

50376
1985
75

50376
1985
75

UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE I

Année Universitaire 1984-1985

N° d'ordre : 1267

THÈSE

présentée pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE TROISIÈME CYCLE

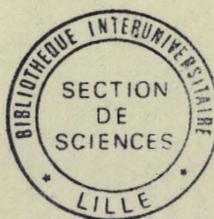
Discipline : **Biochimie**

soutenue le 27 Juin 1985

par

BEJI AMOR

ÉTUDE DE L'ESPÈCE *ESCHERICHIA ADECARBOXYLATA* PAR HYBRIDATION ADN / ADN



Membres du Jury : M. GUILLAUME, Président
M. IZARD, Rapporteur
M. LECLERC, Examineur
M. KREMBEL, Examineur

DOYENS HONORAIRES DE L'ANCIENNE FACULTE DES SCIENCES

MM. H. LEFEBVRE, M. PARREAU.

PROFESSEURS HONORAIRES DES ANCIENNES FACULTES DE DROIT
ET SCIENCES ECONOMIQUES, DES SCIENCES ET DES LETTRES

MM. ARNOULT, Mme BEAUJEU, BONTE, BROCHARD, CHAPPELON, CHAUDRON, CORDONNIER, DECUYPER, DEHEUVELS, DEHORS, DION, FAUVEL, FLEURY, P. GERMAIN, GLACET, GONTIER, KOURGANOFF, LAMOTTE, LASSERRE, LELONG, Mme LELONG, LHOMME, LIEBAERT, MARTINOT-LAGARDE, MAZET, MICHEL, PEREZ, ROIG, ROSEAU, ROUELLE, SCHILTZ, SAVARD, ZAMANSKI.

PROFESSEUR EMERITE

M. A. LEBRUN.

ANCIENS PRESIDENTS DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET
TECHNIQUES DE LILLE

MM. M. PARREAU, J. LOMBARD, M. MIGEON.

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DE LILLE

M. J. CORTOIS.

PROFESSEURS - CLASSE EXCEPTIONNELLE

M. CONSTANT Eugène	Electronique
M. FOURET René	Physique du Solide
M. GABILLARD Robert	Electronique
M. MONTREUIL Jean	Biochimie
M. PARREAU Michel	Analyse
M. TRIDOT Gabriel	Chimie appliquée
M. VIVIER Emile	Biologie cellulaire
M. WERTHEIMER Raymond	Physique atomique et moléculaire

PROFESSEURS - 1ère CLASSE

M. BACCHUS Pierre	Astronomie
M. BEAUFILS Jean Pierre	Chimie physique
M. BIAYS Pierre	Géographie
M. BILLARD Jean	Physique du solide
M. BOILLY Bénoni	Biologie

M. BOUGHON Pierre	Algèbre
M. BOURIQUET Robert	Biologie Végétale
M. BREZINSKI Claude	Analyse numérique
M. CELET Paul	Géologie générale
M. CHAMLEY Hervé	Géotechnique
M. COEURE Gérard	Analyse
M. CORDONNIER Vincent	Informatique
M. DEBOURSE Jean Pierre	Gestion des entreprises
M. DYMENT Arthur	Mécanique
M. ESCAIG Bertrand	Physique du solide
M. FAURE Robert	Mécanique
M. FOCT Jacques	Métallurgie
M. GRANELLE Jean Jacques	Sciences Economiques
M. GRUSON Laurent	Algèbre
M. GUILLAUME Jean	Microbiologie
M. HECTOR Joseph	Géométrie
M. LABLACHE-COMBIER Alain	Chimie organique
M. LACOSTE Louis	Biologie végétale
M. LAVEINE Jean-Pierre	Paléontologie
M. LEHMANN Daniel	Géométrie
Mme LENOBLE Jacqueline	Physique atomique et moléculaire
M. LHOMME Jean	Chimie organique biologique
M. LOMBARD Jacques	Sociologie
M. LOUCHEUX Claude	Chimie physique
M. LUCQUIN Michel	Chimie physique
M. MAILLET Pierre	Sciences économiques
M. MIGNOT Fulbert	Analyse numérique
M. PAQUET Jacques	Géologie générale
M. PROUVOST Jean	Minéralogie
M. ROUSSEAU Jean-Paul	Physiologie animale
M. SALMER Georges	Electronique
M. SEGUIER Guy	Electrotechnique
M. SIMON Michel	Sociologie
M. STANKIEWICZ François	Sciences économiques
M. TILLIEU Jacques	Physique théorique
M. VIDAL Pierre	Automatique
M. ZEYTOUNIAN Radyadour	Mécanique

PROFESSEURS - 2ème Classe

M. ANTOINE Philippe	Analyse
M. BART André	Biologie animale
Mme BATTIAU Yvonne	Géographie
M. BEGUIN Paul	Mécanique
M. BELLET Jean	Physique atomique et moléculaire
M. BERZIN Robert	Analyse
M. BKOUCHE Rudolphe	Algèbre
M. BODARD Marcel	Biologie végétale
M. BOSCOQ Denis	Probabilités
M. BRASSELET Jean-Paul	Géométrie et topologie

M. BRUYELLE Pierre	Géographie
M. CAPURON Alfred	Biologie animale
M. CARREZ Christian	Informatique
M. CAYATTE Jean-Louis	Sciences économiques
M. CHAPOTON Alain	Electronique
M. COQUERY Jean-Marie	Psychophysiologie
Mme CORSIN Paule	Paléontologie
M. CORTOIS Jean	Physique nucléaire et corpusculaire
M. COUTURIER Daniel	Chimie organique
M. CROSNIER Yves	Electronique
M. CURGY Jean-Jacques	Biologie
Mlle DACHARRY Monique	Géographie
M. DAUCHET Max	Informatique
M. DEBRABANT Pierre	Géologie appliquée
M. DEGAUQUE Pierre	Electronique
M. DELORME Pierre	Physiologie animale
M. DELORME Robert	Sciences économiques
M. DE MASSON D'AUTUME Antoine	Sciences économiques
M. DEMUNTER Paul	Sociologie
M. DENEL Jacques	Informatique
M. DE PARIS Jean-Claude	Analyse
Mlle DESSAUX Odile	Spectroscopie de la réactivité chimique
M. DEVRAINNE Pierre	Chimie minérale
M. DHAINAUT André	Biologie animale
Mme DHAINAUT Nicole	Biologie animale
M. DORMARD Serge	Sciences économiques
M. DOUKHAN Jean-Claude	Physique du solide
M. DUBOIS Henri	Spectroscopie hertzienne
M. DUBRULLE Alain	Spectroscopie hertzienne
M. DUBUS Jean-Paul	Spectrométrie des solides
M. DUPONT Christophe	Vie de la firme (I.P.A.)
M. FAKIR Sabah	Algèbre
M. FONTAINE Hubert	Dynamique des cristaux
M. FOUQUART Yves	Optique atmosphérique
M. FRONTIER Serge	Ecologie numérique
M. GAMBLIN André	Géographie urbaine, industrielle et démographie
M. GLORIEUX Pierre	Physique moléculaire et rayonnements atmosphériques
M. GOBLOT Rémi	Algèbre
M. GOSSELIN Gabriel	Sociologie
M. GOUDMAND Pierre	Chimie physique
M. GREGORY Pierre	I.P.A.
M. GREMY Jean-Paul	Sociologie
M. GREVET Patrick	Sciences économiques
M. GUILBAULT Pierre	Physiologie animale
M. HENRY Jean-Pierre	Génie mécanique
M. HERMAN Maurice	Physique spatiale
M. JACOB Gérard	Informatique
M. JACOB Pierre	Probabilités et statistiques
M. JACQUILLAT Bertrand	Gestion
M. JEAN Raymond	Biologie des populations végétales
M. JOFFRE Patrick	Vie de la firme (I.P.A.)
M. JOURNEL Gérard	Spectroscopie hertzienne

M. KREMBEL Jean	Biochimie
M. LANGRAND Claude	Probabilités et statistiques
M. LATTEUX Michel	Informatique
Mme LECLERCQ Ginette	Catalyse
M. LEFEVRE Christian	Pétrologie
Mlle LEGRAND Denise	Algèbre
Mlle LEGRAND Solange	Algèbre
Mme LEHMANN Josiane	Analyse
M. LEMAIRE Jean	Spectroscopie hertzienne
M. LE MAROIS Henri	Vie de la firme (I.P.A.)
M. LHENAFF René	Géographie
M. LOCQUENEUX Robert	Physique théorique
M. LOSFELD Joseph	Informatique
M. LOUAGE Francis	Electronique
M. MACKE Bruno	Physique moléculaire et rayonnements atmosphériques
M. MAIZIERES Christian	Automatique
M. MESSELYN Jean	Physique atomique et moléculaire
M. MESSERLIN Patrick	Sciences économiques
M. MONTEL Marc	Physique du solide
Mme MOUNIER Yvonne	Physiologie des structures contractiles
Mme N'GUYEN VAN CHI Régine	Géographie
M. PARSY Fernand	Mécanique
M. PASZKOWSKI Stéphan	Analyse numérique
Mlle PAUPARDIN Colette	Biologie physiologie végétales
M. PERROT Pierre	Chimie appliquée
M. PERTUZON Emile	Physiologie animale
M. PONSOLLE Louis	Chimie physique
M. PORCHET Maurice	Biologie animale
M. POVY Lucien	Automatique
M. RACZY Ladislav	Electronique
M. RAOULT Jean-François	Géologie structurale
M. RICHARD Alain	Biologie animale
M. RIETSCH François	Physique des polymères
M. ROBINET Jean-Claude	E.U.D.I.L.
M. ROGALSKI Marc	Analyse
M. ROY Jean-Claude	Psychophysiologie
M. SCHAMPS Joël	Spectroscopie moléculaire
Mme SCHWARZBACH Yvette	Géométrie
M. SLIWA Henri	Chimie organique
M. SOMME Jean	Géographie
Mlle SPIK Geneviève	Biochimie
M. STAROSWIECKI Marcel	Informatique
M. STERBOUL François	Informatique
M. TAILLIEZ Roger	Génie alimentaire
Mme TJOTTA Jacqueline	Mathématiques
M. TOULOTTE Jean-Marc	Automatique
M. TURREL Georges	Spectrochimie infrarouge et Raman
M. VANDORPE Bernard	Chimie minérale
M. VAST Pierre	Chimie inorganique
M. VERBERT André	Biochimie
M. VERNET Philippe	Génétique
M. WALLART Francis	Spectrochimie infrarouge et Raman
M. WARTEL Michel	Chimie inorganique
M. WATERLOT Michel	Géologie générale
Mme ZINN Justin Nicole	Algèbre

A la mémoire de mes parents,

Ils ont été pour moi, le meilleur exemple de courage et de lutte contre l'adversité.

A mon épouse Yasmina,

Elle m'a toujours soutenu dans les circonstances les plus difficiles. Sans son dévouement, sa patience et sa compréhension, cette thèse n'aurait jamais pu être réalisée.

A mes enfants Cherifa et Anouar,

Ils m'ont toujours soutenu moralement et m'ont prodigué de nombreux encouragements.

A mes parents adoptifs Chedly et Yamna,

Ils m'ont toujours encouragé de leurs conseils bienveillants.

A tous les miens, à mes amis, en témoignage de mon affection.

A Monsieur le Professeur H. LECLERC,
Professeur de Bactériologie à la Faculté de Médecine de Lille,
Biologiste des Hôpitaux,
Directeur de l'unité INSERM 146,

Vous m'avez accueilli au sein de votre unité avec une grande
bienveillance.

Durant ces deux dernières années, vous m'avez constamment
soutenu moralement et matériellement. Sans votre soutien, je n'aurais jamais
pu mener à bien ce travail à propos d'un groupe de bactéries que vous avez
vous-mêmes caractérisé dès 1962.

Qu'il me soit permis de vous exprimer ma reconnaissance la
plus sincère.

A Monsieur le Docteur D. IZARD,

Chef de travaux à la Faculté de médecine de Lille,
Praticien des Hôpitaux.

Vous n'avez jamais ménagé vos efforts pour me prodiguer
conseils et soutien moral et matériel.

Chercheur passionné, avec un sens profondément humain, vous
avez stimulé ma curiosité et guidé mes premiers pas dans le domaine de la
recherche. Travailleur infatigable, vous m'avez appris à apprécier la ri-
gueur du travail bien fait.

Que cette thèse soit pour moi une occasion supplémentaire
de vous exprimer toute ma reconnaissance et ma profonde amitié.

A Monsieur le Professeur J. GUILLAUME,
Professeur de Microbiologie à l'Université des Sciences et
Techniques de Lille,
Directeur de l'U.E.R. des Sciences Agricoles et Alimentaires.

Vous m'avez accordé d'emblée votre confiance en acceptant
de présider le jury de cette thèse.

Malgré vos nombreuses responsabilités dans l'enseignement
et la recherche, vous avez porté de l'intérêt à ce modeste travail.

Veillez trouver, ici, l'expression de ma gratitude et de
mon profond respect.

A Monsieur le Professeur J. KREMBEL,

Professeur de biologie cellulaire et moléculaire à l'Université des Sciences et Techniques de Lille.

Vous avez accepté de parrainer ce travail avec tant de sympathie et de chaleur qu'il me serait difficile d'oublier votre courtoisie.

J'ai pu apprécier votre compétence et votre accueil profondément humain lorsque j'ai sollicité votre aide à propos de mises au point biochimiques.

C'est un grand honneur que vous me faites en siégeant dans ce jury de thèse.

Je vous exprime ma plus vive reconnaissance.

A Mademoiselle le Docteur F. Gavini,

Chargée de recherche à l'unité INSERM 146,

*Ce travail est issu de l'une de vos études d'analyse
numérique.*

*Vous n'avez jamais ménagé vos efforts pour m'intégrer au
sein de l'équipe de taxonomie et répondre à mes nombreuses questions.*

Qu'il me soit permis de vous exprimer ma reconnaissance.

A Monsieur E. DEWAILLY,

Technicien à l'unité INSERM 146,

Pour sa patience, son aide technique efficace et ses conseils judicieux.

Avec ma sincère amitié.

A tout le personnel technique de l'unité INSERM 146,

Vous avez apporté à des titres divers votre contribution à la réalisation de ce travail. Tous mes remerciements pour votre aide et votre souriante amitié.

TABLE DES MATIÈRES

	Page
CHAPITRE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	
TAXONOMIE DU GENRE ESCHERICHIA	1
A - L'ESPÈCE DANS LA FAMILLE DES ENTEROBACTERIACEAE.....	2
I - Phénotypie et génotypie	2
II - Définition de l'espèce dans la famille des <i>Enterobacteriaceae</i>	3
a) Le GC % (coefficient de CHARGAFF).....	3
b) L'hybridation ADN / ADN	4
c) Le profil d'éluion thermique	4
d) La taille du génome	6
III - Conclusion	8
B - LE GENRE ESCHERICHIA : Généralités et aspect nomenclatural	9
C - ESCHERICHIA COLI.....	11
I - Analyse génomique	11
II - Analyse phénotypique	13
D - ESCHERICHIA ALECARBOXYLATA	19
E - ESCHERICHIA BLATTAE.....	20
I - Historique	20
II - Analyse phénotypique	20
III - Origine des souches	24
IV - Discussion sur la position taxonomique	24

	Page
F - ESCHERICHIA HERMANII	25
I - Historique,.....	25
II - Analyse génomique	25
III - Analyse phénotypique	29
IV - Sensibilité aux antibiotiques,.....	33
V - Origine des souches	33
VI - Discussion sur la position taxonomique,.....	33
G - ESCHERICHIA VULNERIS	34
I - Historique	34
II - Analyse génomique	34
III - Analyse phénotypique	37
IV - Sensibilité aux antibiotiques.....	41
V - Origine des souches	41
VI - Discussion sur la position taxonomique.....	41
H - CONCLUSION	42
CHAPITRE II : OBJECTIFS DE L'ÉTUDE	43
CHAPITRE III : MATÉRIEL ET MÉTHODES	46
A - MATÉRIEL	47
I - Souches	47
II - Milieux de culture	63
III - Réactifs	64
B - MÉTHODES.....	66
I - Extraction de l'ADN froid	68

	Page
II - Marquage de l'ADN	70
III - Détermination du GC %	72
IV - Filtration	73
V - Fragmentation de l'ADN	78
VI - Courbe de compétition	80
VII - Hybridation	84
 CHAPITRE IV : RÉSULTATS	 86
A - HOMOGÉNÉITÉ GÉNOMIQUE DU GROUPE E ₅	87
B - RELATIONS GÉNOMIQUES ENTRE LE GROUPE E ₅ ET LES GROUPES PHÉNOTYPIQUES DE GAVINI ET COLL. (43)	89
C - RELATIONS GÉNOMIQUES ENTRE LE GROUPE E ₅ ET LES GROUPES GÉNOMIQUES DE BRENNER ET COLL. (20)	93
D - RELATIONS GÉNOMIQUES ENTRE LE GROUPE E ₅ ET LES DIFFÉRENTES ESPÈCES DE LA FAMILLE DES ENTEROBACTERIACEAE	95
 CHAPITRE V : DISCUSSION	 103
A - IDENTITÉ DU GROUPE E ₅ ET DE L'ESPÈCE ES. ADECARBOXYLATA	104
B - DÉFINITION PHÉNOTYPIQUE DE L'ESPÈCE ES. ADECARBOXYLATA	105
C - INDÉPENDANCE DE L'ESPÈCE ES. ADECARBOXYLATA ET DU COMPLEXE " ER. HERBICOLA - EN. AGGLOMERANS "	110
D - POSITION TAXONOMIQUE DE L'ESPÈCE ES. ADECARBOXYLATA	111

CHAPITRE VI : CONCLUSION.....	113
BIBLIOGRAPHIE	115

*" Research in applied science leads to reforms;
Research in pure science leads to revolution "*

Sir J.J. THOMSON (1856-1940).
Prix Nobel de Physique.

CHAPITRE I

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

TAXONOMIE DU GENRE ESCHERICHIA

A - L'ESPECE DANS LA FAMILLE DES ENTEROBACTERIACEAE

I . PHENOTYPIE ET GENOTYPIE

Dans la famille des *Enterobacteriaceae* , le génome complet comprend environ 3000 gènes et les études phénotypiques les plus exhaustives ne permettent d'explorer que 5 à 20 % du potentiel génétique d'une bactérie. (7). De plus, la phénotypie classique, telle qu'elle est pratiquée dans les études de taxonomie numérique, accorde une large prédominance aux caractères faciles à mettre en évidence tels que la présence d'enzymes ou l'utilisation des sucres. La considération plus particulière d'une catégorie de gènes dont le produit est facile à mettre en évidence prédomine sur les autres catégories de gènes, regroupant notamment les gènes codant pour la synthèse des macromolécules, ou encore ceux qui interviennent dans la reproduction ou les fonctions de régulation.

En fait, les sources d'erreur d'une définition uniquement phénotypique de l'espèce peuvent être regroupées en 6 rubriques selon BRENNER (7) :

1) Des enzymes différentes, codées par des gènes différents, peuvent catalyser la même réaction.

2) On peut observer la négativité d'une réaction alors que le gène est présent et fonctionnel. Ceci peut être le cas lorsque certains mécanismes de pénétration , de régulation ou de suppression sont impliqués.

3) Une réaction peut être négative alors que le gène est présent ; en effet, il suffit d'une mutation ponctuelle pour bloquer toute son activité.

4) La signification biologique du traitement mathématique utilisé en taxonomie numérique reste à expliciter. Un certain nombre d'étapes enzymatiques peuvent être impliquées dans une voie métabolique.

donnée. La détection du produit final implique que toutes les enzymes sont présentes, alors que l'absence de celui-ci peut être due à la perte d'une seule enzyme.

5) Certains caractères phénotypiques sont difficiles à mettre en évidence, simplement parce que la culture des souches est rendue difficile par la vitesse de croissance, la température d'incubation ou les facteurs de croissance. Cet argument est particulièrement vrai pour les bactéries des genres *Erwinia* et *Yersinia*.

6) La présence de plasmides codant pour des activités métaboliques rendant fluctuante toute définition phénotypique de l'espèce.

II. DEFINITION.

Finalement, seuls les critères génétiques permettent d'aboutir à une définition satisfaisante de l'espèce. D'après BRENNER (7, 8, 14, 19), 5 paramètres doivent être pris en considération : le GC % , l'hybridation ADN/ADN à 2 températures différentes (optimale 60° C et supra-optimale 75° C), le profil d'élu-tion thermique (caractérisé par le ΔT_m) et enfin, la taille du génome. Ce sont ces 5 paramètres que nous allons critiquer successivement.

a) Le GC % (coefficient de CHARGAFF)

Bien que ce caractère soit systématiquement mentionné lors de la description de toute nouvelle espèce d'*Enterobacteriaceae*, son importance discriminatoire au sein de cette famille apparaît très limitée (33, 34, 50, 52) ; en effet, à l'exception des genres *Proteus* et *Providencia* , toutes les *Enterobacteriaceae* ont un GC % compris entre 48 et 63 % avec des valeurs formant un continuum entre les différentes espèces.

La détermination du GC % a été exploitée au niveau de l'ancien genre *Proteus* (18) qui comprenait les espèces suivantes : *P. mirabilis* (GC % = 39,3% \pm 1,4), *P. vulgaris* (39,3 % \pm 1,2), *P. rettgeri* (39 % \pm 1,5) et *P. morgani* (50 % \pm 0,7). C'est sur cette base (confirmée par l'hybridation ADN/ADN) que BRENNER et coll. (18) ont proposé la création du genre *Morganella* avec l'espèce *M. morgani* (correspondant à l'ancienne espèce *P. morgani*).

b) L'hybridation ADN/ADN.

Après avoir étudié systématiquement toutes les espèces de la famille des *Enterobacteriaceae* décrites avant la mise au point des techniques d'hybridation (plus de 50 espèces étudiées), BRENNER et coll. (3, 4, 5, 6, 7, 8, 19) ont proposé le niveau minimal de 70% d'hybridation (à la température optimale de réassociation) pour que 2 souches appartiennent à la même espèce.

