	+			
<i>Firmicutes</i>	222288	<i>Exiguobacterium oxidotolerans</i> AE3	EF530574	+	+			
<i>Firmicutes</i>	224884	<i>Dethiobacter alkaliphilus</i> str. AHT1 ^T	EF422412	+	+			
<i>Firmicutes</i>	225704	Indoor dust clone BF0001B062	AM697036	+	+			
<i>Firmicutes</i>	229820	Mouse cecum clone 16saw39-1d09.q1k	EF604610	+	+			
<i>Firmicutes</i>	238521	<i>Selenomonas ruminantium</i> str. S37	AB198430	+				
<i>Firmicutes</i>	238773	Thermophilic anaerobic digester clone C55_D6_H_B_F08	EF559014	+	+			
<i>Firmicutes</i>	240826	' <i>Caldaterra yamamurae</i> ' str. YMO722	AB308475	+	+			
<i>Firmicutes</i>	242501	<i>Alkaliphilus oremlandii</i> str. OhILAs ^T	NC_009922		+	+		
<i>Firmicutes</i>	243911	Rumen yak rumen fluid clone YRC43	EU259419		+	+		
<i>Firmicutes</i>	247246	Tammar wallaby <i>Macropus eugenii</i> cloaca clone 8817-D4-C-11C	EU289099	+	+			
<i>Firmicutes</i>	249899	Noma subgingival plaque clone 402D01(oral)	AM420144	+	+			
<i>Firmicutes</i>	253512	Noma subgingival plaque clone 301D12(oral)	AM420065		+	+		

Phylum	prokMSA-id	Organisme	N° d'accession	Librairie				
				PHYLA	FIRMICUTES	PEPTOSTREPTOCOCCACEAE	TISSIERELLA SP.	TISSIERELLA PRAEACUTA
<i>Firmicutes</i>	254272	Noma subgingival plaque clone 201F02(oral)	AM420026	+	+			
<i>Firmicutes</i>	254558	<i>Sporolactobacillus nakayamae</i> str. NRIC 0340	AB362632	+	+			
<i>Firmicutes</i>	255427	<i>Cohnella phaseoli</i> str. GSPC1 ^T	EU014872	+	+			
<i>Firmicutes</i>	259261	<i>Megamonas funiformis</i> DSM 19343 ^T	AB300988	+	+			
<i>Firmicutes</i>	259342	<i>Anaerostipes caccae</i> str. DSM 14662 ^T	NZ_ABAX03000028	+	+			
<i>Firmicutes</i>	260909	Anaerobic benzene degrading enrichment soil clone mbl-b52	AB426234	+	+			
<i>Firmicutes</i>	272157	<i>Trichococcus flocculiformis</i> str. a209	EU434437	+	+			
<i>Firmicutes</i>	274696	<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> str. C219a	EU346756	+	+			
<i>Firmicutes</i>	275891	' <i>Murdochia asaccharolytica</i> ' str. WAL 1855C	EU483153		+	+		
<i>Firmicutes</i>	275937	<i>Clostridiisalibacter</i> sp. str. SOL3F37	EU567322		+	+		
<i>Firmicutes</i>	296154	Western lowland gorilla feces clone GOR_aag73d04	EU469882	+	+			
<i>Firmicutes</i> *	15832	<i>Mycoplasma microti</i> str. IL-372	U22415	+	+			
<i>Firmicutes</i> *	166158	<i>Spiroplasma platyhelix</i> str. PALS-1 ^T	DQ860101	+	+			
<i>Firmicutes</i>	14135	<i>Fusibacter paucivorans</i> str. SEBR 4211 ^T	AF050099			+		
<i>Firmicutes</i>	14145	' <i>Clostridium aminobutyricum</i> ' str. DSM 2634	X76161			+		
<i>Firmicutes</i>	14155	<i>Eubacterium nodatum</i> str. ATCC 33099 ^T	U13041			+		
<i>Firmicutes</i>	14164	<i>Mogibacterium pumilum</i> str. ATCC 700696 ^T	AB021701			+		
<i>Firmicutes</i>	14166	<i>Mogibacterium timidum</i> str. ATCC 33093 ^T	U13042			+		
<i>Firmicutes</i>	14167	<i>Mogibacterium vescum</i> str. ATCC 700697 ^T	AB021702			+		
<i>Firmicutes</i>	14168	<i>Clostridium formicaceticum</i> str. DSM 92 ^T	X77836			+		
<i>Firmicutes</i>	14175	<i>Clostridium sticklandii</i>	M26494			+		
<i>Firmicutes</i>	14178	<i>Filifactor alocis</i> str. ATCC 35896 ^T	AJ006962			+		
<i>Firmicutes</i>	14180	<i>Clostridium litorale</i> str. DSM 5388 ^T	X77845			+		
<i>Firmicutes</i>	14190	<i>Clostridium paradoxum</i> str. DSM 7308 ^T	Z69930			+		
<i>Firmicutes</i>	14202	<i>Clostridium ghonii</i> str. DSM 10636	X73451			+		
<i>Firmicutes</i>	14214	<i>Clostridium irregulare</i> str. DSM 2635 ^T	X73447			+		
<i>Firmicutes</i>	14262	<i>Tissierella praeacuta</i> str. NCTC 11158 ^T	X80832			+	+	
<i>Firmicutes</i>	14263	<i>Tissierella praeacuta</i> str. DSM 5675 ^T	X80841			+	+	
<i>Firmicutes</i>	14264	<i>Tissierella praeacuta</i> str. DSM 5675 ^T	X77848			+	+	
<i>Firmicutes</i>	14268	<i>Clostridium ultunense</i> BS ^T	Z69293			+	+	
<i>Firmicutes</i>	14271	<i>Helcococcus ovis</i> str. CCUG 37441 ^T	Y16279			+		
<i>Firmicutes</i>	14277	<i>Peptoniphilus indolicus</i> str. ATCC 29427 ^T	D14147			+		
<i>Firmicutes</i>	14278	<i>Peptoniphilus harei</i> str. DSM 10020 ^T	Y07839			+		
<i>Firmicutes</i>	14287	<i>Peptoniphilus asaccharolyticus</i>	D14152			+		
<i>Firmicutes</i>	14290	<i>Anaerococcus octavius</i> str. NCTC 9810 ^T	Y07841			+		
<i>Firmicutes</i>	18995	<i>Mogibacterium diversum</i> str. ATCC 700923 ^T =HM-7 ^T	AB037874			+		

Phylum	prokMSA-id	Organisme	N° d'accession	Librairie				
				PHYLA	FIRMICUTES	PEPTOSTREPTOCOCCACEAE	TISSIERELLA SP.	TISSIERELLA PRAEACUTA
Firmicutes	25925	<i>Alkaliphilus transvaalensis</i> str. SAGM1 ^T	AB037677			+		
Firmicutes	33092	Human subgingival plaque clone CK035	AF287763			+		
Firmicutes	33116	<i>Clostridium</i> sp. str. FL3	AF224674			+		
Firmicutes	33448	<i>Thermohalobacter berrensensis</i> str. CTT3 ^T	AF113543			+		
Firmicutes	35017	<i>Sporanaerobacter acetigenes</i> str. Lup33 ^T = DSM 13106 ^T	AF358114			+	+	
Firmicutes	40259	<i>Clostridium aceticum</i> str. DSM 1496 ^T	Y18183			+		
Firmicutes	45283	<i>Alkaliphilus crotonatoxidans</i> str. B11-2 ^T	AF467248			+		
Firmicutes	50860	<i>Eubacterium pyruvativorans</i>	AJ310135			+		
Firmicutes	51443	<i>Sedimentibacter saalensis</i> str. ZF2 ^T	AJ404680			+		
Firmicutes	51694	<i>Caminiella sporogenes</i> str. AM1114 ^T	AJ320233			+		
Firmicutes	52802	<i>Clostridium glycolicum</i> str. RD-1	AJ291746			+		
Firmicutes	66195	Chlorobenzene-degrading consortium clone IA-11	AJ488068			+		
Firmicutes	68341	<i>Peptostreptococcus</i> sp. str. E3_32	AF481225			+		
Firmicutes	70590	<i>Clostridium parapatrificum</i> bifermentans str. ATCC 638 ^T	AB075769			+		
Firmicutes	71791	<i>Eubacterium infirmum</i> str. W 1471	U13039			+		
Firmicutes	77885	Termite gut homogenate clone Rs-N27 bacterium	AB088954			+		
Firmicutes	83175	<i>Peptoniphilus lacrimalis</i> str. CCUG 31350 ^T	AF542230			+		
Firmicutes	83820	<i>Tepidibacter formicigenes</i> str. DV1184 ^T	AY245527			+		
Firmicutes	84198	<i>Anaerococcus lactolyticus</i> str. CCUG 31351 ^T	AF542233			+		
Firmicutes	85470	<i>Anaerococcus vaginalis</i> str. CCUG 31349 ^T	AF542229			+		
Firmicutes	85988	<i>Anaerococcus tetradius</i> str. CCUG 46590	AF542234			+		
Firmicutes	87119	<i>Peptoniphilus indolicus</i> str. CCUG 17639	AY153430			+		
Firmicutes	89770	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i> str. NCTC 11460 ^T	AY326462			+		
Firmicutes	92862	Human oral cavity clone FJ023	AY349390			+		
Firmicutes	99351	<i>Helcococcus sueciensis</i> str. CCUG 47334 ^T	AJ579914			+		
Firmicutes	99474	<i>Tepidimicrobium quinonicus</i> str. SB91 ^T = <i>T. ferriphilum</i>	AY656718			+	+	
Firmicutes	102801	<i>Clostridium</i> sp. str. Dex60-61	AJ431243			+		
Firmicutes	104179	' <i>Caldanaerocella colombiensis</i> ' str. P4.4	AY464940			+		
Firmicutes	104585	<i>Clostridium</i> sp. str. PPf35E6	AY548783			+		
Firmicutes	109067	Bacterium CCSD_DF2030_Ag68_isolate_1 1	AY820250			+		
Firmicutes	110063	<i>Clostridium</i> sp. str. BA-1	AB196728			+		
Firmicutes	110214	Evry municipal wastewater treatment plant clone 054E09_B_DI_P58	CR933216			+		
Firmicutes	130545	Microbes on human vaginal epithelium clone rRNA133	AY958906			+		
Firmicutes	136874	Microbes on human vaginal epithelium clone rRNA301	AY959074			+		
Firmicutes	138329	' <i>Clostridium metallolevans</i> ' str. AS11	DQ133569			+		
Firmicutes	142175	Thiosulfate-reducing and sulfate-reducing Tokyo bay	AB218661			+		

Phylum	prokMSA-id	Organisme	N° d'accession	Librairie				
				PHYLA	FIRMICUTES	PEPTOSTREPTOCOCCACEAE	TISSIERELLA SP.	TISSIERELLA PRAEACUTA
		coastal marine sediment isolate C/G2						
<i>Firmicutes</i>	147484	Fecal Wild Gorilla (<i>Gorilla beringei</i>) wild gorilla feces clone Z51	DQ353923			+		
<i>Firmicutes</i>	160284	<i>Bacteroides coagulans</i>	DQ497990			+		
<i>Firmicutes</i>	166171	<i>Acetanaerobacter</i> sp. Iso-W4	DQ677021			+		
<i>Firmicutes</i>	184255	<i>Peptoniphilus</i> sp. gpac018A	AM176519			+		
<i>Firmicutes</i>	184680	<i>Peptoniphilus</i> sp. gpac018B	AM176520			+		
<i>Firmicutes</i>	187695	<i>Clostridium</i> sp. str. OhLAs	DQ250645			+		
<i>Firmicutes</i>	196301	Human fecal clone RL179_aah26e11	DQ796387			+		
<i>Firmicutes</i>	198704	<i>Clostridium</i> sp. str. zx7	EF052865			+		
<i>Firmicutes</i>	211495	Substantial alterations cutaneous biota psoriatic lesions human skin clone 2P3-3	EF419366			+		
<i>Firmicutes</i>	214764	Human fecal clone SJTU_F_15_89	EF399528			+		
<i>Firmicutes</i>	219486	Sequencing libraries indoor dust clone BF0002A141	AM696956			+		
<i>Firmicutes</i>	238921	Methanol-assimilating anaerobic solid waste digester fed methanol clone M35_D8_L_B_D11	EF586012			+		
<i>Firmicutes</i>	247026	Noma subgingival plaque clone 401D07(oral)	AM420118			+		
<i>Firmicutes</i>	248474	Noma subgingival plaque clone 301C06(oral)	AM420061			+		
<i>Firmicutes</i>	259604	<i>Sporobacterium</i> sp. str. WAL 1855D	EU483154			+		
<i>Firmicutes</i>	260726	Candidatus <i>Peptoniphilus massiliensis</i> str. WAL 1804I	EU526292			+		
<i>Firmicutes</i>	267139	<i>Clostridium bartlettii</i> str. DSM 16795 ^T	NZ_ABEZ02000015			+		
<i>Firmicutes</i>	296291	Evolution mammals and their gut microbes spotted hyena feces clone HY2_b05_2	EU458551			+		
<i>Firmicutes</i>	301710	Evolution mammals and their gut microbes polar bear feces clone PB1_aai28h03	EU460442			+		
<i>Firmicutes</i>	302416	Evolution mammals and their gut microbes okapi feces clone OK1_a05_1	EU468525			+		
<i>Firmicutes</i>	88113	<i>Clostridium</i> sp. ArC6	AF443595				+	
<i>Firmicutes</i>	238921	Uncultured bacterium clone M35_D8_L_B_D11	EF586012				+	
<i>Firmicutes</i>	NA	Uncultured bacterium clone SWADLP4-9	FJ535541				+	
<i>Firmicutes</i>	312767	Uncultured bacterium clone BS25	EU358700				+	
<i>Firmicutes</i>	189075	<i>Tissierella</i> sp. S2	EF202592				+	
<i>Firmicutes</i>	342530	Uncultured bacterium clone MBHOS-06	EU369155				+	
<i>Firmicutes</i>	151594	Uncultured soil bacterium clone M50_Pitesti	DQ378266				+	
<i>Firmicutes</i>	NA	Uncultured bacterium clone E91	AM500794				+	
<i>Firmicutes</i>	321681	<i>Tissierella praeacuta</i> strain SN5	EU887816				+	
<i>Firmicutes</i>	NA	Uncultured bacterium clone F132	AM500851				+	
<i>Firmicutes</i>	14266	<i>Clostridium</i> sp. str. BN II = <i>T. creatinini</i> BN 11 ^T	X75909				+	
<i>Firmicutes</i>	326473	Uncultured bacterium clone BS29	EU358704				+	

Phylum	prokMSA-id	Organisme	N° d'accession	Librairie				
				PHYLA	FIRMICUTES	PEPTOSTREPTOCOCCACEAE	TISSIERELLA SP.	TISSIERELLA PRAEACUTA
<i>Firmicutes</i>	321110	Uncultured bacterium clone BS47	EU358722				+	
<i>Firmicutes</i>	NA	Uncultured bacterium clone F7	AM500815				+	
<i>Firmicutes</i>	NA	Uncultured bacterium clone SMR9	AM930348				+	
<i>Firmicutes</i>	238319	Uncultured bacterium clone C37	EU234272				+	
<i>Firmicutes</i>	164133	Uncultured bacterium clone B55_K_B_G06	DQ887969				+	
<i>Firmicutes</i>	145068	Uncultured Clostridium sp. clone HKT148	DQ309375				+	
<i>Firmicutes</i>	179709	<i>Clostridium</i> sp. PML3-1	EF165015				+	
<i>Firmicutes</i>	NA	Uncultured bacterium clone F23	AM500821				+	
<i>Firmicutes</i>	19304	Uncultured bacterium clone tbr1-1	AF280819				+	
<i>Firmicutes</i>	279095	Uncultured bacterium clone PISD-AJD11	AM982571				+	
<i>Firmicutes</i>	278417	Uncultured bacterium clone PISD-AJH06	AM982572				+	
<i>Firmicutes</i>	261405	<i>Soehngenia</i> sp. enrichment culture clone D2CL_Bac_16S_Clone3	EU498369				+	
<i>Firmicutes</i>	102880	Uncultured bacterium clone:BSA1B-10	AB175364				+	
<i>Firmicutes</i>	NA	Uncultured bacterium clone SMG30	AM930287				+	
<i>Firmicutes</i>	246014	Uncultured Clostridium sp. clone 118	EU250933				+	
<i>Firmicutes</i>	308317	<i>Sporanaerobacter</i> sp. SN28	EU887812				+	
<i>Firmicutes</i>	284303	<i>Clostridium</i> sp. AAN13	AB436741				+	
<i>Firmicutes</i>	240034	Uncultured bacterium clone M55_D15_L_B_C09	EF586050				+	
<i>Firmicutes</i>	306762	Uncultured bacterium clone BS11	EU358686				+	
<i>Firmicutes</i>	14269	<i>Clostridium</i> species strain PO	AJ002593				+	
<i>Firmicutes</i>	NA	Uncultured <i>Soehngenia</i> sp. clone D004023E11	EU721800				+	
<i>Firmicutes</i>	101098	<i>Clostridiales</i> bacterium NS4-1	AY466712				+	
<i>Firmicutes</i>	102260	Uncultured bacterium clone:BSA1B-06	AB175360				+	
<i>Firmicutes</i>	84656	<i>Peptostreptococcaceae</i> bacterium 19gly	AF550609				+	
<i>Firmicutes</i>	250325	Uncultured bacterium clone C142B	EU219963				+	
<i>Firmicutes</i>	NA	Uncultured bacterium clone SWADLP2-20	FJ535521				+	
<i>Firmicutes</i>	250415	Bacterium clone Aso2-CS333	EU178830				+	
<i>Firmicutes</i>	204057	Uncultured <i>Clostridiales</i> bacterium clone 12-11B	EF420225				+	
<i>Firmicutes</i>	NA	Uncultured bacterium clone D18	AM500724				+	
<i>Firmicutes</i>	72660	Uncultured bacterium clone tbr1-9	AF280824				+	
<i>Firmicutes</i>	184280	Uncultured bacterium clone H1-814	EF174267				+	
<i>Firmicutes</i>	338939	Iron-reducing bacterium enrichment culture clone HN-HFO11	FJ269087				+	
<i>Firmicutes</i>	337201	<i>Tepidimicrobium</i> sp. HUT8118	AB332033				+	
<i>Firmicutes</i>	132531	<i>Clostridium</i> sp. EBR-02E-0599	AB222052				+	
<i>Firmicutes</i>	133326	Uncultured bacterium clone EBR-02E-0595	AB221370				+	

