

Analyse du génome de Nocardia cyriacigeorgica GUH-2 : plasticité génétique et métabolisme secondaire d'un pathogène opportuniste

Anthony Zoropogui

▶ **To cite this version:**

Anthony Zoropogui. Analyse du génome de Nocardia cyriacigeorgica GUH-2 : plasticité génétique et métabolisme secondaire d'un pathogène opportuniste. Sciences agricoles. Université Claude Bernard - Lyon I, 2011. Français. NNT : 2011LYO10154 . tel-00838589

HAL Id: tel-00838589

https://theses.hal.science/tel-00838589

Submitted on 26 Jun 2013

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

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

N° d'ordre : 154-2011 Année 2011

THESE

présentée devant

l'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

pour l'obtention du diplôme de DOCTORAT

(arrêté du 25 avril 2002)

présentée publiquement le 13 septembre 2011

par

Anthony ZOROPOGUI

Analyse du génome de *Nocardia cyriacigeorgica* GUH-2 : plasticité génétique et métabolisme secondaire d'un pathogène opportuniste

Directeurs de thèse

Patrick BOIRON et Didier BLAHA

JURY :

Philippe MAZODIER	Rapporteur
Jean-Luc PERNODET	Rapporteur
Jean FRENEY	Examinateur
Françoise LUCAS	Examinateur
Petar PUJIC	Examinateur
Didier BLAHA	Examinateur
Patrick BOIRON	Examinateur

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université	**M. A. Bonmartin**
Vice-président du Conseil d'Administration	M. le Professeur G. Annat
Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	M. le Professeur D. Simon
Vice-président du Conseil Scientifique	M. le Professeur J-F. Mornex
Secrétaire Général	M. G. Gay

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard	Directeur : M. le Professeur J. Etienne
Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux	Directeur : M. le Professeur F-N. Gilly
UFR d'Odontologie	Directeur : M. le Professeur D. Bourgeois
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directeur : M. le Professeur F. Locher
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation	Directeur : M. le Professeur Y. Matillon
Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directeur : M. le Professeur P. Farge

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies	Directeur : M. le Professeur F. Gieres
Département Biologie	Directeur : M. le Professeur F. Fleury
Département Chimie Biochimie	Directeur : Mme le Professeur H. Parrot
Département GEP	Directeur : M. N. Siauve
Département Informatique	Directeur : M. le Professeur S. Akkouche
Département Mathématiques	Directeur : M. le Professeur A. Goldman
Département Mécanique	Directeur : M. le Professeur H. Ben Hadid
Département Physique	Directeur : Mme S. Fleck
Département Sciences de la Terre	Directeur : Mme le Professeur I. Daniel
UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives	Directeur : M. C. Collignon
Observatoire de Lyon	Directeur : M. B. Guiderdoni
Ecole Polytechnique Universitaire de Lyon 1	Directeur : M. P. Fournier
Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique	Directeur : M. G. Pignault
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. le Professeur C. Coulet
Institut de Science Financière et d'Assurances	Directeur : M. le Professeur J-C. Augros
Institut Universitaire de Formation des Maîtres	Directeur : M. R. Bernard

Remerciements

Mes remerciements vont tout d'abord à Messieurs les rapporteurs et membres du jury qui ont bien voulu évaluer ce travail de thèse.

Merci à Didier qui m'a « recruté » suite à un entretien passé au CRESSA de Grenoble. Lors de mon arrivé dans l'équipe mes connaissances dans le domaine de la microbiologie étaient assez peu développées, j'espère avoir relevé le défi au bout de ces mois de recherche.

Merci à Patrick de m'avoir permis de réaliser ce doctorat au sein de votre laboratoire.

Merci à Petar de m'avoir accueilli dans son labo pendant mes premiers mois de doctorant. Ton imagination créative m'a toujours impressionnée et tes connaissances en biologie moléculaire ainsi qu'en biochimie m'ont l'air sans limites !! Grâce à toi j'ai pu rencontrer l'ensemble des membres de l'UMR 5557 et apprendre à connaître la « jeune » équipe de cette unité.

Merci à Philippe de m'avoir prêté main forte et juste sur les analyses de génome. Sans toi j'en serais encore à faire des blasts et les COGs et CA n'auraient aucune signification pour moi ...

Merci à Benoit, tu as toujours vu juste dans les points à aborder dans ce travail de thèse. Tes capacités d'écriture m'ont également permis d'avoir un manuscrit (ainsi que mes différents rapports) compréhensibles par mes lecteurs...

Merci à toi Arnault, tu aurais mérité ta place dans mes encradrants de thèse. Merci pour ta disponibilité, pour l'initiation aux divers logiciels que j'ai utilisé, tes idées scientifiques mais aussi ton goût de la fête et nos fous rires tant à l'intérieur qu'en dehors du labo. Bichon t'assures grave !!

Merci Jacques, c'est avec toi que j'ai mis un pied dans la recherche. Ta patience et ta rigueur ont fait que j'ai eu envie d'aller plus loin, ce manuscrit est le reflet de la distance que j'ai parcouru.

Je remercie aussi l'ensemble des membres de l'équipe et plus particulièrement Babeth, Céline et Sylvie pour leur aide précieuse en PCRq ; Evelyne, Françoise et Laurence pour leur accueil à VetAgroSup ; Sabine pour sa bonne humeur, Manue pour ses coup de gueule et sa disponibilité.

Merci à l'ensemble de m'équipe de l'Institut Claude Bourgelat dans lequel j'ai pu réaliser l'expérimentation animale. C'était très agréable de travailler avec une équipe jeune et dynamique.

Merci à Patrick Belli pour s'être rendu disponible afin de réaliser les autopsies et les prélèvements d'organes ainsi que pour les analyses des encéphales. Votre aide a été plus qu'appréciée et vos compétences ainsi que votre gentillesse sont sans égales.

Merci à Marie-Geneviève pour l'aide apportéé sur les questions de biochimie des pepetides et sur la RMN qui reste une technique très obscure pour moi...

Merci à Anne et Jeanine de m'avoir permis d'enseigner en Pharmacie, ces cours étaient vraiment exceptionnels !

Je remercie l'ensemble des membres de l'UMR 5557 et plus particulièrement à Marie-Lara pour qui la bière n'a (ou n'avait ;-)) aucun secret ! David ma petite « B... » avec qui on s'est vraiment bien marré et qui possède un franc parlé même dans les moments les plus inattendus ! Merci à toi Stéphanie, Step, Crotd'n... ton humeur changeante, tes coups de gueule, ton coté bon public et ta sincérité ont fait que je ne pouvais rêver mieux comme co-thésarde ! Merci à Laurine d'avoir été là dans les moments difficiles. Enfin merci à Sabrina, Couscous, chère collègue d'avoir su ramener la vie au Nétien 3^{e} étage, ton arrivée au labo a rythmé mes journées au son provoqué par tes talons ! Merci aux thésards passés : Fred, Oliv, Vin's, Karima, Amélie, Béné, Denis, Arnault. Merci aux thésards en cours : Amel et Lamiae (ne vous inquiétez pas votre tour arrive encore un petit effort on se fera un tajine/kebab une fois tout cela terminé), ML, Steph, Tony, Benoit, Ramquin, Arnaud.

Merci à l'ensemble des stagiaires que j'ai encadré de plus ou moins loin : Laura, Julie, Anne-Fleur, Henry, Benjamin, Julien, Marie-France, Noellie (alias petit Padawan) et

bien sur Seb qui a du subir mes humeurs changeantes lors des (trop longues) dernières semaines de rédactions.

Merci à toi aussi la merdeuse (Sandrine oui oui c'est bien toi), ne râle pas, au fond je suis sûre que tu es contente d'avoir ces quelques lignes qui te sont dédiées ! Et puis j'attends toujours mon repas...

Merci à tous les membres de l'asso Biodocs Lyon et plus particulièrement à Julien (alias Bisounours, ma poule) pour nos mémorables FiestaMix et mon intégration dans l'asso, Emy et Mel pour votre expérience, ce que cela implique (n'est ce pas les râleuses...) et vos connaissances inconditionnelles en matière de bières, Math, Elo, Nico (bien faïsandé), Flo, Rachel et JC. BT 2010 et BV 2011 et les autres actions de l'asso ont été des expériences exceptionnelles et je suis heureux de les avoir partagées avec vous.

J'ai cité mes amis du labo mais je tiens aussi à remercier mes amis de longue date : David, Mammar, Eugé, Domdom, Greg, Laëtitia, Audrey, Valentine, Emeline, Olivier (Zozo). Ainsi que les amis rencontrés au cours de la thèse : Chris et PC. Sans vous les gars je ne sais pas si je serais arrivé au bout de long et du labeur, vous rencontrer m'a permis d'apprécier beaucoup plus la vie à Rockefeller, votre « philosophie » sur la qualité de la fac et nos soirées McDo, Pizzas, COD y sont surement pour quelque chose.

Merci à l'ensemble des personnes que j'ai rencontré pendant cette thèse, Crakos, Amandine, Aurore (la buse), Blandin(e), Olivier, Pierre (tocard n°3), Aurélie, Philippe, Damien, Faïza, Sonia, MC, Lud, Charlotte, Estelle.

Enfin je remercie l'ensemble de ma famille. Papa, Maman, Gwladys, Vanessa et Axelle merci pour votre soutien et pour n'avoir jamais douté de moi c'était rassurant mais en même temps j'avais une certaine pression. J'espère que vous serez fiers de mon travail. Merci à Seb et à Raph pour avoir contribué à l'agrandissement de cette famille avec : Tigane, Elliott, Naya et Mika. Merci aux deux grands parents que j'ai perdu pendant ces quelques années, cette thèse elle est aussi pour vous. Merci à mes 2 grands-mères, mes sept oncles, mes onze tantes, et à l'ensemble de mes cousins, cousines.

Merci à vous tous et à ceux que j'ai oublié.

TABLE DES MATIERES

CHAPITRE I : ETAT DE L'ART SUR LES *NOCARDIA* **18**

I. TAXONOMIE DES *NOCARDIA* **20**

I.1 TAXONOMIE DU COMPLEXE *N. ASTEROIDES* 20

I.1.1 Profil de sensibilité aux antibiotiques de type I 22

I.1.2 Profil de sensibilité aux antibiotiques de type II 24

I.1.3 Profil de sensibilité aux antibiotiques de type III 24

I.1.4 Profil de sensibilité aux antibiotiques de type IV 25

I.1.5 Profil de sensibilité aux antibiotiques de type V 26

I.1.6 Profil de sensibilité aux antibiotiques de type VI 26

I.2 TAXONOMIE DES AUTRES ESPECES DE *NOCARDIA* 26

II. LES *NOCARDIA* DANS L'ENVIRONNEMENT **28**

II.1 INCIDENCE DES *NOCARDIA* DANS LES SOLS 28

II.2 INCIDENCE DES *NOCARDIA* DANS LES EAUX 29

II.3 INCIDENCE DES *NOCARDIA* DANS D'AUTRES ENVIRONNEMENTS 31

III. LES *NOCARDIA* : DES AGENTS PATHOGENES **32**

III.1 INFECTION A *NOCARDIA* CHEZ LES PLANTES 32

III.2 INFECTION A *NOCARDIA* CHEZ L'ANIMAL 32

III.3 INFECTION A *NOCARDIA* CHEZ L'HOMME 37

III.4 PATHOGENIE 38

III.4.1 Facteurs de prédisposition 38

III.4.2 Virulence et production de toxine 38

III.5 CLINIQUE 40

III.5.1 Nocardiose pulmonaire 40

III.5.2 Nocardiose cérébrale 41

III.5.3 Nocardiose cutanée, sous-cutanée et lymphocutanée 44

III.5.4 Nocardiose extrapulmonaire (autre que système nerveux et tissu cutané). 46

III.5.5 Nocardiose disséminée (impliquant deux ou plusieurs sites infectieux). 46

III.5.6 Transmission nosocomiale 46

III.6 TRAITEMENT 47

IV. *NOCARDIA CYRIACIGEORGICA*, UNE ESPECE A PROPRIETES PARTICULIERES ? **48**

IV.1 EXEMPLE DE *N. CYRIACIGEORGICA* GUH-2 51
IV.1.1 La maladie de Parkinson 51
IV.1.1.1 Physiopathologie de la maladie de Parkinson 51
IV.1.1.2 Symptomatologie de la maladie de Parkinson 54
IV.1.1.3 Etiologie de la maladie de Parkinson 54
IV.1.1.4 Traitement de la maladie de Parkinson 56
IV.1.2 Virulence de *N. cyriacigeorgica* GUH-2 57
IV.1.2.1 *N. cyriacigeorgica* GUH-2 et la maladie de Parkinson 59
IV.1.2.2 Production de métabolites secondaire par *N. cyriacigeorgica* GUH-2 60
IV.1.2.2.1 Définition des métabolites secondaires 61
IV.1.2.2.2 Les peptides synthétases non ribosomiques 63
IV.1.2.2.3 Les polyketides synthases 64
IV.2 GENOMIQUE ET EMERGENCE DES *NOCARDIA* 65
IV.2.1 Acquisition d'informations génétiques 66
IV.2.2 Génération de diversité 67
IV.2.2.1 Duplication de gènes 68
IV.2.2.2 Perte de gènes 68
IV.2.2.3 Séquences d'insertion (IS) 68
IV.2.2.4 Réarrangements génétiques 69
IV.2.3 Acclimatation 69
V. CONCLUSION 70

CHAPITRE II : ETUDE DE LA VIRULENCE DE SOUCHES DE *NOCARDIA* CHEZ LA SOURIS 71

I. INTRODUCTION 71
II. MATERIEL ET METHODE 73
II.1 ANIMAUX 73
II.2 MICROORGANISMES 73
II.3 TRAITEMENT A LA L-DOPA ET A LA CARBIDOPA 73
II.4 AUTOPSIE 74
II.5 ANATOMOPATHOLOGIE 74
III. RESULTATS 78
III.1 OBSERVATIONS DE TROUBLES COMPORTEMENTAUX CHEZ LES SOURIS INFECTEES 78
III.2 TRAITEMENT A LA L-DOPA 80
III.3 HISTOLOGIE 80

III.4 ANATOMOPATHOLOGIE DES ENCEPHALES DE SOURIS PRESENTANT DES TROUBLES COMPORTEMENTAUX 80
IV. DISCUSSION 84
V. CONCLUSION 84

CHAPTER III: THE *NOCARDIA CYRIACIGEORGICA* GUH-2 GENOME: STRUCTURE, COMPOSITION AND PHYLOGENETIC TRENDS 87

VI. INTRODUCTION 87
VII. RESULTS 91
VII.1 VIRULENCE STATUS OF *N. CYRIACIGEORGICA* GUH-2 91
VII.2 GENERAL FEATURES OF THE *NOCARDIA CYRIACIGEORGICA* GENOME 91
VII.3 REGIONS OF GENOMIC PLASTICITY 99
VIII. THE PARTICULAR CASE OF INSERTION SEQUENCES (IS) 103
VIII.1 GENETIC POTENTIALS AND METABOLIC PROFILINGS 109
IX. DISCUSSION 111
X. CONCLUSION 116
XI. METHODS 117
XI.1 MICE EXPERIMENTATIONS 117
XI.2 GENOME SEQUENCING AND ASSEMBLY 117
XI.3 GENOME ANNOTATION AND ANALYSIS 118
XI.4 GLOBAL COMPARATIVE STUDY 119
XI.5 DISTRIBUTION OF IS AND GIS AMONG A PANEL OF *NOCARDIA* STRAINS 119
XI.6 IDENTIFICATION OF THE SECRETOME 120
XI.7 METABOLIC PROFILING 120
XII. SUPPLEMENTARY DATASET 121
XIII. ACKNOWLEDGEMENTS 122
XIV. REFERENCES TO CITE 122
XV. CONCLUSION DE CHAPITRE 127

CHAPITRE IV : ANALYSE DES METABOLITES PRODUITS PAR *N. CYRIACIGEORGICA* GUH-2 129

I. INTRODUCTION 129
II. MATERIEL ET METHODE 132
II.1 ANALYSE IN SILICO DES GENES DES NRPS ET PKS 132
II.2 SOUCHE ET CONDITION DE CULTURE 133

II.3 Extractions liquide/liquide 133
II.4 Chromatographie d'exclusion 133
II.5 Chromatographie sur couche mince (CCM) 133
II.6 Chromatographie HPLC 134
II.7 Resonnance magnetique nucleaire 134
II.8 Spectrometrie de masse 134
II.9 Inhibition de proteasome 134
III. Resultats 136
III.1 Analyse in silico des NRPS 136
III.2 Comparaison avec la synthese de la nocobactine 138
III.3 Purification de metabolites secondaires 138
III.4 Purification du pigment produit par *N. cyriacigeorgica* GUH-2 144
III.5 Inhibition du proteasome 144
IV. Discussion 146
V. Conclusion du chapitre 150

CHAPITRE V (PARTIE A) - *NOCARDIA CYRIACIGEORGICA* DANS L'ENVIRONEMENT : MISE AU POINT D'UN CRIBLE PCR 151

I. Introduction 151
II. Materiels et methode 153
II.1 Selection des cibles genetiques 153
II.2 PCR classique 153
II.3 PCR quantitative 153
III. Resultats 155
IV. Discussion 160

CHAPITRE V (PARTIE B) - *NOCARDIA CYRIACIGEORGICA* DANS L'ENVIRONEMENT. DISTRIBUTION OF *N. CYRIACIGEORGICA* IN FRENCH SOIL 163

I. Introduction 163
II. Materials and methods 167
II.1 Environmental samples 167
II.2 Isolation and identification of *N. cyriacigeorgica* from soil samples 167
II.3 Genomic DNA extraction and purification 168

II.4 *NOCARDIA CYRIACIGEORGICA* SPECIFIC QUANTITATIVE REAL-TIME PCR (QPCR) 168
III. RESULTS **170**
III.1 INFLUENCE OF SOIL INHIBITORS AND OPTIMIZED CONDITIONS FOR SOIL DNA SCREENING 170
III.2 DETECTION OF *N. CYRIACIGEORGICA* IN ENVIRONMENTAL SAMPLES BY QPCR TARGETING *NOCYR_5027* 170
III.3 DETECTION OF *NOCARDIA* DNA IN ENVIRONMENTAL SAMPLE BY QPCR TARGETING 16S RDNA 170
III.4 ISOLATION OF *N. CYRIACIGEORGICA* FROM ENVIRONMENTAL SAMPLES 171
IV. DISCUSSION **172**
V. REFERENCES **176**
VI. CONCLUSION DU CHAPITRE **178**

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES **179**

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES **185**

Liste des Figures

Introduction Bibliographique

Figure 1 : Caractéristiques macroscopiques et microscopiques de la souche type *N. asteroides* ATCC 19247T. 17

Figure 2 : Localisation mondiale des différentes espèces de *Nocardia*. 21

Figure 3 : Nocardiose cutanée chez un chat. 33

Figure 4 : Nocardiose chez un poisson tigre. 35

Figure 5 : Hyphes aériens de *Nocardia salmonicida*. 35

Figure 6 : Nocardiose chez des grands mammifères marins. 35

Figure 7 : Mycétome à *N. brasiliensis* et *N. asteroides*. 43

Figure 8 : Nocardiose sporotrichoïde lymphocutanée causée par *N. brasiliensis*. 43

Figure 9 : Schéma des ganglions de la base. 50

Figure 10 : Voies dopaminergiques des ganglions de la base. 52

Figure 11 : Interaction entre une cellule de *Nocardia* et une cellule gliale. 58

Figure 12 : Organisation en domaines d'un module de peptide synthétase. 62

Chapitre II

Figure 1 : Histologie d'un rein réalisée en *post mortem*. 79

Figure 2 : Coupe sagittale d'un encéphale de souris. 81

Figure 3 : Histologie d'encéphales de souris présentant des troubles moteurs du comportement. 83

Chapitre III

Figure 1: Circular representation of *N. cyriacigeorgica* GUH-2 genome. 90

Figure 2: Lineplot between *N. cyriacigeorgica* and *N. farcinica*. 92

Figure 3: NJ tree of studied Actinobacteria. 92

Figure 4: GUH-2's genes shared with neighbors. 94

Figure 5A: Correspondence Analysis of COGs. 96

Figure 5B: Correspondence Analysis of Transcription domains. 97

Figure 6: Cladogram based on the genomic islands distribution among *N. cyriacigeorgica*. 102

Figure 7: Cellular compartmentalization of NRPS and PKS. 108

Chapitre IV

Figure 1 : Comparaison de l'époxomicine avec un métabolite putatif de *N. cyriacigeorgica*. 139

Figure 2 : Cluster de gènes impliqués dans la synthèse de la nocobactine. 139

Figure 3 : Domaines des NRPS et PKS de *N. cyriacigeorgica* GUH-2. 141

Figure 4 : Spectre RMN de fractions de surnageant de culture. 143

Figure 5 : Chromatogrammes HPLC de la fraction F3. 144

Figure 6 : Comparaison des chromatogrammes HPLC en fonction du stade de purification. 145

Figure 7 : Chromatogrammes HPLC des pics 1 et 2. 145

Figure 8 : Spectre de masse du pic 1. 147

Figure 9 : Spectre de masse du pic 2. 147

Figure 10 : Mesures de l'inhibition de l'activité du protéasome. 147

CHAPITRE V

Figure 1 : Courbes quantitatives et de fusions obtenus avec les amorces qIG20lt. 158

Figure 2 : Courbes quantitatives et de fusions obtenues avec les amorces q5295. 158

Figure 3 : Courbes quantitatives et de fusions obtenues avec les amorces q3034. 160

Liste des Tableaux

Introduction Bibliographique

Tableau I : Liste des espèces de *Nocardia* décrites. 19

Tableau II : Profils de sensibilité aux antibiotiques des *Nocardia*. 23

Chapitre II

Tableau I : Souches de *Nocardia* utilisées. 73

Tableau II : Bilan des troubles comportementaux observés. 77

Chapitre III

Table I: Chromosomes features of *N. cyriacigeorgica* GUH-2. 90

Table II: Duplicated genes, lost genes and genes in RGP. 94

Table III: Genomic islands characteristics. 98

Table IV: Distribution of genomic islands among *N. cyriacigeorgica* isolates. 100

Table V: IS distribution among *Nocardia* isolates. 104

Table VI: *N. cyriacigeorgica* and *N. farcinica* IS characteristics. 106

Table VII: Secretome of studied genomes 108

Table VIII: Physiological characteristics of *N. cyriacigeorgica* GUH-2. 110

Chapitre IV

Tableau I : Synténie des régions génomiques contenant des gènes de NRPS et PKS. 137

Chapitre V

Tableau I : Amorces utilisées. 154

Tableau II : Souches et isolats cliniques d'Actinobactéries utilisés. 156

Table I: French environmental soil samples characteristics. 168

Table II: SOD RFLP profiles obtained. 174

LISTE DES ABREVIATIONS

AA : amino-acid (acide aminé)

ABC transporter : ATP binding cassette transporter

ACP : acyl carrier proteins domains

ACT : artemis comparison tool

ADN : acide désoxyribonucléique

ARN : acide ribonucléique

AT : acyl-transférases

ATCC : American Type Culture Collection

ATP : adenosine-5'-triphosphate (adénosine triphosphate)

BAP : blood agar plate (gélose au sang)

BLAST : basic local alignment search tool (algorithme de recherche d'alignement principaux fondamentaux)

BCYE : buffered charcoal yeast extract (extrait de levure de charbon tamponné)

BHI(-P) : brain and heart infusion (-phosphate) (bouillon de cœur cervelle-(phosphate))

CA : Correspondance analysis (analyse de correspondances)

CDS : coding sequence (séquence codante)

CFU : colony forming unit (unité formant colonie)

CMI : concentration minimale inhibitrice

CNM : *Corynebacterium-Nocardia-Mycobacterium*

COG : clusters of orthologous groups

DDH : DNA-DNA hybridation (hybridation ADN-ADN)

DH : déshydratases

DNA : deoxyribonucleic acid (acide désoxyribonucléique)

DNTP : Deoxynucleotide Triphosphate

DMSO : dimethylsulfoxide

DR : direct repeat sequence (séquence directement répétée)

DSM : Deutsche Sammlung von Mikroorganismen

ER : énoyl-réductases

ESAT-6 : 6 kDa early secretory antigenic target

fg : femtogram (femtogramme)

GABA : gamma-aminobutyric acid (acide gamma-aminobutyrique)

GE : genome equivalent (équivalent de génome)

GI : genomic island (îlot génomique)

GPe = *globus pallidus* externe

GPi = *globus pallidus* interne

HPLC : high performance liquid chromatography (chromatographie liquide de haute performance)

HSP : stress-heat shock protein (protéine de résistance aux chocs thermiques)

IG : îlot génomique

IR : inverted repeat sequence (séquence inversée répétée)

IS : insertion sequence (séquence d'insertion)

IRM : imagerie par résonance magnétique

(k)Da : (kilo) Dalton

KS : β-kéto-acyl synthases

KR : β-kéto réductases

LCR : liquide céphalorachidien

L-DOPA : L-3,4-dihydroxyphenylalanine

Mb : megabases

MCE : mammalian cell entry (entrée dans les cellules de mammifère)

MHz : mégaHertz

MIC : minimal inhibitory concentration (concentration minimale inhibitrice)

MK : menaquinone (ménaquinone)

MLSA : multi locus sequencing analysis (analyse de séquences multi-locus)

MPTP : 1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyradine

MS : mass spectroscopy (spectroscopie de masse)

NCBI : national center for biotechnology information (centre national américain d'information en biotechnologie)

NJ : neighborhood joining (matrice de jonction de voisinage)

NMDA : *N*-Methyl-D-aspartic acid

NRPS : non ribosomal peptide synthetase (peptide synthétase non ribosomique)

OFN : observatoire français des nocardioses

PAI : pathogenicity island (îlot de pathogénie)

pb : paire de bases

PC12 : pheochromocytoma cell line 12 (lignée cellulaire 12 de phéochromocytome)

PCR : polymerase chain reaction (polymérisation en chaine)

PD : Parkinson disease (maladie de Parkinson)

PE : Pro-Glu (Proline-Glutamine)

PGRS : polymorphic GC-rich sequences (séquences polymorphiques riches en GC)

PKS : polyketide synthase (polykétide synthase)

PPE : Pro-Pro-Glu (Proline-Proline-Glutamine)

ppm : partie par million

PSM : poste de sécurité microbiologique

qPCR : quantitative polymerase chaine reaction (réaction de polymérisation en chaine quantitative)

REP-PCR : Repetitive Extragenic Palindromic-PCR (PCR des palindromes extragéniques répétitifs)

RFLP : restriction fragment length polymorphism (polymorphismes de longueur des fragments de restriction)

RGP : region of genomic plasticity (Région de plasticité génomique)

RMQS : réseau de mesure de la qualité des sols

RNA : Ribonucleic acid (acide ribonucléique)

RubisCO : ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase oxygenase

SAB : Sabouraud dextrose agar (gélose de Sabouraud)

SDS : sodium dodecyl sulfate (dodécylsulfate de sodium)

SIDA : syndrome d'Immunodéficience acquise

SMX : sulfaméthoxazole

SNc = *substancia nigra pars compacta*

SNr = *substancia nigra pars reticulata*

SOD : superoxyde dismutase

STN = *nucleus subthalamicus*

TE : thiolesterase

TBS : Tris-buffered saline (tampon Tris salin)

TDM : α,α-tréhalose-6,6'-dimycolate

TMP : triméthoprime

unk : unknown function gene (gène de fonction inconnue)

UPS : ubiquitin proteasome system (système ubiquitine protéasome)

LISTE DES ABREVIATIONS SPECIFIQUES AUX GENES

DAT : dopamine transporter (transporter de dopamine)

gyrB : gyrase B subunit (sous-unité B de la gyrase)

hsp65 : 65 kDa stress-heat shock protein (protéine de résistance aux chocs thermiques)

kat : catalase

maoB : monoamine oxydase B

mas : *mce* associated

mce : mammalian cell entry (entrée dans les cellules de mammifères)

mbt : mycobactin (mycobactin)

nat2 : N-acetyltransferase 2

nbt : nocobactin

nar : nitrate reductase

nir :nitrite reductase

nocyr : CDS de *N. cyriacigeorgica*

park : Parkinson disease gene

rpoB : RNA-polymerase (ARN polymerase)

rrs : 16S rRNA (ARNr 16S)

secA1 : preprotein translocase subunit

sodA : superoxyde dismutase (superoxyde dismutase)

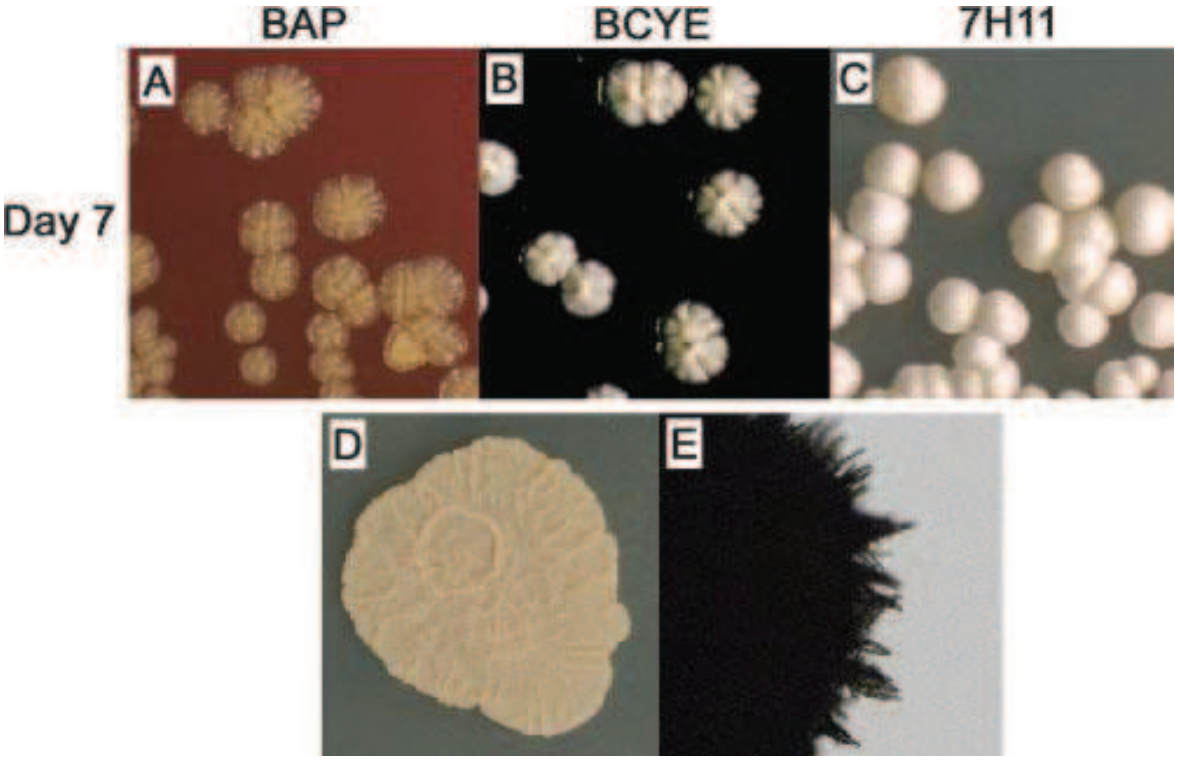


Figure 1 : Caractéristiques macroscopiques et microscopiques uniques de la souche type *N. asteroides* ATCC 19247T. La morphologie de la colonie varie en fonction du milieu de culture utilisé après 7 jours d'incubation à 37°C. (A) Les colonies individuelles sont brillantes, de couleur miel, légèrement surélevée, et croissent avec une texture de surface érodée sur BAP. (B) Les colonies sont semblables, mais de couleur crème sur gélose BCYE. (C) Les colonies sont blanches et en forme de dôme, avec une surface veloutée sur agar 7H11. (D) Les méga-colonies après 4 jours d'incubation sur gélose SAB sont de couleur corail, plates, légèrement hérissées. (E) D'un point de vue microscopique, des hyphes aériens font saillie à partir de ces grandes colonies qui se regroupent pour former une pointe. D'après Schlaberg *et al*., 2008.

CHAPITRE I : ETAT DE L'ART SUR LES *NOCARDIA*

Les bactéries du genre *Nocardia* appartiennent à la famille des *Mycobacteriaceae* de l'ordre des Actinomycetales. Elles ont été isolées pour la première fois par Edmond Nocard en 1888, à partir du farcin du bœuf (Nocard, 1888). Elles ont été décrites comme des microorganismes filamenteux. Une année plus tard, Trevisan a créé le genre *Nocardia*, et *Nocardia farcinica* devient l'espèce type représentative de l'ensemble du genre. Eppinger en 1890 a isolé un microorganisme similaire d'une infection disséminée mortelle chez l'homme. Il est nommé par la suite *Nocardia asteroides* (Beaman and Beaman, 1994).

Les *Nocardia* sont des bactéries à métabolisme aérobie strict, à coloration de Gram positive et partielle avec la technique de Ziehl-Neelsen modifiée (acido-alcoolo résistance partielle). Les *Nocardia* forment des filaments dont la longueur, l'arborescence et l'homogénéité varient en fonction des conditions de culture. L'aspect des colonies sur milieux solides peut être différent selon les espèces ou même selon la souche. Cependant, les colonies présentent toutes des hyphes aériennes qui peuvent leur donner l'aspect de *Streptomyces* spp., voire l'aspect de certains champignons.

Certaines souches de *Nocardia* produisent un pigment de type caroténoïde, les colonies observées ont alors des couleurs qui varient du jaune au rouge en passant par l'orange et le rose (figure 1). Certaines souches sont également capables de produire un pigment brun soluble dans l'eau généralement excrété et capable de colorer le milieu de culture. La présence et l'intensité de chacun de ces pigments dépend des conditions spécifiques de culture utilisées (Brown-Elliott *et al.*, 2006).

Tableau I : Présentation de l'ensemble des espèces de *Nocardia* décrites avec leurs lieux et organes d'isolement.

Nocardia species	Location	Origin	Organ		Year of description
N. abscessus	Japan	Soil		Kageyama *et al* ., 2004	2000
	Japan	Human	Brain, skin, disseminated, eye	Yassin *et al* ., 2000	
N. acidivorans	Stromboli island (Italy)	Soil		Kämpfer *et al*., 2007	2007
N. africana	Sudan	Human	Skin, lungs	Hamid *et al* ., 2001	2001
	Japan	Animal (cat)	Skin	Hattori *et al* ., 2003	
N. alba	China	Soil		Li *et al* ., 2004	2004
N. altamirensis	Spain	Cave wall		Jurado *et al* ., 2008	2008
N. amamiensis	Japan	Soil		Yamamura *et al* ., 2007	2007
	India	Human	Eyes	Reddy *et al* ., 2010	
N. anaemiae	Japan	Human	_	Kageyama *et al* ., 2005	2005
N. aobensis	Japan	Human	_	Kageyama *et al* ., 2004	2005
N. araoensis	Japan	Human	Lung	Kageyama *et al* ., 2004	2004
N.artemisiae	China	Endophytic environment		Zaho *et al* ., 2011	2011
	India	Human	Eyes	Lalitha, 2009	
N. arthritidis	USA	Animal	Bones	Koch *et al* ., 2009	2005
	Japan	Human	Thigh	Kageyama et al., 2004	
	Japan	Human	Brain	Wakui *et al* ., 2008	
N. asiatica	Italy	Human	Skin	Iona *et al* ., 2009	2004
	Japan/Thailand	Human	Sputum	Kageyama et al., 2004	
N. asteroides	Everywere	Soil/Human	All	Blanchard, 1896	1896
	India	Human	Eyes	Reddy *et al* ., 2010	
N. beijingensis	China	Soil		Wang *et al* ., 2001	2001
	Japan, Taiwan	Human	Lungs	Takayanagi *et al* ., 2008	
N. blacklockiae	Autralia	Human	Lung	Conville *et al* ., 2008	2009
N. brasiliensis	Everywere	Human	all, preferentially skin	Pinoy 1913	1913
		Animal (Horse)	Lungs	Deem and Harrington 1980	
N. brevicatena	Not defined	_	_	Goodfellow and Pirouz 1982	1982
N. caishijiensis	China	Soil		Zhang *et al* ., 2003	2003
N. callitridis	Autralia	Plant	Pine tree	Kaewkla and Franco 2010	2010
N. carnea	Turkey, Japan, France	Human	Skin, kidney, lungs	Castellani and Chalmers 1913	1913
N. cerradoensis	Brazil	Soil		Albuquerque de Barros *et al* ., 2003	2003
N. coeliaca	Not defined	_	_	Yano *et al* ., 1969	1948
N. concava	Japan	Human	_	Kageyama *et al* ., 2005	2005
N. coubleae	Koweït	Soil		Rodriguez-Nava *et al* ., 2007	2007
N. crassostreae	USA/Canada	Animal (Oyster)	Oyster	Friedman *et al* ., 1998	1998
N. cummidelens	Not defined	Environment		Maldonado *et al* ., 2000	2001
N. cyriacigeorgica	Everywere	Human	All		2001
	Kuwait	Soil		Khan *et al* ., 2000	
	Japan	Animal (cat)	Skin	Harada *et al* ., 2009	
N. elegans	Japan	Human		Watanabe *et al* ., 2006	2005
	Germany	Human	Lungs	Yassin *et al* ., 2005	
N. endophytica	China	Endophytic environment		Xing et al., 2010	2010
N. exalbida	Japan	Human	Brain, cornea, lung	Lida *et al* ., 2006	2006
N. farcinica	Everywere	Human	All	Trevisan 1889	1889
N. flavorosea	Korea	Soil		Chung *et al* ., 1998	1998
N. fluminea	Not defined	Environment		Maldonado *et al* ., 2000	2001
N. gamkensis	South Africa	Soil		le Roes and Meyers 2006	2007
N. globerula	Not defined	Soil		Waksman and Henrici 1948	1948
N. grenadensis	Grenada island	Water Soil		Kämpfer *et al* ., 2011	2011
N. harenae	Jeju Island (South Korea)	Soil		Seo and Lee 2006	2006
N. higoensis	Japan	Human	Lungs	Kageyama *et al* ., 2004	2004
N. ignorata	Germany	Laboratory		Yassin et al., 2001	2001
	Europe, Kuwait	Human, Soil	Lungs	Rodriguez-Nava *et al* ., 2005	
N. inohanensis	Japan	Human		Kageyama *et al* ., 2004	2004
N. iowensis	USA	Soil		Lamm *et al* ., 2009	2009
N. jejuensis	Jeju Island (South Korea)	Soil		Lee 2006	2006
N. jiangxiensis	China	Soil		Cui *et al* ., 2005	2005
N. jinanensis	China	Soil		Sun *et al* ., 2009	2009
	Taiwan	Human	Skin	Tan *et al* ., 2009	
N. kruczakiae	USA	Human	Lungs	Conville *et al* ., 2004	2005
N. levis (unpublished)	Germany	Human	Lungs, eyes	Reddy *et al* ., 2010	??/2007
N. lijiangensis	China	Soil		Xu *et al* ., 2006	2006
N. mexicana	Mexico	Human	Mycetoma sputum	Rodriguez-Nava *et al* ., 2005	2006
N. mikamii	USA	Human	Lungs	Jannat-Khah *et al* ., 2009	2009
N. miyunensis	China	Soil		Cui *et al* ., 2005	2005
	Italy	Animal (cow)	Breast	Pisoni *et al* ., 2008	
N. neocaledoniensis	India, China	Human	Eyes	Yin *et al* ., 2007	2004
	New-Caledonian	Soil		Saintpierre-Bonaccio *et al* ., 2004	
N. niigatensis	Japan, Korea	Human	Kidney	Kageyama *et al* ., 2004	2004
	France	Human	Lungs	Laurent *et al* ., 2007	2007
N. ninae	Japan	Human	Lung	Moser *et al* ., 2010	2010
N. nova	Everywere	Human, animal, Soil (India)	All	Pier and Fichtner 1981	1983
	Everywere	Human	All	Snijders 1924	
N. otitidiscaviarum	Brazil	Animal (dog, cow)	Skin, lungs, breast	Rlbeiro *et al* ., 2009	1924
	Egypt	Water	Tap water	Abdel-Monem *et al* ., 1991	
N. paucivorans	Canada,Australia, Japan, Germany	Human	Brain, Lung, disseminated	Yassin *et al* ., 2000	2000
N. pigrifrangens	China	Agar plate		Wang *et al* ., 2004	2004
N. pneumoniae	Japan	Human	Lung	Kageyama *et al* ., 2004	2004
N. polyresistens	China	Soil		Xu *et al* ., 2005	2005
N. pseudobrasiliensis	Japan, Europe	Human	All	Ruimy *et al* ., 1996	1996
N. pseudovaccinii	Not defined	_	_	Kim *et al* ., 2002	2002
N. puris	India, Germany, Grece	Human	Eyes, sputum	Yassin *et al* ., 2003	2003
N. rhamnosiphila	South Africa	Soil		Everest *et al* ., 2011	2011
N. salmonicida	Japan	Soil		Yamamura *et al* ., 2003	1999
	USA	Fish (salmon)		Rucker 1949	
				Isik *et al* ., 1999	
N. seriolae	Japan, China	Animal (fish)	Skin	Wang *et al* ., 2009	1988
N. shimofusensis	Japan	Soil		Kageyama *et al* ., 2004	2004
N. sienata	Japan	Human	Sputum	Kageyama *et al* ., 2004	2004
N. soli	Not defined	Environment		Maldonado *et al* ., 2000	2001
N. speluncae	Jeju Island (South Korea)	Soil		Seo *et al* ., 2007	2007
N. takedensis	Japan	Soil		Yamamura *et al* ., 2005	2005
	Spain, Japan	Human	Lungs	Watanabe *et al* ., 2006	
				Betran *et al* ., 2009	
N. tenerifensis	Spain	Soil		Kämpfer *et al* ., 2004	2004
	USA	Animal (cat)	Skin	Ramos-Vara *et al* ., 2007	
N. terpenica	Japan	Human	Lung, Sputum	Hoshino *et al* ., 2007	2007
N. testacea	Japan	Human	Sputum	Kageyama *et al* ., 2004	2004
N. thailandica	Thailand	Human	Sputum, eyes	Kageyama *et al* ., 2008	2005
N. transvalensis	Everywere	Human	Eyes, brain, lungs	Pijper and Pullinger 1927	1927
	Egypt	Water	Tap water	Abdel-Monem et al., 1991	
N. uniformis	Hungary	Soil		Isik *et al* ., 1999	1999
N. vaccinii		Plant	Blueberry	Demaree and Smith 1952	1952
N. vermiculata	Thailand	Human	Sputum	Kageyama *et al* ., 2008	2005
N. veterana	USA, Japan, Autralia	Human	Lungs, skin, blood	Gürtler *et al* ., 2001	2001
N. vinacea	France, Japan	Human	Lungs	Kageyama *et al* ., 2005	2002
	Everywere	Soil		Kinoshita *et al* ., 2002	
N. wallacei	Not defined	Human	Lung	Conville *et al* ., 2008	2009
N. xishanensis	China	Soil		Zhang *et al* ., 2004	2004
N. yamanashiensis	Japan	Human	_	Kageyama *et al* ., 2004	2004

Les techniques classiques de bactériologie ont longtemps permis l'identification des *Nocardia*. En effet, ce sont des microorganismes à catalase positive, à métabolisme oxydatif et capables de croître en utilisant le citrate, le sorbitol, le rhamnose, l'acétamide et le mannitol. Ces Actinobactéries sont également caractérisées par une paroi bactérienne avec un peptidoglycane composée d'acide *méso*-diaminopimélique, d'arabinose, de galactose et d'acides mycoliques dont la longueur de la chaîne de carbone varie de C46 à C60 avec 0 à 4 doubles liaisons (chez *Mycobacterium*, la chaîne de carbone est plus grande : C60 à C90) (Beaman and Beaman, 1994). Un autre critère permettant la différentiation de *Nocardia* des autres Actinobactéries est sa résistance au lysozyme, à l'exception de l'espèce *N. amarae* qui a été renommée *Gordonia amarae* (Klatte *et al.*, 1994). Il faut également noter que les *Nocardia* peuvent être distinguées des autres Actinobactéries par leurs profils en ménaquinones (vitamine K). En effet, les ménaquinones des *Nocardia* sont composés pour plus de 90 % d'entre eux par une ménaquinone hexahydrogéné avec huit unités d'isoprène dans lesquelles les deux extrémités sont cyclisées : le MK-8(H_4) (McNeil and Brown, 1994). Aujourd'hui, ce sont principalement les techniques de biologie moléculaire qui font évoluer la taxonomie et permettent l'identification des *Nocardia* mais les techniques classiques restent encore utilisées en routine au laboratoire et apportent des données complémentaires souvent importantes.

I. Taxonomie des *Nocardia*

La classification des *Nocardia* a pendant longtemps été difficile car elle était basée principalement sur des critères morphologiques et biochimiques. La séparation des différents genres comme les *Corynebacterium, Rhodococcus, Gordonia, Mycobacterium*, *Tsukamurella* et *Nocardia* n'était pas toujours possible sur ces seuls critères. De nouvelles espèces appartenant au genre *Nocardia* sont découvertes chaque année. Depuis 2008, les espèces *N. altamirensis* (Jurado *et al.*, 2008), *N. jinanensis* (Sun *et al., 2009*), *N. iowensis* (Lamm *et al.*, 2009), *N. callitridis* (Kaewkla and Franco, 2010), *N. mikamii* (Jannat-Khah *et al.*, 2010), *N. niwae* (Moser *et al.*, 2010), *N. artemisiae* (Zhao *et al.*, 2011) et *N. endophytica* (Xing *et al.*, 2010) ont été ajoutées au genre *Nocardia*. On compte actuellement plus de 80 espèces de *Nocardia* (tableau I, figure 2).

I.1 Taxonomie du complexe *N. asteroides*

Au sein du genre *Nocardia*, c'est principalement le complexe d'espèces *N. asteroides* qui a été fortement remanié suite à l'utilisation de la biologie moléculaire dans la taxonomie

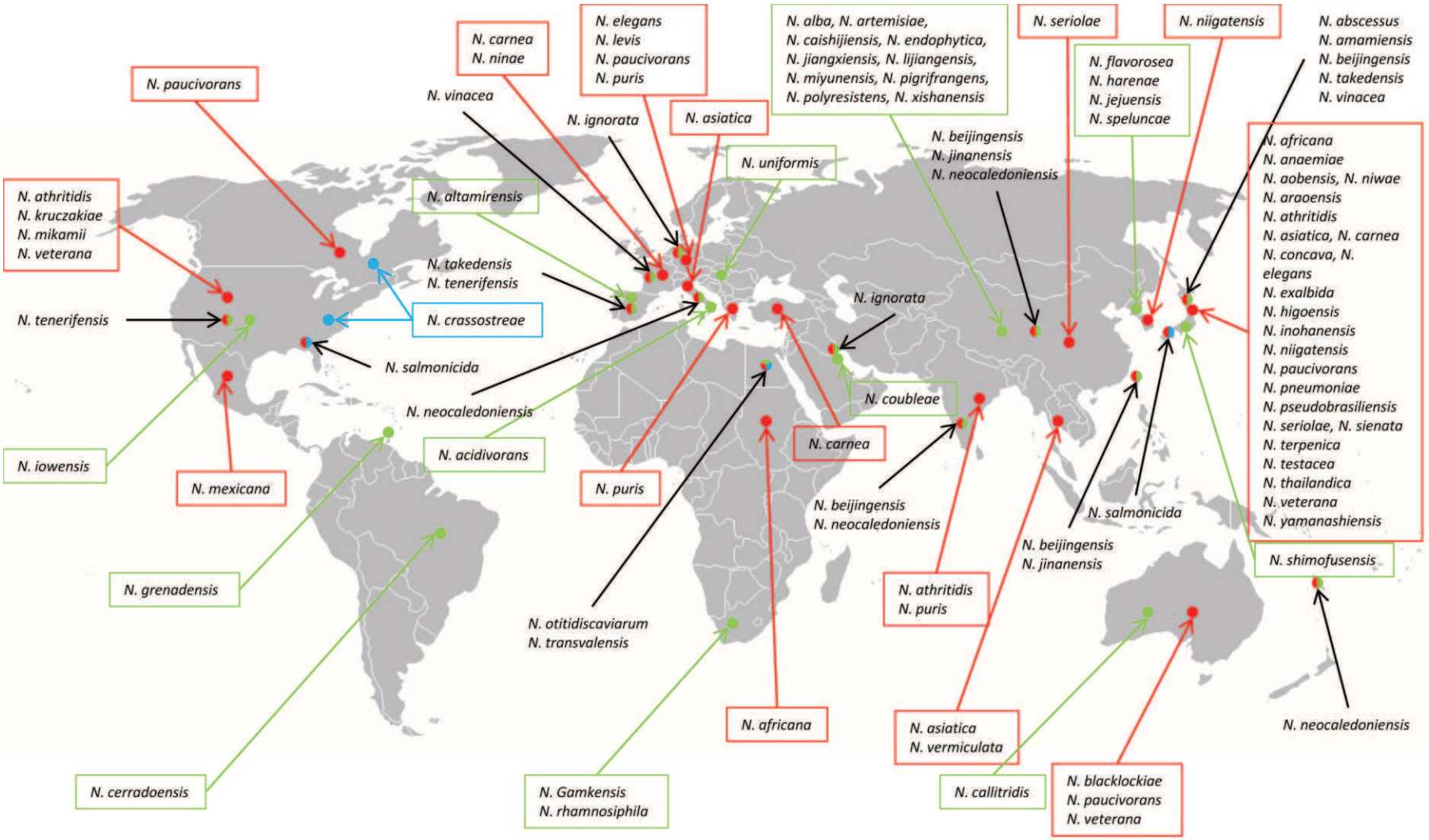


Figure 2 : Localisation mondiale des différentes espèces de *Nocardia*. Les points verts représentent les isolats environnementaux terrestres. Les points bleus représentent les isolats hydriques. Les points rouges représentent les isolats retrouvés en clinique (animale ou humaine). Les espèces retrouvées dans différents types d'environnements sont représentées par différentes couleurs.

des bactéries. Ce taxon regroupait les principales espèces pathogènes chez l'homme et l'animal : *N. asteroides* sensu stricto, *N. nova, N. farcinica* et d'autres espèces dont la définition a commencée en 1988 avec la publication de Wallace *et al*. et s'est poursuivie jusqu'à nos jours. Cette identification est présentée dans les paragraphes suivants (2.1.1 à 2.1.6). Le complexe *N. asteroides* regroupe actuellement 15 espèces de *Nocardia* représentées par six profils de résistance aux antibiotiques (tableau II).

Suite à une étude sur 78 isolats cliniques précédemment décrits comme appartenant au complexe *N. asteroides*, les différentes espèces de ce complexe ont été séparées en différents taxons (Wallace *et al.*, 1988). Six espèces ou complexes d'espèces ont été décrits sur la base de leur profil de sensibilité aux antibiotiques (tableau II). Lors de cette étude, Wallace *et al.* ont constaté que le profil de sensibilité aux antibiotiques de la souche type ATCC 19247 du complexe *N. asteroides,* ne correspondait à aucun des profils de sensibilité décrits. Les études sur d'autres isolats cliniques ont montré que la séquence nucléotidique de l'ARN 16S était spécifique à la souche type ATCC 19247 du complexe *N. asteroides*. Il semblerait donc que cette souche isolée du sol, soit un membre du complexe *N. asteroides*, mais qu'elle soit pour l'instant limitée à cet habitat (Wallace *et al.*, 1988).

I.1.1 Profil de sensibilité aux antibiotiques de type I

Wallace *et al.* (1988) ont montré que le groupe ayant une sensibilité aux antibiotiques de type I correspondait à une espèce distincte des autres espèces du complexe *N. asteroides*. Ces isolats présentent une sensibilité à l'ampicilline, à l'amoxicilline-acide clavulanique, à la carbémicilline et aux céphalosporines à large spectre (cefotaxine et ceftriaxone). En revanche, ces isolats sont résistants à l'imipenème avec des concentrations minimales inhibitrices (CMI) allant de 8 à 32 µg/mL, ce qui les rapproche d'autres espèces résistantes à cet antibiotique comme *N. brasiliensis* et *N. otitidiscaviarum*. *N. abscessus*, qui présentent également une sensibilité au sulfaméthoxazole (SMX), à la gentamicine et à l'amikacine, est sensible ou intermédiaire à la monocycline, résistante aux fluoroquinolones, à l'érythromycine et à la clarithromycine (tableau II). Par la suite, Yassin *et al.* (2000) ont isolé, à partir d'infections dues à des *Nocardia*, des clones présentant un profil de sensibilité de type I. L'analyse de la séquence de l'ARN 16S de ces isolats a confirmé leur appartenance à ce taxon. A partir de ces résultats, l'espèce *N. abscessus* a été créée et correspond aux souches du complexe *N. asteroides* présentant le profil de résistance aux antibiotique de type I (Brown-Elliott *et al.*, 2006). Une particularité de cette espèce a été mise en évidence par l'équipe de Steingrube en

Tableau II : Profils de sensibilité aux antibiotiques des isolats appartenant au complexe *N. asteroides*, *N. brasiliensis*, *N. pseudobrasiliensis* et *N. otitidiscaviarum*. D'après Brown Elliott *et al*., 2006.

Species	Corresponding type drug pattern	Major drug pattern characteristics
N. abscessus	I	Susceptible to ampicillin, amoxicillin-clavulanic acid, ceftriaxone, linezolid, and amikacin; most have resistant MICs for imipenem; resistant to ciprofloxacin and clarithromycin
N. brevicatena/paucivorans complex, unnamed group	II	Same as type I but kanamycin MICs low (<1 μg/ml) and susceptible to ciprofloxacin; usually resistant to gentamicin; resistant to clarithromycin
N. nova complex (*N. nova*, *N. veterana*, *N. africana*, *N. kruczakiae*)	III	Susceptible to ampicillin but resistant to amoxicillin-clavulanic acid; susceptible to erythromycin, clarithromycin, linezolid, and ceftriaxone; very low MICs to imipenem and amikacin
N. transvalensis complex	IV	Resistant to all aminoglycosides, including amikacin; susceptible to ciprofloxacin, ceftriaxone, linezolid, and imipenem; resistant to erythromycin and clarithromycin
N. farcinica	V	Resistant to ampicillin, broad-spectrum cephalosporins, and clarithromycin; resistant to aminoglycosides except amikacin; susceptible to ciprofloxacin, linezolid, and imipenem
N. asteroides complex	VI	Resistant to ampicillin, amoxicillin-clavulanic acid, clarithromycin, and ciprofloxacin; susceptible to ceftriaxone, amikacin, linezolid, and imipenem
N. asteroides type VI (unnamed), *N. cyriacigeorgica*		The ATCC type strain is susceptible to ampicillin, other drug susceptibilities are the same as for pattern VI
N. brasiliensis	NA[a]	Susceptible to minocycline, amoxicillin-clavulanic acid, carbenicillin, and sulfamethoxazole; resistant to kanamycin, cefamandole, ampicillin, ciprofloxacin, and clarithromycin
N. pseudobrasiliensis	NA	Susceptible to carbenicillin, ciprofloxacin, clarithromycin, and sulfamethoxazole; resistant to kanamycin, cefamandole, ampicillin, minocycline, and amoxicillin-clavulanic acid
N. otitidiscaviarum	NA	Susceptible to kanamycin, gentamicin, amikacin, sulfamethoxazole, and ciprofloxacin; resistant to ceftriaxone, ampicillin, amoxicillin-clavulanic acid, carbenicillin, and imipenem (often resistant to all β-lactam antibiotics)

[a] NA, not applicable.

1997. Elle a identifié deux profils spécifiques de *N. abscessus* par Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) à partir de l'amplification d'une région de 441 pb du gène *hsp65* (Steingrube *et al.*, 1997).

I.1.2 Profil de sensibilité aux antibiotiques de type II

N. brevicatena et *N. paucivaurans* constituent les deux principales espèces présentant un profil de sensibilité aux antibiotiques de type II. *N. brevicatena* était initialement affiliée au genre *Micropolyspora* (Collins *et al.*, 1985) mais a été reclassée en tant que *Nocardia* puisque sa paroi contenait de l'acide *méso*-diaminopimélique (Goodfellow and Pirouz, 1982). Ce complexe d'espèces présente un profil de sensibilité similaire à celui de *N. abscessus* (type I). Sa particularité se situe dans sa résistance à la gentamicine et sa sensibilité à l'amikacine, à la kanamycine et à la tobramycine (Wallace *et al.*, 1988) (tableau II). D'un point de vue biochimique, ces deux espèces sont faiblement actives puisqu'elles sont capables d'utiliser très peu de source de carbone : l'acétate et le tréhalose. *N. brevicatena* DSM 42024 se différencie de *N. paucivaurans* DSM 44386 par sa capacité à utiliser l'alcool isoamilique et le 1,2 propanediol comme source de carbone, et à hydrolyser l'esculine (Yassin *et al.*, 2001b). La séquence de l'ARN 16S de ces deux souches présente 99,6 % de similarité, mais les résultats de l'hybridation ADN-ADN (DDH) confirment leur appartenance à deux espèces distinctes.

I.1.3 Profil de sensibilité aux antibiotiques de type III

Les isolats cliniques présentant un profil de résistance aux antibiotiques de type III appartiennent au complexe *N. nova* (Tsukamura, 1982). Ce complexe regroupe les espèces *N. nova* (Wallace *et al.*, 1991), *N. africana* (Hamid *et al.*, 2001), *N. kuczakiae* (Conville *et al.*, 2004) et *N. veterana* (Conville *et al.*, 2003). Ce complexe est défini par un profil de sensibilité aux antibiotiques identique ou similaire aux espèces de ce complexe : sensibilité à l'ampicilline, à l'érythromycine, à la clarithromycine, au linézolide, au ceftriaxone et à de faible concentration en imipenème et amikacine ; et résistance à l'amoxicilline-acide clavulanique (tableau II). Les espèces de ce complexe sont également caractérisées par des propriétés biochimiques proches et des profils de RFLPs identiques sur les séquences du gène de l'ARN 16S (avec les enzymes *Hin*PII et *Dpn*II), et du gène de l'*hsp65* (avec les enzymes *Msp*I et *Bsa*HI). Conville et Witebsky, en 2004, concluent que les meilleurs tests phénotypiques permettant de différencier ces quatre espèces formant ce complexe sont : la production d'arylsulfatase à 14 jours, l'hydrolyse d'esculine et de caséine ainsi que la production d'acide à partir de D-galactose, de glycérol, de raffinose, de salicine et de

tréhalose (Conville *et al.*, 2004). D'autres études ont montré que cette identification phénotypique ne suffisait pas et qu'elle devait être complétée par des analyses de phylogénie moléculaire sur les séquences des gènes de l'ARN 16S et *hsp65* ainsi qu'une DDH (Patel *et al.*, 2004).

I.1.4 Profil de sensibilité aux antibiotiques de type IV

Le complexe *N. transvalensis* comprend les souches présentant un profil de sensibilité aux antibiotiques de type IV. Ce complexe est caractérisé par une résistance à l'érythromycine, à la clarithromycine et aux aminoglycosides, ce qui inclut l'amikacine pour la majorité des souches de ce complexe et qui est une caractéristique unique au sein du genre *Nocardia*. Ces souches montrent aussi une sensibilité à la ciprofloxacine, au ceftriaxone, au linézolide et à l'imipenème (tableau II). C'est en 1927 que la première description de *N. transvalensis* a été faite suite à son isolement d'un mycétome chez un patient sud-africain (Pijper and Pullinger, 1927). En 1997, Wilson *et al.* caractérisent 56 isolats cliniques comme appartenant au complexe *N. transvalensis* en raison de leurs sensibilités aux antibiotiques et de leurs caractéristiques biochimiques communes. Wilson parvient à séparer ce complexe en quatre taxons : *N. asteroides* type IV, *N. transvalensis* et *N. transvalensis* nouveau taxon 1 et nouveau taxon 2. *N. transvalensis sensu stricto* peut être séparé des trois autres taxons par sa capacité à utiliser l'I-myo-inositol et sa résistance à l'amoxicilline-acide clavulanique. Les trois autres taxons de ce complexe peuvent être séparés selon leurs différentes capacités à utiliser l'I-erythritol, le ribitol, le D-mannitol et le D-glucitol. Wilson *et al.* (1997) ont confirmé ces résultats par PCR-RFLP d'un amplicon de 441 pb sur le gène *hsp65*. Ils ont montré que l'utilisation de plusieurs enzymes permettait d'affilier une souche de manière stricte à un taxon (Wilson *et al.*, 1997). McNabb *et al.*, en 1997, ont analysé la composition en acide gras de 13 souches appartenant au complexe *N. transvalensis*. Cette analyse a été utilisée comme méthode de taxonomie, mais cette technique s'est avérée peu concluante puisque les différents isolats n'ont pu être affiliés de manière stricte à un taxon (McNabb *et al.*, 1997). En 2008, Conville *et al.* confirment les résultats obtenus par Wilson et créent deux nouvelles espèces appartenant au complexe *N. transvalensis* : *N. wallacei* qui regroupe les souches de l'ancienne dénomination *N. asteroides* type IV, et *N. blacklokiae* qui devient la nouvelle dénomination pour les souches de *N. transvalensis* « new taxon 1 ». La création de ces deux nouvelles espèces est appuyée par l'analyse des séquences des gènes de l'ARN 16S, *hsp65* et *secA1* ainsi que par la DDH de différentes souches appartenant aux trois taxons. Aucune nouvelle espèce n'a été créé pour *N. transvalensis* « new taxon 2 » puisque ses

caractéristiques phénotypiques ne sont encore pas clairement définies à ce jour (Conville *et al.*, 2008).

I.1.5 Profil de sensibilité aux antibiotiques de type V

N. farcinica est une espèce du complexe *N. asteroides*. Elle représente à elle seule les souches formellement désignée comme *N. asteroides* présentant une sensibilité aux antibiotiques de type V. Ces caractéristiques principales sont la sensibilité à la ciprofloxacine, au linézolide et à l'imipenème et la résistance à la majorité des β-lactamines, à la clarithromycine et aux aminoglycosides, en excluant l'amikacine (tableau II). C'est également la seule espèce du complexe *N. asteroides* capable de se développer à 45 °C, à utiliser l'acétamide comme source de carbone et d'azote et à produire de l'acide à partir du rhamnose. Les analyses sur les séquences de l'ARN 16S et *hsp65*, les DDH ainsi que l'analyse des lipides par différentes équipes de recherche ont montrées que l'ensemble des isolats présentant cette sensibilité aux antibiotiques formaient une espèce distincte (*N. farcinica*) incluant la souche type ATCC 3318^T (première souche de *Nocardia* isolée par E. Nocard) (Steingrube *et al.*, 1995 ; Patel *et al.*, 2004). En 2004, Ishikawa *et al*., ont publié la séquence complète du génome de la souche *N. farcinica* 10152, première souche du genre *Nocardia* à être entièrement séquencée. Elle présente un génome de six mégabases et deux plasmides. De multiples gènes candidats pour expliquer la virulence et le profil de résistance aux antibiotiques ont été décrits sans confirmation expérimentale à ce jour (Ishikawa *et al.*, 2004).