Le pourcentage d'hybridation diminue au fur et à mesure que l'on augmente la température au-dessus de la température optimale de réassociation (10, 12) qui est de 60° C pour les techniques à l'hydroxyapatite et à l'endonucléase S_1 . Cette diminution du pourcentage de réassociation est due à la sélection des hybrides les plus stables. C'est pour associer ce phénomène à la définition de l'espèce que BRENNER et coll. (19) proposent un niveau minimal de 55 % d'hybridation à 75° C pour que 2 souches appartiennent à la même espèce. Le taux minimal d'hybridation requis pour que 2 souches appartiennent à la même espèce est donc de 70 % à 60° C et de 55% à 75° C.

c) Le profil d'élution thermique :

. Rappel :

La stabilité des hybrides hétérologues peut être mesurée en les soumettant à une série de dénaturations sous l'action d'une augmentation progressive de la température (12). La température à laquelle 50% de l'ADN hybride est dénaturé correspond au $T_m(e)$ (température moyenne d'élution). Ce phénomène peut être représenté par le profil d'élution thermique

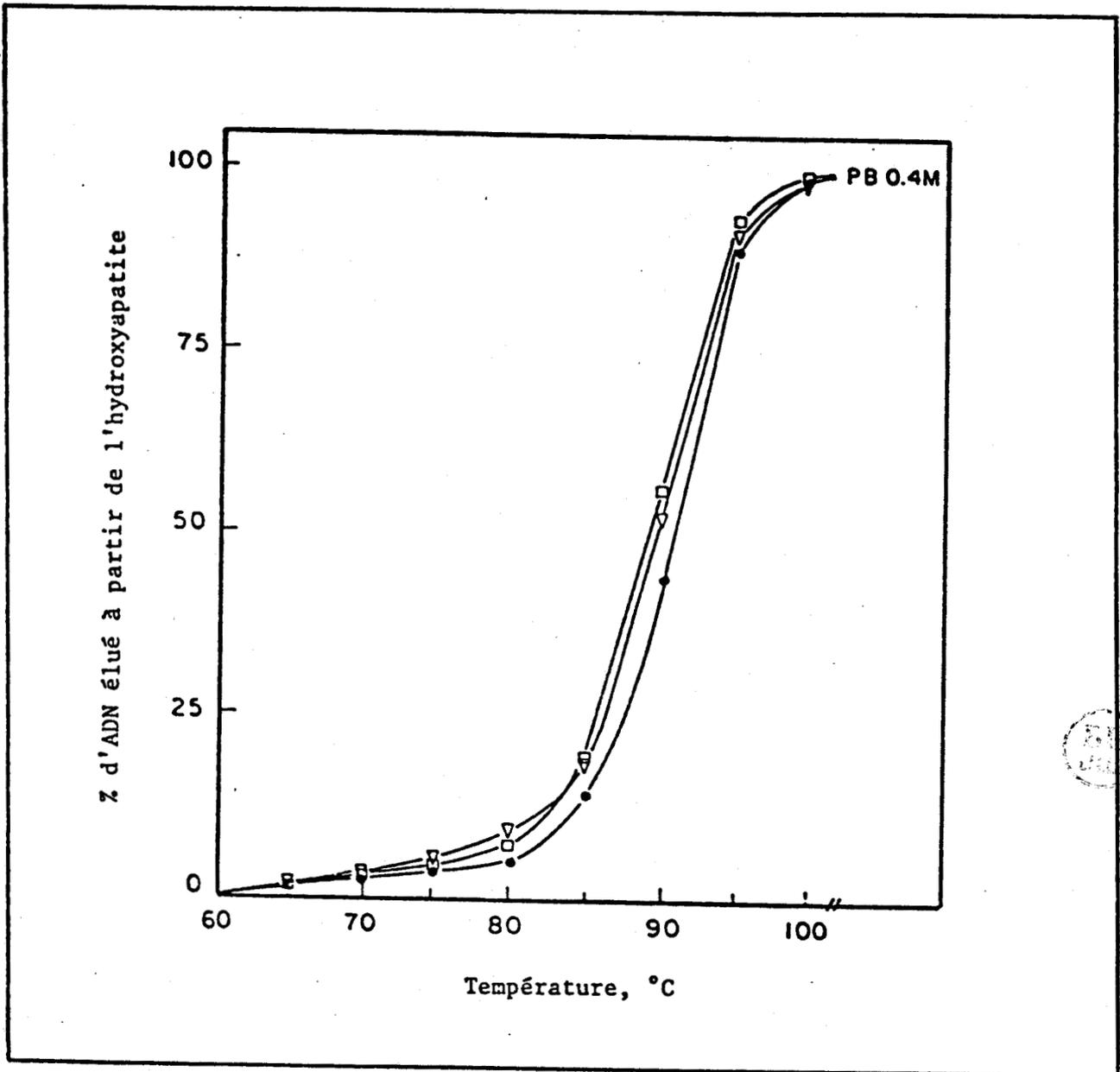


Figure 1

Exemples de profils d'élution thermique.

- *Salmonella ochsenzoll/S. ochsenzoll*
(= ADN de référence)
- *S. ochsenzoll/S. kralendyk*
(ADN hybride)
- ▲—▲ *S. ochsenzoll/Salmonella 41* : α_4 , α_{23} : -
(ADN hybride)

D'après STOLERU et coll. (73).

(figure 1) fondé sur la méthode des pourcentages cumulés ; on obtient alors une courbe sigmoïde.

La différence [$\Delta T_m = T_m$ (ADN de référence) - $T_m(e)$ (ADN hybride)] exprime le pourcentage de bases non appariées à l'intérieur de l'hybride (1, 22, 53, 55)

Application à la définition de l'espèce :

Pour BRENNER (8, 12), le profil d'éluion thermique complète les données de l'hybridation (obtenues à 60° C et à 75° C). Le ΔT_m correspondant au pourcentage de bases non appariées au sein de l'hybride ne devrait pas être supérieur à 6° C lorsque 2 souches appartiennent à la même espèce.

Le ΔT_m étant indépendant de la taille du génome, il s'agit d'un critère de choix particulièrement utile dans la définition de l'espèce.

d) La taille du génome:

. Rappel :

Le pourcentage d'hybridation s'exprime toujours en fonction de la longueur de l'ADN marqué. Si les 2 chromosomes ont la même longueur, celui-ci doit être identique quelque soit l'ADN marqué. Différentes mesures d'hybridation réciproque réalisées au sein des *Enterobacteriaceae* (14, 15, 16, 21, 25, 26, 68, 71) montrent qu'il n'en est pas toujours ainsi. L'illustration de ce phénomène est schématisée à la figure 2 . Ces résultats ont été confirmés par des mesures directes (14, 45, 68) réalisées à l'aide de la méthode de GILLIS, DE LEY et DE CLEENE (45) permettant la détermination du poids moléculaire de l'ADN à partir de l'étude cinétique de la réaction de renaturation. Cette technique, plus reproductible (28) est préférée à la technique antérieure mise au point par WETMUR et DAVIDSON (76).

. Application à la définition de l'espèce :

D'après GILLIS et coll. (45), la taille du génome n'est que très peu influencée par le stade de réplication. Les premières

études détaillées concernant la taille du génome chez les *Enterobacteriaceae* ont été réalisées à propos de l'espèce *Es. coli* (14). D'après BRENNER et coll. (14), la variation de la taille du génome au sein de cette espèce est comprise entre 2.10^9 et 3.10^9 daltons. Cette variation suit une distribution gaussienne. Bien que peu exploré jusqu'à présent, ce paramètre doit être pris en considération dans toute étude de taxonomie génétique.

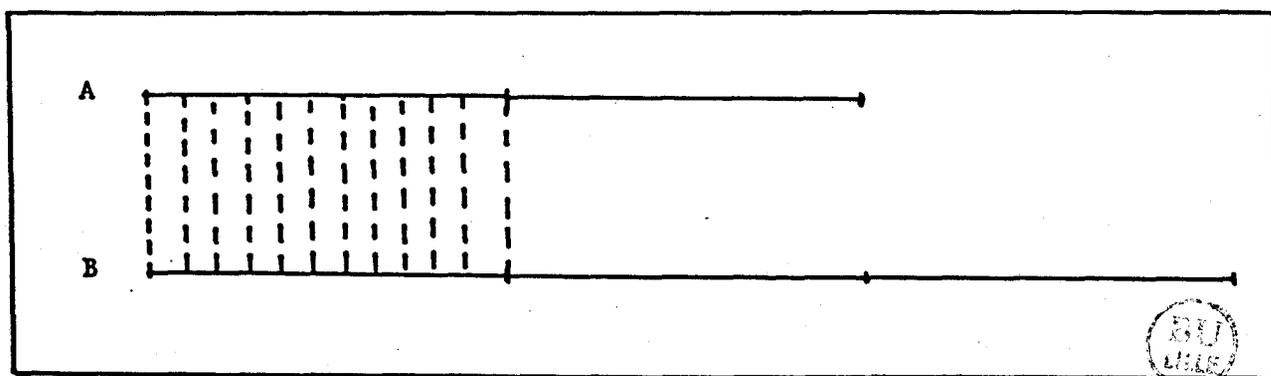


Figure 2

Illustration de la liaison entre l'hybridation réciproque et la
taille du génome

$$A^* \times B = 50\% ; B^* \times A = 33\%$$

* = ADN marqué.

III. CONCLUSION.

La définition moléculaire de BRENNER (7, 8, 19) fondée sur les 5 paramètres précédemment décrits représente une étape capitale en taxonomie des *Enterobacteriaceae* ; c'est le premier essai rationnel de définition de la *genospecies*. Actuellement, la seule espèce pour laquelle on connaisse tous les paramètres définis par BRENNER est *Es. coli* (tableau I) . Dans l'avenir, il est indubitable que la valeur de ces paramètres sera établie pour toutes les autres espèces.

- | |
|---|
| 1. GC % : 49 - 52 % |
| 2. Hybridation intraspécifique
à 60°C : 70 - 100 % |
| 3. Hybridation intraspécifique
à 75°C : > 60 % |
| 4. $\Delta T_m \leq 4^\circ\text{C}$ (4 % de bases non réassociées) |
| 5. Taille du génome : 2,3 à 3,0 x 10 ⁹ daltons |
- 

Tableau I

Définition de l'espèce *Es. coli* selon les paramètres génétiques proposés par BRENNER (7, 8).

B - LE GENRE ESCHERICHIA : GENERALITES ET ASPECT NOMENCLATORAL.

Le genre *Escherichia* a été créé en 1919 par CASTELLANI et CHALMERS (24). L'espèce type est *Es. coli* (MIGULA 1895 - CASTELLANI et CHALMERS 1919 , 24). Il est le genre type de la famille des *Enterobacteriaceae* (RAHN 1937 , 65) qui selon le code de la nomenclature (56) devrait être dénommée famille des *Escherichiaceae* (GOODFELLOWS et TRÜPER, 46).

L'espèce *Es. coli* est la plus fréquemment isolée en bactériologie médicale. Elle est considérée comme germe test de contamination fécale ; elle est à ce titre systématiquement recherchée au cours du contrôle de l'eau et des aliments. Sur le plan fondamental, elle a servi de substrat aux études de biochimie bactérienne, de génétique bactérienne et plus récemment encore à celles de biologie moléculaire et de génie génétique.

D'autres espèces ont été incluses dans le genre. Parmi elles deux figurent dans les " Approved Lists of Bacterial Names" (69) éditées en 1980. Il s'agit de *Es. adecarboxylata* (LECLERC - 1962,4) et de *Es. blattae* (BURGESS et coll., 1973 , 23). Ces 2 espèces sont mentionnées dans la IXème édition (1984) du BERGEY'S manual of systematic bacteriology (54).

Récemment, 2 autres espèces nouvelles , *Es. hermannii* (BRENNER et coll.-1982 , 11) et *Es. vulneris* (BRENNER et coll.-1982, 19) viennent d'être individualisées et classées dans le genre *Escherichia*. Ces dénominations ont été retenues dans la liste n° 10 de validation de noms nouveaux (" Validation of the publication of new names and new combinations previously effectively published outside the international journal of systematic bacteriology", 74).

Finalement, le genre *Escherichia* apparaît constitué de 5 espèces ; sa définition nomenclaturale est la suivante :

Escherichia (CASTELLANI et CHALMERS - 1919, 24), genre type de la famille des *Enterobacteriaceae*.

Es. coli (MIGULA-1895 , CASTELLANI et CHALMERS - 1919 , 24) , espèce type du genre. Souche type : ATCC^(a) 11775

Es. adecarboxylata (LECLERC - 1962, 57).

Souche type : ATCC 23216

Es. blattae (BURGESS, Mc DERMOTT, WHITING - 1973, 23).

Souche type : CDC^(b) 9005-74

Es. hermannii (BRENNER, DAVIS, STEIGERWALT, RIDDLE, Mc WHORTER,
ALLEN, FARMER, SAITCH, FANNING - 1982, 11).

Souche type : ATCC 33650 (= CDC 980-72).

Es. vulneris (BRENNER, Mc WHORTER, LEETE KNUTSON, STEIGERWALT -
1982, 19).

Souche type : ATCC 33821 (= CDC 875-72).

(a) ATCC : American Type Culture Collection, ROCKVILLE, Maryland 20852,
U.S.A.

(b) CDC : Center for Disease Control, ATLANTA, Georgia, U.S.A.

C - ESCHERICHIA COLI (CASTELLANI ET CHALMERS, 1919, 24)

L'espèce *Es. coli* est l'espèce type du genre *Escherichia*. C'est l'espèce la plus anciennement individualisée au sein de la famille des *Enterobacteriaceae*. Sa croissance rapide et ses exigences nutritionnelles très limitées l'ont fait adopter comme modèle bactérien par les généticiens et les biochimistes (*Es. coli* K 12).

Jusqu'aux années soixante dix, cette espèce était considérée comme homogène sur le plan taxonomique. Cette stabilité des caractères s'exprimait dans les descriptions concordantes d'EDWARDS et EWING (30) ou du BERGEY'S manual. Depuis ces dernières années, un certain nombre d'observations ont fait état de souches atypiques pour un nombre important de caractères. Cet atypisme a entraîné une telle confusion au sein des centres de référence, que B. DAVIS du CDC s'est déclarée incapable en 1977 d'écrire une définition opérationnelle de l'espèce (D'après FARMER et coll., 32).

I - ANALYSE GENOMIQUE.

D'après BRENNER et coll. (13, 14, 17), le taux d'hybridation intraspécifique de l'espèce *Es. coli* est compris entre 72 et 100 %. Les bactéries du groupe *Alcalescens - dispar* ne se distinguent pas, sur le plan génétique, des autres souches d'*Es. coli* ; leurs taux d'hybridation avec les 7 souches marquées d'*Es. coli*, sont en effet compris entre 70 et 95 % (40 mesures). Ces données vont dans le sens de la suggestion d'EDWARDS et EWING (30) de considérer ces souches comme des *Es. coli* sur la base des caractères biochimiques et sérologiques. Les bactéries les plus proches de *Es. coli* sont les espèces du genre *Shigella* ; les pourcentages de réassociation *Es. coli-Shigella* varient entre 63 et 89 % (35 mesures). *Es. coli* et les différentes espèces du genre *Shigella* pourraient donc être rassemblés dans un genre unique. Si l'on exclut le genre *Shigella*, le groupe le plus proche d'*Es. coli* est représenté par le genre *Citrobacter* dont certaines souches s'hybrident jusqu'à 54 % .

Des mesures de la taille du génome au sein de l'espèce *Es. coli* ont été pratiquées par BRENNER et coll. (14) ; deux techniques aboutissant à des résultats similaires, ont été utilisées : l'hybridation réciproque et la détermination du poids moléculaire du génome par la méthode de GILLIS, DE LEY et DE CLEENE (45). Les ADN provenant d'un nombre représentatif de différentes souches d'*Es. coli* se distribuent selon une courbe de GAUSS dont les limites sont $2-3 \times 10^9$ daltons (14). Ces variations extrêmes correspondent selon BRENNER et coll. (14) à environ 600 gènes. La fonction de ces gènes n'est pas connue ; elle est jusqu'à présent inaccessible à l'analyse phénotypique. Par ailleurs, elle influe, quelquefois considérablement, sur la mesure du pourcentage d'hybridation.

II. ANALYSE PHENOTYPIQUE.

Un certain nombre de caractères atypiques sont d'origine plasmidique : production d' $H_2 S$, fermentation du raffinose et du saccharose, hydrolyse de l'urée, utilisation du citrate de SIMMONS (Tableau II).

Caractère	Découverte (année)	Auteurs et références
$H_2 S$	1972	STOLERU et coll. (72)
Raffinose	1973	ØRSKOV et ØRSKOV (64)
Saccharose	1975	SMITH et PARSELL (70)
Citrate (SIMMONS)	1978	ISHIGURO et coll. (49)
Urée	1979	WACHSMUTH et coll. (75)

TABLEAU II : Plasmides métaboliques mis en évidence chez *Es. coli*.

Au cours d'un travail récent d'hybridation ADN/ADN (par rapport à *Es. coli* K 12), BRENNER et coll. (14) ont montré l'existence de souches fermentant l'adonitol, l'inositol ; certaines sont dépourvues de décarboxylases (LDC, ODC, ADH) et orientent le diagnostic vers l'espèce (ou plutôt le complexe) *Enterobacter agglomerans* (tableau III).

Caractère atypique	% d'hybridation avec <i>Es. coli</i> K 12	Nombre de souches étudiées.
Adonitol [⊕]	100 %	2
Citrate (SIMMONS) [⊕]	95 - 100 %	4
Citrate [⊕] et H ₂ S [⊕]	100 %	1
Lysine décarboxylase [⊖] Ornithine décarboxylase [⊖] Arginine dihydrolase [⊖]	89 - 100 %	30
H ₂ S [⊕]	100 %	5
H ₂ S [⊕] et indole [⊖]	100 %	1
H ₂ S [⊕] et lactose [⊖]	96 %	1
Lactose [⊖]	92 %	1
Inositol [⊕]	90 - 93 %	2
Inositol [⊕] et H ₂ S [⊕]	94 %	1
Inositol [⊕] et indole [⊖]	100 %	1

TABLEAU III : Hybridation (Technique à l'hydroxyapatite, 60°C)
de souches atypiques à la souche *Es. coli* K 12
D' après BRENNER et coll. (14).

Caractère atypique.	% d'hybridation avec <i>Es. coli</i> K 12	Nombre de souches étudiées.
Mannitol [⊖]	93%	1
Mannitol [⊖] et H ₂ S [⊕]	99%	1
Rouge de méthyle [⊖] et mannitol [⊖]	91 - 100 %	1
Phénylalanine désaminase [⊕]	100 %	3
Urée [⊕]	78 - 100 %	8
K C N [⊕]	100 %	2

TABLEAU III : Hybridation (Technique à l'hydroxyapatite, (suite) 60°C) de souches atypiques à la souche *Es. coli* K 12

D'après BRENNER et coll. (14).

D'autres souches ne fermentent pas le mannitol, ne produisent pas d'indole ; il existe même des souches possédant une phénylalanine désaminase. Et pourtant, toutes ces souches s'hybrident au moins à 78 % avec la souche *Es. coli* K 12 !

Récemment, GAVINI et coll. (40) en 1981 ont proposé une définition phénotypique de l'espèce, à la suite d'un travail de taxonomie numérique.

Définition de l'espèce *Es. coli*.

Elle regroupe des bacilles à Gram négatif mobiles par cils péritriches ou immobiles.

L'optimum de croissance est situé entre 30 et 37° C ; la majorité des souches se multiplient encore à 41 et 44 ° C ; elles en sont incapables à 4° C ; elles ne peuvent se développer en présence de KCN.

Les caractères suivants sont généralement présents : production d'indole, décarboxylase de la lysine et de l'acide glutamique, réduction des nitrates en nitrites, utilisation de L-tartrate selon KAUFFMANN et PETERSEN

Les substrats suivants sont habituellement assimilés :

L-arabinose, D-ribose, D-xylose, D-fructose, D-galactose, D-glucose, D-mannose, D-lactose, D-maltose, D-tréhalose, glycérol, D-mannitol, D-sorbitol, gluconate, acétate, propionate, DL-lactate, DL-glycérate, D-malate, pyruvate, succinate, fumarate, D- α -alanine et L-proline.

Les substrats suivants ne sont jamais assimilés : D-fucose, D-cellobiose, inuline, salicine, éthanol, méthanol, *n*-propanol, *iso*-propanol, géraniol, 2-3-butylène-glycol, érythritol, éthylène-glycol, propylène-glycol, DL-3-hydroxybutyrate, D-tartrate, L-tartrate, citraconate, itaconate, aconitate, oxalate, malonate, pimélate, subérate, azélate, lévulinate, mésaconate, glutarate, adipate, sébacate, salicylate, butyrate, *iso*-butyrate, *n*-valérate, *iso*-valérate, *n*-caproate, heptanoate, caprylate, pèlargonate, caprate, benzoate, *p*-hydroxy-benzoate, D-mandélate, L-mandélate, phtalate, *iso*-phtalate, *tere*-phtalate, benzyl-formate, glycine, β -alanine, L-valine, L-lysine, L-arginine, L-ornithine, L-citrulline, L-leucine, L-thréonine, L-tyrosine, L-phényl-alanine, DL-2-amino-butyrates, DL-3-amino-butyrates, DL-4-amino-butyrates, 5-amino-valérate, 2-amino-benzoate, 3-amino-benzoate, 4-amino-benzoate, L-histidine, L-tryptophane, D-tryptophane, histamine, spermine, tryptamine, amylamine, éthanolamine, butylamine, benzylamine, diphénylamine, urée, urate, sarcosine, bêtaïne, créatine, hippurate, pantothénate, nicotinate, trigonelline, acétamide, naphthalène, dodécane et hexadécane.

Les substrats suivants peuvent être ou non assimilés :

D-arabinose, L-rhamnose, saccharose, amidon, mucate, adonitol, dulcitol, *m*-inositol
m-tartrate, maléate, glycolate, 2-céto-glutarate, phénylacétate, *m*-hydroxy-
benzoate, L-aspartate, L-glutamate, L-sérine, L- α -alanine, L-cystéine,
putrescine et asparagine.

Les sucres et alcools suivants sont habituellement fermentés :

arabinose, xylose, ribose, maltose, glucose, lactose, galactose, rhamnose,
mannose, fructose, tréhalose, mélibiose, sorbitol, glycérol et mannitol.

Les caractères suivants sont habituellement absents :

production d'acétoïne, arginine dihydrolase, ornithine décarboxylase,
gélatinase, Tween estérase, désoxyribonucléase, amylolyse, chitinolyse,
utilisation du malonate, du *m*-tartrate selon KAUFFMANN et PETERSEN (1956).

Les substances suivantes ne sont généralement pas fermentées :

α -méthyl glucoside, cellobiose, sorbose, adonitol, dulcitol, inositol,
érythritol, glycogène, dextrine, inuline, esculine et salicine.

La β -xylosidase est absente.

D ESCHERICHIA ADECARBOXYLATA. (LECLERC-1962, 57)

Les souches de cette espèce ont été étudiées par LECLERC (57) en 1962. Elles sont toutes d'origine aquatique et sont pigmentées en jaune. Sur des critères uniquement phénotypiques et notamment en l'absence de décarboxylases, LECLERC (57) a proposé l'individualisation d'une espèce nouvelle, incluse dans le genre *Escherichia*, *Es. adecarboxylata*.

En 1972, EWING et FIFE ont proposé l'inclusion de cette espèce dans l'espèce *Enterobacter agglomerans* qu'ils venaient de créer (31). Depuis cette époque et jusqu'en 1983 (GAVINI et coll., 43; SAKAZAKI et col., 67) aucune étude n'a été consacrée à cette espèce qui est considérée comme *species incertae sedis* , rattachée provisoirement au genre *Escherichia*, dans la IXème édition du BERGEY'S manual.

Cette espèce faisant l'objet de notre travail de thèse est analysée de façon complémentaire dans le chapitre II (" Objectifs de l'étude") , page 43 .

E ESCHERICHIA BLATTAE (BURGESS ET COLL., 1973, 23)

I. HISTORIQUE :

Cette espèce individualisée par BURGESS et coll. (23), en 1973, regroupe des *Enterobacteriaceae* isolées de la partie terminale de l'intestin du cafard oriental (*Blatta orientalis*, cafard noir).

La souche type de l'espèce, *Es. blattae* CDC 9005-74 n'a été proposée qu'en 1979 par le sous-comité de taxonomie des *Enterobacteriaceae* (Comité International de Bactériologie Systématique, ICSB)

II. ANALYSE PHENOTYPIQUE:

Aucun travail d'hybridation directe (marquage de l'ADN de la souche type ou d'une autre souche de l'espèce) n'a été réalisé jusqu'à présent. La description originale de l'espèce repose sur l'étude de 16 souches (tableau IV).

Celles-ci sont négatives pour les caractères suivants : indole, H₂S, ONPG, réaction de VOGES-PROSKAUER (acétoïne). Ces bactéries sont mobiles, à l'exception de la souche type. L'utilisation du citrate et du malonate permet de différencier 2 biotypes (biotype 1 : citrate et malonate négatifs; biotype 2 : citrate et malonate positifs). Enfin, on note la présence constante de lysine décarboxylase, d'ornithine décarboxylase et d'arginine dihydrolase.