Phylum	prokMSA-id	Organisme	N° d'accession	Librairie				
				PHYLA	FIRMICUTES	PEPTOSTREPTOCOCCACEAE	TISSIERELLA SP.	TISSIERELLA PRAEACUTA
<i>Firmicutes</i>	59568	<i>Peptostreptococcus</i> sp. oral clone EX153	AY134899				+	
<i>Firmicutes</i>	285855	<i>Clostridium</i> sp. AAN14	AB436742				+	
<i>Firmicutes</i>	239034	Uncultured bacterium clone M55_D15_L_B_A09	EF586044				+	
<i>Firmicutes</i>	176096	<i>Proteiniborus ethanolicus</i> GW ^T	EF116488				+	
<i>Firmicutes</i>	255581	Bacterium clone Aso3-CS341	EU178832				+	
<i>Firmicutes</i>	NA	<i>Tissierella praeacuta</i> ATCC 25539 ^T	GQ461812	+				+
<i>Firmicutes</i>	NA	<i>Tissierella praeacuta</i> AIP 224.02	GQ461802	+				+
<i>Firmicutes</i>	NA	<i>Tissierella</i> sp. LBN 291	GQ461818	+				+
<i>Firmicutes</i>	NA	<i>Tissierella</i> sp. LBN 295	GQ461821	+				+
<i>Firmicutes</i>	NA	<i>Tissierella</i> sp. AIP 285.00	GQ461816	+				+
<i>Firmicutes</i>	NA	<i>Tissierella praeacuta</i> LBN 290	GQ461807					+
<i>Firmicutes</i>	NA	<i>Tissierella praeacuta</i> AIP 30.02	GQ461803					+
<i>Firmicutes</i>	NA	<i>Tissierella praeacuta</i> AIP 310.01	GQ461804					+
<i>Firmicutes</i>	NA	<i>Tissierella praeacuta</i> AIP 443.98	GQ461805					+
<i>Firmicutes</i>	NA	<i>Clostridium hastiforme</i> ATCC 33268 ^T	GQ461814					+
<i>Firmicutes</i>	NA	<i>Tissierella praeacuta</i> AIP 488.98	GQ461806					+
<i>Firmicutes</i>	NA	<i>Tissierella praeacuta</i> LBR 1	GQ461808					+
<i>Firmicutes</i>	NA	<i>Tissierella praeacuta</i> VPI 10426	GQ461813					+
<i>Firmicutes</i>	NA	<i>Tissierella praeacuta</i> LBN 296	GQ461809					+
<i>Firmicutes</i>	NA	<i>Tissierella praeacuta</i> VPI 11497A	GQ461810					+
<i>Firmicutes</i>	NA	<i>Tissierella praeacuta</i> VPI 12486A	GQ461811					+
<i>Firmicutes</i>	NA	<i>Tissierella</i> sp. AIP 64.01	GQ461817					+
<i>Firmicutes</i>	NA	<i>Tissierella</i> sp. IP Prévot 3583	GQ461822					+
<i>Firmicutes</i>	NA	<i>Tissierella</i> sp. AIP 249.98	GQ461815					+
<i>Firmicutes</i>	NA	<i>Tissierella</i> sp. LBN 292	GQ461819					+
<i>Firmicutes</i>	NA	<i>Tissierella</i> sp. LBN 299	GQ461820					+
<i>Firmicutes</i>	NA	<i>Tissierella creatinophila</i> DSM 6911 ^T	GQ461823					+
<i>Firmicutes</i>	NA	<i>Tissierella creatinini</i> DSM 9508 ^T	GQ461824					+
<i>Firmicutes</i>	NA	<i>Sporanaerobacter acetigenes</i> DSM 13106 ^T	GQ461827					+
<i>Firmicutes</i>	NA	<i>Clostridium ultunense</i> DSM 10521 ^T	GQ461825					+
<i>Firmicutes</i>	NA	<i>Tepidimicrobium ferriphilum</i> DSM 16624 ^T	GQ461826					+
<i>Firmicutes</i>	NA	<i>Soehngenia saccharolytica</i> DSM 12858 ^T	GQ461828					+

NA, non applicable (absence de numéro ProkMSA-id)

Annexe C. Sensibilité au métronidazole de *Prevotella*

N° de souche	Espèce	Sensibilité au MTZ (µg/ml) *			Gène <i>nim</i>	N° de souche	Espèce	Sensibilité au MTZ (µg/ml) *			Gène <i>nim</i>
		A	B	C				A	B	C	
LBN 427	<i>P. baroniae</i>	4	0,38	NA	+	LBN 404	<i>P. denticola</i>	0,5	0,19	NA	-
LBN 430	<i>P. baroniae</i>	4	0,19	NA	+	LBN 405	<i>P. denticola</i>	0,5	0,125	NA	-
LBN 432	<i>P. baroniae</i>	2	0,094	NA	+	LBN 406	<i>P. denticola</i>	1	0,19	NA	-
LBN 466	<i>P. baroniae</i>	2	0,38	NA	+	LBN 407	<i>P. denticola</i>	0,5	0,094	NA	-
LBN 475	<i>P. baroniae</i>	4	0,19	NA	+	LBN 412	<i>P. denticola</i>	0,5	0,064	NA	-
LBP 19	<i>P. baroniae</i>	1	0,094	NA	+	LBN 413	<i>P. denticola</i>	0,5	0,19	NA	-
LBP 9	<i>P. baroniae</i>	2	0,25	NA	+	LBN 416	<i>P. denticola</i>	1	0,25	NA	-
LBN 423	<i>P. bergensis</i>	1	0,047	NA	-	LBN 417	<i>P. denticola</i>	0,5	0,19	NA	-
LBN 448	<i>P. bergensis</i>	2	0,047	NA	-	LBN 420	<i>P. denticola</i>	1	1,5	NA	-
LBN 330	<i>P. bivia</i>	2	1	16	-	LBN 421	<i>P. denticola</i>	0,5	0,064	NA	-
LBN 331	<i>P. bivia</i>	2	0,5	16	-	LBN 424	<i>P. denticola</i>	0,5	0,125	NA	-
LBN 332	<i>P. bivia</i>	4	0,5	32	-	LBN 438	<i>P. denticola</i>	0,25	0,094	NA	-
LBN 333	<i>P. bivia</i>	2	0,75	32	-	LBN 439	<i>P. denticola</i>	1	0,094	NA	-
LBN 334	<i>P. bivia</i>	2	1	16	-	LBN 442	<i>P. denticola</i>	0,5	0,19	NA	-
LBN 335	<i>P. bivia</i>	2	1	NA	-	LBN 444	<i>P. denticola</i>	0,5	0,125	NA	-
LBN 336	<i>P. bivia</i>	2	0,75	32	-	LBN 454	<i>P. denticola</i>	0,5	0,094	NA	-
LBN 337	<i>P. bivia</i>	4	1	NA	-	LBN 459	<i>P. denticola</i>	0,5	0,125	NA	-
LBN 338	<i>P. bivia</i>	2	1	NA	-	LBN 473	<i>P. denticola</i>	1	0,19	NA	-
LBN 339	<i>P. bivia</i>	2	0,75	16	-	LBP 55	<i>P. denticola</i>	0,5	0,047	NA	-
LBN 340	<i>P. bivia</i>	4	1	NA	-	LBN 378	<i>P. disiens</i>	2	0,38	NA	-
LBN 341	<i>P. bivia</i>	2	0,5	NA	-	LBN 385	<i>P. disiens</i>	2	0,38	NA	-
LBN 342	<i>P. bivia</i>	2	0,75	NA	-	LBN 387	<i>P. disiens</i>	2	0,38	NA	-
LBN 343	<i>P. bivia</i>	1	0,75	16	-	LBN 390	<i>P. disiens</i>	2	0,5	NA	-
LBN 344	<i>P. bivia</i>	2	1	NA	-	LBN 433	<i>P. disiens</i>	4	0,25	NA	-
LBN 345	<i>P. bivia</i>	1	0,75	NA	-	LBN 434	<i>P. disiens</i>	2	0,38	NA	-
LBN 346	<i>P. bivia</i>	1	0,75	16	-	LBN 440	<i>P. disiens</i>	4	0,094	NA	-
LBN 347	<i>P. bivia</i>	4	0,75	NA	-	LBN 443	<i>P. disiens</i>	2	0,38	NA	-
LBN 348	<i>P. bivia</i>	1	0,75	NA	-	LBP 34	<i>P. disiens</i>	4	0,38	NA	-
LBN 349	<i>P. bivia</i>	2	0,5	NA	-	LBP 75	<i>P. disiens</i>	2	0,38	NA	-
LBN 350	<i>P. bivia</i>	2	1,5	16	-	LBN 456	<i>P. heparinolytica</i>	0,5	0,064	NA	-
LBN 361	<i>P. bivia</i>	2	1	32	-	LBN 391	<i>P. intermedia</i>	1	0,19	NA	-
LBN 365	<i>P. bivia</i>	4	1	8	-	LBN 479	<i>P. intermedia</i>	2	0,5	NA	-
LBN 371	<i>P. bivia</i>	4	1	32	-	LBN 376	<i>P. loescheii</i>	1	0,125	NA	-
LBN 373	<i>P. bivia</i>	4	1	NA	-	LBN 422	<i>P. loescheii</i>	1	0,125	NA	-
LBN 374	<i>P. bivia</i>	2	1	8	-	LBN 483	<i>P. loescheii</i>	4	0,25	NA	-
LBN 445	<i>P. bivia</i>	0,5	1,5	16	-	LBN 377	<i>P. melaninogenica</i>	0,125	0,064	NA	-
LBN 449	<i>P. bivia</i>	4	1	NA	-	LBN 397	<i>P. melaninogenica</i>	1	0,125	NA	-
LBN 464	<i>P. bivia</i>	8	1	16	-	LBN 403	<i>P. melaninogenica</i>	0,25	0,094	NA	-
LBN 467	<i>P. bivia</i>	16	1	32	-	LBN 408	<i>P. melaninogenica</i>	0,5	0,25	NA	-
LBN 470	<i>P. bivia</i>	4	0,75	NA	-	LBN 409	<i>P. melaninogenica</i>	0,5	0,125	NA	-
LBN 474	<i>P. bivia</i>	4	0,19	NA	-	LBN 411	<i>P. melaninogenica</i>	1	0,5	NA	-
LBN 478	<i>P. bivia</i>	4	0,75	8	-	LBN 414	<i>P. melaninogenica</i>	1	0,25	NA	-
LBN 481	<i>P. bivia</i>	2	1	NA	-	LBN 415	<i>P. melaninogenica</i>	0,25	0,125	NA	-
LBP 38	<i>P. bivia</i>	2	0,75	8	-	LBN 418	<i>P. melaninogenica</i>	0,25	0,094	NA	-
LBP 4	<i>P. bivia</i>	2	0,5	32	-	LBN 419	<i>P. melaninogenica</i>	2	0,19	NA	-

* Sensibilité au métronidazole déterminée par la méthode de référence sur les cultures initiales (A) ou sur les CCL (C) ou par la méthode du Etest sur les cultures initiales (B).

N° de souche	Espèce	Sensibilité au MTZ (µg/ml) *			Gène <i>nim</i>	N° de souche	Espèce	Sensibilité au MTZ (µg/ml) *			Gène <i>nim</i>
		A	B	C				A	B	C	
LBP 51	<i>P. bivia</i>	2	0,38	32	-	LBN 446	<i>P. melaninogenica</i>	0,5	0,25	NA	-
LBP 52	<i>P. bivia</i>	4	0,75	16	-	LBN 452	<i>P. melaninogenica</i>	0,25	0,094	NA	-
LBP 65	<i>P. bivia</i>	4	1	32	-	LBN 468	<i>P. melaninogenica</i>	0,5	0,25	NA	-
LBP 69	<i>P. bivia</i>	2	0,38	8	-	LBN 469	<i>P. melaninogenica</i>	0,5	0,25	NA	-
LBP 78	<i>P. bivia</i>	4	0,5	8	-	LBN 476	<i>P. melaninogenica</i>	0,5	0,19	NA	-
LBN 351	<i>P. buccae</i>	1	0,25	NA	-	LBP 47	<i>P. melaninogenica</i>	0,25	0,25	NA	-
LBN 352	<i>P. buccae</i>	0,5	0,125	NA	-	LBP 72	<i>P. melaninogenica</i>	1	0,25	NA	-
LBN 353	<i>P. buccae</i>	0,5	0,125	NA	-	LBN 460	<i>P. multiformis</i>	0,5	0,047	NA	-
LBN 354	<i>P. buccae</i>	2	0,19	NA	-	LBN 410	<i>P. nanceiensis</i>	2	0,5	32	-
LBN 355	<i>P. buccae</i>	1	0,19	NA	-	LBN 428	<i>P. nanceiensis</i>	0,5	0,25	NA	-
LBN 356	<i>P. buccae</i>	2	0,38	NA	-	LBN 431	<i>P. nanceiensis</i>	4	0,5	NA	-
LBN 357	<i>P. buccae</i>	2	0,38	NA	-	LBN 293	<i>P. nanceiensis</i>	16	16	NA	-
LBN 358	<i>P. buccae</i>	1	0,19	NA	-	LBN 293b	<i>P. nanceiensis</i>	2	2	32	-
LBN 359	<i>P. buccae</i>	0,5	0,125	NA	-	LBN 297	<i>P. nanceiensis</i>	4	12	32	-
LBN 360	<i>P. buccae</i>	2	0,38	NA	-	LBN 298	<i>P. nanceiensis</i>	2	0,75	16	-
LBN 362	<i>P. buccae</i>	2	0,38	NA	-	LBN 471	<i>P. nanceiensis</i>	1	0,75	NA	-
LBN 363	<i>P. buccae</i>	1	0,19	NA	-	LBP 57	<i>P. nanceiensis</i>	4	0,25	NA	-
LBN 364	<i>P. buccae</i>	1	0,25	NA	-	LBP 66	<i>P. nanceiensis</i>	2	0,125	8	-
LBN 366	<i>P. buccae</i>	1	0,5	NA	-	LBP 84	<i>P. nanceiensis</i>	2	0,5	NA	-
LBN 367	<i>P. buccae</i>	4	0,19	NA	-	LBN 386	<i>P. nigrescens</i>	0,25	0,25	NA	-
LBN 368	<i>P. buccae</i>	0,25	0,064	NA	-	LBN 480	<i>P. nigrescens</i>	2	0,5	NA	-
LBN 369	<i>P. buccae</i>	1	0,032	NA	-	LBP 15	<i>P. nigrescens</i>	0,5	0,125	NA	-
LBN 370	<i>P. buccae</i>	1	0,094	NA	-	LBP 16	<i>P. nigrescens</i>	0,5	0,047	NA	-
LBN 372	<i>P. buccae</i>	0,5	0,064	NA	-	LBP 23	<i>P. nigrescens</i>	1	0,032	NA	-
LBN 375	<i>P. buccae</i>	2	1	NA	-	LBN 381	<i>P. oralis</i>	0,5	0,19	NA	-
LBN 399	<i>P. buccae</i>	0,5	0,125	NA	-	LBN 383	<i>P. oralis</i>	0,25	0,125	NA	-
LBN 453	<i>P. buccae</i>	2	0,25	NA	-	LBN 389	<i>P. oralis</i>	0,25	0,125	NA	-
LBN 455	<i>P. buccae</i>	2	0,25	NA	-	LBN 425	<i>P. oralis</i>	0,125	0,047	NA	-
LBN 461	<i>P. buccae</i>	4	0,38	NA	-	LBN 426	<i>P. oralis</i>	0,25	0,094	NA	-
LBN 462	<i>P. buccae</i>	1	0,125	NA	-	LBN 379	<i>P. oris</i>	0,125	0,016	NA	-
LBN 463	<i>P. buccae</i>	1	0,125	NA	-	LBN 380	<i>P. oris</i>	1	0,25	NA	-
LBN 465	<i>P. buccae</i>	0,5	0,125	NA	-	LBN 384	<i>P. oris</i>	1	0,38	NA	-
LBN 484	<i>P. buccae</i>	2	0,38	NA	-	LBN 388	<i>P. oris</i>	0,5	0,125	NA	-
LBN 485	<i>P. buccae</i>	2	0,38	NA	-	LBN 392	<i>P. oris</i>	1	0,19	NA	-
LBN 486	<i>P. buccae</i>	1	0,25	NA	-	LBN 447	<i>P. oris</i>	1	0,19	NA	-
LBP 22	<i>P. buccae</i>	0,5	0,094	NA	-	LBN 472	<i>P. oris</i>	1	0,19	NA	-
LBP 37	<i>P. buccae</i>	1	0,25	NA	-	LBN 477	<i>P. oris</i>	0,5	0,064	NA	-
LBP 82	<i>P. buccae</i>	0,5	0,75	NA	-	LBN 482	<i>P. oris</i>	1	0,19	NA	-
LBP 86	<i>P. buccae</i>	1	0,125	NA	-	LBN 429	<i>P. salivae</i>	1	0,125	NA	-
LBN 457	<i>P. buccae</i>	4	0,25	NA	-	LBN 450	<i>P. salivae</i>	0,5	0,094	NA	-
LBN 458	<i>P. corporis</i>	4	0,064	NA	-	LBP 42	<i>P. salivae</i>	2	0,25	NA	-
LBN 382	<i>P. denticola</i>	0,5	0,125	NA	-	LBN 441	<i>P. veroralis</i>	0,5	0,047	NA	-
LBN 393	<i>P. denticola</i>	0,5	0,19	NA	-	LBP 71	<i>P. veroralis</i>	1	0,047	NA	-
LBN 394	<i>P. denticola</i>	1	0,094	NA	-	LBP 92	<i>P. veroralis</i>	0,5	0,023	NA	-
LBN 395	<i>P. denticola</i>	0,5	0,094	NA	-	LBN 451	<i>Prevotella</i> sp. nov.	0,5	0,125	NA	-
LBN 396	<i>P. denticola</i>	0,5	0,064	NA	-	LBP 12	<i>Prevotella</i> sp. nov.	0,5	0,094	NA	-
LBN 398	<i>P. denticola</i>	0,25	0,047	NA	-	LBP 13	<i>Prevotella</i> sp. nov.	1	0,094	NA	-
LBN 400	<i>P. denticola</i>	0,5	0,125	NA	-	LBP 68	<i>Prevotella</i> sp. nov.	1	<0,016	NA	-
LBN 401	<i>P. denticola</i>	0,5	0,125	NA	-	LBP 81	<i>Prevotella</i> sp. nov.	2	0,047	NA	-
LBN 402	<i>P. denticola</i>	1	0,125	NA	-						

* Sensibilité au métronidazole déterminée par la méthode de référence sur les cultures initiales (A) ou sur les CCL (C) ou par la méthode du Etest sur les cultures initiales (B).

Annexe D. Publication N°1

Proposal to unify *Clostridium orbiscindens* and *Eubacterium plautii* with description of *Flavonifractor plautii* gen. nov. comb. nov. and reassignment of *Bacteroides capillosus* to *Pseudoflavonifractor capillosus* gen. nov. comb. nov.

Carlier JP, Bedora-Faure M, K'ouas G, **Alauzet C**, Mory F.

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. Août 2009 [Epub ahead of print].

Proposal to unify *Clostridium orbiscindens* (Winter *et al.*, 1991) and *Eubacterium plautii* (Seguin 1928; Hofstad & Aasjord 1982) with description of *Flavonifractor plautii* gen. nov. comb. nov. and reassignment of *Bacteroides capillosus* to *Pseudoflavonifractor capillosus* gen. nov. comb. nov.

Jean-Philippe Carlier¹, Marie Bedora-Faure¹, Guylène K'ouas¹, Corentine Alauzet² and Francine Mory^{2*}

¹ Centre National de Référence des Bactéries Anaérobies et du Botulisme, Institut Pasteur, 25, rue du Dr Roux, F-75724 Paris Cedex 15, France

² Centre Hospitalier et Universitaire de Nancy, Hôpital Central, Laboratoire de Bactériologie, 29, avenue du Maréchal de Lattre de Tassigny, F-54035 Nancy Cedex, France

Corresponding author: F. Mory: 33 3 83 85 16 48

Fax: 33 3 83 85 26 73

E-mail: f.mory@chu-nancy.fr

Running title: *Clostridium orbiscindens* synonym of *Eubacterium plautii*

Abbreviations: DPH, 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene; TGY, trypticase-glucose-yeast extract

The GenBank/EMBL/DDBJ accessions for the 16S rDNA gene sequences of AIP 162.06, AIP 165.06, AIP 028.07, AIP 201.04 and AIP 029.07 are EU541435 to EU541439, respectively.

Summary

We isolated from various clinical samples (blood N=5, intra-abdominal pus N=4, infected soft tissue N=1) several strains, which were anaerobic, motile or non-motile and Gram-positive rods. Some strains formed spores. Phylogenetic analysis of the 16S rDNA gene showed that these organisms could be placed within clostridial cluster IV as defined by Collins *et al.* (1994) and shared more than 99% sequence similarity with *Clostridium orbiscindens* DSM 6740^T and *Eubacterium plautii* DSM 4000^T. Together, they formed a distinct cluster with *Bacteroides capillosus* ATCC 29799^T branching off from this line of descent with sequence similarities of 97.1 to 97.4%. Then, the nearest neighbours of these organisms were *Clostridium viride*, *Oscillibacter valericigenes*, *Papillibacter cinnamivorans* and *Sporobacter termitidis* with sequence similarities of 93.1 – 93.4, 91.2 – 91.4, 89.8 – 90 and 88.7 – 89.3%, respectively. On the basis of biochemical properties, phylogenetic position, DNA G + C content and DNA–DNA hybridization, it is proposed to unify *Clostridium orbiscindens* and *Eubacterium plautii* in a new genus *Flavonifactor plautii* gen. nov., comb. nov. with the type strain DSM 4000^T (= ATCC 29863^T = VPI 0310^T = Prévot S1^T) and to reassign *Bacteroides capillosus* to *Pseudoflavonifactor capillosus* gen. nov., comb. nov. with the type strain CCUG 15402A^T (=ATCC 29799^T= VPI R2-29-1^T).