I.1.6 Profil de sensibilité aux antibiotiques de type VI

L'espèce *N. cyriacigeorgica* comprend les souches ayant une sensibilité aux antibiotiques de type VI (Roth *et al.*, 2003 ; Conville and Witebsky, 2007). Cette espèce est sensible aux céphalosporines à large spectre et est résistante aux pénicillines (tableau II). L'analyse des séquences des gènes de l'ARN 16S et *hsp65* par différentes équipes de recherche montrent que les souches identifiées comme *N. asteroides* type VI et *N. cyriacigeorgica* appartiennent probablement à la même espèce (Yassin *et al.*, 2001b ; Roth *et al.*, 2003). Ce n'est qu'en 2007 que Conville *et al.,* confirment ces résultats par la réalisation d'une DDH entre les souches types de ces deux espèces, *N. asteroides* type VI (ATCC 14759) et *N. cyriacigeorgica* (DSM 44484).

I.2 Taxonomie des autres espèces de *Nocardia*

D'autres espèces pathogènes comme *N. brasiliensis* et *N. otitidiscaviarum* présentent une taxonomie plus homogène. L'analyse phylogénétique des séquences de gène de l'ARN

16S a permis de mieux affiner la taxonomie des Actinobactéries, surtout concernant les genres *Rhodococcus* et *Nocardia* qui peuvent présenter plus de 60 % de gènes en synténie (Rainey *et al.*, 1995). Certaines espèces, positionnées dans un premier temps à l'intérieur d'un genre ont été ensuite reclassées dans un autre genre suite à une analyse moléculaire (*N. amarae* est devenue *Gordonia amarae* (Klatte *et al.*, 1994), *N. restricta* et *Rhodococcus equi* se sont révélées être une seule et même espèce (Rainey *et al.*, 1995). Aujourd'hui, l'analyse des séquences génétiques de l'ARN 16S a montré ses limites dans la définition des espèces, puisque des espèces différentes ont présenté une identité de séquence de l'ARN 16S pouvant atteindre 99,8 % (Conville *et al.*, 2004). Pour répondre à cette observation, la taxonomie des *Nocardia* tout comme celle d'autres procaryotes se fait également à l'aide de plusieurs séquences génétiques comme les gènes de la superoxyde dismutase (*sod*) et de l'heat shock protein 65 (*hsp*).

Les SOD sont des métalloprotéines découvertes par McCord et Fridovich en 1969. Elles protègent les cellules contre les espèces super réactives de l'oxygène en catalysant la réaction de dismutation de l'ion superoxyde en oxygène et peroxyde d'hydrogène (McCord and Fridovich, 1969). Les protéines de type HSP ont été décrites pour la première fois par Tissière *et al.* en 1974 suite à l'observation de leur surexpression dans des cellules de drosophiles lors de l'exposition à un stress tel qu'un choc thermique (Tissieres *et al.*, 1974). Ce n'est que dans les années 1980 que leur rôle biologique en tant que chaperonnes intervenant dans la conformation et le trafic intracellulaire des protéines a été reconnu (Schlesinger, 1990). Puisque ces deux familles de protéines assurent un rôle important dans la cellule, elles sont codées par des gènes qui évoluent lentement. Les différences de séquences sont le reflet d'une divergence phylétique, d'où leur utilisation notamment pour la séparation des espèces bactériennes. Concernant les *Nocardia*, il semblerait que la comparaison de séquences des gènes *sod* soit plus discriminante que l'utilisation de celles de l'*hsp65* (Rodriguez-Nava, communications personnelles).

Récemment, la technique de Multi Locus Sequence Alignment (MLSA) a été utilisée pour séparer les espèces de *Nocardia*. Elle est basée sur le concaténât d'une partie des séquences des gènes *gyrB-rrs-secA1-hsp65-rpoB* (McTaggart *et al.*, 2010). La MLSA a confirmé les résultats de taxonomie obtenus avec les techniques présentées précédemment (phylogénie moléculaire et DDH), avec une délimitation claire entre les différents taxons du complexe *N. asteroides* et les espèces bien définies telles que *N. otitidiscaviarum* et *N. brasiliensis*. La MLSA a même permis de décrire trois clusters de souches au sein de l'espèce *N. cyriacigeorgica* ce qui en ferait une technique de taxonomie plus discriminante.

II. Les *Nocardia* dans l'environnement

Le réservoir des *Nocardia* est environnementale puisqu'à ce jour aucun isolat n'a été décrit comme étant un pathogène strict de l'animal ou de l'homme. Actuellement, il est établi que les *Nocardia* sont des microorganismes ubiquitaires ayant une capacité à coloniser des environnements très variés. Il semblerait que le principal réservoir des *Nocardia* soit le sol, bien qu'elles puissent également être retrouvées dans des lacs, des sédiments marins, des composts, des végétaux, de la poussière et dans l'atmosphère. A ce jour, il existe peu de publications récentes portant sur la diversité et de l'abondance du genre *Nocardia* dans l'environnement. Il existe 45 espèces de *Nocardia* ayant été identifiées dans l'environnement à ce jour, 29 de ces espèces n'ont jamais été retrouvée dans des pathologies que ce soit chez la plante, l'animal ou chez l'homme (tableau I et figure 2). Les *Nocardia* environnementales, comme *N. asteroides*, sont décrites comme des bactéries impliquées dans la digestion saprophytique et le recyclage de la matière végétale dans les environnements naturels (Goodfellow and Williams, 1983).

II.1 Incidence des *Nocardia* dans les sols

La santé et l'environnement sont un champ d'investigation très actuel. En effet, de nombreux microorganismes pathogènes ont un réservoir naturel environnemental. La connaissance des niches écologiques bactériennes aident à l'évaluation du risque sanitaire des populations en contact avec ces environnements. Les sols sont des réservoirs bactériens très étudiés à l'heure actuelle. Selon sa composition, le sol peut atteindre une concentration de 10^{10} bactéries par gramme, ce qui en fait un lieu d'étude privilégié des réservoirs et de la diversité d'espèces microbiennes dans l'environnement. Les principales espèces environnementales décrites appartiennent au complexe *N. asteroides* (Schaal and Bickenbach, 1976 ; Goodfellow and Williams, 1983), ce sont également les espèces les plus retrouvées en clinique. Concernant la localisation des espèces du complexe *N. asteroides*, il semblerait qu'il n'y ait pas de zones géographiques préférentielles et qu'elles soient présentes dans les différentes régions du globe. Certaines espèces, telles que *N. cerradoensis*, isolée de la savane du Cerrado au Brésil en 2003 (Albuquerque de Barros *et al.*, 2003), *N. xishanensis* isolée de la montagne Xishan en Chine ou encore *N. gamkensis* isolée à partir de sols provenant de la bordure de la rivière Gamka en Afrique du Sud (le Roes and Meyers, 2006) semblent n'être retrouvées que dans des régions précises de la planète. Les espèces *N. brasiliensis* et *N. pseudobrasiliensis* sont quant à elles couramment rencontrées au niveau des régions

tropicales. Ce qui n'exclue pas qu'elles puissent être responsables d'infections dans les zones tempérées, notamment au Japon (Klein-Gitelman and Szer, 1991 ; Kageyama *et al.*, 2002).

Actuellement, on ne peut pas conclure quant au potentiel de virulence de ces espèces puisque peu d'études ont utilisé des souches isolées de l'environnement afin d'évaluer leur virulence. Parmi les isolats responsables d'infections humaine ou animale, aucun lien avec une présence dans le sol n'a encore été établi. Toutefois, Kageyama *et al*., en 2005, ont décrit une infection humaine au Japon due à *N. vinacea*. Cette espèce est connue pour être retrouvée dans le sol et n'avait jamais été décrite comme étant pathogène. Nous avons ici un exemple d'une espèce décrite comme environnementale au préalable qui se révèle être pathogène pour l'homme. Cependant, ne s'agissant pas de la même souche, cette étude ne montre pas ce lien de façon directe. Les contraintes environnementales ainsi que la co-localisation d'une bactérie avec des microorganismes pathogènes ou de l'ADN libre dans le sol pourrait permettre l'acquisition de gènes de virulence par transfert horizontaux et accroître le pouvoir pathogène de cette bactérie.

L'étude d'Abdel-Monem *et al,* (1991) a cherché à faire le lien direct entre l'isolement de *Nocardia* dans l'environnement et virulence. Cette étude portait sur les espèces *N. transvalensis* et *N. otitidiscaviarum* qui ont été isolées dans des canalisations d'eau destinée à la consommation en Egypte. La virulence de ces isolats a été testée sur des souris : l'injection de chacune de ces espèces a provoqué des érythèmes, une inflammation ainsi que des abcès au niveau des reins. Cette étude montre pour la première fois que des souches environnementales de *Nocardia* peuvent avoir un pouvoir pathogène (Abdel-Monem *et al.*, 1991).

Récemment, la technique de Repetitive Extragenic Palindromic (REP)-PCR Fingerprinting a montré qu'il existait une diversité au sein des isolats obtenus pouvant être corrélé avec le milieu duquel ces souches sont issues. Les souches provenant du sol, d'environnements aquatiques et ou d'un prélèvement clinique peuvent ainsi être affiliés à des groupes communs suivant le profil obtenu en REP-PCR. L'utilisation de cette technique pourrait donc permettre de relier une souche clinique à son habitat naturel et pourrait être utilisé dans le cas d'études épidémiologiques afin de faire ce lien entre souches environnementales et souches cliniques (Yamamura *et al.*, 2004).

II.2 Incidence des *Nocardia* dans les eaux

Le nombre et la diversité des microorganismes (bactéries, archaebactéries, protistes et champignons) sont maintenant assez bien documentés dans les eaux douces mais également

dans les eaux salées. Certains de ces microorganismes sont des acteurs majeurs des processus biogéochimiques tels que le métabolisme du carbone dissous ou le cycle de l'azote qui sont cruciaux pour l'équilibre des écosystèmes. Ces microorganismes jouent également un rôle important dans les processus de maintien de la qualité de l'eau (mécanismes surtout connus pour l'eau douce), et peuvent être naturellement impliqués dans des processus de dépollution (Hahn, 2006 ; Logares *et al.*, 2009). Même si le rôle écologique des microorganismes dans l'environnement n'est plus à démontrer, une préoccupation actuelle est la présence de microorganismes pathogènes dans l'environnement et notamment dans les eaux.

Les eaux douces accessibles constituent environ 2,5 % de l'eau totale de la planète, la majorité de l'eau douce (75 %) étant stockée au niveau des pôles et des glaciers. Dans la littérature, il existe peu de cas d'isolement de *Nocardia* à partir de milieu aquatique mais le genre *Nocardia* a été aussi bien retrouvé dans les eaux douces que les eaux salées (Abdel-Monem *et al.*, 1991 ; Friedman *et al.*, 1998 ; Yamamura *et al.*, 2004).

Des souches appartenant au complexe *N. asteroides* ont été isolées de sédiments du lac Suwa au Japon (Yamamura *et al.*, 2004). L'identification de ces isolats a été réalisée selon leurs caractéristiques morphologiques et biochimiques, et par l'analyse RFLP de leur séquence de l'ARN 16S. L'utilisation de la technique de REP-PCR pour comparer ces isolats avec d'autres provenant du sol ou du tissu animal a permis de les différencier en fonction de leur environnement d'origine.

Les eaux salées semblent être un réservoir naturel des *Nocardia*. Le milieu marin représente plus de 70 % de la surface de la planète, il est donc important de s'intéresser à la répartition de ce genre bactérien dans cet environnement. *N. cummidelens* a été décrite pour la première fois en 2000 (Maldonado *et al.*, 2000) suite à son isolement à partir d'une cheminée volcanique à Medmenham au Royaume Uni et *N. alba* a été isolée d'un sol de la province de Yunnan en Chine (Li *et al.*, 2004). Ces deux espèces ont également été retrouvées dans les sédiments d'eaux salées du fjord Trondheim où des prélèvements ont été effectués entre 4,5 et 28 mètres de profondeur (Bredholdt *et al.*, 2007). Ces deux espèces n'ont pour l'instant jamais été retrouvées en clinique, mais leur capacité à coloniser des niches écologiques présentant des caractéristiques très différentes (cheminée volcanique, sol et fjords) dans des lieux éloignés (Royaume Uni, Chine et Norvège) montre tout l'intérêt de l'étude de ces espèces.

Deux espèces pathogènes de *Nocardia* (*N. crassostreae* et *N. seriolae*) semblent être présentes dans l'eau salée car elles sont impliquées dans des infections de coquillages (huîtres) et de poissons respectivement (Friedman *et al.*, 1998 ; Engelsma *et al.*, 2008 ; Wang *et al.*, 2009), (voir partie II.3). Cependant, leur réservoir n'a à ce jour pas encore été identifié.

Une autre espèce de *Nocardia*, *N. salmonicida* est couramment impliquées dans des infections de poisson. Cependant, des isolats de cette espèces ont été détecté dans des sols ce qui montre la capacité de *Nocardia* à coloniser des environnements très différents (Yamamura *et al.*, 2004).

II.3 Incidence des *Nocardia* dans d'autres environnements

En plus des habitats décrits dans la section précédente, des *Nocardia* ont également été retrouvées dans des boues activées de stations d'épuration. Stratton *et al*., en 1996, ont montré l'implication de *N. farcinica* dans la stabilisation de la mousse des boues activées (Stratton *et al.*, 1996). Des souches appartenant au complexe *N. asteroides* ont été isolées par différentes équipes de recherche à partir de boues activées (Lee *et al.*, 2003 ; Yamamura *et al.*, 2004). Lee *et al.* (2003) ont montré que la biomasse de *Nocardia* s'accroît avec l'augmentation de la température dans les boues. Cela rejoint l'observation faite par Schaal et Bickenbach en 1976 sur le fait que *N. asteroides* se développe préférentiellement dans les environnements secs et chauds en montrant que le nombre d'isolements de *N. asteroides* à partir de sols est plus faible suite à une année froide et humide plutôt que suite à une année chaude et sèche.

Parthasarathi *et al.*, en 2007, ont mis en évidence l'incapacité de plusieurs espèces de vers de terre à digérer les espèces de *N. asteroides* et *N. otitidiscaviarum*. Ces espèces se retrouvent alors enrichies au niveau de leurs déjections. Cette équipe n'a pas su expliquer la raison de la non digestion mais a supposé que les *Nocardia* produisaient des métabolites inhibiteurs dont l'action viendrait s'ajouter à la protection octroyée par la paroi résistante de ces bactéries (Parthasarathi *et al.*, 2007).

Enfin, *Nocardia* a également été isolé à partir de sols pollués. Comme de nombreuses Actinobactéries, les *Nocardia* semblent posséder une machinerie cellulaire et enzymatique compatible avec la métabolisation de polluants et ainsi avec l'adaptation et la survie dans ces environnements extrêmes. Des prélèvements de sédiments contaminés par des métaux lourds (nickel, cobalt, cadmium, mercure et chrome) dans la ville de Lagos au Nigéria ont montré la présence de *Nocardia* sp. (Oyetibo *et al.*, 2010). Il semblerait donc que ces souches soient : (i) capables de participer au processus de dépollution du sol en métabolisant certains métaux présents ; ou (ii) capable de résister à des concentrations élevées en polluants par le biais de pompes d'efflux permettant le maintien d'une homéostasie compatible avec la vie de la cellule. Dans l'étude d'Oyetibo *et al.*, l'accent a été mis sur la double résistance des souches isolées : aux métaux lourds et à un grand nombre d'antibiotiques. Ce mécanisme de multi-résistance est actuellement bien connu et très étudiés chez les microorganismes car les

déterminants génétiques des systèmes de résistance aux métaux et aux antibiotiques sont souvent les mêmes ou sont génétiquement proches (Joly and Cluzel, 1975 ; Alonso *et al.*, 2000 ; Matyar *et al.*, 2008). Ces environnements fortement pollués pourraient favoriser l'émergence de souches multi-résistantes. Cette résistance, une fois acquise, pourrait poser des problèmes d'émergence de souches pathogènes plus difficile à traiter.

Les environnements contaminés par le pétrole ou ses dérivés sont des niches écologiques à partir desquels il est possible d'isoler des souches de *Nocardia*. Ce sont notamment les espèces du complexe *N. asteroides* (Khan *et al.*, 1997) et *N. otitidiscaviarum* (Zeinali *et al.*, 2008) qui ont été isolées au Koweït et en Iran respectivement. Les études de ce type de sols ont permis également d'identifier une nouvelles espèce, *N. coubleae*, isolée de sols du Koweït fortement contaminé aux hydrocarbures (Rodriguez-Nava *et al.*, 2007).

Il est évident que la proportion de *Nocardia* est largement sous-estimée dans l'environnement, et particulièrement dans les sols. Cela est confirmé par la recrudescence de nouvelles espèces décrites à partir de cet habitat : plus de 50 % des espèces nouvellement décrites ces 5 dernières années proviennent de l'environnement et principalement du sol (tableau I).

III. Les *Nocardia* : des agents pathogènes

III.1 Infection à *Nocardia* chez les plantes

La capacité de *Nocardia* à infecter des plantes est très peu documentée dans la littérature. L'espèce *N. vaccinii*, décrite par Demaree et Smith en 1952 aux Etats-Unis d'Amérique (USA), est considérée comme la seule espèce de *Nocardia* pathogène de plantes. Elle cause la galle chez le myrtillier ainsi que la prolifération du bourgeon de la myrtille. Depuis, cette espèce n'a plus été décrite dans ce type de tumeur. Aucune autre espèce de *Nocardia* n'a à ce jour été mise en cause dans une pathologie végétale.

III.2 Infection à *Nocardia* chez l'animal

C'est une infection chez l'animal qui a permis la première description des *Nocardia* par Nocard (voir introduction). Les espèces retrouvées classiquement chez l'animal sont les espèces du complexe *N. asteroides*, *N. brasiliensis* et *N. otitidiscaviarum*. Ces espèces sont régulièrement responsables d'infection chez le bœuf, le cheval, le poulet, le chat et le chien. Les types d'infections provoquées et les organes touchés par ces espèces sont assez similaires à ceux observés chez l'homme (voir section III.5). Certaines infections sont, en revanche, plus



Figure 3 : Chat présentant des lésions détériorées après le traitement prednisolone. (A) Ulcère sur la patte arrière. (B) Abcès sous-cutanée avec trajets fistuleux dans la partie ventrale du cou. D'après Harada *et al*., 2009.

spécifiques au monde animal, par l'espèce de *Nocardia* mise en jeu, la manifestation clinique ou l'espèce touchée. Par exemple, la mammite est observée principalement chez les bovidés (Maldonado *et al.*, 2004). L'expérimentation animale faite sur des chèvres par Bassam et Hassao a permis de détailler les signes cliniques de cette maladie. Elles peuvent être aiguës avec une inflammation de la glande affectée qui va engendrer une réaction systémique. Elles peuvent aussi être chroniques, la mamelle étant alors le siège d'une fibrose et présentant des nodules remplis de pus ; l'agent pathogène est retrouvé au niveau de la glande et du lait produit par ces animaux (Bassam and Hasso, 1997). Les espèces du complexe *N. asteroides* (plus particulièrement *N. farcinica*) ainsi que *N. otitidiscaviarum* peuvent être responsables de cette maladie. Plus récemment, c'est l'espèce *N. neocaledoniensis* qui a été reconnue comme agent causant des mammites à un troupeau de vaches en Italie. C'est la première description de cette espèce dans une pathologie animale (Pisoni *et al.*, 2008).

Les espèces *N. africana*, *N. elegans* et *N. tenerifensis* ont en commun d'avoir été identifiées comme agents responsables de granulome chez le chat (figure 3). Ce sont des espèces peu rencontrées en clinique et le diagnostic de l'agent infectieux peut s'avérer difficile. Cela a été le cas pour l'infection par *N. africana*. La souche a causé la mort du chat puisqu'elle n'était pas sensible au traitement administré (triméthoprime (TMP)-sulfadimethoxine pendant 1 mois). L'autopsie du chat a révélé que la nocardiose était disséminée, des nodules positifs en coloration de Gram ont été identifiés au niveau sous-cutanée, du foie et de la rate (Hattori *et al.*, 2003 ; Ramos-Vara *et al.*, 2007 ; Harada *et al.*, 2009).

N. arthritidis a été identifiée pour la première fois chez un patient atteint de polyarthrite rhumatoïde d'où le nom de l'espèce : *N. arthritidis*. Contrairement à ce que l'on pourrait penser, cet isolat était responsable d'une infection pulmonaire et non de l'os ou d'une articulation. Elle a toutefois été retrouvée dans une infection des os des métatarses chez un veau aux USA (Koch *et al.*, 2009), ainsi que dans des kératites (Lalitha, 2009).

Les nocardioses peuvent également toucher plus rarement d'autres animaux. Une infection mortelle causée par *N. brasiliensis* a été décrite chez le tatou (Gezuele, 1972). Elles sont aussi décrites chez les oiseaux : la perruche de Derby, la paruline orangée, le pigeon biset, le râle à bec jaune, l'albatros et le perroquet. Suivant les cas, les infections sont observées au niveau sous-cutané, des poumons, du foie, des reins, de la rate et de la cornée. Les espèces mises en causes appartiennent au complexe *N. asteroides* (Long *et al.*, 1983 ; Sileo *et al.*, 1990 ; Bacciarini *et al.*, 1999 ; Darzi *et al.*, 2006 ; Park and Jaensch, 2009 ; Reynolds *et al.*, 2009).

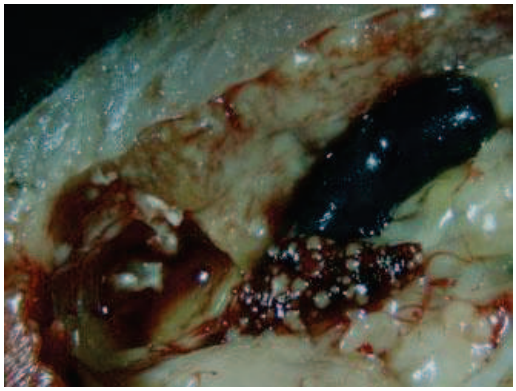


Figure 4 : Poisson tigre malade montrant de nombreuses structures nodulaires dans la rate et les reins (flèches). D'après Wang *et al*., 2009.

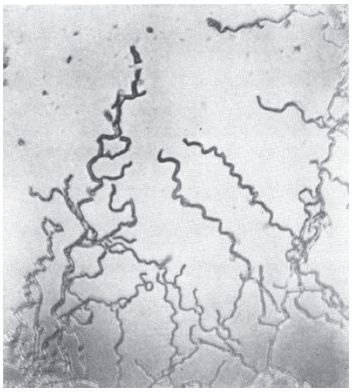


Figure 5 : Hyphes aériens de *Nocardia salmonicida* (x 1000). D'après Rucker *et al*. 1949.

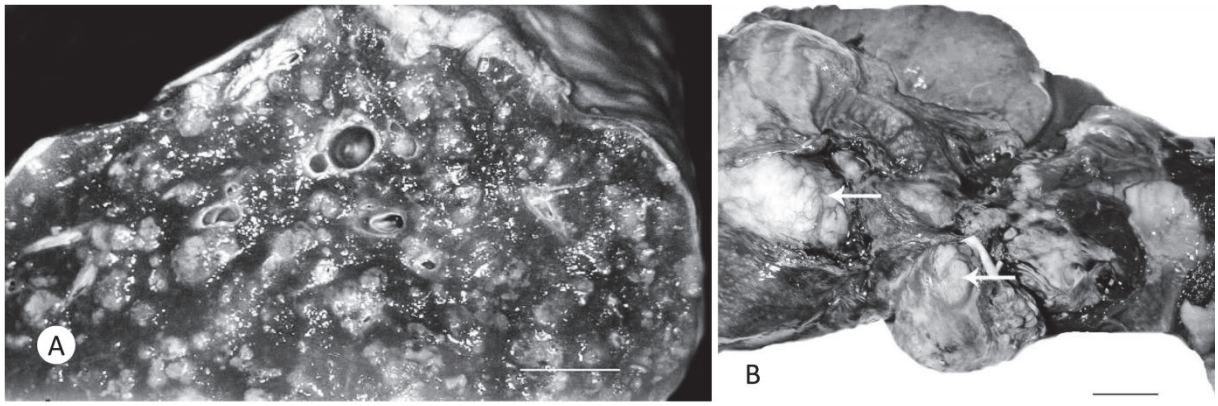


Figure 6 : (A) Viscères thoraciques d'un phoque à capuche avec une nocardiose, les ganglions lymphatiques trachéaux-bronchiques (flèches) sont gonflés et présentent des abcès. (B) Poumon d'un bélouga présentant un pyogranulome multifocal dispersé à l'ensemble du parenchyme . D'après St. Leger *et al*., 2009.

La présence de *Nocardia* dans le sol explique que l'on retrouve des cas de nocardiose chez les animaux terrestres. Les difficultés d'isolement de ce genre bactérien expliquent qu'il soit peu retrouvé dans les environnements aquatiques bien que des cas de nocardiose chez des mollusques, poissons et mammifères confirment la présence de souches de *Nocardia* pathogènes dans ce milieu. L'espèce *N. crassostreae* a été responsable de la mort d'huîtres (*Crassostrea gigas*) en culture aux USA, au Canada (Friedman *et al.*, 1998). Les huîtres infectées présentaient souvent une coloration brune du manteau et/ou la présence de nodules allant du jaune au vert sur le muscle adducteur, les branchies, le cœur ou le manteau. Cette espèce a été identifiée 10 ans plus tard comme un pathogène intervenant secondairement dans la mortalité d'huitre au Pays-Bas suite à une augmentation prolongée de la température et à un faible niveau d'oxygène dans le Lac de Grevelingen (Engelsma *et al.*, 2008). *N. crassostreae* aurait profité de conditions favorables à l'infection puisque les huîtres étaient déjà affaiblies par les conditions météorologiques. Suite à ces observations, nous pouvons penser que cette espèce est probablement ubiquiste du milieu marin.

Trois espèces de *Nocardia* ont été identifiées en tant que pathogènes de poissons :

- *N. seriolae*, qui a notamment causé la mortalité de trois poissons *Terapon jarbua* en Thaïlande. Des nodules contenant la bactérie en cause ont été retrouvé au niveau des branchies, du cœur, de la rate, de la vessie natatoire, des reins et du foie (Wang *et al.*, 2009), (figure 4).

- *N. salmonicida*, identifiée en 1949 par Rucker, a été responsable de la mort dans un élevage d'*Oncorhynchuis nerka* suite à l'isolement de la souche JCM 4826^T des reins et du foie de ces poissons (figure 5). Initialement, Rucker l'a affilié au genre *Streptomyces*, et ce n'est qu'en 1999 que la souche JCM 4826^T sera renommée *Nocardia salmonicida* suite à l'analyse de ces propriétés biochimiques (Rucker, 1949 ; Isik *et al.*, 1999). En 2003, *N. salmonicida* a été identifiée dans des sols au Japon (Yamamura *et al.*, 2003). Cette espèce ne semble donc pas être spécifique du milieu marin.

- Enfin, les espèces du complexe *N. asteroides* sont aussi des pathogènes de mammifères marins. Récemment, une étude a porté sur l'importance des nocardioses chez les phoques et les cétacés. Il semblerait que la nocardiose systémique soit la plus courante chez ces animaux. Les organes les plus souvent touchés sont les poumons et les ganglions lymphatiques, mais des abcès cérébraux ont aussi été rapportés sur 4 des 19 cas étudiés. Les espèces en causes sont *N. farcinica*, *N. asteroides sensu stricto*,

N. cyriacigeorgica, *N. otitidiscaviarum*, *N. brasiliensis* et *N. levis* (St Leger *et al.*, 2009), (figure 6).

III.3 Infection à *Nocardia* chez l'homme

La nocardiose est une infection granulomateuse et suppurative, localisée ou disséminée chez l'homme. Les manifestations cliniques varient de l'infection cutanée causée par une infection traumatique du microorganisme chez un hôte sain, à une affection généralisée chez un hôte immunodéprimé. Le diagnostic d'une nocardiose s'est longtemps fait par l'isolement et l'identification du microorganisme à partir des lésions du patient. Ce genre bactérien est très peu rencontré comme contaminant de laboratoire ou comme faisant partie de la flore naturelle de l'homme.

Lors de l'identification d'une colonie de *Nocardia*, si la contamination du prélèvement clinique peut être supposée sur une expectoration, car l'appareil respiratoire est directement en contact avec l'environnement extérieur, c'est moins le cas sur un prélèvement de fluide ou de tissu stérile de l'organisme tel que le liquide céphalorachidien (LCR). Le diagnostic de nocardiose se confirme si le même agent bactérien est isolé à partir de différents prélèvements chez le même individu. Bien que la mise en culture des prélèvements du patient et les techniques biochimiques classiques d'identification soient toujours pratiquées, l'identification d'une *Nocardia* se fait aujourd'hui par biologie moléculaire dans la plupart des laboratoires hospitaliers. En 1999, des amorces spécifiques du genre *Nocardia* ont été mises au point à partir de la séquence du gène de l'ARN 16S (Laurent *et al.*, 1999). Cette PCR peut être pratiquée sur de l'ADN extrait directement à partir du prélèvement clinique sans passer par la culture. Le diagnostic d'une nocardiose peut donc se faire rapidement d'autant que certaines espèces de *Nocardia* à croissance lente peuvent mettre plusieurs semaines à se développer sur milieu de culture. La confirmation de la présence de *Nocardia* dans le prélèvement se fait généralement par le séquençage du produit PCR. Ces dernières années, l'utilisation de la biologie moléculaire a permis d'affiner le diagnostic des nocardioses. En effet, dans plus de 90 % des cas, la présence d'une *Nocardia* est confirmée par PCR/séquençage alors que l'agent bactérien n'a pu être isolé par des méthodes culturales. Une forte augmentation des cas de nocardiose a été mesurée, certainement en raison du fait que cette pathologie est mieux détectée actuellement. Mais une réelle augmentation de l'incidence de la maladie n'est pas à exclure (Rodriguez-Nava *et al.*, 2008).

III.4 Pathogénie

III.4.1 Facteurs de prédisposition

La nocardiose est une infection opportuniste qui touche particulièrement les patients soumis à une immunosuppression primaire ou secondaire (Laurent *et al.*, 2003). Elle peut toucher toutes les tranches d'âge mais on note une fréquence plus importante pour l'adulte dans la seconde partie de sa vie puisque 75 % des patients ont plus de 50 ans. La nocardiose apparaît presqu'aussi souvent chez l'homme que chez la femme. Les facteurs ethniques ne semblent pas exercer d'influence (Rodriguez-Nava *et al.*, 2008). Il faut noter qu'aucun facteur de prédisposition apparent n'est déclaré chez près du tiers des patients atteints de nocardiose (Laurent *et al.*, 2003).

La corticothérapie au long cours apparaît comme le principal facteur de prédisposition, en France, elle est retrouvée chez près du tiers des patients. Par ordre de fréquence de patients ayant développé un nocardiose, on retrouve les patients transplantés (12,2 %) ou atteints d'hémopathies (10,4 %). Viennent ensuite les sujets atteints de néoplasies, notamment celles affectant l'arbre trachéobronchique (cancers oto-rhino-laryngologiques et pulmonaires), qui touchent un peu plus de 7 % de patients et ceux souffrant de dilatations des bronches (5,3 %).

Les patients atteints du Syndrome d'Immunodéficience Acquise (SIDA) présentent une immunosuppression sévère. Bien que ces malades semblent être des sujets à risques pour la nocardiose, des études récentes ont montré que les *Nocardia* étaient rarement retrouvées chez ces individus. Le traitement de ces patients, en prophylaxie primaire de la toxoplasmose, par l'utilisation de TMP-SMX pourrait expliquer cette faible incidence. Néanmoins, la difficulté de diagnostic de la nocardiose pourrait être responsable d'une sous-estimation de la fréquence des nocardioses chez les patients atteints du SIDA, comme dans l'ensemble de la population.

III.4.2 Virulence et production de toxine

Certains facteurs de virulence des *Nocardia* sont connus à l'heure actuelle mais beaucoup de données manquent encore afin de comprendre les mécanismes conduisant à l'installation de la maladie. Blaine Beaman (Davis, USA) a beaucoup étudié les mécanismes de virulence des souches de *Nocardia* par différentes approches et a publié plus de 100 articles sur ces travaux.

Les souches virulentes de *Nocardia* sont des pathogènes intracellulaires facultatifs qui peuvent coloniser une grande variété de cellules humaines et animales. Cette pathogénie repose sur des mécanismes complexes, multiples qui ne sont pas encore complètement élucidés. La virulence de *Nocardia* semble être associée à la phase de croissance de la

bactérie ; en effet, des cellules en phase exponentielle de croissance sont plus virulentes dans les macrophages que des cellules en phase stationnaire (Beaman and Maslan, 1978). Comme d'autres pathogènes intracellulaires, ces souches sont aussi capables de bloquer la fusion phagosome–lysosome, de neutraliser l'acidification des macrophages, de résister aux mécanismes de stress oxydatifs de la phagocytose, d'altérer les enzymes lysosomales dans le macrophage et, pour certaines d'entre-elles, d'envahir et de croître dans le cerveau d'animaux de laboratoire. Les systèmes mis en place par les *Nocardia* et qui semblent être impliqués dans ces processus sont la sécrétion de la SOD et une forte production de catalase aidant à la résistance au stress oxydatif. La complexité des glycolipides de la membrane externe (présence de α,α-tréhalose-6,6'-dimycolate, le TDM) lui permettrait de résister au processus de lyse dans la tissu hôte. La production d'hémolysines favoriserait son déplacement au sein des tissus (Beaman and Beaman, 1994).

D'autres études ont montré que quelques souches de *N. otitidiscaviarum* produisent la toxine HS-6. Cette toxine d'un poids moléculaire de 776 Da, est capable de provoquer des lésions du pancréas, du foie, de l'estomac, de l'intestin, du cœur, du thymus et des reins après injection de la toxine purifiée à une souris. Des granulomes se forment sur le pancréas, le foie et les ganglions lymphatiques suite à l'injection intra-péritonéale de cette toxine. *In vivo*, le rôle de cette toxine dans la virulence de la souche de *Nocardia* serait faible car l'injection d'une souche productrice de toxine HS-6 ne reproduit pas les lésions obtenues par l'injection seule de toxine (Terao *et al.*, 1992).

L'ensemble de ces travaux a montré qu'il existait une variabilité de la virulence des souches au sein d'une même espèce. D'autres mécanismes de pathogénie importants, tels que la production de formes L, permettraient aux *Nocardia* de persister chez l'hôte sous forme cryptique. La forme L est définie par une absence ou une défaillance de la paroi cellulaire. Sous cette forme, les *Nocardia* perdent leur aspect filamenteux, elles ont l'apparence de sphéroplastes et peuvent se multiplier indéfiniment. Leur défaut de paroi cellulaire en fait des cellules moins immuno-réactives qui peuvent dès lors subsister dans l'hôte sans être éliminées par le système immunitaire inné (Bourgeois and Beaman, 1974, , 1976). La persistance de *Nocardia* sous cette forme pourrait lui permettre de resurgir plusieurs mois/années après la primo-infection. Elle pourrait également être responsable des formes chroniques de nocardiose (Beaman and Beaman, 1994).

III.5 Clinique

En clinique, différente formes de nocardioses sont clairement documentées :

- la nocardiose pulmonaire ;
- la nocardiose du système nerveux central ;
- la nocardiose cutanée, sous-cutanée et lymphocutanée ;
- la nocardiose extrapulmonaire (autre que système nerveux et tissu cutané) ;
- la nocardiose disséminée (impliquant deux ou plusieurs sites infectieux).

III.5.1 Nocardiose pulmonaire

Une infection du poumon peut survenir suite à l'inhalation ou l'aspiration de spores ou de fragment de filaments de *Nocardia* aérosolisés ou associés à des poussières. La description de nocardiose pulmonaire suite à l'ingestion d'aliment contaminé a aussi été décrite (Beaman and Beaman, 1994). L'infection pulmonaire peut également être asymptomatique et la nocardiose est révélée lors d'une radiographie pulmonaire ou par l'apparition d'un ou plusieurs foyers infectieux métastatiques. Occasionnellement, la maladie peut se manifester comme une infection aiguë fulminante.

La localisation pulmonaire de la nocardiose est souvent identifiée comme site primaire de l'infection à partir duquel l'agent bactérien va pouvoir se disséminer par voie lymphatique ou sanguine à d'autres tissus. Le système nerveux central est le plus souvent touché dans le cas de métastases. La peau et le tissu sous-cutané sont moins fréquemment atteints. Dans le cas de nocardiose pulmonaire chez le patient immunodéprimé il est fortement conseillé au clinicien de chercher des foyers métastatiques dans les autres organes du patient.

La présentation clinique la plus fréquente de la nocardiose est une pneumopathie subaiguë ou chronique, suppurative et souvent nécrosante. Un ou plusieurs lobes pulmonaires peuvent être touchés. Dans le cas où le granulome n'est pas nécrosé, il montre une réponse cellulaire mélangée avec granulocytes, macrophages et des lymphocytes. Cette pneumonie s'accompagne de symptômes divers : fièvre, sueurs nocturnes, anorexie, perte de poids, asthénie, anémie, toux productive, rarement hémoptysique. Certains signes évoquent un syndrome bronchique, avec dyspnée, douleur thoracique d'origine pleurale, voire de détresse respiratoire.

Les complications locales des infections pulmonaires sont très répandues et peuvent inclure une atteinte pleurale, une péricardite, une médiastinite, l'obstruction de la veine cave

supérieure et plus rarement la formation d'abcès dans la cage thoracique ou la nuque (McNeil and Brown, 1994).

Diagnostic différentiel :

La nocardiose pulmonaire, bien qu'elle soit la forme la plus fréquente, reste souvent difficile à diagnostiquer. En effet, la symptomatologie de la nocardiose est polymorphe et aspécifique, aucun signe ne permet de la différencier d'une pneumopathie causée par d'autre bactéries comme les mycobactéries, un virus ou un champignon, ou encore une pathologie ayant une origine toxique, particulaire ou médicamenteuse ; une réponse granulomateuse proche de celle de la tuberculose a également été décrite (Beaman and Beaman, 1994). Les signes radiologiques sont, eux aussi, polymorphes et peu spécifiques. Des condensations diffuses ou denses, avec ou sans cavités, des infiltrats localisés, sont des images qui peuvent traduire une nocardiose. L'imagerie médicale, par examen tomodensitométrique ou résonance magnétique nucléaire, peut également se révéler utile pour déterminer l'extension des lésions.

N. asteroides, *N. farcinica*, *N. nova*, *N. cyriacigeorgica*, *N. abscessus*, *N. transvalensis* et *N. otitidiscaviarum* sont les principales espèces responsables de la nocardiose pulmonaire, elles sont également les espèces les plus fréquemment retrouvées en clinique. Ces quatre dernières années, d'autres espèces ont été rencontrées dans des cas de nocardioses pulmonaires : *N. blacklockiae* (Conville *et al.*, 2008), *N. mikamii* (Jannat-Khah *et al.*, 2010), *N. niwae* (Moser *et al.*, 2010) et *N. wallacei* (Conville *et al.*, 2008) (tableau I).

III.5.2 Nocardiose cérébrale

Le système nerveux central est le deuxième site le plus touché, représentant 10 à 15 % des cas de nocardiose, et cette forme cérébrale serait responsable de 1 à 2 % des cas d'abcès cérébraux. Les infections du système nerveux central semblent se développer plus rapidement chez les patients immunodéprimés que chez les individus sans facteurs de prédispositions (Beaman and Beaman, 1994). L'atteinte du système nerveux central est généralement secondaire à un foyer pulmonaire ; cependant, elle peut s'observer de façon isolée sans détection d'autre sites d'infection dans 7 % des cas (Oshiro *et al.*, 2003).

La nocardiose cérébrale se traduit généralement par la présence d'un ou plusieurs abcès positionnés au niveau cervical et pouvant former des extensions satellites. L'atteinte des méninges résulte le plus souvent d'une rupture d'un abcès cérébral dans le système ventriculaire. D'après Oshiro *et al.*, cette rupture est fatale dans 80 % des cas. Néanmoins, quelques cas de méningites pures ont été décrits (Philit *et al.*, 1994 ; Coutant-Perronne *et al.*, 1995).

La symptomatologie clinique varie en fonction de la région du cerveau atteinte. Elle peut évoluer rapidement en raison du caractère expansif de cette infection. Les abcès et méningites avec dilatation des ventricules entraînent un syndrome de masse avec une hypertension intracrânienne, entraînant nausées, vomissements avec photophobie, céphalées, raideurs de la nuque ainsi que des troubles sensitifs, moteurs et du comportement. Un cas de tétraplégie lors d'une atteinte de la moelle épinière cervicale a même été décrit (Durmaz *et al.*, 2001). Des cas de patients atteints de nocardiose cérébrale sans symptômes d'infection bactérienne ont été décrits avec des périodes de latence pouvant aller jusqu'à trois ans. Une publication présente le cas d'un patient immunocompétent de 68 ans avec un abcès cérébral mais aucun signe d'infection. Dans un premier temps, le diagnostic de tumeur cérébrale a été posé. Dans un second temps, l'analyse de la lésion a révélé la présence de *Nocardia* sp. (Bauman *et al.*, 1986). Un cas similaire a été décrit par Beaman (Beaman and Beaman, 1994).

Au niveau biologique, la nocardiose cérébrale n'entraîne pas de modification de la composition du LCR (Laurent *et al.*, 2003). Toutefois, dans les rares cas d'atteinte méningée, l'examen du LCR peut révéler une augmentation des polynucléaires neutrophiles (dans plus de 80 % des cas, supérieure à 500 éléments par millimètre cube), une hypoglycorachie (inférieure à 0,4 g/L, dans plus de 60 % des cas) et une hyperprotéinorachie (supérieure à 1 g/L, dans 60 % des cas) (Bross and Gordon, 1991).

En cas d'abcès cérébral sans méningite, ces signes sont généralement absents ou peu marqués. C'est alors l'examen tomodensitométrique cérébral ou l'imagerie par résonance magnétique (IRM) qui permet de poser le diagnostic de processus expansif intracérébral, d'en préciser la localisation, les dimensions et le nombre. Il permet aussi de suivre l'efficacité du traitement antibiotique. Les images obtenues peuvent être confondues avec des abcès d'origine différentes, comme la toxoplasmose, les tumeurs (Kawakami *et al.*, 2008), ou encore la mycobactériose atypique. Elles peuvent aussi être compatibles avec d'autres lésions comme un gliome ou un accident vasculaire cérébral. Ces similarités peuvent retarder le diagnostic de nocardiose et par conséquent la mise en place de mesures adéquates pour traiter le patient (Chakrabarti *et al.*, 2008). Le diagnostic différentiel se fait alors grâce à la ponction par biopsie stéréotaxique d'un abcès afin d'isoler le germe.

N. asteroides et *N. farcinica* sont les espèces les plus redoutables dans le cas d'abcès cérébraux avec plus de 90 % de mortalité (Fellows *et al.*, 2007). Cependant, ce sont *N. nova* et *N. brasiliensis* qui sont les espèces les plus souvent retrouvées dans cet organe (Naguib and Fine, 1995 ; Gezici *et al.*, 2008). D'autres espèces, comme *N. abscessus*, *N. asiatica,*



Figure 7 : Mycétome à *Nocardia* sur le dos d'une femme sans antécédents médicaux. Le La maladie s'est déclenchée suite aux traumatismes répétés causés par la charge de fagots de bois sur ses épaules et son dos. *N. brasiliensis* et *N. asteroides* ont été isolés à partir d'échantillons de biopsie de ces lésions. D'après Beaman *et al*., 1994.



Figure 8 : Nocardiose sporotrichoïde lymphocutanée causée par une implantation traumatique de *N. brasiliensis* dans le majeur. D'après Saubolle and Sussland 2003.

N. paucivaurans et *N. cyriacigeorgica*, sont capables de provoquer plus rarement ce type d'infection.

III.5.3 Nocardiose cutanée, sous-cutanée et lymphocutanée

Les mycétomes cutanés peuvent résulter d'une infection par un champignon (eumycétome) ou par une Actinobactérie (actinomycétome). Ils surviennent généralement après une inoculation traumatique des microorganismes à travers la peau par l'intermédiaire d'une épine, d'un éclat de bois, d'une blessure, d'une piqûre d'insecte, d'une morsure de chien ou d'une griffure de chat, l'ensemble de ces éléments jouant le rôle de vecteurs mécaniques des *Nocardia*. Ce type d'infection est commun chez l'homme. Lorsque le microorganisme a franchi la barrière cutanée, sa croissance reste localisée et l'infection se limite à la formation d'un abcès. Celle-ci peut, toutefois, progresser suffisamment pour induire une réaction inflammatoire entraînant une accumulation de leucocytes polynucléaires, à l'origine d'une cellulite ou d'une pyodermite (figure 7). L'incidence des nocardioses cutanées, sous-cutanées et lymphocutanées est certainement sous-estimée, les lésions ressemblant à l'infection pyogène à *Staphylococcus aureus*. L'agent étiologique de ce type de lésion n'est, la plupart du temps, pas déterminé sauf en cas de non-réponse au traitement ou en cas d'évolution de la lésion. En Espagne, une incidence de 12 % de la nocardiose cutanée a été noté parmi les infections à *Nocardia* survenues durant une période de 24 ans (Pintado *et al.*, 2002). Palmer *et al*., en 1974, rapportent une incidence de 5 % de nocardioses cutanées dans la littérature anglaise entre 1961 et 1971 (Palmer *et al.*, 1974). Des études plus récentes décrivent une incidence entre 22 et 25 % (Corti and Villafane-Fioti, 2003 ; Mootsikapun *et al.*, 2005) et ceci probablement grâce à une meilleure identification des agents pathogènes en cause. Muños-Hernandez *et al.*, en 2009, décrivent que 97,8 % des mycétomes sont des actinomycétomes et que 86,6 % d'entre eux sont causés par *N. brasiliensis* (Munoz-Hernandez *et al.*, 2009). D'autres cas de mycétomes ont également été décrits impliquant les espèces *N. asteroides* (Lum and Vadmal, 2003), *N. otitidiscaviarum* (Freland *et al.*, 1995) et *N. transvalensis* (Mirza and Campbell, 1994).

La nocardiose cutanée se subdivise en quatre pathologies différentes : l'abcès et cellulite, la lymphangite, le mycétome, et les atteintes cutanées secondaires avec dissémination. Les trois premières formes, correspondant à une infection primaire, affectent généralement les individus apparemment immunocompétents et surviennent le plus souvent suite à un traumatisme. Les lésions sont aiguës ou subaiguës et siègent en général au niveau des parties découvertes comme les mains, les bras, les jambes et les pieds. Il n'y a pas de

dissémination systémique de l'infection et une guérison spontanée des lésions est possible, laissant malgré tout des séquelles cicatricielles importantes (Bourée and Boiron, 1991).

La dissémination à partir du foyer cutané primaire peut avoir lieu par voie lymphatique, entraînant une nocardiose lymphocutanée. Cette forme clinique est aussi appelée forme sporotrichoïde de la nocardiose cutanée, en raison de la ressemblance avec la sporotrichose, infection sous-cutanée due au champignon filamenteux *Sporothrix schenckii*. Cette forme se caractérise par l'apparition d'un nodule ulcéreux bourgeonnant et par le développement d'un cordon lymphangitique remontant jusqu'à la racine du membre avec de nouveaux nodules inflammatoires sur le trajet (Kostman and DiNubile, 1993). Parfois, une adénopathie régionale peut survenir. L'évolution se limite à la zone loco-régionale pour le patient immunocompétent En revanche, elle peut être disséminée chez un patient au système immunitaire altéré. Si *N. brasiliensis* est l'agent étiologique le plus souvent retrouvé, des cas ont aussi été décrits avec *N. asteroides*, *N. otitidiscaviarum* ou *N. nova* (Inamadar *et al.*, 2004).

Le mycétome actinomycosique constitue un cas particulier d'infection sous-cutanée, caractérisé par la présence de grains et s'observe principalement en zone tropicale ou subtropicale. Cette infection progresse lentement et n'est généralement pas douloureuse, du moins au cours des premiers stades de la maladie. Localisé aux extrémités, le plus souvent aux membres inférieurs, mais aussi aux bras ou aux mains, le mycétome peut se développer sur d'autres parties du corps (dos, épaules et tête), (figure 8). Le mycétome débute souvent par un nodule sous-cutané indolore se développant à partir de la lésion primaire. Ce nodule augmente lentement en taille et peut devenir purulent et nécrotique. Ensuite, l'inflammation devient granulomateuse et chronique avec la formation de nouveaux nodules et de nouvelles fistules. L'exsudat des fistules contient des grains caractéristiques en taille, forme et couleur de ce type d'infection. Généralement, le mycétome reste localisé mais peut s'étendre à travers les tissus en impliquant les muscles et les os.

La nocardiose cutanée secondaire est observée principalement chez les sujets immunodéprimés ; elle provoque soit des abcès sous-cutanés uniques ou multiples qui peuvent se fistuliser à la peau, soit des cellulites. Elle résulte, dans 10 à 15 % des cas, de la dissémination des *Nocardia* par voie hématogène à partir d'un foyer, le plus souvent pulmonaire.

III.5.4 Nocardiose extrapulmonaire (autre que système nerveux et tissu cutané).

À côté des atteintes cérébrales et cutanées, presque tous les organes peuvent être atteints, souvent de façon secondaire : la plèvre et la paroi thoracique (8 % des cas), l'œil (3 %), le foie (3 %), les ganglions lymphatiques (3 %) et d'autres localisations (10 %) : le pancréas, le cœur, l'aorte, les os, les articulations, les reins, les surrénales, la rate, l'intestin, le péritoine, la thyroïde, le conduit auditif, l'amygdale, le pharynx, la cavité buccale, la trachée, etc., donnant lieu à une traduction clinique particulière (Rodriguez-Nava *et al.*, 2008).

III.5.5 Nocardiose disséminée (impliquant deux ou plusieurs sites infectieux).

Le développement de *Nocardia* dans un organe abouti fréquemment à la dissémination de l'agent pathogène dans l'organisme par voie sanguine. On parle alors de nocardiose disséminée, puisqu'elle touche deux organes ou plus. La nocardiose disséminée est le plus fréquemment d'origine endogène (c'est-à-dire secondaire à une infection pulmonaire primaire par diffusion hématogène). Comme pour la nocardiose pulmonaire, les patients immunodéprimés ont plus de risques de développer des infections disséminées. Dans le cas d'infections pulmonaires à *Nocardia*, la fréquence de dissémination a été reportée entre 28 et 50 % des cas. Il semblerait que l'ensemble des espèces de *Nocardia* capables d'infecter le poumon et la peau puissent se disséminer dans l'organisme. Cette forme disséminée polyviscérale a un pronostic sombre, avec un taux de mortalité allant de 7 à 44 %, qui peut atteindre 85 % chez les patients sévèrement immunodéprimés (Beaman *et al.*, 1976).

III.5.6 Transmission nosocomiale

Plusieurs épidémies impliquant les espèces du genre *Nocardia* ont été décrites dans la littérature (Stevens *et al.*, 1981 ; Sahathevan *et al.*, 1991). Les services hospitaliers accueillant les patients ayant subi une transplantation cardiaque ou rénale ont été les plus touchés par ce type de transmission (Exmelin *et al.*, 1996). Certaines infections à *Nocardia* se sont déclenchées de façon post-opératoire suite à des actes de chirurgie cardio-vasculaire tels que les valvuloplasties (Falk *et al.*, 1979) ou artériectomies. Récemment, Mrozek *et al*., en 2008, ont publié le cas d'un patient immunocompétent ayant présenté un abcès du psoas et des abcès cérébraux à *N. asteroides* suite à la pose d'une prothèse totale de la hanche. Ces cas de transmission nosocomiale ont été plus souvent observées dans des hôpitaux ayant réalisé ou réalisant des travaux de réfection. La transmission par les poussières en suspension a été alors fortement suspectée (Stevens *et al.*, 1981 ; Sahathevan *et al.*, 1991).

Un seul cas de transmission interhumaine a été décrit dans la littérature (Houang *et al.*, 1980). *N. asteroides* est mise en cause dans six cas d'infections pulmonaires chez des patients

ayant une transplantation rénale dans une unité rénale de soins intensifs sur une période de six mois. La transmission de l'agent pathogène par voie aérienne a été fortement soupçonnée.

III.6 Traitement

La réalisation d'un antibiogramme permet de déterminer la sensibilité aux antibiotiques des *Nocardia*. L'obtention de résultats est parfois difficile car ces bactéries ont une croissance lente et variable selon les souches ; de plus, il est difficile d'obtenir une suspension homogène permettant une bonne standardisation de l'inoculum. Les profils de résistance aux antibiotiques constituent une aide précieuse dans le choix du traitement, mais également dans l'identification des différentes espèces, certaines espèces ayant des profils de résistance caractéristiques (Wallace *et al.*, 1988), (section 2).

Le traitement des nocardioses se fait principalement par l'antibiothérapie. Il peut être complété, si nécessaire, par une exérèse chirurgicale ou un drainage dans le cas d'un abcès. Grâce aux tests *in vitro*, le clinicien peut orienter son choix de traitement. Bien qu'il existe une grande disparité au niveau de la sensibilité des *Nocardia* aux antibiotiques, certaines tendances générales peuvent être dégagées pour les espèces classiquement identifiées.

Grâce à la bonne corrélation des résultats obtenus entre les laboratoires avec les différentes techniques de détermination de sensibilité aux antibiotiques, la reproductibilité est supérieure à 90 %. Cela permet la mise en place d'un traitement adapté et efficace rapidement (Brown and McNeil, 2003).

Les sulfamides apparaissent comme le traitement de première intention pour la nocardiose. Le sulfadiazine, le sulfisoxazole et le SMX font partie de cette classe d'antibiotiques. L'association TMP –SMX ou cotrimoxazole est généralement utilisée. Bien que leur efficacité *in vitro* soit encore discutée, les sulfamides sont encore largement considérés comme traitement de référence des nocardioses (Brown-Elliott *et al.*, 2006 ; Rodriguez-Nava *et al.*, 2008).

La majorité des espèces de *Nocardia* est modérément à fortement résistantes aux β-lactamines. L'acide clavulanique utilisé en association avec l'amoxicilline peut avoir un effet sur les espèces de *N. farcinica*, de *N. asteroides* et de *N. brasiliensis*. L'imipenème reste la β-lactamine la plus efficace contre les espèces *N. asteroides*, *N. farcinica* et *N. nova* bien que 10 à 20 % des souches deviennent résistantes actuellement. Toutefois, cette molécule est inactive vis-à-vis de *N. brasiliensis* et *N. otitidiscaviarum* (Yazawa *et al.*, 1989). Ces deux espèces présentent, en revanche, une sensibilité particulière aux tétracyclines telles que la minocycline et la doxycycline.

L'amikacine et la nétilmicine sont les seuls aminosides actifs contre toutes les espèces. L'amikacine est utilisée lorsqu'une bithérapie est envisagée (Kanemitsu *et al.*, 2003), par la synergie d'action observée *in vitro* avec l'imipenème, les céphalosporines de troisième génération et le TMP-SMX.

La ciprofloxacine est la seule quinolone active contre *N. asteroides*. Elle présente une CMI voisine des taux sériques obtenus *in vivo*.

Le linézolide, qui appartient à la classe des oxazolidinones, est le premier antibiotique actif contre toutes les principales espèces de *Nocardia* d'intérêt clinique, notamment contre *N. brasiliensis*.(Brown-Elliott *et al.*, 2001 ; Vera-Cabrera *et al.*, 2001). Il est utilisé seul ou en association. Cette molécule est particulièrement efficace dans le traitement des atteintes du système nerveux central et les atteintes disséminées (Moylett *et al.*, 2003) mais peut présenter des effets secondaires, tels qu'une insuffisance médullaire, justifiant l'arrêt du traitement (Lewis *et al.*, 2003 ; Jodlowski *et al.*, 2007).

L'association TMP-SMX ne devrait plus être considérée systématiquement comme le traitement de première intention de la nocardiose, notamment en raison d'une efficacité *in vitro* et *in vivo* discutée. La première intention recommandée est l'association imipenème plus amikacine ou céfotaxime plus amikacine par voie intraveineuse dans le traitement initial de l'infection (Rodriguez-Nava *et al.*, 2008). Le TMP-SMX, est souvent administré ensuite en relais *per os* pendant plusieurs mois (Yoneyama *et al.*, 2004). Bien qu'une amélioration clinique soit classiquement observée après une dizaine de jours de traitement, tous les auteurs s'accordent sur la nécessité d'une antibiothérapie prolongée sans qu'à ce jour la durée optimale de traitement ne soit clairement établie. Elle sera adaptée à la sévérité de l'infection, au statut immunitaire du patient, à la virulence de la bactérie et aux risques de rechutes. Classiquement, les formes cutanées primaires nécessitent un traitement d'au moins trois mois ; les formes pulmonaires imposent un traitement de six mois ; les formes disséminées et les patients présentant une immunodépression exigent des traitements d'au moins 12 mois, pouvant être prolongés à vie. Des traitements trop courts exposent les patients à des récidives pouvant atteindre entre 10 et 30 % des patients (Boiron, 2006).

IV. *Nocardia cyriacigeorgica*, une espèce à propriétés particulières ?

En 2001, Yassin *et al*. ont décrit la nouvelle espèce *N. cyriacigeorgica*. La souche IMMIB D-1627^T est décrite suite à son isolement à partir de sécrétion bronchique chez un patient atteint de bronchite chronique (Yassin *et al.*, 2001a). Elle est caractérisée par des hyphes végétatives bien développées et irrégulières qui pénètrent dans la gélose, et des hyphes

aériennes de couleur blanche. Des hydrolysats de cellules entières montrent la présence d'acide *méso*-diaminopimélique, de galactose et d'arabinose reflétant une paroi cellulaire de chemotype IV. Cette paroi est également composée d'acides mycoliques de 46 à 53 atomes de carbones. Les principales différences de la souche IMMIB D-1627^T avec *N. asteroides* ATCC 19247 résultent dans son l'incapacité de la première à utiliser le glucose comme seule source de carbone, et sa capacité à utiliser l'acétamide plutôt que la proline comme source de carbone et d'azote.

Après que plusieurs auteurs aient émis l'hypothèse que *N. asteroides* type VI et *N. cyriacigeorgica* formaient une seule et même espèce, Conville *et al*., en 2007, ont confirmé cette hypothèse par la réalisation d'une DDH entre les souche type de *N. cyriacigeorgica* et de *N. asteroides* type VI (Conville and Witebsky, 2007). Plus récemment, deux équipes de recherche décrivent *N. cyriacigeorgica* comme un pathogène agent émergent aux USA (Schlaberg *et al.*, 2008 ; Portola *et al.*, 2009). Beaucoup de souches ont été décrites comme appartenant à l'espèce *N. asteroides* type VI, ces souches représentant la plus grande partie des isolats cliniques de l'étude de Wallace *et al*. en 1988. Par conséquent, *N. cyriacigeorgica* n'est pas un agent pathogène humain émergent mais installé (Witebsky *et al.*, 2008). Cependant, *N. cyriacigeorgica* semble provoquer un nombre d'infections croissant ces dernières années probablement en raison de l'augmentation du nombre de patients présentant un déficit immunitaire sévère et chronique.

Dans l'environnement, cette espèce n'a été isolée que dans des sols contaminés par des hydrocarbures au Koweït (Khan *et al.*, 1997), sur la côte ouest de la Sicile (Quatrini *et al.*, 2008) et dans le désert de l'Arabie Saoudite (Le *et al.*, 2010). Ce type d'habitat semble faciliter la prolifération de cette espèce. Il a été notamment admis que la capacité de dégrader les hydrocarbones serait une particularité de souches appartenant à cette espèce. Cependant, au vue de la proportion importante de cette espèce dans les isolats cliniques, des environnements plus ubiquistes doivent également contribuer à la présence de cette souche dans la nature.

En clinique, *N. cyriacigeorgica* est retrouvée dans tous les types d'infections décrites dans la section 4.4 puisque qu'elle regroupe les souches de *N. asteroides* présentant un profil de type VI. En France, cette espèce représente 12 % des infections a *Nocardia* entre les années 2000 et 2007 (Rodriguez-Nava *et al.*, 2008).

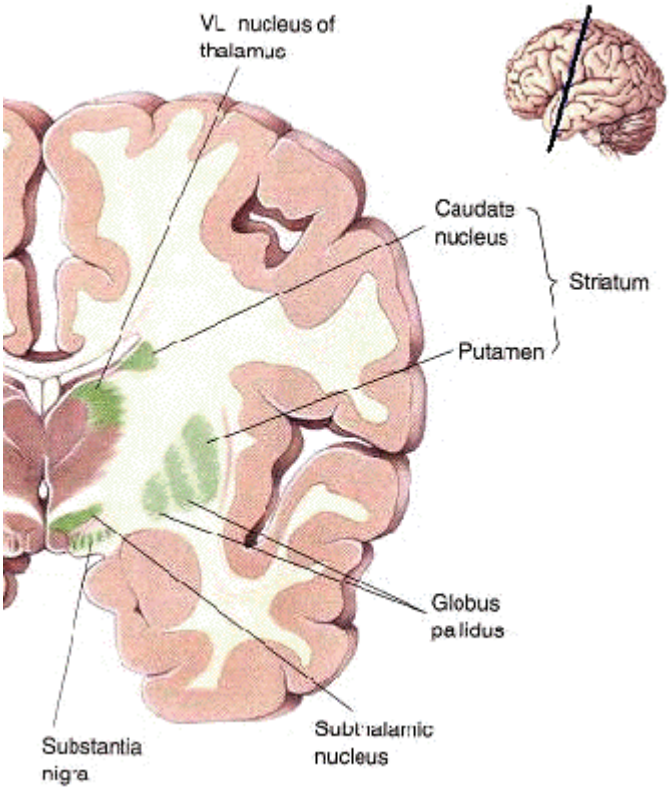


Figure 9 : Schéma des ganglions de la base. D'après Bear, M. F., Connors, B.W. & Paradiso M. A., *Neuroscience: Exploring the Brain*, Second Edition, Lippincott Williams & Wilkins, 2001, pp 473-482.