Caractères Biochimiques	<i>Escherichia blattae</i>	
	16 souches (a)	Souche type (b) CDC 9005-74
Indole	-	-
Rouge de méthyle	+	+
VOGES-PROSKAUER (acétoïne)	-	-
Citrate (SIMMONS)	+	(c)
H ₂ S	-	-
Urée	-	-
Phénylalanine désaminase	-	-
Lysine décarboxylase	+	+
Arginine dihydrolase	-	+
Ornithine décarboxylase	+	+
Mobilité	-	+
Gélatine (22 ° C)	-	-
KCN	-	-
Malonate	+	(c)
Fermentation D-glucose	+	
Lactose	-	-
Saccharose	-	-
D-Mannitol	-	-



TABLEAU IV : Caractères biochimiques de l'espèce *Escherichia blattae* et de la souche type CDC 9005-74

Caractères Biochimiques	<i>Escherichia blattae</i>	
	16 souches (a)	Souche type (b) CDC 9005-74
Dulcitol	-	-
Salicine	-	
Adonitol	-	-
L-Inositol	-	-
D-Sorbitol	-	
L-Arabinose	+	+
Raffinose	-	
L-Rhamnose	+	
Maltose	+	
D-Xylose	+	
Tréhalose	+	
Cellobiose	-	
α -Méthyl- α -glucoside	-	
Erythritol	-	
Esculine	-	
Mélibiose	-	
D-Arabitol	-	

BU
LUE

TABLEAU IV : Caractères biochimiques de l'espèce *Escheri-*
(suite) *chia blattae* et de la souche type CDC 9005-74

III. ORIGINE DES SOUCHES.

Les seules souches étudiées jusqu'à présent sont celles de la description originale de BURGESS et coll. (23). Elles proviennent donc toutes de la partie terminale de l'intestin de *Blatta orientalis*.

IV. DISCUSSION SUR LA POSITION TAXONOMIQUE.

Selon BURGESS et coll. (23), les souches étudiées étaient à la fois proches sur le plan phénotypique des genres *Escherichia* et *Hafnia*. En fait , l'individualisation même de l'espèce et sa position taxonomique sont discutables, pour de nombreuses raisons :

1. Les caractères phénotypiques étudiés sont peu nombreux (environ 25)
2. Aucune étude d'hybridation ADN/ADN n'a été réalisée ; l'homogénéité génomique du groupe est inconnue.
3. A notre connaissance, aucune souche n'a été isolée depuis la description initiale des auteurs.

F ESCHERICHIA HERMANII (BRENNER ET COLL., 1982, 11)

I. HISTORIQUE:

Les souches de cette espèce étaient antérieurement regroupées dans le groupe entérique 11 du CDC (Center for Disease Control, Atlanta, Georgia, U.S.A.) . La dénomination *Es. hermanni* a été proposée par BRENNER et coll. (11) afin d'honorer la mémoire des bactériologistes G.J. HERMANN et L.G. HERMANN. La souche type de l'espèce est la souche ATCC 33650 (= CDC 980-72).

II. ANALYSE GÉNOMIQUE :

Le GC % de 8 souches a été mesuré par la technique de dénaturation thermique. Les valeurs obtenues sont comprises entre 53 et 58 %.

Les travaux d'hybridation ont été effectués par la technique à l'hydroxyapatite. (Tableau V)

ADN froids	% d'hybridation avec l'ADN* ATCC 33650 à 60° C
<i>Escherichia hermanni</i> ATCC 33650	100
<i>Escherichia hermanni</i> 1933-74	91
<i>Escherichia hermanni</i> 899-73	91
<i>Escherichia hermanni</i> 2868-70	88
<i>Escherichia hermanni</i> 2472-72	88
<i>Escherichia hermanni</i> 3300-74	87
<i>Escherichia hermanni</i> 4045-67	86
<i>Escherichia hermanni</i> 4408-70	84
<i>Escherichia coli</i> 614-41	42
<i>Es. coli</i> 1003-68	38
<i>Es. coli</i> 708-74	40
<i>Es. coli</i> 5143-71	38
<i>Es. coli</i> 571-75	37
<i>Es. coli</i> K 12	31
<i>Escherichia blattae</i> 9005-74	32
<i>Salmonella typhimurium</i> LT2	39
<i>Citrobacter freundii</i> 460-61	40
<i>Citrobacter diversus</i> 1381-70	41
<i>Citrobacter amalonaticus</i> 25406	41



TABLEAU V : Hybridation de l'espèce *Escherichia hermanni*
(BRENNER et coll. 11)

ADN* : ADN radioactif

ADN froids	% d'hybridation avec l'ADN* ATCC 33650 à 60 ° C
<i>Klebsellia pneumoniae</i> 2	41
<i>Enterobacter aerogenes</i> 1627-66	35
<i>Enterobacter cloacae</i> 1347-71	46
<i>Enterobacter sakazakii</i> 4562-70	44
<i>Enterobacter agglomerans</i> 6003-71	50
<i>En. agglomerans</i> 4388-71 (groupe IX)	48
<i>En. agglomerans</i> 5378-71 (groupe XI)	48
<i>En. agglomerans</i> 219-71 (groupe XII)	42
<i>En. agglomerans</i> 1600-71 (groupe X)	42
<i>En. agglomerans</i> 1429-71 (groupe III)	41
<i>En. agglomerans</i> 2780-70	37
<i>En. agglomerans</i> 5422-69 (groupe VIII)	36
<i>En. agglomerans</i> 3123-70 (groupe II)	35
<i>En. agglomerans</i> 1741-71 (groupe IV)	33
<i>En. agglomerans</i> 6070-69 (groupe VI)	33
<i>En. agglomerans</i> 23372	30
<i>En. agglomerans</i> 3482-71 (groupe V)	29
<i>Hafnia alvei</i> 5632	23
<i>H. alvei</i> 4510	20

TABLEAU V : Hybridation de l'espèce *Escherichia hermannii*
(suite) (BRENNER et coll., 11)

ADN * : ADN radioactif

ADN froids	% d'hybridation avec l'ADN* ATCC 33650 à 60 ° C
<i>Serratia marcescens</i> 868-57	21
<i>Erwinia amylovora</i> EA 178	26
" <i>salicis</i> ES 102	26
" <i>quercina</i> EQ 102	24
" <i>chrysanthemi</i> SR-32	24
" <i>cypripedii</i> EC 155	23
" <i>tracheiphila</i> 27004	22
" <i>carotovora</i> 495	22
<i>Yersinia enterocolitica</i> 497-70	23
" <i>ruckeri</i>	23
<i>Morganella morgani</i> 25830	25
<i>Providencia alcalifaciens</i> 3370-67	13
" <i>rettgeri</i> 1163	12
" <i>stuartii</i> 3233-68	9
<i>Proteus mirabilis</i> PM-1	7
" <i>vulgaris</i> PR-1	7

TABLEAU V : Hybridation de l'espèce *Escherichia*
(suite) *hermani* (BRENNER et coll., 11)

ADN* : ADN radioactif

L'homogénéité génomique de l'espèce est de 84 - 100 % (ADN marqué : souche ATCC 33650 - 8 souches analysées).

La souche type de l'espèce ne s'hybride qu'entre 30 et 42 % avec les espèces *Escherichia coli* et *Escherichia blattoe* . On constate un niveau d'hybridation similaire avec les espèces appartenant aux genres *Citrobacter*, *Salmonella*, *Klebsiella* et *Enterobacter* (à l'exclusion de *En. agglomerans*).

Les taux d'hybridation avec les différents groupes génomiques définis par BRENNER et Coll.(20) au sein du complexe "*Erwinia herbicola* - *Enterobacter agglomerans*" varient entre 29 et 50 % . L'apparementement génomique est encore plus faible (20 - 25 %) avec les genres *Serratia*, *Hafnia*, *Erwinia* (à l'exclusion du groupe *herbicola*) , *Yersinia* et *Morganella* . Enfin, on observe les pourcentages d'hybridation les plus bas (10 %) avec les espèces des genres *Proteus* et *Providencia* .

III. ANALYSE PHENOTYPIQUE :

L'espèce possède les caractères généraux de la famille des *Enterobacteriaceae* . La totalité des souches est pigmentée en jaune et possède une β - galactosidase. Ces bactéries sont mobiles, produisent de l'indole et n'utilisent pas le citrate de SIMMONS. La réaction de VOGES-PROSKAUER est négative. L'ensemble des germes possède une ornithine décarboxylase, mais ne possède pas de lysine décarboxylase et d'arginine dihydrolase.

Les caractères phénotypiques de l'espèce sont exposés au tableau VI

CARACTERES BIOCHIMIQUES	<i>Es. hermanni</i>	
	% POSITIVITE (32 SOUCHES)	SOUCHE TYPE ATCC 33650
Indole	100	+
Rouge de méthyle	100	+
VOGES-PROSKAUER	0	-
Citrate (SIMMONS)	0	-
H ₂ S	0	-
Urée (CHRISTENSEN)	0	-
Phénylalanine désaminase	0	-
Lysine décarboxylase	6	(+)
Arginine dihydrolase	0	-
Ornithine décarboxylase	100	+
Mobilité	100	+
Gélatine (22° C)	0	-
KCN	94	+
Malonate	3	-
D-Glucose (fermentation)	100	+
D-Glucose (gaz)	97	+

TABLEAU VI : Caractères biochimiques de l'espèce *Escherichia hermanni* et de la souche type ATCC 33650.

Valeurs obtenues après incubation de 48 heures à 36° C ± 1; Les valeurs entre parenthèses correspondent à des positivations tardives (3-7 jours).

CARACTÈRES BIOCHIMIQUES	<i>Es. hermanii</i>	
	% POSITIVITE (32 SOUCHES)	SOUCHE TYPE ATCC 33650
Lactose	44	-
Saccharose	44	-
D-Mannitol	100	+
Dulcitol	19	(+)
Salicin	41	-
Adonitol	0	-
Meso-Inositol	0	-
D-Sorbitol	0	-
L-Arabinose	100	+
Raffinose	41	-
L-Rhamnose	97	+
Maltose	100	+
D-Xylose	100	+
Tréhalose	100	+
Cellobiose	97	+
α -Méthyl-D-glucoside	0	-
Esculine	41	(+)

TABLEAU VI : Caractères biochimiques de l'espèce *Escherichia hermanii* et de la souche type ATCC 33650.

(suite)

Valeurs obtenues après incubation de 48 heures à 36 ° C \pm 1 . Les valeurs entre parenthèses correspondent à des positivations tardives (3-7 jours).

CARACTERES BIOCHIMIQUES	<i>Es. hermani</i>	
	% POSITIVITE (32 SOUCHES)	SOUCHE TYPE ATCC 33650
Mélibiose	0	-
D-Arabitol	8	-
Mucate	97	+
Lipase	0	-
DNase (25° C)	0	-
Réduction des nitrates	100	+
Oxydase	0	-
ONPG (-galactosidae)	100	+
Pigment jaune	100	+
D-Mannose	100	+
Erythritol	0	-
Glycérol	3	-
Tartrate (JORDAN)	34	-
Acétate	78	+
Citrate (CHRISTENSEN)	61	(+)
H ₂ S	0	-

TABLEAU VI : Caractères biochimiques de l'espèce *Escherichia hermani* et de la souche type ATCC 33650.
(suite)

Valeurs obtenues après incubation de 48 heures à 36° C [±] 1 . Les valeurs entre parenthèses correspondent à des positivations tardives (3-7 jours).

IV. SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES :

Le phénotype de résistance des souches a été déterminé par la technique de diffusion en disques. Celles-ci sont résistantes à l'ampicilline et à la carbenicilline. Elles sont sensibles à la céfalotine, la colistine et aux autres antibiotiques habituels.

V. ORIGINE DES SOUCHES :

Les 38 souches étudiées aux Etats-Unis par BRENNER et coll. (11) proviennent de 12 états différents.

Toutes ces souches, d'origine humaine, ont été isolées en bactériologie médicale. Parmi les 25 souches dont l'origine est parfaitement connue, on note la répartition suivante : plaies (12 souches), suppurations (6 souches), selles (5 souches), sang (1 souche) et liquide céphalo-rachidien (1 souche). La souche type ATCC 33650 a été isolée dans une plaie touchant un orteil. La pathogénécité de ces souches n'a pû être mise en évidence de façon précise.

VI. DISCUSSION SUR LA POSITION TAXONOMIQUE :

L'hybridation ADN-ADN et l'analyse phénotypique montrent clairement l'existence d'une espèce nouvelle.

Sur la seule base de l'analyse génomique, cette espèce aurait pû être incluse dans le genre *Enterobacter*, les genres *Citrobacter*, *Klebsiella* ou *Escherichia* et même le genre *Salmonella*.

Sur le plan phénotypique, les caractères biochimiques rapprochent ces souches de l'espèce *Citrobacter amalonaticus* et de l'espèce *Escherichia coli*.

La présence de pigment jaune, de lysine décarboxylase et l'absence d'utilisation du citrate de SIMMONS différencient les souches étudiées de l'espèce *C. amalonaticus* et du genre *Citrobacter* dans son ensemble.

Par contre, l'hétérogénéité phénotypique du genre *Escherichia* (variabilité phénotypique de *Es. coli*, pigmentation jaune de l'espèce *Es. adecarboxylata*) favorise l'inclusion du groupe entérique 11 dans le genre *Escherichia* sous la dénomination de *Es. hermannii*.

G ESCHERICHIA VULNERIS (BRENNER ET COLL., 1982, 19)

I. HISTORIQUE:

Les souches de cette espèce, individualisées par BRENNER et coll. (19) en 1982 étaient antérieurement regroupées dans le "groupe entérique 1" et le " groupe ALMA 1 " du CDC. La dénomination d'*Escherichia vulneris* a été attribuée à celles-ci, en fonction de leur origine : la plupart ont été isolées à partir de plaies (*vulnus*, en latin) chez l'Homme. La souche type de l'espèce est la souche *Escherichia vulneris* ATCC 33821 (= CDC 875-72)

II. ANALYSE GENOMIQUE :

Le GC % de 3 souches a été mesuré par la méthode du T_m ; il est de 59 %. Cette valeur s'inclut bien dans l'intervalle de GC % correspondant aux *Enterobacteriaceae*.

L'hybridation ADN/ADN (technique à l'hydroxyapatite) de la souche type 33821 avec 15 autres souches du "groupe entérique 1 " montre que le pourcentage moyen d'hybridation intra-spécifique est de 75 % (valeurs extrêmes : 66 - 100 %). Ces résultats sont confirmés par le marquage de l'ADN d'une autre souche du " groupe entérique 1 ", la souche CDC 2898-73 (% moyen : 77 % ; valeurs extrêmes : 67 - 100 %).

ADN froids "groupe entérique 1"	ADN* ("groupe entérique 1")	
	Souche type <i>Es. vulneris</i> ATCC 33821	<i>Es. vulneris</i> CDC 2898-73
875-72	100 %	67 %
2898-73	74 %	100 %
2524-69	86 %	86 %
4774-70	67 %	76 %
5814-70	70 %	79 %
2954-71	74 %	87 %
4821-71	72 %	71 %
3455-72	73 %	82 %
3763-72	79 %	74 %
4220-72	79 %	78 %
5641-72	74 %	-
5907-72	73 %	69 %
1544-73	66 %	74 %
1659-73	78 %	77 %
3979-73	82 %	75 %
4121-73	81 %	88 %

TABLEAU VII : hybridation intra-spécifique (à 60 ° C) de l'espèce *Escherichia vulneris* . D'après BRENNER et coll. (19) .

Les relations génomiques entre la souche type ATCC 33821 et les autres espèces de la famille des *Enterobacteriaceae* sont faibles : 6 - 35 % d'homologie. On observe un taux d'hybridation de l'ordre de 25 % - 40 % avec les genres suivants : *Escherichia*, *Enterobacter*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Kluyvera* et *Cedecea*.

ADN* : ADN radioactif.

ADN froids	% hybridation avec l'ADN* de la souche <i>Es. vulneris</i> ATCC 33821
<i>Escherichia coli</i> 09	39
<i>Es. coli</i> 0143	31
<i>Es. blattae</i> 541 11A	32
<i>Es. blattae</i> 9005-74	25
<i>Es. hermannii</i> 980-73	29
"groupe entérique " 10	33
<i>Enterobacter gergoviae</i> 604-77	35
<i>En. cloacae</i> 1347-71	32
<i>En. agglomerans</i> 2780-70	29
<i>En. agglomerans</i> 1600-71	26
<i>En. amnigenus</i> 1325-79	25
<i>En. amnigenus</i> 1319-79	24
<i>Salmonella typhimurium</i> LT2	31
<i>Erwinia carotovora</i> 495	33
<i>E. cypripedii</i> EC 155	23
<i>E. rhapontici</i> ER 106	22
<i>E. nigrifluens</i> EN 104	21
<i>E. mallotivora</i> 2851	19
<i>E. amylovora</i> EA 178	16
<i>E. quercina</i> EQ 102	16
<i>Klebsiella oxytoca</i> 13182	28
<i>K. pneumoniae</i> 2	27
<i>Kluyvera cryocrescens</i> 409-78	28
<i>K. ascorbata</i> 408-78	27
<i>Cedecea davisae</i> 3278-77	28
<i>Cedecea lapagei</i> 485-75	26
<i>Cedecea</i> sp. 3699-73	24
<i>Cedecea</i> sp. 4853-73	21
<i>Citrobacter freundii</i> 460-61	23
<i>Serratia marcescens</i> 868-57	22
<i>S. ficaria</i> 1165-77	18
<i>S. fonticola</i> 4556-71	17
<i>Obesumbacterium proteus</i> 4302-74	17
<i>O. proteus</i> 4296-74	16
<i>Rahnella aquatilis</i> 1327-79	17
<i>Edwardsiella tarda</i> 3592-64	16

TABLEAU VIII

Relations génomiques (hybridation à 60 ° C) entre la souche type *Escherichia vulneris* ATCC 33821 et les autres espèces de la famille des *Enterobacteriaceae*. D'après BRENNER et coll. (19).

ADN froids	% hybridation avec l'ADN* de la souche <i>Es. vulneris</i> ATCC 33821
<i>Hafnia alvei</i> 5632-72	13
<i>Yersinia enterocolitica</i> 497-70	13
<i>Y. kristensenii</i> 1474	13
<i>Y. ruckeri</i> 4535-69	12
<i>Y. pseudotuberculosis</i> P62	10
<i>Morganella morgani</i> 25830	11
<i>Providencia rettgeri</i> 1163	9
<i>P. alcalifaciens</i> 3370-67	8
<i>P. stuartii</i> 2896-68	6
<i>Proteus vulgaris</i> PR1	6

TABLEAU VIII (suite) : relations génomiques (hybridation à 60° C)
entre la souche type *Escherichia vulneris* ATCC 33821 et les
autres espèces de la famille des *Enterobacteriaceae*

D'après BRENNER et coll. (19)

ADN* : ADN radioactif.

III. ANALYSE PHENOTYPIQUE :

Les 2/3 des souches de l'espèce *Es. vulneris* sont pigmentées en jaune. La pigmentation apparaît entre 24 et 48 H chez 50% des souches environ. Ces bacilles possèdent les caractères positifs suivants : mobilité, ONPG, présence de lysine et d'ornithine décarboxylase ; la présence d'arginine dihydrolase est inconstante (28 % des souches). On note l'absence de production d'indole, d'utilisation du citrate (SIMMONS), de production d'acétoïne (VOGES-PROSKAUER).

Les caractères biochimiques détaillés de la souche type ATCC 33821 et de 61 autres souches de l'espèce *Es. vulneris* figurent au tableau IX

CARACTERES BIOCHIMIQUES	<i>Es. vulneris</i>	
	% POSITIVITE (61 SOUCHES)	SOUCHE TYPE ATCC 33821
Indole	0	-
Rouge de méthyle	100	+
VOGES-PROSKAUER (acétoïne)	0	-
Citrate (SIMMONS)	0	-
H ₂ S	0	-
Urée (CHRISTENSEN)	0	-
Phénylalanine désaminase	0	-
Lysine décarboxylase	89	+
Arginine dihydrolase	28	(+)
Ornithine décarboxylase	0	-
Mobilité	100	+
Gélatine (22° C)	0	-
KCN	15	+
Malonate	85	+
D-Glucose (fermentation)	100	+
D-Glucose (gaz)	97	+

TABLEAU IX : Caractères biochimiques de 61 souches appartenant à l'espèce *Es. vulneris* et de la souche type ATCC 33821

D'après BRENNER et coll. (19)

Incubation : 48 heures à 36 ° C ⁺ 1

(+) , réaction positive en 3 à 7 jours.

CARACTERES BIOCHIMIQUES	<i>Es. vulneris</i>	
	% POSITIVITE (61 SOUCHES)	SOUCHE TYPE ATCC 33821
Lactose	13	(+)
Saccharose	8	(+)
D-Mannitol	100	+
Dulcitol	0	-
Salicine	28	(+)
Adonitol	0	-
Meso -Inositol	0	-
D-Sorbitol	0	-
L-Arabinose	100	+
Raffinose	100	+
L-Rhamnose	93	+
Maltose	100	+
D-Xylose	100	+
Tréhalose	100	+
Cellobiose	100	+
α -Méthyl- D-glucoside	26	-

TABEAU IX : Caractères biochimiques de 61 souches appartenant
(suite) à l'espèce *Es. vulneris* et de la souche type
ATCC 33821

D'après BRENNER et coll. (19)

Incubation : 48 heures à 36 ° C \pm 1

(+) , réaction positive en 3 à 7 jours.

CARACTERES BIOCHIMIQUES	<i>Es. vulneris</i>	
	% POSITIVITE (61 SOUCHES)	SOUCHE TYPE ATCC 33821
Esculine	16	(+)
Mélibiose	100	+
D-Arabitol	0	-
Mucate	77	+
Lipase	0	-
DN ^{ase}	0	-
Réduction des nitrates	100	+
Oxydase	0	-
ONPG	100	+
Pigment jaune	56	+
D-Mannose	100	+
Erythritol	0	-
Glycérol	18	-
Tartrate (JORDAN)	0	-
Acétate	20	(+)
Citrate (CHRISTENSEN)	0	-
H ₂ S	0	-

TABLEAU IX : caractères biochimiques de 61 souches appartenant
(suite) à l'espèce *Es. vulneris* et de la souche type
ATCC 33821

D'après BRENNER et coll. (19)

Incubation : 48 heures à 36°C ± 1

(+), réaction positive en 3 à 7 jours.

IV. SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES.

Les souches isolées au CDC sont sensibles à l'ampicilline et à la cefalotine (100 %). Aucune n'est sensible à la carbénicilline (1/3 sont résistantes ; 2/3 sont intermédiaires). La plupart des souches sont sensibles aux antibiotiques habituellement actifs sur les bacilles à Gram négatif (y compris la colistine).

V. ORIGINE DES SOUCHES :

Les 61 souches étudiées par BRENNER provenaient des Etats-Unis (24 états) et du Canada. Parmi celles-ci, 56 étaient d'origine humaine, 2 provenaient d'animaux (lièvre et oiseau) et une de l'environnement ; deux autres étaient d'origine inconnue.

La répartition des souches d'origine humaine est la suivante : plaies (37), gorge ou suppurations (5), sang (4), vagin (1), urine (1), feces (1) et lymphé (1).

Aucune étude du pouvoir pathogène n'a été menée jusqu'à présent.

VI. DISCUSSION SUR LA POSITION TAXONOMIQUE :

Les données phénotypiques et génomiques concordent pour affirmer que les souches appartenant au " groupe entérique 1 " constituent une nouvelle espèce.