Note

The genus *Clostridium* has undergone extensive revision these last few years and has been subdivided into 19 clusters on the basis of 16S rDNA sequence analysis. Cluster I, containing the type species *Clostridium butyricum*, clusters XI and XIVa include the majority of pathogenic species (Collins *et al.*, 1994). The members of cluster IV exhibit a combination of *Clostridium*- and non-*Clostridium*-type properties and a broad chromosomal DNA G + C content range (e.g. *Clostridium sporosphaeroides* a Gram positive spore-forming rod and *Bacteroides capillosus* a Gram negative non sporulating species with 27 and 60 mol% G + C, respectively). This cluster includes also *Clostridium orbiscindens* and *Eubacterium plautii*, two species which are asaccharolytic and produce acetate and butyrate. The name *Clostridium orbiscindens* was proposed in 1991 for an anaerobic bacilli isolated from human feces and capable of cleaving the C3-C4 bond of the quercetin (Winter *et al.*, 1991) and other flavonoids (Schoefer *et al.*, 2003). This organism is motile, peritrichous, Gram variable and forms spores.

Eubacterium plautii (type and unique strain, DSM 4000^T = ATCC 29863^T = VPI 0310^T = Prévot S1) was originally described by Seguin (1928) as *Fusobacterium plauti* (sic) a motile, Gram-negative, non-spore-forming bacillus. Hofstad & Aasjord (1982) on the basis of electron microscope examination showed that *Fusobacterium plautii* is a non-motile, Gram-positive organism and transferred this species within the genus *Eubacterium*. However, in the Bergey's of Systematic Bacteriology, this organism was described as motile, Gram-negative with very occasional weak Gram-positive areas (Moore & Holdeman Moore, 1986). The ability of *Eubacterium plautii* to cleave quercetin is not known. Thus, the characteristics and the taxonomic status of this species need to be clarified.

The isolation from various clinical samples (blood N=5, intra-abdominal pus N=4, infected soft tissue N=1) of several strains with 16S rDNA sequences that were phylogenetically closely related to the type strains of *Clostridium orbiscindens* DSM 6740^T, *Eubacterium plautii* DSM 4000^T and

Bacteroides capillosus ATCC 29799^T prompted us to re-evaluate the phylogenetic position of these three species.

The following selected isolates AIP 201.04, AIP 162.06 =LBN 202, AIP 165.06 = LBN 204, AIP 028.07 = LBN 205, AIP 029.07 = LBN 206 and the type strains were maintained in trypticase-glucose-yeast extract medium (TGY) (Carrier *et al.*, 2002) under anaerobic conditions at 37°C for 24 h in an anaerobic jar containing 5% H₂, 5% CO₂ and 90% N₂ (v/v/v). The 16S rDNA gene sequences were determined for each strain as described previously (Carrier *et al.*, 2004). The alignments were done using CLUSTAL W program (Thompson *et al.*, 1994). A distance matrix was calculated by using DNADIST with the Jukes–Cantor parameter (Jukes & Cantor, 1969). Phylogenetic analysis established that these isolates were part of clostridial cluster IV as defined by Collins *et al.* (1994) and were closely related to the type strains of *Clostridium orbiscindens* DSM 6740^T, *Eubacterium plautii* DSM 4000^T with 99.3 to 100% sequence similarities. Together, both type strains and clinical isolates formed a distinct cluster with *Bacteroides capillosus* ATCC 29799^T branching off from this line of descent with sequence similarities of 97.1 to 97.4% (Fig. 1). Then, the nearest neighbours of this cluster were *Clostridium viride* DSM 6836^T, *Oscillibacter valericigenes* Sjm 18-20^T, *Papillibacter cinnamivorans* DSM 12816^T and *Sporobacter termitidis* SYR^T with respective sequence similarities of approximately 93, 91, 90 and 89%.

The sequences of *Clostridium orbiscindens* DSM 6740^T and *Eubacterium plautii* DSM 4000^T shared 99.7% similarity. This high similarity value suggested that these species are identical notwithstanding some physiological differences. To verify this hypothesis the G + C content of the DNA for each species was determined by HPLC as described by Mesbah *et al.* (1989) and DNA–DNA hybridization was performed. DNA was extracted using a French pressure cell (Thermo Spectronic) and purified by chromatography on hydroxyapatite as described by Cashion *et al.* (1977). DNA-DNA hybridization was carried out using the method described by De Ley *et al.* (1970), modified according to Huss *et al.* (1983) using a model Cary 100 Bio UV/VIS-spectrometer equipped with a Peltier-thermostated multicell changer and a temperature controller with *in-situ*

temperature probe (Varian). Both type strains shared between 72.6 and 76.9% DNA-DNA reassociation similarity. The DNA base composition for *Eubacterium plautii* and *Clostridium orbiscindens* was 61.6 and 58.0 mol% G + C, respectively. Thus, according to the established molecular criteria for species-level relatedness, i.e. strains whose DNAs are at least 70% related under optimal conditions and whose related sequences show less than 3% divergence in 16S rDNA between two strains (Wayne *et al.*, 1987; Stackebrandt *et al.*, 2002), these strains could be regarded as belonging to a single species. Nevertheless, some phenotypic properties were further examined.

Degradation of quercetin

Bacterial degradation of quercetin was checked by the fluorescence quenching test according to Schoefer *et al.* (2001) and modified as follows: 150 µL of each stock solution, 1 mM 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH) and 20 mM quercetin were added in 180 X 8 mm tubes loosely covered. The tubes contained 5 mL of TGY agar and were inoculated with 0.5 mL of an overnight growing culture of each strain and incubated at 37°C for 48 h. For detection of fluorescence, the tubes were examined under a UV lamp (wavelength, 365 nm). Quercetin was degraded by all strains including *Eubacterium plautii* as demonstrated by the strong fluorescence observed (Fig. S1). On the other hand, *E. coli*, which does not degrade quercetin and the negative control (tube without bacteria), did not affect the quenching of DPH fluorescence. Thus, *Eubacterium plautii* like *Clostridium orbiscindens* is able to degrade quercetin.

Detection of the sporulation-specific gene *spo0A*.

Spore formation was not observed with some clinical isolates and the type strain of *Eubacterium plautii* DSM 4000^T. However, the inability to form spores is not an effective criterion for the determination of taxonomic status (Cato *et al.*, 1989). Lack of spore formation may only be due to defective strains. Yet, such asporogenic strains must have the majority of sporulation-specific genes (Onyenwoke *et al.*, 2004). Brill & Wiegell (1997) described a PCR assay to distinguish asporogenic

from non-spore-forming bacteria by employing probes directed against three representative and specific sporulation genes. Thus, we choose to investigate the presence of the sporulation-specific gene *spo0A* for the strains for which endospores have not been observed. The PCR assay was used with the following modifications: DNA was extracted using the InstaGene Matrix kit (Bio-Rad) as recommended by the manufacturer. PCR reactions were performed using 1.5 mM MgCl₂ instead of 0.125 – 0.375 mM. Our results showed that the isolates for which endospores have not been observed as well as *Eubacterium plautii* exhibited the sporulation-specific gene *spo0A* (Fig. S2).

Cellular fatty acid composition

Cellular fatty acid composition was analysed by gas chromatography according to Veys *et al.* (1989) on a fused-silica capillary column (25 m X 0.25 mm ID) coated with 5% methyl phenyl silicone. The cellular fatty acid composition of *Eubacterium plautii* DSM 4000^T, *Clostridium orbiscindens* DSM 6740^T and the clinical strains was very similar. All strains contained an unknown compound that eluted between C_{12:0} and C_{13:0} (6.5 – 8.2%), C_{14:0} (34 – 36.9%), a second unknown compound that eluted between anteiso-C_{15:0} and C_{15:0} (22.6 – 28.3%), C_{16:0} (14.4 – 18.1%), C_{17:1^{ω8}} (3.2 – 5.2%) and C_{18:0} (3.1 – 7.3%) as the major components. Minor fatty acids included iso-C_{15:0} (1.6 - 2.2%) and C_{16:1^{ω9c}} (0 -3.2%).

Susceptibility to glycopeptides

After determination of MICs of vancomycin and teicoplanin according to CLSI standards (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2007), all clinical isolates as well as type strains of *Eubacterium plautii* and *Clostridium orbiscindens* were susceptible to teicoplanin (MICs: 0.25-0.5 µg/ml) and exhibited reduced susceptibility to vancomycin (MICs: 4-8 µg/ml). Known glycopeptide resistance genes were not detected using a PCR assay (Domingo *et al.*, 2005; Fines *et al.*, 1999; McKessar *et al.*, 2000; Mory *et al.*, 1998; Perichon *et al.*, 1997; Rippere *et al.*, 1998).

In conclusion, the phenotypic and genotypic characteristics of *Eubacterium plautii* and *Clostridium orbiscindens* were very similar and strongly suggest that both species represent the same taxon. The only differences observed being the inability of *Eubacterium plautii* type strain to produce spores, and the motility of *Clostridium orbiscindens* type strain. These differences were also observed among the clinical isolates and could simply represent strain variations within the species.

Accordingly, we propose that *Clostridium orbiscindens* (Winter *et al.*, 1991) and *Eubacterium plautii* (Seguin, 1928; Hofstad & Aasjord, 1982) be unified and reclassified in a new genus, *Flavonifractor* gen. nov. with *Flavonifractor plautii* comb. nov. as type species. Since our clinical isolates share identical properties with *Eubacterium plautii* and *Clostridium orbiscindens*, they should be regarded as belonging to the species *Flavonifractor plautii*.

Taxonomic status of *Bacteroides capillosus* and *Clostridium viride*.

Bacteroides capillosus (Tissier, 1908; Kelly, 1957) is a non-motile, Gram-negative, non-spore-forming bacilli. Because the original strain was lost, Cato *et al.* (1979) have selected strain ATCC 29799^T as neotype strain of the species. However, it is evident from tree branching patterns, cellular fatty acids and 5S rRNA studies (Van den Eynde *et al.*, 1989) that *Bacteroides capillosus* ATCC 29799^T is phenotypically and phylogenetically distinct from the genus *Bacteroides* as defined by Shah & Collins (1989). In addition, the G + C content of the DNA of *Bacteroides capillosus* (60 mol%) differs from those of members of the genus *Bacteroides*, which range between 39 – 48 mol% (Shah & Collins, 1989). Consequently, *Bacteroides capillosus* cannot be maintained longer in genus *Bacteroides* and we propose its placement within clostridial cluster IV. The very high level of sequence similarity (>97%) together with biochemical and physiological properties and similar DNA base compositions (58 to 61.6 mol% G + C) showed that *Bacteroides capillosus* is closely related to the new genus *Flavonifractor* (Table 1). However, we tested strain CCUG 15402A^T (=ATCC 29799^T) for the presence of sporulation-specific gene *spo0A* and for its potential to degrade quercetin. Although this strain has the gene *spo0A* it is unable to cut quercetin (data not

shown). This feature and other major differences such as Gram staining and metabolic end products prevent its placement within this genus. In this context, we propose that *Bacteroides capillosus* be placed in a new genus *Pseudoflavonifractor* gen. nov. with *Pseudoflavonifractor capillosus* comb. nov.

Phylogenetically, *Clostridium viride* (Buckel *et al.*, 1994) clearly belongs to the cluster IV. But with sequence similarities of 93.1 – 93.4% it is too remote from *Flavonifractor* or *Pseudoflavonifractor* to be affiliated to the one of these genera. This is supported by a high bootstrap value (Fig. 1). Moreover, Gram staining, DNA base composition (41.5 mol% G + C) and metabolic end products support the view that this species represents another genus (Table 1). Further investigations are needed to define this probable new genus.

Description of *Flavonifractor* gen. nov.

Flavonifractor (Fla.vo.ni.frac'tor N.L. n. *flavonum*, flavone; L. masc. n. *fractor*, breaker; N.L. masc. n. *Flavonifractor*, flavone-breaker).

Strictly anaerobic bacilli, cells are Gram-variable after staining, are motile or not. Spores may be produced or not but the sporulation-specific gene *spoOA* is present. Asaccharolytic, glucose, fructose and ribose can be weakly fermented. Able to cleave quercetin and other flavonoids. Exhibit reduced susceptibility to vancomycin. The major metabolic end products are acetic and butyric acids in TGY broth. The major cellular fatty acids are C_{14:0}, C_{16:0}. Phylogenetically, the genus represents a distinct lineage in clostridial cluster IV. The type species is *Flavonifractor plautii*.

Description of *Flavonifractor plautii* comb. nov

Flavonifractor plautii (plau'ti.i. N.L. gen. masc. n. *plautii*, of Plaut, named for R. Plaut, the bacteriologist who first described this organism).

The description combined characteristics of *Eubacterium plautii* as determined by Seguin (1928) and emended by Hofstad & Aasjord, (1982) and those of *Clostridium orbiscindens* (Winter *et al.*,

1991) and displays the following characteristics in addition to those given in the genus description. Straight or slightly curved rods, 2 to 10µm long, and occur singly or in pairs. Some cells are fusiform. Colonies are minute, circular, convex, gray or white, smooth, non-hemolytic on sheep blood agar. Nitrate is not reduced. Production of indole and H₂S is variable. Gelatin and meat are not digested. Lecithinase is not produced.

The genomic DNA G + C content is 58 to 61.6 mol% (as determined by HPLC).

The species includes strains previously classified as *Clostridium orbiscindens*. The type strain is DSM 4000^T = ATCC 29863^T. Isolated from normal faecal flora, blood, intra-abdominal pus and infected soft tissues in human.

Description of *Pseudoflavonifactor* gen. nov.

Pseudoflavonifactor (Pseu.do fla.vo.ni.frac'tor Gr. adj. pseudes, false, N.L. masc. n. *Flavonifactor* a bacterial genus name; N.L. masc. n. *Pseudoflavonifactor*, a false *Flavonifactor*).

Strictly anaerobic, Gram-negative, non-motile, non-spore-forming bacilli. Phylogenetically, the genus represents a distinct lineage in clostridial cluster IV. The type species is *Pseudoflavonifactor capillosus*.

Description of *Pseudoflavonifactor capillosus* comb. nov.

Pseudoflavonifactor capillosus (ca.pil.lo'sus. L. masc. adj. capillosus, full of hair, very hairy).

The phenotypical and morphological characters were as described by Cato *et al.* (1979) for *Bacteroides capillosus*. Obligately anaerobic bacilli. Cells are Gram-negative, non-motile. Spores are not formed but the sporulation-specific gene *spoOA* is present. Straight or curved rods, 1.6 to 7.1 µm long, predominantly regular in shape, arranged singly, in pairs or in short chains. Filaments with tapered ends are observed. Surface colonies on 48-h-old, anaerobic blood agar are pinpoint to 0.5 mm in diameter, circular, slightly erose, colorless, translucent, and slightly peaked. Growth is stimulated by the addition of ca. 0.02% Tween 80 but is inhibited by 20% bile. Good growth is

observed at 37°C and 45°C. Assaccharolytic, glucose, cellobiose, fructose, galactose, lactose, maltose, mannose starch and sucrose can be weakly fermented. Esculin is hydrolyzed. Nitrate is not reduced. Indole is not produced. H₂S is usually not produced. Gelatin is usually not digested. Lecithinase and lipase are not produced. Unable to cleave quercetin. Acetic and succinic acids are detected after culture in TGY broth. The major cellular fatty acids are C_{14:0}, C_{16:0}.

The G+C content of the DNA is 60 mol%.

The type strain ATCC 29799^T = CCUG 15402A^T was isolated from human feces.

Acknowledgments

We thank Jean Euzéby for his advice on etymology, and Enevold Falsen (CCUG, University of Göteborg, Sweden) for the gift of *Bacteroides capillosus* CCUG 15402A^T.

References

- Brill, J.A. & Wiegel, J. (1997).** Differentiation between spore-forming and asporogenic bacteria using a PCR and Southern hybridization based method. *J Microbiol Methods* **31**, 29 - 36.
- Buckel, W., Janssen, P. H., Schuhmann, A., Eikmanns, U., Messner, P., Sleytr, U. & Liesack, W. (1994).** *Clostridium viride* sp. nov., a strictly anaerobic bacterium using 5-aminovalerate as growth substrate, previously assigned to *Clostridium aminovalericum*. *Arch Microbiol* **162**, 387–394.
- Carlier, J.P., K'ouas, G., Bonne, I., Lozniewski, A. & Mory, F. (2004).** *Oribacterium sinus* gen. nov., sp. nov., within the family 'Lachnospiraceae' (phylum Firmicutes). *Int J Syst Evol Microbiol* **54**, 1611 - 1615.
- Carlier, J.P., Marchandin, H., Jumas-Bilak, E., Lorin, V., Henry, C., Carriere, C. & Jean-Pierre, H. (2002).** *Anaeroglobus geminatus* gen. nov., sp nov., a novel member of the family Veillonellaceae. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**, 983 - 986.
- Cashion, P., Holder-Franklin, M.A., McCully, J. & Franklin, M. (1977).** A rapid method for the base ratio determination of bacterial DNA. *Anal Biochem* **81**, 461 - 466.
- Cato, E.P., Holdeman, L.V. & Moore, W.E.C. (1979).** Proposal of neotype strains for seven non-saccharolytic *Bacteroides* species. *Int J Syst Bacteriol* **29**, 427 - 434.
- Cato, E.P. & Stackebrandt, E. (1989).** Taxonomy and phylogeny. In *Clostridia: Biotechnology handbook*, pp.1 - 22. Edited by N.P. Minton & D.J Clarke. London: Plenum Press.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (2007).** Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria, M11-A7. Edited by Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, P.A.
- Collins, M.D., Lawson, P.A., Willems, A., Cordoba, J.J., Fernandez-Garayzabal, J., Garcia, P., Cai, J., Hippe, H. & Farrow, J.A.E. (1994).** The phylogeny of the genus *Clostridium*: proposal of five new genera and eleven new species combinations. *Int J Syst Bacteriol* **44**, 812–826.

- De Ley, J., Cattoir, H. & Reynaerts, A. (1970).** The quantitative measurement of DNA hybridization from renaturation rates. *Eur J Biochem* **12**, 133 - 142.
- Domingo, M.C., Huletsky, A., Giroux, R., Boissinot, K., Picard, F.J., Lebel, P., Ferraro, M.J. & Bergeron, M.G. (2005).** High prevalence of glycopeptide resistance genes *vanB*, *vanD*, and *vanG* not associated with enterococci in human fecal flora. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 4784 - 4786.
- Felsenstein, J. (1993).** PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.5c. Distributed by the author. Department of Genetics, University of Washington, Seattle, USA.
- Fines, M., Perichon, B., Reynolds, P., Sahn, D.F. & Courvalin, P. (1999).** *VanE*, a new type of acquired glycopeptide resistance in *Enterococcus faecalis* BM4405. *Antimicrob Agents Chemother* **43**, 2161 - 2164.
- Hofstad, T. & Aasjord, P. (1982).** *Eubacterium plautii* (Seguin 1928) comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* **32**, 346 - 349.
- Huss, V.A.R., Festl, H. & Schleifer, K.H. (1983).** Studies on the spectrometric determination of DNA hybridization from renaturation rates. *Syst Appl Microbiol* **4**, 184 - 192.
- Jukes, T.H. & Cantor, R.R. (1969).** Evolution of protein molecules. In *Mammalian Protein Metabolism*, pp.21 - 132. Edited by H.N. Munro. New York: Academic Press.
- Kelly, C.D. (1957).** Genus I, *Bacteroides* Castellani and Chalmers 1919. In *Bergey's manual of determinative bacteriology*, pp.424 - 436. Edited by R. S. Breed, E.G.D. Murray & N. R. Smith. Baltimore: Williams and Wilkins.
- McKessar, S.J., Berry, A.M., Bell, J.M., Turnidge, J.D. & Paton, J.C. (2000).** Genetic characterization of *vanG*, a novel vancomycin resistance locus of *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother* **44**, 3224 - 3228.
- Mesbah, M., Premachandran, U. & Whitman, W. (1989).** Precise measurement of the G + C content of deoxyribonucleic acid by high performance liquid chromatography. *Int J Syst Bacteriol* **39**, 159 - 167.