IV.1 Exemple de *N. cyriacigeorgica* GUH-2

Beaman décrit en 1972 une souche isolée à partir du rein d'un patient atteint d'une infection systémique : *Nocardia cyriacigeorgica* GUH-2. Nombres de ses travaux décrivent cette souche comme ayant un pouvoir pathogène plus élevé que d'autres isolats cliniques de *Nocardia*. En plus des capacités particulières de cette souche à pouvoir survivre dans les macrophages, Beaman a montré que cette souche, lorsqu'elle était injectée en phase exponentielle de croissance chez la souris, était capable d'envahir le système nerveux central et de provoquer différents troubles neurologiques chez ces animaux : l'hémiparésie, ainsi que des symptômes très similaires à ceux observés dans la maladie de Parkinson (Kohbata and Beaman, 1991).

IV.1.1 La maladie de Parkinson

La maladie de Parkinson est une maladie neurodégénérative qui, après la maladie d'Alzheimer, est la maladie neurodégénérative la plus fréquente chez les personnes âgées. Cette pathologie affecte 1 à 2 % de la population française, soit environ 150 000 individus avec 10 000 nouveaux cas chaque année. L'âge du début de la maladie se situe généralement entre 55 et 65 ans, mais elle peut être plus précoce (avant 40 ans). Du fait du vieillissement croissant de la population dans les pays occidentaux, le nombre de cas ne va cesser d'augmenter au cours des prochaines décennies (Driver *et al.*, 2009)

IV.1.1.1 Physiopathologie de la maladie de Parkinson

La maladie de Parkinson est caractérisée par une apoptose progressive des neurones dopaminergiques de la *substancia nigra*, également appelé locus niger. Cette structure cérébrale est située dans le mésencéphale et joue un rôle important dans l'addiction et le mouvement. Son nom vient du fait que cette zone apparait plus sombre que les structures environnantes en raison de la teneur plus élevée en mélanine dans les neurones dopaminergiques. Elle appartient aux ganglions de la base et est située dans la partie profonde du cerveau, au niveau du tronc cérébral (figure 9). La *substancia nigra* est divisée en deux partie : la *pars compacta* composée principalement de neurones dopaminergiques, et la *pars reticulata* où une plus grande proportion de neurones GABAergiques est présente.

Au sein de la *pars compacta*, les neurones nigro-striés prennent naissance et se projettent de façon homolatérale dans le striatum où ils font synapse avec des neurones cholinergiques ou GABAergique. La libération de dopamine sur les récepteurs de type D1 (D1 et D5) va permettre l'activation de la voie directe. Cette voie conduit à l'inhibition du palladium interne puis du noyau ventro-latéral du thalamus via le GABA, ce qui entraîne par

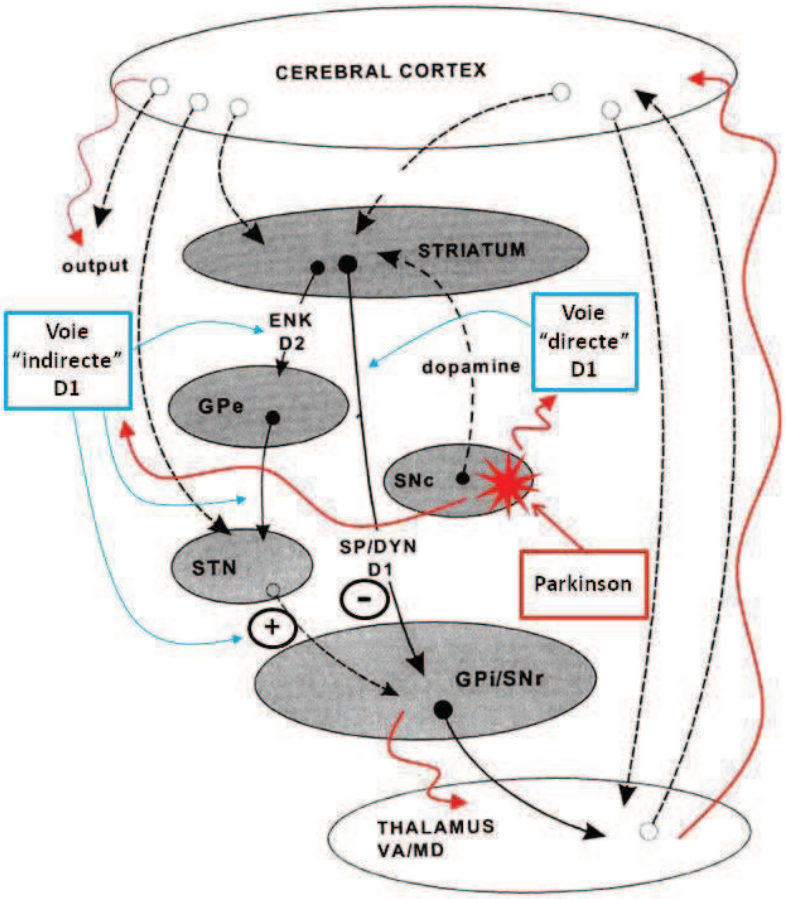


Figure 10 : Voies dopaminergiques des ganglions de la base. GPe = *globus pallidus* externe, GPi = *globus pallidus* interne, SNc = *substancia nigra pars compacta*, SNr = *substancia nigra pars reticulata*, STN = *nucleus subthalamicus*. D'après Groenewegen, 2003.

les neurones glutamatergiques une inhibition du cortex cérébral et du système pyramidal de la motricité volontaire. En parallèle, la libération de la dopamine dans le striatum agit sur les récepteurs de type D2 (D2, D3 et D4) et va avoir l'effet d'une boucle de rétrocontrôle, c'est l'activation de la voie indirecte. L'effet de la dopamine sur ces récepteurs va permettre via le palladium et le noyau sous-thalamique, une activation du palladium interne. Cela conduit à une moindre inhibition du noyau ventral du thalamus et donc à un meilleur contrôle du cortex et des mouvements. Le noyau sous thalamique contient également des interneurones cholinergiques. Ils sécrètent de l'acétylcholine de manière pulsée et sont responsables de la contraction musculaire. Il existe donc un équilibre très subtil entre la sécrétion d'acétylcholine et son inhibition par la dopamine. Cette organisation permet de contrôler le tonus musculaire et l'ordre de contraction volontaire (Groenewegen, 2003 ; Obeso *et al.*, 2010).

Dans l'état parkinsonien, le modèle décrit indique que la perte de neurones dopaminergique serait responsable d'une diminution de réactivité des neurones de la voie directe et d'une désinhibition des neurones de la voie indirecte. Ce déséquilibre provoquerait une hyperactivité des neurones de sortie du système à l'origine d'une sur-inhibition des réseaux pré-moteurs cibles des ganglions de la base. L'inhibition du contrôle des pulses d'acétylcholine étant levé, ce neurotransmetteur est libéré de manière anarchique par le noyau sous thalamique entraînant une stimulation excessive des récepteurs cholinergiques muscariniques à l'origine de tremblements, d'akinésie (lenteur d'initiation de mouvement), d'hypertonie rigide (résistance constante à une mobilisation passive du muscle) et d'instabilité de posture (Obeso *et al.*, 2010) (figure 10).

Chez le sujet âgé, un des mécanismes pouvant expliquer la perte de neurones dopaminergiques est la sénescence des cellules gliales. Ces dernières assureraient alors plus difficilement leur rôle protecteur des neurones (diminution de la production des facteurs trophiques), et cela pourrait conduire à l'apoptose des neurones dopaminergiques. Il a aussi été démontré, dans les cas sporadiques de la maladie de Parkinson, une insuffisance du système ubiquitine-protéasome (UPS) par la mise en évidence d'une diminution quantitative d'un de ses constituants : la sous-unité 20S (Wider *et al.*, 2006). Dans les conditions physiologiques saines, le protéasome élimine les protéines sénescentes, en excès ou mal formées et permet ainsi le maintien d'un équilibre homéostatique intracellulaire. Chez les patients atteints de maladie de Parkinson, les protéines en excès ont tendance à s'agréger afin de conserver le plus longtemps possible cet équilibre. Ce mécanisme induit la formation d'agrégats protéiques sous la forme d'inclusions cytoplasmiques appelées corps de Lewy dont le composant principal est l'α-synucléine. Initialement, la formation de ces agrégats maintient

l'équilibre homéostatique, mais une quantité importante de protéines non dégradées et en dehors des inclusions rompt cet état et provoque des dommages neuronaux dont l'apoptose des neurones dopaminergiques (Manning-Bog *et al.*, 2002).

IV.1.1.2 Symptomatologie de la maladie de Parkinson

Les symptômes parkinsoniens sont principalement moteurs. Ils apparaissent lorsque plus de 70 % des neurones dopaminergiques nigro-striés sont détruits (Obeso *et al.*, 2010). Les signes cliniques sont aujourd'hui bien connus et permettent de poser le diagnostic. Dans certains cas, la visualisation de l'atteinte du striatum peut être faite par une scintigraphie cérébrale.

Plusieurs symptômes cardinaux sont décrits. L'altération du tonus musculaire (la rigidité et la raideur) est la première à apparaître au cours de l'évolution de la pathologie. L'hypokinésie qui signifie une pauvreté des mouvements musculaire et une altération de la mobilité automatique. L'hypokinésie évolue vers la bradykinésie dans laquelle les mouvements sont de plus en plus rares, et peut atteindre l'akinésie où la mobilité n'est plus possible. La dyskinésie peut également survenir, elle est caractérisée par l'apparition de mouvements involontaires. Le tremblement est le symptôme le plus connu de la maladie de Parkinson. Il est fréquent en début de maladie de maladie et s'amenuise avec son évolution. Il apparaît principalement aux extrémités mais peut toucher les membres et différents muscles du visage.

La maladie présente également des symptômes marginaux qui peuvent toucher le système digestif et uro-génital avec pour conséquence une incontinence urinaire, une constipation sévère, un ralentissement de la vidange gastrique, des problèmes érectiles et une anorgasmie, ainsi que des troubles psychiatriques pouvant aller de l'altération de l'attention, de la concentration ou la mémorisation, à l'anxiété, la dépression et la démence.

IV.1.1.3 Etiologie de la maladie de Parkinson

Les causes de la maladie de Parkinson sont probablement multifactorielles (Obeso *et al*., 2010) : la pathologie se développerait chez une personne génétiquement prédisposée et soumise à des cofacteurs environnementaux. A l'heure actuelle, on considère qu'environ 85 % des cas de maladie de Parkinson sont idiopathiques, c'est-à-dire sans cause déterminée.

Des facteurs génétiques ont été identifiés comme responsables ou favorisant l'apparition de la maladie. Dix mutations génétiques différentes ont été découvertes. Les mieux connues sont celles concernant les gènes *Park1* et *Park2*. Le gène *Park1* code pour une protéine, l'α-synucléine, qui est un constituant majeur des corps de Lewy. Ce gène se transmet de façon

autosomique dominante. Le gène *Park2* code pour une autre protéine, la parkin, impliquée dans des formes à hérédité autosomique récessive avec tremblement précoce et dystonie des membres inférieurs. Ce gène est impliqué dans la dégradation des protéines neuronales, notamment l'α-synucléine. Des polymorphismes de gènes pouvant être impliqués dans le transport (gène *DAT*) ou le catabolisme de la dopamine (gène *maoB*), ou bien encore le métabolisme des toxiques (gènes *P450* et *nat2*, glutathion-S-transférases) semblent également prédisposer certaines personnes à l'apparition de la maladie (Menegon *et al.*, 1998 ; Lai *et al.*, 2002 ; Ghione *et al.*, 2007 ; Frank-Cannon *et al.*, 2008). Ces situations, expliquées par un terrain génétique prédisposant, ne représentent qu'une faible minorité des cas de maladie de Parkinson.

La maladie pourrait aussi résulter, dans de nombreux cas, de l'exposition à des substances toxiques associée à une vulnérabilité génétique. De nombreux toxiques sont incriminés : des pesticides ou les métaux lourds comme le manganèse ou le cuivre. Le MPTP (1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyradine) ou certains pesticides tels que la roténone ou le paraquat sont lipophiles, ils peuvent donc passer la barrière hémato-encéphalique de manière passive ou par des transporteurs spécifiques (cas du paraquat). Une fois à l'intérieur des cellules neuronales (neurones ou glie), ces composés ont la propriété de favoriser le stress oxydatif par interaction avec le complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale. L'augmentation d'espèces radicalaires va entraîner le dépassement des systèmes de détoxification de la cellule, l'oxydation des protéines, des lipides et des acides nucléiques cellulaires aboutissant à l'apoptose. La mort cellulaire est également favorisée par la libération du cytochrome C dans les étapes initiales de l'atteinte mitochondriale. Une autre source de radicaux libres est le métabolisme de la dopamine par la monoamine oxydase B ou par auto-oxydation qui va générer du H_20_2. Les toxiques, en détruisant les neurones dopaminergiques, vont induire un échappement de la dopamine à l'extérieur de la cellule, provoquant ainsi une augmentation transitoire du taux de dopamine générant de l'H_20_2. Les neurones dopaminergiques sont donc plus particulièrement touchés par les conséquences du stress oxydatif (Nehru *et al.*, 2008).

D'autres facteurs comme le traumatisme crânien et la consommation de graisses animales favoriseraient le développement de la maladie de Parkinson. Des équipes de recherche ont montrées qu'il y avait un effet protecteur de la consommation de tabac (Quik *et al.*, 2009).

IV.1.1.4 Traitement de la maladie de Parkinson

Il n'existe pas à ce jour de traitement curatif de la maladie de Parkinson. Seule la symptomatologie est traitée par l'action médicamenteuse ou chirurgicale. Au cours de la maladie de Parkinson, une diminution de la transmission dopaminergique striatale est observée suite à la dégénérescence neuronale, ainsi qu'un emballement des interneurones cholinergiques du noyau sous-thalamique, responsable d'une hyperactivité cholinergique.

Trois possibilités sont envisageables pour la thérapeutique médicamenteuse. L'augmentation de la transmission dopaminergique par l'utilisation la levodopa (L-DOPA), d'agonistes dopaminergiques ou d'inhibiteurs enzymatiques. La L-DOPA va être métabolisée en dopamine par l'action de la DOPA-décarboxylase. Elle est administrée avec un inhibiteur de la DOPA-décarboxylase afin de limiter l'action de la L-DOPA au niveau périphérique. Les agonistes dopaminergiques stimulent directement les récepteurs dopaminergiques de type D2 de la voie indirecte sans métabolisation préalable. Les inhibiteurs enzymatiques bloquent la dégradation de la dopamine, la rendant ainsi plus disponible pour les neurones dopaminergiques.

Il est possible de tenter de diminuer la transmission cholinergique par des anticholinergiques centraux. Ils sont des antagonistes compétitifs de l'acétylcholine au niveau des récepteurs muscariniques. Au niveau central, ils permettent de diminuer l'hyperactivité striatale relative à l'action de l'acétylcholine.

Enfin, il est possible d'avoir une action directe sur la transmission glutamatergique par l'action d'amantadine qui est un antagoniste non-compétitif des récepteurs canaux du glutamate, de type *N*-méthyl-D-aspartate (NMDA). Le blocage de ces canaux contribue à réduire l'hyperactivité du noyau sous-thalamique ce qui atténue le déséquilibre entre la dopamine et le glutamate caractéristique de la maladie de Parkinson.

La stratégie chirurgicale est également envisageable. Elle a été développée par l'équipe d'Alim-Louis Benabid à Grenoble en 1993. Elle a été mise en application en Europe en 1998. Cette technique permet une stimulation cérébrale profonde. Les électrodes sont posées sur le thalamus, sur le noyau sous-thalamique ou sur le pallidum, et un neurostimulateur envoie des impulsions électriques. La neurostimulation remplace l'action habituelle de la dopamine, mais elle n'augmente pas la sécrétion de ce neurotransmetteur.

La thérapie génique offre également de réelles perspectives thérapeutiques dans le traitement de la maladie de Parkinson. Elle implique trois types de gènes : ceux qui modifient le réseau en changeant le profil de neurotransmetteurs des cellules, c'est-à-dire le changement de structure glutamatergiques en structure GABAergique ; ceux qui codent des enzymes de

production de la dopamine afin de palier à la perte de neurones ; et ceux qui vont limiter le processus de neuro-dégénération en codant des facteurs de croissance. Des essais encourageant ont été réalisés chez les singes et plusieurs essais thérapeutiques expérimentaux sont en cours. Les premiers résultats paraissent prometteurs seulement, la stratégie nécessitant l'utilisation de virus comme vecteur des gènes à « transfecter » (évaluation de l'immuno-réactivité), et les gènes pouvant être impliqué dans la modification de la survie cellulaire (apparitions de cancers), implique que de nombreuses expériences de contrôle sont encore nécessaires pour évaluer la faisabilité à plus grande échelle (Benabid, 2010).

IV.1.2 Virulence de *N. cyriacigeorgica* GUH-2

N. cyriacigeorgica GUH-2 a été décrite comme une souche possédant une virulence changeante selon son stade de croissance. Lors de l'infection de souris, la dose létale donnant 50 % de mortalité pouvait être 1000 fois plus faible (CFU/mL) en phase exponentielle de croissance (Beaman and Maslan, 1978). Durant cette phase, *N. cyriacigeorgica* GUH-2 est également capable de croître dans des macrophages issus de lapins immunisés contre cette souche. Les cellules de *Nocardia* en phase exponentielle de croissance sont sous la forme d'hyphes alors que des cellules en phase stationnaire seront de forme coccoïde. Lors d'une étude publiée en 1979, Beaman montre que les cellules filamenteuses sont plus difficilement phagocytées que les cellules coccoïdes, ce qui pourrait en partie expliquer la capacité plus importante de *N. cyriacigeorgica* GUH-2 en phase exponentielle de croissance à infecter son hôte (Beaman, 1979). A l'intérieur du macrophage la bactérie pourrait résister au stress oxydatif induit par la production de SOD et de catalase. Une des SOD produite par *N. cyriacigeorgica* GUH-2 est sécrétée et associée aux lipides de la membrane externe. Elle présente des caractéristiques communes aux SOD à Fe et à Mn décrites dans d'autres microorganismes. En phase exponentielle de croissance, la sécrétion de ces deux enzymes est plus importante. Cela va dans le sens d'une résistance accrue de cette souche aux radicaux superoxydes lors de la phagocytose (Beaman *et al.*, 1983 ; Black *et al.*, 1985). Des tests réalisés sur des souris Nude (Nu/Nu), Nude hétérozygotes (Nu/+) et Swiss Webster ont permis d'arriver à la conclusion que les lymphocytes T de l'immunité adaptative sont indispensables pour l'éradication d'une infection pulmonaire causées par *N. cyriacigeorgica* GUH-2. L'ajout de sérum provenant d'une souris immunisée permettrait d'améliorer considérablement l'efficacité des macrophages *in vitro*. Les réponses immunitaires cellulaire et humorale semblent donc indispensables à l'élimination de *N. cyriacigeorgica* GUH-2 de son hôte (Beaman and Maslan, 1977 ; Beaman *et al.*, 1980).

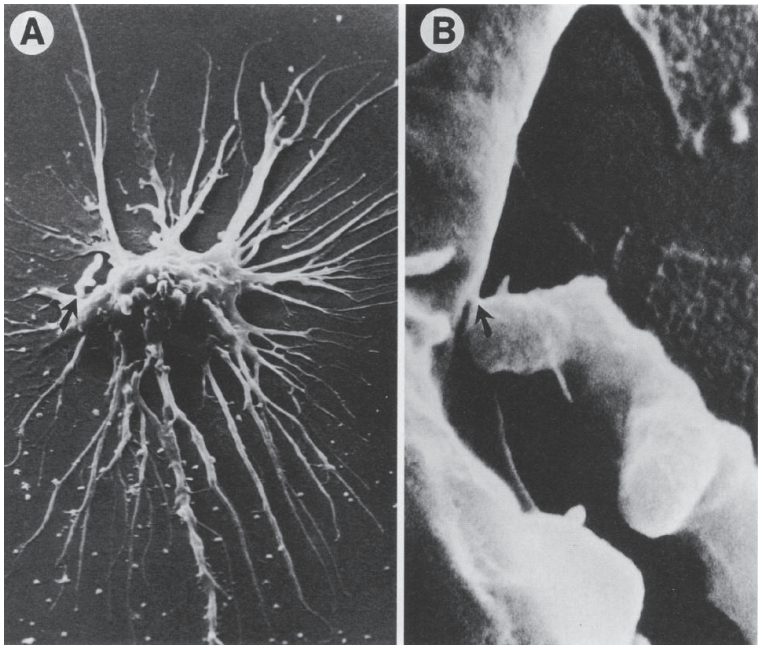


Figure 11 : Images de microscopie électronique à balayage montrant l'interaction entre une cellule de *Nocardia* et une cellule astrocytaire en culture. (A) Vue à faible grossissement de l'attachement entre *N. cyriacigeorgica* GUH-2 et la surface d'un astrocyte (flèche). (B) Vue à fort grossissement de la figure A montrant l'attachement de la pointe du filament de *Nocardia* à la surface de la cellule astrogliales (flèche). D'après Beaman and Beaman, 1994.

In vivo, *N. cyriacigeorgica* GUH-2 semble être plus virulente lorsqu'elle est injectée par voie intraveineuse. Dans ces conditions, elle infectera préférentiellement le système nerveux central (Beaman *et al.*, 1980) (figure 11). Une fois dans l'hôte, la cellule bactérienne est capable de s'attacher aux cellules épithéliales avant d'être phagocytée. Ce serait par ce mécanisme que les cellules de *Nocardia* passeraient la barrière hémato encéphalique (Ogata and Beaman, 1992). Des protéines de poids moléculaire différents ont été identifiées dans les processus d'adhésion, mais seule une protéine de 43 kDa semble être spécifique de l'adhérence de *N. cyriacigeorgica* GUH-2 et permettrait l'invasion des cellules épithéliales pulmonaires ainsi que la dissémination à l'ensemble de l'organe lorsque la cellule est en phase exponentielle de croissance (Beaman and Beaman, 1998). Il reste encore de nombreux points à élucider afin de comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans le processus infectieux de *N. cyriacigeorgica* GUH-2.

IV.1.2.1 *N. cyriacigeorgica* GUH-2 et la maladie de Parkinson

En 1991, Kohbata et Beaman décrivent un modèle de souris Balb/c présentant des symptômes similaires à ceux de la maladie de Parkinson suite à une injection par voie intraveineuse d'une dose non létale de *N. cyriacigeorgica* GUH-2. L'administration de *Nocardia* par voie intraveineuse facilite l'invasion du cerveau, puisqu'elle possède une affinité pour les cellules épithéliales des capillaires cérébraux (Beaman *et al.*, 2000). Une fois dans le cerveau, *Nocardia* croît au contact des neurones avec une affinité pour les neurites (prolongements de corps cellulaire d'un neurone) avec pas ou peu de dommages visibles en raison du non déclenchement de réaction inflammatoire. Les souris étudiées ne présentent pas de signes cliniques avant que les troubles neurologiques n'apparaissent. Après la migration et la croissance de la bactérie dans le cerveau, le nombre de cellule de *Nocardia* décroît entre le 9ème et le 13ème jour post injection, puis le cerveau redevient stérile. L'apparition des signes neurologiques est concomitante avec la disparition de *Nocardia*. Entre 10 et 15 % des souris infectées développent un mouvement rythmique vertical de la tête (yes-yes), des tremblements de repos, une posture arrêtée et une hypoactivité. L'injection de L-DOPA à ces animaux arrête ces troubles pendant plus de 2 heures. L'histopathologie des encéphales montre que les neurones dopaminergiques de la *substancia nigra* et de l'aire tegmentale ventrale ne possèdent plus de corps de Nissl, structure neuronale responsable de la synthèse protéique, et de la dopamine. L'atteinte des corps de Nissl explique la réponse positive à la L-DOPA. L'analyse des niveaux de neurotransmetteurs dans le striatum a révélé que seule la quantité disponible de dopamine a été réduite dans ces animaux. Les niveaux de sérotonine et

de norépinephrine restant inchangés, cela suggère que les cellules dopaminergiques sont spécialement ciblées par l'infection. De plus, une mort cellulaire est observée sans réaction inflammatoire, ce qui suggère que l'apoptose est responsable de la neurodégénérescence dans le système nerveux central, comme dans les modèles MPTP de la maladie (Tam *et al.*, 2002). Les mécanismes cellulaires par lesquelles *N. cyriacigeorgica* GUH-2 pourrait induire l'apoptose sont multiples : la libération de cytokines suite à la phagocytose de *Nocardia* par les cellules gliales (Beaman and Beaman, 1993), la sécrétion par *Nocardia* de métabolites secondaires tels que des inhibiteurs de protéasome (Tam *et al.*, 2002 ; Camp *et al.*, 2003 ; Loeffler *et al.*, 2004 ; Barry and Beaman, 2007), la cytotoxicité due à une surproduction de dopamine pour combler le disfonctionnement de certains neurones (Kristal *et al.*, 2001) ou l'activation de la voie des caspases (Barry and Beaman, 2007). En revanche, bien que des inclusions protéiques soient observées dans les encéphales de souris et de singes (*Macaca fascicularis*) présentant des troubles neurologiques, ces amas semblent différents des corps de Lewy puisque la majorité apparaissent basophile alors que les « vrais » corps de Lewy sont éosinophiles (Chapman *et al.*, 2003).

L'ensemble de ces observations comprenant les symptômes dues aux troubles neurologiques et leur disparition temporelle suite à l'injection de L-DOPA, la sécrétion par *N. cyriacigeorgica* GUH-2 d'un inhibiteur de protéasome, l'induction de l'apoptose des cellules neuronales de la *substancia nigra* et la présence d'inclusions neuronales, vont fortement dans le sens d'un lien possible entre une infection cérébrale à *N. cyriacigeorgica* GUH-2 et la maladie de Parkinson. Cependant, aucun lien direct n'a encore clairement été établi entre l'infection par un microorganisme et le déclenchement de la maladie, bien qu'il ait été décrit des patients atteint de la maladie de Parkinson possédant des anticorps anti-*Nocardia* (Kohbata and Shimokawa, 1993) et que l'implication d'une bactérie ou d'un virus ait déjà été soulevée dans plusieurs publications pour expliquer certaines formes de la maladie (Diaz-Corrales *et al.*, 2004).

IV.1.2.2 Production de métabolites secondaire par *N. cyriacigeorgica* GUH-2

N. cyriacigeorgica GUH-2 serait capable de produire des métabolites secondaires qui interviendraient comme des acteurs majeurs de la virulence de la souche. *In vitro*, ces métabolites sont déclencheurs de l'apoptose sur les cellules PC12 par l'activation de la voie des caspases. Une activité inhibitrice du protéasome par des surnageants de culture du protéasome a également été décrite (Tam *et al.*, 2002 ; Loeffler *et al.*, 2004 ; Barry and Beaman, 2006). D'autres Actinobactéries sont connues pour produire un certain nombre de

métabolites. Certaines bactéries du genre *Streptomyces* sont notamment capables de produire des inhibiteurs du protéasome. Il est intéressant de noter que des modèles animaux de la maladie de Parkinson sont induits à partir de ces inhibiteurs (Kikuchi *et al.*, 2003 ; McNaught *et al.*, 2004). *N. cyriacigeorgica* GUH-2 pourrait produire une molécule de ce type. Elle pourrait avoir un rôle important dans la physiopathologie observée suite à l'injection de la souche chez l'animal et avoir une activité qui persiste même après la disparition de l'agent pathogène.

IV.1.2.2.1 Définition des métabolites secondaires

Les métabolites secondaires sont des composés organiques qui n'interviennent pas directement dans les processus de croissances, de développement et de reproduction des organismes producteurs. Ils sont généralement produits dans les phases de latence et peuvent avoir des structures chimiques très variées. Ils sont issus de réactions enzymatiques faisant intervenir une enzyme libre ou complexée, ou alors sont le produit de grosses protéines multifonctionnelles et responsables de plusieurs étapes enzymatiques telles que les polyketides synthases (PKS) et les peptides synthétases non ribosomiques (NRPS). Les gènes codant les enzymes du métabolisme secondaire sont généralement chromosomiques et organisés sous la forme de cluster mais ne sont pas toujours sous la forme d'un opéron. Peu de gènes de biosynthèse ont été décrit comme étant portés par un plasmide. L'expression des métabolites secondaires peut être influencée par les manipulations environnementales : l'épuisement d'un nutriment, l'ajout d'un inducteur ou la diminution de la phase de croissance. Ces événements génèrent une cascade de signaux régulateurs et engendrent une différentiation chimique (métabolites) et morphologique des cellules (Demain, 1998 ; Demain and Fang, 2000).

Dans la nature, les métabolites secondaires servent à la survie des souches productrices, mais lors de culture pure du microorganisme, ils perdent ce rôle. Généralement, ils sont de faible poids moléculaire, inférieur à 1500 daltons (Hopwood, 1999). Alors que les métabolites primaires sont les mêmes pour l'ensemble des systèmes vivants, les métabolites secondaires sont principalement produits par les plantes et les microorganismes et sont habituellement spécifiques d'une souche. Ils font l'objet de nombreuses études car ils pourraient être une source de molécules à fort potentiel économique ou en santé. Les antibiotiques sont les plus connus des métabolites secondaires, plus de 5000 antibiotiques ont déjà été décrits (Demain and Fang, 2000). La plupart des métabolites secondaires ne présentent pas d'intérêt

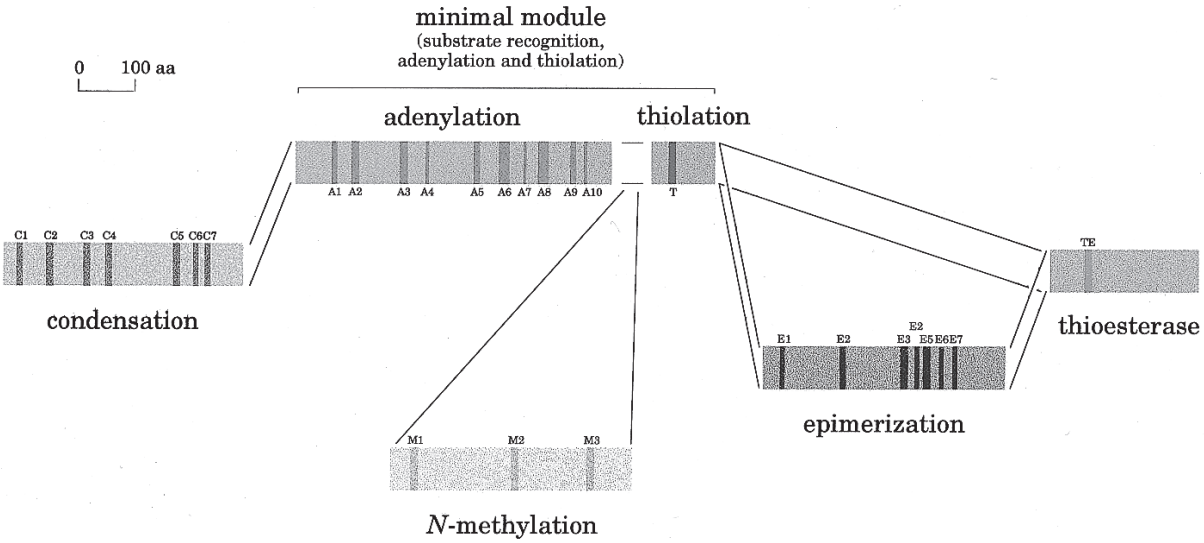


Figure 12 : Schéma montrant l'organisation d'un module de peptide synthétase à partir de domaines fonctionnels. D'après Marahiel *et al.*, 1997.

pharmaceutique car ils sont trop toxiques ou inactifs *in vivo*. Pour des raisons qui restent encore inconnues, plus de 40 % des champignons filamenteux et des Actinobactéries sont producteurs d'antibiotiques. Environ 75 % des antibiotiques sont obtenus à partir des ces microorganismes filamenteux, et le genre *Streptomyces* produits à lui seul les ¾ de ces antibiotiques. Les deuxièmes plus importants producteurs sont les champignons. Hormis la thérapie humaine et animale, les antibiotiques peuvent favoriser la croissance d'animaux et des plantes, et peuvent assurer la protection des plantes contre des microorganismes pathogènes. De manière générale, les métabolites secondaires peuvent intervenir dans la nature dans des processus de défense de l'organisme producteur, de transport de métaux, de symbiose , de sexualité et de différentiation (Chater *et al.*, 2010).

IV.1.2.2.2 Les peptides synthétases non ribosomiques

Les métabolites secondaires peuvent être produits par voie naturelle par des microorganismes provenant de différents habitats (aquatiques et terrestres) et ont la particularité de ne pas être codés directement par le génome mais synthétisés non ribosomiquement par le biais de grosses enzymes multifonctionnelles appelées NRPS (Hopwood, 1999). Une caractéristique unique de ces NRPS est leur capacité à synthétiser des peptides à partir d'acides aminés protéinogènes ou non. Il arrive fréquemment que la synthèse d'un métabolite par ces enzymes soit couplée avec les activités enzymatiques portées par les polykétides synthases (PKS), ceci aboutissant à un produit hybride. Les NRPS sont organisées sous la forme de modules structurels. Le module minimal est composé d'un domaine d'adénylation, d'un domaine de thiolation et d'un domaine de condensation. Le domaine d'adénylation est le point central des NRPS. Il a deux fonctions : la reconnaissance et l'activation du substrat (acide aminé ou hydroxy acide). La reconnaissance du substrat se fait dans une poche formée par le domaine d'adénylation. Les domaines d'adénylation présentent une grande homologie au sein d'un même organisme, mais un changement dans la séquence primaire en acide aminé du domaine va entrainer une modification de la conformation du domaine et donc un changement de spécificité de celui-ci vis-à-vis de son substrat. Ainsi, la variabilité des domaines d'adénylation composant une NRPS va être directement reliée à la diversité des métabolites pouvant être produits par celle-ci. Une fois reconnu, le substrat est activé par la réaction enzymatique d'adénylation dépendante de l'ATP propre au domaine. Le substrat sous forme adénylé est transféré et fixé sur le domaine de thiolation où il pourra être lié par une liaison peptidique au peptide en cours de synthèse par le domaine de condensation. En plus de ces trois domaines, des domaines peuvent intervenir dans la modification du

substrat avant ou après sont incorporation au peptide en cours de synthèse. Ce sont les domaines : d'épimérisation, de méthylation et de cyclisation. Le dernier domaine d'une NRPS est souvent une thio-estérase, elle permet l'ajout du dernier AA à l'oligopeptide et probablement le clivage de celui-ci de la machinerie enzymatique (Marahiel *et al.*, 1997).

Des molécules comme les cyclosporines (immunosuppresseurs) ou la bacitracine (antibiotique) sont produits pas les NRPS (Stachelhaus *et al.*, 1999). La co-culture de cellules neuronales avec des surnageants de culture de *N. cyriacigeorgica* GUH-2 a montré une activité apoptotique sur des cellules en culture et une activité inhibitrice du protéasome. Il est possible que le ou les composés responsables de ces activités soient produits par des NRPS. L'étude des réarrangements génétiques ayant conduit à l'émergence de *N. cyriacigeorgica* pourrait aider à l'identification des gènes impliqués dans ces activités.

IV.1.2.2.3 Les polyketides synthases

Les métabolites secondaires peuvent également être produits par les PKS. Ce sont de grands complexes protéiques multienzymatiques qui contiennent un groupe coordonné de sites actifs. La biosynthèse se fait de manière progressive à partir de simples blocs de 2-, 3-, 4-carbones tels que l'acétyl-CoA, propionyl CoA, butyryle-CoA et de leurs dérivés activés, malonyl-, méthylmalonyl-et éthylmalonyl-CoA. L'étape clé de création de chaînes de biosynthèse de polykétides est une condensation décarboxylante analogue à l'étape d'élongation de la chaîne de biosynthèse des acides gras classique à laquelle il faut ajouter des modifications par des groupes fonctionnels, aboutissant à un niveau de supérieur de complexité chimique dans les produits.

Au moins trois types d'architecture différente de PKS ont été découverts dans l'univers microbien. Les systèmes de type I se composent de très grandes protéines multifonctionnelles qui peuvent être processives ou itérative. Les itératives synthases de type I sont analogues aux synthases d'acides gras retrouvées chez les vertébrés. Elles portent tous les sites actifs nécessaires à la biosynthèse du polykétide. Les synthases itératives de Type II sont des complexes de protéines mono-fonctionnelles. Dans ces synthases, les sites actifs sont répartis entre plusieurs petits polypeptides mono-fonctionnels. Elles sont analogues aux synthases d'acide gras des bactéries et sont impliqués dans la biosynthèse des produits naturels aromatiques des bactéries, tels que l'actinorhodine, la tétracenomycine et la doxorubicine. Les polykétide synthases de type III sont responsables de la synthèse de chalcones, et de stilbènes chez les plantes ainsi que des phénols poly-hydroxylés chez les bactéries. Ces protéines sont relativement petites avec une seule chaîne polypeptidique impliquée dans la biosynthèse des

précurseurs de flavonoïdes. Contrairement à tous les autres PKS, ces protéines n'ont pas de bras phosphopantéthéyl (P-Pant) sur lequel les chaînes croissantes de polykétides sont attachées.

Les polykétides synthases modulaires constituent une classe unique des polykétides synthases de type I. Chacune de ces protéines est constituée de plusieurs domaines actifs organisés en modules. Chaque module est responsable de la construction d'une liaison carbone-carbone, via la condensation décarboxylante d'une unité d'extension kétide avec la chaîne polykétide croissance, suivie d'un cycle programmé de réduction. En outre, il y a un module de chargement dans la plupart des PKS pour l'obtention de l'unité de démarrage à l'avant du module 1 et une thioestérase responsable du déchargement du produit à la fin du dernier module. L'observation selon laquelle il existe un domaine fonctionnel distinct pour chaque transformation nécessaire à la production d'un macrolide a montré que pour une PKS modulaire, la programmation de la PKS est réalisée par une approche de production en ligne.

Les différents domaines constituent une polykétide synthase : des domaines acyl-transférases (AT) pour le chargement des unités de démarrage, d'extension et d'acyles intermédiaires ; des acyl carrier proteins domains (ACP) qui portent la molécule en formation sous la forme d'un thiolester ; le domaine β-kéto-acyl synthases (KS) qui catalyse l'extension de la chaîne ; le domaine β-kéto réductases (KR) responsable de la première réduction d'une fonction alcool ; les déshydratases (DH) qui éliminent l'eau pour donner une thiolester insaturés ; les énoyl-réductases (ER) qui catalysent la réduction finale afin d'obtenir une saturation complète, et enfin une thioestérase (TE) pour catalyser la libération et/ou la cyclisation des molécules.

IV.2 Génomique et émergence des *Nocardia*

Les principaux événements génétiques qui déterminent la structure d'un génome sont la duplication des gènes, le transfert horizontal de gènes, la perte de gènes ou de nucléotides et les réarrangements chromosomiques. Aucune étude n'a à ce jour permit de quantifier la contribution relative de chacun de ces événements dans les processus évolutifs conduisant à la composition actuelle des génomes bactériens (Ventura *et al.*, 2007). Les informations fournies ces dernières années par l'augmentation des génomes séquencés ont montré que derrière le génome cœur qui code les fonctions métaboliques essentielles, les génomes bactériens possèdent un nombre variables de gènes « accessoires » pouvant être acquis par transfert horizontal et codant des fonctions adaptatives pouvant être bénéfiques à la bactérie sous certaines condition de croissance ou environnementales (Juhas *et al.*, 2009).

IV.2.1 Acquisition d'informations génétiques

Par opposition aux eucaryotes chez qui la reproduction sexuée permet le maintien d'une diversité génétique au sein des populations en assurant le brassage génétique, les bactéries ont développé des mécanismes leur permettant d'acquérir de l'information génétique. Il existe trois mécanismes de transfert de gènes entre les bactéries : la transformation, la transduction, et la conjugaison.

La conjugaison nécessite un contact une cellule donneuse et une cellule receveuses afin d'effectuer le transfert par l'intermédiaire d'une structure spécialisée, le pili sexuel.

Au cours de la transformation, un ADN bicaténaire « nu » est introduit dans une bactérie réceptrice. Les cellules capables d'acquérir ces ADN sont dites compétentes. Cette compétence peut être naturelle ou provoquée artificiellement par des traitements modifiant la perméabilité membranaire à l'ADN.

Lors d'une transduction, le transfert d'ADN est réalisé par l'intermédiaire d'un phage. Au moment de la constitution de la particule virale, des portions de chromosomes bactériens peuvent être encapsidés et s'intégrer dans le génome d'une cellule nouvellement infectée. Dans ce cas, les limites sont liées à la capacité du phage à infecter différents hôtes et à la quantité d'ADN qu'il peut encapsider. Peu d'études font état de phages isolés à partir de *Nocardia*, ainsi que de leur diversité d'hôtes (Andrzejewski and Muller, 1975 ; Pulverer *et al.*, 1975). Cependant Manion *et al*, en 1964, utilisent la capacité des phages à infecter différentes Actinobactéries (*Streptomyces*, *Mycobacterium*, *Nocardia*) afin d'affiner leur taxonomie (Manion *et al.*, 1964). Ils concluent sur le fait que les *Streptomyces* sont reliés aux mycobactéries par les *Nocardia*, ceci suggérant des possibilités de transfert d'ADN accrues entre ces trois genres bactériens.

Une fois entré dans la cellule hôte, l'ADN étranger peut rester sous forme de plasmide, être intégré dans le chromosome par recombinaison, ou bien être dégradé. Des plasmides allant de 8 kb à 50 kb ont été identifié dans des souches cliniques de *Nocardia*, leur présence semblait reliée aux infections cutanées (Provost *et al.*, 1996). Aucun lien n'a été montré entre la présence de plasmide et la résistance aux antibiotiques chez *Nocardia*. Deux plasmides pNF1 (184 kb) et pNF2 (87 kb) ont été identifié dans *N. farcinica* 10152 (Ishikawa *et al.*, 2004) et il semblerait que les gènes codant les protéines de réplication de ces deux plasmides (*repA* et *repB*) aient des séquences proches de protéines identifiées dans des plasmides de *Rhodococcus* et *Mycobacterium* (Ventura *et al.*, 2007). Globalement, il semble que le genre *Nocardia* possède peu de plasmide par rapport aux autres genres bactériens (Provost *et al.*, 1996).

Si l'ADN étranger s'intègre dans le chromosome bactérien, il va pouvoir être identifié en tant qu'îlots génomiques. Les îlots génomiques (IG) sont des zones du chromosome bactérien possédant des caractéristiques différentes du reste du génome. De par leur origine exogène, le pourcentage en bases G et C peut notamment être différent, de même que l'usage des codons (toutefois, ces différences peuvent être moins évidentes si l'acquisition est ancienne). Ces îlots sont fréquemment encadrés par des hotspots de recombinaison ou d'insertion de type ARNt ou séquences répétées inversées. Les IGs peuvent être porteurs de plusieurs fonctions : résistance aux antibiotiques, symbiose, virulence, métabolisme des sucres, résistance aux métaux et synthèse de sidérophores (Dobrindt *et al.*, 2004). Le transfert horizontal de gènes permet également l'adaptation rapide à une niche spécifique (Cohan, 2001). En effet, l'acquisition d'ADN étranger mais spécifique d'un habitat peut aider une souche à se développer et à perdurer au sein de cet habitat et ainsi conférer à la souche un avantage adaptatif et sélectif considérable. Aucune étude n'a porté sur les IGs des *Nocardia*, même suite à la publication du premier génome entièrement séquencé (Ishikawa *et al.*, 2004). L'étude de la présence et de la répartition des IGs au sein d'une population bactérienne informe sur les événements génétiques qui ont contribués à l'émergence de nouveaux genre, espèce ou souche bactérienne. La caractérisation et l'identification de ces séquences pourrait aider à la compréhension des propriétés particulières de *N. cyriacigeorgica* GUH-2, son implication dans la neurodégénérescence ainsi que sa résistance accrue au système immunitaire animal.

IV.2.2 Génération de diversité

La génération de diversité a été classiquement perçue comme un phénomène progressif d'accumulation de mutations ponctuelles conduisant à l'émergence de nouvelles propriétés et à l'isolement sexuel des espèces (Andersson and Hughes, 2009). Chez les bactéries, ce processus est largement complété par d'autres mécanismes, comme les réarrangements de grandes portions des génomes, la fusion de réplicons, la duplication ainsi que la perte de gènes. Ces différents mécanismes ont permis une diversification rapide des bactéries, rendant possible une réponse rapide aux pressions environnementales et la colonisation d'une grande variété de niches écologiques. De plus, l'absence de phase diploïde dans le cycle de développement des bactéries favorise la fixation des modifications génétiques. En conséquence, l'évolution des génomes bactériens doit être abordée à différentes échelles allant de la modification locale d'un gène à l'organisation du (ou des) chromosome(s).

IV.2.2.1 Duplication de gènes

Il a longtemps été admis que les génomes bactériens avaient évolué à partir d'un génome ancestral plus petit, principalement par le biais de nombreux événements de duplication génique et la production conséquente de paralogues (Kunisawa, 1995). Toutefois, une analyse fondée sur les données de génomes bactériens actuellement disponibles ne supporte pas cette théorie et montre que les duplications des gènes ne contribuent que modestement à l'évolution des génomes (Coenye *et al.*, 2005). Malgré cela, il a été constaté que les gènes impliqués dans une adaptation spécifique ont été conservés après les doubles emplois, ce qui suggère que la duplication des gènes joue un rôle évolutif. Ceci est bien illustré par le paranome mycobactérien qui correspond en grande partie à une catégorie fonctionnelle de gènes impliqués dans le métabolisme des acides gras, en accord avec la nature complexe de la paroi cellulaire mycobactérienne et reflétant probablement l'évolution adaptative de cette structure cellulaire (Tekaia *et al.*, 1999 ; Coenye *et al.*, 2005).

IV.2.2.2 Perte de gènes

La perte d'ADN peut aller de délétions importantes qui s'étendent sur de multiples locus à des délétions d'un ou de quelques nucléotides. Les inactivations et les mutations délétères dans des gènes contribuant peu à la vie de la bactérie peuvent être transmises à la descendance et s'accumuler dans les populations, conduisant éventuellement à la perte de gènes. De tels événements dans des gènes essentiels seraient délétères d'un point de vue individuel, ce qui limiterait la transmission à une descendance, préservant ainsi la fonctionnalité de ces gènes (Ochman and Davalos, 2006).

IV.2.2.3 Séquences d'insertion (IS)

Les IS sont de courtes séquences d'ADN (750 à 1600 pb) contenant un gène codant une transposase servant à sa propre mobilité (Mahillon and Chandler, 1998). Ce sont des éléments transposables pouvant influencer un gène ou son environnement et ainsi modifier le phénotype d'une bactérie. Certaines IS possèdent un promoteur dans la partie terminale de leur séquence. En s'insérant à la bonne distance d'un gène, elles ont un effet activateur sur l'expression de ce gène. Elles peuvent également s'intégrer à l'intérieur d'une séquence codante inhibant ainsi l'expression de ce gène. Ces modifications peuvent influencer notamment le potentiel de virulence d'une souche. Ainsi, dans le complexe *Mycobacterium avium* un lien a été fait entre la présence de l'IS901 et la virulence des souches (Pavlik *et al.*, 2000).

Chez les *Nocardia*, deux IS ont pour l'instant été identifiée dans les espèces *N. mexicana* (Yao *et al.*, 1994) et *N. farcinica* (Ishikawa *et al.*, 2004). Les IS semblent ainsi contribuer de façon non négligeable à l'augmentation de la diversité et à l'évolution des phénotypes.

IV.2.2.4 Réarrangements génétiques

Les évènements de réarrangement du génome, comprenant l'acquisition ou la perte de fragments d'ADN, les inversions et les translocations, sont des phénomènes fréquemment observés chez les bactéries. Ils sont largement dépendant de l'activité d'éléments répétés et mobiles tels que les IS, transposons, séquences de prophage, et des plasmides. Cependant, l'impact de la modification de la synténie sur la diversité fonctionnelle n'est pas encore clairement défini à ce jour.

IV.2.3 Acclimatation

L'acclimatation est le fait, pour un organisme vivant, de s'adapter à un changement durable de son environnement, notamment climatique (température, humidité, ressources, etc.). Elle se déroule sur une période relativement courte – au plus égale à la durée de vie de l'organisme – et correspond à des changements phénotypiques réversibles, ce qui la différencie de l'adaptation. Au sein d'une même espèce, de nombreux caractères phénotypiques sont soumis à variation. Cette diversité phénotypique va conduire à un changement dans le profil d'expression des gènes et ainsi engendrer une réponse correspondant au stimulus reçu. De manière globale, l'acclimatation est associée à des modifications transcriptionnelles et traductionnelles, tandis que l'adaptation concerne les changements relatifs au contenu génomique. Différents mécanismes de régulation existent chez les bactéries ; ils impliquent des gènes dits "régulateurs", dont les principales familles sont les systèmes à deux composantes, le quorum-sensing et les facteurs transcriptionnels de la famille des sigma70 (σ70).

Cependant, ce type de régulation est très fréquemment utilisé par les bactéries, et ce de manière très étendue. Des régulateurs tels que les facteurs σ70 peuvent intervenir dans les réponses à différentes perturbations de l'environnement. Les facteurs σ70 permettent la reconnaissance spécifique des différents types de promoteurs au sein d'un génome, leur activation ainsi que la transcription des gènes en aval. Ces facteurs sont impliqués dans différents phénomènes d'acclimatation suivant leurs classes : phase exponentielle de croissance, réponse au stress de température, carence en nutriments, variation de pH, entrée en

phase stationnaire, etc. La majorité d'entre eux est impliquée dans des fonctions extracytoplasmiques.

L'ensemble de ces données apporte un éclairage conséquent sur l'importance et la complexité de tous ces mécanismes de régulation pour la survie et le développement des bactéries dans un environnement donné. De plus, tous ces systèmes peuvent interagir les uns avec les autres, aboutissant à des cascades de régulations extrêmement complexes et difficilement identifiables. Il paraît donc primordial de déterminer le rôle de chacun de ces régulateurs, que ce soit lors de la virulence ou de la symbiose, afin de mieux comprendre l'écologie des bactéries, et ce qu'elles soient pathogènes ou non.

V. Conclusion

L'implication des *Nocardia* dans de nombreuses pathologies animales et humaines ainsi que leur rôle environnemental dans les processus biogéochimiques, justifient leur dénomination de pathogènes opportunistes. La diversité phénotypique des espèces du genre *Nocardia* en fait un intéressant modèle d'étude de la frontière entre les procaryotes non-pathogènes et pathogènes. Cette diversité phénotypique est certainement le reflet d'une diversité génomique résultant de l'accumulation des processus de l'évolution.

Le travail de thèse présenté dans ce document s'est focalisé sur l'étude de la souche *N. cyriacigeorgica* GUH-2. Quatre chapitres ont été développés. Le chapitre II décrit les capacités infectieuses de la souche en comparaison avec d'autres. Le chapitre III décrit le génome de *N. cyriacigeorgica* GUH-2 : les régions de plasticité comprenant les IGs et les ISs ; les facteurs de virulence ; le profil métabolique de la souche. La comparaison de ces caractéristiques avec des génomes proches permet de mieux cerner le statut de pathogène opportuniste de cette souche. Le chapitre IV relate de la production par *N. cyriacigeorgica* GUH-2 de métabolites secondaires, plus particulièrement par les NRPS et de leur lien éventuel avec des inhibiteurs de protéasome. Le dernier chapitre traite de mise au point de marqueurs génétiques spécifiques de l'espèce *N. cyriacigeorgica* et de leur utilisation dans l'identification d'une niche environnementale de cette espèce.

CHAPITRE II : ETUDE DE LA VIRULENCE DE SOUCHES DE *NOCARDIA* CHEZ LA SOURIS

I. Introduction

Les *Nocardia* sont des bactéries aérobies à Gram positif appartenant à l'ordre des Actinobactéries. Ce sont des microorganismes saprophytes du sol. Certaines espèces de *Nocardia* sont aussi décrites comme pathogènes opportunistes. Ces espèces sont retrouvées principalement dans des infections pulmonaires et peuvent également atteindre d'autres organes, le plus souvent comme foyers secondaires d'infection.

Le système nerveux central est le deuxième site de l'organisme le plus touché suite à une infection à *Nocardia* (Ogata and Beaman, 1992). Chez l'homme, la nocardiose cérébrale a souvent un début insidieux. Elle se présente ensuite habituellement comme une forme grave d'un abcès du cerveau (Beaman and Beaman, 1994). Les symptômes observés sont divers : nausées, vomissements avec photophobie, céphalées, raideurs de la nuque, troubles moteurs (hémiparésie et tremblements) et troubles du comportement (schizophrénie, dépression, dyslexie, hallucinations et amnésie). De nombreux travaux sur les processus infectieux et les mécanismes moléculaires d'adhésion, de résistance et de multiplication des *Nocardia* ont été publiés par Beaman depuis 1969 (Bourgeois and Beaman, 1974 ; Beaman *et al.*, 1978 ; Beaman and Maslan, 1978 ; Filice *et al.*, 1980). Dans ces publications ils ont décrit *N. cyriacigeorgica* GUH-2 comme une souche possédant une virulence jusqu'à 10 fois supérieure chez l'animal par rapport aux autres souches de *Nocardia* testées.

Chez la souris et le primate, lors d'une injection par voie intraveineuse d'une dose sub-létale, *N. cyriacigeorgica* GUH-2 est retrouvée préférentiellement dans le cerveau. Une fois dans le système nerveux central, il semblerait que *N. cyriacigeorgica* GUH-2 ait une affinité particulière pour la substance noire. La présence de la souche au contact de cette région neuronale plus concentrée en neurones dopaminergique a causé l'apparition de lésions telles que l'apoptose de neurones dopaminergiques, la disparition des corps de Nissl et l'apparition d'inclusions protéiques similaires aux corps de Lewy observés également dans la maladie de Parkinson. L'ensemble de ces modifications cellulaires ont été décrites comme étant la cause de troubles comportementaux observés chez les animaux ayant subit une injection de *N. cyriacigeorgica* GUH-2. A partir de 12 jours suivant l'inoculation, une partie des animaux ont présenté un ou plusieurs de ces symptômes : posture figée, tremblements, membres relâchés, hémiparésie et mouvements rythmiques verticaux de la tête. Une réponse positive à

la L-DOPA a été observée chez les animaux présentant des mouvements verticaux répétitifs de la tête et sont devenus non différentiable par rapport aux animaux non inoculés ou témoins. La L-DOPA n'a, par contre, eu aucun effet sur les souris présentant l'hémiparésie comme trouble comportementale principal (Kohbata and Beaman, 1991).

La description des troubles moteurs ainsi que les modifications cellulaires observées du système nerveux central chez les animaux infectés rappelle la symptomatologie de la maladie de Parkinson. Une infection par une souche particulière de *Nocardia* pourrait être un des facteurs de prédisposition dans l'apparition de la maladie d'autant plus que des études ont révélé la présence d'anticorps anti-*Nocardia* dans le sérum de patients atteints de la maladie de Parkinson (Kohbata and Shimokawa, 1993).

Dans ce travail nous avons voulu tester la capacité de différentes souches de *Nocardia* à déclencher ces troubles comportementaux chez l'animal et identifier les zones neurologiques touchées et impliquées dans ces troubles. Pour cela nous avons inoculé quatre souches de *Nocardia* d'origines cliniques et environnementale à des souris Balb/c. Les résultats obtenus confirment les expérimentations réalisées par Kohbata *et al*. (1991) et Beaman *et al*. (2008), et permettent l'identification de nouvelles souches de *Nocardia* responsables de l'apparition de troubles moteurs chez la souris.

Ces travaux ont été effectués en collaboration avec P. Belli de l'établissement VetAgroSup – Campus vétérinaire et l'Institut Claude Bourgelat.

II. Matériel et méthode

II.1 Animaux

Des souris femelles BALB/c pesant entre 18 et 20 grammes ont été utilisées dans une animalerie de niveau 2 à l'Institut Claude Bourgelat®, VetAgroSup, Marcy l'Etoile, France. Les animaux ont été acclimatés pendant 10 jours avant le début des manipulations. La sécurité de l'environnement de travail et des manipulateurs a été assurée par l'utilisation de l'ISOcage^{TM}.

II.2 Microorganismes

Quatre souches bactériennes ont été utilisées pour l'expérimentation animale (tableau I).

Tableau I : Souches de *Nocardia* utilisées dans cette étude.

Souche	Lieu d'isolement	Référence
Nocardia cyriacigeorgica GUH-2	Rein d'un patient mort des suites de l'infection par cette souche au Georgetown University Hospital Washington, DC	Beaman and Maslan, 1978
Nocardia cyriacigeorgica souche type (DSM 44484)	Secrétions bronchiques d'un individu atteint de bronchite chronique dans la ville de Gelsenkirchen en Allemagne	Yassin *et al.,* 2001
Nocardia farcinica IFM 10152	Bronches d'une patiente japonaise	Ishikawa *et al.,* 2004
Nocardia asteroides ATCC 19247	Sol	Gordon and Mihm, 1959

Ces souches ont été cultivées en bouillon BHI (Conda) complémenté avec du NaH_2PO_4 H_2O à 20 mM final (BHI-P). Un volume de 50 mL de BHI-P a été ensemencé à partir de 20 mL d'une culture homogène de *Nocardia* en phase stationnaire et incubé à 37 °C sous agitation à 150 rpm. Une fois les cellules en phase exponentielle de croissance, la culture cellulaire a été centrifugée et à 50 x *g* pour éliminer les agrégats de cellules et la concentration a été ajustée à environ $3{,}5.10^6$ CFU.mL^{-1}. Un volume de 0,1 mL de cette suspension bactérienne a été injecté aux souris dans la veine latérale de la queue. Chaque souris a reçue environ $3{,}5.10^5$ CFU.

II.3 Traitement à la L-dopa et à la carbidopa

Un volume de 100 µL d'une solution saline contenant de la L-dopa (Sigma®) à hauteur de 20 mg.kg^{-1} et de la carbidopa (Sigma®) à hauteur de 5 mg.kg^{-1} a été administré à des souris contrôles non-infectées sans signes neurologiques et des souris infectées présentant divers troubles neurologiques. Leur réponse a été observée pendant deux heures. Certaines

souris ont reçu une seconde injection de 100 µL de cette solution saline au cours de l'observation.

II.4 Autopsie

Les animaux ont été euthanasiés par une injection mortelle de 0,5 mL d'une solution de dolethal en intra-péritonéal après avoir été anesthésiée par une injection de kétamine en intra-péritonéal a raison de 100 $mg.kg^{-1}$ de kétamine. Le prélèvement des différents organes a été réalisé. Les encéphales ont été coupés en 2 dans le sens de la longueur afin de séparer les deux hémisphères. Une première moitié a été congelée dans l'azote liquide et conservée à -80 °C. La seconde a été immergée dans du formol histologique tamponné pH 7,4 - 7,6. Les organes prélevés en *post mortem* ont été conservés de la même manière.

II.5 Anatomopathologie

Suite à la fixation dans le formol histologique, l'étape de déshydratation des organes prélevés a été réalisée. Les échantillons ont été introduits dans deux bains d'éthanol de degrés croissant (70° et 90°) pendant 1 heure chacun puis dans trois bains d'éthanol absolu pendant (i) 2 heures,(ii) 2 heures et de (iii) 2 à 12 heures respectivement. Les quatre premiers bains d'éthanol ont été faits sous agitation douce, le cinquième bain n'étant pas agité. Les échantillons ont ensuite été introduits successivement dans trois bains d'alcool butylique pendant 24 heures chacun (le dernier bain pouvant être maintenu indéfiniment). Entre chacun des bains, les échantillons ont été égouttés par centrifugation douce. Enfin l'inclusion à la paraffine des échantillons a été réalisée par deux bains de 24 heures dans la paraffine à 60 °C.

Les coupes sériées de 4 µm d'épaisseur ont été réalisées sur les blocs de paraffines contenant les organes. Des séries de 6 coupes ont été récoltées tous les 400 à 500 µm. Chaque série est annotée par une lettre et chaque coupe par un numéro correspondant à une coloration. Quatre colorations ont été réalisées dans chaque série de coupe : l'hématoxyline de Harris - éosine, la coloration de Fite, la coloration de Gram et l'immunohistochimie avec un anticorps anti-mycobactérie. Deux coupes de chaque série ont été conservées pour analyses ultérieures ou complémentaires.

- Coloration à l'hématoxyline de Harris - éosine :

Les lames ont été déparaffinées par deux bain successifs de 10 minutes chacun dans le réactif Ottix (MM France) puis par un bain de 5 minutes dans le réactif Ottix Shaper (MM France). Les lames ont été réhydratées par un bain de 2 minutes d'alcool à 90°, un bain de 2 minutes d'alcool à 70°, et un bain de 2 minutes d'eau. La coloration a ensuite été réalisée par un bain de 10 minutes dans l'hématoxyline de Harris acidifiée (Thermo

Scientific) suivit d'un rinçage de 10 minutes à l'eau, d'un bain de 30 secondes dans du carbonate de lithium à saturation (1,5 g de carbonate de lithium dans 100 mL d'eau), d'un rinçage de 10 minutes à l'eau, d'un bain de 4 minutes dans l'éosine jaunâtre (2 g d'éosine jaunâtre, 100 mL d'eau, 0,2 mL de formaldéhyde) et d'un rinçage à l'eau de 5 minutes. Une déshydratation a été réalisée par un bain de 5 minutes des lames dans l'Ottix Shapper (MM France) et deux bains successifs de 10 minutes dans l'Ottix (MM France). Cette coloration permet d'observer la topographie générale du tissu et notamment des zones de lésions.

- Coloration de Fite :

Les lames ont été déparaffinées par deux bains de 12 minutes chacun dans un mélange huile de paraffine + xylène (1:2 vol /vol). La coloration a été réalisée par un bain de 10 minutes à température ambiante dans une solution de Carbol-Fushine (fuchsine basique 0.5 g, eau distillée 50 mL, éthanol absolu 5 mL, phénol cristaux fondus 2,5 mL). Après un rinçage à l'eau les lames ont été décolorées avec une solution d'acide sulfurique à 1 % durant 5 à 10 minutes. Les lames ont été rincées à l'eau et contre colorées avec une solution de bleu de méthylène filtrée (bleu de méthylène 0,07 g, éthanol 95 % 5 mL, eau 45 mL) pendant 30 secondes. Elles ont ensuite été lavées à l'eau avant d'être séchées totalement et montées directement avec un milieu de synthèse. Cette coloration d'histochimie colore en rouge les *Nocardia* dans le tissu observé.