Sur la seule base des données génomiques, *Es. vulneris* aurait pu être classée dans les genres *Enterobacter*, *Salmonella* ou *Escherichia*. La seconde solution aurait pu être la création d'un genre nouveau monospécifique.

Des considérations pratiques (diagnostic), l'absence de production d'acétoïne et d'utilisation du citrate (SIMMONS) ont conduit les auteurs à inclure les souches du " groupe entérique 1 " dans le genre *Escherichia*, sous la dénomination de *Es. vulneris*.

H - CONCLUSION

Contrairement à la notion d'espèce, dont les critères de définition se sont considérablement précisés au cours de ces dernières années, grâce à l'hybridation ADN/ADN, la notion du genre au sein de la famille des *Enterobacteriaceae* est actuellement mal définie et demeure essentiellement pratique (47, 11, 19, 48).

Le ΔT_m est de peu d'utilité pour décider si 2 espèces appartiennent à un même genre. D'autres méthodes pourraient être utilisées pour établir une classification supra-spécifique (séquençage d'ARN, hybridation de fragments clonés d'ADN, immunologie d'enzymes). Il est cependant prudent d'attendre qu'une telle classification soit suffisamment avancée avant de modifier la nomenclature bactérienne (47). Pour cette raison, la ressemblance phénotypique est devenue un critère prioritaire pour définir les genres (11, 19, 48).

Cette ressemblance devrait cependant être plus approfondie. En ce qui concerne notamment le genre *Escherichia*, une étude de taxonomie numérique serait souhaitable afin d'apprécier rationnellement (plutôt que subjectivement, à partir de quelques caractères d'usage commun) la ressemblance réelle entre l'espèce *Es. coli* et les autres espèces nouvellement décrites.

CHAPITRE II

OBJECTIFS DE L'ETUDE

Comme nous l'avons vu au chapitre I, l'espèce *Escherichia adecarboxylata* a été individualisée par LECLERC en 1962. Aucune information nouvelle n'a été publiée sur cette espèce, depuis qu'EWING et FIFE (31) ont considéré en 1972 cette dénomination comme synonyme d'*Enterobacter agglomerans*.

En fait, la position taxonomique exacte de l'espèce *Escherichia adecarboxylata* demeure inconnue, puisqu'elle est liée à la connaissance spécifique du complexe "*Erwinia herbicola* - *Enterobacter agglomerans*" qui représente le " taxon " le plus hétérogène de la famille des *Enterobacteriaceae*.

En étudiant, par analyse numérique, les caractères phénotypiques de 169 souches appartenant ou apparentées au complexe "*Herbicola-Agglomerans*", GAVINI et coll. (43) ont montré en 1983, l'existence de 5 groupes majeurs subdivisés en 15 sous-groupes.

Toutes les souches d'*Es. adecarboxylata* incluses dans l'échantillonnage s'agrègent dans un seul et même sous-groupe, le sous-groupe E₅ ; celui-ci comprend en outre 2 souches dénommées *Enterobacter agglomerans* et une souche dénommée *Erwinia herbicola*.

Lors d'un travail d'hybridation ADN/ADN, BRENNER et coll. (20), en 1984, ont étudié 124 souches appartenant au complexe "*Herbicola-Agglomerans*" ; ces auteurs ont pu regrouper 90 souches en 13 groupes génomiques.

Enfin, sur la base d'une étude de taxonomie numérique et de quelques mesures d'hybridation ADN/ADN, SAKAZAKI et coll. (75) ont conclu à l'individualisation d'*Es. adecarboxylata* par rapport à *En. agglomerans*.

Les objectifs de cette thèse sont au nombre de quatre :

1) Analyser par hybridation ADN/ADN, l'homogénéité génomique du groupe E₅ de GAVINI et coll. (43).

2) Mesurer les relations génomiques entre E₅ et les autres groupes définis par GAVINI et coll. (43).

3) Hybrider les souches du groupe E₅ aux souches types des groupes génomiques de BRENNER et coll. (20).

4) Etudier les relations génomiques entre le groupe E₅ et les différentes espèces de la famille des *Enterobacteriaceae*.

*" Une expérience d'une heure nous instruit
souvent plus que des raisonnements de
plusieurs années. "*

Abbé E. MARIOTTE (1620 - 1684) .

CHAPITRE III
MATERIEL ET METHODES .

A - MATERIEL

I . SOUCHES :

Les 160 souches étudiées se répartissent comme suit :

. 47 souches représentant le groupe E₅ (objet de l'étude) et les 15 autres phénotypiques définis par GAVINI et coll. (43) lors de l'analyse numérique du complexe " *Erwinia herbicola* - *Enterobacter agglomerans* " (tableau X).

. 12 souches représentant les groupes génomiques définis par BRENNER et coll. (20) à partir d'un travail d'hybridation ADN/ADN à propos du complexe " *Erwinia herbicola*-*Enterobacter agglomerans* " (tableau XI).

. 90 souches représentant la plupart des espèces de la famille des *Enterobacteriaceae* (tableau XII).

SOUCHES RECUES COMME	REFERENCES COLLECTIONS OFFICIELLES	REFERENCES COLLECTIONS PRIVEES			ORIGINE	RECUES DE :
		GAVINI et coll. (43)	CUETM (a)	AUTRES		
<i>Escherichia adecarboxylata</i>		E ₅ -11	78-209	LECLERC 36	Ea ⁽¹⁾	LECLERC.
"		E ₅ -7	78-214	LECLERC-44	Ea	"
"		E ₅ -8	78-249	" -30	"	"
"		E ₅ -9	78-161	" -23	"	"
"		E ₅ -10	78-252	" -25	"	"
"		E ₅ -12	78-254	" -35	"	"
"		E ₅ -13	78-251	" -50	"	"
"		E ₅ -14	78-250	" -49	"	"
"		E ₅ -15	78-160	" -1	"	"
"		E ₅ -16	78-255	" -10	"	"
<i>Enterobacter agglomerans</i>	(b) CDC 1744-71 (c) 3423 (= ICPB)	E ₅ -61	79-125	Angers 467	M ⁽²⁾	STARR
<i>Erwinia herbicola</i>		E ₅ -81	79-133	Lille 15568	P ⁽³⁾	PAULIN
<i>Enterobacter agglomerans</i>		E ₅ -132	79-256	Angers B 238.3	Ea	Laboratoire d'hy- drobiologie Inst. Pasteur de Lille
<i>Erwinia herbicola</i>		B ₁ -105	79-90	Angers B 243.3	P	PAULIN
"		B ₁ -109	79-99	Angers B 243.3	P	"

TABLEAU X : Liste des souches étudiées par GAVINI et coll. (43)

Références : voir page 62



SOUCHES RECUES COMME	REFERENCES COLLECTIONS OFFICIELLES	REFERENCES COLLECTIONS PRIVEES			ORIGINE	RECUES DE :
		GAVINI et coll. (43)	CUETM	AUTRES		
<i>Erwinia herbicola</i>		B ₂ -99	79-97	Angers A 17.6	P	PAULIN
<i>Enterobacter agglomerans</i>		B ₃ -54	79-223	GILARDI 960	M	GILARDI
" "		B ₃ -62	79-354	GILARDI 1030	M	"
<i>Enterobacter pigmenté</i>		B ₄ -2	79-210	LECLERC a 97	Ea	LECLERC
" "		B ₄ -4	79-216	LECLERC a 53	Ea	"
<i>Enterobacter agglomerans</i>		B ₄ -30	79-245	RICHARD 14-78	M	RICHARD
" "		B ₄ -33	79-229	RICHARD 4-78	M	"
" "		B ₄ -34	79-227	" 14-77	"	"
" "		B ₄ -47	79-22	GILARDI 698	"	GILARDI
" "		B ₄ -48	79-16	" 721	"	"
" "		B ₄ -49	79-18	" 722	"	"
" "		B ₄ -51	79-17	" 749	Démaquillant	"
<i>Erwinia herbicola</i>		B ₄ -70	79-251	GRAHAM 892	M	DE LEY
<i>Erwinia like</i>	ICPB 2953	B ₄ -72	79-126	" G 156	"	STARR
<i>Erwinia herbicola</i>	ICPB EH 101	B ₄ -73	79-157	" G 142	P	STARR

TABLEAU X : Liste des souches étudiées par GAVINI et coll. (43)

(suite)

Références : voir page 62



SOUCHES RECUES COMME	REFERENCES COLLECTIONS OFFICIELLES	REFERENCES COLLECTIONS PRIVEES			ORIGINE	RECUES DE :
		GAVINI et coll. (43)	CUETM	AUTRES		
<i>Erwinia herbicola</i>	NCIB 9744 ^(d)	B ₄ -84	79-262		P	DE LEY
" "	ICPB 2950	B ₄ -90	79-259	GRAHAM G 152	"	"
" "		B ₄ -110	79-86	ANGERS E 10.6.1	"	
" "	(=ATCC ^(e) 33243)					
	NCPPB ^(f) 2971	B ₄ -136	83-13		?	DE LEY
	(=PDDCC ^(g) 272)					
<i>Erwinia milletiae</i>	NCPPB 2519	B ₄ -137	82-84		P	DE LEY
<i>Enterobacter agglomerans</i>		B ₅ -55	79-12	GILARDI 961	M	
" "		B ₅ -56	79-25	" 968	M	
<i>Erwinia herbicola</i>		B ₅ -112	79-79	ANGERS B 6.2	P	
" "	ATCC 14589	B ₅ -128	79-132		P	
<i>Enterobacter agglomerans</i>		B ₆ -53	79-11	GILARDI 959	M	
<i>Enterobacter agglomerans</i>		B ₇ -31	79-233	RICHARD 13-78	M	
" <i>Bacterium typhiflavum</i> "		B ₈ -39	79-224	GRAHAM 708	M	DE LEY
<i>Erwinia lathyri</i>		B ₈ -80	79-364	" G 144	P	"
<i>Erwinia herbicola</i>		B ₉ -96	79-255	ANGERS 217.8	P	
<i>Enterobacter agglomerans</i>		D ₁ -92	79-232	DE LEY VAN VUU- REN 84	Brasseries	DE LEY

TABLEAU X : Liste des souches étudiées par GAVINI et coll. (43)

(suite) Références : voir page 62



SOUCHES RECUES COMME	REFERENCES COLLECTIONS OFFICIELLES	REFERENCES COLLECTIONS PRIVEES			ORIGINE.	RECUES DE :
		CAVINI et coll. (43)	CUETM	AUTRES		
<i>Enterobacter agglomerans</i>		D ₁ -93	79-226	DE LEY - VAN VUUREN 117	Brasseries	
<i>Enterobacter agglomerans</i>		D ₃ -36	79-345	RICHARD 17-78	M	
Coliforme atypique		E ₁ -98	83-127		Ea	GAVINI
" "		E ₁ -101	83-130		Ea	"
" "		E ₁ -102	83-129		Ea	"
Coliforme atypique		E ₂ -23	79-199		Ea	GAVINI
" "		E ₂ -24	79-192		Ea	"
" "		E ₂ -82	79-195		Ea	"
" "		E ₂ -83	79-202		Ea	"
Coliforme atypique		E ₃ -65	79-194		Ea	GAVINI
" "		E ₃ -73	79-191		"	"
" "		E ₃ -84	79-201		"	"
" "		E ₃ -85	79-189		"	"
<i>Enterobacter agglomerans</i>		E ₄ -41	79-9	GILARDI 552	M	

TABLEAU X : Liste des souches étudiées par GAVINI et coll. (43)

(suite)

Références : voir page 62



SOUCHES RECUES COMME	REFERENCES COLLECTIONS OFFICIELLES	REFERENCES COLLECTION CUETM	ORIGINES	RECUES DE :
<i>Enterobacter agglomerans</i>	CDC 3123-70 (=ATCC 29923)	83-134	selles humaines	BRENNER (20) (groupe II)
<i>Enterobacter agglomerans</i>	CDC 1429-71 (=ATCC 29922)	83-140	sang veineux	BRENNER (groupe III)
" "	CDC 1741-71 (=ATCC 27998)	83-132	trachée	BRENNER (groupe IV)
" "	CDC 3482-71 (=ATCC 29921)	83-142	urètre	BRENNER (groupe V)
" "	CDC 6070-69 (=ATCC 29920)	83-139	plaies	BRENNER (groupe VI)
" "	CDC 6003-71 (=ATCC 29904)	83-137	urines	BRENNER (groupe VII)
" "	CDC 5422-69 (=ATCC 29919)	83-136	poumons	BRENNER (groupe VIII)

TABEAU XI : Liste des souches représentant les groupes génomiques définis par BRENNER et coll. (20)

Références : voir page 62



SOUCHES RECUES COMME	REFERENCES COLLECTIONS OFFICIELLES	REFERENCES COLLECTION CUETM	ORIGINES	RECUES DE :
<i>Enterobacter agglomerans</i>	CDC 4388-71 (=ATCC 29918)	83-135	gorge	BRENNER (groupe IX)
" "	CDC 1600-71 (= ATCC 29917)	83-138	foie de poulet	BRENNER (groupe X)
" "	CDC 5378-71 (= ATCC 29916)	83-133	vagin	BRENNER (groupe XI)
" "	CDC 219-71 (= ATCC 29915)	83-141	sang veineux	BRENNER (groupe XII)
" "	CDC 1645-71 (= ICPB 3424)	84-89	médicale	BRENNER (groupe XIII)

TABLEAU XI : Liste des souches représentant les groupes génomiques définis par
(suite) BRENNER et coll. (20)
Références : voir page 62



SOUCHES RECUES COMME	REFERENCES COLLECTIONS OFFICIELLES	REFERENCES COLLECTIONS PRIVEES			ORIGINES	RECUES DE :
		GAVINI et coll. (39, 42)	CUETM	AUTRES		
<i>Buttiauxella agrestis</i> " "	ATCC 33320 ATCC 33994	F 44 F 96	77-167 78-29		S ⁽⁴⁾ Ea	GAVINI GAVINI
<i>Cedecea davisae</i> <i>Cedecea lapagei</i>	CIP ^(h) (= CDC 3278-77 (= ATCC 33431) CIP 80-35 (= CDC 0485-76) (= ATCC 33432)		82-55 82-54		F ⁽⁵⁾ M	
<i>Citrobacter freundii</i> " " " " " "	ATCC 8090 CDC 2987-57 ATCC 6750 CDC 460-61	B 111	77-25 77-23 77-20 77-11		? ⁽⁶⁾ ? F ?	EWING EWING
<i>Edwardsiella hoshinae</i>	CIP 78-56 (= ATCC 33379)		82-53	(= GRIMONT 2-78)	M	

TABLEAU XII : Liste des souches représentant les espèces de la famille
des *Enterobacteriaceae*
Références : voir page 62



SOUCHES RECUES COMME	REFERENCES COLLECTIONS OFFICIELLES	REFERENCES COLLECTIONS PRIVEES			ORIGINE	RECUES DE :
		GAVINI et coll. (39, 42)	CUETM	AUTRES		
<i>Edwardsiella ictaluri</i>	ATCC 33202		83-3		Ps (?)	
" <i>tarda</i>	ATCC 15947 (= CDC 1483-59)		78-301		F	
<i>Enterobacter aerogenes</i> (= <i>K. mobilis</i>)	ATCC 13048	f121 (= d ₃)	77-29		M	
" "	CDC 2979-69		79-39		?	
" <i>agglomerans</i>	CDC 1461-67 (= ATCC 27155)		77-28		M	EWING
" <i>amigenus</i>	ATCC 33072	H ₃ - 145	77-118		Ea	GAVINI
" "		H ₃ - 140	78-65			"
" <i>cloacae</i>	ATCC 13047	G - 4	77-27		M	
" "	CDC 1347-71		77-39		?	BRENNER

TABLEAU XII. : Liste des souches représentant les espèces de la famille
(suite) des *Enterobacteriaceae*

Références : voir page 62



SOUCHES RECUES COMME.	REFERENCES COLLECTIONS OFFICIELLES	REFERENCES COLLECTIONS PRIVEES.			ORIGINE	RECUES DE :
		GAVINI et coll. (39, 42)	CUETM	AUTRES		
<i>Enterobacter cloacae</i>		G-97	77-134		ES ⁽⁸⁾	GAVINI
" "		G-45	77-120		F	"
" "		G-127	77-126		Ea	"
" "		G-35	77-121		F	"
" <i>gergoviae</i>	CIP 76-01 (= ATCC 33028)		79-01		M	
" "	CIP 76-02				M	
" <i>intermedium</i>	CIP 79-27 (= ATCC 33110)	H ₁ - 86	77-130		ES	GAVINI
" "	ATCC 33421	H ₁ - 99	77-123		Ea	"
" <i>sakazaki</i>	CDC 4562-70 (= ATCC 29544)		83-123		M	
" "		D ₂ - 19	79-104	RICHARD 7-75	M	RICHARD

TABLEAU XII : Liste des souches représentant les espèces de la famille
(suite) des *Enterobacteriaceae*
Références : voir page 62



SOUCHES RECUES COMME	REFERENCES COLLECTIONS OFFICIELLES	REFERENCES COLLECTIONS PRIVEES			ORIGINE	RECUES DE :
		GAVINI et coll (39, 42)	CUETM'	AUTRES		
<i>Enterobacter sakazakii</i>		D ₂ - 23	79-103	RICHARD 16-76	M	RICHARD
" "		--	80-32	" 20-77	M	"
<i>Erwinia amylovora</i>	ATCC 7400	--	77-48		P	BRENNER
" <i>carotovora</i>	ATCC (=NCPPB 312)	A - 142	79-140		"	
" <i>dissolvens</i>	ATCC 23373	151	77-43		"	BRENNER
Es. <i>adecarboxylata</i>	ATCC 23216		77-3		Ea	
" <i>blattae</i>	ATCC 29907	--	83-90		Blatte	
" <i>coli</i>	ATCC 10536	CA ₅ -90	77-1		?	
" "		CA ₄ -28	81-60		Ea	GAVINI
" "		CA ₅ -66	81-57		ES	"
" "		CA ₄ - 19	81-65		F	"
" <i>hermani</i>	ATCC 33650 (= CDC 980-72)	--	82-71		M	

TABLEAU XII : Liste des souches représentant les espèces de la famille
(suite) des *Enterobacteriaceae*
Références : voir page 62



SOUCHES RECUES COMME	REFERENCES COLLECTIONS OFFICIELLES	REFERENCES COLLECTIONS PRIVEES			ORIGINE	RECUES DE :
		GAVINI et coll. (39,42)	CUETM	AUTRES		
<i>Escherichia vulneris</i>	ATCC 33821 (= CDC 875-72)	--	83-92		M	
<i>Hafnia alvei</i>	ATCC 13337	I-2	77-33		?	
<i>Klebsellia oxytoca</i>	ATCC 13182	M-2	--		M	
" <i>planticola</i>	ATCC 33531	--	83-94		P'	
" <i>pneumoniae</i>	ATCC 13882	J-1	77-44		?	
" "	NCTC (i)9636	--	79-297		?	
" <i>trevisanii</i>	CIP 81-36 (= ATCC 33558)	K-70	78-120		Ea	GAVINI
" <i>terrigena</i>	ATCC 33257	L-84	77-176		Ea	"
" "	ATCC 33629	L-80	78-141		"	"
" "	ATCC 33630	L-66	78-155		"	"
" "		F-82	78-132		"	"

TABLEAU XII : Liste des souches représentant les espèces de la famille
(suite) des *Enterobacteriaceae*

Références : voir page 62.



SOUCHES RECUES COMME	REFERENCES COLLECTIONS OFFICIELLES	REFERENCES COLLECTIONS PRIVEES			ORIGINE.	RECUES DE :
		GAVINI et coll. (39,42)	CUETM	AUTRES		
<i>Kluyvera ascorbata</i>	ATCC 33433	--	81-54		M	FARMER
" "	ATCC 33434	--	81-52		M	"
" <i>cryocrescens</i>	ATCC 33435	--	81-51		A(9)	"
" "	ATCC 14237	--	81-50		EU ⁽¹⁰⁾	"
" "	ATCC 14238	--	81-49		EU	"
<i>Levinea amalonatica</i>	CDC 25406	--	77-26		?	BRENNER
" <i>malonatica</i>	CDC 25408 (= NCTC 10810)	--	77-4		?	"
<i>Proteus mirabilis</i>	ATCC 9240	--	77-79		?	
" <i>morgani</i>		--	77-83	VÉRON 119	?	VÉRON
" <i>penneri</i>	ATCC 33519	--	83-12		M	
" <i>vulgaris</i>	ATCC 13315	--	77-80		?	

TABLEAU XII : Liste des souches représentant les espèces de la famille
(suite) des *Enterobacteriaceae*

Références : voir page 62



SOUCHES RECUES COMME	REFERENCES COLLECTIONS OFFICIELLES	REFERENCES COLLECTIONS PRIVEES			ORIGINE	RECUES DE :
		GAVINI et coll. (39,42)	CUETM	AUTRES		
<i>Providencia alcalifaciens</i>	ATCC 13159	--	77-84		M	
" <i>rettgeri</i>	NCTC 2481	--	77-77	VERON 116	?	VERON
" <i>stuartii</i>	ATCC 29914	--	80-105		?	
<i>Rahnella aquatilis</i>	ATCC 33071	H ₂ - 133	77-115		Ea	GAVINI
" "	ATCC 33991	H ₂ - 173	78-85		S	"
" "	ICPB 4279	H ₂ - 138	78-71		Ea	GAVINI
<i>Salmonella arizonae</i>	CDC -62 (= ATTC 29934)	--	80-16		?	BRENNER
" <i>typhimurium</i>	ATCC 23565	--	77-61		?	
" "		--	77-64	LT2	?	BRENNER
<i>Serratia ficaria</i>	(ICPB 4050) (CIP 7923) ATCC 33105	--	82-56		P	

TABLEAU XII : Liste des souches représentant les espèces de la famille
(suite) des *Enterobacteriaceae*
Références : voir page 62



SOUCHES RECUES COMME	REFERENCES COLLECTIONS OFFICIELLES	REFERENCES COLLECTIONS PRIVEES			ORIGINE	RECUES DE :
		GAVINI et coll. (39,42)	CUETM	AUTRES		
<i>Serratia fonticola</i>	ATCC 29844 (= ICPB 4268)	C11	77-165		Ea	GAVINI
" <i>grimesii</i>	ATCC 14460	--	77-51		?	
" <i>liquefaciens</i>	ATCC 27592	--	83-18		?	
" <i>marcescens</i>	ATCC 13880	S _{A2} ²¹	77-58		ES	
" "	CDC 868-57	--	77-57		?	BRENNER
" <i>rubidaea</i>	CDC 934-72	--	79-46		?	"
" "	CDC 2199-72 (= ATCC 27593)	S _{A1} ²²	80-31		?	
<i>Shigella boydii</i>		--	77-68	VERON ⁽²³⁾	?	VÉRON
" <i>sonnei</i>	ATCC 9290	--	77-65		?	
<i>ratumella ptyseos</i>	ATCC 33301 (=CDC 9591-78) { = CIP 81-97)	--	81-62		M	

TABLEAU XII : Liste des souches représentant les espèces de la famille
(suite) des *Enterobacteriaceae*
Références : voir page 62



SOUCHES RECUES COMME	REFERENCES COLLECTIONS OFFICIELLES	REFERENCES COLLECTIONS PRIVEES			ORIGINE	RECUES DE :
		GAVINI et coll. (39,42)	CUETM	AUTRES		
<i>Yatumella ptyseos</i>				45	M	
<i>Yersinia enterocolitica</i>	CIP 80-27	--	82-49		M	
" <i>frederiksenii</i>	CIP 80-29	--	82-51		EU	
" <i>intermedia</i>	CIP 80-28	--	82-50		M	
" <i>kristensenii</i>	CIP 80-30	--	82-52		M	
" <i>pseudotuberculosis</i>		--	77-92	VERON 139		VERON
" <i>ruckeri</i>	ATCC 29473	--	80-109		Ps	BRENNER

TABLEAU XII : Liste des souches représentant les espèces de la famille
(suite) des *Enterobacteriaceae*.