- Moore, W.E.C. & Holdeman Moore, L.V. (1986).** Genus *Eubacterium* Prévot 1938, 294 AL. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol 2, pp.1353 - 1373. Edited by P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe & J.G Holt. Baltimore: Williams & Wilkins.
- Mory F., Lozniewski A., David V., Carlier J.P., Dubreuil L., & Leclercq R. (1998).** Low-level vancomycin resistance in *Clostridium innocuum*. *J Clin Microbiol* **36**, 1767-1768.
- Onyenwoke, R.U., Brill, J.A., Farahi, K. & Wiegel, J. (2004).** Sporulation genes in members of the low G + C Gram-type-positive phylogenetic branch (Firmicutes). *Arch Microbiol* **182**, 182 - 192.
- Perichon, B., Reynolds, P. & Courvalin, P. (1997).** *VanD*-type glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* BM4339. *Antimicrob Agents Chemother* **41**, 2016 - 2018.
- Rippere, K., Patel, R., Uhl, J.R., Piper, K.E., Steckelberg, J.M., Kline, B.C., Cockerill III, F.R. & Yousten, A.A. (1998).** DNA sequence resembling *vanA* and *vanB* in the vancomycin-resistant biopesticide *Bacillus popilliae*. *J Infect Dis* **178**, 584 - 588.
- Schoefer, L., Braune, A. & Blaut, M. (2001).** A fluorescence quenching test for the detection of flavonoid transformation. *FEMS Microbiol Lett* **204**, 277-280.
- Schoefer, L., Mohan, R., Schwiertz, A., Braune, A. & Blaut, M. (2003).** Anaerobic degradation of flavonoids by *Clostridium orbiscindens*. *Appl Environ Microbiol* **69**, 5849 - 5854.
- Seguin, P. (1928).** Culture du *Fusobacterium plauti*, forme mobile du Bacille fusiforme. *C R Soc Biol* **99**, 439 - 442.
- Shah, H.N. & Collins, M.D. (1989).** Proposal to restrict the genus *Bacteroides* (Castellani and Chalmers) to *Bacteroides fragilis* and closely related species. *Int J Syst Bacteriol.* **39**, 85 - 87.
- Stackebrandt, E., Frederiksen, W., Garrity, G.M., Grimont, P.A.D., Kämpfer, P., Maiden, M.C.J., Nesme, X., Rossello-Mora, R., Swings, J. & other authors. (2002).** Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**, 1043–1047.

- Thompson, J.D., Higgins, D.G. & Gibson, T.J. (1994).** CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**, 4673 - 4680.
- Tissier, H. (1908).** Recherche sur la flore intestinale normale des enfants âgés d'un an à cinq ans. *Ann Inst Pasteur Paris*. **22**, 189 - 208.
- Van den Eynde, H., De Baere, R., Shah, H.N., Gharbia, S.E., Fox, G.E., Michalik, J., Van de Peer, Y. & De Wachter, R. (1989).** 5S ribosomal ribonucleic acid sequences in *Bacteroides* and *Fusobacterium*: evolutionary relationships within these genera and among eubacteria in general. *Int J Syst Bacteriol* **39**, 78-84.
- Veys, A., Callewaert, W., Waelkens, E. & Van den Abbeele, K. (1989).** Application of gas-liquid chromatography to the routine identification of nonfermenting Gram-negative bacteria in clinical specimens. *J Clin Microbiol* **27**, 1538 - 1542.
- Wayne, L.G., Brenner, D., Colwell, R.R., Grimont, P.A.D., Kandler, O., Krichevsky, M.I., Moore, L.H., Moore, W.E.C., Murray, R.G.E. & other authors. (1987).** Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int J Syst Bacteriol* **37**, 463 - 464.
- Winter, J., Popoff, M.R., Grimont, P. & Bokkenheuser, V.D. (1991).** *Clostridium orbiscindens* sp. nov., a human intestinal bacterium capable of cleaving the flavonoid C-ring. *Int J Syst Bacteriol* **41**, 355 - 357.

Table 1: Comparison of biochemical and physiological properties of *C. orbiscindens*, *E. plautii*, *B. capillosus* and *C. viride*.

	<i>C. orbiscindens</i>	<i>E. plautii</i>	<i>B. capillosus</i>	<i>C. viride</i>
Gram staining*	V	V	-	+
G + C content (mol%)	58.0	61.6	60	41.5
Metabolism†	NF	NF	NF	NF
Metabolic end products ‡	A, B	A, B	A, S	A, P, B, V
Major cellular fatty acids§	C _{14:0} , C _{16:0}	C _{14:0} , C _{16:0}	C _{14:0} , C _{16:0}	NA
References	This paper	This paper	Cato et al., (1979); Van den Eynde et al. (1989)	Buckel et al. (1994)

* V, variable; -, negative; +, positive.

† NF, non-fermentative; F, fermentative.

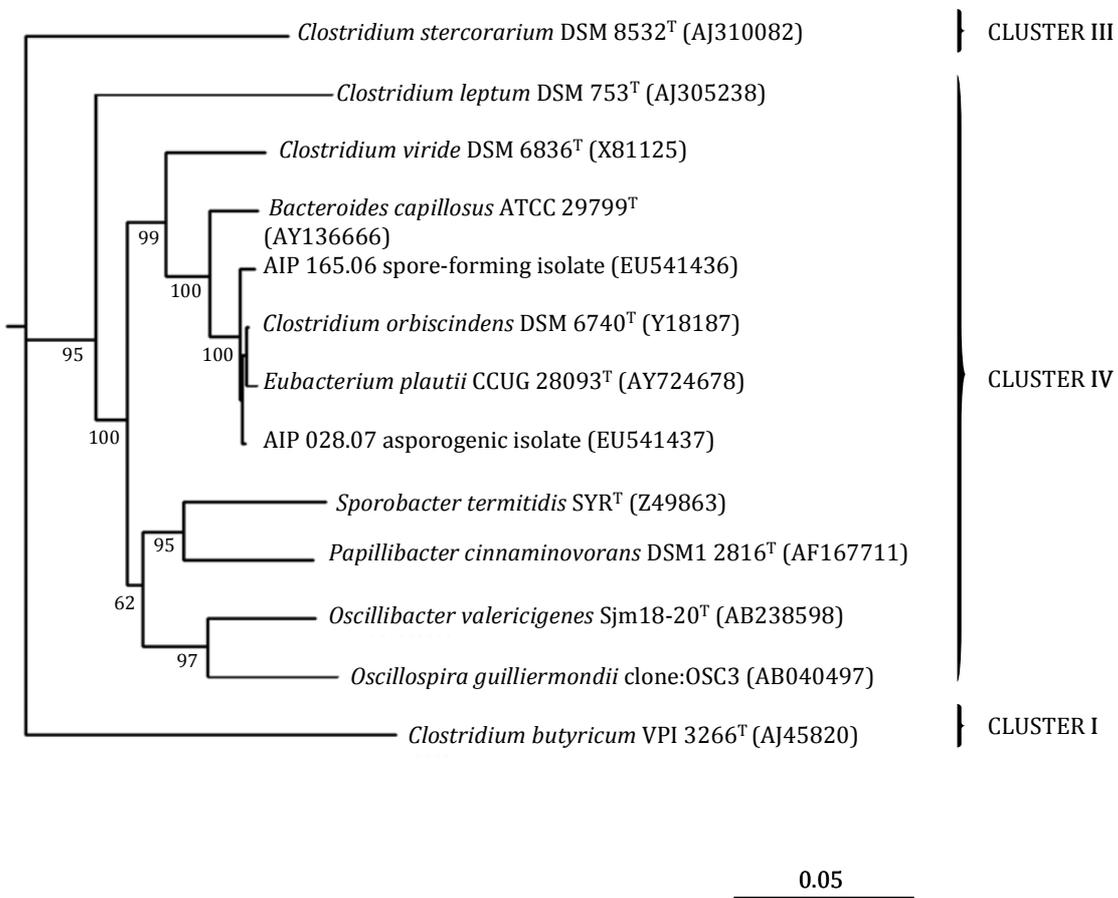
‡ A, acetic acid ; B, butyric acid; P, propionic acid; V, valeric acid; S, succinic acid; NA, not available.

§ Number of carbon: number of double bonds; iso, iso-branched chain; anteiso, anteiso-branched chain;

DMA, dimethylacetal

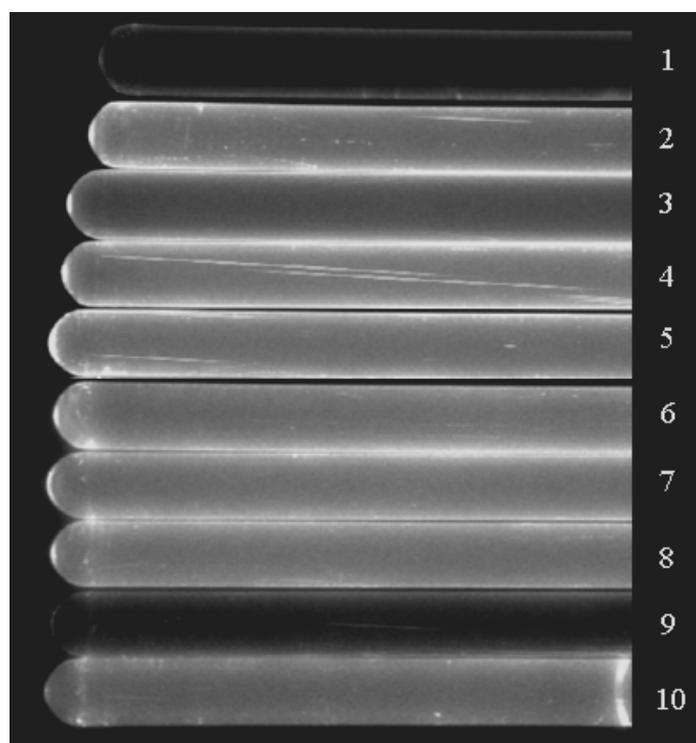
Legends

Figure 1. Dendrogram indicating the phylogenetic position of *Eubacterium plautii*, *Clostridium orbiscindens* and *Bacteroides capillosus* and closely related species among the clostridial groups. Evolutionary distances (based on 1400 unambiguous nucleotides) were computed by using the neighbour-joining method and bootstrap values calculated from 100 resamplings (Felsenstein, 1993). The sequence of *Clostridium butyricum* was used as an outgroup. Scale bar indicates 5% sequence divergence. GenBank accession numbers are given in parentheses. T, type strain.



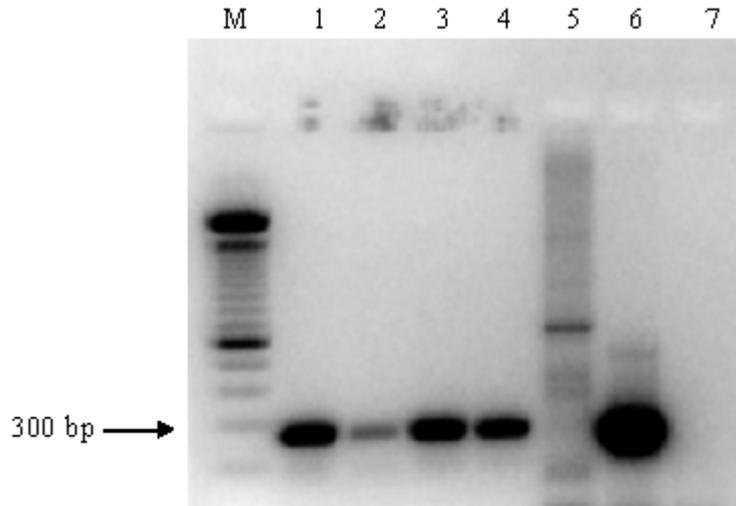
Supplementary figure S1. DPH fluorescence quenching test.

The test is based on the property of flavonoids to quench DPH fluorescence: 1, DPH + quercetin + *E. coli* K 12 (quercetin non degrading strain) ; 2, DPH + quercetin + AIP 201.04 ; 3, DPH + quercetin + *Clostridium orbiscindens* DSM 6740^T ; 4, DPH + quercetin + AIP 165.06 ; 5, DPH + quercetin + AIP 162.06 ; 6, DPH + quercetin + *Eubacterium plautii* DSM 4000^T ; 7, DPH + quercetin + AIP 029.07 ; 8, DPH + quercetin + AIP 028.07 ; 9, DPH + quercetin (negative control); 10, DPH (positive control).



Supplementary figure S2. PCR amplification *spo0A*-fragments.

Representative PCR of *spo0A*-fragments from: Lane M, 100 bp ladder size marker (Invitrogen); lane 1, *Eubacterium plautii* DSM 4000^T; lane 2, *Clostridium orbiscindens* DSM 6740^T; lane 3, AIP 028.07; lane 4, AIP 029.07; lane 5, *Escherichia coli* K12 (non-spore-forming species); lane 6, *Clostridium perfringens* (asporogenic species); 7, negative control.



Annexe E. Publication N°2

Bacteremia caused by a metronidazole-resistant *Prevotella* sp. strain.

Mory F., Carlier J. P., **Alauzet C.**, Thouvenin M., Schuhmacher H., Lozniewski A.

Journal of Clinical Microbiology 2005, 43:5380-5383.

Bacteremia Caused by a Metronidazole-Resistant *Prevotella* sp. Strain

Francine Mory,¹ Jean-Philippe Carlier,² Corentine Alauzet,¹ Maxime Thouvenin,³
Hélène Schuhmacher,⁴ and Alain Lozniewski^{1*}

Laboratoire de Bactériologie¹ and Service des Maladies Infectieuses et Tropicales,⁴ Centre Hospitalier et
Universitaire, Nancy, Centre National de Référence des Bactéries Anaérobies et du Botulisme,
Institut Pasteur, Paris,² and Laboratoire de Biologie, Centre Hospitalier,
Neufchâteau,³ France

Received 15 March 2005/Returned for modification 30 April 2005/Accepted 3 July 2005

Metronidazole resistance among *Prevotella* spp. is rare. We report here the first case of bacteremia due to a high-level metronidazole-resistant *Prevotella* sp. responsible for treatment failure.

CASE REPORT

A 78-year-old man with a past history of non-insulin-dependent diabetes mellitus and diverticulitis was hospitalized because of fever and altered clinical status. Physical examination was normal and no abnormalities were revealed by a systematic computed tomography scan of the abdomen. Laboratory studies revealed a white blood cell count of 28,000 cells/mm³ (90% polymorphonuclear leukocytes), a C-reactive protein level of 139 mg/liter, and a blood glucose level of 2 g/liter. Three sets of blood culture samples were collected in BACTEC Plus Aerobic/F medium and BACTEC Plus Anaerobic/F medium (BACTEC 9000 system; Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France). The patient was treated empirically with intravenous cefotaxime (1 g three times daily) and ofloxacin (200 mg twice daily). Blood cultures taken at the admission detected the presence of *Escherichia coli* (susceptible to both antibiotics used) and *Streptococcus anginosus* (susceptible to cefotaxime). Urine and lower respiratory tract samples remained negative after quantitative bacteriologic cultures. On day 7, the patient remained febrile and new blood cultures (three sets) were taken while intravenous metronidazole (500 mg three times daily) and teicoplanin (400 mg once daily) were added.

A strictly anaerobic, nonmotile, gram-negative rod was the only bacterium detected in the three anaerobic blood culture vials of the three sample sets taken on day 7. In vitro susceptibility testing was performed by using a standard disk diffusion method on brucella agar supplemented with 5% sheep blood, 1 mg of vitamin K₁/liter, and 5 mg of hemin/liter (7). Metronidazole susceptibility was determined by using 16- μ g metronidazole Neo-Sensitabs (Rosco Diagnostica, Taastrup, Denmark). According to the criteria of the Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie for susceptibility testing of anaerobes (7), the isolate was considered susceptible to amoxicillin-clavulanate, piperacillin-tazobactam, cefoxitin, imipenem, chloramphenicol, clindamycin, and metronidazole after 48 h of incubation. It was also intermediate to cefotaxime and resistant to ofloxacin. β -lactamase production was demonstrated by using a nitrocefin test (Cefi-

nase; bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France). Using an Etest method (13), we found a MIC ratio of >500 for cefotaxime/cefotaxime-clavulanic acid and ceftazidime/ceftazidime-clavulanic acid, suggesting the presence of an extended-spectrum β -lactamase.

It has been shown that metronidazole resistance may be only detected after prolonged incubation time (9, 12). Plates were therefore incubated for additional 48 h. This permitted us to observe that small colonies began to appear inside the metronidazole inhibition zone after 72 h and became more numerous after 96 h. The same phenomenon was also observed within the ellipse area of a metronidazole Etest strip after 72 h. Colonies from within and outside the inhibition zone, respectively, designated AIP 261-03 and AIP 268-03, were subcultured without antibiotic, and MICs were determined by using an agar dilution method as recommended by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI; formerly the National Committee for Clinical Laboratory Standards) (21). Both populations were found to be intermediate to cefotaxime (32 mg/liter). For metronidazole, MICs of 2 and 64 mg/liter were found for AIP 268-03 and AIP 261-03, respectively. On day 14, the treatment was changed to piperacillin-tazobactam (4 g three times daily) and ciprofloxacin (400 mg twice daily). The patient became afebrile and was discharged home 3 weeks later.

The presence of 5-nitroimidazole (*nim*) resistance genes was investigated by PCR with universal primers (28). Positive control strains containing *nim* genes included *Bacteroides fragilis* 638R containing plasmid pIP417 (*nimA*), *B. fragilis* BF8 (*nimB*), *B. fragilis* 638R containing plasmid pIP419 (*nimC*), *B. fragilis* 638R containing plasmid pIP421 (*nimD*), and *B. fragilis* ARU 6881 (*nimE*) gave amplification products, whereas AIP 261-03, AIP 268-01, and *B. fragilis* ATCC 25285 (*nim*-negative and metronidazole-susceptible control strain) did not. For AIP 268-03, a significant increase of the metronidazole MIC (24 mg/liter) was observed after three passages in brucella broth supplemented with hemin and vitamin K₁ and containing subinhibitory concentrations of metronidazole. When the same assay was performed with AIP 261-03, the MIC was also increased up to 256 mg/liter. For all metronidazole-resistant isolates, the metronidazole MICs remained unchanged after further four consecutive subcultures on drug-free medium.

AIP 261-03 and AIP 268-03 did not grow on unsupple-

* Corresponding author. Mailing address: Laboratoire de Bactériologie, Hôpital Central, CHU, 29 Avenue du Maréchal de Lattre de Tassigny, 54035 Nancy Cedex, France. Phone: (33) 3-83-85-18-14. Fax: (33) 3-83-85-26-73. E-mail: a.lozniewski@chu-nancy.fr.