- Coloration de Gram :

Les lames ont été déparaffinées et réhydratées de la même manière lors de la coloration à l'hématoxyline éosine. Chacune des étapes suivantes a été précédée d'un lavage à l'eau. Les lames ont été colorées au violet de méthyl (violet de méthyl 0,2 %, alcool 2 %, ammonium oxalate 0,75 %) pendant 30 secondes à 1 minute. Elles ont été colorées au lugol (iode 1 %, iodure de potassium 2 %) pendant 20 secondes avant d'être décolorée à l'alcool et acétone pendant 5 à 10 secondes. Une recoloration à la fuchsine (fuchsine basique 0,08 ‰, alcool méthylique 8 %) pendant 30 secondes à 1 minute a été réalisée. Enfin, les lames ont été séchées. Au même titre que la coloration de Fite, cette coloration d'histochimie colore en bleu les *Nocardia* dans le tissu observé.

- Immunohistochimie :

Les lames ont été déparaffinées et réhydratées de la même manière que pour la coloration à l'hématoxyline éosine. Les peroxydases endogènes ont été inhibées par l'utilisation d'eau oxygénée à 3 % pendant 20 minutes à température ambiante. Après un rinçage de 5 minutes à l'eau, les sites antigéniques ont été révélés par un traitement

aux micro-ondes. Les lames ont été immergées dans un tampon phosphate citrate (50,5 mL d'acide citrique à 0,5 mol.L^{-1}, 14,7 mL de phosphate de sodium disodique à 0,5 mol.L^{-1}) à pH 6 préalablement préchauffé pendant 2 minutes à 800 watts. Elles ont été ensuite incubées deux fois 10 minutes à 800 watts (le niveau a été réajusté entre les deux incubations avec de l'eau distillée). Les lames ont été laissées refroidir 20 minutes hors du four à micro-ondes, rincées pendant 5 minutes dans l'eau distillée puis pendant 5 minutes dans du tampon TBS (50 mM Tris, 150 mM NaCl pH 7,6) à température ambiante. Une digestion enzymatique a été réalisée en utilisant le kit « AUTOZYME » (MM France). Les lames ont été incubées 10 minutes à 37 °C dans 2 mL de tampon « AUTOZYME » (MM France) contenant 8 gouttes d'« AUTOZYME » (MM France) concentré préalablement ramené à température ambiante. Puis elles ont été incubées 5 minutes dans du TBS à température ambiante. Les sites non spécifiques ont été bloqués par une incubation de 20 minutes avec le blocant du kit. Les lames ont été ensuite incubées 1 nuit à 4 °C (ou 1 heure à température ambiante) avec l'anticorps primaire « rabbit anti-mycobacterium » SEROTEC OBT0947 diluée au 1/10000ème dans du « Primary Antibody Diluting Buffer » contenant 5 % de sérum de bouc. A la suite de cette étape, quatre rinçages ont été effectués avec du TBS à température ambiante. L'incubation avec l'anticorps secondaire du kit « Impress » de Vector a été réalisée pendant 30 minutes à température ambiante. Les lames ont été rincées pendant 10 minutes à température ambiante avant l'étape de visualisation de la réaction par le kit « NOVARED » de Vector pendant 5 minutes. Une contre coloration a été réalisée à l'hématoxyline pendant 1 minute. S'en est suivi une étape de rinçage avant l'étape finale de déshydratation des coupes pendant 5 minutes dans l'Ottix Shapper (MM France) et deux bains successifs de 10 minutes dans l'Ottix (MM France). Ces réactions d'immunohistochimie permettent la détection et la visualisation des antigènes de *Nocardia*.

Tableau II : Bilan des troubles comportementaux observés chez les 103 souris infectés avec différentes souches de *Nocardia.*

Souche	Dose	Nb. de souris	Nb. de décès	Nb. de souris avec des troubles comportementaux				
				Hémiparèsie	Mouvement vertical de la tête	Hémiparésie et tremblements de tête	Rigidité du mouvement	Total
Milieu de culture (contôle)	-	6	0	0	0	0	0	0
N. asteroides 19247	sub-létale	17	0	0	0	0	0	0
N. farcinica 10152	sub-létale	20	0	4	1	4	0	9
N. cyriacigeorgica 44484	sub-létale	20	0	2	3	0	2	7
N. cyriacigeorgica GUH-2	sub-létale	20	0	2	0	0	1	3
N. cyriacigeorgica GUH-2	létale	20	13	1	2	0	0	3

III. Résultats

III.1 Observations de troubles comportementaux chez les souris infectées

Les souris ont été infectées avec une suspension bactérienne sub-létale. Quatre souches de *Nocardia* d'origine différente (clinique et environnementale) ont été utilisées afin d'identifier les souches capables de provoquer des troubles comportementaux. Les résultats obtenus avec la souche non pathogène *N. asteroides* 19247 ont confirmé son incapacité à induire un changement de comportement chez les souris. Les trois autres souches testées ont provoqué l'apparition de troubles comportementaux à partir du sixième jour post infection. Une augmentation du nombre de souris présentant ces troubles ainsi que de l'intensité de ceux-ci a été observée jusqu'à une stabilisation au 13ème jour post infection. Parmi les troubles observés on retrouve la rigidité musculaire, les souris ayant du mal à se mouvoir, ou se déplaçant par à-coups. L'hémiparésie qui est caractérisée par des souris présentant une atteinte du coté droit ou gauche du corps avec des troubles surtout visibles au niveau de la position de la tête qui penche de manière constante du coté atteint. Ces souris ont une tendance à se déplacer en tournant toujours dans le même sens et se mettent à tourner rapidement lorsqu'elles sont tenues par la queue. On peut observer des tremblements sur la totalité du corps de la souris, l'animal étant petit nous n'avons pu déterminer s'ils étaient présents seulement au niveau des membres. Les mouvements rythmiques et verticaux de la tête ont également été observés (souris qui comptent les secondes). Dans ce mouvement, les souris lèvent leur tête à la verticale de manière incontrôlée, pendant quelques dixièmes de secondes. Ce mouvement peut se produire plus de 50 fois en trente secondes (vidéo 1) ce qui le rend caractéristique et très différents du comportement normal d'une souris en train de sonder son environnement.

Les résultats des troubles comportementaux sont variables en fonctions des souches utilisées (tableau II). Sur les 20 souris inoculées avec une dose sub-létale de *N. cyriacigeorgica* GUH-2, seules trois ont développé des troubles du comportement et aucune ne présentait le mouvement vertical de la tête. Sept des souris inoculées avec la souche type de *N. cyriacigeorgica* DSM 44484 ont développé des troubles du comportement. Deux souris ont une rigidité du mouvement, deux souris ont une hémiparésie et trois ont un mouvement vertical de la tête. Les résultats obtenus avec la souche *N. farcinica* 10152 ont été les plus concluants avec presque 45 % des souris (9/20) présentant des troubles suite à l'infection bactérienne. Parmi elles, quatre présentent une hémiparésie, une montre un

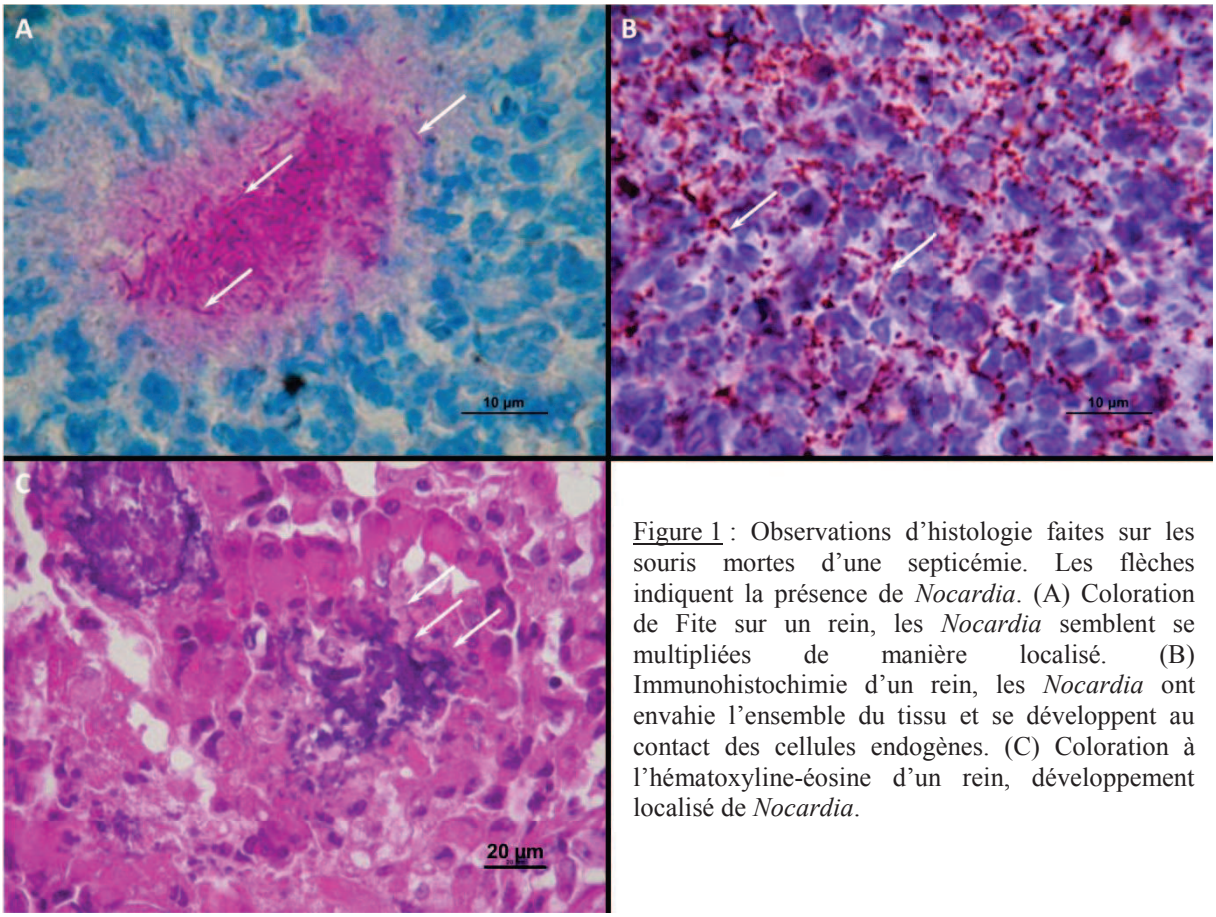


Figure 1 : Observations d'histologie faites sur les souris mortes d'une septicémie. Les flèches indiquent la présence de *Nocardia*. (A) Coloration de Fite sur un rein, les *Nocardia* semblent se multipliées de manière localisé. (B) Immunohistochimie d'un rein, les *Nocardia* ont envahie l'ensemble du tissu et se développent au contact des cellules endogènes. (C) Coloration à l'hématoxyline-éosine d'un rein, développement localisé de *Nocardia*.

mouvement vertical anormal de la tête et quatre présentent ces deux symptômes simultanément.

Afin de vérifier la virulence de *N. cyriacigeorgica* GUH-2 nous avons utilisé une dose létale pour réaliser l'injection : environ 10^7 CFU. Plus de 50 % des souris sont succombé dans les 5 jours suivant l'injection. Sept souris se sont maintenues en vie avec un comportement qui ne semble pas être affecté dans les premiers jours. Puis trois d'entre elles ont développé des troubles comportementaux de type hémiparésie, tremblements et mouvement vertical de la tête.

III.2 Traitement à la L-dopa

Les souris présentant des troubles comportementaux ont été traitées à la L-dopa afin de relier la possible perte de neurones dopaminergiques à la symptomatologie observée. Cependant, aucun des animaux traités ne s'est avéré sensible à cette molécule. Aucun changement de comportement n'a été observé jusqu'à deux heures post injection et pour certains avec une dose double de celle indiquée dans la littérature.

III.3 Histologie

Une autopsie a été pratiqué sur les souris ayant reçu une injection létale de *N. cyriacigeorgica* GUH-2. L'observation macroscopique des organes a révélé la présence de nodules beiges et mous sur les rates, reins, myocarde, encéphales, foies et poumons (figure 1).

L'histologie de ces organes a montré la présence de foyers infectieux disséminés à l'ensemble de l'organisme. Les lésions les plus étendues touchent les reins, la rate et le myocarde. Ces lésions sont caractérisées par des abcès et de vastes foyers de cellules inflammatoires poly et mononuclées ainsi qu'une infiltration diffuse du tissu interstitiel par ces mêmes cellules (figure 1). Ces observations confirment la dissémination de la bactérie inoculée dans tout l'organisme et la septicémie comme cause de la mort.

III.4 Anatomopathologie des encéphales de souris présentant des troubles comportementaux

Le temps nécessaire à l'étude complète d'un encéphale de souris étant important, l'ensemble des cerveaux prélevés n'a pu être analysé. Cependant, des encéphales de souris présentant différents troubles du comportement ont été étudiés. L'analyse de coupes sagittales de ces encéphales à révélé la présence de lésions de type amas de gliose situées en partie médiane à la base du télencéphale (figure 2).

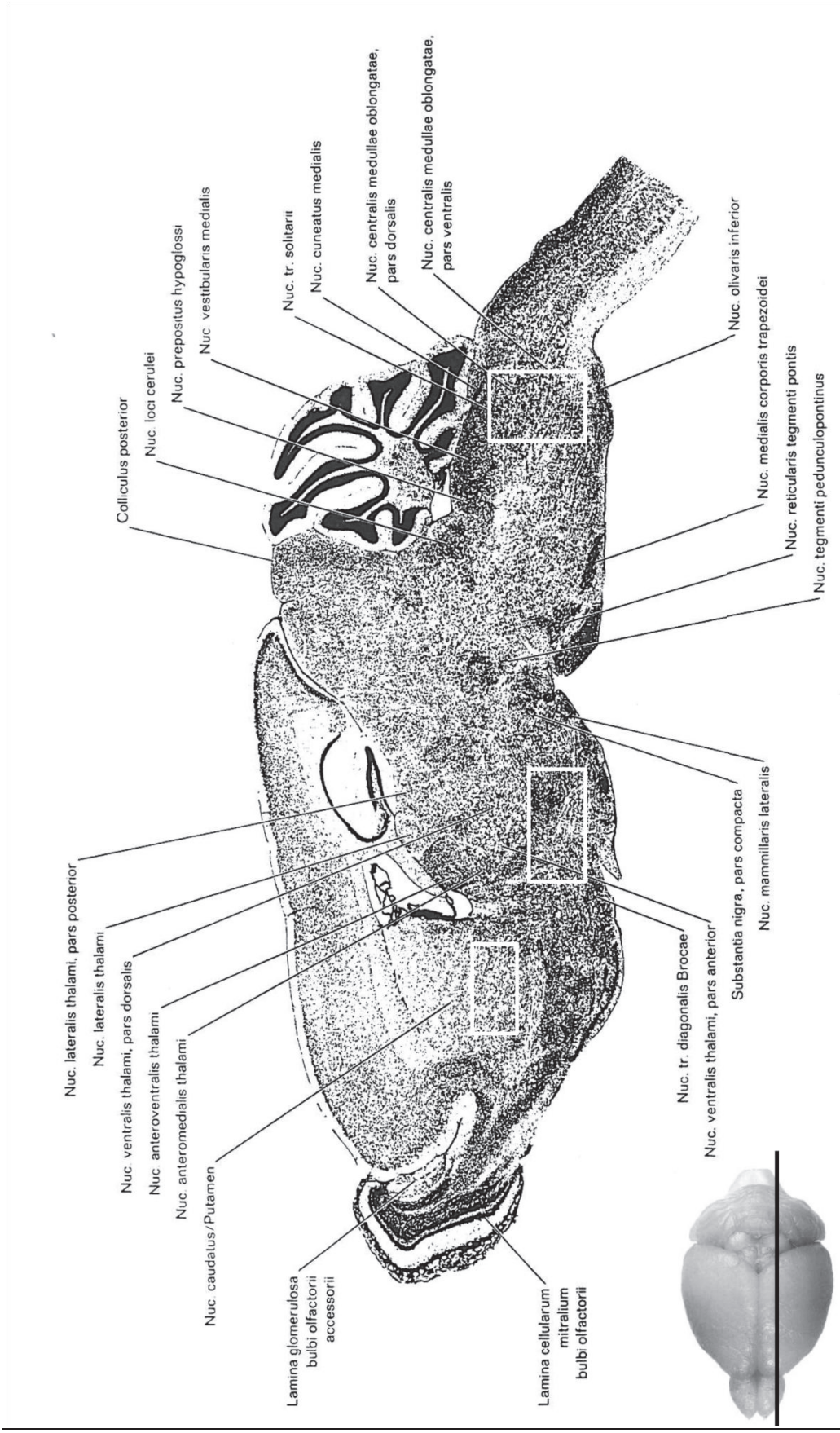


Figure 2 : Coupe sagittale d'un encéphale de souris. Les encadrements montrent les zones dans lesquelles ont été retrouvées les principales lésions. D'après « Atlas of the mouse brain », Sidman *et al.*, 1971.

L'encéphale d'une souris infectée avec la souche *N. cyriacigeorgica* GUH-2 mais ne présentant pas de symptômes moteurs a révélé la présence de petits foyers de gliose à la base du télencéphale (lames C3, D3, E3, H3, K3) en coloration à l'hématoxyline de Harris-éosine. Il y a une légère inflammation à la base des hémisphères cérébraux sans mise en évidence d'agent pathogène par les colorations spécifiques (Fite, Gram et immunohistochimie).

Des observations ont été faites sur le cerveau prélevé chez une souris infectée avec la souche *N. cyriacigeorgica* 44484 qui présentait les troubles moteurs suivant : mouvement vertical et rythmique de type « oui-oui » de la tête et une hémiparésie. La coloration hématoxyline de Harris–éosine a montré la présence d'une gliose diffuse très légère à la base du télencéphale et d'un petit manchon lymphocytaire périvasculaire dans la moelle allongée. Un petit foyer de gliose a été identifié à la base du télencéphale (lame D3) et une hyperchromatose des neurones dans la moelle allongée (lame I3, neuronophagie). Les autres colorations n'ont pas permis d'observer l'agent pathogène.

Le cerveau d'une souris ayant développé des troubles comportementaux de type mouvement vertical de la tête et hémiparésie suite à une infection par la souche *N. farcinica* 10152 a présenté un foyer de gliose à la base du télencéphale (lame J3), observé sur une coloration à l'hématoxyline de Harris-éosine (figure 3A). L'agent pathogène n'a pas pu être mis en évidence par les autres colorations.

L'encéphale d'une souris présentant seulement une hémiparésie suite à l'infection avec la souche *N. farcinica* 10152 a montré par coloration à l' hématoxyline de Harris-éosine trois foyers de gliose, un dans le diencéphale et deux à la base du télencéphale (lame D3 et G3), (figure 3B). La coloration de Fitte a permis l'observation d'un agent pathogène évoquant fortement une *Nocardia* (lames M5 et I5) (figure 3C). L'immunohistochimie a aussi permis l'observation de d'agent pathogènes évoquant les *Nocardia* dans le cervelet à la limite profonde de la couche des grains ainsi que dans la *medullae oblongatae* (figure 3D).

Cinq semaines après l'inoculation, l'agent pathogène n'a pu être mis en évidence que chez la souris présentant seulement une hémiparésie. En dehors de cela, aucune des observations histologiques effectuées sur les différents cerveaux n'a permis de différencier les troubles moteurs observés.

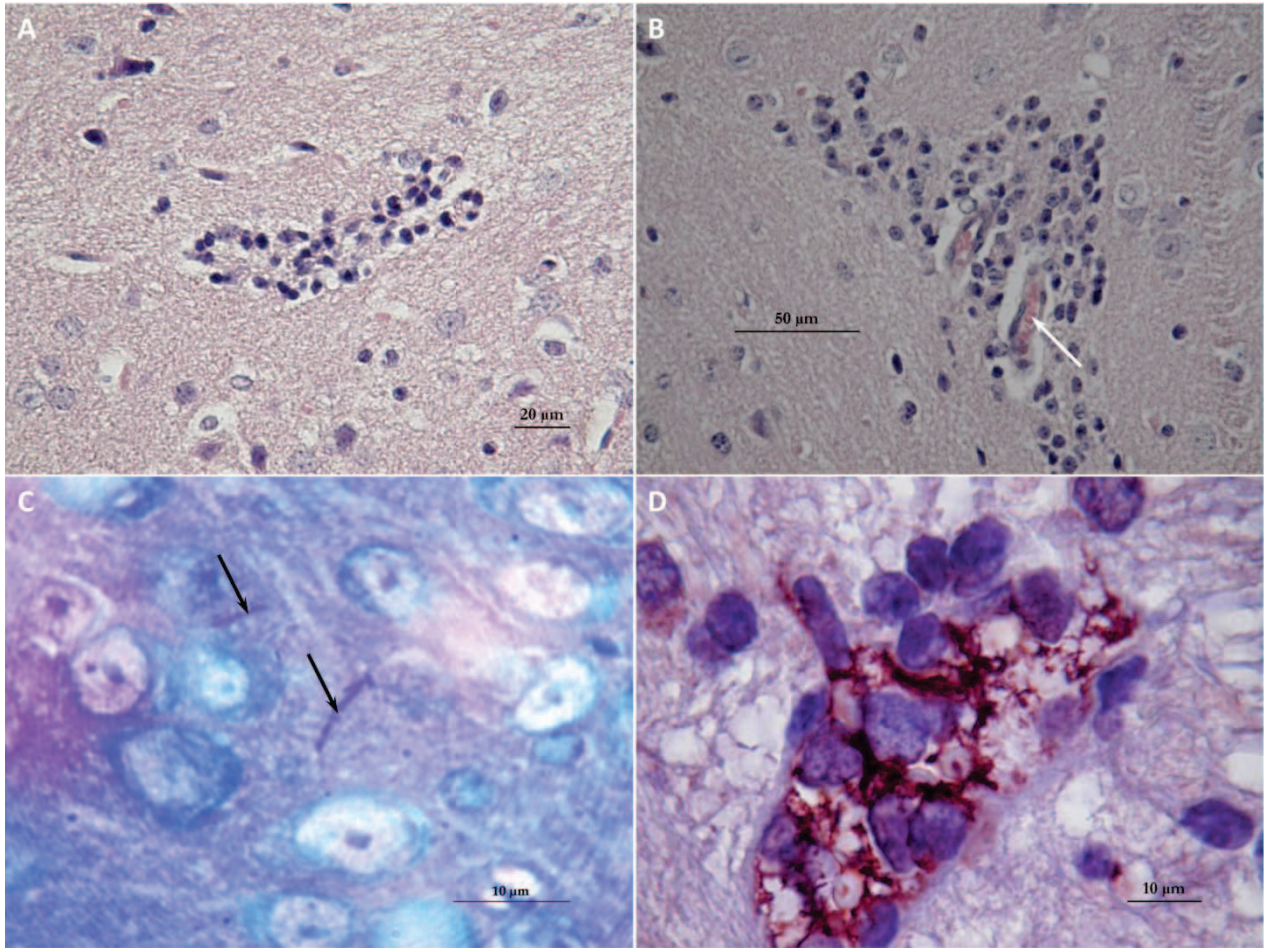


Figure 3 : Histologie des encéphales de souris présentant des troubles moteurs du comportement. (A) Coloration à l'hématoxyline-éosine montrant un foyer de gliose à la base du télencéphale chez une souris ayant des mouvements verticaux rythmiques de la tête et une hémiparésie. (B, C, D) Observations faites sur un cerveau de souris ayant développé seulement une hémiparésie. (B) Coloration à l'hématoxyline-éosine montrant un manchon lymphocytaire autour de capillaires (flèche blanche). (C) Coloration de Fite montrant la présence de cellules de *Nocardia* (flèches noires) au milieu de neurones apparemment sains. (D) Immunohistochimie révélant la présence d'antigènes de *Nocardia* (rouge brique) entouré de cellules de la microglie.

IV. Discussion

Les résultats obtenus lors de ce travail ont montré en conditions expérimentales, l'implication de souches de *Nocardia* dans l'apparition de troubles comportementaux chez la souris. Les analyses de coupes de cerveaux ont évoqué des lésions au niveau de la base du télencéphale probablement responsables de l'apparition de ces troubles moteurs. Ces observations rejoignent celles décrites par Kohbata et Beaman en 1991 sur le même modèle de souris, bien que quelques différences aient été observées. La virulence de la souche *N. cyriacigeorgica* GUH-2 a été vérifiée avec une dose létale équivalente à celle décrite par Beaman, mais nous n'avons pas pu reproduire l'ensemble des symptômes décrits avec cette souche. Par exemple, aucune des souris inoculées n'a présenté de mouvements rythmiques verticaux de la tête. Lors d'une culture de *N. cyriacigeorgica* GUH-2, il est difficile d'obtenir une suspension homogène sans amas de cellules ; cette souche ayant une tendance à croitre sous la forme d'agrégats cellulaires. Cela a probablement été la principale cause dans la difficulté à reproduire les symptômes et la faible proportion de souris atteintes d'une infection cérébrale. En revanche, ces symptômes ont été observés avec les autres souches de *Nocardia* utilisées (*N. farcinica* 10152 et *N. cyriacigeorgica* 44484). Pour l'ensemble des souches testées nous n'avons pas observé de position verticale de la queue (Beaman and Tam, 2008) mais les souris avaient une difficulté significative à se déplacer vers l'avant comme observé dans la vidéo jointe à la publication de Beaman and Tam, 2008. L'histologie des encéphales n'a pas révélé la présence d'agent pathogène dans les encéphales de souris avec un mouvement vertical et rythmique de la tête à l'instar des observations faites par Kohbata et Beaman (1991, 2008). La présence d'inclusions protéiques à proximité des lésions n'a pas pu être observée. Ici, le nombre d'animaux étudiés a été un facteur limitant dans l'étude statistique des données obtenues mais l'obtention de symptômes reproductibles suite aux injections des souches de *Nocardia* de l'étude confirme leur caractère pathogène.

V. Conclusion

Les *Nocardia* sont décrites comme des souches environnementales, saprophytes du sol possédant dans certains cas un caractère de « pathogène opportuniste ». Actuellement, les gènes permettant la transition d'un habitat environnemental vers l'hôte animal ou humain n'ont été pas élucidés. Le séquençage du génome de *N. farcinica* IFM 10152 a révélé la présence de différents gènes de virulence, tels que les protéines Mce (Mammalian cell entry), la famille de protéines antigènes 85, des facteurs impliqués dans l'adhésion et l'invasion de la cellule hôte, plusieurs catalases et superoxyde dismutase. En plus des facteurs de virulence les

Nocardia possèdent des profils de résistance aux antibiotiques très différents selon les espèces alors que la nécessité environnementale de la variété de ces résistances n'a pas encore été complètement élucidée à ce jour. Des données apportées par le séquençage d'un autre génome de *Nocardia* apporteraient des informations originales dans l'élucidation de la position intermédiaire de ce pathogène opportuniste à la fois saprophyte du sol et agent pathogène de l'homme.

Des composés excrétés ont également été reliés à la pathogénie des *Nocardia*. L'implication d'un sidérophore, la nocobactine, dans la cytotoxicité de *N. farcinica* 10152 à été démontré (Ishikawa *et al.*, 2004 ; Hoshino *et al.*, 2011). Ce type de corrélation a déjà été réalisé avec le sidérophore de *M. tuberculosis*, la mycobactine (Krithika *et al.*, 2006). Ces deux sidérophores sont des produits issus du métabolisme secondaire responsable aussi de la synthèse de composés naturels tels que les antibiotiques (pénicilline, rapamycine, …), ou d'autres composés possédant une activité biologique. Les *Nocardia* sont connues pour produire un certain nombre de ces composés. Certains d'entre eux ont été mis en cause dans des surnageants de cultures de *N. cyriacigeorgica* GUH-2 ayant une activité apoptotique sur des cellules PC12 en culture ainsi qu'une activité inhibitrice du protéasome (Barry and Beaman, 2007). Cependant, ces deux activités n'ont pu être attribuées au même composé. L'importance du métabolisme secondaire dans les mécanismes de virulence ainsi que l'abondance de gènes intervenant dans celui-ci chez les Actinobactéries environnementales, fait de *N. cyriacigeorgica* GUH-2 un modèle de choix dans l'étude des composées produits par ces gènes.

Au cours des dernières années, les infections à *N. cyriacigeorgica* ont pris une importance grandissante dans le milieu clinique avec une augmentation des cas recensés chaque année. En dépit de cette recrudescence, la niche environnementale de ce pathogène reste inconnue. Cette espèce bactérienne a été uniquement identifiée dans des sols contaminés aux hydrocarbures (Khan *et al.*, 1997 ; Quatrini *et al.*, 2008). Il semblerait que *N. cyriacigeorgica* possède l'ensemble du matériel génétique lui permettant de dégrader des hydrocarbures linéaires (Le *et al.*, 2010). Afin de définir le risque lié au contact dans l'environnement avec cette espèce, il apparait indispensable d'identifier la ou les niches écologiques permettant son développement. La cohabitation de l'espèce *N. cyriacigeorgica* avec l'homme pourrait notamment être corrélée avec la prévalence de patients parkinsoniens en milieu agricole.

CHAPTER III: THE *NOCARDIA CYRIACIGEORGICA* GUH-2 GENOME: STRUCTURE, COMPOSITION AND PHYLOGENETIC TRENDS

VI. Introduction

Nocardia are part of the well-known CMN actinobacterial group that also includes *Corynebacterium* and *Mycobacterium* in the *Corynebacterineae* suborder (Stackebrandt *et al.*, 1997). These Actinobacteria are characterized by the presence of long-chain mycolic acids in their cell wall (Embley and Stackebrandt, 1994), making them acido-resistant and favoring resistance to hydrophilic chemicals and dehydration. Such properties of their cell wall can be beneficial for survival and growth inside macrophages. Macrophages could prevent their recognition by the host's immune system. All CMN genera include pathogenic strains responsible of human diseases that have affected, in certain cases, millions of individuals such as leprosy, tuberculosis, and diphtheria. Nevertheless, the CMN group also includes saprophytes that thrive in soils, waters, and polluted environments.

Nocardia genus comprises about 80 species (Zhao *et al.*, 2011), among which *N. cyriacigeorgica* that was proposed as a *Nocardia* species in 2001 following the isolation and characterization of strain IMMIB D-1627T from a bronchial discharge in a chronic bronchitis patient in Gelsenkirchen, Germany (Yassin *et al.*, 2001). *N. cyriacigeorgica* can be differentiated from other species using 16S rDNA sequence and growth properties such as the use of acetamide as their sole carbon source and their inability to grow on proline as a sole carbon and nitrogen source. This species was validated by Conville *et al.* (2007) who showed that all *N. asteroides* strains with type VI drug resistance pattern belonged to this species (Conville and Witebsky, 2007), with the particularity of *N. cyriacigeorgica* type strain to be susceptible to ampicillin, whereas other *N. cyriacigeorgica* were resistant to this antibiotic. *N. cyriacigeorgica* were found different from *N. farcinica* in their ability to produce nitrate reductase and hydrolyse xantine and their inability to produce urease, hydolyse esculin and use L-Rhamnose (Brown-Elliott *et al.*, 2006). *N. cyriacigeorgica* were described as responsible of human pneumopathies, brain abscesses, and kidney, heart and eye infections (Beaman and Maslan, 1977; Yassin *et al.*, 2001; Barnaud *et al.*, 2005; Elsayed *et al.*, 2006; Schlaberg *et al.*, 2008; Lalitha, 2009; Cargill *et al.*, 2010). It is the most prevalent species

involved in human nocardiosis in North America (Schlaberg *et al.*, 2008; McTaggart *et al.*, 2010). Its prevalence in France was estimated at about 12% among the declared human nocardial infections between 2000 and 2007 (Rodriguez-Nava *et al.*, 2008). Nocardiosis can be fatal for immune-depressed individuals (Rodriguez-Nava *et al.*, 2008; McTaggart *et al.*, 2010). There is no report of inter-human transmission of *Nocardia* spp., suggesting that environmental exposures are the main cause of infections. However, *N. cyriacigeorgica* were rarely isolated from environmental samples. Anyhow, *N. cyriacigeorgica* isolates have been recovered from oil contaminated soils (Khan *et al.*, 1997; Quatrini *et al.*, 2008). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) could favor growth of this species. *N. cyriacigeorgica* was shown to oxidize a variety of aliphatic compounds (Le *et al.*, 2010) and grow in hydrophobic conditions ; a situation also observed for several species of the CMN group e. g. the non-tuberculous mycobacteria. Taxonomic re-evaluation of several *N. asteroides* complex strains would likely lead to a better view of *N. cyriacigeorgica* preferential habitats.

In this work, the first *N. cyriacigeorgica* complete genome sequence is presented. This genome was obtained from the strain was isolated from a kidney infection that became systemic and led to a fatal outcome at Georgetown University Hospital, Washington, D.C (Beaman and Maslan, 1977). This strain has been the dominant model in the fields of *Nocardia* biology and nocardial pathogenesis because its pathogenesis analysis revealed the generation of Parkinson-like symptoms in a mouse model (Kohbata and Beaman, 1991). This observation led several research groups to investigate its possible role in some human Parkinson cases (Hubble *et al.*, 1995) and led us to obtain its full genome sequence to better define its virulence properties. One of the key findings about *N. cyriacigeorgica* GUH-2 pathogenesis was the observation that exponentially growing *N. cyriacigeorgica* GUH-2 cells were able to invade both the brain and lungs of mice and monkeys (Beaman and Maslan, 1978; Beaman *et al.*, 2000). The specific adherence of these bacterial cells to the murine brain was shown to be mediated by a 43-kDa filament Tip protein (Beaman and Beaman, 1998). *N. cyriacigeorgica* GUH-2 was shown to invade and grow within the *substantia nigra* 24-28 hours after its inoculation and without any obvious inflammatory response causing so-called "silent infections" in both animal models(Ogata and Beaman, 1992b). Infected animals (mice and monkeys) were shown to clear sub lethal numbers of *N. cyriacigeorgica* GUH-2 cells from their brain but later developed characteristic abnormal movements (Ogata and Beaman, 1992a). These altered behaviors included a rhythmic vertical "yes-yes" head–shaking, stooped posture, hesitation to forward movement, retropulsion, and restlessness. These Parkinsonian-like symptoms appeared to be related to (i) a decreasing in the dopamine receptors number

and (ii) a programmed cells death of the dopaminergic neurons within the *substantia nigra* in mice (Beaman and Tam, 2008). Intraperitoneal injection of antiparkinsonian drugs such as a mixture of L-DOPA and carbidopa temporarily alleviated these symptoms for 2-3 hours (Kohbata and Beaman, 1991; Tam *et al.*, 2002). *N. cyriacigeorgica* GUH-2 was also reported, in several independent experiments using a variety of cellular models, to produce a substance(s) that can induce apoptosis and dopamine depletion (Loeffler *et al.*, 2004; Barry and Beaman, 2007). Hints on the nature of this substance(s) (probably a proteasome inhibitor) are inferred from the genome sequence presented in this paper. A transposon mutagenesis screening of *Mycobacterium tuberculosis* showed that the structural proteasomal genes of this closely related bacterium seems to be involved in their response toward oxidative and nitrosative stresses (Darwin *et al.*, 2003), suggesting that the nocardial proteasome or its inhibitors could play a role in virulence and brain tissue damages.

The genome sequence of *N. cyriacigeorgica* GUH-2 was also obtained in order to test the hypothesis that bacterial pathogens having an environmental origin such as *Nocardia* spp, could be key players in outdoor ecosystems. An environmental *Nocardia* genome should have a high number of gene/protein classes including a selection of a large and varied catabolic determinants allowing colonization of numerous niches among highly competitive outdoor systems. Statistical tests were thus performed to infer trends in the genes composition of *N. cyriacigeorgica* GUH-2 and compare these trends with those of other opportunistic environmental pathogen or of primary pathogen. These tests were performed by comparing the *Nocardia* genome contents with those of closely related non pathogenic actinobacterial neighbors such as *Rhodococcus jostii, Mycobacterium smegmatis, Amycolatopsis mediterranei,* and *Corynebacterium glutamicum*; and with those of pathogenic ones i.e. *R. equi, M. tuberculosis,* and *C. diphtheriae*. Proportion of clusters of orthologous groups (COGs) were investigated, and attempts was made using a phylogenomic approaches to trace back their origin. These analyses were performed by inferring the phylogenetic evolutionary trends of *N. cyriacigeorgica* strain GUH-2 using multi locus sequence comparisons of 5 housekeeping genes with the database sequences of other fully sequenced actinobacterial genomes. Afterwards, the COGs were positioned on the evolutionary tree. These analyses suggested recent genomic islands (GI) acquisitions, some of them were specific to *N. cyriacigeorgica* strain GUH-2, some were shared with few or all strains of *N. cyriacigeorgica* tested. These analyses revealed a dynamic genomic evolutionary pattern suggesting DNA acquisitions and DNA rearrangements.

Table I: Chromosome features of *N. cyriacigeorgica* GUH-2 compared with eight other Actinobacteria.

Features	*N. cyriacigeorgica* GUH-2	*N. farcinica* 10152	*R. equi* ATCC 33707	*R. jostii* RHA1	*M. tuberculosis* H37Rv	*M. smegmatis* MC2 155	*C. diphtheriae* NCTC 13129	*C. glutamicum* ATCC 13032	*A. mediterranei* U32
Size	6,194,645	6,021,225	5,235,298	9,702,737	4,411,532	6,988,209	2,488,635	3,309,401	10,236,715
G+C (%)	68.37	70.83	68.81	67.0	65.61	67.40	53.48	53.81	71.29
Average CDS length	983.29	922.77	952.39	872.17	923.13	905.65	927.24	923.69	936.1
Average intergenic region	171.09	117.23	109.07	117.54	114.69	84.84	119.08	156.45	126.77
Protein coding density	86.73	90.93	91.16	90.29	91.33	91.16	87.11	86.49	90.69
Protein-coding sequences (CDS)	5,491	5,984	5124	9,145	4,454	7,449	2,491	3,128	9,988
Pseudogenes	14	UK	13	40	8	290	131	2	4
rRNA (operon)	3	3	1	4	3	6	5	6	4
tRNA	49	53	52	52	45	47	54	60	52

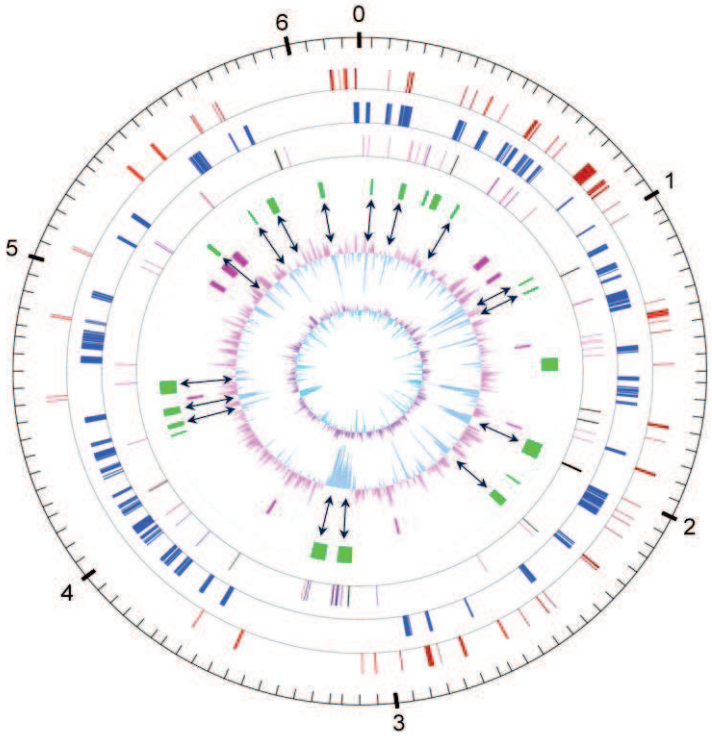


Figure 1: Circular representation of the *N. cyriacigeorgica* chromosome. The scale is shown in megabases in the outer black circle. Arrows show correspondence between GI and low G + C content. Moving inward:
- the first circle shows putative virulence genes
- the second shows syntons (≥ 5 genes) conserved between *N. cyriacigeorgica*, *N. farcinica*, *R. jostii* and *M. tuberculosis*
- the third shows tRNA ( ), phage related genes ( ) and ISs ( )
- the fourth shows genomic islands: GI-Cy1 to GI-Cy22
- the fifth shows largest genes
- the sixth shows GC plot of *N. cyriacigeorgica* genome
- the seventh shows GC plot of *N. farcinica* genome.

VII. Results

VII.1 Virulence status of *N. cyriacigeorgica* GUH-2

Virulence of *N. cyriacigeorgica* strain GUH-2 was confirmed by an intravenous injection of approximately 10^7 CFU in the tail of BALB/c mice. Death rate rise to 60% between day 2 to 7. Autopsy of the mice revealed that mice death was due to a septicemia with formation of nodules in several organs: the kidneys, liver, brain, spleen, lungs and heart. Microscopic analysis of the nodules showed high numbers of poly- and mono-nucleated inflammatory cells, and of *N. cyriacigeorgica* GUH-2 cells (see chapter II). Some mice were infected with approximately 3.5 x 10^5 CFU of *N. cyriacigeorgica* GUH-2 and developed abnormal behavior: rigidity, stooped posture, hemiparesis and vertical yes-yes head shaking probably due to a brain infection.

VII.2 General features of the *Nocardia cyriacigeorgica* genome

The *N. cyriacigeorgica* genome is composed of a single chromosome of 6,194,645 pb with an average G+C content of 68.37%. It encodes 49 tRNA genes, three ribosomal RNA operons, 5,491 predicted protein-coding sequences (CDS), and 14 pseudogenes i.e. truncated genes. A putative function was assigned to 62.12% of all CDS: 28.11% encode conserved proteins of unknown function and 9.71% were unique with no homology to any other known sequence (Table I). *N. cyriacigeorgica* strain GUH-2 did not show a plasmid. The genome coding density was estimated at 86.73%, which is markedly lower than the 91% value observed in related genomes (Table I).

The chromosome harbors eleven insertion sequences (see IS section) and 15 genes related to phages with apparently no complete phage configurations. Putative virulence genes are present but scattered along the chromosome with no significant pathogenicity island (PAI). Syntons of 5 genes conserved between *N. cyriacigeorgica*, *N. farcinica*, *Rhodococcus jostii* and *Mycobacterium tuberculosis* have been detected, facilitating the visualization of highly conserved regions shared by these 4 genomes (Fig. 1). Non-conserved regions often show distinct G+C content biases. Regions encoding the largest deduced proteins from the genome mainly match with non ribosomal peptide synthetases (NRPS), and show a high G+C content, with the exception of nocyr_4710 that encodes a putative Peptidyl-dipeptidase Dcp and is located near a transposase-related DNA sequence with a G+C content slighthly lower than the one of the whole genome (Fig. 1).

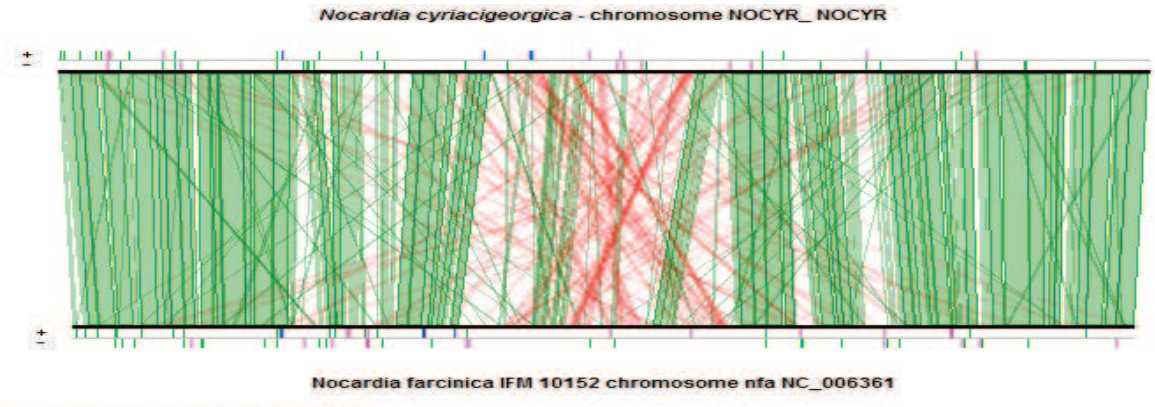


Figure 2: Lineplot based on synteny results of series of 5 genes between *N. cyriacigeorgica* and *N. farcinica* genomes. Strand Conservations (in green) and Strand Inversions (in red) are shown. Above the lineplot, pink bars indicate transposases and insertion sequences. Blue bars indicate rRNA and Green ones tRNA.

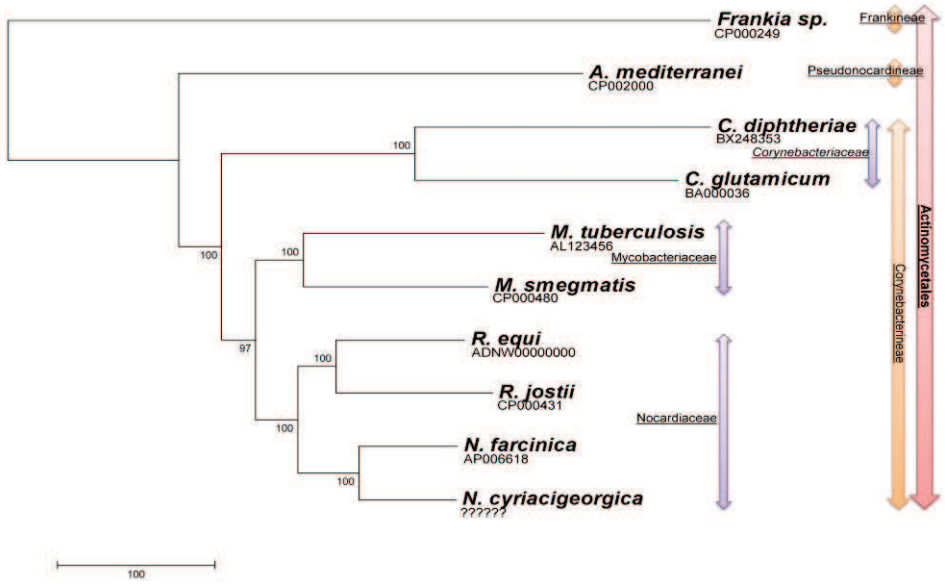


Figure 3: NJ tree of Actinobacteria inferred from concatenated *gyr*B-*rrs*-*sec*A1-*hsp*65-*rpo*B DNA sequences.

To better understand the events which led to the actual *N. cyriacigeorgica* GUH-2's genomic structure, its core genome was first delimited by identifying genes shared by closely related actinobacterial neighbors (Fig. 5). There was 83% (of 5491) of *N. cyriacigeorgica* genes that were retrieved in at least another genome: among which 14.7% (805 of 5491) were found in a putative common ancestor to all genomes present in the tree except *Frankia sp.* Cci3 (Fig. 5). Of these genes, 80% could be assigned a function and as expected, a large proportion was inferred to be implicated in basic bacterial functions such as synthesis of proteins, purines and pyrimidines nucleosides and nucleotides, of amino acids, of co-factors prosthetic groups and carriers, DNA metabolism and cell envelope (data not shown). Interestingly, the only genes strictly shared by *N. cyriacigeorgica* and *M. tuberculosis* were those of the IS987 insertion sequence, suggesting a likely transfer event of this IS between these species. The two *Nocardia* genomes were found to share 74.5% of their CDS, delimiting a sort of *Nocardia* pangenome to about 4,5 Mb. 1398 CDS (25.5%) of *N. cyriacigeorgica* were thus not found in the *N. farcinica* genome. Most of them are "unk" genes (78%) but some are likely involved in phosphonate transport and metabolism (phytase), in synthesis of fatty acids, in glutamate metabolism, in nitrite/nitrate transport, and rubisco production. Conversely, 2253 CDS of *N. farcinica* (data not shown) were not found in the *N. cyriacigeorgica* genome. Again, a high proportion of these (69%) were "unk" genes and a few could be related to particular activities like thiocyanate (toxic compound) (4 genes), urea (6 genes), auxins (6 genes) and lignin catabolism, metal resistance and virulence (9 genes).

N. farcinica and *N. cyriacigeorgica* genomes showed 11.5% (633 out of 5491) of their CDS to be strictly in common, and not being shared with the other sequenced actinobacterial genomes that were investigated (Fig. 4). These *Nocardia* strains have an equivalent genome size which is longer than the one of a primary actinomycetal pathogens (Table I). 16.6% (777 kb) of *N. cyriacigeorgica* CDS content, was not detected in other organisms using the databases, and could be considered strain-specific. These CDS were sometimes related to mobile and extrachromosomal elements but most of them showed "unk" genes of unknown function. A search of amplified (mainly duplicated) CDS among *N. cyriacigeorgica* genome revealed 161 entries of which 132 are duplicated, 21 are triplicated and 8 are quadruplicated. 29% of these CDS could not be attributed to a particular functional group but 79% were also found in *N. farcinica*. IS, *mce* genes, transcriptional regulators and nitrate reductase were part of these amplified CDS. 23% of these CDS were found on GIs (see below and Table II).

Table II: Duplicated genes (threshold 70% identities), lost genes (threshold 40% identities), and genes present in a region of genomic plasticity (RGP), COGs are described in Fig. 6A.

	Nb. CDS	Not retrived in Nf	nb. RGP feature score ≥ 3	COGs mostly represented (RGP≥3)
RGP	1563	515	10	R, K, E, Q (R, K, Q, I)
Duplicated Genes (70 %)	161	59		Q, C, I
Lost genes (Nf, Rj, Req)	193	0		E, R, Q, K

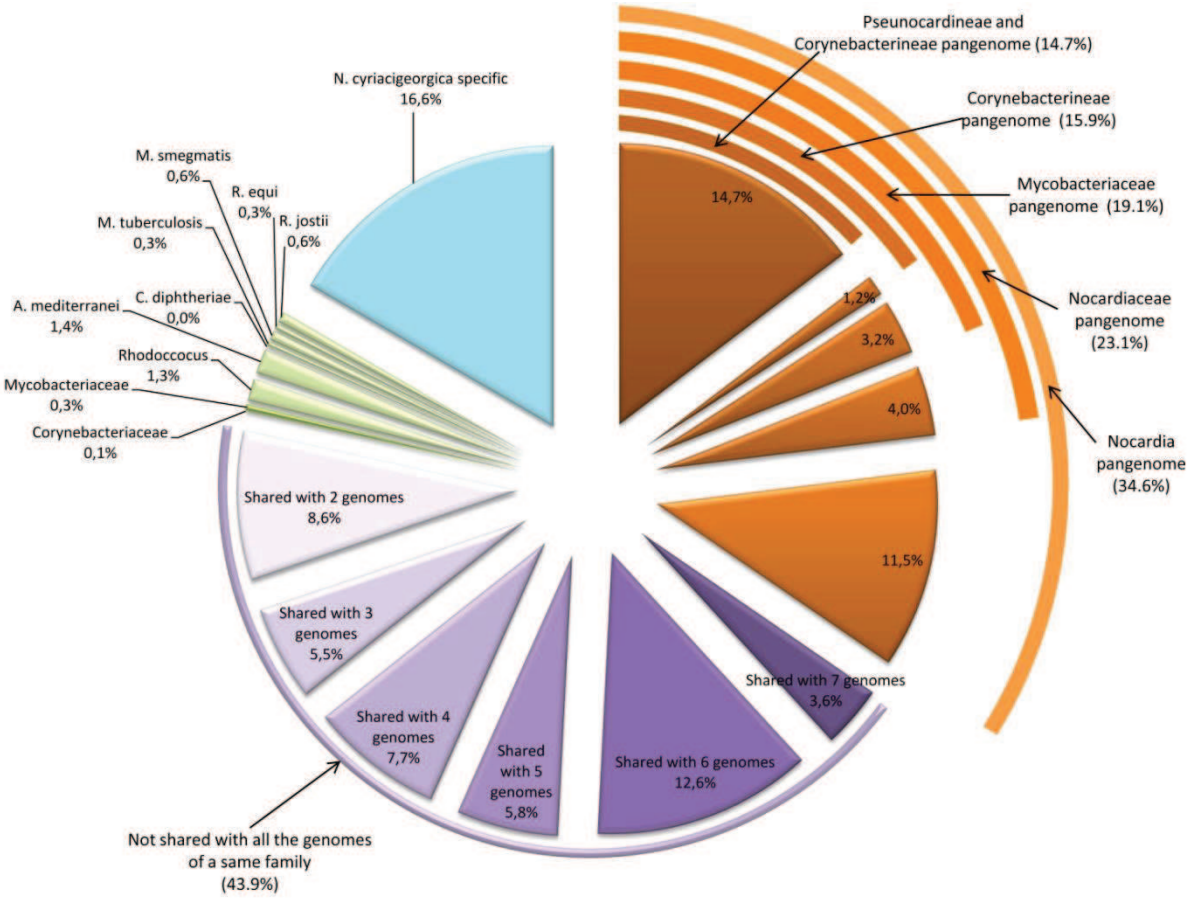


Figure 4: *N. cyriacigeorgica* genes shared with compared Actinobacteria. Orange indicates genes belong to pangenomes, purple shows genes shared by two to seven members of different families, green shows genes shared with one genome and blue indicates *N. cyriacigeorgica* specific genes.

COGs of DNA/AA sequences have been defined and used to infer trends among bacterial genomes regarding an amplification of particular functional potentials or genetic elements. Over the 5491 CDS of the *N. cyriacigeorgica* genome, 4016 CDS (i. e. 73%) belong to these COGs. The proportion of these COGs among Actinobacteria was similar with slightly higher occurrences of CDS among the "transcription" (K) and "signal transduction" (T) COGs in the *Nocardia* genomes (Supplementary Table SI). Correspondence analysis of the number of CDS per COG among a set of actinobacterial species was performed with the idea of testing a possible bias related to the pathogenic nature of the species. This analysis showed that numbers of CDS per COG could differentiate primary pathogens from non-pathogens. This "pathogen effect" was apparently stronger on the dataset than the genus effect. In fact, all non-pathogens had a closer COG signature even though some of the tested species were part of the same genus as those of the tested pathogens. COG numbers of the *Nocardia* genomes were found similar to the ones of non-pathogens (Fig. 5A). A correspondence analysis of the CDS from the transcription COG by considering its sub-divisions according to particular domains was further performed (Fig. 5B). This analysis did not separate the dataset according to the pathogenic nature of the species. Numbers of CDS per sub-division of this COG were found similar between the *Nocardia* genomes and similar to those observed among *M. tuberculosis*.

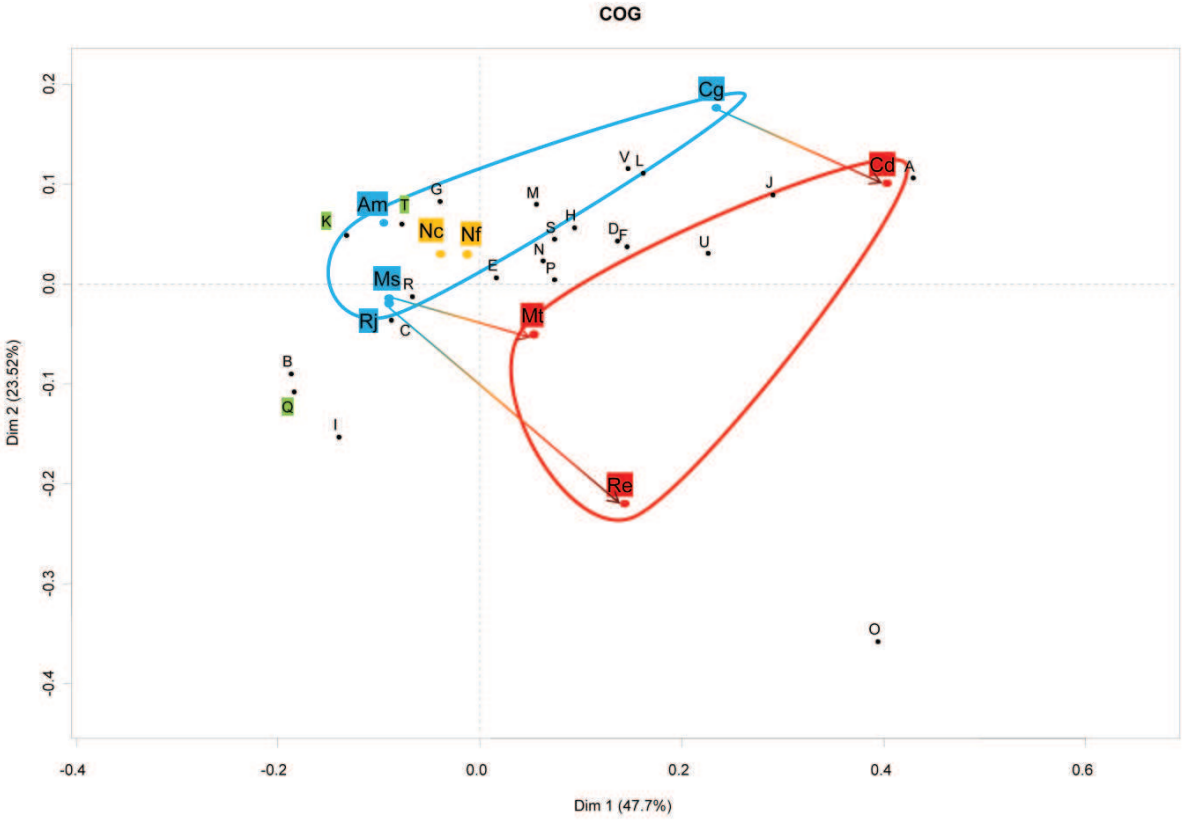


Figure 5A: Correspondence Analysis of COGs abundance retrieved in (Am) *A. mediterranei*, (Cd) *C. diphtheriae*, (Cg) *C. glutamicum*, (Mt) *M. tuberculosis*, (Ms) *M. smegmatis*, (Nc) *N. cyriacigeorgica*, (Nf) *N. farcinica*, (Re), *R. equi* (Rj), *R. jostii*. In red are the pathogens, in blue are the non pathogens or saprophytic bacteria and in orange are the *Nocardia*. COGs list: (A) RNA processing and modification, (B) Chromatin structure and dynamics, (C) Energy production and conversion, (D) Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning, (E) Amino acid transport and metabolism, (F) Nucleotide transport and metabolism, (G) Carbohydrate transport and metabolism, (H) Coenzyme transport and metabolism, (I) Lipid transport and metabolism, (J) Translation, ribosomal structure and biogenesis, (K) Transcription, (L) Replication, recombination and repair, (M) Cell wall/membrane/envelope biogenesis, (N) Cell motility, (O) Posttranslational modification, protein turnover, chaperones, (P) Inorganic ion transport and metabolism, (Q) Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism, (R) General function prediction only, (S) Function unknown, (T) Signal transduction mechanisms, (U) Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport, (V) Defense mechanisms

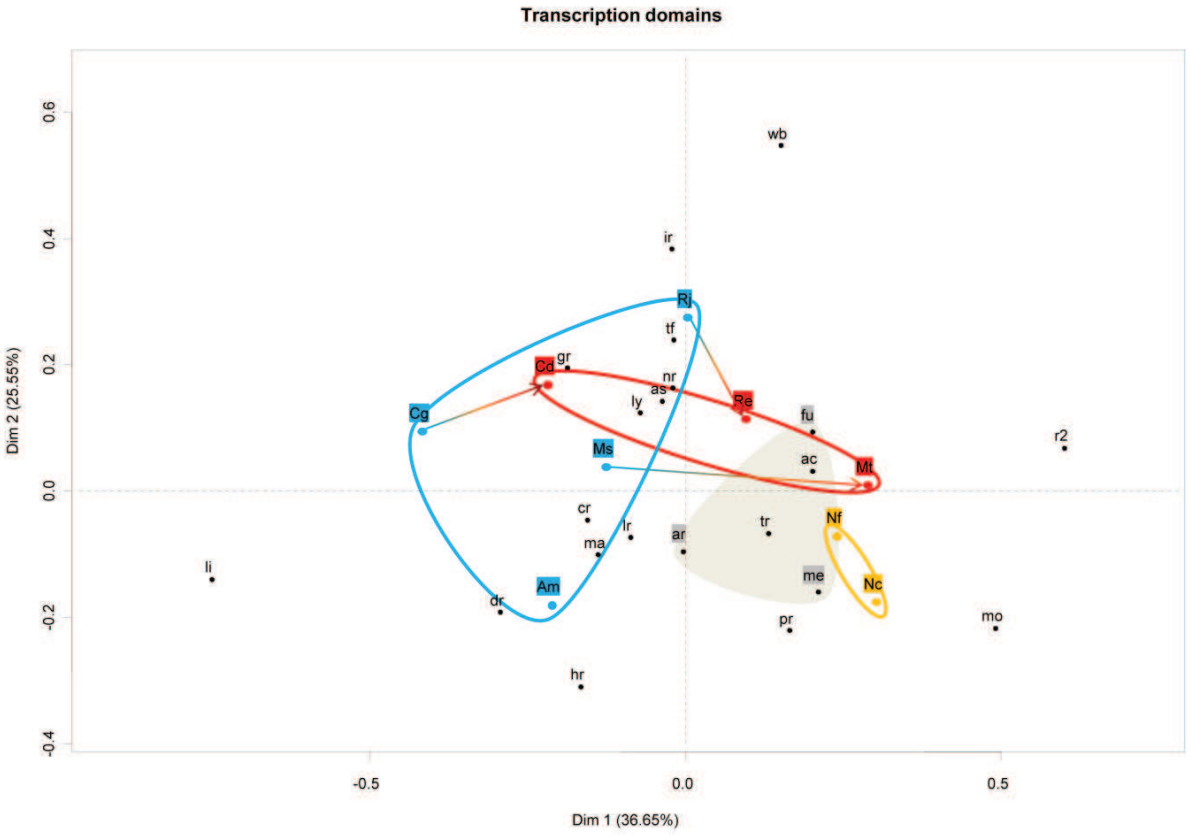


Figure 5B: Correspondence Analysis of transcription domains abundance retrieved in (Am) *A. mediterranei*, (Cd) *C. diphtheriae*, (Cg) *C. glutamicum*, (Mt) *M. tuberculosis*, (Ms) *M. smegmatis*, (Nc) *N. cyriacigeorgica*, (Nf) *N. farcinica*, (Re), *R. equi* (Rj) *R. jostii*. In red are the pathogens, in blue are the non pathogens or saprophytic bacteria and in orange are the *Nocardia*. Transcription domains list: (ab) AbrB, (ac) AraC, (ar) ArsR, (as) AsnC, (cr) Crp, (dr) DeoR, (fu) Fur, (gr) GntR, (hr) HxlR, (ir) IclR, (li) LacI, (lr) LuxR, (ly) LysR, (ma) MarR, (me) MerR, (mo) MoxR, (nr) NrdR, (pr) PadR, (r2) Rrf2, (tf) CarD/TRCF, (tr) TetR, (wb) WhiB.