(a) = CUETM : Collection de l'Unité d'Ecotoxicologie Microbienne, VILLENEUVE D'ASCQ, France; (b) = CDC : Center for Disease Control, ATLANTA, Georgia, U.S.A. ; (c) = ICPB : International Collection of Phytopathogenic Bacteria University of California, DAVIS, California; (d) = NCIB : National Collection of Industrial Bacteria, Torry Research Station, ABERDEEN, Scotland, U.K. ; (e) = ATCC : American Type Culture Collection, ROCKVILLE, Maryland, U.S.A. ; (f) = NCPPB : National Collection of Plant Pathogenic Bacteria, HARPENDEN, Great Britain ; (g) = PDDCC : Culture Collection of Plant Diseases Division, New Zealand, Department of Scientific and Industrial Research, AUCKLAND, New Zealand ; (h) = CIP : Collection de l'Institut Pasteur, PARIS, France ; (i) = NCTC : National Collection of Type Culture, LONDON, England .

(1) = Ea : eau d'alimentation ; (2) = M : origine médicale ; (3) = P : plante ; (4) = S : sol ; (5) = F : matières fécales ; (6) = ? : origine inconnue ; (7) = Ps : poissons ; (8) = ES : eaux de surface ; (9) = A : aliments ; (10) = EU : eaux usées.

BUS
LIFE

II. MILIEUX DE CULTURE :

- a) Gélose nutritive (Institut Pasteur Production)
- b) Bouillon nutritif (Institut Pasteur Production)
- c) Milieu de culture utilisé pour le marquage de l'ADN

Trois solutions entrent dans la composition de ce milieu synthétique. Leurs formules sont les suivantes :

- Solution de métaux :

. eau distillée.....	1000	ml
. EDTA.....	5	g
. ZnSO ₄	2,2	g
. MnSO ₄	0,57	g
. FeSO ₄	0,5	g
. CaCl ₂ , 7H ₂ O	0,161	g
. CuSO ₄	0,157	g
. Na ₂ MoO ₄	0,151	g

Ajuster à pH = 6 avec une solution aqueuse de KOH (N);
conserver à + 4° C.

- Solution de base :

. eau distillée	500	ml
. CaCl ₂	0,025	g
. MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,2	g
. KH ₂ PO ₄	0,75	g
. K ₂ HPO ₄	1,04	g

Ajuster à pH = 6,8. Ajouter 3 ml de solution de métaux, 2 g de glucose et 2 g de casamino-acide (DIFCO). Stériliser à l'autoclave pendant 30 minutes à 105 ° C.

- Solution azotée :

. eau distillée.....	500	ml
. NaCl	0,1	g
. (NH ₄) ₂ SO ₄	0,5	g

Ajuster à pH = 6,8 . Stériliser à l'autoclave à 120 ° C pendant 20 minutes.

- Milieu final :

Mélanger la solution de base et la solution azotée volume à volume.

III. RÉACTIFS :

a) Solution saline - EDTA

. NaCl	0, 15	M
. EDTA	0, 1	M
. eau distillée	1000	ml

Ajuster à pH = 8 avec une solution aqueuse de NaOH (5N).

b) Dodécyl sulfate de sodium (SDS)

e

. Dodécyl sulfate de sodium.....	25	g
. eau distillée	100	ml

Verser très lentement le SLS dans l'eau distillée légèrement chauffée. Conserver à 37 ° C.

c) Solution de NaCl (5 M)

d) Mélange de Chloroforme - alcool isoamylique.

- . Chloroforme (PROLABO) 24 volumes
- . Alcool isoamylique (PROLABO) .. 1 volume

e) Alcool éthylique à 95 %.

Conserver à - 20°C.



f) Solution saline citratée (= SSC)

- . NaCl 8,766 g/l
- . Citrate trisodique, 2H₂O (MERCK) 4,411 g/l

Ajuster à pH = 7 avec une solution aqueuse d'acide chlorhydrique (N/10) . Conserver à + 4° C.

Remarque :: 0,1 SSC = diluer au 1/10 la solution précédente.

- . 10 SSC = multiplier les quantités de NaCl et de citrate trisodique par 10.

g) Solution de ribonucléase A (N° R-4875 SIGMA) à 0,2 % dans SSC.

- . Ribonucléase 200 mg
- . SSC 100 ml

Après dissolution, chauffer pendant 10 minutes au bain-marie à 100° C afin de détruire les impuretés (DN^{ases}) . Conserver à - 20° C.

h) Isopropanol (RP PROLABO)

i) Solution de pronase (CALBIOCHEM) à 0,2 % dans SSC.

. Pronase	200	mg
. SSC	100	ml

Après dissolution, placer la solution à 37 ° C pendant 2 heures. Conserver à + 4° C.

j) Thymidine ³H-6 (CEA - SACLAY - France)

. Activité totale	1	mCi
. Activité spécifique	27	Ci/m Mole
. Solution aqueuse stérile	0,5	ml

k) Solution aqueuse à 1 % de désoxy-2'-adénosine.

. Désoxy-2'-adénosine	1	g
. eau distillée	100	ml

Filtrer à travers une membrane filtrante de 0,22 u.

B - MÉTHODES

La méthode d'hybridation a été décrite par DE LEY et TYTGAT en 1970 (29) ; elle fait intervenir un phénomène de compétition entre un ADN froid X, dénaturé et fragmenté (= ADN étranger) et l'ADN radioactif A, dénaturé et fragmenté (= ADN de référence) vis-à-vis de l'ADN froid, dénaturé, non fragmenté et immobilisé sur un filtre de nitrocellulose (44) selon le schéma de la figure 3 , page 67 .

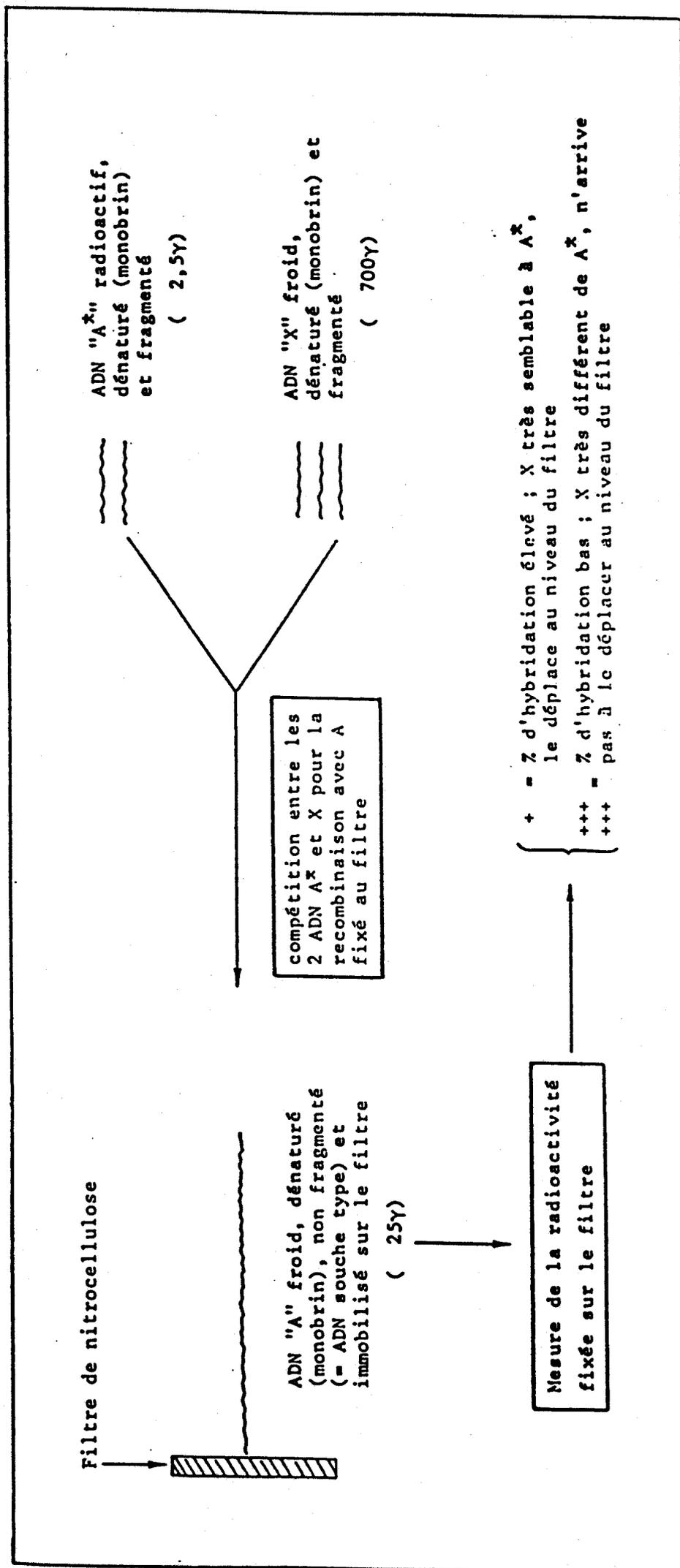


FIGURE 3 : Principe de l'hybridation sur filtre de nitrocellulose (technique de compétition; DE LEY et TYTGAT, 29).

D'après IZARD (50, 51).



Les différentes étapes de la méthode d'hybridation ADN/ADN sont les suivantes :

- Extraction de l'ADN froid (souche type et souches à hybrider).
- Marquage de l'ADN de référence (souche type).
- Détermination du GC % de l'ADN de la souche type afin d'en déduire la température optimale d'hybridation.
- Fixation de l'ADN froid de référence (souche type) sur le filtre de nitrocellulose.
- Fragmentation des ADN (souche type : ADN froid et marqué; des souches à hybrider) afin de faciliter la recombinaison et d'éviter la formation de faux hybrides.
- Etablissement de la courbe de compétition permettant de déterminer la quantité d'ADN de référence (souche type) compétitif.
- Hybridation proprement dite.

Ces stades successifs vont être exposés en détail dans les paragraphes suivants.

I. EXTRACTION DE L'ADN FROID :

La technique utilisée est celle de MARMUR (61) légèrement modifiée par FERRAGUT et LECLERC (36).

- On cultive les bactéries dans 50 ml de bouillon à 30 ° C (préculture), avec agitation, pendant 12 heures.
- Cette préculture sert à ensemercer un ballon de 600 ml de bouillon nutritif ; la culture est agitée et maintenue à 30° C durant 24 heures.
- Centrifuger le bouillon de culture obtenu, à 17000 g, à la température de + 5° C (centrifugeuse BECKMAN J 21 B), pendant 10 minutes.

- Mettre en suspension le culot bactérien dans 50 ml de solution saline d'EDTA (lavage des bactéries).

- Centrifuger comme précédemment et peser le culot bactérien.

- Remettre en suspension le culot bactérien dans de la solution saline d'EDTA (50 ml pour 2 à 3 g de bactéries, 100 ml pour des poids supérieurs).

- Déprotéiniser en ajoutant de la pronase (concentration finale : 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, soit 5,12 ml pour 200 ml de solution saline d'EDTA) et du dodécyl sulfate de sodium (concentration finale : 0,5 %, soit 4,05 ml pour 200 ml de solution saline d'EDTA) et laisser 16 h à 37 ° C.

- Ajouter la même quantité de dodécyl sulfate de sodium que précédemment de façon à obtenir une concentration finale de 1 %.

- Ajuster la solution obtenue avec la solution de NaCl (5 M) de façon à obtenir une concentration finale de 1 M (soit 40 ml pour 200 ml de solution saline d'EDTA).

- Ajouter un volume égal de mélange chloroforme (24 volumes) alcool isoamylique (1 volume).

- Agiter doucement pendant 30 minutes puis centrifuger à 4500 tours/minute pendant 30 minutes, à la température de + 5° C.

- Recueillir, par aspiration sous vide, la phase aqueuse qui contient l'ADN et poursuivre la purification avec le mélange chloroformique jusqu'à disparition de l'interphase qui contient les protéines.

- Verser la phase aqueuse purifiée dans un bécher et précipiter l'ADN par l'éthanol conservé à - 20 ° C ; l'ADN filamenteux est enroulé progressivement sur une baguette de verre.

- Dissoudre l'ADN obtenu dans 30 ml de solution saline d'EDTA à la température de 40 ° C et éliminer l'ARN contaminant par la RNase pancréatique ajoutée de façon à atteindre une concentration finale de 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (soit 1,3 ml pour 50 ml de solution saline d'EDTA).

- Placer 1 heure à 60 ° C puis renouveler la déprotéinisation comme précédemment.

- Précipiter l'ADN par l'éthanol conservé à - 20 ° C ; dissoudre dans 10 ml environ de 0,01 SSC puis porter à 40 ° C jusqu'à dissolution.

- Réajuster la concentration en sel avec du 10 SSC (1 ml pour 10 ml de solution 0,01 SSC).

- Reprécipiter l'ADN, d'abord par l'éthanol à froid avec redissolution dans 10 ml environ de 0,01 SSC, ensuite par l'isopropanol avec dissolution dans environ 2 ml de 0,1 SSC.

- Dialyser la solution d'ADN obtenue contre 1,5 l de 0,1 SSC pendant 24 heures (et ceci 2 fois de suite), sous agitation, à la température de + 4 ° C (tube à dialyse 22/32, SCIENTIFIC INSTRUMENT).

- Après dialyse, conserver l'ADN à la température de -20 ° C en ajoutant une à deux gouttes de chloroforme.

La pureté de la préparation obtenue est vérifiée selon la technique exposée au paragraphe III.

L'absence de dénaturation de l'ADN est contrôlée en effectuant une courbe de dénaturation (paragraphe III) : l'hyperchromicité doit être comprise entre 30 et 40 % selon MANDEL et MARMUR (60).

II. MARQUAGE DE L'ADN :

Il consiste à ajouter au milieu de culture synthétique (voir matériel) un précurseur radioactif (Thymidine ³H-6, activité spécifique 27 Ci/mMole - 1 mCi/marquage) qui est incorporé dans l'ADN au cours de la biosynthèse. La désoxy-2'-adénosine froide favorise l'incorporation en entrant en compétition avec les systèmes enzymatiques catabolisant la thymidine (59, 62).

La technique est la suivante :

- Ensemencer la souche dans 20 ml de milieu synthétique liquide contenu dans un erlen (A) et placer celui-ci dans un bain-marie agité, à 30 ° C pendant 7 heures environ.

- Prélever 2 ml de bouillon de (A) afin d'inoculer un erlen analogue (B) dans les mêmes conditions que précédemment (7 h).

- Recommencer l'opération avec un nouvel erlen (C), puis après 3 h 1/2 d'agitation, mesurer la DO du bouillon à 650 nm.

- Calculer alors le nombre (x) de ml de bouillon nécessaire pour obtenir dans 300 ml de milieu neuf une DO (650 nm) d'environ 0,01 ; on utilise la formule suivante :

$$(300 + x) \times 0,01 = x \times DO (\text{à } 650 \text{ nm})$$

- Placer l'erlen contenant le milieuensemencé dans un bain-marie avec dispositif d'agitation (température : 30 ° C).

- Après 1/2 h, ajouter au milieu 12,5 ml de solution de désoxy-2'-adénosine froide et 0,5 ml de solution de thymidine tritiée (1 mCi-conditionnement CEA, SACLAY, France). La culture est mise en agitation pendant 3 h.

L'extraction de l'ADN radioactif est effectuée selon le protocole défini pour l'ADN froid.

L'activité spécifique (nombre de cpm/ μ g d'ADN) est de l'ordre de 80 à 100.000 cpm/ μ g d'ADN obtenu.

III. DÉTERMINATION DU GC % $\left(\frac{\text{Guanine} + \text{Cytosine}}{\text{basés totales}} \right) \%$

Cette mesure s'effectue en milieu salin (SSC).

- Prendre x ml de la solution concentrée d'ADN auxquels on ajoute y ml de 10 SSC selon la formule : $y = 0,1 x$ puis diluer au 1/5^e avec du SSC afin d'obtenir un volume convenable à dialyser contre SSC.

- Verser la solution obtenue dans un tube à dialyse (SCIENTIFIC INSTRUMENT, 22/32) que l'on immerge dans 1,5 litre de solution SSC, agitée à l'aide d'un barreau magnétique et refroidie à + 4 ° C (chambre froide).

- Après 24 heures de dialyse, vérifier la pureté de la préparation d'ADN en mesurant les rapports d'absorption 260/280 nm et 260/230 nm qui doivent être respectivement au moins égaux à 1,8 et 2 selon MARMUR (61).

- La détermination du GC % s'effectue par dénaturation thermique, à l'aide d'un spectrophotomètre UVIKON 820, fonctionnant en double faisceaux.

- L'ADN est placé dans une cellule que l'on chauffe progressivement au moyen d'un bain-marie HAAKE relié à un programmeur de température HAAKE PG 20.

- La densité optique (DO) à 260 nm et la température sont enregistrées simultanément sur l'imprimante du spectrophotomètre.

- Le phénomène de dilution de la solution d'ADN, consécutif à l'expansion thermique, est corrigé dans tous les cas (60).

- Le GC % des souches analysées est calculé d'après la formule de DE LEY (27) :

$$\text{GC \%} = 2,44 (T_m - 69,4)$$

Le T_m est la température pour laquelle 50 % de l'ADN est dénaturé. La détermination de ce paramètre est effectuée par dérivation des mesures de DO en fonction de la température suivant l'équation :

$$\frac{\Delta DO}{\Delta t} = f (t^\circ)$$

et interpolation linéaire de la médiane (36) (figure 4, page 74).

Le nombre des mesures du GC % est au minimum de 3 ; les déterminations sont recommencées jusqu'à ce que l'intervalle de confiance pour une probabilité d'erreur de 1 % soit inférieur ou égal à 3.

IV. FILTRATION :

Cette manipulation consiste à fixer l'ADN du système de référence (froid, dénaturé et non fragmenté) sur le filtre de nitrocellulose.

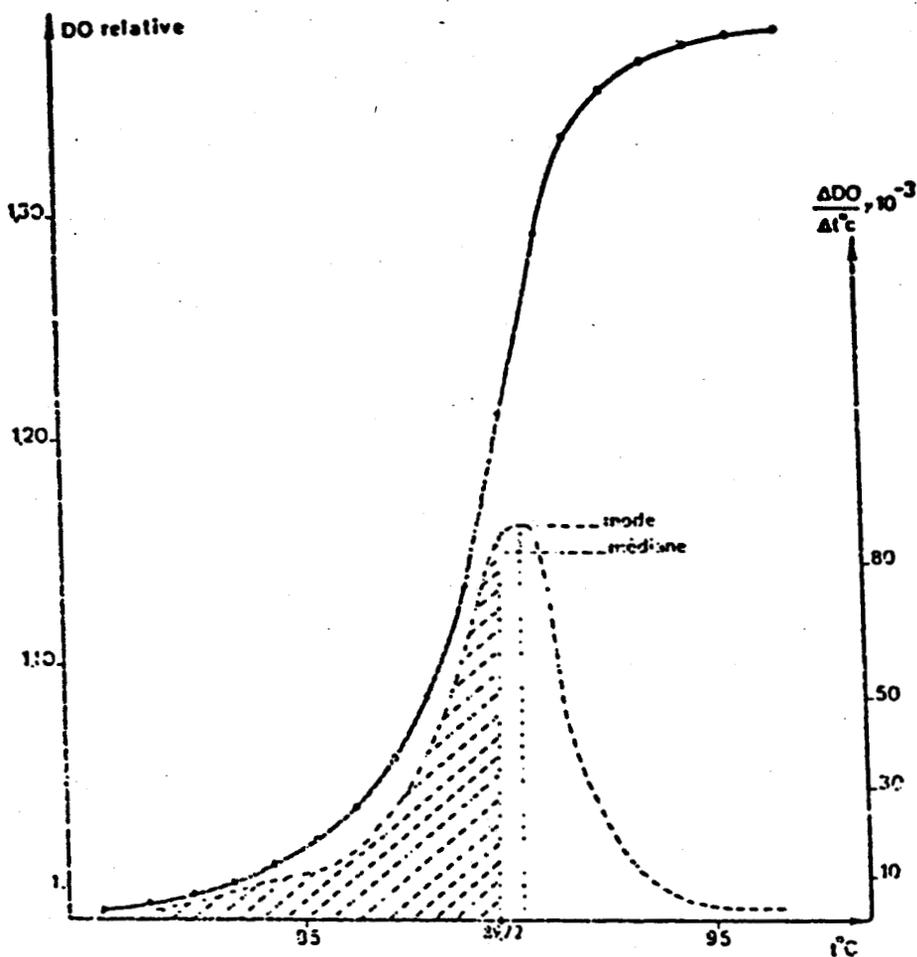


FIGURE 4 : Courbe de dénaturation (—) et dérivée de la courbe de dénaturation (-----) de l'ADN natif de *Es. coli* ATCC 10536

Interprétation graphique de la médiane
D'après FERRAGUT (36)

t correspond à un intervalle de 1°C. La médiane sépare la surface située sous la courbe de fusion différentielle en deux moitiés égales. Elle indique la valeur du T_m .

La technique utilisée est la suivante :

- Préparer une solution de 500 μ g d'ADN dans 5 ml de 0,1 SSC.
- Mesurer la DO (à 260 nm) de la solution obtenue en cuve de quartz de 1 cm de côté. Cette DO (DO₁) doit être proche de 2.
- Reprendre l'ADN versé sans la cuve du spectrophotomètre et le dénaturer par chauffage à 105 ° C pendant 15 mn ; maintenir l'ADN à l'état dénaturé par agitation pendant quelques minutes, dans la glace fondante.
- Ajouter à la solution d'ADN dénaturé 7,37 ml de 10 SSC (refroidi à + 4° C) ; cette opération permet de réaliser une concentration de 6 SSC, nécessaire à la fixation de l'ADN sur le filtre (SARTORIUS SM 11358).
- Prélever 0,6 ml de la solution d'ADN en 6 SSC ; ajouter 0,6 ml de 6 SSC (conservé à + 4° C) et mesurer la DO (à 260 nm). Le mélange est fait dans la cuve du spectrophotomètre, soit DO₂.
- Disposer le filtre précédemment immergé pendant 2 heures dans de l'eau distillée (à + 4 ° C) sur un dispositif mis au point à cet effet (figure 5).
- Imprégner le filtre de 6 SSC (0 + 4° C) en versant 20 à 30 ml de 6 SSC dans le dispositif.
- Filtrer lentement la solution d'ADN sur l'appareil après avoir changé le tube conique (figure 5) ; ajouter le liquide de rinçage (5 ml SSC) du tube pyrex qui a servi à la dénaturation.
- Mesurer la DO (à 260 nm) du filtrat : soit DO₃.
- Après avoir branché un nouveau tube conique, rincer le filtre avec 25 ml de 6 SSC (conservé à + 4 ° C) ; soit DO₄, la DO du solvant (6 SSC) de rinçage.