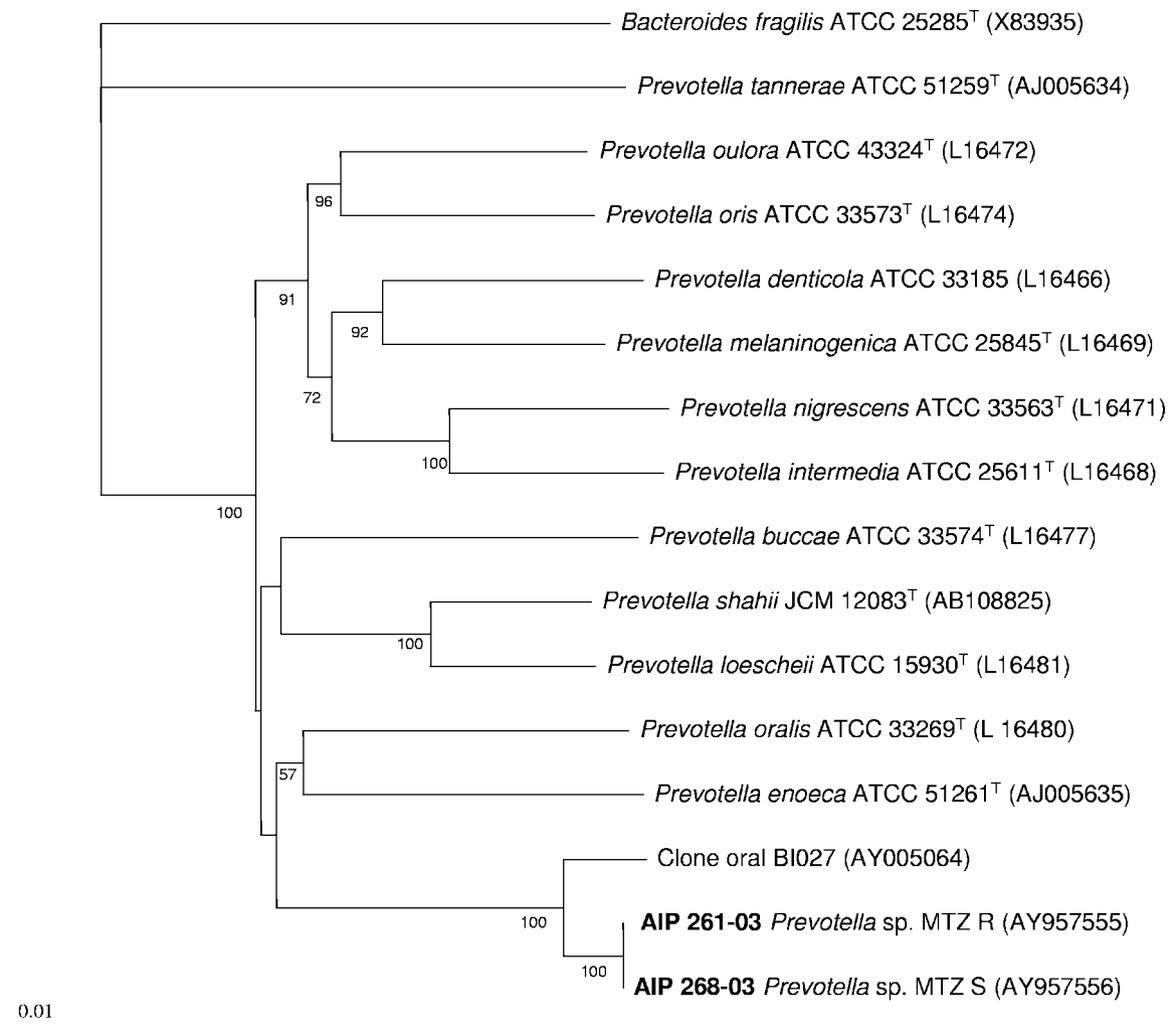


FIG. 1. Dendrogram showing the phylogenetic positions of AIP 261-03 and AIP 268-03 within the genus *Prevotella* based on 16S rRNA sequences. The sequence of *B. fragilis* was used as an outgroup. The numbers above the branches are bootstrap percentages from 100 resampled data sets. The reference sequences were obtained from the GenBank and EMBL databases. Accession numbers are given in parentheses. The bar represents a 1% sequence difference.

mented brucella agar nor on brucella agar supplemented with vitamin K₁. Both isolates grew on brucella agar supplemented with hemin, but a substantially decreased growth rate was observed for AIP 261-03 whose colonies of which were smaller than those of AIP 268-03 after 48 h of incubation. Both isolates gave nonpigmented colonies on brucella sheep blood agar.

Conventional tests (15, 17), as well as tests with the API 20A (bioMérieux), Rapid ID32A system (bioMérieux), and the RAPID ANA II system (AES, Combourg, France) showed that AIP 261-03 and AIP 268-03 produced the same profile. They were susceptible to bile and resistant to kanamycin, vancomycin, and colistin. Production of catalase, indole, and lipase was not detected. Gelatin was not liquefied. Acid was produced from lactose and saccharose but not from cellobiose, salicin, xylose, and xylan. The organisms did not hydrolyze esculin. Positive reactions were obtained for β-galactosidase, α-glucosidase, β-glucosidase, α-galactosidase, α-fucosidase, and N-acetyl-β-glucosaminidase. For both isolates, the major metabolic end products were acetic acid, lactic acid, and succinic

acid as assessed by quantitative gas chromatography (3). However, it is noteworthy that the resistant strain AIP 261-03 produced higher levels of lactic acid than the susceptible strain AIP 268-03, namely, 44.6 versus 11 mmol/liter, respectively.

The cultural and biochemical characteristics were consistent with those of the genus *Prevotella*. 16S rRNA gene determination was performed as described previously (5). The 16S rRNA sequences obtained were compared to all eubacterial 16S rRNA sequences available in the GenBank database by using the multisequence Advanced BLAST comparison software from the National Center for Biotechnology Information (1). A phylogenetic tree was constructed from 1,380 unambiguous nucleotide positions by using the Fitch and Margoliash algorithm (11) and showed that both strains fell within the genus *Prevotella* (Fig. 1).

A 16S rRNA sequence identity of 100% was found between the two strains. The highest sequence similarity value (99%) was then obtained with the 16S rRNA sequence of the oral clone BI027 (22). After which, sequence similarity values

ranged from 89% (*Prevotella oralis* ATCC 33269^T) to 80% (*Prevotella tanneriae* ATCC 51259^T). Thus, the strains AIP 261-03 and AIP 268-03 can be considered to represent two clones of a novel species within the genus *Prevotella*. Both strains exhibited the same pulsed-field gel electrophoresis pattern (CHEF DRIII; Bio-Rad) after DNA digestion performed by using XbaI as described by Chung et al. (6).

Prevotella spp. are anaerobic gram-negative bacilli that may be involved in various human infections, including infections of the head, neck, lower respiratory tract, central nervous system, and abdominal and female genital tract, and bacteremia (17). In humans, the sources of such infections are usually the oral cavity, as well as the intestinal and urogenital tracts, where these bacteria are prevalent in the local commensal flora. Despite a previous history of diverticulitis, an intestinal source was ruled out in our patient since the abdominal computed tomography scan and a further performed colonoscopy were normal. Examination of the oropharynx revealed no abnormalities, and no other potential source of infection could be identified.

The treatment of such infections is commonly based on the use of metronidazole. For a long time, it has been considered that acquired resistance to this antibiotic was rare among anaerobes despite its extensive use. However, recent studies have shown that this resistance is not uncommon especially among *Bacteroides* spp. (12). Such resistance has also been observed in *Prevotella* spp. and gram-positive anaerobic bacteria (14, 19, 23, 26, 27). For most *Prevotella* spp. strains, a low-level resistance was observed, and only a single isolate of *Prevotella melaninogenica* with a high-level resistance (MIC of metronidazole: 32 mg/liter) has been reported by Lubbe et al. (19). Such a resistance level was also found in our isolate. For *Bacteroides* spp., it has been suggested that high-level metronidazole resistance may lead to eradication failure (25). This was also demonstrated in our patient who remained febrile while being treated with metronidazole for 7 days and who became afebrile 3 days after metronidazole was changed to piperacillin-tazobactam. It is believed that exposure to metronidazole can lead to the development of metronidazole-resistant mutants (12, 16). In contrast, in the present report, a metronidazole-resistant *Prevotella* sp. isolate was recovered before metronidazole was started in a patient that had not received previous 5-nitroimidazole therapy. This was also shown by other for metronidazole-resistant *Bacteroides* strains (24). We found that in our isolate metronidazole resistance was inducible and that, as shown by other with *nim*-positive *Bacteroides* spp. strains (12, 18), the mutant remained resistant after the removal of the antibiotic. Therefore, it may be possible that exposure to metronidazole in vivo has led to select a preexisting resistant subpopulation. However, this remains uncertain since no blood samples were taken while the patient was treated by metronidazole, and consequently no isolate was recovered after metronidazole treatment.

Among *Bacteroides* spp., 5-nitroimidazole resistance is most often related to the presence of *nim* genes, although *nim* gene-negative metronidazole-resistant strains have been reported (12, 18).

The proposed resistance mechanism conferred by the *nim* genes is that they encode a 5-nitroimidazole reductase, which possibly use ferredoxin as the electron donor (4). 5-Nitroimidazole is reduced to its amine derivative through a low redox potential reaction. For *B. fragilis*, it has been suggested that metronidazole resistance may also be due to alterations of different other enzymes involved in electron transfer reactions, particularly but not exclusively the pyruvate-oxidoreductase complex (2, 8, 10, 20). Decreased activity of pyruvate-oxidoreductase complex, which may be compensated for by the increase of the production of lactate dehydrogenase, causes alteration in the end products of glucose metabolism (2, 8, 20). This phenomenon induces elevated levels of lactate, as observed with our metronidazole-resistant strain. However, multiple pathways may be involved in the resistance to 5-nitroimidazole drugs, and further investigations are needed to determine the mechanism of metronidazole resistance in the new *Prevotella* species reported herein.

In the present study, metronidazole susceptibility was initially determined after 48 h. However, as seen here and in previous reports (9, 12), some slow-growing metronidazole-resistant clones could only be detected later. These would have been overlooked after 48 h of incubation using standard methods, including the agar dilution method. Therefore, given that this specific population may be responsible for treatment failure, we strongly recommend that plates be reexamined after 72 h to look for small colonies within the metronidazole inhibition zone. This case highlights the importance of careful antimicrobial susceptibility testing of anaerobes, especially in severe infections.

Nucleotide sequence accession numbers. The GenBank/EMBL/DDBJ accession numbers for the 16S rRNA sequences of strains AIP 261-03 and AIP 268-03 are AY957555 and AY957556, respectively.

We thank Isabelle Scholtus and Marie Bedora-Faure for technical help.

REFERENCES

- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D. J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**:3389–3402.
- Britz, M. L., and R. G. Wilkinson. 1979. Isolation and properties of metronidazole-resistant mutants of *Bacteroides fragilis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **16**:19–27.
- Carlier, J. P. 1985. Gas chromatography of fermentation products: its application in diagnosis of anaerobic bacteria. *Bull. Inst. Pasteur* **83**:57–69.
- Carlier, J. P., N. Sellier, M. N. Rager, and G. Reysset. 1997. Metabolism of 5-nitroimidazole in susceptible and resistant isogenic strains of *Bacteroides fragilis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:1495–1499.
- Carlier, J. P., G. K'ouas, A. Lozniewski, F. Sirveaux, P. Cailloux, and F. Mory. 2004. Osteosynthesis-associated bone infection caused by a nonproteolytic, nontoxicogenic *Clostridium botulinum*-like strain. *J. Clin. Microbiol.* **42**:484–486.
- Chung, W. O., J. Gabany, G. R. Persson, and M. C. Roberts. 2002. Distribution of *erm*(F) and *tet*(Q) genes in 4 oral bacterial species and genotypic variation between resistant and susceptible isolates. *J. Clin. Periodontol.* **29**:152–158.
- Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. 2004. Communiqué 2004. Société Française de Microbiologie, Paris, France.
- Diniz, C. G., L. M. Farias, M. A. R. Carvalho, E. R. Rocha, and C. J. Smith. 2004. Differential gene expression in a *Bacteroides fragilis* metronidazole-resistant mutant. *J. Antimicrob. Chemother.* **54**:100–108.
- Dublanchet, A. 1990. *Bacteroides fragilis* with reduced sensitivity to metronidazole. An unusual phenotypic expression. *Med. Mal. Infect.* **20**(HS):113–116.
- Edwards, D. I. 1993. Nitroimidazole drugs—action and resistance mechanisms. II. Mechanisms of resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* **31**:201–210.

11. **Felsenstein, J.** 1993. PHYLIP (Phylogeny Inference Package), version 3.5c. Department of Genetics, University of Washington, Seattle.
12. **Gal, M., and J. S. Brazier.** 2004. Metronidazole resistance in *Bacteroides* spp. carrying *nim* genes and the selection of slow-growing metronidazole-resistant mutants. *J. Antimicrob. Chemother.* **54**:109–116.
13. **Handal, T., I. Olsen, C. B. Walker, and D. A. Caugant.** 2004. β -lactamase production and antimicrobial susceptibility of subgingival bacteria from refractory periodontitis. *Oral Microbiol. Immunol.* **19**:303–308.
14. **Hecht, D. W.** 2004. Prevalence of antibiotic resistance in anaerobic bacteria: worrisome developments. *Clin. Infect. Dis.* **39**:92–97.
15. **Holdeman, L. V., E. P. Cato, and W. E. C. Moore.** 1977. Anaerobe laboratory manual, 4th ed. Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, Va.
16. **Ingham, H. R., S. Eaton, C. W. Venables, and P. C. Adams.** 1978. *Bacteroides fragilis* resistant to metronidazole after long-term therapy. *Lancet* *i*:214.
17. **Jousimies-Somer, H., P. Summanen, D. M. Citron, E. J. Baron, H. M. Wexler, and S. M. Finegold.** 2002. Wadsworth-KTL anaerobic bacteriology manual, 6th ed. Star Publishing Co., Belmont, Calif.
18. **Löfmark, S., H. Fang, M. Hedberg, and C. Edlund.** 2005. Inducible metronidazole resistance and *nim* genes in clinical *Bacteroides fragilis* group isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:1253–1256.
19. **Lubbe, M. M., P. L. Botha, and L. J. Chalkley.** 1999. Comparative activity of eighteen antimicrobial agents against anaerobic bacteria isolated in South Africa. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **18**:46–54.
20. **Narikawa, S., T. Suzuki, M. Yamamoto, and M. Nakamura.** 1991. Lactate dehydrogenase activity as a cause of metronidazole resistance in *Bacteroides fragilis* NCTC 11295. *J. Antimicrob. Chemother.* **28**:47–53.
21. **National Committee for Clinical Laboratory Standards.** 2003. Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria, 6th ed. Approved standards M11–A6. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
22. **Paster, B. J., S. K. Boches, J. L. Galvin, R. E. Ericson, C. N. Lau, V. A. Levanos, A. Sahasrabudhe, and F. E. Dewhirst.** 2001. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J. Bacteriol.* **183**:3770–3783.
23. **Phillips, I., C. Warren, E. Taylor, R. Timewell, and S. Eykyn.** 1981. The antimicrobial susceptibility of anaerobic bacteria in a London teaching hospital. *J. Antimicrob. Chemother.* **8**(Suppl. D):17–26.
24. **Rotimi, V. O., B. I. Duerden, V. Ede, and A. E. MacKinnon.** 1979. Metronidazole-resistant *Bacteroides* from untreated patient. *Lancet* *i*:833.
25. **Rotimi, V. O., M. Khoursheed, J. S. Brazier, W. Y. Jamal, and F. B. Khodakhast.** 1999. *Bacteroides* species highly resistant to metronidazole: an emerging clinical problem? *Clin. Microbiol. Infect.* **5**:166–169.
26. **Sandoe, J. A. T., J. K. Struthers, and J. S. Brazier.** 2001. Subdural empyema caused by *Prevotella loescheii* with reduced susceptibility to metronidazole. *J. Antimicrob. Chemother.* **47**:366–367.
27. **Theron, M. M., M. N. Janse Van Rensburg, and L. J. Chalkley.** 2004. Nitroimidazole resistance genes (*nimB*) in anaerobic gram-positive cocci (previously *Peptostreptococcus* spp.). *J. Antimicrob. Chemother.* **54**:240–242.
28. **Trinh, S., and G. Reysset.** 1996. Detection by PCR of the *nim* genes encoding 5-nitroimidazole resistance in *Bacteroides* spp. *J. Clin. Microbiol.* **34**:2078–2084.

Annexe F. Publication N°3

Prevotella nanceiensis sp. nov., isolated from human clinical samples.

Alauzet C., Mory F., Carlier J. P., Marchandin H., Jumas-Bilak E., Lozniewski A.

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 2007, 57:2216-2220.

Prevotella nanceiensis sp. nov., isolated from human clinical samples

C. Alauzet,^{1,2} F. Mory,² J. P. Carlier,³ H. Marchandin,^{4,5} E. Jumas-Bilak⁵ and A. Lozniewski^{1,2}

Correspondence

A. Lozniewski

a.lozniewski@chu-nancy.fr

¹Université Nancy I, UMR CNRS 7565, UFR de Médecine, Laboratoire de Bactériologie, Vandoeuvre-les-Nancy, France

²Centre Hospitalier et Universitaire de Nancy, Hôpital Central, Laboratoire de Bactériologie, Nancy, France

³Institut Pasteur, Centre National de Référence des Bactéries Anaérobies et du Botulisme, Paris, France

⁴Centre Hospitalier et Universitaire de Montpellier, Hôpital Arnaud de Villeneuve, Laboratoire de Bactériologie, Montpellier, France

⁵Université Montpellier 1, UFR de Pharmacie, Laboratoire de Bactériologie-Virologie, EA 3755, Montpellier, France

Three strains of anaerobic, non-pigmented, Gram-negative bacilli isolated from various human clinical samples were characterized in terms of phenotypic and genotypic tests, including sequence analysis of 16S rRNA and *rpoB* genes. The strains were most closely related to the type strains of *Prevotella marshii* and *Prevotella shahii* on the basis of both 16S rRNA (89.8 and 89.0% identity, respectively) and *rpoB* gene sequences (83.1 and 82.8% identity, respectively). Phylogenetic analysis showed that the isolates constituted a robust homogeneous group distinct from known species in the genus *Prevotella*. The *rrn* skeleton (as determined by PFGE) and the DNA G + C content, determined to be 39.4 mol% for strain LBN 293^T, distinguished the novel isolates from the type strains of *P. marshii* and *P. shahii*. The three strains were saccharolytic and produced acetic, lactic and succinic acids as major metabolic end products. Polyphasic investigations supported the proposal of a novel species, *Prevotella nanceiensis* sp. nov., with LBN 293^T (=AIP 261.03^T =CIP 108993^T =CCUG 54409^T) as the type strain.

The genus *Prevotella* includes strictly anaerobic, Gram-negative, moderately saccharolytic, bile-sensitive rods that formerly belonged to the genus *Bacteroides* (Shah & Collins, 1990). These bacteria, which are part of the human oral, intestinal and urogenital flora, may be involved in various infections of the head and neck, lower respiratory tract, central nervous system, abdominal and female genital tract and in bacteraemia (Jousimies-Somer *et al.*, 2002). The use of molecular methods, such as 16S

rRNA gene sequencing, for the identification of anaerobic bacteria has revealed that a significant proportion of strains did not correspond to species with validly published names (Jousimies-Somer, 1997; Jousimies-Somer *et al.*, 2003) and has led to a great expansion of the genus *Prevotella*, with the description of seven novel species within the last 3 years. In this study, three strains of anaerobic Gram-negative rods, isolated from different human clinical samples and affiliated to the genus *Prevotella* by presumptive identification tests, were subjected to a comprehensive range of phenotypic, genotypic, genomic and phylogenetic tests.

Strains LBN 293^T and LBN 297 were both recovered in pure culture. Strain LBN 293^T was isolated in 2003 from blood cultures from a 78-year-old man (Mory *et al.*, 2005) and strain LBN 297 was isolated in 2004 from lung abscess pus from a 67-year-old man. Strain LBN 298 was isolated in 2005 from a broncho-alveolar lavage fluid from a 66-year-old woman. The broncho-alveolar lavage fluid also contained *Pseudomonas aeruginosa* and a coagulase-negative *Staphylococcus* sp. Strains were grown at 36 °C on Brucella agar supplemented with 5% sheep blood, haemin

Abbreviation: ML, maximum likelihood.

The GenBank/EMBL/DDBJ accession numbers for the 16S rRNA and *rpoB* gene sequences determined in this study are respectively AY957555 and EF405531 for *P. nanceiensis* LBN 293^T, EF405529 and EF405532 for *P. nanceiensis* LBN 297 and EF405530 and EF405533 for *P. nanceiensis* LBN 298. Those for the *rpoB* gene sequences of *P. marshii* E9.34^T and *P. shahii* JCM 12083^T are respectively EF405534 and EF405535.