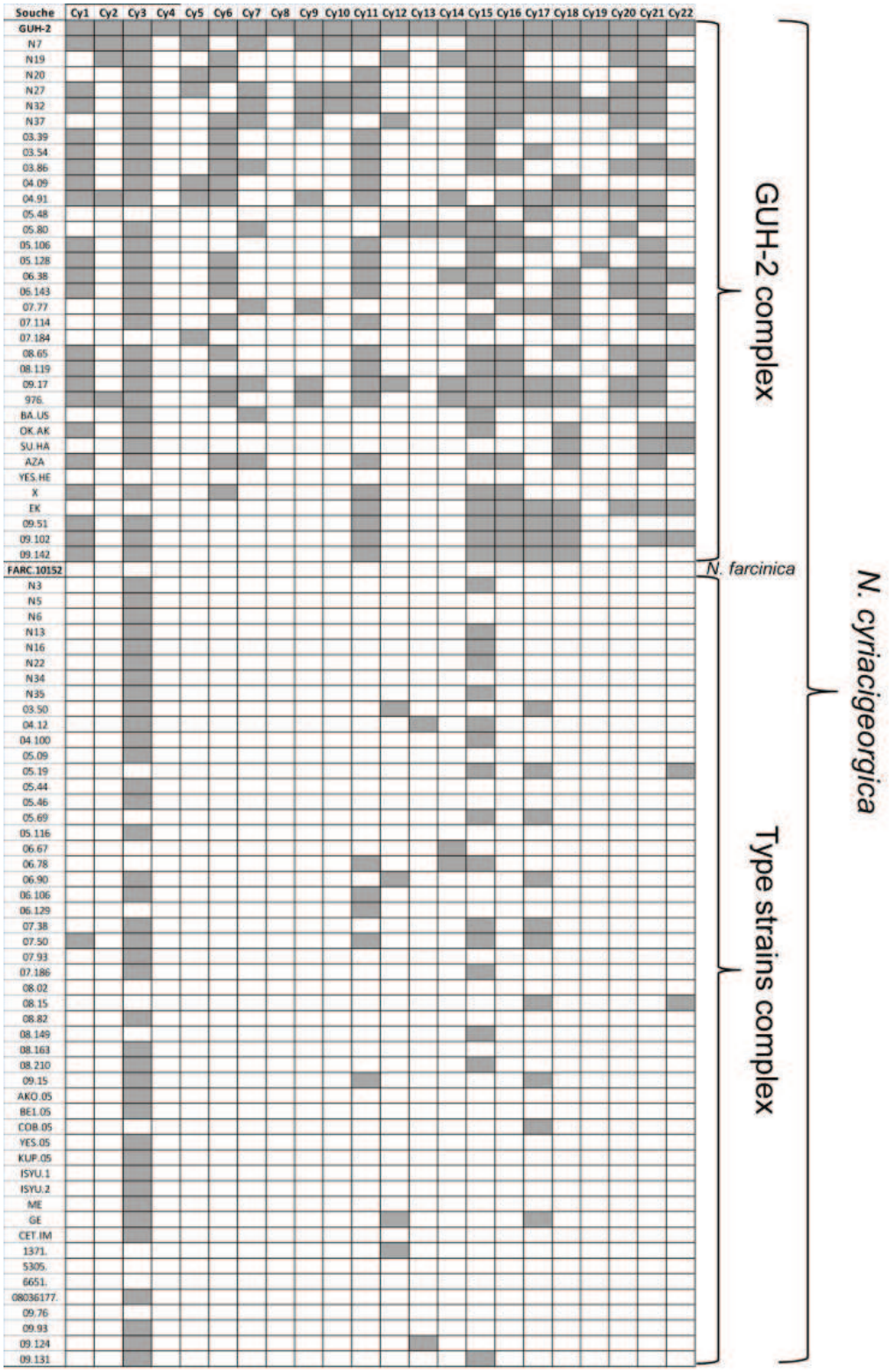
Table III: Genomics islands (GI) (named GI-Cy#) found in *N. cyriacigeorgica* by comparison with *N. farcinica*.

GI	GI position	Virulence gene (in or around GI)	ORF begin	ORF end	Length (kb)	Nb. of genes	Gene class	Putative role of GI	tRNA
GI-Cy1	61471..73200		*nocyr_0048*	*nocyr_0063*	11.7	14	Unknown	Unknown	0
GI-Cy2	213775..239600		*nocyr_0182*	*nocyr_0205*	25.8	21	Enzymes, transporters, histidine degradation, CSP	Unknown	3
GI-Cy3	343550..357558	*nocyr_0300*	*nocyr_0300*	*nocyr_0309*	14	10	Enzymes, regulators, transporters, catalase	Adaptation to atypical conditions	1
GI-Cy4	387100..424100		*nocyr_0340*	*nocyr_0383*	37	43	Recombinase, integrase, topisomerase, ADN pol III, cadmium inductible protein	Plasticity, adaptation	1
GI-Cy5	512800..526200		*nocyr_0472*	*nocyr_0488*	13.4	17	regulators, transporters	Unknown	0
GI-Cy6	594300..599228	0547→0555 0566→0567	*nocyr_0557*	*nocyr_0561*	4.9	5	Regulators, **ISNcy5**	Plasticity	1
GI-Cy7	1045000..1055000		*nocyr_0920*	*nocyr_0925*	10	6	Unknown	Unknown	1
GI-Cy8	1098658..1109690		*nocyr_0967*	*nocyr_0978*	11.3	11	Integrase, endoribonuclease	Plasticity	0
GI-Cy9	1480355..1548800		*nocyr_1341*	*nocyr_1391*	69.3	51	Enzymes, regulators, mycosin	Virulence	2
GI-Cy10	1937100..2016932	*nocyr_1792*	*nocyr_1739*	*nocyr_1800*	79.8	68	Enzymes, regulators, C31 phage resistance genes	Defense	1
GI-Cy11	2164650..2173100		*nocyr_1932*	*nocyr_1940*	8.4	9	Unknown	Unknown	0
GI-Cy12	2273150..2315500		*nocyr_2044*	*nocyr_2082*	42.4	36	Enzymes, transporters, regulators, integrases	Plasticity	1
GI-Cy13	3131000..3204200		*nocyr_2827*	*nocyr_2884*	73.2	58	Enzymes, regulators, **ISNcy2-b**, **ISNcy4**, integrases, PBP	Plasticity, adaptation	0
GI-Cy14	3265400..3337600		*nocyr_2933*	*nocyr_2985*	72.2	61	Enzymes, Nitrate reduction/expulsion, **ISNcy1-d**, regulators, recombinase	Nitrite/Nitrate metabolism, plasticity	1
GI-Cy15	4299671..4308500		*nocyr_3906*	*nocyr_3911*	8.8	6	Cobalamin and citrate metabolism	Vit B12, energy metabolism	0
GI-Cy16	4339344..4363500		*nocyr_3940*	*nocyr_3962*	24.2	23	Enzymes, regulators, limonene-momooxygenase	Unknown, Adaptation	0
GI-Cy17	4409577..4447497		*nocyr_4002*	*nocyr_4035*	37.9	34	Enzymes, regulators, transporters	Unknown	0
GI-Cy18	4523400..4592400	*nocyr_4112, nocyr_4128*	*nocyr_4097*	*nocyr_4162*	69	66	Enzymes, regulators, NRPS, transporters, fatty acid synthesis, spermidin, sigma factor, DHB	Fatty acid and peptide synthesis, adaptation, virulence, plasticity	1
GI-Cy19	5338862..5361100		*nocyr_4801*	*nocyr_4818*	22.2	14	Enzymes, regulators	Unknown, vitamine métabolism	0
GI-Cy20	5611900..5622135		*nocyr_5027*	*nocyr_5036*	10.2	10	Unknown	Unknown	0
GI-Cy21	5720300..5758400	*nocyr_5135, nocyr_5136*	*nocyr_5133*	*nocyr_5170*	38.1	38	Enzymes, transporters, regulators, sulfur metabolism	Energy metabolism, virulence, adaptation	0
GI-Cy22	5992000..6012890		*nocyr_5383*	*nocyr_5404*	20.9	21	Enzymes	Unknown	0

VII.3 Regions of genomic plasticity

A lineplot graph between *N. farcinica* and *N. cyriacigeorgica* genomes, representing identities between DNA sequences, was performed in order to visualize the repartition of variable and conserved regions between their genomes (Fig. 2). This analysis shows the number of conserved CDSs between these chromosomes to increase towards their respective origin. The lowest concentration of these CDSs was observed around the chromosomal terminus of replication. Overall, the organization of these variations was quite similar between the two halves of the circular chromosome creating a mirror-like effect indicative of increasing evolutionary constraints from the terminus towards the origin of replication (on both strand). The chromosomal terminus is partially visible on the circular map of *N. cyriacigeorgica* genome and shows a large segment with a distinct G+C content according to the GC plot (Fig. 1). The Artemis Comparison Tool (ACT) was used to refine these analyses and identify DNA segments >4.5 kb or containing more than 5 CDS. These DNA regions were termed GI for simplicity even though they were not all showing features such as tRNA and integrase genes or a G+C bias distinct from the one of the genome. 22 GIs could be detected using this approach (named GI-Cy#) (Table III). 21 of these GI are also detected with the *RGPfinder* tool of MaGe plateform. GI-Cy6 was not considered due to its length 4.9 kb). Of these, four are genomic islets (<10 kb), and the largest GI is about 80 kb. These GIs represent a total of 704 kb i.e. 11.4% of the genome and encode 622 CDS. The average G+C% content of these GI is of 65.5%, with values going from 60.1% to 68.6%.GIs boundaries were analyzed. tRNA or tmRNA genes are detected at the extremity of ten of the reported GIs. Direct repeats were observed for the GI-Cy8 at positions 1098658 to 1098672 for left hand and 1109676 to 1109690 for right hand. Four GIs showed IS sequences. Five GIs contain genes implicated in DNA modification processes such as integrase, recombinase, endonuclease and excisionase. These genes were probably involved in the acquisition of these GIs. Ten GIs did not show any of the above features. Most CDS on these GIs encode putative proteins, enzymes and transcriptional regulators of unknown function (74%). Some CDS, likely representing a benefit for GUH-2, could be identified: *katA* (GI-Cy3), limonene monooxygenase (GI-Cy16), sulfonate ABC transporter (GI-Cy21). CDS likely involved in nitrate metabolism are carried by GI-Cy14. A cobalamin-independent methionine synthase (*metE*) and three genes involved in citrate metabolism are found on GI-Cy15 while *pglY* and *pglZ* involved in phage defense are found on Cy10 (Table III).

Table IV: Genomics islands (GI) (named GI-Cy#) found in *N. cyriacigeorgica* by comparison with *N. farcinica*.



To evaluate the significance and time of acquisition of the above GIs, PCR screenings were defined for each GI and used on total DNA extracts of 86 *N. cyriacigeorgica* strains (Table IV). Prevalence of these GIs was quite variable going from strains (DNA extracts) showing no positive PCR products for any of these GIs to a 69% maximal occurrence of these GIs among another strain. GI-Cy4 and GI-Cy-8 were found restricted to the GUH-2 genome but show all the features of mobile elements. The GI PCR screenings divided the strains into two groups: one grouping strains sharing 5 or more GIs with GUH-2, and named the "GUH-2 complex" (31 strains); and one grouping strains sharing 5 or less GIs with GUH-2 and named the "type strain complex" (55 strains). Among the "GUH-2 complex", some GIs were highly prevalent: GI-Cy1 (23 positive strains), GI-Cy6 (18), GI-Cy11 (25), GI-Cy15 (29), GI-Cy16 (23), GI-Cy18 (20), and GI-Cy21 (26). Strain N7 harbored the highest number of GIs found in GUH-2 (15/22 positive PCR products). Among the "type strain complex", GI- Cy2, -Cy5, -Cy6, -Cy7, -Cy9, -Cy10, -Cy16, -Cy18, -Cy19, -Cy20, and -Cy21 were not recorded. No GI seems to be representative for this complex and GI-Cy15 and GI-Cy17 were the most prevalent. GI-Cy3 was widely distributed among all strains tested (69 positive strains) suggesting an early acquisition by the radiating *N. cyriacigeorgica* mother clone. PCR screenings targeting the left and right hands of GIs were defined to estimate the level of conservation of the islands. The left (L) and right (R) hands of GI-Cy9, -Cy15, and -Cy16 were largely detected whereas only one hand could be detected for GI-Cy2 (R), -Cy3 (L), -Cy4 (R), -Cy7 (R), -Cy11 (R), -Cy17 (R), -Cy18 (L), -Cy19 (R), -Cy20 (L), -Cy21 (L), and -Cy22 (R) among all strains tested. The L and R hands of the GI-Cy5, Cy6, Cy10, and Cy11 were detected among the "GUH-2 complex" and the hands of GI-Cy1 (L), -Cy3 (R), -Cy7 (L), -Cy11 (L), -Cy13 (L), -Cy20 (R), -Cy21 (R) were detected among the "GUH-2 complex" (data not shown).

Cladograms were constructed on the basis of positives and negatives GIs PCR results (Fig. 6). Dataset of inner GIs and GIs-hands were analyzed separately or altogether and gave the same results. All strains harboring 5 or more GIs were regrouped in a same clade: the "GUH-2 complex". Other strains showed a second well defined clade: the "type strain complex". Three strains (indicated by * on the figure 6) were moved from one clade to another depending on the dataset used. They harbor 3 to 5 GIs so are on the limit to each group. This analysis confirmed the split of *N. cyriacigeorgica* in two complexes even if the delimitation of the complexes has to be improved.

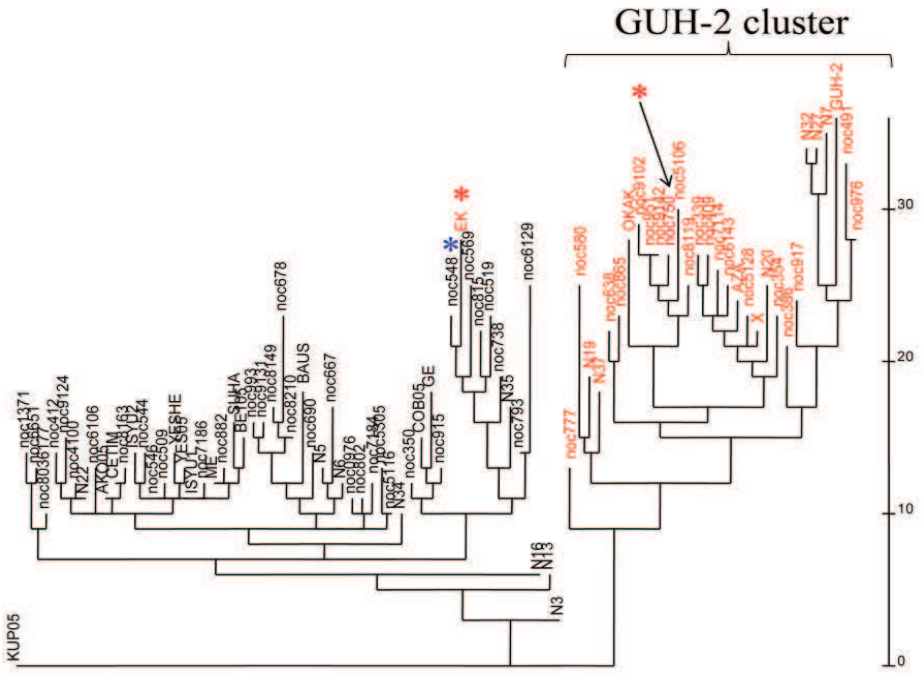


Figure 6: Cladogram illustrating the distribution of the three markers of the 22 GIs among the strains studied. Red colored strains harbor 5 or more GIs and black strains harbor less than 5 GIs. "*" indicates strains moving from one clade to another depending on the dataset used. The scale shows the numbers of PCR positive signal diversion.

GIs represent gains in CDS and bacterial properties but gene losses can also affect metabolic potentials. These gene losses were thus investigated. 193 CDS were apparently lost by *N. cyriacigeorgica* GUH-2 according to the *N. farcinica* genomic content. Among them, 35% encodes putative proteins of unknown function but four clusters of genes lost by GUH-2 and likely involved in particular functions were identified: 3 CDS involved in glutamine metabolism; 10 CDS involved in phenyl acid acetic degradation; four CDS involved in thiocyanate degradation and nitrogen metabolism; and 4 CDS involved in urease synthesis (4 genes) (Table II).

VIII. The particular case of Insertion sequences (IS)

Among *N. cyriacigeorgica* genome, eleven IS were detected and found to belong to five families (IS*3*, IS*21*, IS*200*, IS*256* and IS*NCY*) whereas the *N. farcinica* genome was found to harbor fifteen IS also belonging to five families but not from all the same ones (IS*3*, IS*5*, IS*200*, IS*481*, and IS*630*) (Table VI). Only ISNfa14 and ISNcy8 of the IS*3* family were considered as orthologs. They were found to share 86% nucleic acid identity and were found at the same genomic locus. *N cyriacigeorgica* genome showed DNA signatures of two Tn*3* transposons including one incomplete element. *N. farcinica* genome also showed the presence of a Tn*3* in which transposase coding sequence shared 85% nucleic acid identity with the one of transposon 2 of *N. cyriacigeorgica*. Inverted repeats (IR) and / or direct repeats (DR) were found for five *N. cyriacigeorgica* IS and for three *N. farcinica* IS. ISNcy2 found in three copies (two sharing 100% and one sharing 82% nucleic acid identity) in *N. cyriacigeorgica* genome were similar to IS987 (75% nucleic acid identity) which was only observed among *M. tuberculosis* and *M. bovis* genomes. *N. cyriacigeorgica* harbors also ISNcy1 which is present in three strictly identical allelic copies and a fragment one. Three IS present several allelic copies in *N. farcinica*: ISNfa1 of the IS*481* family is found in two copies with 99% nucleic acid identity, ISNfa2 of IS*5* family is found in height copies from 72% to 99% nucleic acid identity, and a fragmented copy of ISNfap1 of the Tn*3* family showing 85% nucleic acid identity was found on the larger plasmid.

The distribution of 6 IS/Tn elements among a sub-set (n=18) of the *N. cyriacigeorgica* strains screened in the GI section, a set (n=11) of *N. farcinica* strains, and among some of *Nocardia* species type strains (n=12), was investigated (Table V). Only ISNcy4 (Tn*3*) and ISNfa2 (IS*427* of the IS*5* family) were detected among *N. cyriacigeorgica* and *N. farcinica* but their prevalence was quite different from one species to another. In fact, both of these elements appeared more deeply related to *N. farcinica* than *N. cyriacigeorgica* evolutionary

Table V: Distribution of IS among *N. cyriacigeorgica* and *N. farcinica* isolates (PCR analyses), grey indicates positive results.

		Strain	ISNcy2-a	ISNcy3	ISNcy4	ISNfa1-a	ISNfa2-b	ISNfa5
N. cyriacigeorgica	GUH-2 complex	**GUH2**	■	■	■			
		N7	■					
		N27	■		■			
		03.86	■					
		04.91	■	■	■			
		06.38	■					
		09.17	■	■				
		976.	■	■				
		AZA	■	■				
		09.102	■	■				
	Type strain complex	**DSM 44484**						
		N13						
		04.12	■					
		05.69	■					
		07.93	■					
		08.02	■					
		09.131	■					
		AKO	■					
		BE1						
		1351.					■	
N. farcinica		**10152.**			■	■	■	■
		DSM 43665			■	■	■	■
		07.48			■		■	
		08.148						
		08.150			■		■	
		08..166			■		■	
		08.106			■		■	
		09.27			■		■	
		09.45			■		■	
		09.53			■		■	
		4037.			■		■	
		5596.			■		■	
Nocardia type strains		*N. abcsessus*						
		N. asteroides						
		N. brasiliensis						
		N. carnea						
		N. nova						
		N. otitidiscaviarum	■					
		N. paucivaurans						
		N. mexicana						
		N. tranvalensis						
		N. vinacea						

dynamics. ISNcy2 (IS*51* of the IS*3* family) was the most prevalent among *N. cyriacigeorgica* but was absent from the tested *N. farcinica* strains. Surprisingly, this ISNcy2 was also found among the *N. otitidiscaviarum* type strain. ISNcy3 was not detected in *N. farcinica* and its prevalence was higher among the GUH-2 complex of *N. cyriacigeorgica* which was defined while investigating GIs distribution (see section above). A similar situation was observed for ISNcy4. ISNcy2 and ISNcy3 were not detected among the *Nocardia* type strains that were tested suggesting a distribution restricted to *N. cyriacigeorgica*. ISNfa1 and ISNfa5 were not detected in *N. cyriacigeorgica* and appeared to have a distribution restricted to *N. farcinica* strain 10152. ISNcy4 (Tn*3*) and ISNfa1 (IS*481*) are similar (89% identity) and are retrieved in several strains of both genomes. The cladogram construction from IS PCR result showed a similar distribution of the strain among the two complexes. But the small proportion of IS studied limited the accuracy in the delimitation of each complexes (data not shown).

Virulence-related functions

Several genes are identified as virulence factors in Actinobacteria and in particular in *Mycobacterium*, being directly responsible for tissues and cell invasion. Blast and keyword-based searches allowed identification of these genes among the *N. cyriacigeorgica* genome. Six complete *mce* (mammalian cell entry) loci containing *yrbE* and *mas* (*mce* associated) genes were found in both *Nocardia* genomes. Cell wall components are often considered as virulence factors due to their proximity with the host cellular immune system. Among them antigen 85 family proteins (4 genes), lipoproteins (19 genes) and PE_PGRS/PPE family proteins (5 genes) were found. Two superoxide dismutase genes (*sod*) and three catalase genes were also identified. Nitrate reductase genes (*narBGHIJKY*, and *nirBD*), trehalose 6,6'-dimycolate transferase (one gene) and RuBisCO (2 genes) were clustered because they probably contribute to the ability of *N. cyriacigeorgica* to persist inside macrophages.

Extracellular enzymes can play part in virulence and were thus searched among the *Nocardia* genomes. These were identified by searching for particular domains including a peptide leader, and transmembrane domains. The inferred secretomes of the two *Nocardia* genomes were predicted to comprise mainly proteins of unknown function (from 58% to 70%), several proteases, lipases as well as a transcriptional regulator and members of *mce* genes (Table VII). Comparison of the CDS from the *N. cyriacigeorgica* and *N. farcinica* secretomes showed identities (between 81 to 86%), higher than those observed among the other CDS shared by these Actinobacteria (60%).

Table VI: IS of *N. cyriacigeorgica* and *N. farcinica* with IR and DR.

IS Name	Family - Group	IR left	IR right	Number of copies and DNA allelic % identity	DR	Taille
ISNcy1-a1	IS256	GGGAGTGTCTAATTAACGGCCGATCT	AGATCAGCCGTTAACTCGACACACCC		CTTGGCGA	1400
ISNcy1-a2	IS256	GGGAGTGTCTAATTAACGGCCGATCT	AGATCAGCCGTTAACTCGACACACCC	4 copies with 100 % identities	none	1384
ISNcy1-a3	IS256	GGGAGTGTCTAATTAACGGCCGATCT	AGATCAGCCGTTAACTCGACACACCC		G	1386
ISNcy1-a4 (fragment)	IS256	none	AGATCAGCCGTTAACTGGACACACCC		none	512
ISNcy2-a1	IS3 - IS51	TGAATCCCCCCGGCGATTCCGGAGCC	GTCTCCGGACATGCCGGGGGGATTCA	3 copies from 82 to 100 % identities	C	1343
ISNcy2-a2	IS3 - IS51	TGAATCCCCCCGGCGATTCCGGAGCC	GTCTCCGGACATGCCGGGGGGATTCA		CTCG	1349
ISNcy2-b	IS3 - IS51	TGAATCCCCCGGCATGTCCGGAGCC	GTCTCCGGACTCACCGGGGCGATTCA		CCCG	1350
ISNcy3	Tn3	GGGGTTCCGGTAGTAACCGCCGAAGAATCAACGGATATGGCGTAGC	GCTACGCCATATCCGTTGGTTTTTCGGCGGTTACTACCGGAACCCC		AG	2166
ISNcy4	Tn3	CGGGGTCGCCGTAGTATCGGCCGATTTTCGGGCGGATATGGCGTA	TACGCCATATCCGCCCGAAATTCGGCCGATACTACGGCGACCCCG		ACC	6178
ISNcy5	IS200/IS605 - IS608	none	none		none	375
ISNcy6	IS200/IS605 - IS1341	none	none		none	1143
ISNcy7	ISNCY	none	none		none	1005
ISNcy8	IS3 - IS51	none	none		none	309
ISNcy9	ISNCY	none	none		none	534
ISNcy10	IS21	none	none		none	207
ISNcy11	ISNCY	CGGCCAACATCGAAGTACACAAC	GTTCTGTAGCTCGGTACCTGCCG		none	906
ISNfa1-a	IS481	TGTTGCGGGTCGTGACGTTGGTGACGCGGTGGCGGTGGTGAGCTGAGGGC	ACCAGCCAGCCGCCTCCACACCGGCGTCACCAACGTCACGGCCTCATACA	2 copies with 99 % identities	none	1112
ISNfa1-b	IS481	TGTTGCGGGTCGTGACGTTGGTGACGCGGTGGCGGTGGTGAGCTGAGGGC	ACCAGCCAGCCGCCTCCACACCGGCGTCACCAACGTCACGGCCTCATACA		none	1113
ISNfa2-a	IS5 - IS427	CTAGGCGGTGTCTCGAAGTAG	CTACTTCGAGACACCGCCTAG		none	1048
ISNfa2-b	IS5 - IS427	CTAGGCAGTGTCTCGAAGTAG	CTACTTCGAGACACCGCCTAG		none	1048
ISNfa2-c	IS5 - IS427	none	none		none	906
ISNfa2-d	IS5 - IS427	CTAGGCGGTGTCTCGAAGTAG	CTACTTCGAGACACCGCCTAG	8 copies from 72 to 99 % identities	none	1048
ISNfa2-e	IS5 - IS427	CTAGGCGGTGTCTCGAAGTAG	CTACTTCGAGACACCGCCTAG		none	1048
ISNfa2-f	IS5 - IS427	CTAGGCAGTGTCTCGAAGTAG	CTACTTCGAGACACCGCCTAG		none	1048
ISNfa2-g	IS5 - IS427	CCTAGGCGGTGTCTCGAAGTAG	CTACTTCGAGACACCGCCTAGG		none	1051
ISNfa2-h	IS5 - IS427	CTAGGCAGTGTCTCGAAGTAG	CTACTTCGAGACACCGCCTAG		none	1048
ISNfa3	IS5 - IS427	none	none		none	411
ISNfa4	IS200/IS605	none	none		none	1221
ISNfa5	IS200/IS605	none	none		none	1146
ISNfa6	IS5 - IS427	none	none		none	321
ISNfa7	IS481	none	none		none	1032
ISNfa8	IS630	CCTAGTGCCGCG	CGCGGCACTAGG		none	1199
ISNfa9	IS3 -IS3	none	none		none	366
ISNfa10	IS3 - IS407	none	none		none	246
ISNfa11	IS3 -IS3	none	none		none	255
ISNfa12	IS3 -IS3	none	none		none	928
ISNfa13	IS3 -IS3	none	none		none	351
ISNfa14	IS3 - IS51	none	none		none	309
ISNfa15	IS5 - IS427	none	none		none	1107
ISNfap1-a	Tn3	GGGGTAGCCGTAGCATCCGCCGAAAATCAGGCGGATATGGCGT	ACGCCATATCCGCCCGATTTTCGGCAAATGCTACGGCTACCCC	2 copies with 85 % identities	none	7260
ISNfap1-b (fragment)	Tn3	none	none		none	696
ISNfap2	IS3 - IS51	none	none		none	234

The GUH-2 genome shows a good potential for the synthesis of a number of chemical compounds that could have various functions like acting as antimicrobials or inhibitors of particular complexes such as the proteasome. 12 CDS were predicted to encode polyketides synthases (PKSs), and 22 CDS predicted to encode NRPSs. Among these, 4 PKSs and 15 NRPSs were found in the *N. farcinica* genome including the cluster previously described as producing a lipid-soluble, iron-binding nocobactin. *nocyr_4800* was found to be the longest CDS of the genome (43689 pb) and to likely encode a NRPS with twelve modules and so a production of a putative metabolite containing twelve peptidic substrates. Two other operons of NRPS containing two and three genes that could produce molecule containing thirteen and eleven building blocks respectively were also found.

It is noteworthy that a correlation was observed between the isoelectric point and the molecular weight of the inferred proteins of the GUH-2 genome. The largest proteins of the genome, constituted principally by NRPS and PKS, showed similar isoelectric points, suggesting a compartmentalization inside the cytosol in order to allow operation of these enzymes.

Table VII: Ranking of CDS retrieved in secretome of studied genomes.

	Occurrence (%)								
	Nc	**Nf**	**Re**	**Rj**	**Mt**	**Ms**	**Cd**	**Cg**	**Am**
SP>0,5 Tmm<3	263 (4,79)	281 (4,70)	256 (5,00)	249 (3,16)	184 (4,13)	326 (4,38)	139 (5,58)	129 (4,12)	621 (6,22)
Cellular process and signaling	53 (20,15)	70 (24,91)	58 (22,66)	74 (29,72)	41 (22,28)	74 (22,70)	34 (24,46)	33 (25,58)	125 (20,13)
Information storage and processing	2 (0,76)	4 (1,42)	3 (1,17)	3 (1,20)	5 (2,72)	3 (0,92)	2 (1,44)	1 (0,78)	8 (1,29)
Metabolism	51 (19,39)	47 (16,73)	51 (19,92)	66 (26,51)	38 (20,65)	77 (23,62)	15 (10,79)	21 (16,28)	147 (23,67)
Poorly characterized	49 (18,63)	45 (16,01)	42 (16,41)	53 (21,29)	27 (14,67)	34 (10,43)	9 (6,47)	27 (20,93)	66 (10,63)
all COG	127 (48,29)	137 (48,75)	132 (51,56)	157 (63,05)	92 (50,00)	158 (48,47)	57 (41,01)	70 (54,26)	298 (47,99)
Hypothetical	185 (70,34)	189 (67,26)	166 (64,84)	145 (58,23)	119 (64,67)	202 (61,96)	91 (65,47)	86 (66,67)	389 (62,64)
Nb gene	5491	5984	5124	7872	4454	7449	2491	3128	9988

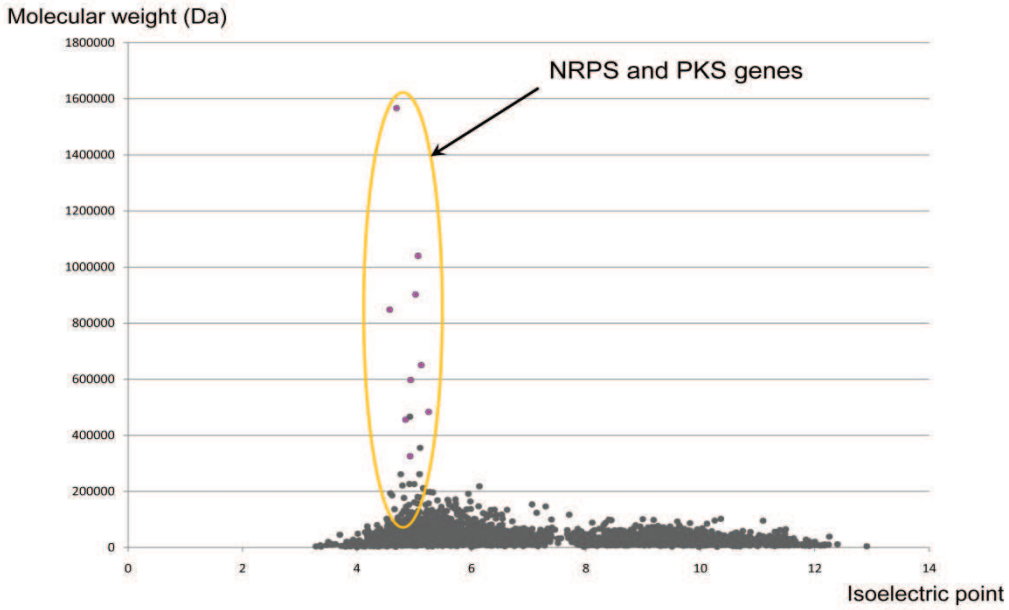


Figure 7: Relation between molecular weight and isolectric point from *N. cyriacigeorgica* genes. NRPS and PKS are regrouped around 4.7.

VIII.1 Genetic potentials and metabolic profiling

Phenotypic microarray datasets and the *N. cyriacigeorgica* antibiotic resistance profile were compared with the genetic potentialities of the GUH-2 genome and inferred activities. Phenotypic profiling was performed by testing *N. cyriacigeorgica* ability to grow with various carbon and nitrogen sources. Genes putatively involved in first step of substrate catabolism reaction were found when a bacterial growth is observed (Table VIII). On the other side substrate specific transporters were found but there remain cases where the transporters remain unknown. In *N. cyriacigeorgica* genome there is several ABC transporters of unknown function that could fill that role. The results obtained with all amino acids show that only seven can be used as carbon and/or nitrogen source. The absence of specific genes putatively implicated in substrate catabolism or transport by *in silico* analysis explains the negative *in vivo* results. It remains L-aspartic acid, L-lysine and L-proline where all genes seem to be present without *in vivo* growth observed. A misannotation or a lack of gene(s) necessary to finalize degradation steps could justify these conflicting results.

The osmoadaptation capacity was also evaluated. *N. cyriacigeorgica* was able to grow on high salinity concentration certainly due to his ability to transport and/or synthesize osmoprotectant like ectoine and betaine (Table VIII).

The resistance pattern determined by plate assays shows that *N. cyriacigeorgica* GUH-2 is a member of the *N. asteroides* drug pattern type VI, being resistant to several sulfonamides, aminoglycosides, tetracyclines and penicillins antibiotics classes and sensitive to cefamandole, cefotaxime, amikacin, and imipenem. Many CDS likely to play part in these antibiotic resistances were found in the *N. cyriacigeorgica* chromosome. The gyrase A was responsible for ciprofloxacine resistance. Twelve β lactamases are probably responsible for ampicillin, carbenicillin, oxacillin and penicillin resistance. The resistance to paromomycin and tobramycin can certainly be imputed to the three aminoglycoside phosphotransferases. The six ribosomal RNA methyltransferase could be implicated in macrolides resistance. The fourteen drug or multidrug efflux transporters found together with non identified genes have certainly a role in tetracycline, penimepicycline, polymyxin B, paromomycin, D,L-serine hydroxamate, sisomicin, sulfamethazine, novobiocin and sulfadiazine resistance (data not shown).

Table VIII: *In vivo* results and *in silico* predictions of the phenotypic features of carbon, nitrogen sources and osmolites resistance

Carbon substrate	***(in vivo/in silico)***	***Transport reaction***	***Catabolism reaction***	
			Function	***Gene***
α-D-Glucose	(+/+)	nocyr_3162	Glucokinase	nocyr_3654
			Isocitrate dehydrogenase	nocyr_0982, nocyr_2095
α-Keto-Glutaric Acid	(+/+)	nocyr_0877	Glutamate synthase	nocyr_0046, nocyr_0047
			Alpha-ketoglutarate decarboxylase	nocyr_4437
Acetic Acid	(+/+)	nocyr_1905, nocyr_1906	Acetyl-CoA synthetase	nocyr_0331, nocyr_4359
D-Fructose	(+/+)	nocyr_2500, nocyr_5425	Fructose-1-phosphate kinase	nocyr_2208
			6-phosphofructokinase	nocyr_3974
			Ribose-5-phosphate isomerase B	nocyr_1338
D-Ribose	(+/+)	nocyr_2500, nocyr_5425	Putative ADP-ribose pyrophosphatase	nocyr_2198
			Tkt transketolase	nocyr_3442
			Ribose-phosphate pyrophosphokinase	nocyr_4668
D-Xylose	(+/+)	nocyr_2500, nocyr_5425	Putative Xylose isomerase	nocyr_4986
Glycerol	(+/+)	nocyr_3162	Glycerol kinase	nocyr_1036, nocyr_2754, nocyr_2756
L-Asparagine	(-/-)	nocyr_1382	L-asparaginase	not found
L-Glutamic Acid	(+/+)	nocyr_2070, nocyr_3715, nocyr_3716, nocyr_3717, nocyr_3718, nocyr_5421	Glutamine synthetase	nocyr_1738, nocyr_0204, nocyr_1317, nocyr_1380, novyr_2699, nocyr_2801, nocyr_1419
L-Glutamine	(+/+)	nocyr_2070	L-glutamine:D-fructose-6-phosphate amidotransferase	nocyr_0927
L-Lyxose	(+/-)	nocyr_2500, nocyr_5425	Aldolase	not found
L-Proline	(-/+)	nocyr_1907, nocyr_4096	Proline dehydrogenase	nocyr_4495
			pyrroline-5-carboxylate reductase	nocyr_4984
L-Serine	(-/-)	not found	Serine 3-dehydrogenase	nocyr_4997
L-Threonine	(-/-)	not found	threonine dehydratase	nocyr_1314, nocyr_1923
Methyl Pyruvate	(+/+)	not found	Pyruvate dehydrogenase	nocyr_1090, nocyr_1091, nocyr_1668
			Pyruvate decarboxylase	nocyr_3109
			Pyruvate carboxylase	nocyr_2275, nocyr_3905
Mono Methyl Succinate	(+/+)	not found	Succinate dehydrogenase	nocyr_0402, nocyr_0491, nocyr_0982, nocyr_1011, nocyr_1012, nocyr_1013, nocyr_1014, nocyr_1614, nocyr_2457, nocyr_2526, nocyr_3221, nocyr_3762, nocyr_3787, nocyr_3994, nocyr_4767, nocyr_5495
Propionic Acid	(+/+)	not found	Fructose-1-phosphate kinase	nocyr_2208
			6-phosphofructokinase	nocyr_3974
Pyruvic Acid	(+/+)	not found	Pyruvate dehydrogenase/ decarboxylase/ carboxylase	nocyr_1090, nocyr_1091, nocyr_1668, nocyr_3109, nocyr_2275, nocyr_3905
Tween 20	(+/+)	not found	Lipase/esterase	nocyr_1901, nocyr_2297, nocyr_3023
Tween 40	(+/+)		Long-chain-fatty-acid-CoA ligase	nocyr_4443
Tween 80	(+/+)		Beta-ketoacyl-CoA thiolase	nocyr_2317, nocyr_4330

Nitrogen substrate	***(in vivo/in silico)***	***Transport reaction***	***Catabolism reaction***	
			Function	***Gene***
Ammonia	(+/+)	nocyr_3877, nocyr4095 ammonium	Glutamate-ammonia ligase	nocyr_1727, nocyr_3021
D,L-á-Amino-Caprylic Acid	(+/+)	not found	Amino-transferase, fatty-acid-CoA ligase, acyl-CoA-oxidase, Short chain enoyl-CoA hydratase, acetyl-CoA acetyltransferase	nocyr_1035, 5280, nocyr_1477, 1607, 2793, 4443, 4484, nocyr_2558, nocyr_0541, 3004
D-Mannosamine	(+/+)	not found	Amino-transferase	nocyr_1035, 5280
Glucuronamide	(+/+)	not found	Amidase	nocyr_0399, 1503, 2714, 5286
L-Asparagine	(+/-)	nocyr_1382	L-asparaginase	not found
L-Alanine	(-/-)		L-alanine dehydrogenase	nocyr_1677
L-Arginine	(-/-)		arginine deiminase	nocyr_4697
L-Asparagine	(+/-)	nocyr_1382	L-asparaginase	not found
L-Aspartic Acid	(+/+)	26 amino-acid transporters	Aspartate 1-decarboxylase	nocyr_0416
			Aspartate-semialdehyde dehydrogenase	nocyr_0297
			Putative aspartate aminotransferase	nocyr_0573, nocyr_2246
			L-aspartate oxidase	nocyr_1969, nocyr_4454
			Argininosuccinate synthase	nocyr_2162
			Adenylosuccinate synthase	nocyr 5220
L-Cysteine	(+/+)	26 amino-acid transporters	Putative cysteine dioxygenase	nocyr_0418
			Bifunctional phosphopantothenoylcysteine-decarboxylase/phosphopantothenate synthase	nocyr_3502
			Putative cysteine desulfurase	nocyr_0178, nocyr_0389, nocyr_3424, nocyr_4001
L-Glutamic Acid	(+/+)	nocyr_2070, nocyr_3715, nocyr_3716, nocyr_3717, nocyr_3718, nocyr_5421	Glutamine synthetase	nocyr_1738, nocyr_0204, nocyr_1317, nocyr_1380, novyr_2699, nocyr_2801, nocyr_1419
L-Glutamine	(+/+)	nocyr_2070	L-glutamine:D-fructose-6-phosphate amidotransferase	nocyr_0927
Glycine	(-/+)	nocyr_0719, nocyr_0720, nocyr_3173, nocyr_4096,	Glycine dehydrogenase	nocyr_2568
L-Histidine	(+/+)	nocyr_3160, nocyr_3162	Histidine ammonia-lyase	nocyr_0194 (cluster of histidine degradation)
L-Isoleucine	(-/-)	not found	leucine dehydrogenase	Not found
L-Leucine	(-/-)	not found	leucine dehydrogenase	Not found
L-Lysine	(-/+)	nocyr_2766	Orn/Lys/Arg decarboxylase	nocyr_2212
L-Methionine	(-/-)	not found	methionine decarboxylase	not found
L-Phenylalanine	(-/-)	not found	phenylalanine 4-monooxygenase	nocyr_1007
			4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase	nocyr_4865
L-Proline	(-/+)	nocyr_1907, nocyr_4096	Proline dehydrogenase	nocyr_4495
			pyrroline-5-carboxylate reductase	nocyr_4984
L-Serine	(-/-)	not found	Serine 3-dehydrogenase	nocyr_4997
L-Threonine	(-/-)	not found	threonine dehydratase	nocyr_1314, nocyr_1923
L-Tryptophan	(-/-)	not found	tryptophan α,β oxydase	not found
			tryptophan dehydrogenase	
L-Tyrosine	(+/+)	26 amino-acid transporters	Aspartate/tyrosine aminotransferase	nocyr_0634
L-Valine	(-/-)		Valine dehydrogenase	nocyr_1282
Nitrite	(+/+)	nocyr_2944, nocyr_4289, nocyr_4292	Nitrite reductase	nocyr_4287, nocyr_4288
Nitrate	(+/+)	nocyr_2944, nocyr_4289, nocyr_4292	Nitrate reductase	nocyr_2522, nocyr_2523, nocyr_2524, nocyr_2525, nocyr_2939, nocyr_2940, nocyr_2942, nocyr_2943, nocyr_3079, nocyr_4273, nocyr_4274, nocyr_4275, nocyr_4276, nocyr_4396, nocyr_4928
Urea	(+/-)	not found	Urease	not found
Uric Acid	(+/-)	not found	Urate oxidase	not found
Ala-Gln (-/+)	(+/+)	nocyr_0120	Amidase	nocyr_0399, 1503, 2714, 5286
Ala-His (-/+)	(+/+)		Dipeptidase	nocyr_0580, 4710
Gly-Asn (-/-)	(+/+)			
Gly-Gln (-/+)	(+/+)			
Gly-Met (-/-)	(+/+)			
Met-Ala (-/-)	(+/+)			
Ala-Glu (-/+)	(+/+)			
Gly-Glu (-/+)	(+/+)			

Osmolites	***(in vivo/in silico)***	***Transport and metabolism reaction***	
		Function	***Gene***
NaCl ≤ 6,5%	(+/+)	Ectoine/hydroxyectoine ABC transporter	nocyr_0721
Ammonium sulfate pH8 ≤ 100mM	(+/+)	Ectoine hydroxylase	nocyr_3186
Potassium chloride ≤ 6%	(+/+)	L-ectoine synthase	nocyr_3187
Sodium Lactate 1%	(+/+)	Glycine betaine transporter betP	nocyr_0720
Sodium Nitrate ≤ 100mM	(+/+)	High-affinity choline transport protein	nocyr_3118
Sodium Nitrite 10mM	(+/+)	Betaine aldehyde dehydrogenase (BADH)	nocyr_3119
Sodium Phosphate pH 7 ≤ 200mM	(+/+)	Choline oxidase	nocyr_3120
Sodium sulfate ≤ 5%	(+/+)	Glycine betaine transporter betP	nocyr_3173

IX. Discussion

Nocardia cyriacigeorgica is considered an opportunistic pathogen which can cause many infections including deadly brain abscesses and granulomatous diseases among immunocompromised and healthy individuals. However, the physiology of these diseases remains poorly understood. This paper describes the first *N. cyriacigeorgica* full genome sequence and presents a complete description of its specificities in regard to its plasticity, ability at acquiring novel DNA potentials, and also its content regarding virulence-related issues, antibiotic resistances and functions likely related to the outdoor cycle of this Actinobacteria. The analyses performed showed an important ability of this species at acquiring DNA even though no one has been able to genetically transform this Actinobacteria so far. This paper is a road map for several years of research on *Nocardia* biology.

Virulence issues

The *N. cyriacigeorgica* GUH-2 genome analyses revealed several genetic determinants related to virulence. Some of these were encoded by GIs but some were also part of the *Nocardia* or Actinobacteria pangenome inferred from comparisons with the full genome sequence of, respectively, *N. farcinica* or of the ones of other Actinobacteria. The genome of *N. cyriacigeorgica* harbors virulence-related CDS such as Mce proteins described as important virulence factors of *M. tuberculosis* (Arruda *et al.*, 1993). Mce can act as transmembrane transporters favoring macrophage invasion (Mohn *et al.*, 2008). These CDS are organized in operons containing two *yrbE* genes followed by six *mce* genes and sometimes two *mce* associated (*mas)* genes. There are six copies of the complete *mce* operon in *N. cyriacigeorgica* and *N. farcinica* whereas four copies are identified in *M. tuberculosis* genome. Although, the importance of these genes in *M. tuberculosis* virulence as been shown (Casali and Riley, 2007), their detection in multicopies among *M. smegmatis* and *R. jostii* (six and four clusters, respectively) suggest a function not limited to cell entry (Kumar *et al.*, 2005). Having access to the *N. cyriacigeorgica mce* genes will now allow the design of transcriptomic experiments attempting at identifying the *mce* genes which are turned on during host cell colonization.

Other *N. cyriacigeorgica* CDS than *mce* have been described as important in the infection and cell invasion processes. In fact, the expressions of superoxide dismutase and catalase genes were observed during *N. cyriacigeorgica* macrophage invasion and were suggested to be involved in resistance to oxidative stresses (Beaman and Beaman, 1994). Two *sod* and three *kat* genes were found in the *N. cyriacigeorgica* genome. *katA* is harbored by the GI-Cy3 genomic island but the other two kat genes are found on conserved genomic regions.

Other genes can also have a complementary action during nocardial growth in macrophages. The trehalose 6,6'-dimycolate transferase CDS was found related to mycolyltransferases 85 (Matsunaga *et al.*, 2008) that can promote *M. tuberculosis* survival in macrophages by decreasing both phagosomal acidification and phagolysosomal fusion (Spargo *et al.*, 1991; Tonge, 2000). An encoded *N. cyriacigeorgica* hemolysin which can disrupt the phagolysosome membrane was also recorded and could favor cytoplasmic growth (Emeruwa, 1986; Camp *et al.*, 2003). The isocitrate lyase CDS observed on GI-Cy15 could also be part of the *N. cyriacigeorgica* macrophage invasion process by preventing apoptosis as observed in *M. tuberculosis* (Li *et al.*, 2008). In addition of requiring defense mechanisms against macrophage antibacterial processes, an intracellular pathogen needs to be able to survive under low oxygen pressures as those observed in poorly irrigated tissues of the mammal body (Ishikawa *et al.*, 2004). Genes involved in such processes are thus also qualified as virulence-related determinants. RubisCO genes were observed in the *N. cyriacigeorgica* genome and could play part in this microaerophilic growth requirement. However, in this study, various attempts at growing the GUH-2 strain under anaerobic growth or autotrophic growth conditions failed (data not shown). *N. cyriacigeorgica* also contains denitrification genes (*narBGHIJKY*, and *nirBD*) of which five are harbored by GI-Cy14. *N. cyriacigeorgica* was initially described as an obligate aerobe but RubisCO and denitrifying genes suggest an ability at growing under anaerobic conditions. However, the conditions allowing a growth under low oxygen pressure remain to be defined.

Several metabolites, proteins, enzymes and lipids which are not directly involved in colonization but are at the frontline during host infection can also play a role in virulence such as the cell wall constituents and some extracellular enzymes/metabolites. The cell wall is a protection for bacteria but can also be a target for the immune system. For example, PE/PPE serine α/β hydrolases membrane proteins are important in *Mycobacterium* pathogens species to avoid detection or killing during their intracellular life in a variety of host cells (Stinear *et al.*, 2008; Sultana *et al.*, 2011). However, their low number in *N. cyriacigeorgica* and *N. farcinica* could be an effect of their opportunistic status (environmental cycle) and could explain their poor ability at escaping the immune system of a healthy host. Furthermore, *Nocardia* can secrete several enzymes that may interfere with the host cell metabolism (Loeffler *et al.*, 2004), in particular SOD (Beaman *et al.*, 1983), lipases (Nesbit and Gunasekaran, 1993) and proteases (Zlotnik *et al.*, 1984). CDS encoding such enzymes were observed in the GUH-2 genome. Eight CDS were found encoding extracellular lipases and ten encoding extracellular proteases. Nevertheless, much more genes encoding putative secreted

enzymes in taxa such as *Mycobacterium*, in particular the ESAT proteins, were recorded (Brodin *et al.*, 2004). The GUH-2 genome was found to harbor three ESAT CDS.

Another major group of secreted molecules that can play a role in virulence are the siderophores. *Nocardia* strains can produce several siderophores like formobactin (Murakami *et al.*, 1996), amamistatin (Suenaga *et al.*, 1999), brasilibactin (Tsuda *et al.*, 2005), asterobactin (Nemoto *et al.*, 2002) and nocobactin for which a structure was proposed and the respective gene clusters allowing their synthesis were described (Hoshino *et al.*, 2011). Nocobactin synthesis was previously found under the control of two genetic clusters, with cluster I positioned 195 kb from cluster II. The GUH-2 genome showed a cluster I organization different from the one observed in the *N. farcinica* genome. *nbtH* is absent in the GUH-2 genome and replaced by a putative formyltransferase CDS which could play a role in preventing the transfer of an acyl chain to the ε-amino group of lysine. The GUH-2 cluster II shows high homologies with the one of the *N. farcinica* genome but showed CDS encoding two NRPS and an exported protein of unknown function. The NRPS CDS could play a role in the synthesis of this GUH-2 siderophore and change some of its properties.

These Actinobacteria are also known to synthesize other extracellular metabolites through NRPS and PKS genes-related processes. For instance, it is strongly believed that the substance produced by *N. cyriacigeorgica* GUH-2 which can induce brain damages by inducing apoptosis and a dopamine depletion would be encoded by NRPS or PKS genes (Loeffler *et al.*, 2004; Barry and Beaman, 2007). Such synthases are also involved in the synthesis of antibiotics and could have been involved in the synthesis of transvalencin Z (Mukai *et al.*, 2006), DA-7218 (Espinoza-Gonzalez *et al.*, 2008), and nocardithiocin (Mukai *et al.*, 2009) by *Nocardia* strains. The GUH-2 genome was found to encode 12 PKS-related CDS and 22 NRPS-related ones. The molecules produced by such synthases are often difficult to purify from culture filtrates without genetic manipulations that would lead to an over-expression of their CDS.

Genome plasticity issues

ISs and GIs are signatures of genomic plasticity among bacteria, and can be used to infer the ability of a strain to acquire DNA from an exogenous source. The metabolic profiling showed that GUH-2 could grow on a variety of substrates. In most of cases, the CDS involved in transport and catabolism reaction were related to the observed activity. However CDS involved in a metabolic activity were found without *in vivo* confirmation (L-glycine, L-lysine, L-proline). CDS involved in L-lysine and L-proline catabolism were out of GIs but

showed a codon adaption index (CAI) below the average (data not shown). This bias codon could reflect a low expression of these CDS due to their recent acquisition, explaining *in vivo* results. An overexpression of these genes in GUH-2 could change the phenotype and confirmed this hypothesis. Low CAI was also observed for CDS identified when *in vivo* activity was viewed. In this case the presence of multiple CDS (with high and low CAI) assigned to this function probably allowed a sufficient gene expression level to observe a phenotype. A high turnover of GIs appears to occur among *N. cyriacigeorgica.* GUH-2 closest GI profile showed an absence of 7 GIs and a conservation of 15 ones. GI profiles thus suggest a good *N. cyriacigeorgica* competence towards GI acquisitions but the mechanisms involved in their mobility remain to be determined. One GI, GI-Cy8, appears to have been recently acquired by GUH-2 and to posses all genetic elements making such elements mobile. This GI could be a good starting material for the design of a genetic vector (Alegre *et al.*, 1994). A high turnover of IS elements was also observed among the *Nocardia* genomes. Several IS were found among the *N. cyriacigeorgica* (n=16) and *N. farcinica* (n=26) genomes while previous authors had only reported two IS among the *Nocardia*: ISNfa1 (*N. farcinica*) (Ishikawa *et al.*, 2004) and IS204 (*N. mexicana*) (Yao *et al.*, 1994). These latter observations had suggested a poor propensity for *Nocardia* at acquiring exogenous DNA and a likely fast removal of IS elements from their genome. Here, the *Nocardia* genomes were found to harbor relatively high IS numbers. IS of eight families were recorded suggesting a high genomic tolerance towards these elements and likely frequent DNA acquisitions by these Actinobacteria. However, about 45% of the observed IS among *Nocardia* genomes did not show IR and DR. A lack of such sequences could be indicative of a loss of their transposition autonomy or of selective pressures leading to their fixation at a particular site because of functional benefits. This would need to be further investigated.

Nevertheless, there is much debate about the role of IS elements in the birth of particular bacterial lineages. However, there are several indirect evidences suggesting a good match between the presence of a particular IS or group of IS and bacterial diversification. In the case of our investigations by PCR screenings of the distribution of GUH-2 IS elements among the *Nocardia*, the ISNcy2 and ISNfa2 were found to be restricted to respectively *N. cyriacigeorgica* and *N. farcinica*, ISNcy3 was restricted to the *N. cyriacigeorgica* GUH-2 complex and ISNfa5 to two particular clones of *N. farcinica*. These data suggest either a contribution of IS elements in the emergence of these groups of bacteria by an involvement in genetic processes that would have favored the genetic diversification of this species or a presence because of a recent DNA acquisition by a DNA shuttle such as a GI or plasmid

element. The global analysis of *N. cyriacigeorgica* IS and GI distribution among a set of selected strains gave similar GI/IS repartition profiles and divided *N. cyriacigeorgica* into two clusters, one grouping profiles being close to the GUH-2 one and one grouping profiles matching or being close to the type strain profile. Such common phylogenetic trends in the evolution of GUH-2 GI/IS elements in *N. cyriacigeorgica* suggest linked origins between GI and IS elements. GIs would thus be the genetic shuttles for IS elements. In fact, even though most IS elements were found distributed over the genome without particular insertion site preferences, a few of these, ISNcy5, ISNcy2-b, ISNCy4, & ISNcy1-a4, were found harbored by GIs supporting a probable recent acquisition through the acquisition of such elements. For example, ISNcy2-b seemed to have been acquired through acquisition of GI-Cy13. This IS is significantly different from the other ISNcy2-related copies found in the GUH-2 genome suggesting a recent acquisition through the insertion of this GI. Interestingly, a division of *N. cyriacigeorgica* into distinct phylogenetic sub-groups was previously suggested by McTaggart *et al.* (McTaggart *et al.*, 2010) through MLSA. It would now be interesting to further investigate the IS/GI patterns of these strains in regards to this MLSA phylogenetic tree. This could not be done in this work because of the non-availability of these strains in our collection. Such analysis could add further support for the role of IS/GI elements in bacterial diversification and speciation. No relation between the habitat or the geographical origin of the strains used in this study and the observed GI/IS profiles could be observed.

It is noteworthy that ISNcy2 was found similar to IS987 of *M. tuberculosis* and *M. bovis*, and was not recorded among other bacterial genomes. In order to relate IS divergences and the evolution of Actinobacteria, the two orthologous IS alleles named ISNfa14 and ISNcy8, found respectively in *N. farcinica* and *N. cyriacigeorgica* were used. These IS have 86% identity suggesting a relatively more ancient diversification of ISNcy2 and IS*987* (75% identity) if one would consider that their evolutionary clock would be running at similar rates as the ones of ISNcy8/ISNfa14 orthologs. PCR screenings showed ISNcy2 to be largely distributed among *N. cyriacigeorgica* whereas it was totally absent from *N. farcinica* and other *Nocardia* type strains. This would thus tend to suggest a *N. cyriacigeorgica* specific acquisition that would be matching the phylogenetic radiation of this species. The actinobacterial donor of this IS remains to be identified and could be from an outdoor environment.

Outdoor-related functional issues

Although a significant number of virulence genes was identified, with some being harbored by GIs, the main drivers of *N. cyriacigeorgica* evolution should be related to its

outdoor cycle. Nocardioses are without any doubt of environmental origin, and infections are mainly the consequences of exposures to soil or water sources of these opportunistic pathogens. Indeed, several characteristics of the GUH-2 genome reflect the environmental origin of this species. For instance, estimation of the time of divergence between *N. cyriacigeorgica* and *N. farcinica* (2.9% of substitution site) using the inferred value of 1% divergence between *rrs* sequences being equivalent to a time scale of 50 MY, one can estimate that *N. cyriacigeorgica* diverged 150 MY ago from *N. farcinica*. Then come the two *Rhodococcus* species at 5.2 and 6.2 %, that would correspond to a separation 300 MY ago. Knowing that warm-blooded mammals emerged during the Eocene (56-34 MY ago), it confirms that these *Nocardia* are of environmental origin and gradually acquired genetic potentials (GI) making them health hazards for humans. Furthermore, *N. cyriacigeorgica* genome size is in the range of what is expected for saprophytic bacteria (from 6 Mb to 11Mb). This size range seems to be in line with an increase related to the selection of CDS improving metabolic potentials and regulatory processes allowing growth under a wider range of environmental constraints (Konstantinidis and Tiedje, 2004). These observations are further supported by COG analyses which showed that *Nocardia* genomes share similar configurations as those reported among non pathogenic Actinobacteria. Interestingly, both *Nocardia* genomes have a higher proportion of K and T COG CDS. These COGs encode DNA and proteins regulatory functions suggesting an evolution towards regulatory fine tunings of their genetic potentials that are likely leading to expression patterns favoring growth under much more complex conditions.

X. Conclusion

On one hand, primary pathogens are subjected to evolutionary forces driven by the host defense responses which can lead to a specialization for certain hosts and a genome size reduction as observed for B. mallei (Song et al., 2010). On the other hand, opportunistic pathogens are exposed to a multitude of environmental constraints that favor an increase tolerance towards the acquisition of foreign DNA and the selection of novel metabolic properties. The GUH-2 genome is a clear reflection of these latter trends. The GUH-2 genome shows a great plasticity as shown from its GI and IS contents which appear to have recently evolved and to be strain-specific. This genome appears to be undergoing genetic rearrangements but the most surprising observation was the great ability of these strains at acquiring novel DNA pieces. So far, Nocardia were thought to have a low mating frequency, not acquiring much novel DNA potentials from their neighbors. This work shows a complete

opposite trend with the N. cyriacigeorgica strain being sexually active and diversifying because of their ability at acquiring novel genetic potentials. It thus appears, that from one strain to another, major changes in niche preferences can occur including their tropism for certain human tissues because of these features.

XI. Methods

XI.1 Mice experimentations

Female BALB/c mice (specific pathogen-free) of 18-20 g (approximately 8 weeks of age) were maintained by the Institut Claude Bourgelat®, VetAgroSup, Marcy l'Etoile, France in accordance with approved protocols by the board of ethics on animal experimentations.

N. cyriacigeorgica strain GUH-2 was grown in brain-heart infusion broth (BHI-P) up to its mid-log phase at 37 °C with mild rotational agitation (150 rpm). The suspension of cells was centrifuged at 55 x g to remove bacterial clumps, and adjusted to approximately 3.5 x 10^6 CFU/ml and 0.1 ml of this bacterial suspension was injected intravenously (IV) through the lateral tail vein into each mouse, as described in detail by Kohbata and Beaman (Kohbata and Beaman, 1991). Each mouse received approximately 3.5 x 10^5 CFU.

XI.2 Genome Sequencing and Assembly

A Sanger/pyrosequencing hybrid approach was used for whole-genome sequencing of *Nocardia cyriacigeorgica* strain GUH-2. Two shotgun libraries were constructed with 3kb and 10kb size fragments, obtained after mechanical shearing of the total genomic DNA, and cloned into vectors pcdna2.1 (A) (Invitrogen) and pCNS (B) (pSU derived) respectively. Sequencing with vector-based primers was carried out using the ABI 3730 Applera Sequencer. A total of 8448 (~0.8X coverage) (A) and 26400 (~3X coverage) (B) reads were analysed and assembled with 837088 (~14X coverage) reads obtained with Genome Sequencer FLX (Roche Applied Science). For the assembly, we used the Arachne "HybridAssemble" version (Broad institute, www.broad.mit.edu) that combines the 454 contigs with Sanger reads. To validate the assembly, the Mekano interface (Genoscope), based on visualization of clone links inside and between contigs, was used to check the clones coverage and misassemblies. In addition, the consensus was confirmed using Consed functionalities (www.phrap.org): the consensus quality and the high quality discrepancies. The finishing step was achieved by primer walks and *in vitro* transposition technology (Template Generation System™ II Kit; Finnzyme, Espoo, Finland), and a total of 11015 sequences (615 and 10400 respectively) were needed for gap closure and quality assessment.

XI.3 Genome Annotation and Analysis

Automatic and expert annotation: Coding sequences (CDS) were predicted using AMIGene (Annotation of Microbial Genomes) software (Bocs et al., 2004). Each predicted CDS was assigned a unique identifier prefixed with "NOCYR_". The set of predicted genes were submitted to automatic functional annotation using the tools listed in Vallenet *et al.*, 2006 et 2009 (Vallenet *et al.*, 2006; Vallenet *et al.*, 2009). All these data (syntactic and functional annotations, and results of comparative analysis, see below) are stored in a relational database, called NocardiaScope. Manual validation of the automatic annotation was performed using the web-based MaGe (Magnifying Genomes) interface, which allows graphic visualization of the annotations enhanced by a synchronized representation of synteny groups in other genomes chosen for comparison. Because of the lack of a close public *Nocardia cyriacigeorgica* reference genome, a complete manual annotation of the 5491 predicted CDSs was performed by a group of five expert curators. Complete data are publicly available via the MaGe interface at http://www.genoscope.cns.fr/agc/mage (selection of the *Nocardia cyriacigeorgica* genome). Sequences and annotations data have also been deposited at the EMBL database (http://www.ebi.ac.uk/embl) using the accession numbers XXX.