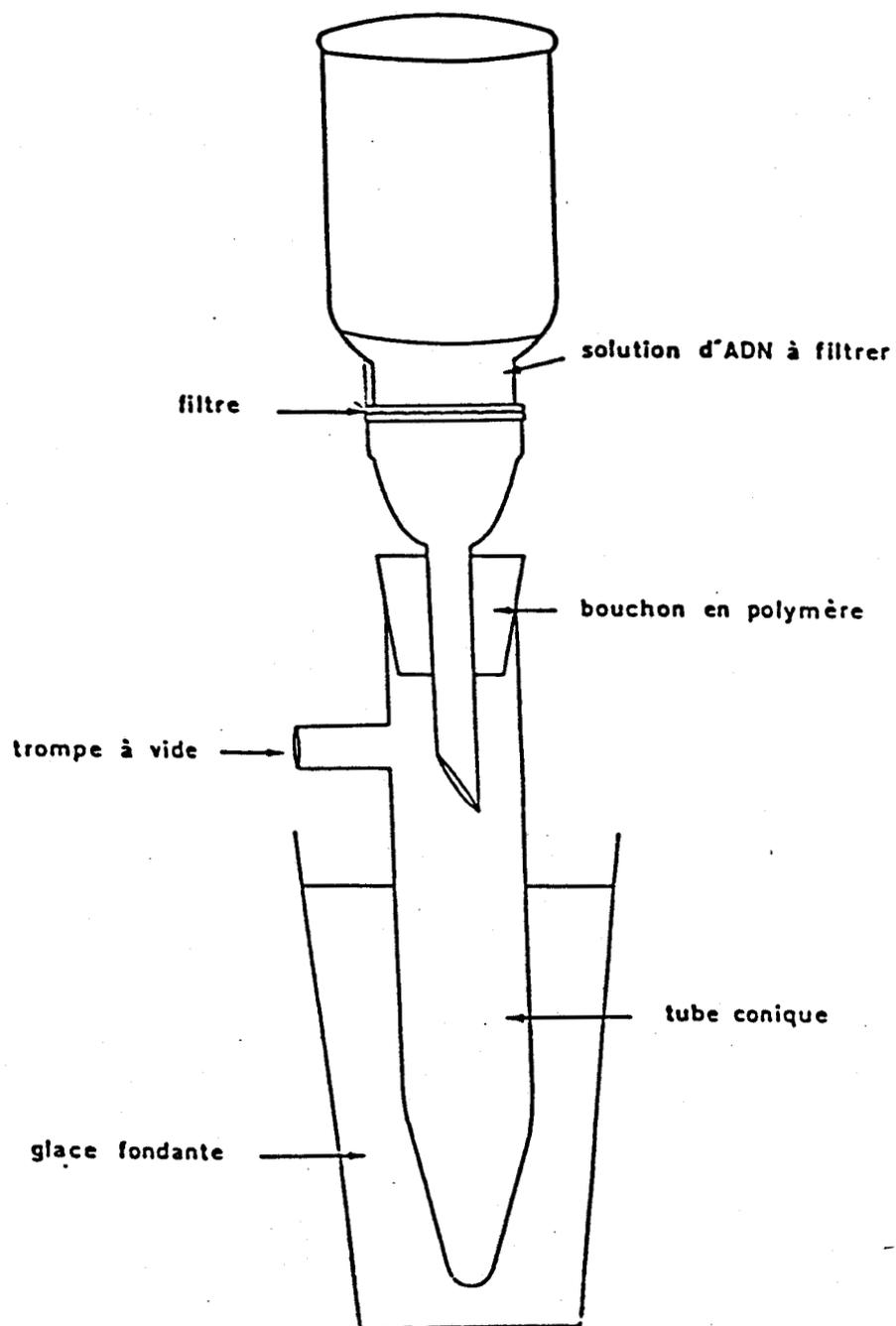


FIGURE 5 : Dispositif de filtration - D'après IZARD (50)

- Retirer le filtre et délimiter la zone de fixation de l'ADN à l'aide d'un crayon; sécher pendant 2 heures à 80 ° C sous un vide de 70 Torr; conserver dans une cloche à vide.

Les calculs suivants permettent de déterminer le nombre de γ/cm^2 d'ADN retenu.

- Nombre de γ d'ADN/ml dans 1 ml de solution à filtrer:

$$x = \frac{DO_1 \times 1000}{20}$$

- Nombre de γ d'ADN dans les 5 ml de solution à filtrer:

$$x = 5x$$

- Nombres de γ d'ADN/ml après addition de 10 SSC (7,37 ml):

$$Y = \frac{X}{12,37}$$

- DO espérée après dénaturation :

$$DO_e = \frac{Y \times 20}{1000}$$

- DO observée après dénaturation :

$$DO_o = 2 DO_2$$

- Paramètre d'appréciation de la dénaturation :

$$R = \frac{DO_o}{DO_e} \quad (\text{Il doit être } > 1,1)$$

- Calcul de la quantité d'ADN perdue lors de la mesure de DO₂ :

$$a = \frac{X \times 0,6}{12,37}$$

- Calcul de la quantité d'ADN non fixée lors de la filtration :

$$b = \frac{DO_3 \times 1000 \times 16}{20 \times R}$$

- Calcul de la quantité d'ADN perdue lors du rinçage du filtre :

$$c = \frac{DO_4 \times 1000 \times 25}{20 \times R}$$

- Rendement de la filtration (= pourcentage de rétention) :

$$\text{rétention} = \frac{X - (a + b + c) \times 100}{X}$$

- Calcul du nombre de γ d'ADN par cm² de filtre :

$$\text{nombre de } \gamma/\text{cm}^2 = \frac{X - (a + b + c)}{9,62}$$

9,62 = surface du filtre en cm² (diamètre = 35 mm).

V. FRAGMENTATION DE L'ADN :

La taille des fragments d'ADN marqué et d'ADN compétitif doit être parfaitement calibrée.

Des fragments trop longs facilitent la formation de faux hybrides comme le montre le schéma ci-dessous :

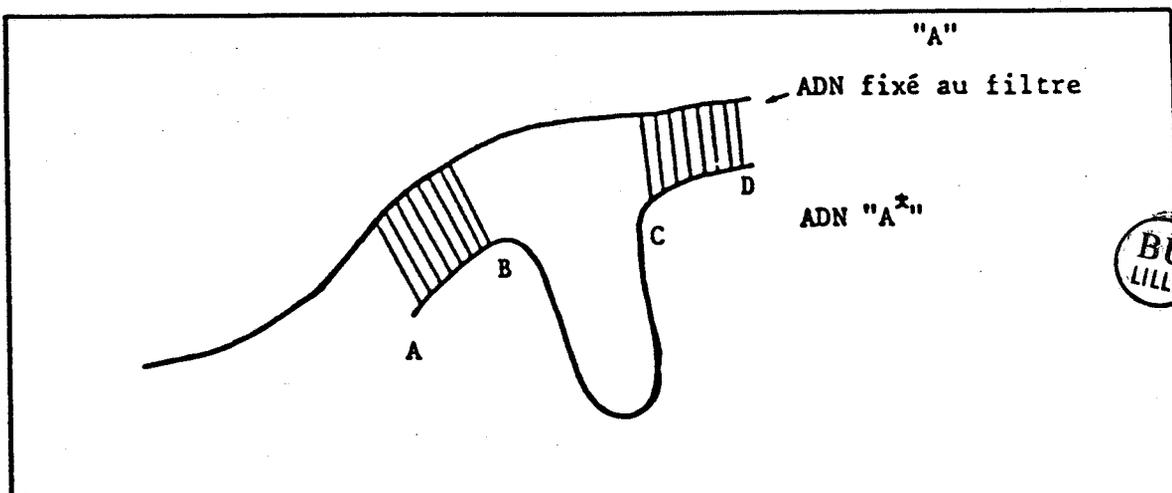
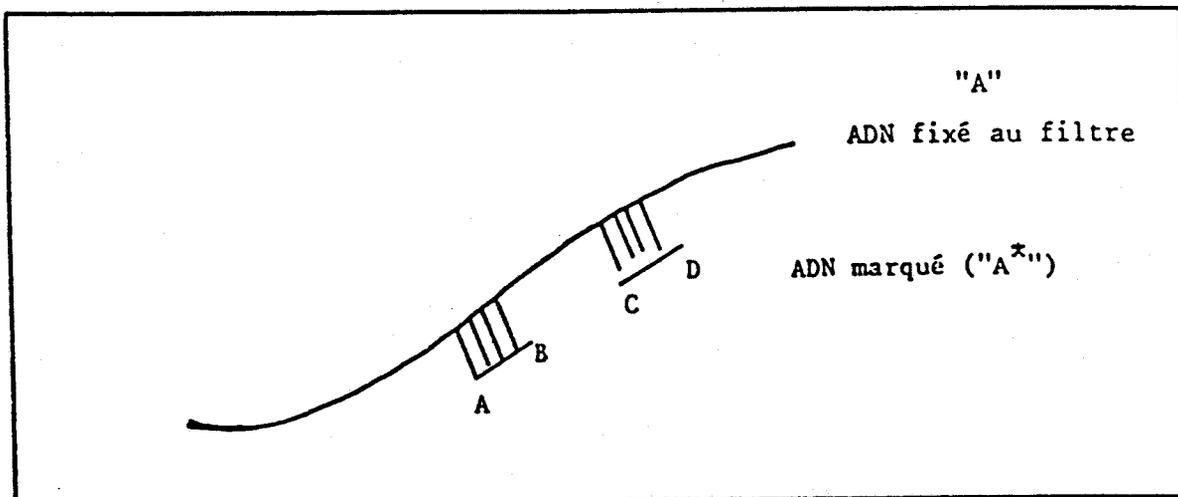


FIGURE 6

Au cours du comptage, la radioactivité du segment BC est intégrée. Le pourcentage d'hybridation ne correspond plus à la réalité. Il faut fragmenter l'ADN de telle sorte que la radioactivité due aux segments non appariés mais liés soit éliminée le plus possible, afin d'aboutir au schéma suivant :



La fragmentation augmente les chances de collision entre 2 brins homologues. Elle permet d'augmenter la précision de la mesure. Afin de satisfaire à ces 2 exigences, l'ADN radioactif et l'ADN compétitif sont fragmentés en segments de 4×10^5 daltons à l'aide d'une cellule de FRENCH (37) dont la pression correspond à 1470 kg/cm^2 . On peut estimer que l'ADN immobilisé sur le filtre a un poids moléculaire (PM) compris entre 5 et 10×10^6 daltons (29).

VI. COURBE DE COMPÉTITION :

La courbe de compétition permet de mesurer la quantité d'ADN froid de référence capable de déplacer le maximum d'ADN radioactif qui se recombine au filtre. Cette quantité définit le témoin 100 %.

La courbe ne donnant des informations que sur sa partie terminale, seuls les points 0, 500, 600, 700 et 800 sont étudiés.

Selon la technique décrite par DE LEY et TYTGAT (29), le volume final de la solution réactive est de 1,5 ml de 2 SSC - 30 % DMSO (Diméthylsulfoxyde). Le DMSO à la concentration de 30 % diminue lors de l'incubation, le relargage de l'ADN fixé au filtre (29, 58).

Les réactifs sont ajoutés dans l'ordre et les quantités suivantes:

- Eau distillée :

$$z = 1,5 \text{ ml} - (\text{volume des autres réactifs})$$

- 10 SSC

$$x = \frac{3 - (\text{vol. ADN}^* + \text{vol. ADN froid}) \times 0,1}{10}$$

- DMSO..... 0,45 ml

- ADN de référence, froid, fragmenté et dénaturé :

$$V = \frac{\text{nombre de } \mathcal{V} \text{ choisis (0, 500, 600, 700 et 800 } \mathcal{V} \text{)}}{\text{nombre de } \mathcal{V} \text{/ml de la solution 0,1 SSC}}$$

- ADN* de référence fragmenté et dénaturé :

$$Q = \frac{1}{10} \text{ quantité d'ADN froid immobilisé sur le filtre}$$



Le tableau VI résume l'ensemble des différentes opérations.

Réactifs	ADN compétitif	0 Y	500 Y	600 Y	700 Y	800 Y
H ₂ O		z ₁	z ₂	z ₃	z ₄	z ₅
10 SSC		x ₁	x ₂	x ₃	x ₄	x ₅
DMSO		0,45 ml				
ADN de référence froid, fragmenté et dénaturé		0	v ₁	v ₂	v ₃	v ₄
ADN* de référence, fragmenté et dénaturé		Q	Q	Q	Q	Q
Quantité d'ADN immobilisé sur le filtre		≈ 25 Y				

TABLEAU XIII Tableau de calcul d'une courbe de compétition



La température optimale de renaturation en 2 SSC - 30 % DMSO est déduite de la formule de DE LEY et TYTGAT (29) :

$$T_{OR,D} = 0,51 \times GC \% + 28,0$$

L'incubation s'effectue au bain-marie, dans des fioles de verre soumises à un mouvement de rotation; elle dure 16 heures. Les filtres sont ensuite séchés pendant 3 heures à 105 ° C. Le comptage de la radioactivité retenue sur les filtres est effectué dans 10 ml de liquide de BRAY (2) ou de LIPOLUMA[®] après contact de 12 heures. Quatre comptages de 4 minutes sont pratiqués sur chaque filtre. La courbe obtenue est représentée à la figure 8. La quantité d'ADN froid correspondant au témoin 100 % a toujours été trouvée égale à 700 Plors de nos expériences.

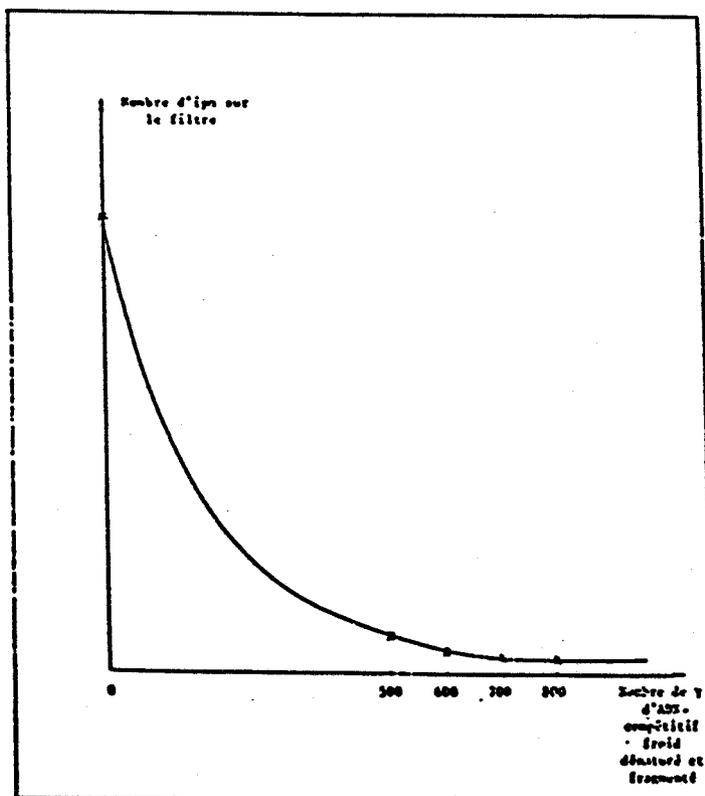


FIGURE 8 : Courbe de compétition - D'après IZARD (50).

VII. HYBRIDATION :

Le protocole est le même que celui de la courbe de compétition. L'ADN compétitif est remplacé par l'ADN à hybrider.

Les témoins blancs correspondent à une hybridation nulle (0 %), alors que le témoin souche type correspond à 100 % de réassociation.

Le tableau XIV montre un exemple de protocole de calculs d'après IZARD (50, 51).

Réactifs	Témoin blanc N° 1	Témoin blanc N° 2	Témoin Souche A	Souche X	Calcul
ADN froid "A" ou "X"	-	-	DO : 31,4	DO : 34,8	
"	-	-	Nombre de γ d'ADN/ml : $\frac{31,4 \times 1000}{20}$	Nombre de γ d'ADN/ml : $\frac{34,8 \times 1000}{20}$	
H ₂ O	0,483	0,483	0,041	0,085	1,5 ml - Volume autres réactifs
10 SSC	0,297	0,297	0,293	0,293	$x = \frac{3 - (\text{Vol. en ml "A"} + \text{Vol. en ml "X"}) \times 0,1}{10}$
DMSO	0,450	0,450	0,450	0,450	Volume constant quelle que soit la série d'hybridation
ADN froid "A" ou "X"	-	-	0,446 (ADN "A")	0,402 (ADN "X")	Volume correspondant à 700 γ
ADN "A*" à 10 γ /ml	0,27	0,27	0,27	0,27	Volume correspondant au 1/10e de la quantité d'ADN fixée au filtre
ADN "A"	27 γ	27 γ	27 γ	27 γ	Charge d'ADN comprise entre 20 et 30 γ (emporte-pièce)
Comptage dans 10 ml de BRAY	A	A'	B	X	Nombre de Cpm sur le filtre en fin de manipulation

Tableau XIV

Exemple d'hybridation entre l'ADN* de la souche A ("A*") et l'ADN froid de la souche X ("X").

Les valeurs numériques illustrent les formules générales exposées lors de la courbe de compétition.

Les volumes sont exprimés en ml. Le pourcentage d'hybridation est donné par la formule suivante :

$$\% (A^* \times X) = \frac{\frac{A + A'}{2} - X}{\frac{A + A'}{2} - B} \times 100 \quad - \quad \text{D'après IZARD (50, 51)}$$



CHAPITRE IV

RESULTATS

Une collection de 160 souches a été hybridée avec la souche *Es. adecarboxylata* E₅ LECLERC-36. Celles-ci se répartissent de la façon suivante :

- . Groupe E₅ (GAVINI et coll., 43) : 12 souches
- . Groupes de GAVINI et coll. (43) appartenant ou apparentés au complexe "*Erwinia herbicola* - *Enterobacter agglomerans* " : 45 souches représentant 15 groupes phénotypiques.
- . Groupes de BRENNER et coll. (20) appartenant ou apparentés au complexe "*Erwinia herbicola* - *Enterobacter agglomerans* " : 12 souches représentant 12 groupes génomiques.
- . *Enterobacteriaceae* : 90 souches représentant 58 espèces.

A - HOMOGÉNÉITÉ GÉNOMIQUE DU GROUPE E₅

L'ADN radioactif de la souche *Es. adecarboxylata* E₅ LECLERC-36 s'hybride entre 73 % et 100 % (tableau XV) avec les 12 autres souches du groupe. Le groupe E₅ apparaît particulièrement homogène. Cinq souches s'hybrident à 100 % avec la souche E₅ LECLERC-36. Une seule souche s'hybride à un taux inférieur à 87 % (*Es. adecarboxylata* E₅ LECLERC-35) avec la souche dont l'ADN est marqué.

SOUCHE RECUE COMME :	REFERENCES	% d'hybridation avec l'ADN* de la souche <i>Es. adecarboxylata</i> E ₅ LECLERC-36
<i>Es. adecarboxylata</i>	LECLERC-36	100 %
"	LECLERC-23	100 %
"	LECLERC-25	100 %
"	LECLERC-50	100 %
"	LECLERC-1	100 %
"	LECLERC-10	100 %
<i>En. agglomerans</i>	LILLE 15568	97 %
"	ICPB 3423	96 %
<i>Es. adecarboxylata</i>	LECLERC-49	95 %
"	LECLERC-44	92 %
<i>Er. herbicola</i>	ANGERS 467	92 %
<i>Es. adecarboxylata</i>	LECLERC-30	87 %
"	LECLERC-35	73 %

BU
LILLE

TABLEAU XV : Homogénéité du groupe E₅ . L'ADN de chacune des souches du groupe est hybridé (à 55,2°C) avec l'ADN radioactif (thymidine tritiée) de la souche *Escherichia adecarboxylata* E₅ LECLERC-36

ADN* : ADN radioactif
Références : voir matériel et méthodes.

B - RELATIONS GÉNOMIQUES ENTRE LE GROUPE E₅ ET LES GROUPES PHÉNOTYPIQUES DE GAVINI ET COLL. (43) :

Les relations génomiques entre le groupe E₅ et les autres groupes phénotypiques définis par GAVINI et coll. (43) à propos du complexe " *Erwinia herbicola* - *Enterobacter agglomerans* " ont été étudiées en hybridant l'ADN de souches représentant 15 groupes. Les taux d'hybridation obtenus figurent au tableau XVI.

Les groupes E₂ et E₃ dénommés " Coliformes atypiques " par GAVINI et coll. (43) à propos d'une étude de taxonomie numérique portant sur des souches appartenant ou apparentées à l'espèce *Es. coli*, s'hybrident fortement à la souche *Es. adecarboxylata* E₅ LECLERC-36.

GROUPES	SOUCHE RECUE COMME :	REFERENCES	% d'hybridation avec l'ADN* de la souche <i>Es. adecarboxy- lata</i> E ₅ LECLERC-36
Groupe B ₁	<i>Erwinia herbicola</i>	Angers B 243.3	30 %
	" "	Angers B 238.3	25 %
Groupe B ₂	" "	Angers A 17.6	22 %
Groupe B ₃	<i>En. agglomerans</i>	GILARDI 960	40 %
	"	" 1030	30%
Groupe B ₄	"	RICHARD 14-78	43 %
	"	GILARDI 749	43 %
	"	" 722	31 %
	"	RICHARD 4-78	30 %
	"	GILARDI 21	30 %
	<i>Erwinia-like</i>	ICPB 2953	28 %
	" <i>herbicola</i>	NCPPB 2971	27 %
	" "	GRAHAM G 155	26 %
	" "	" G 152	22 %
	" "	NCIB 9744	21 %
	" "	ICPB EH 101	20 %
	<i>Enterobacter pigmenté</i>	LECLERC a 97	18 %
	<i>Er. herbicola</i>	Angers E 10.6.1	18 %
<i>En. agglomerans</i>	GILARDI 698	16 %	
<i>Er. milletiae</i>	NCPPB 2519	16 %	
<i>En. agglomerans</i>	RICHARD 14-77	11 %	
<i>Enterobacter pigmenté</i>	LECLERC a 53	10 %	
Groupe B ₅	<i>Er. herbicola</i>	ATCC 14589	36 %

TABLEAU XVI : Hybridation (à 55,2 ° C) de la souche *Es. adecarboxy-
lata* E₅ LECLERC - 36 avec les groupes phénotypiques
définis par GAVINI et coll. (43) par analyse numéri-
que du complexe "*Erwinia herbicola* - *Enterobacter aggro-
merans* "

ADN* : ADN radioactif (thymidine tritiée)

Références : voir matériel et méthodes.

GROUPES	SOUCHE RECUE COMME :	REFERENCES	% d'hybridation avec l'ADN* de la souche <i>Es. adecarboxy- lata</i> E ₅ LECLERC-36
Groupe B ₅	<i>Er. herbicola</i>	Angers B 6.2.	28 %
	<i>En. agglomerans</i>	GILARDI 968	25 %
	"	" 961	21 %
Groupe B ₆	"	" 969	26 %
Groupe B ₇	"	RICHARD 13-78	44 %
Groupe B ₈	" <i>Er. lathyri</i> "	GRAHAM G 144	38 %
	" <i>Bacterium flavum</i> "	" 708	37 %
Groupe B ₉	<i>Er. herbicola</i>	Angers 217.8	44 %
Groupe D ₁	<i>En. agglomerans</i>	VAN VUUREN 84	25 %
	"	" 117	21 %
Groupe D ₃	"	RICHARD 17-18	43 %
Groupe E ₁	Coliforme atypique	GAVINI 98	32 %
	" "	" 102	30 %
	" "	" 101	24 %
Groupe E ₂	" "	" 24	79 %
	" "	" 83	78 %
	" "	" 23	78 %
	" "	" 82	76 %

TABLEAU XVI : hybridation (à 55,2 ° C) de la souche *Es. adecarboxylata* E₅ LECLERC - 36 avec les groupes phénotypiques définis par GAVINI et coll. (43) par analyse numérique du complexe "*Erwinia herbicola* - *Enterobacter agglomerans* "

ADN* : ADN radioactif (thymidine tritiée).

Références : voir matériel et méthodes.