Transmission electron micrographs of cells of strain LBN 293^T and a comparison of its fatty acid profile with those of related type strains are available as supplementary material with the online version of this paper.

and vitamin K₁ (BBA) in an anaerobic chamber (Concept 1000; Ruskinn).

DNA was extracted by using the QIAamp DNA Mini kit (Qiagen). The 16S rRNA gene was amplified by PCR and sequenced as described previously (Carlier *et al.*, 2004). A 374 bp fragment of the gene *rpoB* was amplified using the primer pair Prev3250F (5'-AACCCGTTGGGTGTGCC-3') and Prev3623R (5'-AGIGCCAAACCT CCATCTCTCC-3') (Berger *et al.*, 2005). Nucleotide sequences were analysed by using SeqScape software (version 2.5; Applied Biosystems). The sequences were compared to those deposited in the GenBank and Ribosomal Database Project II databases using the BLAST program (Altschul *et al.*, 1997) and Seqmatch program (Cole *et al.*, 2006), respectively. The isolates displayed the highest 16S rRNA gene sequence similarity to members of the genus *Prevotella*. Maximum similarity (99.4 %) was observed with the sequence of *Prevotella* sp. oral clone BI027, obtained from human subgingival plaque (Paster *et al.*, 2001). The 16S rRNA gene sequences were aligned against sequences of all known *Prevotella* type strains and that of *Prevotella* oral clone BI027 using the DIALIGN program (Morgenstern, 2002). The distance matrix constructed using the Similarity table program of the PHYLIP package (Felsenstein, 1993) showed that strains LBN 293^T, LBN 297 and LBN 298 shared more than 99.6 % of their 16S

rRNA gene nucleotide positions. The best sequence matches with strains of species with validly published names were obtained with *Prevotella marshii* E9.34^T and *Prevotella shahii* JCM 12083^T, but the similarity levels (89.8 and 89.0 %, respectively) were relatively low. The three isolates displayed 100 % identity in *rpoB* gene sequences. Maximum similarity was again observed with the sequences of *P. marshii* E9.34^T and *P. shahii* JCM 12083^T (83.1 and 82.8 %, respectively). Altogether, the sequencing results suggested that the three strains belonged to a new taxon. This prompted us to investigate the taxonomic position of these strains by a polyphasic approach.

Evolutionary trees were reconstructed using the PHYLIP suite of programs (Felsenstein, 1993) by maximum-parsimony (Kluge & Farris, 1969) and by neighbour-joining (algorithm F84 for substitution model) (Saitou & Nei, 1987; Kishino & Hasegawa, 1989). The robustness of the nodes was evaluated by 1000 bootstrap replications using SEQBOOT and CONSENSE programs (Felsenstein, 1993). The maximum-likelihood (ML) tree was reconstructed using phyML software with GTR (gamma distribution and invariable sites) as the substitution model and 100 bootstraps replications (Guindon & Gascuel, 2003). The 16S rRNA gene-based ML phylogenetic tree is shown in Fig. 1. Nodes labelled by asterisks were found by all three

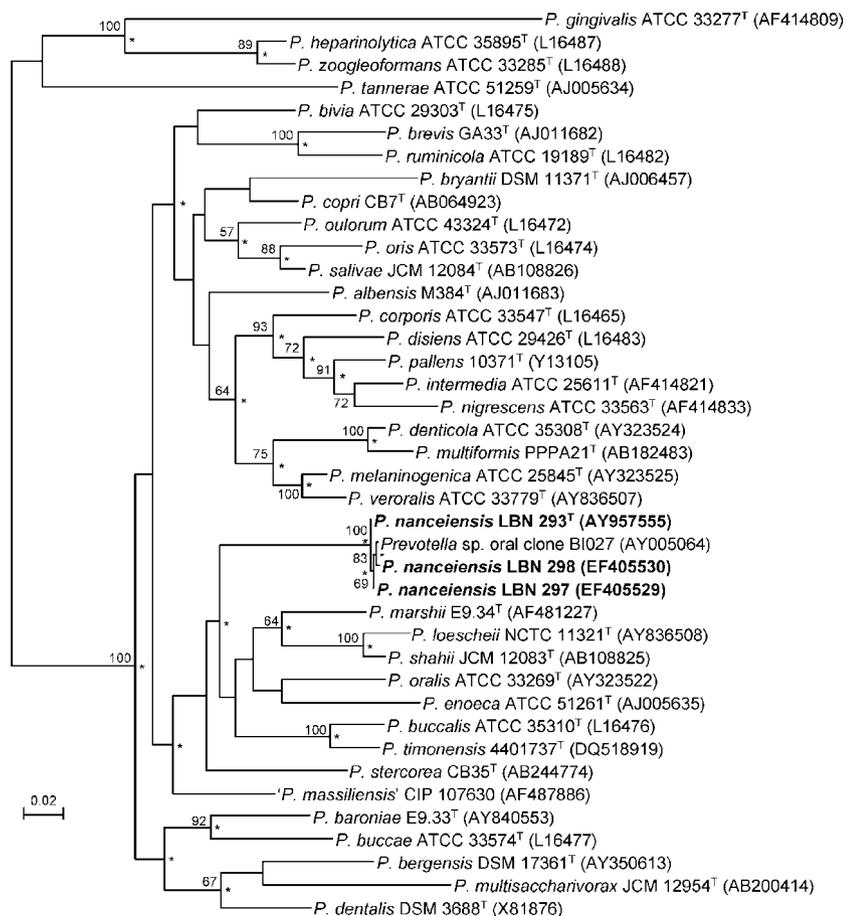


Fig. 1. ML phylogenetic tree for 16S rRNA gene sequences showing the relationship between the novel strains (*Prevotella nanceiensis* sp. nov.) and the other members of the genus *Prevotella*. The sequence of *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277^T (GenBank accession no. L16492) was used as an outgroup. Bootstrap values >50 are indicated at corresponding nodes. Consensus nodes observed in the ML, neighbour-joining and parsimony trees are labelled with asterisks. Sequence accession numbers are in parentheses. Bar, 0.02 substitutions per site.

phylogenetic methods, but other branches moved according to the phylogenetic method. Strains LBN 293^T, LBN 297 and LBN 298 formed a robust homogeneous group distinct from other species of the genus *Prevotella*.

The DNA G + C content of strain LBN 293^T, determined by HPLC at the Identification Service of the DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Germany), was 39.4 mol%. This value is in accordance with those reported for the genus *Prevotella* (39–60 mol%) (Willems & Collins, 1995; Avguštin *et al.*, 1997) and was clearly distinct from the DNA G + C contents determined for the most closely related species, *P. marshii* (51.0 mol%; Downes *et al.*, 2005) and *P. shahii* (44.3 mol%; Sakamoto *et al.*, 2004).

Large-scale chromosome structure analysis was previously described as a sensitive indicator of phylogenetic relationships between bacteria (Liu *et al.*, 1999; Marchandin *et al.*, 2003a; Jumas-Bilak *et al.*, 2005). Chromosome size and *rrn* skeletons of the three isolates were studied in comparison with *P. marshii* DSM 16973^T and *P. shahii* DSM 15611^T using PFGE, as described previously (Jumas-Bilak *et al.*, 1998; Marchandin *et al.*, 2003a, b). All three strains studied possess a unique and circular chromosome (data not shown). The chromosome of the novel strains was 3.02 to 3.09 Mb in size, similar to the *P. marshii* chromosome (2.95 Mb) but clearly distinct from the *P. shahii* chromosome (4.01 Mb). I-*CeuI* profiles showed that all the strains tested possess four *rrn* operons (Fig. 2). The *rrn* skeleton distinguished the novel strains from their most closely related phylogenetic neighbours, *P. marshii* and *P. shahii*, each species exhibiting a specific I-*CeuI* profile (Fig. 2).

The strains were obligately anaerobic, non-spore-forming, non-motile, Gram-negative coccoid and short rods. After

4 days incubation on BBA, colonies were 0.5–1 mm in diameter, circular, entire, slightly convex and smooth, white, non-pigmented and surrounded by a β -haemolysis zone. For examination of the cell-wall ultrastructure of strain LBN 293^T, cells were prepared as described previously (Carlier *et al.*, 2004) and electron photomicrographs were taken with a JEOL 1010 transmission electron microscope operating at 80 kV. Rods, 0.4–0.5 \times 0.5–1.0 μ m in size, were observed. Transmission electron microscope examination of ultrathin sections of strain LBN 293^T showed the presence of a typical Gram-negative cell wall composed of a thin peptidoglycan layer surrounded by an outer membrane (see Supplementary Fig. S1 in IJSEM Online).

All strains were susceptible to bile (1 mg tablet) and resistant to kanamycin (1 mg disc), vancomycin (5 μ g tablet) and colistin (10 μ g tablet).

Biochemical tests were performed in triplicate using the API 20A anaerobe identification kit (bioMérieux) as recommended by the manufacturer. Xylan fermentation was determined in trypticase/yeast extract broth as recommended by Holdeman *et al.* (1977). Metabolic end products were assayed by quantitative gas chromatography as described previously (Carlier, 1985). Enzyme profiles were generated with the Rapid ID 32A anaerobe identification kit (bioMérieux), according to the manufacturer's instructions, and performed in triplicate. The results of these tests are given in the species description.

Characteristics summarized in Table 1 for the novel strains and related *Prevotella* species showed that the novel strains were phenotypically very similar to *Prevotella buccalis* and *Prevotella veroralis*. However, the novel strains could be distinguished from *P. buccalis* by the absence of arginine arylamidase production and from *P. veroralis* by the absence of fermentation of xylan.

The cellular fatty acid composition of strain LBN 293^T was determined by using the MIDI Microbial Identification System at the Identification Service of the DSMZ (Supplementary Table S1). Analysis of cellular fatty acids showed that strain LBN 293^T had a low similarity index (0.106) to the *Prevotella loescheii* entry found in MIDI library version 3.8. The high level of summed feature 11 and smaller amount of C_{18:1 ω 9c} are differential characteristics between strain LBN 293^T and closely related species

On the basis of the above-mentioned findings, we propose that strains LBN 293^T, LBN 297 and LBN 298 should be classified within a novel species of the genus *Prevotella*, *Prevotella nanceiensis* sp. nov.

Description of *Prevotella nanceiensis* sp. nov.

Prevotella nanceiensis (nan.se.i.en'sis. N.L. fem. adj. *nanceiensis* pertaining to Nanceium, the old name of Nancy, the French city where the strains supporting the description of the species were isolated).

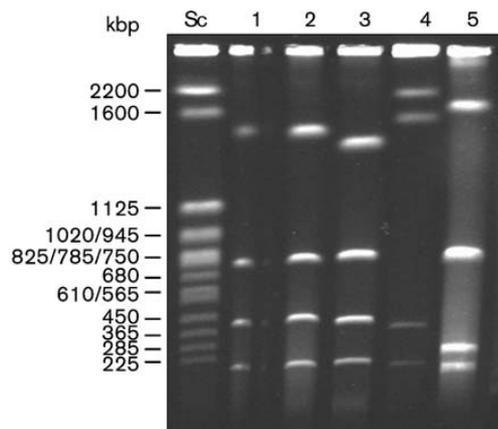


Fig. 2. PFGE migration of I-*CeuI*-restricted DNAs. Lanes: 1, *P. nanceiensis* LBN 298; 2, *P. nanceiensis* LBN 297; 3, *P. nanceiensis* LBN 293^T; 4, *P. shahii* DSM 15611^T; 5, *P. marshii* DSM 16973^T. Lane Sc, *Saccharomyces cerevisiae* chromosome used as molecular size marker. Sizes are indicated in kilobases.

Table 1. Differential phenotypic characteristics of *Prevotella nanceiensis* sp. nov. and related *Prevotella* species

Species: 1, *P. nanceiensis* sp. nov. (strains LBN 293^T, LBN 297 and LBN 298); 2, *P. bivia*; 3, *P. disiens*; 4, *P. buccalis*; 5, *P. enoeca*; 6, *P. oralis*; 7, *P. oulorum*; 8, *P. veroralis*; 9, *P. shahii*; 10, *P. marshii*; 11, *P. loescheii*. +, Positive; -, negative; v, variable; ND, no data available. Data for reference species were taken from Downes *et al.* (2005), Jousimies-Somer *et al.* (2002), Sakamoto *et al.* (2004), Shah & Collins (1990), Watabe *et al.* (1983) and Wu *et al.* (1992).

Characteristic	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Pigment production	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
Fermentation of:											
Cellobiose	v*	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+
Lactose	+*	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+
Mannose	+*	+	-	+	v	+	+	+	+	v	+
Raffinose	+*	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+
Rhamnose	-*	-	-	-	ND	+	-	-	-	-	-
Salicin	-*	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Sucrose	+*	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+
Xylan	-	-	ND	-	ND	-	-	+	ND	ND	v
Aesculin hydrolysis	+*	-	-	+	v	+	+	+	-	-	+
Gelatin hydrolysis	-*	+	+	-	+	v	-	v	+	+	+
Catalase	-*	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-

*As determined using the API 20A anaerobe identification kit.

Cells are obligately anaerobic, non-spore-forming, non-motile, Gram-negative coccoid and short rods (0.4–0.5 × 0.5–1.0 µm). After 4 days incubation on BBA, colonies are 0.5–1 mm in diameter, circular, entire, slightly convex and smooth, white, non-pigmented and surrounded by a β-haemolysis zone. Growth is inhibited in the presence of bile. Strains are saccharolytic and ferment glucose, lactose, maltose, mannose, raffinose and sucrose. Fermentation of cellobiose is variable among strains. Acid is not produced from arabinose, glycerol, mannitol, melezitose, rhamnose, salicin, sorbitol, trehalose, xylan or xylose. The major metabolic end products are acetic, lactic and succinic acids. Aesculin is hydrolysed. Gelatin and urea are not hydrolysed. Indole and catalase are not produced and nitrate is not reduced. All strains are positive for α-galactosidase, β-galactosidase, β-galactosidase-6-phosphate, α-glucosidase, N-acetyl-β-glucosaminidase, alkaline phosphatase, leucyl glycine arylamidase, alanine arylamidase, α-fucosidase and glutamyl glutamic acid arylamidase in the Rapid ID 32A identification panel, while reactions for mannose and raffinose fermentation and for β-glucosidase are variable among strains. All strains are negative for the remaining 16 tests, resulting in a Rapid ID 32A profile of 47⁰/1¹/5⁷ 440222. The fatty acid profile predominantly comprises iso-C_{15:0}, anteiso-C_{15:0}, C_{16:0}, C_{16:0} 3-OH, C_{18:2}ω_{9,12c} and summed feature 11 (iso-C_{17:0} 3-OH and/or C_{18:2} dimethylacetal). Chromosomal

genomic size ranges from 3.02 to 3.09 Mb, with four *rrn* operon copies. The DNA G + C content of the type strain is 39.4 mol%.

The type strain is LBN 293^T (=AIP 261.03^T =CIP 108993^T =CCUG 54409^T), isolated from a blood culture. Two other strains were recovered from clinical respiratory samples.

Acknowledgements

The authors are grateful to M.-C. Prevost and A. Mallet (Plate-forme de Microscopie Electronique, Institut Pasteur, Paris) for performing the transmission electron microscopy, Corinne Teyssier for her help concerning PFGE and Isabelle Scholtus, Monique Chaon, Elise Pernot and Marie Bedora-Faure for their technical assistance.

References

- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**, 3389–3402.
- Avguštin, G., Wallace, R. J. & Flint, H. J. (1997). Phenotypic diversity among ruminal isolates of *Prevotella ruminicola*: proposal of *Prevotella brevis* sp. nov., *Prevotella bryantii* sp. nov., and *Prevotella albensis* sp. nov. and redefinition of *Prevotella ruminicola*. *Int J Syst Bacteriol* **47**, 284–288.
- Berger, P., Adékambi, T., Mallet, M.-N. & Drancourt, M. (2005). *Prevotella massiliensis* sp. nov. isolated from human blood. *Res Microbiol* **156**, 967–976.
- Carlier, J.-P. (1985). Gas chromatography of fermentation products: its application in diagnosis of anaerobic bacteria. *Bull Inst Pasteur* **83**, 57–69.
- Carlier, J.-P., K'ouas, G., Bonne, I., Lozniewski, A. & Mory, F. (2004). *Oribacterium sinus* gen. nov., sp. nov., within the family 'Lachnospiraeae' (phylum Firmicutes). *Int J Syst Evol Microbiol* **54**, 1611–1615.
- Cole, J. R., Chai, B., Farris, R. J., Wang, Q., Kulam-Syed-Mohideen, A. S., McGarrell, D. M., Bandela, A. M., Cardenas, E., Garrity, G. M. & Tiedje, J. M. (2006). The ribosomal database project (RDP-II): introducing *myRDP* space and quality controlled public data. *Nucleic Acids Res* **35**, D169–D172.
- Downes, J., Sutcliffe, I., Tanner, A. C. & Wade, W. G. (2005). *Prevotella marshii* sp. nov. and *Prevotella baroniae* sp. nov., isolated from the human oral cavity. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**, 1551–1555.
- Felsenstein, J. (1993). PHYLIP (phylogeny inference package), version 3.5c. Distributed by the author. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle, USA.
- Guindon, S. & Gascuel, O. (2003). A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol* **52**, 696–704.
- Holdeman, L. V., Cato, E. P. & Moore, W. E. C. (1977). *Anaerobe Laboratory Manual*, 4th edn. Blacksburg, VA: Virginia Polytechnic Institute and State University.
- Jousimies-Somer, H. (1997). Recently described clinically important anaerobic bacteria: taxonomic aspects and update. *Clin Infect Dis* **25** (Suppl. 2), S78–S87.
- Jousimies-Somer, H., Summanen, P., Citron, D. M., Baron, E. J., Wexler, H. M. & Finegold, S. M. (2002). *Wadsworth-KTL Anaerobic Bacteriology Manual*, 6th edn. Belmont, CA: Star Publishing.