Synteny group computation: Sequence data for comparative analyses were obtained from the NCBI database (RefSeq section). Putative orthology relationships between two genomes were defined by gene pairs satisfying either the BBH criterion or an alignment threshold (at least 40% sequence identity over at least 80% of the length of the smallest protein). These relationships were subsequently used to search for synteny groups (*i.e.*, conservation of the chromosomal co-localization between pairs of orthologous genes from different genomes) among several bacterial genomes using an algorithm based on an exact graph-theoretical approach (Boyer *et al.*, 2005). This method allowed for multiple correspondences between genes, detection of paralogy relationships, gene fusions, and chromosomal rearrangements (inversion, insertion/deletion). The 'gap' parameter, representing the maximum number of consecutive genes that are not involved in a synteny group, was set to five. These results were used to draw the LinePlot shown in figure 2.

Genomic Island Identification (RGP-finder): The *RGPfinder* tool in the MaGe annotation platform (Roche et al., in preparation) was used to indentify Regions of Genomic Plasticity (RGPs) in the whole genome sequence of *Nocardia cyriacigeorgica* compare to the one of *N. farcinica.* RGPs are defined as regions of at least 5 kb that are missing in at least one of the genomes that were compared. This definition makes no assumption about the evolutionary origin or genetic basis of these variable chromosomal segments. *RGPfinder*

searches for synteny breaks between a target genome and a set of closely related bacteria (generally other strains) to define RGPs. It also provides information about composition abnormalities (%G+C deviation, Codon Adaptation Index) and RGP flanking features such as tRNA, IS and repeats, which are common features of GI. Moreover the tool integrates the results of Alien Hunter (Vernikos and Parkhill, 2006), and SIGI-HMM (Waack *et al.*, 2006) two methods that analyses compositional biases to detect atypical sequences (*i.e.*, sequences potentially acquired by horizontal gene transfer).

XI.4 Global comparative study

We compared genomes of *A. mediterranei* (EU149765), *C. diphtheriae* (BX248353), *C. glutamicum* (BA000036), *M. tuberculosis* (AL123456), *M. smegmatis* (CP000480), *N. farcinica* (AP006618), *N. cyriacigeorgica, R. equi* (ADNW00000000) and *R. jostii* (CP000431) using various graphic tools including MaGe Microscope platform (https://www.genoscope.cns.fr/agc/microscope/home/index.php) and ACT. The phylogenetic tree of life of the Actinobacteria was built from a MLSA data set on the basis of (McTaggart *et al.*, 2010). We used Clusters of Orthologous Groups (COGs) automatic annotation and correspondence analysis (CA) with R software (R_Development_Core_Team, 2011) to graphically infer global trend between the above genomes.

The whole genome of the *N. cyriacigeorgica* and *N. farcinica* were aligned using ACT, a program for comparing two or more DNA sequences (Carver *et al.*, 2005). A region of more than five genes and 5kb which is not retrieved in *N. farcinica* was defined as GI.

Nocardia IS families were defined on the basis of BLAST analyses carried out against sequences deposited at the IS database (www.is.biotoul.fr/is.html).

Deleted genes from the GUH-2 genome were identified by searching CDS in common with *N. farcinica*, *R equi* and *R jostii* and looking for those absent from *N. cyriacigeorgica* genome by using the Phyloprofiles exploration tool of MaGe. Only CDS presenting more than 40% amino-acid identities were considered. Duplicated genes were detected in the GUH-2 genome with the same tool, *N. cyriacigeorgica* genome was compared against itself and CDS presenting more than 70% predicted amino-acid identities were considered.

XI.5 Distribution of IS and GIs among a panel of *Nocardia* strains

Rapid DNA extraction was performed by the suspension of 10 to 20 colonies in 100 µL of sterile water. The mixture was heated at 55 °C for 15 min and 5 units of achromopeptidase were added before incubating the suspension at 70 °C for 15 min. Cells were centrifugated and supernatant containing DNA was conserved. PCR screenings were defined to investigate

the distribution of all GIs reported in this work and for a set of selected IS elements among a panel of *Nocardia* strains. Primers were defined using primerselect (DNASTAR). All PCR reactions were performed in a final volume of 25 µL, containing extraction, 2.5 µL of each primers at 10 µM, 2.5 µL of 10X PCR buffer, 0.75 µL of $MgCl_2$ 50 mM, 0.25 µL of 10 mM DNTPs, 5% DMSO, and 1 µL of DNA. PCR cycle is: 95°C 300 sec, 95 °C 30 sec, annealing temperature depending on primers used (see annexe 1), 72 °C from 30 sec to 90 sec (x35) and 72 °C 300 sec. PCR products were visualized by electrophoresis using 1% agarose gels, and staining with ethidium bromide.

XI.6 Identification of the secretome

Protein secretion in Gram-positive bacteria occurs mainly through general secretory (Sec) and twin arginine translocation (Tat) pathways, and to a lesser extent by ABC (ATP-binding cassette) type transporters. There are also minor pathways such as the Early Secreted Antigen Target (ESAT-6) machinery described in *Mycobacterium* (Sorensen *et al.*, 1995; Gordon *et al.*, 1999). The secretome was analyzed for pathogenic and non pathogenic Actinobacteria using SignalP and TMhmm (Mastronunzio *et al.*, 2008) as well as PSORTb (Gardy and Brinkman, 2006) and the two lists were fused. These bioinformatics tools can detect trans-membrane domains (Sonnhammer *et al.*, 1998). None of these tools is error-free but their combined use yields a set of proteins that corresponds for the most part to actually secreted proteins (Mastronunzio *et al.*, 2008; Nogueira *et al.*, 2009).

XI.7 Metabolic profiling

N. cyriacigeorgica strain GUH-2 was grown three days at 37°C on Middlebrook 7H10 (supplemented with 0.5% glycerol and 1% Middlebrook OADC enrichment) agar plate. GUH-2 colonies were introduced in 20 mL of IF-0a GN/GP (Biolog Inc) and homogenized to obtain a cell cluster free 81% transmittance solution. 880 µL of these solution were added to 10 mL of IF-0a GN/GP (Biolog Inc) supplemented with 1 mL of additive solution specific for each Omnilog plate. 120 µL of Dye mix F, or H (depending on the Omnilog plate use) was added. 100 µL of this solution were finally added to each well of Omnilog plates before introducing its in Omnilog device. Cellular respiration was measured by dark blue tetrazolium oxidation during 72H.

XII. Supplementary dataset

Supplementary table 1: Clusters of orthologous groups in related genomes. Numbers in parentheses indicate the percentage of the total population in that genome. (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/)

	Occurrence, (%)								
COG ID	*N. cyriacigeorgica*	*N. farcinica*	*R. jostii*	*R. equi*	*C. glutamicum*	*C. diphtheriae*	*M. smegmatis*	*M. tuberculosis*	*A. mediterranei*
A	1(0.02)	1(0.02)	1(0.01)	1(0.03)	1(0.04)	1(0.06)	1(0.02)	1(0.03)	1(0.01)
B	2(0.05)	3(0.07)	1(0.01)	1(0.03)	0(0.00)	0(0.00)	2(0.04)	2(0.07)	2(0.02)
C	340(8.47)	379(8.91)	741(10.96)	352(9.26)	173(7.49)	129(7.17)	614(11.42)	281(9.51)	644(6.45)
D	52(1.29)	51(1.20)	69(1.02)	45(1.18)	34(1.47)	28(1.56)	51(0.95)	46(1.56)	71(0.71)
E	668(16.63)	732(17.21)	1282(18.96)	741(19.49)	471(20.39)	335(18.63)	1051(19.55)	481(16.27)	1246(12.48)
F	114(2.84)	127(2.99)	197(2.91)	124(3.26)	95(4.11)	84(4.67)	171(3.18)	105(3.55)	184(1.84)
G	378(9.41)	367(8.63)	714(10.56)	366(9.63)	290(12.55)	180(10.01)	615(11.44)	237(8.02)	937(9.38)
H	202(5.03)	212(4.98)	290(4.29)	175(4.60)	129(5.58)	114(6.34)	234(4.35)	157(5.31)	313(3.13)
I	384(9.56)	408(9.59)	797(11.79)	435(11.44)	98(4.24)	77(4.28)	607(11.29)	314(10.62)	587(5.88)
J	206(5.13)	237(5.57)	252(3.73)	205(5.39)	182(7.88)	173(9.62)	216(4.02)	178(6.02)	265(2.65)
K	636(15.84)	657(15.44)	904(13.37)	484(12.73)	232(10.04)	158(8.79)	674(12.54)	254(8.59)	1246(12.48)
L	245(6.10)	280(6.58)	479(7.08)	182(4.79)	201(8.70)	202(11.23)	297(5.53)	250(8.46	343(3.43)
M	186(4.63)	180(4.23)	248(3.67)	162(4.26)	122(5.28)	93(5.17)	208(3.87)	139(4.70)	359(3.59)
N	75(1.87)	81(1.90)	92(1.36)	63(1.66)	30(1.30)	42(2.34)	85(1.58)	52(1.76)	114(1.14)
O	154(3.83)	171(4.02)	225(3.33)	484(12.73)	105(4.55)	158(8.79)	175(3.26)	156(5.28)	256(2.56)
P	449(11.18)	496(11.66)	817(12.08)	533(14.02)	359(15.54)	239(13.29)	673(12.52)	279(9.44)	740(7.41)
Q	391(9.74)	388(9.12)	691(10.22)	343(9.02)	81(3.51)	52(2.89)	578(10.75)	361(12.21)	637(6.38)
R	978(24.35)	1000(23.51)	1676(24.79)	940(24.73)	494(21.39)	299(16.63)	1325(24.65)	642(21.72)	1761(17.63)
S	272(6.77)	270(6.35)	425(6.29)	252(6.63)	191(8.27)	136(7.56)	325(6.05)	206(6.97)	434(4.35)
T	310(7.72)	297(6.98)	419(6.20)	213(5.60)	111(4.81)	105(5.84)	300(5.58)	183(6.19)	570(5.71)
U	46(1.15)	47(1.10)	50(0.74)	51(1.34)	34(1.47)	33(1.84)	45(0.84)	52(1.76)	79(0.79)
V	141(3.51)	155(3.64)	168(2.48)	120(3.16)	103(4.46)	85(4.73)	144(2.68)	76(2.57)	221(2.21)
W	1(0.02)	0(0.00)	0(0.00)	1(0.03)	0(0.00)	0(0.00)	1(0.02)	0(0.00)	4(0.04)
tot	4016	4254	6761	3801	2310	1798	5375	2956	7106

Supplementary table 2: Genes containing catalytic transcription domains in related genomes. Numbers in parentheses indicate the percentage of the total population in that genome.

	Occurrence , (%)								
Transcription domains	*A. mediterranei*	*C. diphtheriae*	*C. glutamicum*	*M. smegmatis*	*M. tuberculosis*	*N. cyriacigeorgica*	*N. farcinica*	*R. equi*	*R. jostii*
AbrB	0(0,00)	0(0,00)	0(0,00)	0(0,00)	2(1,44)	1(0,25)	0(0,00)	0(0,00)	0(0,00)
AraC	39(4,66)	1(1,79)	4(3,57)	24(4,95)	7(5,04)	29(7,34)	36(8,55)	19(5,48)	46(7,03)
ArsR	44(5,26)	2(3,57)	11(9,82)	14(2,89)	12(8,63)	19(4,81)	23(5,46)	11(3,17)	27(4,13)
AsnC	22(2,63)	0(0,00)	2(1,79)	11(2,27)	5(3,60)	7(1,77)	7(1,66)	9(2,59)	23(3,52)
Crp	5(0,60)	1(1,79)	2(1,79)	2(0,41)	3(2,16)	1(0,25)	2(0,48)	1(0,29)	2(0,31)
DeoR	19(2,27)	2(3,57)	4(3,57)	8(1,65)	0(0,00)	6(1,52)	6(1,43)	5(1,44)	6(0,92)
Fur	2(0,24)	1(1,79)	1(0,89)	4(0,82)	2(1,44)	3(0,76)	3(0,71)	2(0,58)	3(0,46)
GntR	66(7,89)	8(14,29)	12(10,71)	65(13,40)	8(5,76)	19(4,81)	26(6,18)	27(7,78)	72(11,01)
HxlR	27(3,23)	0(0,00)	2(1,79)	11(2,27)	2(1,44)	7(1,77)	10(2,38)	4(1,15)	8(1,22)
IclR	29(3,46)	2(3,57)	7(6,25)	22(4,54)	4(2,88)	8(2,03)	19(4,51)	32(9,22)	52(7,95)
LacI	56(6,69)	3(5,36)	10(8,93)	25(5,15)	1(0,72)	0(0,00)	3(0,71)	4(1,15)	18(2,75)
LuxR	96(11,47)	6(10,71)	8(7,14)	37(7,63)	8(5,76)	38(9,62)	29(6,89)	31(8,93)	59(9,02)
LysR	46(5,50)	3(5,36)	10(8,93)	40(8,25)	5(3,60)	22(5,57)	24(5,70)	23(6,63)	49(7,49)
MarR	75(8,96)	4(7,14)	9(8,04)	27(5,57)	7(5,04)	23(5,82)	23(5,46)	27(7,78)	37(5,66)
MerR	30(3,58)	4(7,14)	5(4,46)	13(2,68)	4(2,88)	30(7,59)	22(5,23)	14(4,03)	20(3,06)
MoxR	3(0,36)	0(0,00)	0(0,00)	3(0,62)	3(2,16)	4(1,01)	3(0,71)	1(0,29)	2(0,31)
NrdR	1(0,12)	1(1,79)	1(0,89)	1(0,21)	1(0,72)	1(0,25)	1(0,24)	1(0,29)	1(0,15)
PadR	19(2,27)	1(1,79)	3(2,68)	5(1,03)	3(2,16)	13(3,29)	13(3,09)	6(1,73)	10(1,53)
Rrf2	1(0,12)	0(0,00)	0(0,00)	2(0,41)	2(1,44)	3(0,76)	3(0,71)	2(0,58)	3(0,46)
CarD/TRCF	2(0,24)	2(3,57)	2(1,79)	2(0,41)	2(1,44)	2(0,51)	2(0,48)	2(0,58)	3(0,46)
TetR	248(29,63)	12(21,43)	15(13,39)	163(33,61)	52(37,41)	151(38,23)	157(37,29)	119(34,29)	179(27,37)
WhiB	7(0,84)	3(5,36)	4(3,57)	6(1,24)	6(4,32)	8(2,03)	9(2,14)	7(2,02)	34(5,20)
Tot :	837	56	112	485	139	395	421	347	654

XIII. Acknowledgements

Thanks are expressed to Danis Abrouk and Severine Bouchet for help with treatment of large data sets,. Thanks are expressed to the PARMIC and EML (Environment Microbiology Lyon) biological resource center which made available the Omnilog Combo system. This project was funded by a Genoscope research program, by a CNRS MIE interdisciplinary program and a CNRS-USA exchange program. Part of this work was funded by ANR SEST xxx and ANR SEST (2005-2009) project 009 named "Patho-déchets". The CNRS, University Lyon 1 and VetAgroSup institutions also contributed financially to this work. Anthony Zoropogui received a PhD grant from Cluster Environnement of the Rhône-Alpes region.

XIV. References to cite

Alegre MT, Cournoyer B, Mesas JM, Guerineau M, Normand P et al. (1994) Cloning of Frankia species putative tRNA(Pro) genes and their efficacy for pSAM2 site-specific integration in Streptomyces lividans. Appl Environ Microbiol 60(12): 4279-4283.

Arruda S, Bomfim G, Knights R, Huima-Byron T, Riley LW (1993) Cloning of an M. tuberculosis DNA fragment associated with entry and survival inside cells. Science 261(5127): 1454-1457.

Barnaud G, Deschamps C, Manceron V, Mortier E, Laurent F et al. (2005) Brain abscess caused by Nocardia cyriacigeorgica in a patient with human immunodeficiency virus infection. J Clin Microbiol 43(9): 4895-4897.

Barry DP, Beaman BL (2007) Nocardia asteroides strain GUH-2 induces proteasome inhibition and apoptotic death of cultured cells. Res Microbiol 158(1): 86-96.

Beaman BL, Maslan S (1977) Effect of cyclophosphamide on experimental Nocardia asteroides infection in mice. Infect Immun 16(3): 995-1004.

Beaman BL, Maslan S (1978) Virulence of Nocardia asteroides during its growth cycle. Infect Immun 20(1): 290-295.

Beaman BL, Beaman L (1994) Nocardia species: host-parasite relationships. Clin Microbiol Rev 7(2): 213-264.

Beaman BL, Beaman L (1998) Filament tip-associated antigens involved in adherence to and invasion of murine pulmonary epithelial cells in vivo and HeLa cells in vitro by Nocardia asteroides. Infect Immun 66(10): 4676-4689.

Beaman BL, Tam S (2008) An unusual murine behavior following infection with log-phase Nocardia asteroides type 6 strain GUH-2 (Nocardia cyriacigeorgica GUH-2). Microbes Infect 10(7): 840-843.

Beaman BL, Scates SM, Moring SE, Deem R, Misra HP (1983) Purification and properties of a unique superoxide dismutase from Nocardia asteroides. J Biol Chem 258(1): 91-96.

Beaman BL, Canfield D, Anderson J, Pate B, Calne D (2000) Site-specific invasion of the basal ganglia by Nocardia asteroides GUH-2. Med Microbiol Immunol 188(4): 161-168.

Boyer F, Morgat A, Labarre L, Pothier J, Viari A (2005) Syntons, metabolons and interactons: an exact graph-theoretical approach for exploring neighbourhood between genomic and functional data. Bioinformatics 21(23): 4209-4215.

Brodin P, Rosenkrands I, Andersen P, Cole ST, Brosch R (2004) ESAT-6 proteins: protective antigens and virulence factors? Trends Microbiol 12(11): 500-508.

Brown-Elliott BA, Brown JM, Conville PS, Wallace RJ, Jr. (2006) Clinical and laboratory features of the Nocardia spp. based on current molecular taxonomy. Clin Microbiol Rev 19(2): 259-282.

Camp DM, Loeffler DA, Razoky BA, Tam S, Beaman BL et al. (2003) Nocardia asteroides culture filtrates cause dopamine depletion and cytotoxicity in PC12 cells. Neurochem Res 28(9): 1359-1367.

Cargill JS, Boyd GJ, Weightman NC (2010) Nocardia cyriacigeorgica: a case of endocarditis with disseminated soft-tissue infection. J Med Microbiol 59(Pt 2): 224-230.

Carver TJ, Rutherford KM, Berriman M, Rajandream MA, Barrell BG et al. (2005) ACT: the Artemis Comparison Tool. Bioinformatics 21(16): 3422-3423.

Casali N, Riley LW (2007) A phylogenomic analysis of the Actinomycetales mce operons. BMC Genomics 8: 60.

Conville PS, Witebsky FG (2007) Organisms designated as Nocardia asteroides drug pattern type VI are members of the species Nocardia cyriacigeorgica. J Clin Microbiol 45(7): 2257-2259.

Darwin KH, Ehrt S, Gutierrez-Ramos JC, Weich N, Nathan CF (2003) The proteasome of Mycobacterium tuberculosis is required for resistance to nitric oxide. Science 302(5652): 1963-1966.

Elsayed S, Kealey A, Coffin CS, Read R, Megran D et al. (2006) Nocardia cyriacigeorgica septicemia. J Clin Microbiol 44(1): 280-282.

Embley TM, Stackebrandt E (1994) The molecular phylogeny and systematics of the actinomycetes. Annu Rev Microbiol 48: 257-289.

Emeruwa AC (1986) Isolation and some properties of beta-hemolysin produced by Nocardia asteroides. Mycopathologia 95(1): 29-35.

Espinoza-Gonzalez NA, Welsh O, de Torres NW, Cavazos-Rocha N, Ocampo-Candiani J et al. (2008) Efficacy of DA-7218, a new oxazolidinone prodrug, in the treatment of experimental actinomycetoma produced by Nocardia brasiliensis. Molecules 13(1): 31-40.

Gardy JL, Brinkman FS (2006) Methods for predicting bacterial protein subcellular localization. Nat Rev Microbiol 4(10): 741-751.

Gordon SV, Brosch R, Billault A, Garnier T, Eiglmeier K et al. (1999) Identification of variable regions in the genomes of tubercle bacilli using bacterial artificial chromosome arrays. Mol Microbiol 32(3): 643-655.

Hoshino Y, Chiba K, Ishino K, Fukai T, Igarashi Y et al. (2011) Identification of nocobactin NA biosynthetic gene clusters in Nocardia farcinica. J Bacteriol 193(2): 441-448.

Hubble JP, Cao T, Kjelstrom JA, Koller WC, Beaman BL (1995) Nocardia species as an etiologic agent in Parkinson's disease: serological testing in a case-control study. J Clin Microbiol 33(10): 2768-2769.

Ishikawa J, Yamashita A, Mikami Y, Hoshino Y, Kurita H et al. (2004) The complete genomic sequence of Nocardia farcinica IFM 10152. Proc Natl Acad Sci U S A 101(41): 14925-14930.

Khan ZU, Neil L, Chandy R, Chugh TD, Al-Sayer H et al. (1997) Nocardia asteroides in the soil of Kuwait. Mycopathologia 137(3): 159-163.

Kohbata S, Beaman BL (1991) L-dopa-responsive movement disorder caused by Nocardia asteroides localized in the brains of mice. Infect Immun 59(1): 181-191.

Konstantinidis KT, Tiedje JM (2004) Trends between gene content and genome size in prokaryotic species with larger genomes. Proc Natl Acad Sci U S A 101(9): 3160-3165.

Kumar A, Chandolia A, Chaudhry U, Brahmachari V, Bose M (2005) Comparison of mammalian cell entry operons of mycobacteria: in silico analysis and expression profiling. FEMS Immunol Med Microbiol 43(2): 185-195.

Lalitha P (2009) Nocardia keratitis. Curr Opin Ophthalmol 20(4): 318-323.

Le TN, Mikolasch A, Awe S, Sheikhany H, Klenk HP et al. (2010) Oxidation of aliphatic, branched chain, and aromatic hydrocarbons by Nocardia cyriacigeorgica isolated from oil-polluted sand samples collected in the Saudi Arabian Desert. J Basic Microbiol 50(3): 241-253.

Li JM, Li N, Zhu DY, Wan LG, He YL et al. (2008) Isocitrate lyase from Mycobacterium tuberculosis promotes survival of Mycobacterium smegmatis within macrophage by suppressing cell apoptosis. Chin Med J (Engl) 121(12): 1114-1119.

Loeffler DA, Camp DM, Qu S, Beaman BL, LeWitt PA (2004) Characterization of dopamine-depleting activity of Nocardia asteroides strain GUH-2 culture filtrate on PC12 cells. Microb Pathog 37(2): 73-85.

Mastronunzio JE, Tisa LS, Normand P, Benson DR (2008) Comparative secretome analysis suggests low plant cell wall degrading capacity in Frankia symbionts. BMC Genomics 9: 47.

Matsunaga I, Naka T, Talekar RS, McConnell MJ, Katoh K et al. (2008) Mycolyltransferase-mediated glycolipid exchange in Mycobacteria. J Biol Chem 283(43): 28835-28841.

McTaggart LR, Richardson SE, Witkowska M, Zhang SX (2010) Phylogeny and identification of Nocardia species on the basis of multilocus sequence analysis. J Clin Microbiol 48(12): 4525-4533.

Mohn WW, van der Geize R, Stewart GR, Okamoto S, Liu J et al. (2008) The actinobacterial mce4 locus encodes a steroid transporter. J Biol Chem 283(51): 35368-35374.

Mukai A, Fukai T, Hoshino Y, Yazawa K, Harada K et al. (2009) Nocardithiocin, a novel thiopeptide antibiotic, produced by pathogenic Nocardia pseudobrasiliensis IFM 0757. J Antibiot (Tokyo) 62(11): 613-619.

Mukai A, Fukai T, Matsumoto Y, Ishikawa J, Hoshino Y et al. (2006) Transvalencin Z, a new antimicrobial compound with salicylic acid residue from Nocardia transvalensis IFM 10065. J Antibiot (Tokyo) 59(6): 366-369.

Murakami Y, Kato S, Nakajima M, Matsuoka M, Kawai H et al. (1996) Formobactin, a novel free radical scavenging and neuronal cell protecting substance from Nocardia sp. J Antibiot (Tokyo) 49(9): 839-845.

Nemoto A, Hoshino Y, Yazawa K, Ando A, Mikami Y et al. (2002) Asterobactin, a new siderophore group antibiotic from Nocardia asteroides. J Antibiot (Tokyo) 55(6): 593-597.

Nesbit EA, Gunasekaran M (1993) Influence of cultural conditions on growth and lipolytic activity in Nocardia asteroides. Folia Microbiol (Praha) 38(6): 451-455.

Nogueira T, Rankin DJ, Touchon M, Taddei F, Brown SP et al. (2009) Horizontal gene transfer of the secretome drives the evolution of bacterial cooperation and virulence. Curr Biol 19(20): 1683-1691.

Ogata SA, Beaman BL (1992a) Site-specific growth of Nocardia asteroides in the murine brain. Infect Immun 60(8): 3262-3267.

Ogata SA, Beaman BL (1992b) Adherence of Nocardia asteroides within the murine brain. Infect Immun 60(5): 1800-1805.

Quatrini P, Scaglione G, De Pasquale C, Riela S, Puglia AM (2008) Isolation of Gram-positive n-alkane degraders from a hydrocarbon-contaminated Mediterranean shoreline. J Appl Microbiol 104(1): 251-259.

R_Development_Core_Team (2011) R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria.

Rodriguez-Nava V, Zoropogui A, Laurent F, D. B, A. C et al. (2008) La nocardiose, une maladie en expansion, Nocardiosis, an expanding disease. Antibiotiques 10(3): 115-127.

Schlaberg R, Huard RC, Della-Latta P (2008) Nocardia cyriacigeorgica, an emerging pathogen in the United States. J Clin Microbiol 46(1): 265-273.

Song H, Hwang J, Yi H, Ulrich RL, Yu Y et al. (2010) The early stage of bacterial genome-reductive evolution in the host. PLoS Pathog 6(5): e1000922.

Sonnhammer EL, Eddy SR, Birney E, Bateman A, Durbin R (1998) Pfam: multiple sequence alignments and HMM-profiles of protein domains. Nucleic Acids Res 26(1): 320-322.

Sorensen AL, Nagai S, Houen G, Andersen P, Andersen AB (1995) Purification and characterization of a low-molecular-mass T-cell antigen secreted by Mycobacterium tuberculosis. Infect Immun 63(5): 1710-1717.

Spargo BJ, Crowe LM, Ioneda T, Beaman BL, Crowe JH (1991) Cord factor (alpha,alpha-trehalose 6,6'-dimycolate) inhibits fusion between phospholipid vesicles. Proc Natl Acad Sci U S A 88(3): 737-740.

Stackebrandt E, Sproer C, Rainey FA, Burghardt J, Pauker O et al. (1997) Phylogenetic analysis of the genus Desulfotomaculum: evidence for the misclassification of Desulfotomaculum guttoideum and description of Desulfotomaculum orientis as Desulfosporosinus orientis gen. nov., comb. nov. Int J Syst Bacteriol 47(4): 1134-1139.

Stinear TP, Seemann T, Harrison PF, Jenkin GA, Davies JK et al. (2008) Insights from the complete genome sequence of Mycobacterium marinum on the evolution of Mycobacterium tuberculosis. Genome Res 18(5): 729-741.

Suenaga K, Kokubo S, Shinohara C, Tsuji T, Uemura D (1999) STRUCTURES OF AMAMISTATINS A AND B, NOVEL GROWTH INHIBITORS OF HUMAN TUMORCELL LINES FROM AN ACTINOMYCETE Tetrahedron letters 40(10): 1945-1948.

Sultana R, Tanneeru K, Guruprasad L (2011) The PE-PPE Domain in Mycobacterium Reveals a Serine alpha/beta Hydrolase Fold and Function: An In-Silico Analysis. PLoS One 6(2): e16745.

Tam S, Barry DP, Beaman L, Beaman BL (2002) Neuroinvasive Nocardia asteroides GUH-2 induces apoptosis in the substantia nigra in vivo and dopaminergic cells in vitro. Exp Neurol 177(2): 453-460.

Tonge PJ (2000) Another brick in the wall. Nat Struct Biol 7(2): 94-96.

Tsuda M, Yamakawa M, Oka S, Tanaka Y, Hoshino Y et al. (2005) Brasilibactin A, a cytotoxic compound from actinomycete Nocardia brasiliensis. J Nat Prod 68(3): 462-464.

Vallenet D, Labarre L, Rouy Z, Barbe V, Bocs S et al. (2006) MaGe: a microbial genome annotation system supported by synteny results. Nucleic Acids Res 34(1): 53-65.

Vallenet D, Engelen S, Mornico D, Cruveiller S, Fleury L et al. (2009) MicroScope: a platform for microbial genome annotation and comparative genomics. Database (Oxford) 2009: bap021.

Vernikos GS, Parkhill J (2006) Interpolated variable order motifs for identification of horizontally acquired DNA: revisiting the Salmonella pathogenicity islands. Bioinformatics 22(18): 2196-2203.

Waack S, Keller O, Asper R, Brodag T, Damm C et al. (2006) Score-based prediction of genomic islands in prokaryotic genomes using hidden Markov models. BMC Bioinformatics 7: 142.

Yao W, Yang Y, Chiao J (1994) IS204: an insertion sequence from Nocardia asteroides (mexicana) YP21. Plasmid 32(3): 262-269.

Yassin AF, Rainey FA, Steiner U (2001) Nocardia cyriacigeorgici sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol 51(Pt 4): 1419-1423.

Zhao GZ, Li J, Zhu WY, Klenk HP, Xu LH et al. (2011) Nocardia artemisiae sp. nov., an endophytic actinobacterium isolated from surface-sterilized stem of Artemisia annua L. Int J Syst Evol Microbiol.

Zlotnik H, Schramm VL, Buckley HR (1984) Purification and partial characterization of a Nocardia brasiliensis extracellular protease. J Bacteriol 157(2): 627-631.

XV. Conclusion de chapitre

Ce chapitre avait pour objectif de mettre en évidence les caractéristiques génomiques du pathogène opportuniste *N. cyriacigeorgica* GUH-2. Les analyses globales sur les similitudes et la proportion des CDS appartenant aux COGs ont confirmé le caractère opportuniste de cette souche puisqu'elle se rapproche des souches non pathogènes. Les comparaisons avec les souches séquencées les plus proches ont également révélé que presque 10 % des CDS du génome sont des gènes de fonction inconnue montrant ainsi qu'il reste encore un important travail à faire dans le but de la compréhension de la fonction de chacun d'entre eux dans les différentes voies métaboliques de *N. cyriacigeorgica* GUH-2.

L'étude du génome a révélé la présence d'un certain nombre de gènes liés à la virulence tels que les *mce*, *sod*, *kat* et les gènes liés au métabolisme du nitrite et du nitrate. Les résultats des capacités métaboliques d'utilisation de composés carbonés et azoté ont permis de corréler la plupart des observations faites *in vivo* avec les gènes retrouvés *in silico* ainsi que d'expliquer en partie les résistances aux antibiotiques de la souche.

La génomique comparative réalisée entre *N. farcinica* et *N. cyriacigeorgica* a révélé un pangénome commun aux *Nocardia* représentant presque 35 % du génome de *N. cyriacigeorgica*. Elle a aussi permis l'identification de 22 IGs spécifiques de *N. cyriacigeorgica*. Un certain nombre de ces IGs semblent liés au métabolisme énergétique, à l'adaptation à des conditions spécifiques, à la virulence, et à la plasticité génétique notamment par l'intermédiaire des ISs. Les études de distribution des IGs et des IS au sein de différentes souches de l'espèce *N. cyriacigeorgica* ont montré la séparation de l'espèce en deux complexes de souches : le « GUH-2 complex » et le « type strain complex ». Actuellement, aucune donnée ne permet de dire si l'un comprend des souches plus virulentes que l'autre ou encore de définir d'autres différences que celle d'une répartition différente des éléments génétiques mobiles.

L'analyse du génome a révélé la présence d'un certain nombre de gènes possiblement liés au métabolisme secondaire : NRPS et PKS. Or, on sait que les Actinobactéries sont d'importants producteurs de ces métabolites. La souche *N. cyriacigeorgica* GUH-2 étant associée à une dégénérescence neuronale chez la souris, l'identification des métabolites qu'elle produit pourrait aider à comprendre le rôle de ces molécules dans les mécanismes moléculaires conduisant à une apoptose cellulaire. Ceci a été abordé dans le chapitre suivant.

CHAPITRE IV : ANALYSE DES METABOLITES PRODUITS PAR *N. CYRIACIGEORGICA* GUH-2

I. Introduction

Les protéines et métabolites sécrétés représentent un intérêt important dans la compréhension de la vie bactérienne. Ces molécules sont impliquées dans divers mécanismes cellulaire : le quorum sensing (Recio *et al.*, 2004 ; Teasdale *et al.*, 2009), la différenciation cellulaire (Schazschneider *et al.*, 1974 ; Ristow *et al.*, 1975), la communication (Bassler and Losick, 2006), la symbiose (Richardson *et al.*, 1988), la croissance des plantes (Teintze *et al.*, 1981), la compétition vis-à-vis d'un environnement (Cavalier-Smith, 1992), la virulence dans un hôte végétal ou animal (Strobel, 1977 ; Gasson, 1980). Bien que non essentiels à la survie cellulaire, les métabolites sécrétés participent généralement à l'amélioration des conditions de vie de la cellule bactérienne. Pour ce qui est des bactéries pathogènes qui se développent à l'intérieur des cellules hôtes ou qui sont en contact direct avec celles-ci, les molécules sécrétées par les microorganismes sont souvent impliquées dans la physiopathologie observée (Lo *et al.*, 2011).

Les *Nocardia* sont des bactéries intracellulaires opportunistes connues principalement pour leurs implications dans des pathologies pulmonaires (Brown-Elliott *et al.*, 2006) et cutanées (Boiron *et al.*, 1992) mais ces Actinobactéries peuvent également être responsables d'abcès cérébraux (Lin *et al.*, 2010) ainsi que d'infections généralisées touchant une grande partie des organes de l'homme (Al-Tawfiq and Al-Khatti, 2010). Peu de choses sont connues sur les mécanismes cellulaires conduisant les *Nocardia* à franchir, s'installer et à se développer dans le tissu hôte. Il a été montré que des protéines de surface membranaires de tailles variable (62-, 43-, 36-kDa) suivant la souche de *Nocardia* utilisée étaient en partie responsables de l'adhésion et de l'invasion de cellules épithéliales pulmonaires (Beaman and Beaman, 1998). Certaines souches de *Nocardia* sont également capables de survivre et de se multiplier à l'intérieur du macrophage grâce à la surexpression de catalase dans les cellules et de superoxyde dismutase qui sera sécrétée dans le cytoplasme du macrophage (Beaman *et al.*, 1985). D'autres composés membranaires, excrétés ou secrétés pourraient être les molécules responsables du déplacement ou de l'adhésion de la bactérie au sein du tissu hôte, elles pourraient aussi être impliqués dans la réponse immunitaire ou encore avoir une activité bouleversant complètement le fonctionnement du tissu infecté et conduire à la mort cellulaire.

Le métabolisme global de la cellule est réparti entre le métabolisme primaire et le métabolisme secondaire qui ont des fonctions et des effecteurs très différents. Le métabolisme primaire implique des réactions cataboliques et anaboliques se traduisant par une augmentation de la biomasse, il implique les fonctions essentielles à la vie de la cellule. Ces réactions conduisant à la maîtrise de l'énergie et du pouvoir réducteur, sont utilisées pour synthétiser les acides aminés, les acides nucléiques, des lipides et des polysaccharides de structure. Ces briques élémentaires serviront alors à la synthèse d'ARN, de protéines, de la membrane cellulaire etc.

Le métabolisme secondaire est quand à lui responsable de la production de composés non essentiels à la cellule. Chez les bactéries, le métabolisme secondaire produit des métabolites secondaires de faible masse moléculaire, le plus souvent pendant la phase stationnaire de croissance (Demain and Fang, 2000). Les métabolites secondaires sont surtout connus pour leur rôle important dans le domaine de la santé avec plusieurs composés utilisés dans la lutte contre les infections bactériennes telles que la pénicilline (Fleming, 2001) et la streptomycine (Jones *et al.*, 1944). Pour des raisons qui restent encore inconnues les Actinobactéries sont d'incroyables producteurs d'antibiotiques puisque près de 75 % d'entres eux sont produits par ces bactéries filamenteuses (Demain and Fang, 2000). Le genre *Streptomyces* est responsable à lui seul de la production de 75 % d'entre eux. Actuellement, il a été estimé que moins d'1 % du monde microbien a été exploré mais les nouvelles techniques de culture, d'extraction des acides nucléiques et d'exploration de nouveaux habitats (milieux marins) laissent présager de grandes découvertes de diversité génétiques et métaboliques dans les modes de production de telles molécules (Sanchez, 2005). Les métabolites secondaires sont formés par des voies enzymatiques faisant intervenir des protéines individuelles, libres ou complexés, ou par le biais de grands polypeptides multifonctionnels responsables de la réalisation d'une multitude d'étapes enzymatiques, comme les polykétides synthases (PKS) et NRPSs (Demain, 1998). Un grand nombre d'études montrent que ces complexes multi-protéiques sont codés par les plus longs CDS des génomes (Hopwood, 1999).

Les *Nocardia* sont des Actinobactéries capables de produire une grande variété de métabolites secondaires (Ruiz *et al.*, 2010). Les nocardicines A et B produites par *Nocardia uniformis* (Aoki *et al.*, 1976) et 3'-O-diméthyl mutactimycine produite par *Nocardia transvalensis* (Speitling *et al.*, 1998), sont des exemples d'antibiotiques produits par ce genre bactérien. Les *Nocardia* produisent également des sidérophores tels que la formobactine (Murakami *et al.*, 1996), l'amamistatine (Suenaga *et al.*, 1999), la brasilibactine (Tsuda *et al.*, 2005), l'astérobactine (Nemoto *et al.*, 2002) et la nocobactine pour laquelle la

structure ainsi que les clusters de gènes impliqués dans la biosynthèse ont récemment été identifiés (Hoshino *et al.*, 2011). Dans ce chapitre nous avons effectué un bilan de ce type de voies de biosynthèse et cherché à déduire si ces voies pouvaient contribuer au pouvoir de virulence de *N. cyriacigeorgica* GUH-2. Cette souche bactérienne a été décrite comme étant capable de générer des symptômes similaires à ceux de la maladie de Parkinson sur modèle murin et chez le primate (Beaman and Maslan, 1978 ; Beaman *et al.*, 2000). Suite à une injection chez ces animaux, *N cyriacigeorgica* GUH-2 envahit le système nerveux central et entraine une dégénérescence des neurones dopaminergiques et notamment ceux de la substance noire (Ogata and Beaman, 1992). Cette activité sur le système nerveux central pourrait être due à la production de composés capables de provoquer l'apoptose des cellules dopaminergiques et une diminution de leur activité sur des modèles cellulaires (Camp *et al.*, 2003 ; Loeffler *et al.*, 2004 ; Barry and Beaman, 2007). Parmi les mécanismes cellulaires associés à la maladie de Parkinson, plusieurs études montrent qu'un disfonctionnement du protéasome peut contribuer à l'apparition de la maladie (Snyder and Wolozin, 2004). Ainsi, l'action unique d'un inhibiteur de protéasome a été reconnue comme reproduisant les symptômes parkinsoniens chez l'animal (McNaught and Olanow, 2006). La combinaison des capacités invasives de *N. cyriacigeorgica* GUH-2 (Beaman and Beaman, 1998 ; Tam *et al.*, 2002) et de la production d'un inhibiteur du protéasome pourrait être une des explications de la virulence de cette souche. Parmi les inhibiteurs de protéasome déjà identifié, certains d'entre eux l'ont été chez des Actinobactéries du genre *Streptomyces* (Omura and Takeshima, 1996 ; Feling *et al.*, 2003) ce qui laisse suggérer que ce type de composé pourrait également être produit par *N. cyriacigeorgica* GUH-2.

Dans le chapitre précédent, le génome de la souche de *N. cyriacigeorgica* GUH-2 a été présenté et 12 CDS codant des PKS ainsi que 22 CDS codant des NRPS ont été identifiés. Par conséquent, *N. cyriacigeorgica* GUH-2 possède un potentiel génétique à produire un certain nombre de composés naturels lui permettant probablement de survire en tant que saprophyte ou en tant que pathogène de l'homme. Nous nous sommes intéressés plus particulièrement aux composés pouvant être sécrétés par *N. cyriacigeorgica* GUH-2, en analysant *in-silico* les gènes connus pour être impliqués dans le métabolisme secondaire (NRPS et PKS) ainsi que leur environnement génétique afin de les relier avec un organisme producteur de composé de même type. La mise au point d'un protocole de purification de surnageants de culture nous a permis de mettre en évidence un composé de petite taille ayant un pouvoir inhibiteur sur le protéasome *in-vitro*. Ces résultats suggèrent un rôle de ce type de composés dans la virulence de la bactérie ainsi que dans la capacité à provoquer une

neurodégénérescence probablement en lien étroit avec les propriétés du sécrétome de la cellule.

Les NRPS sont des complexes multi-protéiques organisés sous la forme de modules qui sont des groupes coordonnés de sites actifs. Un module va comporter différents domaines, dont chacun est caractérisé par une activité enzymatique spécifique. Un module est responsable de l'ajout d'une unité (substrat) au peptide en cours de synthèse. Le nombre, la nature et l'ordre de chacun des modules vont être déterminants dans la structure finale du métabolite produit. Le module minimal nécessaire à un cycle d'élongation comprend un domaine d'adénylation (A), un domaine de thiolation (T) et un domaine de condensation (C). Le domaine d'adénylation présente un intérêt supérieur puisque c'est lui qui est responsable de la reconnaissance spécifique du substrat à ajouter au peptide en cours de synthèse (Marahiel *et al.*, 1997). Ces protéines ont été reconnues comme étant les plus grosses et plus complexes enzymes jamais découvertes (Hopwood, 1999). Les PKS sont également de gros complexes protéiques possédant des activités enzymatiques. Trois architectures de PKS ont été identifiées, leur point commun est la réaction de condensation décarboxylante qui est à la base de la chaine de biosynthèse des polykétide. On peut également retrouvé dans l'environnement génétique des NRPS et PKS, des CDS codant des enzymes telles que des oxygénases, des oxydoréductases et des glycosyltransférases. Ces enzymes interviennent aussi dans la modification de la structure des composés naturels produits afin de leur apporter de nouvelles fonctionnalités (Hopwood, 1997 ; Katz, 1997).

II. Matériel et Méthode

II.1 Analyse in silico des gènes des NRPS et PKS

Les CDS appartenant aux grandes familles des NRPS et PKS ont été identifié dans le génome par homologie avec des CDS déjà décrit chez d'autres bactéries et par l'utilisation des fonctions InterProScan et COGnitor disponibles sur la plateforme MaGe. La détermination des domaines portant une fonction enzymatique a été faite par l'intermédiaire de la base de données NRPS-PKS : http://www.nii.res.in/nrps-pks.html, qui détermine le substrat potentiellement incorporé par la composition en acides aminées des protéines (Challis *et al.*, 2000).

II.2 Souche et condition de culture

N. cyriacigeorgica GUH-2 a été cultivée dans du milieu BHI (Conda) complémenté avec du NaH_2PO_4 H_2O à 20 mM final (BHI-P). Un volume de 250 mL de BHI-P a été ensemencé à partir de 2 mL d'une culture homogène de *N. cyriacigeorgica* GUH-2 en phase stationnaire et entreposé sous agitation à 150 rpm à 37°C. Après six semaines de culture, les 250 mL de culture ont été centrifugés pendant 20 min à 7000 g. Le surnagent a été récupéré et filtré deux fois sur 0.2 µm afin d'éliminer tous microorganismes. La stérilité du filtrat a été vérifié par étalement de 200 µL de surnageant sur des boite de BHI-P agar.

II.3 Extractions liquide/liquide

Le surnageant de culture une fois stérilisé a subi différentes étapes d'extractions. Une première extraction a été réalisée avec du dichlorométhane. La phase apolaire a été conservée et nommée F1, la phase polaire a subi une deuxième extraction avec du n-butanol. Les deux phases ont été séparées et appelé F2 pour la phase n-butanol et F3 pour la phase aqueuse résiduelle. Les phases F1, F2 et F3 ont été évaporées sous vide, à sec, afin de pourvoir obtenir un poids sec avant d'entreprendre les étapes suivantes.

II.4 Chromatographie d'exclusion

La fraction F3 (2.3 mL) a été déposée sur une colonne de Séphadex® G25 de Sigma Aldrich (251 mL et 50.2 g). Il s'agit d'un gel d'exclusion-diffusion, qui sépare les composés en fonction de leur taille, entre 1000 et 5000 Da. L'élution de la colonne a été réalisée par gravité avec un mélange binaire A (H_2O-MeOH dans les proportions 80:20). Quatre heures ont été nécessaires pour séparer l'ensemble des composées, ceux-ci étant collectés par fractions de 10 mL.

II.5 Chromatographie sur couche mince (CCM)

Les fractions éluées de la colonne de Sephadex® G25 ont été analysées par CCM : la phase stationnaire était la cellulose et la phase mobile du BAW (butanol, Acetic acid, Water dans les proportions 4:2:2). La migration a été réalisée sur 10 cm et la détection a été faite à 254 nm, 365 nm ainsi qu'à l'œil nu par révélation à la ninhydrine. Après regroupement des fractions de profils identiques, neuf profils différents ont été obtenus et regroupés en neuf fractions appelés F3A, F3B, …, F3I, La première correspondant au volume mort et la dernière au rinçage de la colonne.

II.6 Chromatographie HPLC

70 µL des fractions F3A à F3I ont été injectées sur une colonne Eclipse XDB-C18 non endcapped d'Agilent Technologies (dimensions 250x4,6 mm avec des particules de 5 µm) reliée à une HPLC Agilent 1100 Series. L'élution a été réalisée avec un gradient de méthanol de 0% à 100 % en 25 minutes avec un débit de 0.8 $mL.min^{-1}$. La présence de composés a été détectée par une lecture de l'absorbance à 260 nm.

Les fractions correspondant aux pics d'intérêt de la fraction F3H ont été regroupées et injectées de nouveau sur cette colonne afin de vérifier leur pureté.

II.7 Résonnance magnétique nucléaire

Le Bruker DRX à 300 MHz a été utilisé pour l'analyse RMN du proton de HB30D. Les fréquences optimales utilisées ont été 300,13 MHz pour le ^{1}H et 75,13 MHz pour le ^{13}C. L'échantillon a été analysé dans de l'eau deutérée (D_2O).

II.8 Spectrométrie de masse

Une colonne HPLC Eclipse XDB-C18 couplée au spectromètre de masse HP1100 MSD series d'Agilent a été utilisée. La source d'ionisation du spectromètre est un électrospray, l'analyseur un quadripôle. L'appareil a été calibré comme suit : flux de gaz (azote) : 9,5l/min ; pression du nébuliseur : 38bar ; température du gaz : 340°C ; tension du capillaire : 4500V en positif comme en négatif ; fragmenteur : 150 et 220 selon le composé analysé (unité arbitraire entre 0 et 400, utilisée à 80 pour les molécules facilement ionisables et autour de 200 pour les molécules plus difficilement ionisables).

II.9 Inhibition de protéasome

L'activité chymotrypsine du protéasome 20S de lapin Sigma® a été mesurée par l'apparition de fluorescence provoquée par la dégradation d'un peptide chromogène, le *N*-Succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC. La mesure de l'activité témoin a été faite par le mélange de 3,5 µL de SDS 1 %, 5 µL de peptide chromogène à 2 mM, le tout a été ajusté avec du tampon Tris-HCl 20 mM à pH 8 pour un volume final de 99 µL. La réaction a été initiée par l'ajout de 1 µL de protéasome 20S à 1.4 $mg.mL^{-1}$ (T = 0). Le mélange réactionnel a été réalisé dans une cuve de 100 µL à face claire, qui a été introduite dans le Fluorometer BIO-RAD VersaFluorTM. La longueur d'onde d'excitation a été de 360 nm et celle d'émission de 460 nm. L'expérience a été réalisée à température ambiante (23 °C) pendant 50 min et la lecture de fluorescence a été faite toutes les 30 secondes. Le test des fractions inhibitrices a

Tableau I : Synténie des NRPS et PKS de *N. cyriacigeorgica* GUH-2 avec d'autres procaryotes.

	Label	CDS label	Gene length	Gene name	Product	Syntons in *N. farcinica*		Syntons in others	
						Nb gene	% similarity	Nb gene	% similarity
NRPS fragment		*nocyr_0388*	3930	_	putative non-ribosomal peptide synthetase	79	80.47	7 (*M. gilvum*)	66.92
		nocyr_2357	1194	_	putative peptide synthetase	6	57.92	0	
		nocyr_2360	1677	_	putative peptide synthetase		66.85		
		nocyr_2663	1359	_	putative non-ribosomal peptide synthetase (fragment)	0		0	
		nocyr_5486	1767	_	peptide synthetase NRPS5-4-3 (fragment)	0		2 (*M. sp.* JLS)	39.03
PKS	*pks_1*	*nocyr_0145*	5247	*pks13*	Polyketide synthase PKS13	65	79.42	28 (*R. opacus*)	63.9
Cluster I (NRPS)[1(x2), 2]	*nrps_1*	*nocyr_0751*	7374	_	non-ribosomal peptide synthetase	37	58.58	7 (*R. erythopolis*)	53.66
	nrps_2	*nocyr_0752*	12840	_	non-ribosomal peptide synthetase		60.06		56.97
	nrps_3	*nocyr_0753*	16767	_	non-ribosomal peptide synthetase		56.29		53.26
Cluster II (NRPS/PKS)		*nocyr_0790*	1248	*nbtG*	lysine-N-oxygenase	11	79.7	10 (*T. paurometabola*)	55.79
		nocyr_0791	942	_	putative formyltransferase		no CDS		no identity
	nrps_4	*nocyr_0792*	5595	*mbtE*	non-ribosomal peptide synthetase		51.79		38.4
		nocyr_0793	990	_	putative ferric nocobactin-binding protein		51.68		no identity
	nrps_5	*nocyr_0794*	1725	_	non-ribosomal peptide synthetase		no CDS		no identity
	nrps_6	*nocyr_0795*	4509	_	non-ribosomal peptide synthetase		34.88		35.95
		nocyr_0796	579	_	exported protein of unknown function		no CDS		no identity
	nrps_7	*nocyr_0797*	3432	*mbtB*	Phenyloxazoline synthase mbtB (Mycobactin synthetase protein B)		51.95		48.83
	nrps_8	*nocyr_0798*	6102	_	non-ribosomal peptide synthetase		no CDS		no identity
		nocyr_0799	759	_	putative thioesterase		55.78		44.58
	pks_2	*nocyr_0800*	1317	_	polyketide synthase		71.26		57.38
	pks_3	*nocyr_0801*	3057	_	modular polyketide synthase		51.29		41.3
NRPS[1]	*nrps_9*	*nocyr_1701*	7212	_	non-ribosomal peptide synthetase	0		2 (*P. aeruginosa*)	43.77
cluster III (PKS)	*pks_4*	*nocyr_2010*	723	*hisF*	Imidazole glycerol phosphate synthase subunit hisF	0	91.67	3 (*R. opacus*)	no identity
		nocyr_2011	1656	_	acyl-CoA synthetase epimerase (AMP-forming)/AMP-acid ligases II		no identity		62.15
	pks_5	*nocyr_2012*	267	_	peptide carrier protein (pcp)		no identity		65.79
	pks_6	*nocyr_2013*	4833	_	modular polyketide synthase		no identity		59.96
Cluster IV (PKS)	*pks_7*	*nocyr_2493*	6384	_	modular polyketide synthase	5	70.83	2 (*M. marinum*)	32.81
	pks_8	*nocyr_2494*	1404	_	Putative acyltransferase (polyketide synthase associated protein A2)		63.73		36.7
Cluster V (NRPS)[4(x2) 2, 4]	*nrps_10*	*nocyr_2584*	9852	_	non-ribosomal peptide synthetase	0		9 (*S. coelicolor*)	42.88
	nrps_11	*nocyr_2585*	5469	_	non-ribosomal peptide synthetase				46.42
	pks_11	*nocyr_3144*	6396	_	modular polyketide synthase	3	76.05	2 (*H. elongata*)	38.38
[3, 4]	*nrps_12*	*nocyr_3282*	13518	_	modular polyketide synthase	25	70.84	3 (*G. bronchialis*)	43.48
	nrps_13	*nocyr_4062*	13140	_	non-ribosomal peptide synthetase	5	84.86	0	
	nrps_14	*nocyr_4098*	5970	_	non-ribosomal peptide synthetase	0		0	
	nrps_15	*nocyr_4800*	43689	_	non-ribosomal peptide synthetase	21	73.87	4 (*R. equi*)	58.55
Cluster VI (NRPS)[2(x3), 3 1]	*nrps_16*	*nocyr_4843*	25341	_	non-ribosomal peptide synthetase	86	69.16	2 (*Candidatus Nitrospira defluvii)*	37.1
	nrps_17	*nocyr_4844*	18276	_	non-ribosomal peptide synthetase		68.34		37.99
	pks_12	*nocyr_5485*	5499	_	modular polyketide synthase	75	38.37	2 (*M. bovis)*	30.79

Genes in genetic environment: 1 = oxygenase, 2 = oxidoreductase, 3 = glycosyl transferase, 4 = other transferase

été fait par leur ajout à T = 0 dans le mélange réactionnel (100 µl final). L'activité du protéasome a été évaluée par la valeur de la pente à l'origine de la courbe de fluorescence et par la valeur maximale de fluorescence obtenue.

III. Résultats

III.1 Analyse *in silico* des NRPS

La synténie autour des CDS de NRPS et de PKS de *N. cyriacigeorgica* GUH-2 a été observée et comparée avec celle d'autres procaryotes. Une organisation similaire à celle observée chez *N. farcinica* a été retrouvée avec une synténie pouvant aller jusqu'à 86 CDS. Des pourcentages d'identité en acides aminés entre ces CDS allant jusqu'à 90 % ont été calculés. Ces données reflètent un grand degré de conservation entre les deux génomes de *Nocardia* pour ces CDS. Les Actinobactéries ont été les plus retrouvés dans les genres bactériens présentant une synténie proche de celle de *N. cyriacigeorgica* avec des pourcentages d'identité allant jusqu'à 67 %. Cependant des identités de CDS proches ont également été calculées chez des gamaproteobactéries telles que *Pseudomonas* et *Halomonas* ainsi que dans la classe des *Nitrospira*. Aucun de ces CDS n'a été identifié comme appartenant à un des IG décrit dans le chapitre III mais le cluster V de NRPS (tableau I) n'a pas été retrouvé chez *N. farcinica*. L'étude de l'environnement génétique de ce cluster a montré qu'il appartient à un nouvel IG de *N. cyriacigeorgica* GUH-2 d'une taille de 33,7 kb, avec un taux de G+C de 70,7 %. Dix sept CDS codant un transporteur de résistance aux drogues, des transférases, une épimérase et deux régulateurs transcriptionnels ont été identifiés dans cet IG. Ce cluster a montré une synténie se rapprochant de celle observée dans le génome de *S. coelicolor* A3(2). Dans ce génome ces gènes ont été reconnus comme responsable de la synthèse d'un sidérophore, la coelibactine. Actuellement, seules la nocobactine et la coelibactine ont été identifiées comme molécules produites par un des clusters de NRPS/PKS similaire à *N. cyriacigeorgica*.

L'annotation du génome a révélée 22 CDS codant des NRPS et 12 CDS codant des PKS (tableau I, figure 3). Parmi ces NRPS quatre sont organisées en opérons ou en cluster de gènes. Cette organisation permet la production de peptides de 13 acides aminés pour le cluster VI, 10 acides aminés pour le cluster I et 6 acides aminés pour le cluster IV. L'étude des domaines d'adénylation des NRPS a permis de déduire la séquence primaire des composés produits par ces enzymes, le cluster I contient notamment un domaine d'adénylation permettant la reconnaissance de l'acide 2-amino-9,10 époxi-8-oxodécanoique qui présente une structure proche de celles d'un inhibiteur du protéasome l'époxomicine (figure 1).

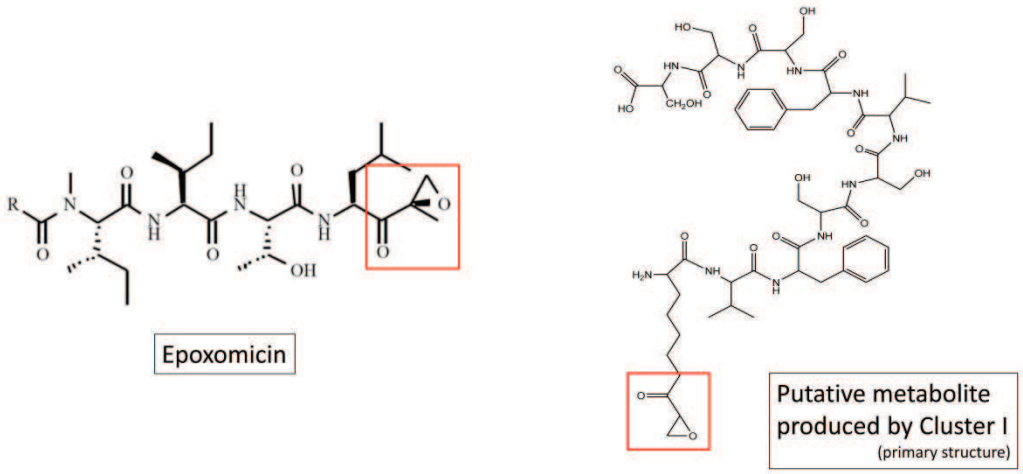


Figure 1 : Comparaison de la structure de l'époxomicine avec celle du métabolite putatif produit par le cluster de NRPS I de *N. cyriacigeorgica* GUH-2. En rouge sont encadrés les groupements époxy.

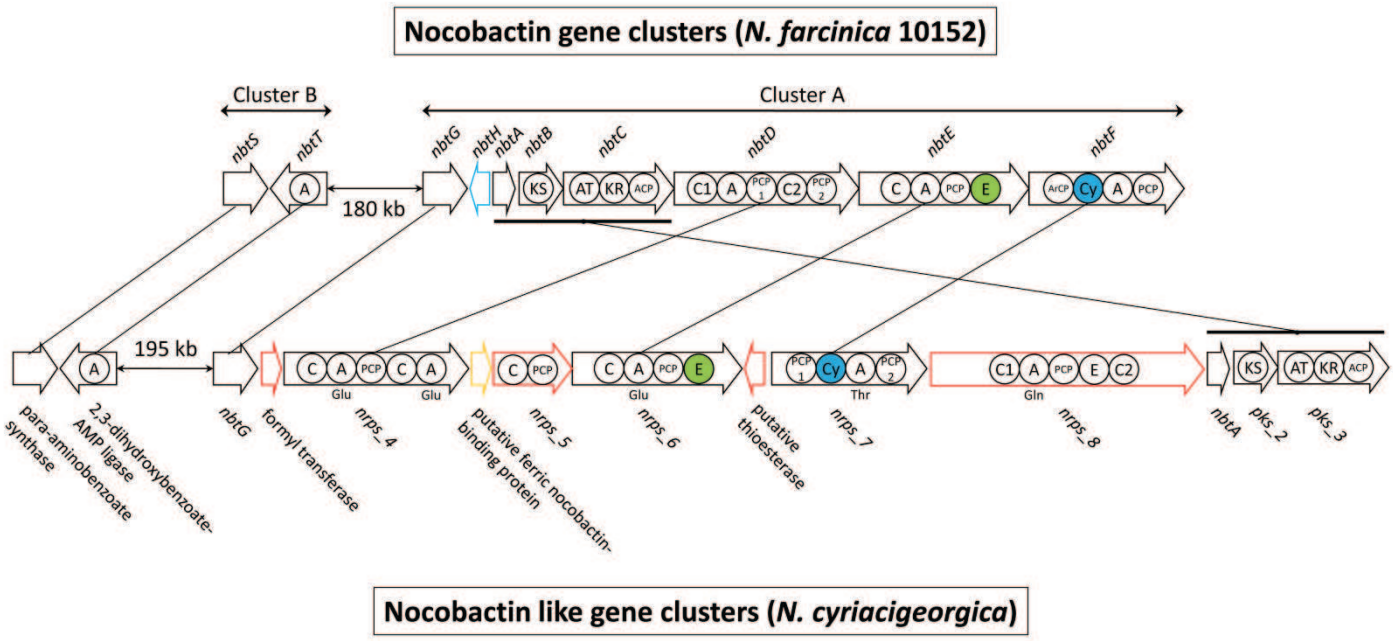


Figure 2 : Comparaison du cluster de gène impliqué dans la synthèse de la nocobactine chez *N. farcinica* 10152, avec la séquence correspondante chez *N. cyriacigeorgica* GUH-2. Les CDS bleu et orange représentent les CDS différents chez *N. farcinica* et *N. cyriacigeorgica* respectivement. Les CDS rouges sont surnuméraires chez *N. cyriacigeorgica.*

La masse théorique de ce peptide déduit est de 1293.36 Da. Des domaines d'épimérisation, de méthylation et de cyclisation sont retrouvés dans plusieurs de ces CDS. Ces domaines peuvent modifier la structure de l'oligopeptide produit. Actuellement, il n'est pas possible de prédire le site d'action de ces domaines sur l'oligopeptide synthétisé. Des CDS codant des enzymes telles que des oxygénases, des oxydoréductases et des transférases ont été identifié dans l'environnement génétiques proches des CDS de NRPS et PKS (tableau I). Ces enzymes pourraient elles aussi modifier la structure du composé produit. La prédiction d'une structure définitive des métabolites synthétisés s'avère par conséquent difficile.