GROUPES.	SOUCHE RECUE COMME :	REFERENCES	% d'hybridation avec l'ADN* de la souche <i>Es. adecarboxy- lata</i> E ₅ LECLERC-36
Groupe E ₃	Coliforme atypique " " " "	GAVINI 73 " 85 " 84	89 % 83 % 80 %
Groupe E ₄	<i>En. agglomerans</i>	GILARDI 552	47 %



TABLEAU XVI : Hybridation (à 55, 2°C) de la souche *Es. adecarboxylata* E₅ LECLERC - 36 avec les groupes phénotypiques définis par GAVINI et coll. (43) par analyse numérique du complexe "*Erwinia herbicola* - *Enterobacter agglomerans* "

ADN* : ADN radioactif (thymidine tritiée)
Références : voir matériel et méthodes.

Les taux sont de 76 - 79 % pour le groupe E₂ (4 souches étudiées) et de 80 - 89 % pour le groupe E₃ (3 souches étudiées).

L'apparement des autres groupes au groupe E₅ n'est au maximum que de 47 %. Parmi les groupes les plus proches, on note les groupes E₄ (47 % - 1 souche), B₉ (44 % - 1 souche), D₃ (43 % - 1 souche), B₇ (44 % - 1 souche), B₄ (10 - 43 % - 17 souches), B₃ (30 - 40 % - 2 souches).

L'apparement des autres groupes (B₁, B₂, B₅, B₆, B₈, D₁, E₁) est inférieur à 40 %.

C - RELATIONS GÉNOMIQUES ENTRE LE GROUPE E₅ ET LES AUTRES GROUPE GÉNOMIQUES DE BRENNER ET COLL. (20).

Les taux d'hybridation entre l'ADN radioactif de la souche *Es. adecarboxylata* E₅ LECLERC - 36 et 12 souches représentant chacune un groupe génomique défini par BRENNER et coll. (20) sont exposés au tableau XVII.

L'hybridation ADN/ADN montre un apparement très net entre le groupe E₅ et le groupe XI (77 %) et un apparement moyen (53 %) avec le groupe VII .

Les autres groupes n'ont que des relations génomiques très faibles (inférieurs à 43 %) avec le groupe E₅.

GROUPES	SOUCHE RECUE COMME :	REFERENCES	% d'hybridation avec l'ADN* de la souche <i>Es. adecarboxy- lata</i> E ₅ LECLERC-36
Groupe II	<i>En. agglomerans</i>	CDC 3123-70	31%
Groupe III	"	CDC 1429-71	43%
Groupe IV	"	CDC 1741-71	38%
Groupe V	"	CDC 3482-71	24%
Groupe VI	"	CDC 6070-69	22%
Groupe VII	"	CDC 6003-71	53%
Groupe VIII	"	CDC 5422-69	34%
Groupe IX	"	CDC 4388-71	39%
Groupe X	"	CDC 1600-71	31%
Groupe XI	"	CDC 5378-71	77%
Groupe XII	"	CDC 219-71	32%
Groupe XIII	"	CDC 1645-71	20%



TABLEAU XVII : Hybridation (à 55,2°) de la souche *Es. adecarboxylata* E₅ LECLERC - 36 avec les groupes définis par BRENNER et coll. (20) par hybridation ADN/ADN du complexe "*Erwinia herbicola* - *Enterobacter agglomerans* "

ADN* : ADN radioactif (thymidine tritiée)

Références : voir matériel et méthodes.

D - RELATIONS GÉNOMIQUES ENTRE LE GROUPE E₅ ET LES DIFFÉRENTES
ESPÈCES DE LA FAMILLE DES ENTEROBACTERIACEAE :

Ces relations sont exposées dans le tableau XVIII.

La souche type de l'espèce *Es. adecarboxylata* (ATCC 23216)
s'hybride à 100 % avec la souche *Es. adecarboxylata* E₅ LECLERC -
36.

Parmi les autres espèces représentant la famille des *Ente-
robacteriaceae* , ce sont les espèces *En. cloacae* (57 - 64 %, 6
souches) et *K. terrigena* (42 - 55 %, 4 souches) qui sont les plus
proches du groupe E₅.

L'apparementement entre le groupe E₅ et les genres *Entero-
bacter* et *Klebsiella* est confirmé avec les espèces *En. amnigenus*
(46 - 48 %, 2 souches), *En. gergoviae* (39 - 45 %, 2 souches),
En. sakazakii (37 - 45 %, 4 souches), *K. pneumoniae* (42 - 51 %, 2
souches), *K. oxytoca* (49 %, 1 souche), *K. mobilis* (syn.
En. aerogenes, 46 - 49 %, 2 souches).

ESPECES .	REFERENCES DES SOUCHES	% d'hybridation avec l'ADN* de la souche <i>Es. adecarboxylata</i> E ₅ LECLERC - 36
<i>Escherichia adecarboxylata</i>	ATCC 23216	100 %
<i>Enterobacter cloacae</i>	ATCC 13047	64 %
	CUETM 77-120	63 %
	CUETM 77-134	61 %
	CUETM 77-121	60 %
	CDC 1347-71	59 %
	CUETM 77-126	57 %
<i>Klebsiella terrigena</i>	CUETM 78-132	55 %
	ATCC 33630	53 %
	CIP 80-07	47 %
	ATCC 33629	42 %
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 13882	51 %
	NCTC 9636	42 %
<i>Klebsiella oxytoca</i>	ATCC 13182	49 %
<i>Enterobacter aerogenes</i> (= <i>Klebsiella mobilis</i>)	ATCC 13048	49 %
	CDC 2979-69	46 %
<i>Enterobacter amnigenus</i>	ATCC 33072	48 %
	CUETM 78-65	46 %
<i>Citrobacter diversus</i>	CDC 3613-63	47 %

BU
LILLE

TABLEAU XVIII : Hybridation (à 55,2°C) de la souche *Es. adecarboxylata* E₅ LECLERC - 36 avec les différentes espèces représentant la famille des *Enterobacteriaceae*

ADN* : ADN radioactif (thymidine tritiée)

Références : voir matériel et méthodes.

ESPECES	REFERENCES DES SOUCHES	% d'hybridation avec l'ADN* de la souche <i>Es. adecarboxylata</i> E ₅ LECLERC - 36
<i>Klebsiella planticola</i>	ATCC 33531	45 %
<i>Enterobacter gergoviae</i>	CIP 76-01	45 %
	CIP 76-02	39 %
<i>Enterobacter sakazakii</i>	RICHARD 7-75	45 %
	RICHARD 20-77	42 %
	RICHARD 16-76	38 %
	ATCC 29544	37 %
<i>Citrobacter freundii</i>	CDC 460-61	44 %
	CDC 2987-57	36 %
	ATCC 8090	33 %
	ATCC 6750	28 %
<i>Escherichia coli</i>	CUETM 81-57	42 %
	CUETM 81-65	38 %
	CUETM 81-60	37 %
	ATCC 10536	30 %
<i>Levinea malonatica</i>	CDC 25408	41 %
<i>Levinea amalonatica</i>	CDC 25406	39 %
<i>Proteus penneri</i>	ATCC 33519	38 %

TABLEAU XVII : Hybridation (à 55,2 ° C) de la souche *Es. adecarboxylata* E₅ LECLERC - 36 avec les différentes espèces représentant la famille des *Enterobacteriaceae*.

ADN* : ADN radioactif (thymidine tritiée)

Références : voir matériel et méthodes.

ESPECES	REFERENCES DES SOUCHES	% d'hybridation avec l'ADN* de la souche <i>Es. adecarboxylata</i> E ₅ LECLERC - 36
<i>Serratia marcescens</i>	ATCC 13880	37 %
	CDC 868-57	31 %
<i>Kluyvera ascorbata</i>	ATCC 33433	37 %
	ATCC 33434	37 %
<i>Rahnella aquatilis</i>	ATCC 33991	37 %
	ICPB 4279	31 %
	ATCC 33071	30 %
<i>Escherichia vulneris</i>	ATCC 33821	36 %
<i>Klebsiella trevisanii</i>	CIP 81-36	36 %
<i>Serratia grimesii</i>	ATCC 14460	36 %
<i>Cedecea davisae</i>	CIP 80-34	36 %
<i>Kluyvera cryocrescens</i>	ATCC 14238	36 %
	ATCC 33435	35 %
	ATCC 14237	35 %
<i>Serratia rubidaea</i>	CDC 2199-72	35 %
	CDC 934-72	11 %

TABLEAU XVIII : Hybridation (à 55,2 ° C) de la souche *Es. adecarboxylata* E₅ LECLERC - 36 avec les différentes espèces représentant la famille des *Enterobacteriaceae*.

ADN* : ADN radioactif (thymidine tritiée)

Références : voir matériel et méthodes.

ESPECES	REFERENCES DES SOUCHES	% d'hybridation avec l'ADN* de la souche
		<i>Es. adecarboxylata</i> E ₅ LECLERC - 36
<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC 23565	35 %
	LT 2	31 %
<i>Escherichia blattae</i>	ATCC 29907	33 %
<i>Enterobacter intermedium</i>	CIP 79-27	33 %
	ATCC 33421	32 %
<i>Serratia fonticola</i>	ATCC 29844	33 %
<i>Erwinia dissolvens</i>	ATCC 23373	33 %
<i>Buttiauxella agrestis</i>	CIP 80-31	33 %
	ATCC 33994	33 %
<i>Salmonella arizonae</i>	CDDC 62	32 %
<i>Serratia ficaria</i>	ATCC 33105	31 %
<i>Cedecea lapagei</i>	CIP 80-35	31 %
<i>Shigella boydii</i>	VÉRON 23	29 %
<i>Tatumella ptyseos</i>	CUETM 82-4	29 %
	ATCC 33301	19 %



TABLEAU XVIII : Hybridation (à 55, 2° C) de la souche *Es. adecarboxylata* E₅ LECLERC - 36 avec les différentes espèces représentant la famille des *Enterobacteriaceae*.

ADN* : ADN radioactif (thymidine tritiée)

Références : voir matériel et méthodes.

ESPECES	REFERENCES DES SOUCHES	% d'hybridation avec l'ADN* de la souche <i>Es. adecarboxylata</i> E ₅ LECLERC - 36
<i>Escherichia hermannii</i>	ATCC 33650	28 %
<i>Edwardsiella ictaluri</i>	ATCC 33202	28 %
<i>Serratia liquefaciens</i>	ATCC 27592	27 %
<i>Providencia stuartii</i>	ATCC 29914	26 %
<i>Edwardsiella hoshinae</i>	CIP 78-56	26 %
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	VÉRON 139	25 %
<i>Enterobacter agglomerans</i>	ATCC 27155	20 %
<i>Proteus mirabilis</i>	ATCC 9240	20 %
<i>Hafnia alvei</i>	ATCC 13337	19 %
<i>Yersinia enterocolitica</i>	CIP 80-27	19 %
<i>Edwardsiella tarda</i>	ATCC 15947	18 %
<i>Erwinia amylovora</i>	ATCC 7400	17 %
<i>Morganella morganii</i>	VÉRON 119	16 %



TABLEAU XVIII : Hybridation (à 55,2° C) de la souche *Es. adecarboxylata* E₅ LECLERC - 36 avec les différentes espèces représentant la famille des *Enterobacteriaceae*.

ADN * : ADN radioactif (thymidine tritiée)
 Références : voir matériel et méthodes.

ESPECES	REFERENCES DES SOUCHES	% d'hybridation avec l'ADN* de la souche <i>Es. adecarboxylata</i> E ₅ LECLERC - 36
<i>Providencia rettgeri</i>	VÉRON 116	16 %
<i>Yersinia frederiksenii</i>	CIP 80-29	16 %
<i>Shigella sonnei</i>	ATCC 9290	15 %
<i>Providencia alcalifaciens</i>	ATCC 13159	15 %
<i>Erwinia carotovora</i>	ATCC 15713	14 %
<i>Proteus vulgaris</i>	ATCC 13315	11 %
<i>Yersinia intermedia</i>	CIP 80-28	10 %
" <i>kristensenii</i>	CIP 80-30	4%
" <i>ruckeri</i>	ATCC 29473	4 %

BU
LILLE

TABLEAU XVIII : Hybridation (à 55,2° C) de la souche *Es. adecarboxylata* E₅ LECLERC - 36 avec les différentes espèces représentant la famille des *Enterobacteriaceae*

ADN* : ADN radioactif (thymidine tritiée)
Références : voir matériel et méthodes.

Les genres *Citrobacter* - *Levinea* sont presque aussi proches du groupe E₅ que les genres *Enterobacter* et *Klebsiella* (respectivement 28 - 44 %, 4 souches et 39 - 47 %, 3 souches).

Le taux d'hybridation entre le groupe E₅ et l'espèce *Es.coli* varie entre 30 et 42 % (4 souches).

Les autres espèces étudiées (tableau XVIII) ne sont que très faiblement apparentées au groupe E₅ (pourcentage de réassociation inférieur à 38 %).

" Le grand art consiste à instituer des expériences décisives ne laissant aucune place à l'imagination de l'observateur. Au début des recherches sur un sujet déterminé quelconque, l'imagination doit donner des ailes à la pensée. Au moment de conclure et d'interpréter les faits que les observations ont rassemblés, l'imagination doit au contraire être dominée et asservie par les résultats matériels des expériences."

L. Pasteur (1822-1895)

CHAPITRE V

DISCUSSION

Les données obtenues par hybridation ADN/ADN nous permettent de discuter :

1 - L'existence du groupe E₅ en tant qu'entité génomique et son extension à des souches classées par GAVINI et coll. (43) ou BRENNER et coll. (20) dans des groupes différents.

2 - L'identité entre le groupe E₅ *sensu novo* et l'espèce *Es. adecarboxylata*.

3 - L'individualisation de l'espèce *Es. adecarboxylata* au sein du complexe " *Erwinia herbicola* - *Enterobacter agglomerans*".

4 - La position taxonomique de l'espèce *Es. adecarboxylata* au sein de la famille des *Enterobacteriaceae*.

À - IDENTITÉ DU GROUPE E₅ ET DE L'ESPÈCE ES. ADECARBOXYLATA :

L'homogénéité génomique du groupe E₅ est du niveau de l'espèce, selon les critères de BRENNER et coll. (7, 8, 14, 19).

Selon les mêmes critères, on peut assimiler au groupe E₅ les souches des groupes E₂ et E₃ individualisées sur le plan phénotypique par GAVINI et coll. (43) et dénommées " Coliformes atypiques".

Il en est de même pour les souches du groupe XI de BRENNER et coll. (20) qui rassemble 6 souches identifiées au préalable comme *Enterobacter agglomerans* ou *Erwinia herbicola*.

L'ensemble des souches étudiées appartenant aux groupes E₅, E₂, E₃ et XI s'hybride au moins à 73 % avec la souche *Es. adecarboxylata* E₅ LECLERC - 36. Cette dernière souche s'hybride elle-même à 100 % avec la souche type *Es. adecarboxylata* ATCC 23216.

Nos travaux aboutissent donc à une redéfinition phénotypique de l'espèce *Es. adecarboxylata*.

B - DÉFINITION PHÉNOTYPIQUE DE L'ESPÈCE ES. ADECARBOXYLATA :

Notre description est fondée sur l'étude de 20 souches (13 appartiennent au groupe E₅ *sensu stricto*, 4 sont classées dans le groupe E₂ et 3 proviennent du groupe E₃).

Les souches de BRENNER appartenant au groupe XI ne sont pas disponibles pour l'instant (à l'exception de la souche CDC 5378-71). Il est à noter que contrairement aux souches " Européennes " issues de l'environnement, ces souches " Américaines " sont d'origine médicale, ce qui modifie ainsi nos connaissances à propos de l'écologie de l'espèce *Es. adecarboxylata*.

Les caractères biochimiques conventionnels sont présentés au tableau XIX.

CARACTERES	<i>Es. adecarboxylata</i>		
	REACTION	% +	% (+)
Formation de pigment jaune	+ ou -	60	
Croissance à 4° C	d	5	15
" à 41 ° C	+ ou -	85	
" à 44 ° C	-	0	
Mobilité	+	100	
KCN	+	100	
Lysine décarboxylase	-	0	
Arginine dihydrolase	-	0	
Ornithine décarboxylase	-	0	
Gélatine (22 ° C)	-	0	
Urée	+ ou -	70	
Indole	+	90	
VOGES-PROSKAUER (acétoïne)	-	0	
Citrate (SIMMONS)	-	0	
Malonate	+	100	
D-Tartrate (KAUFFMANN)	-	0	
L-Tartrate (")	- ou +	30	
meso-tartrate (KAUFFMANN)	-	0	
Mucate (")	+	90	
Tartrate (JORDAN)	+ ou -	70	
Phénylalanine désaminase	-	0	
Réduction des nitrates	+	100	
H ₂ S	-	0	
D-Glucose (gaz)	+	100	
Tetrathionate réductase	- ou +	25	
Désoxyribonucléase	-	0	
β- galactosidase	+	100	
β- xylosidase	+	95	

TABLEAU XIX : Caractères biochimiques conventionnels de l'es-
pèce *Escherichia adecarboxylata*.

CARACTERES	<i>Es. adecarboxylata</i>		
	REACTION	% +	% (+)
FERMENTATIONS :			
L-arabinose	+	100	
D-xylose	+	100	
D-ribose	+	100	
Maltose	+	100	
D-lactose	+ ou -	85	15
D-galactose	+	100	
L-rhamnose	+	100	
D-mannose	+	100	
D-fructose	+	100	
α - méthyl -D-glucoside	-	0	
D-tréhalose	+	100	
Raffinose	d	30	35
L-sorbose	-	0	
Mélibiose	+	100	
D-mélézitose	-	0	
D-sucrose	d	20	5
D-mannitol	+	100	
Dulcitol	+ ou -	70	
D-cellobiose	+	100	
D-cellobiose (gaz)	+	100	
Glycêrol	(+)		100
Glycêrol (gaz)	-	0	
Adonitol	+ ou -	55	
<i>meso</i> -érythritol	-	0	
Salicine	+	100	



TABLEAU XIX : Caractères biochimiques conventionnels de l'es-
(suite) pèce *Escherichia adecarboxylata*.

CARACTERES	<i>Es. adecarboxylata</i>		
	REACTION	% +	% (+)
Inuline	-	0	
Glycogène	-	5	
Hydrolyse de l'esculine	+	100	



TABLEAU XIX : Caractères biochimiques conventionnels de l'espèce
(suite) *Escherichia adecarboxylata*

Symboles :

- + , réaction positive pour au moins 90 % des souches en 24 à 48 H.
- , réaction négative pour au moins 90 % des souches
- (+), réaction positive après 3 jours et plus
- + ou - , - ou +, les premiers signes correspondent au résultat le plus fréquent
- d , différentes réactions biochimiques [+, (+), ou -] .

Les sources de carbone suivantes sont assimilées par 80% à 100% des souches :

L-arabinose, D-ribose, D-xylose, L-rhamnose, D-fructose, D-galactose, D-glucose, D-mannose, D-cellobiose, D-lactose, D-maltose, D-tréhalose, gluconate, salicine, glycérol, D-mannitol, acétate, DL-lactate, DL-glycérate, L-malate, pyruvate, phényl-acétate, L- α -alanine, D- α -alanine, L-glutamate, L-proline.

Les sources de carbone suivantes ne sont pas assimilées par 80 à 100 % des souches (lecture en 5 jours) :

D-arabinose, D-fucose, D-saccharose, inuline, méthanol, *n*-propanol, *iso*-propanol, géraniol, 2-3-butylène-glycol, *meso*-érythritol, *meso*-inositol, éthylène-glycol, propionate, DL-3-hydroxy-butyrates, D-malate, D-tartrate, citraconate, itaconate, aconitate, citrate, oxalate, maléate, pimélate, subérate, azélate, glycolate, lévulinate, glutarate, adipate, mésaconate, sébacate, salicylate, butyrate, *iso*-butyrate, *n*-valérate, *iso*-valérate, *n*-caproate, heptanoate, caprylate, pèlargonate, caprate, benzoate, *m*-hydroxy-benzoate, *p*-hydroxy-benzoate, phtalate, *iso*-phtalate, *tere*-phtalate, D-pyruvate, phénol, D-mandélate, L-mandélate, benzyl-formate, glycine, β -alanine, L-leucine, L-*iso*-leucine, L-valine, L-thréonine, L-méthionine, DL-2-amino-butyrates, 3-amino-butyrates, 4-amino-butyrates, 5-amino-valérate, L-lysine, L-arginine, L-ornithine, L-citrulline, L-phényl-alanine, L-tyrosine, 2-amino-benzoate, 3-amino-benzoate, 4-amino-benzoate, L-tryptophane, D-tryptophane, histamine, putrescine, spermine, tryptamine, amylamine, éthanolamine, butylamine, benzylamine, diphénylamine, urée, urate, sarcosine, bêtaïne, créatine, hippurate, pantothénate, nicotinate, trigonelline, asparagine, acétamide, naphtalène, dodécane, hexadécane.

C - INDÉPENDANCE DE L'ESPÈCE *ES. ADECARBOXYLATA* ET DU COMPLEXE
" *ERWINIA HERBICOLA - ENTEROBACTER AGGLOMERANS* " .

L'espèce *Es. adecarboxylata* a été mise en évidence par LECLERC en 1962 (57). Bien qu'EWING et FIFE (31) aient inclus les souches décrites par LECLERC dans le biogroupe G₃ de l'espèce *En. agglomerans*, la dénomination d'*Es. adecarboxylata* fut maintenue dans les " Approved lists of Bacterial Names " (69).

En fait d'autres études sur le complexe " *Herbicola - Agglomerans* " étaient nécessaires pour clarifier le statut taxonomique des souches rangées dans l'espèce *Es. adecarboxylata*.

Récemment, 2 types de travaux viennent d'être publiés à propos de la taxonomie du complexe " *Herbicola - Agglomerans* " (GAVINI et coll., 43, BRENNER et coll., 20) aboutissant à la mise en évidence de 28 groupes (15 groupes phénotypiques et 13 groupes génomiques).

Nos mesures d'hybridation permettent de mettre en évidence l'identité entre *Es. adecarboxylata* et certains groupes (paragraphe A) ou bien l'absence de relations génomiques significatives (< 45 %), à l'exception du groupe VII de BRENNER (53 %).

Toutes ces mesures d'hybridation ADN/ADN permettent donc de conclure que sur les 28 groupes du complexe " *Herbicola - Agglomerans* ", 4 correspondent à l'espèce *Es. adecarboxylata*, un est apparenté à 53 % (groupe VII) et les autres n'ont aucun apparentement remarquable.

Contrairement à l'opinion d'EWING et FIFE (31), l'espèce *Es. adecarboxylata* est indépendante de l'espèce *En. agglomerans*.

D - POSITION TAXONOMIQUE DE L'ESPÈCE ES. ADECARBOXYLATA :

Sur la seule base de l'hybridation ADN/ADN, l'espèce *Es. adecarboxylata* devrait être rattachée au genre *Enterobacter* ; les taux d'hybridation avec l'espèce type (*En. cloacae*) varient entre 57 et 64 %.

Des taux de réassociation légèrement inférieurs apparaissent avec le genre *Klebsiella* (42 - 55 %).

Les pourcentages d'hybridation avec les genres *Enterobacter* et *Klebsiella* sont nettement supérieurs à ceux que l'on observe pour le genre *Escherichia* (28 - 42 %).

Devant cette discordance entre les données génomiques et les données phénotypiques (tableau XX) qui séparent nettement l'espèce *Es. adecarboxylata* des autres espèces appartenant aux genres *Enterobacter* et *Klebsiella*, nous nous abstenons de proposer un changement nomenclatural.