- Jousimies-Somer, H. R., Summanen, P. H., Wexler, H., Finegold, S. M., Gharbia, S. E. & Shah, H. N. (2003). *Bacteroides*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, and other anaerobic gram-negative bacteria. In *Manual of Clinical Microbiology*, 6th edn, vol. 1, pp. 880–901. Edited by P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Tenover & R. M. Tenover. Washington, DC: American Society for Microbiology.
- Jumas-Bilak, E., Michaux-Charachon, S., Bourg, G., O'Callaghan, D. & Ramuz, M. (1998). Differences in chromosome number and genome rearrangements in the genus *Brucella*. *Mol Microbiol* **27**, 99–106.
- Jumas-Bilak, E., Jean-Pierre, H., Carlier, J.-P., Teyssier, C., Bernard, K., Gay, B., Campos, J., Morio, F. & Marchandin, H. (2005). *Dialister microaerophilus* sp. nov. and *Dialister propionificaciens* sp. nov., isolated from human clinical samples. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**, 2471–2478.
- Kishino, H. & Hasegawa, M. (1989). Evaluation of the maximum likelihood estimate of the evolutionary tree topologies from DNA sequence data, and the branching order in Hominoidea. *J Mol Evol* **29**, 170–179.
- Kluge, A. & Farris, J. (1969). Quantitative phyletics and the evolution of anurans. *Syst Zool* **18**, 1–32.
- Liu, S.-L., Schryvers, A. B., Sanderson, K. E. & Johnston, R. N. (1999). Bacterial phylogenetic clusters revealed by genome structure. *J Bacteriol* **181**, 6747–6755.
- Marchandin, H., Jumas-Bilak, E., Gay, B., Teyssier, C., Jean-Pierre, H., Siméon de Buochberg, M., Carrière, C. & Carlier, J.-P. (2003a). Phylogenetic analysis of some *Sporomusa* sub-branch members isolated from human clinical specimens: description of *Megasphaera micronuciformis* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**, 547–553.
- Marchandin, H., Teyssier, C., Siméon de Buochberg, M., Jean-Pierre, H., Carrière, C. & Jumas-Bilak, E. (2003b). Intra-chromosomal heterogeneity between the four 16S rRNA gene copies in the genus *Veillonella*: implications for phylogeny and taxonomy. *Microbiology* **149**, 1493–1501.
- Morgenstern, B. (2002). A simple and space-efficient fragment-chaining algorithm for alignment of DNA and protein sequences. *Appl Math Lett* **15**, 11–16.
- Mory, F., Carlier, J.-P., Alauzet, C., Thouvenin, M., Schuhmacher, H. & Lozniewski, A. (2005). Bacteremia caused by a metronidazole-resistant *Prevotella* sp. strain. *J Clin Microbiol* **43**, 5380–5383.
- Paster, B. J., Boches, S. K., Galvin, J. L., Ericson, R. E., Lau, C. N., Levanos, V. A., Sahasrabudhe, A. & Dewhirst, F. E. (2001). Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol* **183**, 3770–3783.
- Saitou, N. & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**, 406–425.
- Sakamoto, M., Suzuki, M., Huang, Y., Umeda, M., Ishikawa, I. & Benno, Y. (2004). *Prevotella shahii* sp. nov. and *Prevotella salivae* sp. nov., isolated from the human oral cavity. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**, 877–883.
- Shah, H. N. & Collins, M. D. (1990). *Prevotella*, a new genus to include *Bacteroides melaninogenicus* and related species formerly classified in the genus *Bacteroides*. *Int J Syst Bacteriol* **40**, 205–208.
- Watabe, J., Benno, Y. & Mitsuoka, T. (1983). Taxonomic study of *Bacteroides oralis* and related organisms and proposal of *Bacteroides veroralis* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **33**, 57–64.
- Willems, A. & Collins, M. D. (1995). 16S rRNA gene similarities indicate that *Hallella seregens* (Moore and Moore) and *Mitsuokella dentalis* (Haapasalo et al.) are genealogically highly related and are members of the genus *Prevotella*: emended description of the genus *Prevotella* (Shah & Collins) and description of *Prevotella dentalis* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* **45**, 832–836.
- Wu, C. C., Johnson, J. L., Moore, W. E. C. & Moore, L. V. H. (1992). Emended descriptions of *Prevotella denticola*, *Prevotella loescheii*, *Prevotella veroralis*, and *Prevotella melaninogenica*. *Int J Syst Bacteriol* **42**, 536–541.

Annexe G. Publication N°4

Metronidazole resistance in *Prevotella* spp. and description of a new *nim* gene in *Prevotella baroniae*.

Alauzet C., Mory F., Teyssier C., Hallage H., Carlier J. P., Grollier G., Lozniewski A.

Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Octobre 2009. [Epub ahead of print].

ABSTRACT

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24

Non duplicate clinical isolates of *Prevotella* spp. recovered from patients hospitalized between 2003 and 2006 in two French tertiary-care teaching hospitals were investigated for their susceptibility to metronidazole and the presence of *nim* genes. Of the 188 strains tested, 3 isolates displayed reduced susceptibility to metronidazole after 48 h of incubation while 27 additional isolates exhibited heterogeneous resistance after prolonged incubation, all of them being *nim*-negative. Among the remaining 158 isolates, 7 *nim*-positive isolates were detected. All of these strains were identified as *Prevotella baroniae* by 16S rRNA gene sequence analysis, and contained a new *nim* gene, named *nimI*, as determined by DNA sequence analysis. Chromosomal localization of this single copy gene was demonstrated in all clinical isolates as well as in the type strain *P. baroniae* DSM 16972^T by using southern hybridization. No known associated insertion sequence elements were detected upstream of the *nimI* gene in any of the *nim*-positive strains using PCR-mapping. After prolonged exposure to metronidazole, stable resistant subpopulations could be selected in *nimI* positive ($n = 6$) as well as in *nim*-negative *Prevotella* isolates ($n = 6$) irrespectively of their initial susceptibility to this antibiotic. This study is the first description of a new nitroimidazole-resistance gene in *P. baroniae* which seems to be 'silent' and might be intrinsic in this species. Moreover, our findings highlight the fact that high level resistance to metronidazole may be easily induced in both *nim*-positive and *nim*-negative *Prevotella* spp. strains.

INTRODUCTION

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22

The genus *Prevotella* includes strictly anaerobic, gram-negative, moderately saccharolytic, bile sensitive rods formerly belonging to the genus *Bacteroides* (33). These bacteria which are part of the human oral, intestinal and urogenital flora may be involved in various infections including infections of the head and neck, respiratory tract, central nervous system, abdominal and urogenital tract, and bacteremia (19). Metronidazole is commonly used for the treatment of anaerobic infections. For a long time, it has been considered that acquired resistance to this antibiotic was rare among anaerobes despite its extensive use. However, recent studies have shown that this resistance is no longer uncommon among these organisms (3, 16, 18, 22, 23, 26, 36). Reduced susceptibility to 5-nitroimidazole drugs is generally associated with the presence of a nitroimidazole reductase encoded by a *nim* gene. This enzyme converts 4- or 5-nitroimidazole to 4- or 5-aminoimidazole, thus avoiding the formation of toxic nitroso radicals that are essential for antimicrobial activity (4). Currently, seven *nim* genes named *nimA* to *-G*, which are either plasmid or chromosomally encoded, have been described (30), while a new *nim* gene (*nimH*, accession number FJ969397) is being described in *Bacteroides fragilis*.

Among studies concerning metronidazole susceptibility in *Prevotella* spp., the presence of *nim* genes has only rarely been investigated (20, 23, 27). This led us to investigate the presence and the type of *nim* genes among a large panel of clinical *Prevotella* strains belonging to different species and isolated from patients hospitalized in two French tertiary-care teaching hospitals.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial isolates, identification and culture. One hundred eighty-eight non duplicate *Prevotella* isolates recovered from patients hospitalized between 2003 and 2006 in two French tertiary-care teaching hospitals (university hospital center of Nancy, $n = 157$; university hospital center of Poitiers, $n = 31$) were investigated. These strains were isolated from various clinically significant infections (head and neck, $n = 49$; skin and soft tissues, $n = 36$; intra-abdominal, $n = 30$; pleuro-pulmonary, $n = 25$; urogenital, $n = 20$; osteo-articular, $n = 13$; bacteremia, $n = 11$; other, $n = 4$). Isolates were identified by phenotypic methods as well as by 16S rRNA gene sequence analysis if necessary (*Prevotella bivia*, $n = 41$; *Prevotella buccae*, $n = 35$; *Prevotella denticola*, $n = 28$; *Prevotella melaninogenica*, $n = 17$; *Prevotella disiens*, $n = 10$; *Prevotella nanceiensis*, $n = 10$; *Prevotella oris*, $n = 9$; *Prevotella baroniae*, $n = 7$; *Prevotella nigrescens*, $n = 5$; *Prevotella oralis*, $n = 5$; *Prevotella* sp., $n = 5$; *Prevotella loescheii*, $n = 3$; *Prevotella salivae*, $n = 3$; *Prevotella veroralis*, $n = 3$; *Prevotella bergensis*, $n = 2$; *Prevotella intermedia*, $n = 2$; *Prevotella corporis*, $n = 1$; *Prevotella heparinolytica*, $n = 1$; *Prevotella multififormis*, $n = 1$) (1, 17, 19). Strains were stored in brucella broth containing 15% (wt/vol) glycerol at -80°C prior to assays. For all experiments, strains were grown at 37°C on brucella agar supplemented with 5% sheep blood, hemin and vitamin K₁ (BBA) under anaerobic conditions.

Metronidazole susceptibility testing. MICs of metronidazole were determined on BBA by the agar dilution method according to CLSI standards (document M11-A7) (5) and by the Etest method (AB Biodisk, Solna, Sweden) according to the manufacturer's instructions. Readings were performed after incubation of 48 h at 35°C under anaerobic conditions. MIC results were interpreted in accordance with the guidelines of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) (susceptibility ≤ 4 $\mu\text{g/ml}$; resistance ≥ 8 $\mu\text{g/ml}$) (11). *Bacteroides fragilis* ATCC 25285^T and *Bacteroides*

1 *thetaitotaomicron* ATCC 29741 were included as controls. As it has been previously shown
2 that metronidazole resistance may be only detected after prolonged incubation time (9, 14,
3 25), a second reading of all tests was performed after additional 72 h. All assays were
4 performed in duplicate.

5 **Detection of *nim* genes and IS elements.** DNA was extracted by using the QIAamp
6 DNA mini kit (Qiagen Inc., Hilden, Germany). The presence of *nim* genes was investigated
7 by PCR with universal primers NIM-3 and NIM-5, as previously described (25, 38). For IS
8 element-specific PCR amplifications, previously published primers were used (15, 35, 37,
9 38). Using the forward primer specific to the amplified IS element and the reverse NIM-5
10 primer, further PCR experiments were performed to determine whether the IS was upstream
11 of the *nim* gene, as described by S6ki *et al.* (34, 35). The following positive control strains
12 containing *nim* genes and IS elements were used: *B. fragilis* 638R(pIP417) (*nimA*, IS1168),
13 *B. fragilis* BF8 (*nimB*, IS1168), *B. thetaiotaomicron* BT13(pIP419) (*nimC*, IS1170),
14 *B. fragilis* 638R(pIP421) (*nimD*, IS1169), *B. fragilis* BF388(pBF388c) (*nimE*, ISBf6), and *B.*
15 *fragilis* BF6712 (IS612). *B. fragilis* ATCC 25285^T was included as a *nim*-negative control.
16 The IS element and *nim* gene PCR products were sequenced using an ABI-PRISM Big Dye
17 terminator sequencing kit on an automated sequencer ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems,
18 Les Ulis, France). The nucleotide sequences were analyzed by using the SeqScape software
19 (version 2.5, Applied Biosystems). The sequences were compared to those deposited in the
20 GenBank database using the BLAST program (2). The sequences of Nim proteins were
21 determined using the TRANSLATE program of the ExpASy Proteomics Server
22 (www.expasy.org). The protein sequences were analyzed and aligned by using the BioEdit
23 Sequence Alignment Editor program (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). A
24 phylogenetic dendrogram was generated using the neighbor-joining method with the MEGA
25 software, version 2.1 (21).

1 **Localization of *nim* genes.** The presence of *nim* genes in either plasmid or
2 chromosomal DNA was determined by plasmid extraction and southern hybridization in *nim*-
3 positive strains as previously described (14). Briefly, plasmid DNA was extracted using the
4 Plasmid mini preparation kit (Qiagen). Uncut plasmid DNA and *Eco*RI-digested
5 chromosomal DNA were run on electrophoresis gels and then transferred by capillarity to
6 nylon membranes Hybond-N+ (Amersham Biosciences). *Nim* digoxigenin-labeled probes
7 were obtained by PCR as described above using primer pair NIM-3 and NIM-5 with a dNTP
8 mixture containing 0.1 mM digoxigenin-dUTP (Roche Diagnostics). The hybridization of the
9 probes was detected by a CSPD chemiluminescence system (Roche Diagnostics). *B. fragilis*
10 638R(pIP417) and *B. fragilis* BF8 were used as positive and negative controls for plasmid and
11 chromosomal localization, respectively.

12 **Selection and stability of metronidazole resistance.** Eleven clinical isolates (5 *nim*-
13 positive and 6 *nim*-negative strains), as well as *Prevotella baroniae* DSM 16972^T and
14 *B. fragilis* 25285^T, were tested for induction of metronidazole resistance. For this purpose,
15 bacterial suspensions were inoculated on BBA plates containing metronidazole at increasing
16 concentration as previously described by Schaumann *et al.* (32). The susceptibility of colonies
17 growing at the highest concentration was determined using the agar dilution method. The
18 stability of resistance was evaluated by determining the MIC of metronidazole after three
19 consecutive subcultures on drug-free BBA. As described by Pelaez *et al.* (29), we considered
20 that the resistance was stable when the MIC of metronidazole against *Prevotella* spp. was
21 maintained (within ± 1 dilution) after the passages. Experiments were performed in duplicate.

22 **Nucleotide sequence accession numbers.** 16S rRNA and *nim* gene sequences of *P.*
23 *baroniae* isolates have been deposited in the GenBank database under accession numbers
24 FJ940875 to FJ940882 and FJ940883 to FJ940890, respectively.

25

RESULTS

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25

Of the 188 clinical isolates tested, 3 were found to be resistant to metronidazole after 48 h of incubation either by the agar dilution (LBN 464 and LBN 467) or by the Etest method (LBN 298) (Table 1). For 30 isolates, slow growing colonies were visualized inside the inhibition zone of the Etest strip after prolonged incubation. Colonies from within the inhibition zone were subcultured without antibiotic and retested by the agar dilution method to determine whether the MIC had changed from its original value. These sub-populations showed MICs ranging from 8 to 32 $\mu\text{g/ml}$.

PCR amplification with universal primers targeting *nim* genes yielded products of about 460 bp for seven clinical isolates. All of these strains were genotypically identified as *P. baroniae*. The same *nim* gene was amplified in *P. baroniae* DSM 16972^T. All *P. baroniae* strains tested were considered susceptible to metronidazole by the agar dilution method and the Etest method (Table 1). The distance matrix constructed using the Similarity table program of the PHYLIP package (13) showed that *P. baroniae* strains shared between 97.1 to 100% of their *nim* gene nucleotide positions. The *nim* gene detected in the *P. baroniae* type strain (FJ940883) showed the highest identity with *nimH* at 63.8% followed by *nimF* (63.2%), *nimD* (62.8%), *nimG* (62.5%), *nimC* (62.1%), *nimE* (61.7%), *nimA* (60.1%) and *nimB* (59.7%). This potentially new *nim* gene was named *nimI*. Predicted amino acid sequence alignment of NimI with homologs from other anaerobic bacteria showed that NimI formed a homogeneous group distinct from the other Nim types with which NimI exhibited 55.9 to 64.4% identity. Insertion elements that have been associated with *nim* genes (*IS1168*, *IS1169*, *IS1170*, *ISBf6* and *IS612*) (35, 37) were not found in *nimI*-positive strains except for the type strain in which *IS1168* was detected. However, PCR-mapping and sequencing showed that this sequence was not localized upstream of the *nimI* gene.

1 No plasmid was found in any of the *P. baroniae* isolates tested as well as in *B. fragilis*
2 BF8 whereas a *nimA*-carrying plasmid of about 7 to 8 kb was detected in *B. fragilis*
3 638R(pIP417), as expected (15). To determine the presence of *nimI* gene in chromosomal
4 DNA, hybridizations were performed with *nimA*, *B* and *I* gene probes on chromosomal blots
5 using *EcoRI*-digested DNA. No hybridization was found with any of the strains tested using
6 the *nimA* gene probe. A positive hybridization was observed for *B. fragilis* BF8 with the *nimB*
7 gene probe, and for all *P. baroniae* strains with the *nimI* gene probe. In all cases, only one
8 copy of the *nimI* gene was observed.

9 Experiments to detect whether metronidazole-resistant sub-populations could be
10 induced or selected in *nim*-positive ($n = 6$) or *nim*-negative ($n = 6$) *Prevotella* strains showed
11 that all isolates exhibited significantly enhanced MICs (8× to 256× the original MIC) after
12 several passages on plates containing raising concentrations of metronidazole (Table 2).
13 Induced resistance was stable in all strains after subculture in the absence of metronidazole
14 and also after storage and freezing. For *nimI*-positive strains, no differences in the *nim* gene
15 sequences were found in strains converting from metronidazole-susceptibility to
16 metronidazole-resistance.

DISCUSSION

1
2
3 Among the few studies examining the distribution of *nim* genes in *Prevotella* spp. (20,
4 23, 27), *nim*-positive *Prevotella* strains have been rarely found. Lubbe *et al.* (23) detected one
5 *nimA*-positive strain (*Prevotella bivia*) among seven strains screened while Katsandri *et al.*
6 (20) recovered one *nimC*-positive strain (*Prevotella oralis*) and two *nimE*-positive isolates (*P.*
7 *oralis*, *Prevotella buccalis*) among 57 isolates tested. In our study, no *nim* gene was amplified
8 in any of the 30 isolates exhibiting reduced susceptibility to metronidazole after 48 h of
9 incubation and/or presenting slow-growing resistant subpopulations. This suggests that for
10 these isolates other potential resistance mechanisms may exist, such as decreased
11 pyruvate:ferredoxin oxidoreductase activity, over-expression of efflux pumps or alterations of
12 the rhamnose catabolism pathway (7, 10, 28, 29, 31). On the other hand, a potentially novel
13 *nim* gene, *nimI*, was present and ‘silent’ in 7 of the 158 remaining clinical isolates for which
14 neither increased initial MICs nor slow-growing resistant populations were observed. For
15 *Bacteroides* spp., it has been reported that strains harbouring ‘silent’ *nim* genes may become
16 resistant to metronidazole after prolonged exposure to this antibiotic (14, 22) and that this
17 phenomenon may be a consequence of the activation of the *nim* gene as a result of point
18 mutations, insertion of an IS element promoter immediately upstream of the gene or the
19 formation of a new promoter following insertion (14, 37). In the present study, metronidazole
20 resistance could be selected after prolonged *in vitro* exposure to this drug in all *nim*-positive
21 *Prevotella* strains tested. The possibility that mutation within the *nimI* gene might have led to
22 conversion from silent to constitutive expression was ruled out by *nim* gene sequencing at
23 pre- and post-induction states. On the other hand, none of the known IS elements that have
24 been associated with *nim* genes were detected upstream of *nimI*. These findings are in
25 accordance with previous studies that have reported that *nim*-positive strains may be
26 metronidazole resistant in the absence of known activating IS elements (14, 20, 22). This

1 suggests that, as for other *nim* genes, the expression of *nimI* may be modulated by other
2 mechanisms than those related to the presence of IS elements although it cannot be ruled out
3 that new IS elements that are not recognized by the primers used may be involved.

4 In *Bacteroides* spp., it has been shown that exposure to metronidazole can select for
5 resistant sub-populations exhibiting either a non-stable phenotype that reverted to
6 susceptibility during growth in the absence of the antibiotic, or a constitutive phenotype that
7 remained resistant after removal of the drug (14, 22, 32). In the present study, metronidazole
8 resistance could be selected and remained stable in both *nim*-positive and *nim*-negative
9 *Prevotella* strains tested as well as in *B. fragilis* ATCC 25285^T. Other authors have also
10 shown that metronidazole resistant mutants may be selected from *nim*-negative *Bacteroides*
11 spp. isolates, including the *B. fragilis* type strain (7, 32). In contrast, Gal and Brazier (14) as
12 well as Löfmark *et al.* (22) did not observe any selection of resistant mutants when *nim*-
13 negative *Bacteroides* isolates were tested. Possible reasons for the discrepancies between
14 these studies can be attributed, at least partially, to the use of different protocols for the
15 selection of metronidazole-resistant sub-populations. It has been reported that selection of
16 microbial sub-populations that are resistant to the therapy administered may lead to treatment
17 failure in infections caused by different bacterial species including *Prevotella* spp. (12, 24, 25,
18 29). Furthermore, Diniz *et al.* have also shown that *in vivo* selection of resistant *Bacteroides*
19 isolates by low doses of metronidazole may lead to enhanced pathogenicity (6). In the present
20 study, the review of charts of patients with *P. baroniae* infection revealed that for the only
21 patient who was treated with metronidazole, treatment failure was not observed. However, no
22 conclusion can be drawn from this observation since this patient also received another active
23 antibiotic. Treatment failure with metronidazole was observed in two patients infected with
24 *nim*-negative *Prevotella* isolates, LBN 293b (*Prevotella nanceiensis*) and LBN 465 (*P.*
25 *buccae*), which were both initially considered susceptible to metronidazole. High level
26 metronidazole resistance could be induced in both strains while slow-growing subpopulations

1 within the inhibition zone of the Etest strip were only observed for LBN 293b. This strain was
2 isolated from blood cultures (25) while LBN 465 was recovered from pancreatic necrotic
3 tissue in a patient suffering from acute pancreatitis. For this patient, who remained febrile
4 while being treated with metronidazole and was reoperated, a metronidazole-resistant *P.*
5 *buccae* isolate (MIC, 32 µg/ml) was obtained from a surgical drainage sample. This strain
6 exhibited the same pulse-field gel electrophoresis pattern than LBN 465 after DNA digestion
7 performed by using *Xba*I (data not shown). The patient became afebrile after metronidazole
8 was changed to imipenem. Thus, *in vivo* selection of a resistant subpopulation, which was
9 responsible for treatment failure, was demonstrated and corroborated the previous observation
10 that the initial isolate became resistant after prolonged *in vitro* exposure to metronidazole.