III.2 Comparaison avec la synthèse de la nocobactine

Un cluster de gène a récemment été décrit chez *N. farcinica* comme étant le responsable de la synthèse de nocobactine. Dans le génome de *N. farcinica*, il est présenté sous la forme de deux clusters de gènes. Le cluster A comprend huit CDS codant principalement des NRPS et PKS, alors que le cluster B situé à 180 kb en amont du premier contient deux gènes (*nbtS* et *nbtT*). L'ensemble de ces CDS ont été retrouvé chez *N. cyriacigeorgica* à l'exception de *nbtH*, qui a été remplacé par une formyl-transférase. Des pourcentages d'identité entre *N. farcinica* et *N. cyriacigeorgica* allant de 34 à 79 % ont été calculé pour les autres CDS du cluster A. Quatre CDS supplémentaire à *N. farcinica* ont été retrouvés chez *N. cyriacigeorgica* dont deux ont été identifié comme étant des NRPS. Le cluster B contenant les gènes *nbtS* et *nbtT* a été retrouvé à 195 kb du cluster I (figure 2).

Ces gènes semblent impliqués dans la synthèse d'un sidérophore mais cette organisation génétique reflète la production d'une molécule de composition et de structure différente de celles de la nocobactine.

III.3 Purification de métabolites secondaires

Dans le but d'identifier les métabolites secondaires produits par *N. cyriacigeorgica* GUH-2, différentes méthodes de séparation, de purification et d'analyse de surnageants de culture ont été testées.

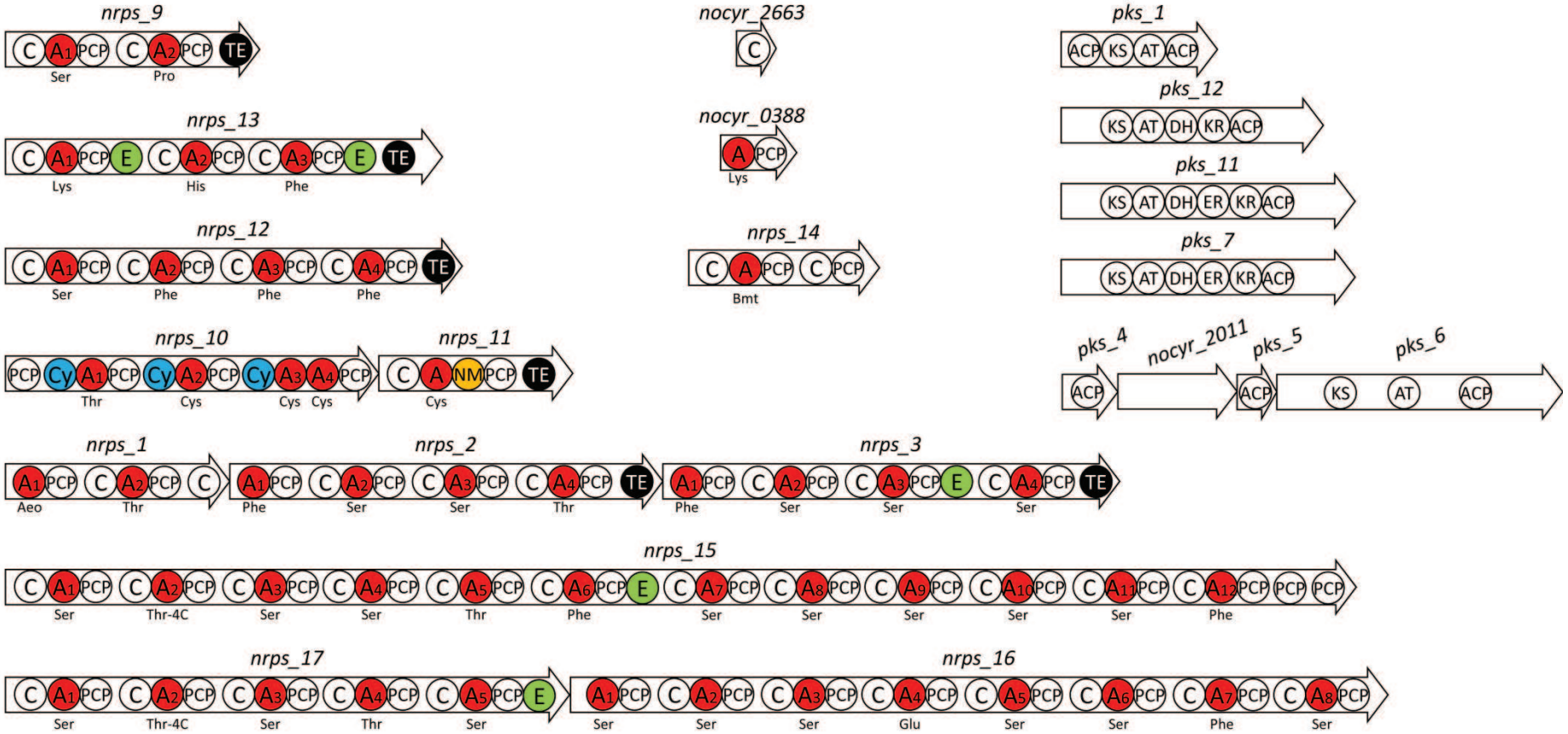


Figure 3 : Domaines retrouvés dans les NRPS et PKS de *N. cyriacigeorgica* GUH-2

Des extractions liquide/liquide des composés produits ont été réalisées à partir de surnageants de culture de *N. cyriacigeorgica* GUH-2. La nature des composés présents dans chacune des trois fractions a été évaluée par une analyse en RMN du proton (figure 4). Les spectres RMN des deux fractions les plus polaires (F2 et F3) ont montré des signaux peptidiques avec des pics observés dans les zones de 1 à 2 ppm de 3 à 5 ppm et autour de 8 ppm, caractéristiques des -C<u>H</u>$_3$, -C<u>H</u>$_2$ et -C<u>H</u> aliphatiques ; des –<u>H</u>C-OR et -CH$_2$-C<u>H</u>=; et des protons aromatiques, respectivement. Les molécules recherchés étant de nature peptidique, nous poursuivons les analyses avec la fraction F3. Cette fraction a été injectée sur une colonne de chromatographie Sephadex G25. Les chromatogrammes obtenus ont été comparés avec ceux de milieu de culture vierge dans les mêmes conditions. Les pics surnuméraires reflétant l'activité métabolique de la souche ont été regroupés en sept échantillons. Ces échantillons ont été injectés sur une colonne type C-18 couplée à une HPLC. Les chromatogrammes ont montré que l'ensemble des échantillons injectés présentaient un profil complexe. Toutefois des profils plus simples ont été observés pour les fractions contenant des composés de plus petite taille (figure 5). Le 7^{e} échantillon a été le seul à avoir été séparé distinctement par la colonne hydrophobe. Les deux premiers pics les plus importants de cet échantillon et absents du milieu de culture vierge ont été analysés en spectrométrie de masse et/ou RMN (figure 6). L'analyse HPLC sur une colonne C-18 des pics 1 et 2 a révélée que le pic 1 est élué sous la forme d'un pic principal correspondant au composé A. L'échantillon contenant le pic 2 a été traité dans les même conditions de chromatographie et a été élué sous la forme de deux pics : un pic majoritaire correspondant au composé B et un pic minoritaire le composé C (figure 7). Des masses de 2.5 mg pour le composé A et 0.2 mg pour le composé B ont été récupérées. Le composé C étant en trop faible quantité, il n'a pu faire l'objet d'analyses complémentaires.

L'analyse des composés A et B en spectrométrie de masse a révélé une ionisation difficile du composé A avec des pics non exploitables (figure 8). Le composé B a présenté une masse de 921 Da, laissant suggérer que la molécule étudiée possède un nombre impair d'azote (figure 9). Seul le composé A était en quantité suffisante pour qu'il puisse être analysé en RMN du proton. Le rapport entre l'intensité des différents signaux observés a suggéré la présence de plusieurs molécules dans cet échantillon. Cependant, l'observation de signaux caractéristiques des peptides suggère la production possible du composé A par le métabolisme secondaire (données non montrées).

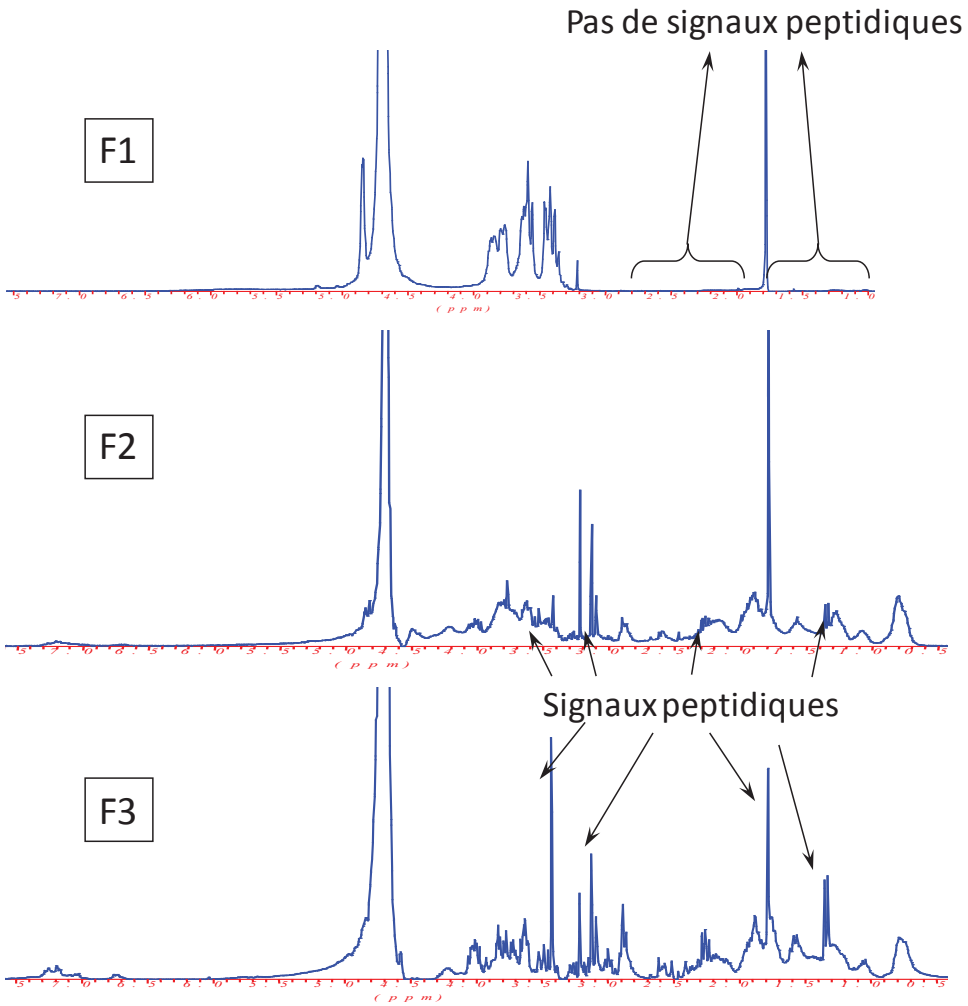


Figure 4 : Spectres RMN ^{1}H des fractions F1, F2, F3 issues des extractions liquide/liquide faites à partir de surnageant de *N. cyriacigeorgica* GUH-2.

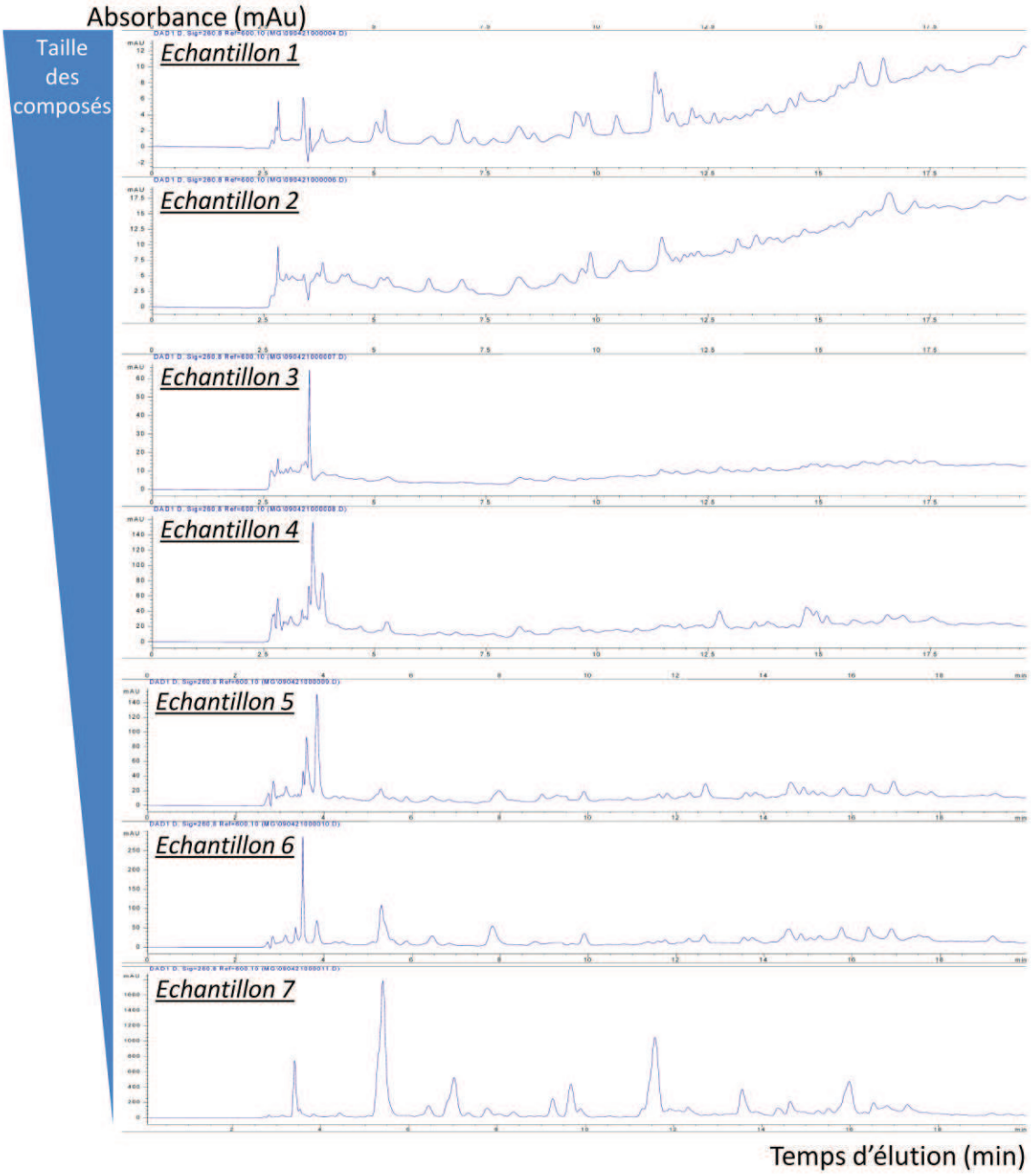


Figure 5 : Chromatogrammes HPLC obtenus avec la colonne Eclipse XDB-C18 des sept échantillons issues de la colonne de chromatographie d'exclusion Sephadex G25

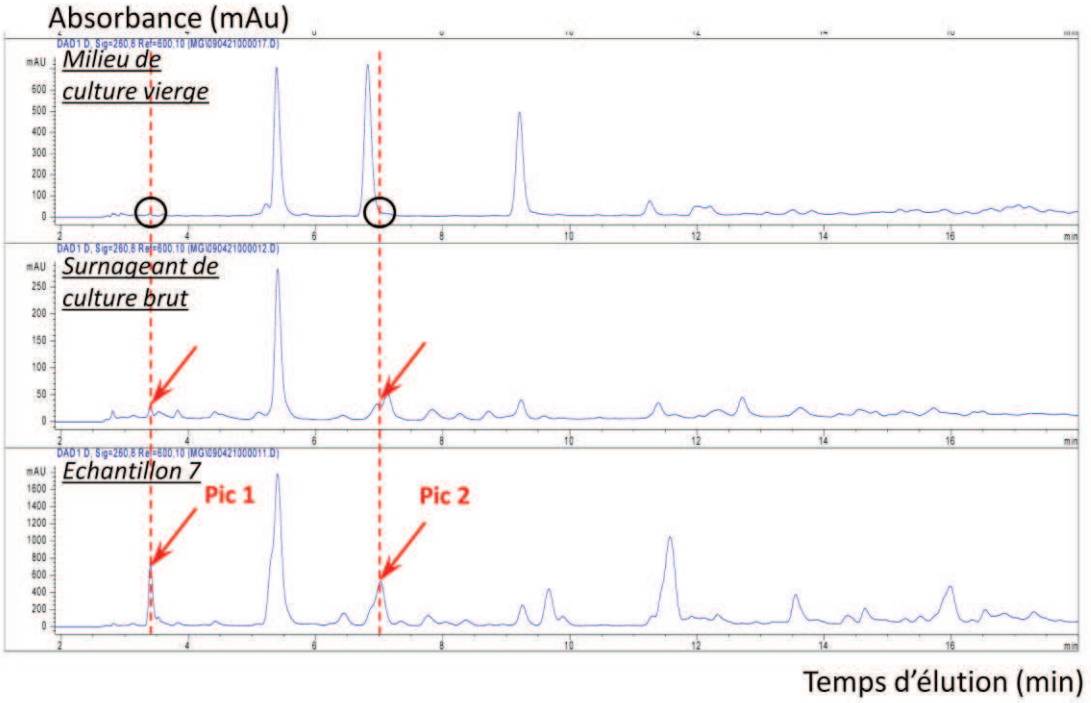


Figure 6 : Comparaison des chromatogrammes HPLC obtenus avec la colonne Eclipse XDB-C18 du milieu de culture vierge, du surnageant de culture brut, et de l'échantillon 7 (Sephadex G25). Les flèches indiquent les pics surnuméraires au milieu de culture vierge qui seront purifiés.

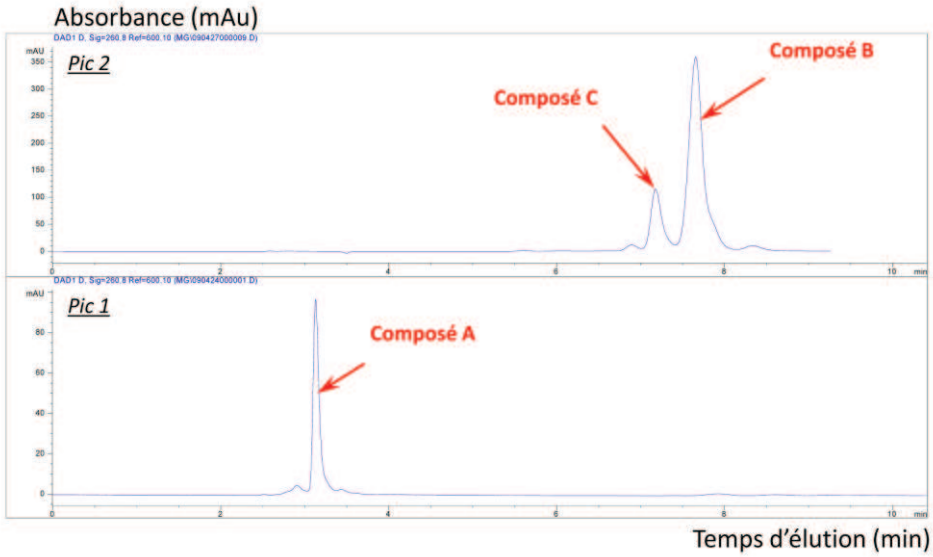


Figure 7 : Chromatogrammes HPLC obtenus avec la colonne Eclipse XDB-C18 des fractions correspondant aux pics 1 et 2.

III.4 Purification du pigment produit par *N. cyriacigeorgica* GUH-2

Une coloration des surnageants de cultures de *N. cyriacigeorgica* GUH-2 en brun/noir a été observée lorsque le bouillon de culture contient de la tyrosine (données non montrées). Différents tests ont été menés dans le but de purifier et d'identifier la molécule donnant cette coloration. Les extractions liquide/liquide ont montré que ce composé était très polaires et qu'il persistait dans la fraction aqueuse à la dernière étape de purification. La séparation de cette fraction en chromatographie HPLC sur C-18 a montré que le pigment était élué avec du méthanol 100%. Les analyses complémentaires ont montré que le pigment n'était pas dans la fraction active sur le protéasome (données non montrées) et la faible quantité d'échantillon n'a pas permis de poursuivre plus loin les analyses de ce ou ces composés. L'analyse *in silico* des CDS de NRPS a montré la reconnaissance de substrats contenant des groupements aromatiques. Les propriétés d'absorption de la lumière dans le visible de ces composés nous orientent vers le choix de ces CDS comme impliqué dans la synthèse d'un pigment.

III.5 Inhibition du protéasome

Les composés A et B ont été purifiés dans les expérimentations précédentes. Leur propriété d'inhibiteur de protéasome a été testée sur le protéasome de lapin *in-vitro*. L'apparition de fluorescence dans l'échantillon a été mesurée car elle était directement proportionnelle à la dégradation du peptide chromogène par l'activité protéasique du protéasome. Les tests réalisés sur le protéasome seul ont révélé un problème de répétabilité de la manipulation bien que les échantillons aient été traités dans les mêmes conditions. La vitesse d'apparition de la fluorescence a varié du simple au quadruple : 6.47, 24.21 et 13.95 unités d'apparition de fluorescence par seconde pour les tests 1, 6 et 7 respectivement (figure 10). La fluorescence finale a varié entre 3200 et 5290 unités de fluorescence, ce qui suggère que la quantité de peptide initialement présente dans l'échantillon était différente. En dépit de ces résultats disparates, l'action sur le protéasome de surnageant de culture à différents stades de purification a été comparé. Les résultats ont montré que des fractions complexes telles que le surnageant de culture brute ou encore l'échantillon 7 issue de la colonne G25 possède une activité qui limite l'apparition de fluorescence et donc l'activité du protéasome de lapin avec des pentes à l'origine ainsi que des valeurs de fluorescence maximales enregistrées plus faibles que pour les contrôles positifs. Le composé A n'a pas montré d'inhibition significative de l'activité du protéasome puisque les valeurs sont de l'ordre de celles obtenues pour les tests sans inhibiteurs. Une activité inhibitrice sur le

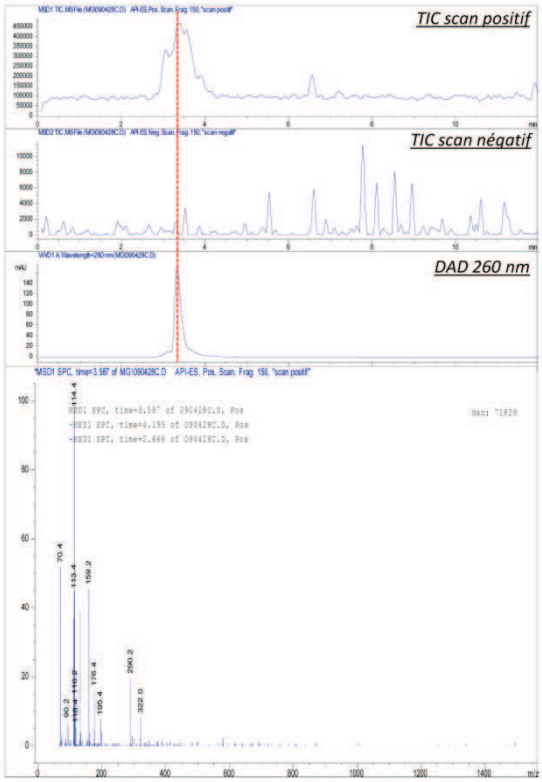


Figure 8 : Spectre de masse du pic 1 avec une fragmentation à 150

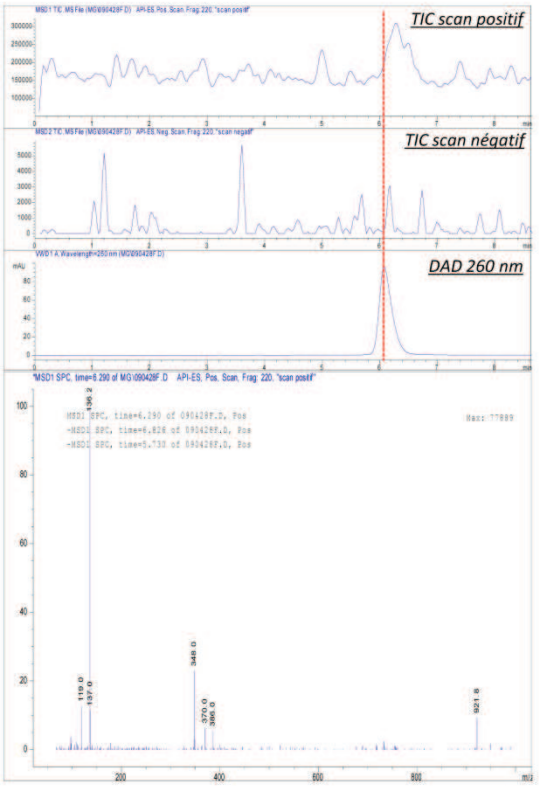


Figure 9 : Spectre de masse du pic 2 avec une fragmentation à 150

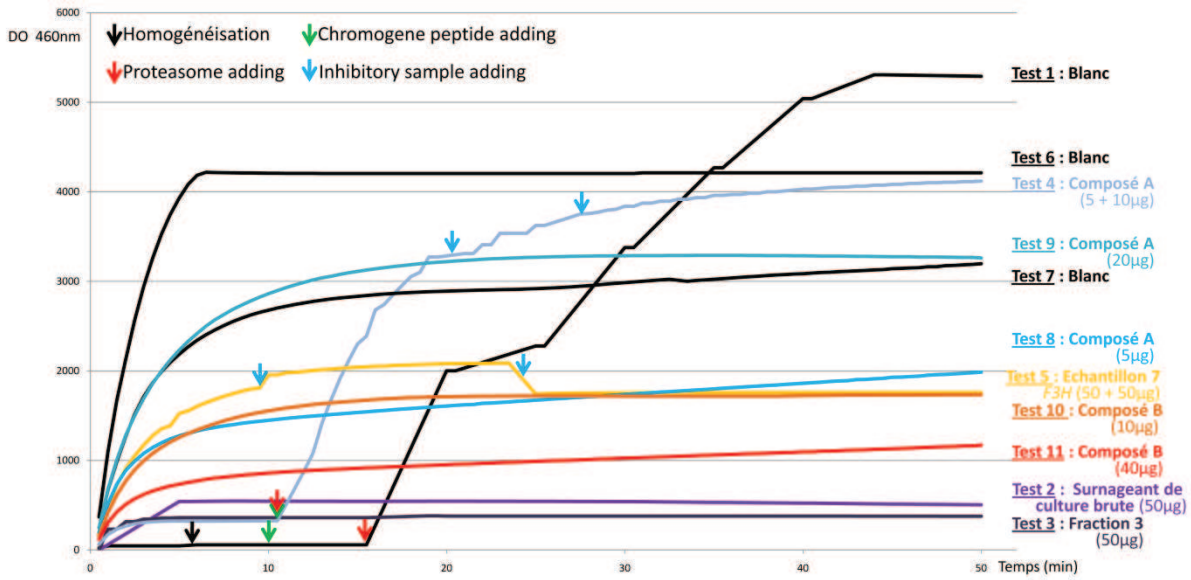


Figure 10 : Influence de surnageant de culture de *N. cyriacigeorgica* GUH-2 sur l'activité du protéasome de lapin. Tous les échantillons contiennent 1,4 pg de protéasome et 1.10^{-5} mmol de peptide chromogène.

protéasome a été enregistrée pour le composé B. En effet, en présence de ce composé la vitesse d'apparition de la fluorescence observée était plus faible et le maximum de fluorescence a atteint des valeurs 2 à 3 fois inférieures suivant les concentrations utilisées (figure 10).

IV. Discussion

Le but de cette étude était d'analyser les composés produits et sécrétés par *N. cyriacigeorgica* GUH-2. Son génome a révélé 22 NRPS et 7 PKS un nombre CDS équivalent à celui retrouvé dans le génome *S. coelicolor* A3(2) qui porte 18 clusters impliqués dans le métabolisme secondaire dans lesquels sont réparties 9 NRPS et 12 PKS (Bentley 2002). L'analyse *in silico* de ces machines enzymatiques a montré qu'elles pouvaient produire des composés pouvant atteindre jusqu'à 13 unités de substrat. L'étude de la synténie autour de ces CDS a révélé dans la majorité des cas une organisation proche de celle de *N. farcinica* ou d'autres Actinobactéries, connues pour leur capacité à produire des composés naturels présentant une activité biologique (Demain and Fang, 2000). L'absence du cluster V de NRPS de *N. cyriacigeorgica* dans le génome de *N. farcinica* a montré une spécificité de ces CDS au génome de GUH-2. Ces CDS appartiennent probablement à un IG nouvellement identifié. La synténie de cet IG a rappelé celle observée dans le génome de *S. coelicolor* A3(2). Les gènes de ce cluster de *S. coelicolor* A3 sont responsables de la synthèse de coelibactine (sidérophore) (Bentley 2002, Hesketh 2009). Cependant les pourcentages d'homologie observés n'ont pas permis de confirmer la synthèse du même type de composé par *N. cyriacigeorgica*. Des analyses complémentaires sur cette IG devront être réalisées afin de comprendre son rôle possible dans la régulation de l'homéostasie de la cellule.

Un cluster de gènes similaire au cluster de gènes impliqué dans la synthèse de nocobactine par *N. farcinica* a été retrouvé dans le génome de *N. cyriacigeorgica* GUH-2. Des CDS supplémentaires codant deux NRPS, une formyl-transférase et une thioestérase ont été retrouvé dans le nocobactine like cluster de *N. cyriacigeorgica.* Ces différences d'organisation de gènes suggèrent la production d'un composé de structure différente mais dont la fonction pourrait être commune. En effet, le génome de *M. tuberculosis* H37rv porte un cluster de gène également impliqué dans la synthèse d'un sidérophore, la mycobactine (Krithika *et al.*, 2006). L'organisation ainsi que la séquence en acides aminés des CDS sont proches des clusters retrouvés dans les génomes de *N. farcinica* et *N. cyriacigeorgica*. Le sidérophore 2,3 dihydroxybenzoate a déjà été identifié dans des surnageants de culture de GUH-2 (Feistner and Beaman, 1987). Cependant, la complexité des structures présentées pour la

nocobactine et la mycobactine suggère une autre voie de biosynthèse par *N. cyriacigeorgica* du 2,3 dihydroxybenzoate de structure simple. Le cluster de gènes responsable de la synthèse du 2,3 dihydroxybenzoate a été identifié chez *B. subtilis* (Rowland *et al.*, 1996), mais est absent chez *N. cyriacigeorgica* GUH-2 bien que des gènes de fonctions similaires aient été identifiés dans son génome. Il apparait évident que *N. cyriacigeorgica* utilise une autre voie métabolique conduisant à la formation du même composé. L'intérêt de la production de différents sidérophores par un même microorganisme a déjà été décrit (Chater *et al.*, 2010). Dans l'environnement, le même sidérophores peut être produit et incorporé par des bactéries de différentes espèces/genres ou peut être incorporé par des systèmes membranaires spécifiques. La production de différents sidérophores par une souche devient alors un moyen de lutter contre les compétiteurs environnant (Challis and Hopwood, 2003). Ainsi une bactérie 1 pourrait utiliser les sidérophores produit par une bactérie 2 et dans des conditions où le métal serait en plus faible concentration, une compétition pour ce métal se mettrait en place entre les différentes espèces bactériennes. Une régulation des gènes responsables de la synthèse de composés plus complexes avec des systèmes de transport plus spécifiques et une affinité plus grande pour les métaux, serait activée afin de rendre les microorganismes plus compétitifs vis-à-vis du métal devenu rare au sein de la niche écologique.

L'étude du cluster I de NRPS (tableau I, figure 1 et 3) a montré l'incorporation probable de l'acide 2-amino-9,10 époxi-8-oxodécanoique comme premier substrat de la molécule. La structure de cet acide est proche de celle que l'on peut observer dans l'époxomicine, connue pour être un inhibiteur de protéasome (Hanada *et al.*, 1992). Ces deux molécules portent un groupement époxy qui est responsable du blocage de la fonction protéasique du protéasome (Sin *et al.*, 1999). Afin de vérifier si un tel composé était produit par *N. cyriacigeorgica* GUH-2 un protocole de purification des métabolites produits a été mis en place. Trois composés ont été obtenus après purification. Deux étaient présent en quantité suffisante pour que leur activité puisse être testée sur le protéasome de lapin *in vitro*. La fraction complexe dont ont été extraits ces composés présente une activité inhibitrice sur le protéasome. Cependant cette fraction comprend des éléments présents dans le milieu de culture de base. Le test de composés purifié (absent du milieu de culture) a révélé une activité inhibitrice du composé B sur le protéasome. Ce dernier composé pourrait donc être en partie responsable de l'effet apoptotique observé in vitro sur les cellules (Barry and Beaman, 2007) et chez les modèles animaux (Kohbata and Beaman, 1991). Le composé A ne possède pas d'activité inhibitrice suite aux résultats peut reproductibles obtenus avec celui-ci. Des tests complémentaires doivent être accomplis afin de valider l'activité biologique du composé B et

une purification en plus grande quantité pourrait permettre d'obtenir des informations sur la structure de cette molécule. Bien que ce composé présente une activité sur le protéasome, la masse de 921 Da obtenue en spectrométrie de masse, diffère de manière significative avec la masse théorique obtenue pour le composé produit par le cluster I : 1293.36 Da. Il semble donc que ces deux composés soit différents, ou que le composé purifié soit un fragment du décapeptide produit par le cluster I.

La découverte de l'activité biologique de molécules excrétées par *N. cyriacigeorgica* GUH-2 pourrait aider à la compréhension de l'origine des troubles que cette Actinobactérie déclenche chez la souris. En effet il a été montré que l'injection d'inhibiteurs du protéasome chez l'animal provoquait une symptomatologie similaire à celle de la maladie de Parkinson (Ahn and Jeon, 2006). Le mécanisme par lequel l'inhibition du protéasome pourrait contribuer à la neurodégénérescence reste actuellement sans réponse mais les études laissent penser que le disfonctionnement de cette machinerie entraîne l'accumulation d'agrégats de protéines anormales ou dégradées, qui interfèrent ensuite avec de nombreux processus physiologiques.

Les voies du métabolisme secondaire faisant intervenir plusieurs CDS, l'étude de la synténie a permis d'orienter les hypothèses sur le rôle biologiques des composés produits par les clusters de gènes identifiés. Cependant, la diversité des métabolites déjà identifiés est le reflet des possibilités offertes par les voies de productions de ces composés. L'implication de ces clusters de gènes dans la production de molécules intervenant dans un processus biologique défini ne pourra être confirmée que par biologie moléculaire : inactivation des cibles ou expression dans une autre souche.

Bien que nous n'ayons pu mettre en évidence la structure d'un composé, les études précédentes ont montrés que cette souche était capable de produire des molécules, possiblement issues du métabolisme secondaire lui permettant soit de survivre dans des conditions limitantes en fer par la production de sidérophores, soit lui permettant d'accroître sa virulence dans un hôte en produisant des molécules délétères pour les cellules hôtes telles qu'un inhibiteur du protéasome.

Des améliorations sur le protocole de purification ainsi que sur la manière de tester l'activité des composés produits doivent être réalisées. Cela pourrait être fait par l'utilisation de milieux pauvres dans lesquels l'apparition de nouveaux composés serait plus facilement détectable. Une cinétique d'apparition de ces composées au cours du temps pourrait également être réalisée.

Des difficultés dans la manipulation du protéasome ont été constatées : problème de répétabilité avec une difficulté d'obtention d'une activité enzymatique et d'un maximum de

fluorescence similaire pour des contions expérimentales identiques. Par ailleurs, le coût important de la manipulation nous a poussé à chercher une méthode complémentaire permettant le test d'un grand nombre de molécules et de fractions issues de surnageants de culture de *Nocardia*. Cette méthode a été trouvée via l'utilisation de nématodes (Caldwell *et al.*, 2009). Les premiers tests ont été effectués avec des co-cultures de souches de *Nocardia* avec nématodes marqués à l'EGFP sur les neurones dopaminergiques. La comparaison avec les contrôles utilisant des souches plus ou moins virulentes a montré que les vers cultivées avec *N. cyriacigeorgica* GUH-2 et *N. farcinica* IFM 10152 présentaient une fluorescence amoindrie, donc une plus faible proportion de neurones dopaminergiques. Cela rejoint les observations de Beaman, qui ont montré que *N. cyriacigeorgica* GUH-2 allait préférentiellement coloniser les zones présentant ce type de neurones et notamment la substance noire (Ogata and Beaman, 1992). La co-culture de nématodes avec des composés produits par les souches de *Nocardia* pourraient induire le même type de lésions sur les neurones dopaminergiques et diminuer la florescence des nématodes. L'étude de Caldwel *et al.* (2009), a montré qu'un composé seul était capable d'entrainer des lésions sur les neurones de nématodes (Caldwell *et al.*, 2009), cependant la présence de l'agent bactérien en temps que vecteur du composé jusqu'aux neurones pourrait être une condition nécessaire à la perte du signal de fluorescence observée.

La caractérisation des métabolites produits par les PKS et NRPS pourrait non seulement aider à la compréhension de l'implication de *N. cyriacigeorgica* GUH-2 dans le déclenchement de symptômes parkinsoniens chez l'animal, mais également permettre la découverte de nouvelles molécules telles que des sidérophores ou des antibiotiques.

V. Conclusion du chapitre

L'étude du génome a révélé que *N. cyriacigeorgica* GUH-2 possède un grand nombre de gènes codant des NRPS et des PKS. L'analyse *in silico* de ces gènes a montré une production de peptides pouvant atteindre 13 acides aminés pour le plus grand d'entre eux. Un nocobactine like cluster a été retrouvé chez *N. cyriacigeorgica* GUH-2. Ses similitudes avec le cluster responsable de la synthèse de mycobactine ont laissé penser que *N. cyriacigeorgica* produise également un sidérophore par cet ensemble de CDS. Le cluster de NRPS I a montré que l'un des substrats ajouté à une des molécules produite possède une structure proche de celle de l'époxomicine, connue pour être un inhibiteur du protéasome. *N. cyriacigeorgica* GUH-2 possédant des propriétés neurodégénératives et les inhibiteurs du protéasome étant connu pour leur rôle dans la mort cellulaire, l'étude de l'activité de surnageants de culture de la souche d'intérêt a été entreprise. Elle a permis de montré une activité inhibitrice de composés sécrétés par *N. cyriacigeorgica* GUH-2 sans que ceux-ci aient clairement pu être purifiés ou reliés de manière certaine au métabolisme secondaire.

Il est apparu à ce stade du travail que *N. cyriacigeorgica* GUH-2 possède un fort potentiel de virulence de part ses propriétés infectieuses, son matériel génétique ainsi que son sécrétome. Or, l'espèce *N. cyriacigeorgica* est couramment rencontrée en clinique sans que son réservoir naturel n'ait encore été identifié. La mise au point d'un moyen de détection et l'identification de la niche écologique de cette espèce a donc été l'objet de recherches synthétisées dans la suite du travail. Ce chapitre a bénéficié des connaissances acquises via l'analyse du génome et l'observation de CDS spécifiques à l'espèce *N. cyriacigeorgica*.

CHAPITRE V (PARTIE A) - *NOCARDIA CYRIACIGEORGICA* DANS L'ENVIRONNEMENT : MISE AU POINT D'UN CRIBLE PCR

I. Introduction

Afin d'identifier les habitats préférentiels d'un microorganisme, il est nécessaire de posséder une méthode de détection rapide fiable. Nous avons choisi de mettre en place un crible PCR spécifique de *N. cyriacigeorgica* afin de pouvoir tester la présence de cette espèce sur un grand nombre d'échantillons. La définition d'une telle méthodologie réside dans le choix de la cible du crible. En effet beaucoup de cribles ADN ont été définis à partir de séquences des gènes de ménage tels que l'ARN 16S, *hsp65*, *sodA*, ceci en raison d'une large distribution de ces cibles et de l'importance des banques de données les concernant. Bien que ces cibles aient permis d'élaborer des cribles spécifiques pour les contextes de la microbiologie clinique, leur application sur des échantillons environnementaux pose de nombreux problèmes. La diversité bactérienne au sein d'un gramme d'un sol ou d'un millilitre d'eau de rivière est très élevée et augmente les probabilités d'amplification des cibles chez des espèces voisines.

L'Observatoire Français des Nocardioses (OFN) de la plateforme PARMIC de la SFR U. Lyon 1 étant un partenaire étroit de l'équipe de recherche, nous avons pu bénéficier des acquis de cette structure concernant la diversité génétique des *Nocardia* d'origine clinique et environnementale. L'analyse phylogénétique des séquences des gènes ménagers a montré qu'il existait des différences significatives dans les jeux de séquence confirmant la concordance entre les classifications taxonomiques et génétiques. Cependant, peu de zones suffisamment conservées semblaient pouvoir permettre la définition de crible PCR spécifiques et sensibles. Afin de palier à ce « problème », nous avons opté pour une recherche dans le génome de *N. cyriacigeorgica* GUH-2 de séquences d'ADN spécifiques de cette espèce, et l'élaboration de cribles PCR sensibles permettant l'amplification de souches cliniques et environnementales. Ce travail a conduit à la validation de cribles spécifiques de *N. cyriacigeorgica* mais également du sous-groupe « GUH-2 complex » qui avait été observé lors de l'analyse de la répartition des IG et IS (ch. II) au sein de l'espèce. Un crible PCR pour le clone/complexe clonal GUH-2 a également été élaboré.

Tableau I : Amorces utilisées dans cette étude

CDS name	CDS length	CDS function	Primer Name	Primer Sequence	Amplicon length
nocyr_0300	1470	catalase (*katA* gene)	qIG31tF	5'-TTCATCCGCTCGCAGAAGC-3'	189
			qIG31tR	5'-CTCGGCGTTGATCCACTGATAG-3'	
nocyr_0675	1314	protein of unkown function	0689F	5'-CCAGAAAGGTAATCGCAATG-3'	450
			0689R	5'-GTAACAACTCTTCGAGTATC-3'	
nocyr_0968	408	protein of unkown function	0991F	5'-GAACTGGAGCTTGCGGTATC-3'	404
			0991R	5'-CATTGCGCCGCCGGGTACCTG-3'	
nocyr_1096	894	protein of unkown function	1125F	5'-GAGAATGAGAATGGTGTCG-3'	675
			1125R	5'-GATCTTCTTCCCTTGTGCGG-3'	
nocyr_1391	1248	putative β-lactamase	qIG9rtF	5'-GTAGCCGGCATGGTCAGACTC-3'	79
			qIG9rtR	5'-GTACGACCGCTTGCAACTGCTA-3'	
nocyr_2958	99	protein of unkown function	3036F	5'-CGACGACAATCAGTGAGGAG-3'	678
			3036R	5'-CGCTAATTGTTCTACCTGAG-3'	
nocyr_2959	549	protein of unkown function	3037F	5'-GTGTACTGCGTCAAAGAAGC-3'	458
			3037R	5'-CATTCAACTCGGTACGTCAC-3'	
nocyr_2960	1185	protein of unkown function	3038F	5'-CCTCAGGATATCCCCTGTTG-3'	542
			3038R	5'-CAACAGGGGATATCCTGAGG-3'	
nocyr_2975	1905	protein of unkown function	3054F	5'-GCACGAACTCGATGAAAATG-3'	623
			3054R	5'-CCAATGATACGCGGACGTAG-3'	
			q3054F	5'-CTCACGCCGGACCAAATG-3'	196
			q3054R	5'-GCGCGGCATAGAGGTTGA-3'	
nocyr_3076	390	protein of unkown function	3158F	5'-GAATCCTTCGAATGGCGAGG-3'	374
			3158R	5'-CGACAAGTCCTACTTCACTG-3'	
nocyr_3955	1185	protein of unkown function	4056F	5'-GAGCCGAAAGTGGACAGATG-3'	268
			4056R	5'-CAGAGGTTGAAGCTAGTCTG-3'	
nocyr_4032	336	protein of unkown function	4139F	5'-GTGACCTGGAGTCGGTATGC-3'	312
			4139R	5'-CGAGCAAGTAGACCGGTCAC-3'	
nocyr_4096-nocyr_4097		intergenic sequence	qIG18ltF	5'-GTTCGACCGGCACTGATT-3'	109
			qIG18ltR	5'-CGGTTGCGGGGTGTTTACT-3'	
nocyr_4483	615	protein of unkown function	4598F	5'-GACGAAGGGTTGATCGCTCC-3'	406
			4598R	5'-GGTTTCCGCCGGGCGAATTC-3'	
nocyr_4802	5517	protein of unkown function	4929F	5'-GTACCGAACCAAGGAACAAG-3'	505
			4929R	5'-GTACTCGGTCGTCCCCGATTC-3'	
nocyr_5027	990	protein of unkown function	qIG20ltF	5'-ACGCTGGAACGAGGGAGACAC-3'	172
			qIG20ltR	5'-GTGCGGTCGACGCCATAGTC-3'	
nocyr_5031	825	protein of unkown function	5166F	5'-GCGAATCGAGCTGTGACGAC-3'	553
			5166R	5'-CGAATCGTGATAAGAACCGG-3'	
nocyr_5133	1662	thiamine biosynthesis protein	qIG21ltF	5'-AGGGCCGTCGACCGTATGA-3'	152
			qIG21ltR	5'-GGCTTCGACCTGTTCGTAGTGTTT-3'	
nocyr_5159	549	protein of unkown function	5295F	5'-CTATTCGTACTCGGCGGTGG-3'	406
			5295R	5'-GACGAAGATCTTGACGAACGC-3'	
			q5295F	5'-TTCGCCGACAAACTCACCAA-3'	182
			q5295R	5'-AACGCATTGCTATCCCAGGAA-3'	
nocyr_5404/ nocyr_5405		intergenic sequence	qIG22rtF	5'-CAAGTATCAGGGCGAAGGGTATT-3'	69
			qIG22rtR	5'-GGTCACGCGGGTTTTACTGG-3'	

II. Matériels et méthode

II.1 Sélection des cibles génétiques

Utilisation de l'outil phyloprofile de MaGe (https://www.genoscope.cns.fr/agc/microscope/mage/index.php) pour comparer les CDS de *N. cyriacigeorgica* GUH-2 avec ceux de l'ensemble des génomes présents dans la base de données du Génoscope. Un seuil de 25 % d'identité en acides nucléiques a été choisi. L'outil BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) du NCBI a été utilisé afin de faire une première analyse de la spécificité de cette cible.

II.2 PCR classique

Le logiciel PrimerSelect de DNASTAR® a été utilisé pour définir les amorces PCR à partir des séquences des CDS sélectionnés (tableau I). Ces amorces ont été testées en PCR classiques sur un ensemble d'ADNs extraits d'isolats cliniques et environnementaux appartenant ou non à l'espèce *N. cyriacigeorgica* (tableau II). Les isolats ont été obtenus de la collection de l'OFN et avaient été classés par MLSA et analyses phénotypiques. Les ADNs ont été extraits par une méthode rapide consistant à suspendre 10 à 20 colonies de *Nocardia* dans 100 µL d'eau stérile. Après avoir été agité fortement, le mélange a été chauffé à 55 °C pendant 15 min puis chauffé à 70 °C pendant 15 min en présence de 5 unités d'achromopeptidase. Les cellules ont été ensuite centrifugées et le surnageant contenant l'ADN a été conservé à 20 °C. La réaction de PCR a été effectuée dans un volume final de 25 µL dans lequel ont été mélangés : 1 µL d'ADN extrait, 250 ng de chacune des amorces (tableau I), 1 µL de DNTPs à 10 mM, 2.5 µL de tampon 10X contenant du $MgSO_4$ et 2,5 U d'ADN polymérase *pfu* Invitrogen™. L'amplification a été réalisée sur un appareil C1000 de Bio-Rad. Un volume de 5 µL de produits de PCR a été ensuite mélangé avec 1 µL de tampon de charge (6X) L'ensemble a été déposé sur un gel d'agarose à 1 % dans du tampon TAE 1X (40 mM Tris Acétate pH 8.3, 1 mM EDTA) contenant du bromure d'éthidium (BET) à 0.5 $\mu g.mL^{-1}$. Après une migration d'environ 25 min à 100 V, le gel a été observé sous une lumière UV permettant de visualiser l'ADN.

II.3 PCR quantitative

De nouvelles amorces ont été définies à partir des séquences amplifiées en PCR classique. Nous avons utilisé le logiciel PrimerSelect de DNASTAR® avec comme contraintes : des produits PCR de moins de 200 pb et un pourcentage en GC le plus faible

Tableau II : Souches et isolats cliniques d'Actinobactéries utilisées dans cette étude.

Genomic species	Type strain Culture collection no.	Literature	No. of isolates	Genomic species	Type strain Culture collection no.	Literature	No. of isolates
Nocardia cyriacigeorgica Type strain complex	DSM 44484^T	Yassin *et al* ., 2001	56	*Nocardia otitidiscaviarum*	ATCC 14629^T	Snijders 1924	1
Nocardia cyriacigeorgica GUH-2 complex		Yassin *et al* ., 2001	45	*Nocardia paucivorans*	DSM 44386^T	Yassin *et al* ., 2000	1
Nocardia abscessus	DSM 44432^T	Yassin *et al* ., 2000	2	*Nocardia pseudobrasiliensis*	DSM 44290^T	Ruimy *et al* ., 1996	1
Nocardia africana	DSM 44491^T	Hamid *et al* ., 2001	2	*Nocardia pseudovaccinii*	DSM 43406^T	Kim *et al* ., 2002	1
Nocardia amamiensis	DSM 45066^T	Yamamura *et al* ., 2007	1	*Nocardia veterana*	OFN 04.43		1
Nocardia araoensis	DSM 44729^T	Kageyama *et al* ., 2004	1	*Nocardia vinacea*	JCM 10988^T	Kinoshita *et al* ., 2002	9
Nocardia arthritidis	DSM 44731^T	Kageyama *et al* ., 2005	1	*Corynebacterium amycolatum*	CIP 103452^T	Collins *et al* ., 1988	1
Nocardia beijingensis	OFN 05.18	Wang *et al* ., 2001	1	*Gordonia aichiensis*	ATCC 33611^T	Klatte *et al* ., 1994	1
Nocardia brasiliensis	OFN 04.101	Pinoy, 1913	1	*Gordonia sputi*	ATCC 29627^T	Riegel *et al* ., 1994	1
Nocardia carnea	OFN 05.89	Castellani and Chalmers 1913	1	*Rhodococcus rhodochrous*	ATCC 13808^T	Rainey *et al* ., 1995	1
Nocardia cerradoensis	OFN 2307	Albuquerque de Barros *et al* ., 2003	1	*Streptomyces griseus*	ATCC 23345^T	Liu *et al* ., 2005	1
Nocardia coubleae	DSM 44960^T	Rodriguez-Nava *et al* ., 2007	1	*Rhodococcus*	OFN 08.55		1
Nocardia farcinica	DSM 44665^T	Trevisan 1889	6	*Streptomyces*	OFN 09.230		1
Nocardia higoensis	DSM 44732^T	Kageyama *et al* ., 2004	1	*Gordonia*	OFN 4486		1
Nocardia ignorata	DSM 44496^T	Yassin *et al* ., 2001	1	*Mycobacterium*	OFN 09242		1
Nocardia kruczakiae	DSM 44877^T	Conville *et al* ., 2005	1	*Gordonia bronchialis*	OFN 1829.89	Stackebrandt *et al* . 1989	1
Nocardia ninae	DSM 44978^T	Laurent *et al* ., 2007	1	*Rhodococcus erythropolis*	CIP 102573	Goodfellow and Alderson 1979	1
Nocardia niigatensis	DSM 44670^T	Yassin *et al* ., 2001	1	*Tsukamurella paurometabola*	ATCC 25938^T	Yassin *et al* ., 1995	1
Nocardia nova	DSM 44481^T	Tsukamura 1983	8				

Total strains n=132

Strains code : *N. cyriacigeorgica* "type strain complex": OFN 04.36, 06.129, SE.ET.1.04, 03.39, 04.100, 04.12, 04.92, 05.44, 05.46, 05.48, 05.69, 06.106, 06.38, 06.78, 06.90, 07.02, 07.38, 07.38, 07.77, 07.93, 08.02, 08.119, 08.149, 08.15, 08.82, 09.102, 09.131, 09.15, 09.76, 09.93, 1371., 5305., 6651., 976., AKO.05, CET.IM, COB.05, GE, ISYU.790, ISYU.811, KUP.05, ME, N13, N16, N22, N28, N3, N32, N34, N37, N40, N5, N6, SU.HA, YES.05; *N. cyriacigeorgica* "GUH2 complex": GUH-2, OFN 746, 03.50, 03.54, 03.86, 04.09, 04.107, 04.32, 04.91, 04.95, 0411536B., 05.106, 05.116, 05.128, 05.19, 0517., 06.143, 07.114, 07.186, 07.50, 07.74, 08.163, 08.210, 08.65, 08036177., 09.124, 09.142, 09.17, 09.51, AZA, BA.US, BE1.05, EAA2.05, EK, IN-TU, IS.04, N11, N19, N20, N27, N38, N7, OK.AK, X, YES.HE; *N. abcessus* OFN 04.87; *N. africana* DSM44501; *N. farcinica* IFM 10152, OFN 04.28, 04.48, 04.88, 04.121; *N. nova* OFN 04.37, 04.50, 04.52, 04.79, 04.93, 04.99, 04.104, 04.119; *N. vinacea* OFN 08.43, QAF1-B8, QAF3-B3, B4, B5, B6, B7, B8.

possible (tableau I). Les ADNs bactériens ont été extraits par la méthode de lyse alcaline précédée d'une étape de forte agitation des cellules bactériennes avec des billes de 0.5 mm. La concentration en ADN génomique a été estimée avec un Nanodrop® ND-1000 spectrophotometer (Labtech International, Paris, France) à une longueur d'onde de 260 nm. Les PCR ont été réalisées avec le kit SsoFast™ EvaGreen® Supermix (Bio-Rad, Ivry sur Seine, France) en accord avec les recommandations du kit. La réaction s'est déroulée dans un volume final de 20 µL contenant 500 nmol.L^{-1} de chacune des amorces et 500 µg d'ADN génomique (5 µL par réaction). Des contrôles sans ADN contant le mélange réactionnel avec de l'eau ont été ajoutés à chaque essai. Le thermocycleur utilisée était un CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). Les produits de PCR ont été déposés sur gels d'agarose dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment.

III. Résultats

La recherche via l'outil phyloprofiles de MaGe a permis l'identification de 68 CDS de gènes peu ou pas reconnus dans la base de données du Génoscope qui comprend plus de 550 génomes bactériens. Ces CDS ont été extraits de MaGe et analysés sur la base de données du NCBI par BLAST afin de déterminer le pourcentage de recouvrement et d'homologie avec les séquences de cette base de données. Cette procédure a permis l'élimination de 45 CDS qui possédaient soit des homologues au sein d'autres espèces ou une trop grande conservation de certains domaines et pouvant induire un manque de spécificité du crible en cours de développement. Les 14 CDS montrant une bonne spécificité dans les banques de données ont été utilisés comme point de départ dans le développement des cribles PCR et la définition des amorces.

Les amorces définies ont été testées sur des échantillons d'ADN provenant de neuf isolats environnementaux de *N. cyriacigeorgica*. Le choix d'utilisation d'isolats environnementaux a été fait en raison d'une diversité attendue plus grande au sein de ce groupe que chez les isolats cliniques de *N. cyriacigeorgica*. Les souches de ce premier crible ont également été sélectionnées pour obtenir un équilibre dans le nombre d'isolats pour les deux complexes observés par analyse des IS/IG et ayant révélé un « GUH-2 complex » et un « type strain complex ». Durant cette recherche d'un marqueur génétique spécifique de l'espèce *N. cyriacigeorgica*, il était important d'éliminer rapidement les gènes cibles n'étant pas retrouvés chez tous ces isolats ; *N. cyriacigeorgica* montrant une forte plasticité génomique et une capacité d'acquisition d'ADN exogènes. Les premiers tests ont confirmé cette grande

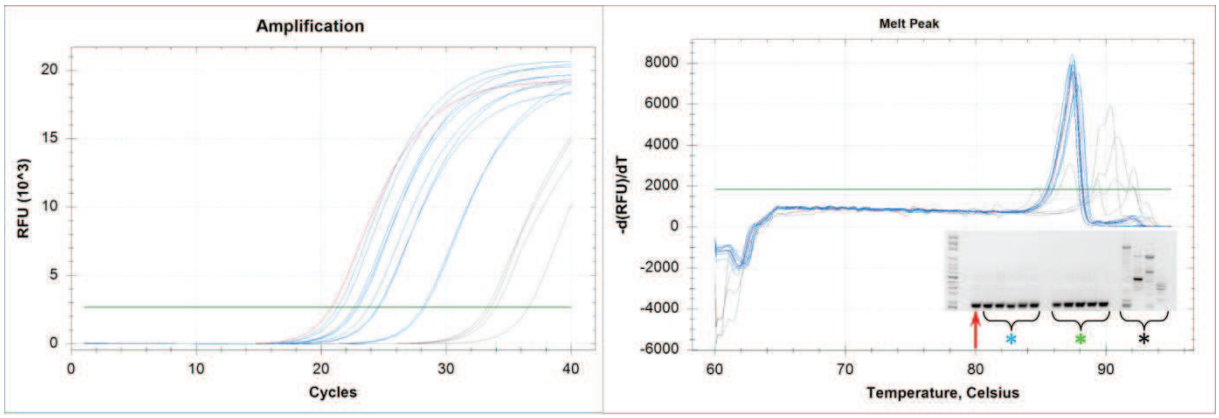


Figure 1 : Courbes d'amplification et de fusion de PCRq du crible *nocyr_5021* avec les amorces qIG20lt. Les courbes rouges représentent l'amplification de l'ADN de la souche *N. cyriacigeorgica* GUH-2. Les courbes bleues représentent les amplifications des ADNs d'autres isolats de l'espèce *N. cyriacigeorgica*. Les courbes grises représentent les amplifications des ADNs d'autres isolats de *Nocardia*. Le résultat d'électrophorèse en gel d'agarose des produits PCR est présenté : ↑ = GUH-2, * = « GUH-2 complex », * = « type strain complex », * = autres *Nocardia*.

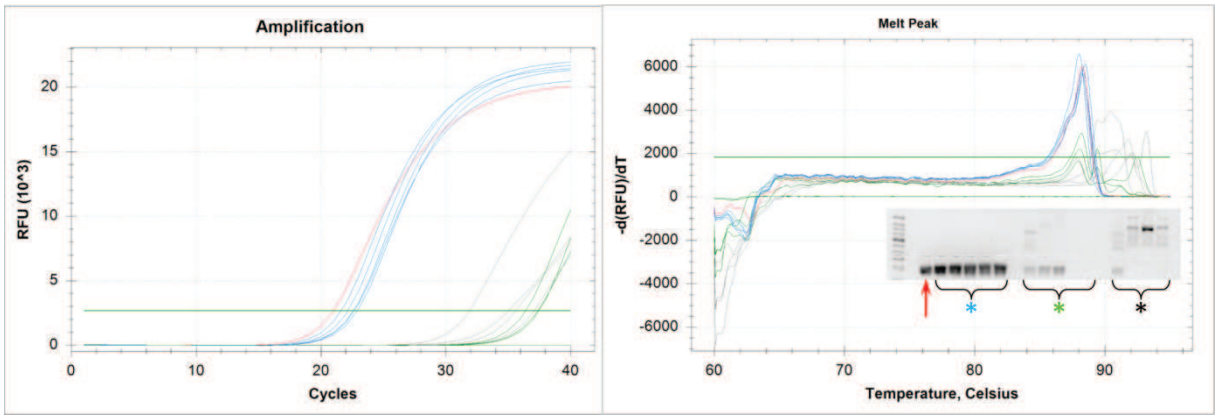


Figure 2 : Courbes d'amplification et de fusion PCRq du crible *nocyr_5159* avec les amorces q5295. Les courbes rouges représentent l'amplification de l'ADN de la souche *N. cyriacigeorgica* GUH-2. Les courbes bleues représentent les amplifications des ADNs d'isolats appartenant au « GUH-2 complex ». Les courbes vertes représentent les amplifications des ADNs d'isolats appartenant au « type strain complex ». Les courbes grises représentent les amplifications des ADNs d'autres espèces de *Nocardia*. Le résultat d'électrophorèse en gel d'agarose des produits PCR est présenté: ↑ = GUH-2, * = « GUH-2 complex », * = « type strain complex », * = autres *Nocardia*.

flexibilité génomique. Peu de cribles PCR (n=4/14) ont permis d'observer une prévalence des cibles chez l'ensemble des isolats testées. Seuls les CDS *nocyr_0968*, *nocyr_2960*, *nocyr_2975*, et *nocyr_3956* ont été détectés chez ces isolats. Les autres CDS ont semblé être restreints au génome de *N. cyriacigeorgica* GUH-2. Par contre, un crible ciblant le CDS *nocyr_5191* a suggéré une répartition restreinte au « GUH-2 complex ».

Les cinq cribles PCR montrant une bonne sensibilité ont été testés sur un plus grand nombre d'ADN (n=132) extraits d'isolats cliniques et environnementaux appartenant aux deux complexes de *N. cyriacigeorgica* mais également aux espèces *N. abscessus*, *N. asiatica*, *N. asteroides*, *N. carnea*, *N. farcinica*, *N. nova*, *N. paucivorans* et *N. vinacea* (tableau II). Ces tests ont eu pour objectif de vérifier la sensibilité et spécificité des cribles. Les amorces ciblant les CDS *nocyr_0968*, *nocyr_2960* et *nocyr_3956* ont donné des produits PCR de la taille attendue avec des ADN d'autres espèces de *Nocardia* que *N. cyriacigeorgica* suggérant une faible spécificité malgré une absence dans le génome de la souche séquencée de *N. farcinica*. Les cribles PCR des CDS *nocyr_2975* et *nocyr_5191* se sont avérées spécifiques de la souche *N. cyriacigeorgica* GUH-2 et du « GUH-2 complex », respectivement. Les tests sur les ADN des autres espèces de *Nocardia* n'ont pas donné de signaux PCR et ont démontré la spécificité de ces deux cribles sur l'ensemble des isolats testés.

Ces essais n'ont cependant pas permis d'identifier une cible qui serait présente dans l'ensemble des isolats de l'espèce *N. cyriacigeorgica*. Les travaux menés sur la prévalence des IGs (partie III) de GUH-2 au sein de l'espèce *N. cyriacigeorgica* ont montré que certains îlots ou extrémités d'îlots étaient présents chez plus de 80 % des souches de cette espèce. Ces cribles IG-spécifiques ont donc été utilisés, en complément des cribles *nocyr_2975* et *nocyr_5191* pour l'élaboration de cribles au format PCR quantitative.