ESPECES \ CARACTERES	Indole	Mobilité	Voges-Proskauer	Lysine decarboxylase	Ornithine decarboxylase	Arginine dihydrolase	Citrate (Simmons)
<i>Es. adecarboxylata</i>	+	+	-	-	-	-	-
<i>En. cloacae</i>	-	+	+	-	+	+	+
<i>En. aerogenes</i>	-	+	+	+	+	-	+
<i>En. agglomerans</i>	[-]	[+]	d	-	-	-	d
<i>En. amnigenus</i>	-	+	+	-	+	-	+
<i>En. intermedium</i>	-	+	+	-	+	d	+
<i>En. sakazakii</i>	[-]	+	+	-	+	+	+
<i>En. gergoviae</i>	-	+	+	+	+	-	+
<i>K. pneumoniae</i>	-	-	+	+	-	-	+
<i>K. ozaenae</i>	-	-	-	d	-	-	d
<i>K. rhinoscleromatis</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>K. oxytoca</i>	+	-	+	+	-	-	+
<i>K. terrigena</i>	-	-	+	+	-	-	+
<i>K. planticola</i>	d	-	+	+	-	-	+
<i>K. trevisanii</i>	d	-	+	+	-	-	+

BU
LILE

TABLEAU XX : Les différents caractères de *Es. adecarboxylata* et des espèces du genre *Enterobacter* et *Klebsiella*

Symboles :

+, réaction positive pour au moins 90 % des souches

-, réaction négative pour au moins 90 % des souches

[+], 76-89 % de positivité

d, 26-75 % de positivité

[-], 76-89 % de négativité

Les données sont calculées pour une période d'incubation de 48 H (à 36 ± 1 ° C)

CHAPITRE VI

CONCLUSION

Notre étude d'hybridation ADN/ADN réalisée initialement sur un groupe phénotypique en attente de classification a permis :

- 1 - La redéfinition phénotypique de l'espèce *Es. adecarboxylata*.
- 2 - L'individualisation de cette espèce au sein de la famille des *Enterobacteriaceae*.
- 3 - De montrer qu'il existait des souches d'origine médicale au sein de *Es. adecarboxylata*, espèce dont l'écologie était traditionnellement rattachée à l'environnement.

Des contacts avec des sociétés commercialisant des kits d'identification vont permettre son identification aisée dans les laboratoires de bactériologie de l'eau, des aliments et de bactériologie médicale.

Ce travail permettra de mieux cerner l'épidémiologie de cette espèce mal connue et de déterminer son profil de sensibilité aux antibiotiques.

Cette thèse a fait l'objet de la proposition de publication :

IZARD D., MERGAERT J., GAVINI F., BEJI A., KERSTERS K., DE LEY J.
and LECLERC H.

Separation of *Escherichia adecarboxylata* from the " *Erwinia herbicola* - *Enterobacter agglomerans* " complex and the other *Enterobacteriaceae* by nucleic acid and protein electrophoretic techniques.

Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur), envoyé pour publication.

" Les sources ont deux extrémités qui se touchent. La première est la pure ignorance naturelle où se trouvent tous les hommes en naissant. L'autre extrémité est celle où arrivent les grandes âmes qui, ayant parcouru tout ce que les hommes peuvent savoir, trouvent qu'ils ne savent rien et se rencontrent en cette même ignorance d'où ils étaient partis. Mais c'est une ignorance savante qui se connaît "

B. PASCAL (1623 - 1662)

BIBLIOGRAPHIE

1. BAUTZ E.K.F., BAUTZ F.A. "The influence of complementary bases on the stability of ordered polynucleotides".
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 1964, 52 , 1476-1481
2. BRAY G.A. "A simple efficient liquid scintillator for counting aqueous solutions in a liquid scintillation counter".
Anal. Biochem., 1960, 1 , 279-295
3. BRENNER D.J. "Deoxyribonucleic acid reassociation in the taxonomy of enterobacteria".
Int. J. Syst. Bacteriol., 1973, 23 , 298-307
4. BRENNER D.J. "Characterization and clinical identification of *Enterobacteriaceae* by DNA hybridization".
Prog. Clin. Pathol., 1978, 7 , 71-117
5. BRENNER D.J. "DNA reassociation for the clinical differentiation of enteric bacteria".
Public Health Laboratory, 1978, 32 , 118-130
6. BRENNER D.J. "Speciation in *Yersinia*".
Contr. Microbiol. Immunol. , 1979, 5 , 33-43 (KARGER, BASEL)
7. BRENNER D.J. "Taxonomy, classification and nomenclature of bacteria".
in LENNETTE, BALOWS, HAUSLER, TRUANT " Manual of clinical microbiology",
3rd ed., ASM ed., 1980
8. BRENNER D.J. "Introduction to the family *Enterobacteriaceae*".
in STARR M.P., STOLP H., TRUPER H.G., BALOWS A., SCHLEGEL H.G.
" The prokaryotes", 1981, vol. II, ch. 88, 1105-1127
9. BRENNER D.J., "Family I. *Enterobacteriaceae* RAHN 1937", in " Bergey's
Manual of systematic bacteriology", vol. I, p. 408-420, N.R. KRIEG and
J.G. HOLT (eds.), 1984, WILLIAMS and WILKINS, Baltimore, U.S.A.
10. BRENNER D.J., COWIE D.B. "Thermal stability of *Escherichia coli* -
Salmonella typhimurium deoxyribonucleic acid duplexes".
J. Bacteriol., 1968, 95 , 2258-2262

11. BRENNER D.J., DAVIS B.R., STEIGERWALT A.G., RIDDLE C.F., McWHORTER A.C., ALLEN S.D., FARMER III J.J., SAITOH Y. & FANNING G.R. "Atypical biogroups of *Escherichia coli* found in clinical specimens and description of *Escherichia hermannii* Sp". Nov.. J. Clin. Microbiol., 1982, 15 , 703-713
12. BRENNER D.J., FALKOW S. "Molecular relationships among members of the *Enterobacteriaceae* ". in "Advances in genetics", 1971, 16, 81-117, Academic Press Inc., New York
13. BRENNER D.J., FANNING G.R., MIKLOS G.V., STEIGERWALT A.G. "Polynucleotide sequence relatedness among *Shigella* species". Int. J. Syst. Bacteriol., 1973, 23, 1 , 1-7
14. BRENNER D.J., FANNING G.R., SKERMAN F.J., FALKOW S. "Polynucleotide sequence divergence among strains of *Escherichia coli* and closely related organisms". J. Bacteriol., 1972, 109 , 3, 953-965
15. BRENNER D.J., FANNING G.R., STEIGERWALT A.G. "Deoxyribonucleic acid relatedness among *Erwiniae* and other *Enterobacteriaceae* : the gall, wilt, and dry-necrosis organisms (genus *Erwinia* Winslow et al., *sensu stricto*)". Int. J. Syst. Bacteriol., 1974, 24 , 197-204
16. BRENNER D.J., FANNING G.R., STEIGERWALT A.G. "Deoxyribonucleic acid relatedness among *Erwiniae* and other enterobacteria. II. Corn Stalk Rot Bacterium and *Pectobacterium chrysanthemi*. ". Int. J. Syst. Bacteriol., 1977, 27 , 3, 211-221
17. BRENNER D.J., FANNING G.R., STEIGERWALT A.G., ØRSKOV F., "Polynucleotide sequence relatedness among three groups of pathogenic *Escherichia coli* strains". Infect. Immunity, 1972, 6, 308-315

18. BRENNER D.J., FARMER J.J., FANNING G.R., STEIGERWALT A.G., KLYKKEN P., WATHEN H.G., HICKMAN F.W., EWING W.H. " Deoxyribonucleic acid relatedness of *Proteus* and *Providencia* species".
Int. J. Syst. Bacteriol., 1978, 28, 269-282
19. BRENNER D.J., McWHORTER A.D., LEETE KNUTSON J.K., STEIGERWALT A.G.
"Escherichia vulneris : a new species of *Enterobacteriaceae* associated with human wounds".
J. Clin. Microbiol., 1982, 15 , 6, 1133-1140
20. BRENNER D.J., RICHARD G., FANNING G.R., JEAN K., LEETE KNUTSON ,
ARNOLD G., STEIGERWALT, MICAH I., KRICHEVSKY."Attempts to classify
Herbicola group- *Enterobacter agglomerans* strains by deoxyribonucleic
acid hybridization and phenotypic tests".
Int. J. Syst. Bacteriol., 1984, 34 , 1, 45-55
21. BRENNER D.J., STEIGERWALT A.G., MIKLOS G.V., FANNING G.R."Deoxyribonu-
cleic acid relatedness among *Erwiniae* and the other *Enterobacteriaceae* :
the soft-rot organisms (genus *Pectobacterium* Waldee) ".
Int. J. Syst. Bacteriol., 1973, 23 , 3, 205-216
22. BRITTEN R.J., KOHNE D.E."Repeated sequences in DNA".
Science, 1968, 161, 529-540.
23. BURGESS N.R.H., McDERMOTT S.N. and WHITING J.
"Aerobic bacteria occurring in the hind-gut of the cockroach,
Blatta orientalis". J. Hyg. (Cambridge) , 1973, 71 : 1 - 7
24. CASTELLANI A., and CHALMERS A.J. 1919."Manual of tropical medicine".
3rd ed. Williams Wood and Co., New York
25. CROSA J.H., BRENNER D.J., EWING W.H., FALKOW S."Molecular relationships
among the *Salmonellae* ".
J. Bacteriol., 1973, 115, 1, 307-315

26. CROSA J.H., STEIGERWALT A.G., FANNING G.R., BRENNER D.J. "Polynucleotide sequence divergence in the genus *Citrobacter*".
J. Gen. Microbiol., 1974, 83, 271-282
27. DE LEY J. "Reexamination of the association between melting point, buoyant density and chemical base composition of deoxyribonucleic acid".
J. Bacteriol., 1970, 101, 738-754
28. DE LEY J. "Modern molecular methods in bacterial taxonomy : evaluation, application, prospects".
Proc. 4th Int. Conf. Plant. Path. Bact., 1978, I, 347-357, INRA ed.
29. DE LEY J., TYTGAT R. "Evaluation of membrane filter methods for DNA-DNA hybridization".
Ant. van Leeuwenhoek, 1970, 36, 4, 461-474
30. EDWARDS P.R. and EWING W.H. "Identification of *Enterobacteriaceae*".
3rd ed. Burgess Publishing Co, Minneapolis, 1972, p. 362
31. EWING W.H. & FIFE M.A. "*Enterobacter agglomerans* (BEIJERINCK) com. nov. (the *Herbicola-Lathyri* Bacteria)". Int. J. Syst. Bacteriol., 1972, 22, 4-11.
32. FARMER J.J., BRENNER D.J. "Concept of a bacterial species : importance to writers of microbiological standards for water".
Bacterial indicators/Health hazards, associated with water, ASTM STP 635, HOADLEY and DUTKA eds., American Society for testing and materials, 1977, 37-47.
33. FERRAGUT C. "Contribution à l'étude du GC % chez les bactéries. Application à un groupe d'entérobactéries apparentées au genre *Citrobacter*".
Thèse de Doctorat es sciences (3ème cycle). Faculté des Sciences et Techniques, Lille, 1976

34. FERRAGUT C., GAVINI F., IZARD D., LECLERC H. "Etude du GC % dans un groupe d'entérobactéries H₂S⁻ apparentées au genre *Citrobacter*". Can. J. Microbiol., 1978, 24, 4, 473-479
35. FERRAGUT C., IZARD D., GAVINI F., KERSTERS K., DE LEY J. & LECLERC H. "*Klebsiella trevisanii* : a new species from water and soil". Int. J. Syst. Bacteriol. , 1983, 33, 133-142
36. FERRAGUT C., LECLERC H. " Etude comparative des méthodes de détermination du T_m de l'ADN bactérien". Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur), 1976, 127 A , 223-235
37. FRENCH C.S., MILNER H.W. "Disintegration of bacteria and small particles by high-pressure extrusion". in "Methods in enzymology" (L. GROSSMAN and K. MOLDAVE), 1, Academic Press, New York and London, 1955, pp. 64-67
38. GAVINI F., FERRAGUT C., IZARD D., TRINEL P.A., LECLERC H., LEFEBVRE B., MOSSEL D.A.A. "*Serratia fonticola*, a new species from water". Int. J. Syst. Bacteriol., 1979, 29, 92-101
39. GAVINI F., FERRAGUT C., LECLERC H. " Etude taxonomique d'entérobactéries appartenant ou apparentées au genre *Enterobacter*". Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur), 1976, 127 B, 317-335
40. GAVINI F., IZARD D., TRINEL P.A., LEFEBVRE B., LECLERC H. " Etude taxonomique d'entérobactéries appartenant ou apparentées à l'espèce *Escherichia coli*". Can. J. Microbiol., 1981, 27, 98-106
41. GAVINI F., LECLERC H., LEFEBVRE B., FERRAGUT C., IZARD D. " Etude taxonomique d'entérobactéries appartenant ou apparentées au genre *Klebsiella*". Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur), 1977, 128 B, 45-59

42. GAVINI F., LEFEBVRE B., LECLERC H. " Positions taxonomiques d'entérobactéries H_2S^- par rapport au genre *Citrobacter*".
Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur), 1976, 127 A, 275-295
43. GAVINI F., LEFEBVRE B. & LECLERC H. " Etude taxonomique de souches appartenant ou apparentées au genre *Erwinia*, groupe *Herbicola* et à l'espèce *Enterobacter agglomerans*". System. Appl. Microbiol., 1983, 4, 218-235.
44. GILLESPIE D., SPIEGELMAN S. "A quantitative assay for DNA-RNA hybrids with DNA immobilised on a membrane".
J. Mol. Biol., 1965, 12, 829-842
45. GILLIS M., DE LEY J., DE CLEENE M. "The determination of molecular weight of bacterial genome DNA from renaturation".
Eur. J. Biochem., 1970, 12, 143-153
46. GOODFELLOW M., TRÜPER H.D. "*Escherichiaceae* nom.nov., a name to replace *Enterobacteriaceae*".
Int. J. Syst. Bacteriol., 1982, 32, 3,383
47. GRIMONT P.A.D. "Apport des hybridations ADN-ADN dans la taxonomie des *Enterobacteriaceae*",
in " Les bacilles à gram négatif d'intérêt médical et en santé publique : taxonomie , identification, applications " (H. LECLERC, éd.)
colloques INSERM 114, p. 49-67. Les éditions de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Paris, 1983.
48. GRIMONT P.A.D., FARMER III J.J., GRIMONT F. , ASBURY M.A., BRENNER D.J. and DEVAL C. "*Ewingella americana* gen. nov., sp.nov., a new *Enterobacteriaceae* isolated from clinical specimens".
Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur), 1983, 134 A, 39-52.
49. ISHIGURO N., OKA C., HANZAWA Y., SATO G. " Isolation of citrate positive variants of *E. coli* from domestic pigeons, pigs, cattle and horses".
Appl. Environ. Microbiol., 1978, 36, 217-222

50. IZARD D. "Etude génétique du genre *Enterobacter*".
Thèse pour l'obtention du Doctorat d'Etat es Sciences Pharmaceutiques
(2 tomes) . Faculté de Pharmacie de Lille, 1980.
51. IZARD D. " Application de l'analyse en composantes principales à l'étude
génomique du genre *Enterobacter*".
Mémoire pour l'obtention du Diplôme d'Etude et de Recherche en Biologie
Humaine, Faculté de Médecine de Lille, 1984.
52. IZARD D., FERRAGUT C., GAVINI F., LECLERC H. " Variations of the moles
percent guanine plus cytosine within a group of *Enterobacteriaceae*
belonging or related to the genus *Enterobacter*".
Int. J. Syst. Bacteriol., 1978, 28, 4, 449-452
53. KOTAKA T., BALDWIN R.L. "Effect of nitrous acid on the d AT copolymer as
template for DNA polymerase".
J. Mol. Biol., 1964, 9 , 323-339
54. KRIEG N.R. (ed.). " Bergey's manual of systematic bacteriology", vol. 1.
WILLIAMS & WILKINS C°, Baltimore, U.S.A., 1984.
55. LAIRD C., MAC CONAUGHTY B.L., MAC CARTY B.J. "Rate of fixation of
nucleotide substitutions in evolution".
Nature, 1969, 224, 149-154
56. LAPAGE S.P., SNEATH P.H.A., LESSEL E.F., SKERMAN V.D.B., SEELIGER H.P.R.,
and CLARK W.A. (éd.) "International code of nomenclature of bacteria".
American Society for Microbiology, Washington. D.C., 1975.
57. LECLERC H. "Etude biochimique d'*Enterobacteriaceae* pigmentées".
Ann. Inst. Pasteur, 1962, 102 , 726-741.
58. LEGAULT-DEMARE J., DESSEAUX B., HAYMAN T., SEROR S., RESS G.P.
" Studies on hybrid molecules of nucleic acids. 1. DNA/DNA hybrids on
nitrocellulose filters".
Biochem. Biophys. Res. Comm., 1967, 28, 4, 550-557

59. MAHLER I. "Preparation of tritium labeled DNA from *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*".
in "Methods in enzymology", vol XII A (L. Grossman & K. Moldave),
Academic Press, New York and London, 1967, p. 693-695
60. MANDEL M., MARMUR J. "Use of ultraviolet absorbance temperature profile
for determining the guanine plus cytosine content of DNA".
in "Methods in enzymology", 12, part. B (L. Grossman and K. Moldave),
Academic Press, New York and London, 1968, p. 195-206
61. MARMUR J. "A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from
microorganisms".
J. Mol. Biol., 1961, 3 , 208-218
62. MURATA N., STARR M.P. "Intragenetic clustering and divergence of *Erwinia*
strains from plants and man in the light of deoxyribonucleic acid
segmental homology".
Can. J. Microbiol., 1974, 20 , 1545-1565
63. ØRSKOV I., Genus V. *Klebsiella* Trevisan 1885, in "Bergey's manual
of systematic bacteriology", vol. 1, p. 461-465,
N.R. KRIEG and J.G. HOLT (eds.) , 1984, WILLIAMS and WILKINS,
Baltimore, U.S.A.
64. ØRSKOV I., ØRSKOV F., " Plasmid determined H₂S character in *Escherichia coli*
and its relation to plasmid carried raffinose fermentation and
tetracycline resistance characters".
J. Gen. Microbiol., 1973, 77, 487-499
65. RAHN O. "New principles for the classification of bacteria".
Zbl. Bakt. Abt., 1937, 2, 96, 273-286
66. RICHARD C., Genus VI. *Enterobacter* Hormaeche and Edwards 1960, in
"Bergey's manual of systematic bacteriology",
vol. 1, p. 465-469, N.R. KRIEG and J.G. HOLT (eds.) , 1984,
WILLIAMS and WILKINS, Baltimore, U.S.A.

67. SAKAZAKI R., KURAMOCHI S., KOSAKO Y. & TAMURA K., " Individualisation d'*Escherichia adecarboxylata* par rapport à *Enterobacter agglomerans*".
in " Les bacilles à gram négatif d'intérêt médical et en santé publique :
taxonomie, identification, applications" (H. LECLERC, éd.)
colloques INSERM 114, p. 157 - 166. Les éditions de l'Institut National
de la Santé et de la Recherche Médicale, Paris, 1983.
68. SEIDLER R.J., KNITTEL M.D., BROWN C. " Potential pathogens in the
environment : cultural reactions and nucleic acid studies on *Klebsiella
pneumoniae* from clinical and environmental sources ".
Appl. Microbiol., 1975, 29, 819-825
69. SKERMAN V.D.B., MCGOWAN V., and SNEATH P.H.A., Approved lists of bacterial
names.
Int. J. Syst. Bacteriol. 1980, 30 : 225-420.
70. SMITH W.H., PARSELL Z. " Transmissible substrate utilizing ability in
enterobacteria".
J. Gen. Microbiol., 1975, 87, 129-140
71. STEIGERWALT A.G., FANNING G.R., FIFE-ASBURY M.A., BRENNER J.J.
"DNA relatedness among species of *Enterobacter* and *Serratia*".
Can. J. Microbiol., 1976, 22, 121-137
72. STOLERU G.H., GERBAUD G.R., BOUANCHAUD D.H., LE MINOR L. " Etude
d'un plasmide transférable déterminant la production d'H₂S et la ré-
sistance à la tétracycline chez *Escherichia coli*".
Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur), 1972, 123, 743-754
73. STOLERU G.H., LE MINOR L., IHERITIER A.M. "Polynucleotide sequence
divergence among strains of *Salmonella* sub-genus IV and closely related
organisms".
Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur), 1976, 127 A, 477-486

74. "Validation of the publication of new names and new combinations previously effectively".

Published outside the IJSB, list n° 10

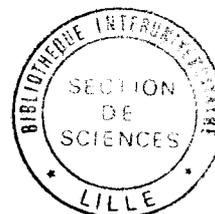
Int. J. Syst. Bacteriol., 1983, 33, 438-440

75. WACH SMUTH I.K., DAVIS B.R., ALLEN S.D. " Ureolytic *Escherichia coli* of human origin : serological, epidemiological and genetic analysis".

J. Clin. Microbiol., 1979, 10, 897-902

76. WETMUR J.G., DAVIDSON N. " Kinetics of renaturation of DNA".

J. Mol. Biol., 1968, 31, 349-370



Cette thèse a été imprimée
par l'ASSOCIATION CORPORATIVE DES
ETUDIANTS EN MEDECINE
DE LILLE

BEJI AMOR

**ÉTUDE DE L'ESPÈCE *ESCHERICHIA ADECARBOXYLATA*
PAR HYBRIDATION ADN / ADN**

THÈSE de Doctorat 3ème cycle BIOCHIMIE - Lille I - 1985 - N°

Cadre de classement :

Mots-clefs : Taxonomie, hybridation ADN/ADN,
Enterobacteriaceae, *Escherichia adecarboxyla*,
Enterobacter agglomerans, *Erwinia herbicola*.

RÉSUMÉ DE LA THÈSE

Les relations génomiques entre l'espèce *Escherichia adecarboxylata*, le complexe «*Erwinia herbicola* - *Enterobacter agglomerans*» et les autres espèces de la famille des *Enterobacteriaceae* ont été étudiées par hybridation ADN-ADN (technique à la nitrocellulose). Les résultats obtenus montrent que l'homogénéité intraspécifique des souches reçues comme *Es. adecarboxylata* est comprise entre 73 et 100%. Trois souches reçues comme *Enterobacter agglomerans* et une souche reçue comme *Erwinia herbicola* s'hybrident respectivement à 77, 96, 97 et 92% avec l'ADN marqué représentant l'espèce *Es. adecarboxylata*. Deux sous-groupes (E₂, E₃) antérieurement décrits par GAVINI et coll. (System. Appl. Microbiol., 1983, 4, 218-235) comme «coliformes atypiques» s'hybrident fortement (76-79% et 80-89% respectivement) avec *Es. adecarboxylata*.

Nous proposons de réunir toutes ces souches dans une seule espèce *Es. adecarboxylata*. Les pourcentages d'hybridation faibles ou modérés (< 53%) montrent une différence significative avec les groupes phénotypiques ou génomiques précédemment décrits au sein du complexe «*Herbicola-agglomerans*». Il existe aussi une différence notable entre *Es. adecarboxylata* et les autres espèces de la famille des *Enterobacteriaceae* (Taux d'hybridation < 64%). A la faveur de ces données, nous concluons que l'espèce *Es. adecarboxylata* constitue un taxon individualisé par rapport à *En. agglomerans* et aux autres espèces de la famille des *Enterobacteriaceae*. Une nouvelle définition de l'espèce est présentée.

JURY

Président : Monsieur GUILLAUME
Rapporteur : Monsieur IZARD
Examineurs : Monsieur LECLERC
Monsieur KREMBEL