11 It is noteworthy that *nimI* was found in all *P. baroniae* isolates tested including the
12 type strain originating from the UK (8) and clinical isolates obtained in two geographically
13 distant sites in France. *NimI* was also recently detected in two other *P. baroniae* clinical
14 strains isolated in our laboratory whereas this gene was not detected in 33 type strains
15 belonging to other *Prevotella* species. Moreover, a phylogenetic tree based on *Nim* amino
16 acid sequences showed that *NimI* formed a new homogeneous group distant from the other
17 *Nim* types involved in metronidazole resistance in anaerobic bacteria (data not shown). These
18 results, associated with the fact that *nimI* had a chromosomal localization, suggest that this
19 gene might be intrinsic in *P. baroniae*. However, further studies including a larger number of
20 strains are needed to confirm this hypothesis. It is interesting to note that 16S rRNA gene
21 sequencing was necessary to unambiguously identify all *P. baroniae* strains, suggesting that
22 the clinical implication of this species might be under-estimated since molecular identification
23 is not widely used in routine clinical laboratories.

24 In conclusion, this study led to the description of a new *nim* gene, which seems to be
25 intrinsic to the species *P. baroniae*, and underscores the importance of a correct identification
26 at the species level, at least for isolates responsible for severe infections. Moreover, we

1 showed for the first time that subpopulations exhibiting high level resistance to metronidazole
2 can be selected from both silent *nimI*-positive and *nim*-negative *Prevotella* spp. isolates after
3 prolonged exposure to this antibiotic. These findings not only confirm that *nim* genes are not
4 the only factors involved in the decreased susceptibility of *Prevotella* spp. to metronidazole,
5 but also emphasize the importance of careful susceptibility testing of anaerobes and the
6 usefulness of 16Sr DNA-based identification methods, especially in case of severe infections
7 or treatment failures.
8

ACKNOWLEDGMENTS

1

2

3 We are very grateful to Dr J. S6ki for kindly supplying the reference strains
4 *B. thetaiotaomicron* BT13 (*nimC*, IS1170), *B. fragilis* BF388 (*nimE*, ISBf6) and *B. fragilis*
5 BF6712 (IS612) used as positive controls. We thank I. Scholtus, M.R. Balland, C. Nicolas,
6 and A.M. Carpentier for technical assistance.

REFERENCES

- 1
2
3 1. **Alauzet, C., F. Mory, J. P. Carlier, H. Marchandin, E. Jumas-Bilak, and A.**
4 **Lozniewski.** 2007. *Prevotella nanceiensis* sp. nov., isolated from human clinical
5 samples. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**:2216-2220.
- 6 2. **Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and**
7 **D. J. Lipman.** 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein
8 database search programs. *Nucleic. Acids. Res.* **25**:3389-3402.
- 9 3. **Behra-Miellet, J., L. Dubreuil, and L. Calvet.** 2006. Evaluation of the in vitro
10 activity of ertapenem and nine other comparator agents against 337 anaerobic bacteria.
11 *Int. J. Antimicrob. Agents* **28**:25-35.
- 12 4. **Carlier, J. P., N. Sellier, M. N. Rager, and G. Reysset.** 1997. Metabolism of a 5-
13 nitroimidazole in susceptible and resistant isogenic strains of *Bacteroides fragilis*.
14 *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:1495-1499.
- 15 5. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** 2007. Methods for antimicrobial
16 susceptibility testing of anaerobic bacteria. Approved standard, M11-A7., 7th ed.
17 Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa.
- 18 6. **Diniz, C. G., R. M. Arantes, D. C. Cara, F. L. Lima, J. R. Nicoli, M. A. R.**
19 **Carvalho, and L. M. Farias.** 2003. Enhanced pathogenicity of susceptible strains of
20 the *Bacteroides fragilis* group subjected to low doses of metronidazole. *Microbes*
21 *Infect.* **5**:19-26.
- 22 7. **Diniz, C. G., L. M. Farias, M. A. R. Carvalho, E. R. Rocha, and C. J. Smith.** 2004.
23 Differential gene expression in a *Bacteroides fragilis* metronidazole-resistant mutant.
24 *J. Antimicrob. Chemother.* **54**:100-108.

- 1 8. **Downes, J., I. Sutcliffe, A. C. R. Tanner, and W. G. Wade.** 2005. *Prevotella*
2 *marshii* sp. nov. and *Prevotella baroniae* sp. nov., isolated from the human oral
3 cavity. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**:1551-1555.
- 4 9. **Dublanchet, A.** 1990. *Bacteroides* de sensibilité réduite au métronidazole. *Méd. Mal.*
5 *Infect.* **20** (HS):113-116.
- 6 10. **Edwards, D. I.** 1993. Nitroimidazole drugs-action and resistance mechanisms. II.
7 Mechanisms of resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* **31**:201-210.
- 8 11. **European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST).**
9 Clinical Breakpoints and Epidemiological Cut-Off values: Metronidazole – EUCAST
10 clinical MIC breakpoints 2008-06-19 (v 2.2).
11 [<http://www.srga.org/eucastwt/MICTAB/MICmiscellaneous.html>]
- 12 12. **Falagas, M. E., G. C. Makris, G. Dimopoulos, and D. K. Matthaiou.** 2008.
13 Heteroresistance: a concern of increasing clinical significance? *Clin. Microbiol. Infect.*
14 **14**:101-104.
- 15 13. **Felsenstein, J.** 1993. PHYLIP (phylogeny inference package), version 3.5c.
16 Distributed by the author. Department of Genome Sciences, University of
17 Washington, Seattle.
- 18 14. **Gal, M., and J. S. Brazier.** 2004. Metronidazole resistance in *Bacteroides* spp.
19 carrying *nim* genes and the selection of slow-growing metronidazole-resistant mutants.
20 *J. Antimicrob. Chemother.* **54**:109-116.
- 21 15. **Haggoud, A., G. Reysset, H. Azeddoug, and M. Sebald.** 1994. Nucleotide sequence
22 analysis of two 5-nitroimidazole resistance determinants from *Bacteroides* strains and
23 of a new insertion sequence upstream of the two genes. *Antimicrob. Agents*
24 *Chemother.* **38**:1047-1051.
- 25 16. **Hecht, D. W.** 2004. Prevalence of antibiotic resistance in anaerobic bacteria:
26 worrisome developments. *Clin. Infect. Dis.* **39**:92-97.

- 1 17. **Holdeman, L. V., E. P. Cato, and W. E. C. Moore.** 1977. Anaerobe laboratory
2 manual, 4th ed. Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, Va.
- 3 18. **Jamal, W. Y., V. O. Rotimi, J. S. Brazier, M. Johny, W. M. Wetieh, and B. I.**
4 **Duerden.** 2004. Molecular characterization of nitroimidazole resistance in
5 metronidazole-resistant *Bacteroides* species isolated from hospital patients in Kuwait.
6 Med. Princ. Pract. **13**:147-152.
- 7 19. **Jousimies-Somer, H., P. Summanen, D. M. Citron, E. J. Baron, H. M. Wexler,**
8 **and S. M. Finegold.** 2002. Wadsworth - KTL anaerobic bacteriology manual, 6th ed.
9 Star Publishing, Belmont Co., Calif.
- 10 20. **Katsandri, A., A. Avlami, A. Pantazatou, D. P. Houhoula, and J.**
11 **Papaparaskevas.** 2006. Dissemination of *nim*-class genes, encoding nitroimidazole
12 resistance, among different species of Gram-negative anaerobic bacteria isolated in
13 Athens, Greece. J. Antimicrob. Chemother. **58**:705-706.
- 14 21. **Kumar, S., K. Tamura, I. B. Jakobsen, and M. Nei.** 2001. MEGA2: molecular
15 evolutionary genetics analysis software. Bioinformatics **17**:1244-1245.
- 16 22. **Löfmark, S., H. Fang, M. Hedberg, and C. Edlund.** 2005. Inducible metronidazole
17 resistance and *nim* genes in clinical *Bacteroides fragilis* group isolates. Antimicrob.
18 Agents Chemother. **49**:1253-1256.
- 19 23. **Lubbe, M. M., K. Stanley, and L. J. Chalkley.** 1999. Prevalence of *nim* genes in
20 anaerobic/facultative anaerobic bacteria isolated in South Africa. FEMS Microbiol.
21 Lett. **172**:79-83.
- 22 24. **Moore, M. R., F. Perdreau-Remington, and H. F. Chambers.** 2003. Vancomycin
23 treatment failure associated with heterogeneous vancomycin-intermediate
24 *Staphylococcus aureus* in a patient with endocarditis and in the rabbit model of
25 endocarditis. Antimicrob. Agents Chemother. **47**:1262-1266.

- 1 25. Mory, F., J. P. Carlier, C. Alauzet, M. Thouvenin, H. Schuhmacher, and A.
2 Lozniewski. 2005. Bacteremia caused by a metronidazole-resistant *Prevotella* sp.
3 strain. J. Clin. Microbiol. **43**:5380-5383.
- 4 26. Papaparaskevas, J., A. Pantazatou, A. Katsandri, D. P. Houhoula, N. J. Legakis,
5 A. Tsakris, and A. Avlami. 2008. Moxifloxacin resistance is prevalent among
6 *Bacteroides* and *Prevotella* species in Greece. J. Antimicrob. Chemother. **62**:137-141.
- 7 27. Papaparaskevas, J., A. Pantazatou, A. Katsandri, N. J. Legakis, and A. Avlami.
8 2005. Multicentre survey of the in-vitro activity of seven antimicrobial agents,
9 including ertapenem, against recently isolated Gram-negative anaerobic bacteria in
10 Greece. Clin. Microbiol. Infect. **11**:820-824.
- 11 28. Patel, E. H., L. V. Paul, A. I. Casanueva, S. Patrick, and V. R. Abratt. 2009.
12 Overexpression of the rhamnose catabolism regulatory protein, RhaR: a novel
13 mechanism for metronidazole resistance in *Bacteroides thetaiotaomicron*. J.
14 Antimicrob. Chemother. [Epub ahead of print]
- 15 29. Peláez, T., E. Cercenado, L. Alcalá, M. Marín, A. Martín-López, J. Martínez-
16 Alarcón, P. Catalán, M. Sánchez-Somolinos, and E. Bouza. 2008. Metronidazole
17 resistance in *Clostridium difficile* is heterogeneous. J. Clin. Microbiol. **46**:3028-3032.
- 18 30. Podglajen, I., J. Breuil, and E. Collatz. 2005. Anaerobes, p. 340-348. In D. G.
19 White, M. N. Aleshun, and P. F. McDermott (ed.), Frontiers in antimicrobial
20 resistance. ASM Press, Washington, DC.
- 21 31. Pumbwe, L., D. Glass, and H. M. Wexler. 2006. Efflux pump overexpression in
22 multiple-antibiotic-resistant mutants of *Bacteroides fragilis*. Antimicrob. Agents
23 Chemother. **50**:3150-3153.
- 24 32. Schaumann, R., S. Petzold, M. Fille, and A. C. Rodloff. 2005. Inducible
25 metronidazole resistance in *nim*-positive and *nim*-negative *Bacteroides fragilis* group

- 1 strains after several passages on metronidazole containing columbia agar plates.
2 Infection **33**:368-372.
- 3 33. **Shah, H. N., and D. M. Collins.** 1990. *Prevotella*, a new genus to include
4 *Bacteroides melaninogenicus* and related species formerly classified in the genus
5 *Bacteroides*. Int. J. Syst. Bacteriol. **40**:205-208.
- 6 34. **Sóki, J., E. Fodor, D. W. Hecht, R. Edwards, V. O. Rotimi, I. Kerekes, E. Urbán,**
7 **and E. Nagy.** 2004. Molecular characterization of imipenem-resistant, *cfiA*-positive
8 *Bacteroides fragilis* isolates from the USA, Hungary and Kuwait. J. Med. Microbiol.
9 **53**:413-419.
- 10 35. **Sóki, J., M. Gal, J. S. Brazier, V. O. Rotimi, E. Urbán, E. Nagy, and B. I.**
11 **Duerden.** 2006. Molecular investigation of genetic elements contributing to
12 metronidazole resistance in *Bacteroides* strains. J. Antimicrob. Chemother. **57**:212-
13 220.
- 14 36. **Theron, M. M., M. N. Janse Van Rensburg, and L. J. Chalkley.** 2004.
15 Nitroimidazole resistance genes (*nimB*) in anaerobic Gram-positive cocci (previously
16 *Peptostreptococcus* spp.). J. Antimicrob. Chemother. **54**:240-242.
- 17 37. **Trinh, S., A. Haggoud, G. Reysset, and M. Sebald.** 1995. Plasmids pIP419 and
18 pIP421 from *Bacteroides*: 5-nitroimidazole resistance genes and their upstream
19 insertion sequence elements. Microbiology **141** (Pt 4):927-935.
- 20 38. **Trinh, S., and G. Reysset.** 1996. Detection by PCR of the *nim* genes encoding 5-
21 nitroimidazole resistance in *Bacteroides* spp. J. Clin. Microbiol. **34**:2078-2084.
22
23

1 TABLE 1. MICs of metronidazole for *nimI*-positive strains and *nim*-negative strains
 2 exhibiting reduced susceptibility to metronidazole

Strain ^a	Presence of <i>nim</i> gene	MIC determined by agar dilution ($\mu\text{g/ml}$)		
		original	SGC ^b	
<i>P. baroniae</i>	DSM 16972 ^T	+	2	NA ^c
	LBN 427	+	4	NA ^c
	LBN 430	+	4	NA ^c
	LBN 432	+	2	NA ^c
	LBN 466	+	2	NA ^c
	LBN 475	+	4	NA ^c
	LBP 9	+	2	NA ^c
	LBP 19	+	1	NA ^c
<i>P. bivia</i>	LBN 330	-	2	16
	LBN 331	-	2	16
	LBN 332	-	4	32
	LBN 333	-	2	32
	LBN 334	-	2	16
	LBN 336	-	2	32
	LBN 339	-	2	16
	LBN 343	-	1	16
	LBN 346	-	1	16
	LBN 350	-	2	16
	LBN 361	-	2	32
	LBN 365	-	4	8
	LBN 371	-	4	32
	LBN 374	-	2	8
	LBN 445	-	0.5	16
	LBN 464	-	8	16
	LBN 467	-	16	32
	LBN 478	-	4	8
	LBP 4	-	2	32
	LBP 38	-	2	8
LBP 51	-	2	32	
LBP 52	-	4	16	
LBP 65	-	4	32	
LBP 69	-	2	8	
LBP 78	-	4	8	
<i>P. nanceiensis</i>	LBN 293b	-	2	32
	LBN 297	-	2	16
	LBN 298 ^d	-	4	32
	LBN 410	-	1	32
	LBP 66	-	2	8

3 ^a LBN, Laboratoire de Bactériologie de Nancy; LBP, Laboratoire de Bactériologie de Poitiers.

4 ^b SGC: slow growing colonies within the inhibition zone of the Etest strip.

5 ^c NA: not applicable (absence of slow growing colonies).

6 ^d Strain with reduced susceptibility to metronidazole as determined at 48 h by the Etest method (MIC, 16 $\mu\text{g/ml}$).

1 TABLE 2. Induction and stability of resistance to metronidazole in 11 clinical *Prevotella*
 2 isolates, *P. baroniae* DSM 16972^T and *B. fragilis* ATCC 25285^T

Strain (<i>nimI</i> gene) ^a	MIC (μg/ml)		
	original	post-induction	post-stability
<i>P. baroniae</i> DSM 16972 ^T (+)	2	16	16
<i>P. baroniae</i> LBN 427 (+)	4	128	128
<i>P. baroniae</i> LBN 430 (+)	4	128	128
<i>P. baroniae</i> LBN 432 (+)	2	64	64
<i>P. baroniae</i> LBN 475 (+)	4	256	256
<i>P. baroniae</i> LBP19 (+)	1	128	128
<i>P. bivia</i> LBN 332 (-)	4	>256	>256
<i>P. bivia</i> LBN 371 (-)	4	>256	>256
<i>P. bivia</i> LBN 467 (-)	16	>256	>256
<i>P. buccae</i> LBN 465 (-)	0.5	128	64
<i>P. nanceiensis</i> LBN 293b (-)	2	256	256
<i>P. nanceiensis</i> LBN 410 (-)	1	256	256
<i>B. fragilis</i> ATCC 25285 ^T (-)	0.5	256	128

^a + : positive ; - : negative.

3

4

5

6

7

8

Une classification et une nomenclature fiables et actualisées sont indispensables pour identifier et différencier les microorganismes pathogènes chez l'homme. Ces dernières années ont vu la création de nombreux nouveaux taxons bactériens ainsi que la reclassification d'espèces ou de genres déjà connus, notamment au sein des bactéries anaérobies. Afin de clarifier la position taxonomique de certains groupes de bactéries anaérobies pour lesquelles des phénotypes de résistance aux antibiotiques inhabituels étaient observés, une approche taxonomique mixte et consensuelle associant l'analyse de marqueurs phénotypiques, génotypiques, génomiques et phylogénétiques a été utilisée. Dans un premier temps, cette approche a été appliquée à des bactéries présentant un bas niveau de résistance à la vancomycine et appartenant aux *Clostridiaceae*, famille en plein remaniement taxonomique. Les résultats obtenus ont abouti à la description d'une nouvelle espèce de *Tissierella* et d'un nouveau genre, *Flavonifactor*, qui résulte du regroupement de deux espèces préexistantes. Appliquée dans le cadre d'une étude sur la résistance au métronidazole chez *Prevotella* spp., cette approche a conduit, dans un deuxième temps, à la découverte d'une nouvelle espèce, *Prevotella nanceiensis*, dont la résistance au métronidazole a été impliquée dans un échec thérapeutique. Un nouveau gène (*nimI*) codant une nitroimidazole réductase et *a priori* intrinsèque à l'espèce *Prevotella baroniae* a également été décrit. Ce travail souligne l'importance d'une taxonomie claire et fiable en bactériologie médicale et l'intérêt d'une approche mixte et consensuelle en taxonomie bactérienne.

MOTS CLES : Taxonomie mixte et consensuelle, bactéries anaérobies, *Clostridiaceae*, *Prevotella*, résistance.

A reliable and up to date taxonomy is essential to unambiguously identify and differentiate human pathogenic microorganisms. Numerous new bacterial taxa have been created over the last years, meanwhile already known species or genus were reclassified, particularly concerning anaerobic bacteria. To clarify the taxonomic position of specific anaerobic bacteria displaying unusual antibiotic resistance, a polyphasic taxonomic approach combining the analysis of phenotypic, genotypic and phylogenetic markers has been used. This approach has been first applied to bacteria displaying low level resistance to vancomycin and belonging to the *Clostridiaceae* family. It resulted in the description of a new species of *Tissierella* as well as a new genus, *Flavonifactor* sp., which arises from the combination of two pre-existing species. Applied in a second time in a study on metronidazole resistance in *Prevotella* spp., this approach led to the discovery of a new species, *Prevotella nanceiensis*, the resistance of which to metronidazole has been implicated in therapeutic failure. A new gene (*nimI*) coding a nitroimidazole reductase that seems to be intrinsic to the species *Prevotella baroniae* has also been described. This study emphasizes the importance of a clear and reliable taxonomy in medical bacteriology as well as the benefit of a polyphasic approach in taxonomy.

KEYWORDS : Polyphasic taxonomy, anaerobes, *Clostridiaceae*, *Prevotella*, resistance.