De nouvelles amorces ont été dessinées pour satisfaire aux exigences de cette méthodologie. Huit couples d'amorces ont été définis et testés : six afin de trouver un marqueur génétique spécifique de l'espèce *N. cyriacigeorgica*, un pour le « GUH-2 complex » et un pour *N. cyriacigeorgica* GUH-2. Des tests de ces cribles PCRq ont été réalisés avec des ADN extraits d'isolats cliniques et environnementaux représentatifs des deux complexes de l'espèce *N. cyriacigeorgica*. Ces tests ont montré un manque de sensibilité ou de spécificité de cinq cribles (couples d'amorces) définis à l'échelle de l'espèce ; certains produits PCR issus de ces cribles ont montré de grandes différences dans les courbes de fusion suggérant une amplification de faux-positifs. Les essais réalisés sur 101 ADN extraits d'isolats de *N. cyriacigeorgica*, 50 ADN extraits d'autres espèces de *Nocardia* et 7 ADN extraits des genres proches de *Nocardia* ont permis de validées trois couples d'amorce permettant la

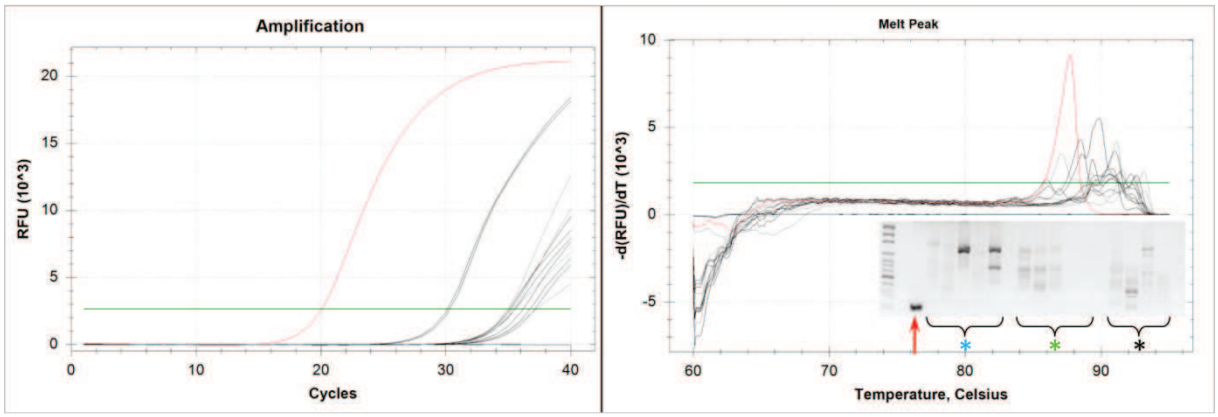


Figure 3 : Courbes d'amplification et de fusion qPCR du crible *nocyr_2975* avec les amorces q3034. Les courbes rouges représentent l'amplification de l'ADN de la souche *N. cyriacigeorgica* GUH-2. Les courbes grises représentent les amplifications des ADNs de souches appartenant à l'espèce *N. cyriacigeorgica*, ainsi qu'à d'autres espèces de *Nocardia*. Le résultat d'électrophorèse en gel d'agarose des produits PCR est présenté : ↑ = GUH-2, * = « GUH-2 complex », * = « type strain complex », * = autres *Nocardia* autres que *N. cyriacigeorgica*.

détection de souches de l'espèce *N. cyriacigeorgica* à différentes échelles de sensibilité (clone, complexe GUH-2 et espèce). Après optimisation, les conditions de PCR pour les trois couples d'amorces ont été les suivantes : une étape de dénaturation à 95 °C, suivie de 40 cycles de dénaturation à 95 °C pendant 10 secondes, d'hybridation à 59 °C pendant 10 secondes et d'élongation à 72 °C pendant 20 secondes.

L'utilisation des amorces de la cible qIG20lt a montré que l'ensemble des ADN extraits d'isolats appartenant à l'espèce *N. cyriacigeorgica* possédait cette séquence. Ces amorces ont été définies après avoir constaté que l'extrémité de l'GI-Cy20 semblait être présente dans 82 % des isolats testés selon la procédure définie dans le chapitre III. L'amorce qIG20ltF cible la séquence intergénique située entre *nocyr_5026* à l'extérieur du GI-Cy20 et *nocyr_5027* faisant partie du GI-Cy20 alors qIG20ltR cible la séquence codante du gène *nocyr_5027* qui est un gène de fonction inconnue. L'amplicon PCRq a une taille attendue de 172 pb et possède un pourcentage en G+C de 61.6 %. Des dilutions en cascade d'ADN génomique ont montré une bonne sensibilité de cette cible jusqu'à des quantités d'ADN génomique comprises entre 50 et 500 fg. Un génome de *Nocardia* étant estimé entre 6.78 fg (*N. cyriacigeorgica* GUH-2) et 6.89 fg (*N. farcinica* 10152), ces amorces devraient permettre la détection de 8 à 80 équivalents génomes. Les courbes de fusions de l'amplicon ont indiqué un pic unique centré à 87.70 °C (+/- 0.5 °C) (figure 1). Les ADN extraits d'isolats n'appartenant pas à *N. cyriacigeorgica* ont quelquefois donnés des produits PCR mais avec un temps de cycles (C(t)) plus long et caractérisé par des courbes de fusions à plusieurs pics. Les analyses par électrophorèse ont montré l'obtention de produits PCR de taille attendue pour les souches de *N. cyriacigeorgica*. Pour les autres espèces de *Nocardia* et d'Actinobactéries, les analyses par électrophorèse n'ont pas révélé de produits PCR ou des produits de tailles différentes de la taille attendue (figure 1).

Le même type de schéma de sensibilité des cribles PCRq a été observé pour les amorces q5295 (*nocyr_5159*) et q3054 (*nocyr_2975*) avec des détections de 8 à 80 équivalent génomes. Les ADN n'appartenant pas au clone ou au complexe visé n'ont pas été amplifiés ou avec des C(t) plus grand et des courbes de fusion avec des pics multiples, ceci se traduisant par une absence ou plusieurs bandes lors d'une analyse par électrophorèse en gel d'agarose (figure 2 et 3). Les résultats obtenus avec ces deux couples d'amorces étaient en accord avec les résultats de PCR classique. Les amorces q5295 ont permis l'amplification PCR d'un fragment de 182 pb avec un pourcentage en G+C de 59.3 % à l'intérieur du gène *nocyr_5159*. Le pic de la courbe de fusion de l'amplicon était centré autour de 88.3 °C (+/- 0.3 °C) (figure 2). Cependant, un groupe d'isolats appartenant au « GUH-2 complex » n'ont pu être

amplifié dans de bonnes conditions avec ces amorces suggérant un problème de sensibilité. Les amorces q3054 ont amplifié un fragment de 196 pb contenant un taux en G+C de 60.2 % à l'intérieur du gène *nocyr_2975* et dont le pic de fusion était centré à 88.10 °C (+/- 0.5 °C) (figure 3).

IV. Discussion

Ces travaux ont permis de valider des cribles PCR classiques et de type PCR quantitative. Trois cibles spécifiques de l'espèce *N. cyriacigeorgica* ont été identifiées et utilisées. La stratégie développée diffère de celle employée le plus couramment puisque les cribles ciblent des gènes de fonction inconnue et ont pu être élaborés grâce à l'obtention du génome de la souche *N. cyriacigeorgica* GUH-2. Les cribles développés ont bien rendu compte de l'efficacité de cette stratégie puisque nous avons pu atteindre un niveau de détection et de sensibilité permettant d'étudier la prévalence d'un clone et d'un sous-groupe (complexe GUH-2) au sein d'une espèce. Nous avons également pu remarquer que la définition de deux complexes au sein de l'espèce *N. cyriacigeorgica* selon des critères phylogénétiques avec des divergences significatives dans les jeux de données *sod* (Rodriguez-Nava *et al*., pers. com.) et des critères de plasticité génétique avec une répartition différentielle des IGs au sein de l'espèce, a été confortée par le crible *nocyr_5159* qui a montré une répartition spécifique de cette cible au sein du « GUH-2 complex » malgré une localisation hors IG. Ces résultats ont rejoint ceux apportés par la MLSA des *Nocardia* (McTaggart *et al.*, 2010) dans lequel la phylogénie réalisée a montré que l'espèce *N. cyriacigeorgica* se sépare en trois complexes de souches. Pour valider définitivement cette concordance entre jeux de données, il faudrait confronter l'ensemble des isolats de McTaggart aux mêmes techniques : la PCR sur les IG, la phylogénie *sodA* et la PCR spécifique du « GUH-2 complex ».

En plus de ces deux marqueurs, les amorces qIG20lt ont permis d'élaborer un crible PCR spécifique et sensible au niveau de l'espèce *N. cyriacigeorgica*. Pour ces amorces, la stratégie mise en place était plus risquée puisqu'elle cible une zone liée au GI-Cy20. L'IG étant par définition une séquence de gène se déplaçant au sein d'un génome ou entre des génomes de famille plus ou moins rapprochée, la possibilité que cette séquence soit présente dans d'autres souches que celles appartenant à *N. cyriacigeorgica* était non-négligeable. Seulement, les marqueurs de transferts tels que les tRNA ou les séquences inversées répétées n'étaient plus présentes aux bordures du GI-Cy20 suggérant une fixation stable. Afin de s'assurer de la spécificité de ce crible, les amorces ont été placées dans une séquence codante

(amorce qIG20ltR) et dans une séquence non codante (amorce qIG20ltf). Ces choix devraient permettre une utilisation du crible sur des échantillons tant cliniques qu'environnementaux.

Les *Nocardia* représentent avant tout un danger potentiel pour la population humaine. Elles sont présentes dans un grand nombre d'infections sur les territoires de l'hémisphère nord (Rodriguez-Nava *et al.*, 2008 ; Schlaberg *et al.*, 2008), dans l'hémisphère sud avec une grosse proportion de mycétome en Amérique du Sud et centrale (Munoz-Hernandez *et al.*, 2009) et le sont probablement aussi en Afrique noire avec un certain nombre de cas de nocardioses recensés (Chevalier *et al.*, 2009 ; Lowman and Aithma, 2010). La faible proportion de ces cas sur le continent africain vient principalement du fait que la nocardiose ne présente pas de symptômes caractéristiques et est difficile à diagnostiquer. Elle peut être facilement confondue avec une infection par une mycobactérie ou un virus (Beaman and Beaman, 1994). Cette infection étant généralement éliminée correctement suite à un traitement par antibiotique, la caractérisation de l'agent infectieux est rarement effectuée. Cependant différents cas ont été rapportés de traitement inadapté lors d'un traitement d'une nocardiose pulmonaire ou cutanée (Ambrosioni *et al.*, 2010 ; Sullivan and Chapman, 2010). L'utilisation de marqueurs génétiques spécifiques pour les *Nocardia* aurait ici permis de déterminer la nature de l'agent infectieux par PCR et d'apporter ainsi un traitement adapté. Il est vrai que le test PCR pour la détection des *Nocardia* existe déjà (Laurent *et al.*, 1999) et que les profils de sensibilité aux antibiotiques sont aussi largement décrits pour les différentes espèces de *Nocardia* (Brown-Elliott *et al.*, 2006). Seulement, dans le cas ou l'espèce *N. cyriacigeorgica* est l'agent le plus retrouvé dans ce type d'infection et où un test simple permet de la détecter, il serait surement préférable d'adapter le traitement de l'infection à l'espèce bactérienne en cause plutôt que d'administrer un traitement empirique pour l'ensemble du genre. Ceci pourrait permettre d'éviter l'émergence de *Nocardia* résistante au traitement et la dissémination de ces résistances dans le genre bactérien puisque ces génomes semble posséder une bonne capacité d'acquisition d'ADN exogènes (partie III).

Ces marqueurs pourraient aussi avoir un rôle dans le suivi de l'infection bactérienne chez le patient. En effet on sait que le site d'infection primaire est le poumon et que la dissémination à des organes secondaires tels que le cerveau, le cœur, le foie la rate et les reins se fait par voie hématogène (Rodriguez-Nava *et al.*, 2008). Le contrôle de la quantité de cellules bactériennes dans le sang pourrait alors être un bon indicateur du stade d'avancement de l'infection et du suivi de l'évolution de celle-ci. On pourrait aussi imaginer que les deux complexes de souches possèdent des potentiels de virulence distincts. Ainsi, il pourrait être

important de savoir à quel complexe appartient l'isolat de *N. cyriacigeorgica* retrouvé dans une infection afin d'apporter un pronostic plus détaillé sur l'infection.

Enfin ces marqueurs pourraient avoir un rôle déterminant dans la découverte des habitats préférentiels de *N. cyriacigeorgica*. Bien que cette espèce soit parmi les plus couramment identifiées lors des infections à nocardioses son habitat reste inconnu. Elle a été identifiée dans des sols qui présentaient la caractéristique d'avoir été contaminée par des hydrocarbures (Khan *et al.*, 2000 ; Quatrini *et al.*, 2008). Ceci nous laisse penser que ce type de pollution pourrait favoriser le développement de cette espèce, d'autant plus qu'elle semble posséder l'ensemble de la machinerie enzymatique lui permettant d'utiliser ce type de substrat comme source d'énergie (Le *et al.*, 2010). Toutefois, pour pouvoir se développer sur ce type de milieu, la bactérie doit être présente au départ dans le site qui va subir la contamination ou doit être apportée par un moyen extérieur. La question se pose alors de savoir si l'espèce *N. cyriacigeorgica* est ubiquiste du sol comme semble l'être le genre *Nocardia* mais en proportion trop faible pour qu'elle puisse être détectée ou si celle-ci se développe ponctuellement dans des environnements au gré des sources de nutriments disponibles et des potentialités métaboliques nouvellement acquises. Les analyses du Ch. III suggèrent en effet que cette Actinobactérie à une capacité d'adaptation fortement reliée à ses activités d'échanges génétiques/ d'acquisition d'ADN.

CHAPITRE V (Partie B) - *NOCARDIA CYRIACIGEORGICA* DANS L'ENVIRONNEMENT. DISTRIBUTION OF *N. CYRIACIGEORGICA* IN FRENCH SOIL

I. Introduction

Nocardia are partially acid fast, filamentous Gram-positive aerobic Actinobacteria. *N. cyriacigeorgica* is characterized by a sensitivity drug pattern type VI: resistant to ampicillin, amoxicillin-clavulanic acid, clarithromycin, ciprofloxacin and susceptible to ceftriaxone, amikacin, linezolid, and imipenem (Wallace *et al.*, 1988; Yassin *et al.*, 2001; Conville and Witebsky, 2007). The preferential habitats of this species remain mainly unknown but soils contaminated by hydrocarbons led to the isolation of several strains. Members of this species have many similarities but several results in molecular phylogeny and IG/ IS distribution showed a division into two sub-groups: a "GUH-2 complex" and a "type strain complex" (see chapters III and V) . The *N. cyriacigeorgica* GUH-2 strain was shown to cause brain infection in laboratory animals (mice and primates), including levodopa-responsive movement disorders, and Lewy like bodies which resemble Parkinson's disease (PD) symptoms (Kohbata and Beaman, 1991; Tam *et al.*, 2002; Beaman and Tam, 2008).

Parkinson's disease (PD) is the second-most common neurodegenerative disorder but the factors or the etiologic agents of this disease appear to be multiple. It is a slowly progressive disorder characterized by bradykinesia, rigidity, tremor, and postural instability (Farrer, 2006). The pathological hallmark of Parkinson disease is the degeneration of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars *compacta*, resulting in loss of nigrostriatal pathway and a reduction of dopamine levels in the striatum (Braak *et al.*, 2003). Several studies identified genetic factors as responsible or strongly favoring the PD (Menegon *et al.*, 1998; Lai *et al.*, 2002; Ghione *et al.*, 2007; Frank-Cannon *et al.*, 2008). Although these genetic cases of PD led to the identification of cellular mechanisms involved in this disease, only 5% to 10% of the PD cases are apparently caused by a gene disorder (Rosner *et al.*, 2008). Most PD cases seem to have a sporadic origin. Exposures to particular pharmaceuticals and agro-chemicals seem to be crucial factors in the epidemiology of this illness. In fact, various studies suggested that the rural life style could be an epidemiological contributor to

PD (Manning-Bog *et al.*, 2002; Ghione *et al.*, 2007; Rosner *et al.*, 2008). Pesticides and herbicides like rotenone, paraquat, and MPTP are likely etiologic agent of PD (Manning-Bog *et al.*, 2002). However, this disease is multi-factorial, and these molecules are just one part of a number of factors that can lead to PD symptoms. Anyhow, these molecules allowed the development of animal models for PD investigations (Kolata, 1983; Greenamyre *et al.*, 1999; McCormack and Di Monte, 2003). The mode of action of these molecules, a dysfunction of the ubiquitin-proteasome system (UPS) which is involved in protein degradation, was frequently described in PD (Snyder and Wolozin, 2004). Actinobacterial secondary metabolites inhibiting the ubiquitin-proteasome system were also described such as epoxomicin. These metabolites were shown to cause an impairment of the UPS leading to neurodegeneration in animal models (Mc Cormack *et al.*, 1997). Actinobacteria are now well-known to encode and express proteasomal protein degradation systems having functional similarities with the ones of higher organisms (Pouch 2000, Nagy 1998, Pearce 2006), A synthesis of proteasomal inhibitors by such eubacteria could thus be explained by a functional contribution in the regulation of these proteasomes. *N. cyriacigeorgica* GUH-2 was shown to be able to invade the brain of experimental animals and cause dopaminergic neurons apoptosis and proteasome inhibition (Barry and Beaman, 2007). Culture filtrates of this strain were found to inhibit the ubiquitin-proteasome system (UPS) of eukaryotic cells suggesting that *N. cyriacigeorgica* GUH-2 could probably produce these inhibitors while infecting brain tissues and lead to neurodegenerative PD like symptoms (Loeffler *et al.*, 2004; Barry and Beaman, 2007).

Soil is a reservoir of *Nocardia* (McNeil and Brown, 1994) but *N. cyriacigeorgica* has been identified only in petrol contaminated soils in Kuwait and Italy (Khan *et al.*, 1997; Quatrini *et al.*, 2008). However, this is not indicative of a low prevalence of this species in outdoor environments which can lead to exposure to these Actinobacteria but rather an indication of a major lack of knowledge on the habitats of this species. In fact, this species is frequently responsible of human infections (12% of nocardiosis on French territory) (Rodriguez-Nava *et al.*, 2008) and these records are indicative of a wide distribution of *N. cyriacigeorgica* in the environment. In order to prevent human exposure to this organism, it is thus essential to better define its range of habitats. For this purpose, we investigated the distribution and the abundance of *N. cyriacigeorgica* in soils of five French departments. These regions were also chosen in order to investigate a possible correlation between the geographic repartition of this species and the incidence of the PD (Elbaz *et al*., 2009). To achieve these goals, we set up two approaches to detect *N. cyriacigeorgica* in soils: a culture

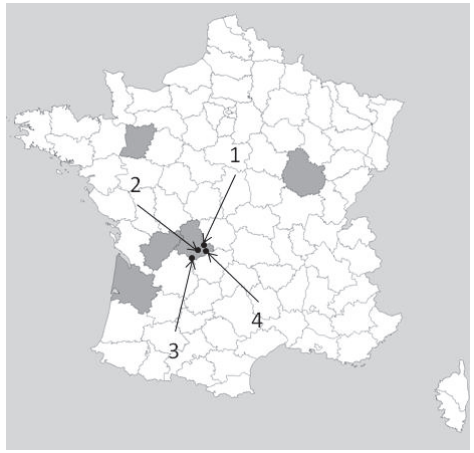
dependent method and a quantitative real time PCR (qPCR) approach targeting specific genes of *N. cyriacigeorgica*. A panel of *Nocardia* species and closely related genera were used to optimize the specificity and the sensitivity of the qPCR. The procedure was then applied on 70 RMQS (Réseau de Mesure de la Qualité des Sols = French soil quality monitoring network) soil DNA extracts from Charente, Côte d'Or, Gironde, Haute Vienne and Mayenne French departments. Crop and pasture fields soil samples from farms where PD cases were reported in the Limousin region were also collected and investigated in this study.

Table I : Environmental French soil samples description and location on a map.

	Environmental sites	Description	Pesticid used	Nb. of samples
	PD case farm			4
1	Champnétry	Cultivated soil : wheat and tritical	Printazol N	1
		Permanent grassland (>10 yrs)	nt	1
2	Saint Genest sur Roselle	Cultivated soil : wheat, tritical and corn	Printazol N	1
		Permanent grassland (>10 yrs)	nt	1
	Control farm			4
3	Saint Yriex	Cultivated soil : wheat, tritical and barley	Printazol N, Isoproturon, Platform S, Oklar, Harmony extra	1
		Permanent grassland (>10 yrs)	nt	1
4	Sussac	Cultivated soil : wheat	Printazol N	1
		Permanent grassland (>10 yrs)	Genoxone ZXE	1
	RMQS library			70
	arable lands	cultivated soils	nk	20
		cultivated soils with alternance of temporary grasslands	nk	7
	waste lands		nk	3
	wooded areas	wood and forest	nk	26
	grasslands	Permanent grasslands (6-10 yrs)	nk	1
		Permanent grasslands (> 10 yrs)	nk	10
	Vineyards and Orchards	Orchards	nk	1
		Vineyards	nk	2

nt=not treated; nk=not kwnown

Numbers of RMQS samples: arable lands cultivated soils: 614, 809, 862, 917, 967, 1009, 1011, 1013, 1280, 1322, 1324, 1332, 1365, 1367, 1405, 1446, 1488, 1531, 1697, 1738; arable lands cultivated soils with alternance of temporary grasslands: 556, 616, 673, 729, 731, 783, 785; waste lands: 1320, 1614, 1739; wooded areas, wood and forest: 755, 811, 915, 1008, 1057, 1282, 1290, 1375, 1407, 1415, 1458, 1527, 1569, 1570, 1574, 1611, 1612, 1651, 1652, 1653, 1695, 1736, 1779, 1782, 1824, 1867; Permanent grasslands (6-10 yrs): 1456 Permanent grasslands (> 10 yrs): 558, 675, 913, 963, 965, 1055, 1292, 1417, 1454, 1741; Orchards: 1100; Vineyards: 1656, 1699.



II. Materials and methods

II.1 Environmental samples

A set of 70 samples over 2200 were chosen within the French RMQS (Réseau de Mesure de la Qualité des Sols = French Soil quality monitoring network) soil library. Data relative to this library are stored in the DONESOL database (Grolleau *et al.*, 2004). Soils were chosen based on a study of Elbaz *et al*., 2009 which showed higher occurrence of PD in Charente, Côte d'Or, Gironde, Haute Vienne and Mayenne French department (personnal communication). Other soil samples were collected in agricultural or pasture sites from farms in the Limousin region, France. Samples were collected in May 2008. Agricultural sites correspond to a soil growing cereals and treated with pesticides for many years. Pasture sites were not treated with pesticides, they were used only for feeding animals. Between four to six samples were taken per site. Soils of each site were pooled to have an averaged representative sample per site. Eight different soil samples were finally studied: two conditions (agricultural and pasture) were sampled among four farms. Soil features are indicated on Table 3.

II.2 Isolation and identification of *N. cyriacigeorgica* from soil samples

Nocardia isolation from soil samples were performed using Bennett medium supplemented with actidione 50µg.mL^{-1}, nystatine 50µg.mL^{-1} and metacyclin 10µg.mL^{-1} (final volume). Soil suspensions were prepared by blending 5g sieved soil (dry wt) in 50mL of cold saline solution for 1 min in a Waring blender. Homogenized soil suspensions and freshwater samples were serially diluted in sterile saline solution, and 100µL from 10^1 to 10^5 dilutions were spread in triplicate on agar plates. Plates were incubated aerobically for 5 days to 3 weeks at room temperature (~25°C). Small, dry and colored (from white to red colonies) were selected. Rapid DNA extraction was performed by the suspension of 10 to 20 colonies in 100µL of sterile water. The mixture was heated at 55°C for 15min and 5 units of achromopeptidase was added before putting suspension at 70°C for 15min. Cells were centrifugated and the supernatant containing DNA was conserved at -20°C. Allocation of strains to the *Nocardia* genus was performed using the NG1 and NG2 PCR screening (Laurent *et al.*, 1999). Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) was applied to positive *Nocardia* strains using the *sod* PCR RFLP scheme. Restrictions with *Bgl*I, *Mbo*I and *Scfr*I enzymes (FastDigest Fermentas) were performed on a *sod* gene fragment amplified by PCR using the SODv1 (5'-CACCAYWSCAAGCACCA-3') and SODv2 primers (5'-CCTTGACGTTCTGGTACTG-3') primers. PCR reactions were performed in a final volume

of 25µL. An annealing temperature of 56°C was applied and a 450pb fragment was expected. Restriction products were visualized by electrophoresis using 3% agarose gels, staining with ethidium bromide, and exposure to UV light. These profiles allowed a quick allocation of the recovered 223 *Nocardia* isolates into their respective species. Some NG PCR (16S RNA) products were sequenced at Biofidal Inc. DNA sequencing service (Vaulx-en-Velin, France).

II.3 Genomic DNA extraction and purification

Bacterial genomic DNA was extracted by alkaline lysis method preceded by 5min of fast vortex with 0.5mm sterile beads. DNA from Limousin soil samples was extracted with the FastDNASPIN® Kit (For Soil) (BIO 101, Inc., Carlsbad, France) following the manufacturer instructions; each soil was extracted three times. DNA from soils of the RMQS grid was extracted by the GenoSol platform (Ranjard *et al.*, 2009), according to a single optimized procedure (Ranjard *et al.*, 2003). DNA extracts were resolved by electrophoresis in a 0.8% agarose gel, stained with ethidium bromide and photographed using a Gel Doc 1000 camera (Bio-Rad, Ivry sur Seine, France). DNA concentration in the crude and purified soil extracts was determined by electrophoretic comparison with a standard curve as previously described (Ranjard *et al.*, 2006). Concentration of genomic DNA was estimated using a Nanodrop® ND-1000 spectrophotometer (Labtech International, Paris, France) at 260nm wavelength.

II.4 *Nocardia cyriacigeorgica* specific quantitative real-time PCR (qPCR)

Sequencing project of *N. cyriacigeorgica* GUH-2 genome was initiated by our research team (= Opportunistic pathogen bacteria and environment). Comparative genomic with *N. farcinica* 10152 genome (single *Nocardia* genome sequenced (Ishikawa *et al.*, 2004)) and other Actinobacteria genomes allowed identifying genes specific for GUH-2 strain. The DNASTAR software was used to design primers for these genes (Table 2).

The SsoFast™ EvaGreen® Supermix (Bio-Rad, Ivry sur Seine, France) was used, according to the manufacturer instructions. Reactions were set up in a final volume of 20µL having 500nmol.L^{-1} of each primer, according to the manufacturer instructions. Five nanograms of soil DNA (5µL for RMQS DNA and 2.5µL for Limousin DNA) and 500pg of strain genomic DNA were used as templates (5µl each *per* reaction). Non-template controls, including the reaction mix with sterile water in place of DNA template, were added to each run. Quantitative PCR was performed in a CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-

Rad). The following PCR protocol was applied: initial denaturation at 95°C for 5min, followed by 40 cycles with denaturation at 95°C for 10s, annealing/elongation at 63°C for 20s for qIG20lt, q5295 and q3054 primers; an annealing/elongation step at 62°C for 20s was applied only for 16S2 primers (16S2F 5'-CCTTACCTGGGTTTGACATACAC-3'; 16S2R 5'-TACGCGCTGGCAACATAAGATA-3'). Subsequently a melting curve was recorded by increasing the temperature from 65°C to 95°C (2.5°C every 10s). For reproducibility, assays were realized in duplicates or triplicates on separate plates. qPCR data were expressed in genome-equivalent (GE) or cell (1 cell corresponding to 1 GE), and as the means of duplicate or triplicate determinations and 1 standard deviation. Testing of qPCR specificity with environmental DNA and the evaluation of the inhibitory potential of DNA extracts was carried out by adding 2ng of Sussac soil DNA (2.5µL *per* reaction) in each dilution of a standard of genomic DNA of strain *N. cyriacigeorgica* GUH-2. In order to check for PCR inhibitors in the RMQS soil DNAs, 10^6 copies of the circularized pGEM-T Easy plasmid DNA (2.5µL *per* reaction) were added to 9 DNA extracts (0.5, 1, 2.5 and 5ng) selected for their contrasting structure and physico-chemical properties (Table 2), and quantified afterwards by comparison with a 10-fold diluted standard of pGEM-T Easy plasmid DNA (10^1 to 10^7 copies, 2.5µL each *per* reaction). Real time PCR reactions and cycling conditions were as stated above, except the primers used which were SP6 and T7 universal primers, and the annealing temperature which was set up to 55°C. Specificity of PCR products was checked by melting curve analysis (Tm of 88°C). A 10-fold reduction of the copy number amplified by qPCR with respect to the copy number introduced in the reaction mixture was considered as 10% of amplification efficiency, and inversely proportionally as 90 % of inhibition. Prevention of inhibiting effects was tested adding different amounts of T4 gene 32 protein (25, 50, 75 and 100ng μL^{-1}, Roche Diagnostics) in the qPCR reaction

III. Results

III.1 Influence of soil inhibitors and optimized conditions for soil DNA screening

To allow the best detection sensitivity, we checked for the presence of PCR inhibitors. Assays on a ten fold dilution series of pGEM-T Easy plamid DNA (10^7 to 1) was realized, and 10^6 copies of plasmid was added to 5 ng (2.5 µL) of soil DNA for quantification. A comparative test with and without T4 gene 32 protein, shown that soil DNA had not a strong inhibitor potential because amount of plasmid detected was between $6.04*10^5$ and $2.68*10^6$ plasmid copies depending on soil DNA extraction. The addition of T4 gene 32 protein at $25ng.\mu L^{-1}$ increased the sensitivity of the qPCR, between $1.82*10^6$ and $3.79*10^6$ plasmid copies were detected.

III.2 Detection of *N. cyriacigeorgica* in environmental samples by qPCR targeting *nocyr_5027*

Based on the results of optimization tests, qPCR in environmental samples were set up with 5ng (2.5µL) of soil DNA, 750 nmol.L-1 of each primers and 25ng.µL-1 of T4 gene32 protein (final volume). None of the DNA replicates of the overall the 70 RMQS soil sample was positive. Melting curves showed several picks and none of them were at the expected temperature of 87.5°C. Gel electrophoresis showed several bands in each sample with none at the expected size (data not shown). Assays on DNA extracted from Limousin soils gave similar results; none emitted a positive fluorescence signal. These data suggested that *N. cyriacigeorgica* GUH-2 was absent in these soils or present at quantities lower that 80 GE per qPCR which is equivalent to less than 10^4 $cell.g^{-1}$ soil (dry wt).

III.3 Detection of *Nocardia* DNA in environmental sample by qPCR targeting 16S rDNA

Nocardia and closely related genera were quantified in soils from farms of Limousin and RMQS using 16S2 primers. Pasture Limousin soil contained between 55.3 and 203 pg of target DNA which is equivalent to 2.93×10^3 and 1.08×10^4 GE because the average 16S copy number *per Nocardia* genome was chosen to equal to 3, according to the number of *rrn* operons of this genus observed in *N. farcinica* and *N. cyriacigeorgica*. Culture Limousin soil contains between 4.37×10^3 et 9.88×10^3 GE. The abundance of *Nocardia* is similar in pasture and cultured soil and non significant differences was observed between two types of soil of a same exploitation. Quantification data on RMQS samples range between 1.48×10^4

GE and 3.75 x 10^2 GE of *Nocardia.* One soil, RMQS 614, not showed a positive signal (data not showed).

III.4 Isolation of *N. cyriacigeorgica* from environmental samples

All soil samples from Limousin were tested for the isolation of culturable *N. cyriacigeorgica*. Dilutions of 10^3 or 10^4 were the ones which allowed isolation of the highest amount of *Nocardia* strains because colonies were sufficiently well-separated on plates to allow growth of *Nocardia* away from other bacteria which grow more quickly on these plates. The culture medium chosen was not specific for *Nocardia* strains, although antifungal and antibacterial drug were used. Fungus, Gram negative bacteria and Actinobacteria other than *Nocardia* were frequently seen on the plates. Environmental colonies of *Nocardia* have a growth rate that can be very different from one to another. The first colonies were observed 4 days after spreading on the plates and the last ones appeared 3 weeks later. Two hundred and twenty three colonies of *Nocardia* were obtained and confirmed by the *Nocardia* NG PCR (Laurent *et al*., 1999). RFLP on *sod* gene was chosen to allocate these isolates to a particular species. PCR amplification of *sod* gene gave an amplicon of 450 pb which was digested with *Bgl*I, *Scrf*I and *Mbo*I. Five RFLP profiles were obtained (Table 4) and the enzyme *Mbo*I was found the most discriminant one giving 5 profiles whereas BglI and ScrfI gave only 2 or 3 RFLP profiles, respectively. The result of 16S RNA sequencing on several members of each RFLP profile, showed that one profile was not specific to one species. For example, strains were identified as *N. inohanensis* by 16S rDNA analysis but produced several *sod* restriction profiles such as type I, II and IV. Furthermore, 16S rDNA of isolate found in restriction profile I and III were shown as being *N. jiangxiensis*; and those of profile V as being *N. pseudovaccinii* and *N. nova*. Restriction profiles II and IV seems to be specific of *N. inohanensis* but not exclusive because members of this species were found among profile I. Restriction profile III seemed to be specific for *N. jiangxiensis* but not exclusive because isolates belonging to this species were found in profile I.

Several *Nocardia* strains isolated from soils of the Limousin region were negative using the *sod* PCR screening. 16S RNA sequencing on these strains showed the presence of the same four species: *N. inohanensis, N. jiangxiensis, N. pseudovaccinii* and *N. nova*. According to these experimentations, we can conclude that we were not able to isolate *N. cyriacigeorgica* strains by the culture dependent method used in this study.

Table II : SOD profiles obtained

	***Bgl* I**	***Mbo* I**	***Scrf* I**
Profil 1	170, 280	70, 100, 240	70, 320
Profil 2	170, 280	210, 250	70, 320
Profil 3	170, 280	90, 140, 220	70, 320
Profil 4	170, 280	450	100, 210
Profil 5	450	100, 360	80, 130, 260

IV. Discussion

The aim of this study was to evaluate the prevalence and abundance of *N. cyriacigeorgica* in soils and bring the first insights about environmental habitats that could expose human to these Actinobacteria. Attempts at relating the soil repartition of this species with the epidemiology of PD cases in France were also planned but no *N. cyriacigeorgica* strains could be detected in the selected soils of this study. *N. cyriacigeorgica* accounts for up to 35% of *Nocardia* strains recovered from patients in the southern United States (Schlaberg *et al.*, 2008) and 12% in France (Rodriguez-Nava *et al.*, 2008). Because of the variety, the large amount of microorganisms and the concentration of the targeted bacterial population in a soil sample, it is very difficult to identify the habitat of a bacterial species. The cultural approach was efficient when specific cultural media were used; they allowed high detection sensitivity for *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia* strains (Dérédjian thesis, 2010). For now, there is no specific cultural media for *Nocardia*, it was necessary to set up a complementary method to cultural approaches. The development of a real time quantitative PCR method had a lot of advantages: the rapidity gave the ability to screen much more samples than classical ones and smallest soil microbial population could be quantified (even non culturable bacteria) (Linke *et al.*, 2010). Here was presented the first report of this approach for the screening of *Nocardia* species. Information obtained thanks to *N. cyriacigeorgica* GUH-2 genome sequencing was a key point in this technical set up. *nocyr5027*, *nocyr5159* and *nocyr2975* CDS acquisition was certainly implicated in the emergence of *N. cyriacigeorgica*, the "GUH-2 complex", and GUH-2 itself because of the observed distribution of these targeted DNAs.

Although qPCR gave satisfying results of sensitivity and specificity using DNA genomic tests, and soil DNA spiked in DNA of interest, we were not able to amplify DNA from *N. cyriacigeorgica* in soil DNA extracts. We could wonder whether it was a biological reality *i.e.* no *N. cyriacigeorgica* in these soils or a methodological bias *i.e.* low sensitivity of

the method, presence of inhibitors in soil DNA extracts. Soils contain a lot of substances which can interfere negatively with reagents used for qPCR and particularly polymerase enzyme. The inhibitor power of these soils was tested. Results obtained on DNA extracted by the FastDNASPIN® Kit (For Soil) showed that DNA contained few inhibitors because amounts of plasmid quantified is closed of that one introduced initially. Addition of T4 gene 32 polymerase at 25 $ng.\mu L^{-1}$ in qPCR prevents the inhibition present in extracts and improved the detection efficiency of the targets. Tests on DNA from RMQS showed same results. Finally, 25 $ng.\mu L^{-1}$ (final concentration) of T4 gene 32 polymerase was sufficient to prevent inhibition.

Primers designed from 16S rDNA sequences to be specific for *Nocardia* genus were tested in qPCR. Specificity of these primers was not sufficient because positive signals were observed on DNA extracts from type strains from *Rhodococcus* and *Gordonia* genera. But the utilization of them inform on the presence of *Nocardia* and closely related genera in studied soils. Targeted 16S rDNA was detected. Results showed no abundance differences of *Nocardia* in pasture and cultured Limousin soils suggesting a weak impact of agricultural chemicals on nocardial development propensity. Quantification data on RMQS samples showed that only one soil was *Nocardia* free (RMQS 614). However, *Nocardia* is detected in soils presenting same composition and physico-chemical characteristics (RMQS 1280, 1367, 1738), so we are not able to give an explanation on this absence of signal. These elements reinforced the knowledge about the fact that terrestrial environment constitute a natural environment for *Nocardia*.

The utilization of Bennett media complemented with antifungal and antibiotics drugs permit to have no stringent growth conditions for *Nocardia*. Currently, there is no specific media for *Nocardia* growth. An isolation method by sucrose gradient has been described by Yamamura *et al*., 2003 (Yamamura *et al.*, 2003). After centrifugation of a soil suspension, most of the *Nocardia* population was found to be present in the 20% sucrose layer. Although this method was efficient, there was a possibility that the spiked layers in the rest of genera present can mask the species of *Nocardia* not retained in the 20 % sucrose layer. Khan *et al*., 1997 isolated for the first time *N. cyriacigeorgica* strains from oil polluted environment. They used agar media plates containing paraffin to isolate hydrocarbons degrading species. The same isolation media could not be used in this work because the soils studied do not present the same oil contamination. Bennett complemented media was chosen to investigate our soils, it allows growth of all *Nocardia* species. Several species were isolated and identified by 16S rDNA sequencing four *Nocardia* species: *N. jiangxiensis*, *N. pseudovaccinii*, *N. inohanensis*,

and *N. nova*. *N. cyriacigeorgica* was not detected on agar plates. This is the second report of *N. jiangxiensis*, and *N. pseudovaccini* as soil species (Kim *et al.*, 2002; Cui *et al.*, 2005). *N. inohanensis* was described by Kageyama *et al*. (Kageyama *et al.*, 2004), as a new species responsible of an infection in Mexico (clinical signs not detailed). This was the first report of isolation of this species from environment. *N. nova* species was frequently encountered in clinical samples. It could be responsible for brain abscesses. RFLP on *sod* gene allowed to roughly allocated strains to species but not very reliably. Nevertheless, it avoided sequencing of the 223 isolates. This method has to be improved by the utilization of other enzymes to have a more reliable restriction profiles.

To investigate the distribution and the abundance of *N. cyriacigeorgica* in environments where PD cases were more frequent, the qPCR procedure was applied to 70 RMQS soils from Charente, Côte d'Or, Gironde, Haute Vienne and Mayenne French departments, eight soils from Limousin region of France. *N. cyriacigeorgica* was not detected in any of these soils meaning that it was either present below the detection limit in soil or absent from these environments. These results were in agreement with those obtained with the cultural dependent method. No positive signal was observed using qIG20lt primers therefore q5295 and q3034 primers have not been tested because they screen a smallest part of the bacterial population with a similar sensitivity. *N. cyriacigeorgica* GUH-2 strain could grow in presence of pesticide like paraquat thanks to SOD secreted as a defense mechanism (Alcendor *et al.*, 1995). Hypothesis that utilization of pesticides can select positively this species in environment was not elucidated with this work. Moreover, the pesticides utilization seems to not to have influenced the distribution of *Nocardia* in soil because the same species were retrieved within cultured and pasture soils. Even if potential opportunistic pathogen species are present (*N. nova, N. inohanensis*), *N. cyriacigeorgica* remain absent or was present below the limit of methodology detection. PD is a multifactorial disease that appears to arise from the effects of both genetic and environmental influences. Injection of drugs like MPTP, paraquat or rotenone can provoke PD in animals. These chemical compounds were widely and heavily used in agriculture and might favor the emergence of this disease among farmers. Others etiologic agents were described next to a post-encephalic parkinsonism such as virus or microorganisms (Diaz-Corrales *et al.*, 2004). However, these studies were based on clinical reports and most of them did not clearly show what were the causes of PD. Several research teams have developed animal models (mice and *Caenorhabditis elegans*) involving Actinobacteria (*N. otitidiscaviarum*, *Streptomyces venezuelae*) in neurodegeneration mechanisms (Diaz-Corrales *et al.*, 2004; Caldwell *et al.*, 2009). The secondary metabolites

produced by these bacteria seem to be specifically implicated in dopaminergic neuronal apoptosis. All these reports show that bacterial exposure could enhance neurodegeneration *in vivo*. In this study we tried to correlate PD cases to the prevalence of a species able to induce Parkinson like syndromes in mice. Specific primers for different levels of *N. cyriacigeorgica* were validated. Since GUH-2 strain and *N. cyriacigeorgica* were never detected in soils, the PD cases did not appear to be affected by such pathogenic bacteria. Furthermore the use of the pesticides did not favor the growth and /or dissemination of that species to a detectable concentration in soils. Nevertheless other Actinobacteria strains also described as producers of neurodegenerative metabolites were not investigated in these soils. Although microorganisms could have a role in the etiology of this illness, no result showed actually that they could be a major cause of PD. In all reports, the concentration of drugs, culture filtrates or bacterial used to induce Parkinsonism in experimental animals, are far from what it is encountered in nature. It seems likely that the genetics susceptibilities associated with this disease and exposure to pharmaceuticals and pesticides are more significant factors that can lead to PD. Still, a better understanding of the causes of this illness can help in prevention and treatment especially and the links with bacterial infections remain to be further investigated.

V. References

Alcendor DJ, Chapman GD, Beaman BL (1995) Isolation, sequencing and expression of the superoxide dismutase-encoding gene (*sod*) of *Nocardia asteroides* strain GUH-2. Gene 164(1): 143-147.

Barry DP, Beaman BL (2007) *Nocardia asteroides* strain GUH-2 induces proteasome inhibition and apoptotic death of cultured cells. Res Microbiol 158(1): 86-96.

Beaman BL, Tam S (2008) An unusual murine behavior following infection with log-phase *Nocardia asteroides* type 6 strain GUH-2 (*Nocardia cyriacigeorgica* GUH-2). Microbes Infect 10(7): 840-843.

Braak H, Rub U, Gai WP, Del Tredici K (2003) Idiopathic Parkinson's disease: possible routes by which vulnerable neuronal types may be subject to neuroinvasion by an unknown pathogen. J Neural Transm 110(5): 517-536.

Caldwell KA, Tucci ML, Armagost J, Hodges TW, Chen J et al. (2009) Investigating bacterial sources of toxicity as an environmental contributor to dopaminergic neurodegeneration. PLoS One 4(10): e7227.

Conville PS, Witebsky FG (2007) Organisms designated as *Nocardia asteroides* drug pattern type VI are members of the species *Nocardia cyriacigeorgica*. J Clin Microbiol 45(7): 2257-2259.

Cui Q, Wang L, Huang Y, Liu Z, Goodfellow M (2005) *Nocardia jiangxiensis* sp. nov. and *Nocardia miyunensis* sp. nov., isolated from acidic soils. Int J Syst Evol Microbiol 55(Pt 5): 1921-1925.

Diaz-Corrales FJ, Colasante C, Contreras Q, Puig M, Serrano JA et al. (2004) *Nocardia otitidiscaviarum* (GAM-5) induces parkinsonian-like alterations in mouse. Braz J Med Biol Res 37(4): 539-548.

Farrer MJ (2006) Genetics of Parkinson disease: paradigm shifts and future prospects. Nat Rev Genet 7(4): 306-318.

Frank-Cannon TC, Tran T, Ruhn KA, Martinez TN, Hong J et al. (2008) Parkin deficiency increases vulnerability to inflammation-related nigral degeneration. J Neurosci 28(43): 10825-10834.

Ghione I, Di Fonzo A, Saladino F, Del Bo R, Bresolin N et al. (2007) Parkin polymorphisms and environmental exposure: decrease in age at onset of Parkinson's disease. Neurotoxicology 28(3): 698-701.

Greenamyre JT, MacKenzie G, Peng TI, Stephans SE (1999) Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. Biochem Soc Symp 66: 85-97.

Grolleau E, Bargeot L, Chafchafi A, Hardy R, Doux J et al. (2004) Le système d'information national sur les sols : DONESOL et les outils associés. Étude et Gestion des Sols 11(3): 255-270.

Ishikawa J, Yamashita A, Mikami Y, Hoshino Y, Kurita H et al. (2004) The complete genomic sequence of *Nocardia farcinica* IFM 10152. Proc Natl Acad Sci U S A 101(41): 14925-14930.

Kageyama A, Yazawa K, Nishimura K, Mikami Y (2004) *Nocardia inohanensis* sp. nov., *Nocardia yamanashiensis* sp. nov. and *Nocardia niigatensis* sp. nov., isolated from clinical specimens. Int J Syst Evol Microbiol 54(Pt 2): 563-569.

Khan ZU, Neil L, Chandy R, Chugh TD, Al-Sayer H et al. (1997) *Nocardia asteroides* in the soil of Kuwait. Mycopathologia 137(3): 159-163.

Kim KK, Roth A, Andrees S, Lee ST, Kroppenstedt RM (2002) *Nocardia pseudovaccinii* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol 52(Pt 5): 1825-1829.

Kohbata S, Beaman BL (1991) L-dopa-responsive movement disorder caused by *Nocardia asteroides* localized in the brains of mice. Infect Immun 59(1): 181-191.

Kolata G (1983) Monkey model of Parkinson's disease. Science 220(4598): 705.

Lai BC, Marion SA, Teschke K, Tsui JK (2002) Occupational and environmental risk factors for Parkinson's disease. Parkinsonism Relat Disord 8(5): 297-309.

Laurent FJ, Provost F, Boiron P (1999) Rapid identification of clinically relevant *Nocardia* species to genus level by 16S rRNA gene PCR. J Clin Microbiol 37(1): 99-102.

Linke S, Lenz J, Gemein S, Exner M, Gebel J (2010) Detection of *Helicobacter pylori* in biofilms by real-time PCR. Int J Hyg Environ Health 213(3): 176-182.

Loeffler DA, Camp DM, Qu S, Beaman BL, LeWitt PA (2004) Characterization of dopamine-depleting activity of *Nocardia asteroides* strain GUH-2 culture filtrate on PC12 cells. Microb Pathog 37(2): 73-85.

Manning-Bog AB, McCormack AL, Li J, Uversky VN, Fink AL et al. (2002) The herbicide paraquat causes up-regulation and aggregation of alpha-synuclein in mice: paraquat and alpha-synuclein. J Biol Chem 277(3): 1641-1644.

Mc Cormack T, Baumeister W, Grenier L, Moomaw C, Plamondon L et al. (1997) Active site-directed inhibitors of *Rhodococcus* 20 S proteasome. Kinetics and mechanism. J Biol Chem 272(42): 26103-26109.

McCormack AL, Di Monte DA (2003) Effects of L-dopa and other amino acids against paraquat-induced nigrostriatal degeneration. J Neurochem 85(1): 82-86.

McNeil MM, Brown JM (1994) The medically important aerobic actinomycetes: epidemiology and microbiology. Clin Microbiol Rev 7(3): 357-417.

Menegon A, Board PG, Blackburn AC, Mellick GD, Le Couteur DG (1998) Parkinson's disease, pesticides, and glutathione transferase polymorphisms. Lancet 352(9137): 1344-1346.

Quatrini P, Scaglione G, De Pasquale C, Riela S, Puglia AM (2008) Isolation of Gram-positive n-alkane degraders from a hydrocarbon-contaminated Mediterranean shoreline. J Appl Microbiol 104(1): 251-259.

Ranjard L, Lignier L, Chaussod R (2006) Cumulative effects of short-term polymetal contamination on soil bacterial community structure. Appl Environ Microbiol 72(2): 1684-1687.

Ranjard L, Lejon DP, Mougel C, Schehrer L, Merdinoglu D et al. (2003) Sampling strategy in molecular microbial ecology: influence of soil sample size on DNA fingerprinting analysis of fungal and bacterial communities. Environ Microbiol 5(11): 1111-1120.

Ranjard L, Dequiedt S, Lelievre M, Marron PA, Mougel C et al. (2009) Platform GenoSol: a new tool for conserving and exploring soil microbial diversity. Environ Microbiol Reports 1: 97-99.

Rodriguez-Nava V, Zoropogui A, Laurent F, Blaha D, Couble A et al. (2008) La nocardiose, une maladie en expansion, Nocardiosis, an expanding disease. Antibiotiques 10(3): 115-127.

Rosner S, Giladi N, Orr-Urtreger A (2008) Advances in the genetics of Parkinson's disease. Acta Pharmacol Sin 29(1): 21-34.

Schlaberg R, Huard RC, Della-Latta P (2008) *Nocardia cyriacigeorgica*, an emerging pathogen in the United States. J Clin Microbiol 46(1): 265-273.

Snyder H, Wolozin B (2004) Pathological proteins in Parkinson's disease: focus on the proteasome. J Mol Neurosci 24(3): 425-442.

Tam S, Barry DP, Beaman L, Beaman BL (2002) Neuroinvasive *Nocardia asteroides* GUH-2 induces apoptosis in the substantia nigra in vivo and dopaminergic cells in vitro. Exp Neurol 177(2): 453-460.

Wallace RJ, Jr., Steele LC, Sumter G, Smith JM (1988) Antimicrobial susceptibility patterns of *Nocardia* asteroides. Antimicrob Agents Chemother 32(12): 1776-1779.

Yamamura H, Hayakawa M, Iimura Y (2003) Application of sucrose-gradient centrifugation for selective isolation of *Nocardia* spp. from soil. J Appl Microbiol 95(4): 677-685.

Yassin AF, Rainey FA, Steiner U (2001) *Nocardia cyriacigeorgici* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol 51(Pt 4): 1419-1423.

VI. Conclusion du chapitre

Ce chapitre avait pour but la mise au point et l'utilisation de marqueurs génétiques spécifiques de l'espèce *N. cyriacigeorgica* pour identifier un réservoir naturel de cette espèce. Une première partie a montré la validité de la méthode de détection à trois niveaux : l'espèce *N. cyriacigeorgica*, le « GUH-2 complex » et la souche GUH-2. Cela a été possible par le test de ces marqueurs sur plus de 150 ADNs extraits d'isolats appartenant ou non à l'espèce *N. cyriacigeorgica* GUH-2.

L'identification d'un habitat préférentiel de cette espèce n'a néanmoins pas été possible bien que la limite de détection du marqueur de *N. cyriacigeorgica* soit inférieure à 1000 équivalents génomes par gramme de sol. Nous ne pouvons donc conclure sur la présence de l'espèce dans le sol français. Les sols utilisés pour la recherche se situant dans des zones dans lesquelles une plus forte incidence de cas de Parkinson a été observé, aucun lien entre la présence de la bactérie et l'apparition de la maladie ne peut être établi avec les données actuelles. Il est à noter que les doses infectieuses de *Nocardia* demeurent encore mal connues.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

La majorité des données de recherche sur les *Nocardia* portent sur l'identification de nouvelles espèces et la taxonomie de ce genre bactérien. Pourtant, de nombreux rapports sont publiés chaque année sur des infections cliniques impliquant des *Nocardia* chez des sujets fragiles et immunodéprimés mais également chez des sujets en parfaite santé. L'augmentation des données sur les propriétés infectieuses et les déterminants génétiques impliqués dans les processus de virulence des *Nocardia* sont des éléments indispensables dans la compréhension du mode de fonctionnement de ce type d'infections. L'identification des réservoirs naturels de ces bactéries seraient également une information importante dans la prévention de ces infections.

Ce travail de thèse a été entrepris dans le but d'apporter des réponses à ces différents thèmes. Au cours de nos travaux nous nous somme intéressés plus particulièrement à la souche *N. cyriacigeorgica* GUH-2. Les premiers rapports font état d'une virulence accrue à celle précédemment rencontrée dans ce genre bactérien ainsi que des propriétés neurodégénérative entrainant des troubles comportementaux chez la souris et le primate similaires à ceux observés dans la maladie de Parkinson. Cette souche a été utilisée dans l'infection chez la souris. Les observations précédemment décrites dans les publications (Kohbata and Beaman, 1991 ; Tam *et al.*, 2002) ont été confirmées. L'utilisation d'autres souches de *Nocardia* appartenant ou non à l'espèce *N. cyriacigeorgica* a montré que cette capacité à déclencher des troubles comportementaux n'était pas limitée à une souche mais qu'il était possible que ces propriétés soient répandues dans le genre *Nocardia*. Les troubles observés ont été des mouvements verticaux et rythmiques de la tête de type « oui-oui », des hémiparésies et une posture figée et ou rigidité du mouvement. Ces résultats méritent d'être approfondis par des répétitions de manipulation afin de pouvoir obtenir des données statistiques sur le nombre d'animaux développant ces troubles ainsi que sur la proportion d'isolats de *Nocardia* capable de les déclencher. Il serait ainsi plus facile d'établir des similitudes phénotypiques et génétiques entre ces isolats/souches afin d'identifier les éléments en cause dans cette pathologie.

Les données fournies par le séquençage du génome de *N. cyriacigeorgica* GUH-2 ont apporté des connaissances sur les gènes possiblement impliqués dans la virulence de cette bactérie. En effet la comparaison de son génome avec celui de pathogènes biens étudiés a

révélé un certain nombre de similitudes. Ainsi, des CDS fortement liés à la pathogénie de *M. tuberculosis* ont été retrouvés dans les génomes de *Nocardia* : *mce*, antigen 85, PE-PPE/PGRS (Matsunaga *et al.*, 2008 ; Mohn *et al.*, 2008 ; Stinear *et al.*, 2008). L'étude du sécrétome a permis la reconnaissance de CDS codant une SOD, des protéases, des lipases et d'enzymes de fonction inconnues. L'ensemble de ces CDS ont déjà été identifié comme acteurs dans les processus de virulence soit par leur rôle dans l'aide à la l'invasion, la survie ou la multiplication de la cellule bactérienne dans le macrophage, soit dans leur implication dans l'invasion du tissus infecté et la soustraction au système immunitaire hôte.

Plusieurs études ont évoqué l'implication de métabolites dans la virulence de *N. cyriacigeorgica* GUH-2 (Loeffler *et al.*, 2004 ; Barry and Beaman, 2007 ; Beaman and Tam, 2008). L'étude des CDS liés au métabolisme secondaire a révélé la présence de 22 CDS codant des NRPS et 12 CDS codant des PKS ce qui est proche de ce que l'on retrouve dans le génome de grands producteurs de métabolites tels que *S. coelicolor*. L'étude de la synténie environnant ces CDS a révélé majoritairement une organisation proche de celle de *N. farcinica* et d'Actinobactéries. Un des clusters de NRPS de *N. cyriacigeorgica* a montré des similitudes d'organisation et des homologies avec les CDS du cluster de la nocobactine de *N. farcinica* et du cluster impliqué dans la synthèse de mycobactine de *M. tuberculosis*. Chez ces deux microorganismes ces clusters sont impliqués dans la synthèse d'un sidérophore suggérant la production du même type de composé par le cluster de *N. cyriacigeorgica*. La mycobactine et la nocobactine ont été identifié dans des processus de virulence, le fer jouant un rôle clé dans le développement des maladies infectieuses (Krithika *et al.*, 2006 ; Hoshino *et al.*, 2011). Le métabolite produit par GUH-2 pourrait alors lui aussi, contribuer à la virulence de la souche. L'analyse *in silico* des CDS de NRPS de *N. cyriacigeorgica* a montré la production de composés putatifs pouvant atteindre 13 unités de substrat de nature peptidique. L'un des substrats ajoutés présente une structure poche de celle de l'époxomicine, un inhibiteur du protéasome par son groupement époxy. Les tests menés sur la purification des métabolites produits par la souche *N. cyriacigeorgica* ont abouti à la purification d'un composé ayant une activité inhibitrice sur le protéasome de lapin *in vitro*. Cependant la corrélation entre le composé purifié et le peptide au groupement époxy n'a pas été établie bien que les analyses en RMN montrent une nature peptidique du composé purifié. Les analyses doivent être poursuivie afin d'identifier de manière plus précise la ou les molécules impliquées dans une inhibition du protéasome et de résoudre la ou leurs structures. A partir de celle-ci, il sera plus simple de la corréler ou non avec un des clusters de NRPS ou de PKS identifié. La purification et l'élucidation de la structure de ce composé apporterait de

nouvelles connaissance sur la diversité des capacités d'adaptation des bactéries pour répondre à un même problème : l'accessibilité aux métaux dans l'environnement ou dans une cellule hôte.

Un des points clé de l'étude du génome de *N. cyriacigeorgica* GUH-2 a été la disponibilité du génome de *N. farcinica* 10152. Ces deux souches de *Nocardia* ont présenté propriétés infectieuses similaires chez l'animal. Néanmoins, la comparaison des deux génomes a révélé un certain nombre de différences. L'étude des régions liées à la plasticité, *i.e.* les IGs et les ISs, a montré que les génomes de *Nocardia* possèdent une capacité à intégrer de l'ADN exogène supérieure à celle attendue. En effet, 22 régions du génome de *N. cyriacigeorgica* n'ont pas été retrouvées chez *N. farcinica* et ont été identifiées en comme étant des IG. Des CDS liés à la virulence, la plasticité, le métabolisme énergétique ou encore l'adaptation à des conditions de stress ont été identifiés dans ces îlots. La recherche des IS a montré que les génomes de *Nocardia* étaient porteurs d'un nombre supérieurs d'IS à ce qui avait précédemment été décrit (Yao *et al.*, 1994 ; Ishikawa *et al.*, 2004). L'identification de 16 et 26 IS appartenant à huit familles dans les génomes de *N. cyriacigeorgica* et *N. farcinica* respectivement, a montré la capacité des génomes de *Nocardia* à assimiler de l'ADN présentant des propriétés très différentes.

L'étude de la qualité de ces éléments génétiques a permis d'estimer la date d'acquisition de ces éléments les uns par rapport aux autres. Cela a été le cas de GI-Cy8 qui a montré les caractéristiques génétiques d'un évènement récent car il est porteur de l'ensemble de gènes permettant son déplacement ainsi que de DR. La présence d'IS montrant des copies identiques à 100 % a aussi été qualifiée d'événement récent, ces copies n'ayant pas encore subies les mutations causées par l'évolution des génomes.

L'étude de la répartition des ISs au sein du genre *Nocardia* et des IGs au sein de l'espèce *N. cyriacigeorgica* a été un moyen d'évaluer l'importance de ces séquences génétiques dans les processus évolutifs conduisant à l'émergence d'une espèce ou d'un clone bactérien. Par exemple, ISNcy2-a largement distribué dans l'espèce *N. cyriacigeorgica* et absente des autres espèces *Nocardia* a montré un rôle dans l'émergence de *N. cyriacigeorgica*. En revanche, la détection plus retreinte d'ISNfa1-a et ISNfa5 aux souches de *N. farcinica* 10152 et 44665, a été le reflet d'une acquisition ponctuelle de ces IS. La grande variabilité de distribution des IGs au sein de l'espèce *N. cyriacigeorgica* est venue conforter ici encore l'idée que les génomes de *Nocardia* possèdent une certaine plasticité.

L'étude de la distribution des ISs et IGs a également permis de définir deux complexes au sein de l'espèce *N. cyriacigeorgica* : le « GUH-2 complex » et le « type strain complex ». L'éventualité de l'existence de complexes au sein de cette espèce avait déjà été évoquée par McTaggart *et al.* (2010). Les résultats décrits sur la répartition des IGs et ISs ont confirmé ces groupes. Ces résultats ont aussi été appuyés par les cribles PCR développés puisque la cible *nocyr_5159* n'a été détectée que dans le « GUH-2 complex ». Les CDS ciblés lors des cribles du clone, du complexe clonal et de espèce *N. cyriacigeorgica* (*nocyr_2975*/ *nocyr_5159*/ *nocyr_5027* respectivement) ont été de part leur spécificité certainement liés à l'émergence des isolats qui en sont porteurs.

Il serait intéressant d'approfondir le rôle de chacun des IGs identifiés afin de pourvoir appréhender l'importance de la présence de chacun d'entres eux dans une souche. Ce travail nécessite de maitriser la mutagénèse de *N. cyriacigeorgica*. Au cours de la thèse plusieurs essais ont été réalisés dans ce but sans que des résultats assez concluants aient été obtenus pour être présenter dans ce rapport. Néanmoins les informations apportées par la maitrise de cette technique semblent cruciales tant dans la compréhension du rôle physiologique des IGs que dans l'étude de la réelle implication des CDS identifiés comme intervenant dans la virulence.

Une dernière partie a été consacrée à la détection de l'espèce *N. cyriacigeorgica* dans des sols provenant du territoire français. L'analyse du génome a montré que les souches de *Nocardia* présentent les caractéristiques de souches environnementales. La taille de leur génome ainsi que la proportion de chacun COGs les a rapproché des autres souches environnementales étudiés. La littérature fait état d'isolements de *N. cyriacigeorgica* à partir de sols contaminés aux hydrocarbures (Khan *et al.*, 1997 ; Quatrini *et al.*, 2008). Cependant les propriétés neurodégénératives observées chez l'animal ont axé nos recherches dans des sols provenant des régions dans lesquelles la proportion de patients atteints de la maladie de Parkinson était plus élevée et dans des exploitations agricoles de patients parkinsoniens. Afin de détecter des ADNs appartenant à l'espèce *N. cyriacigeorgica* des cribles de PCRq ont été mis au point. La validation de ces cribles réalisée par l'utilisation de plus 150 isolats appartenant aux deux complexes de *N. cyriacigeorgica* ainsi qu'à d'autres espèces de *Nocardia* et aux genres bactériens voisins. Ces cribles ont permis la détection de *N. cyriacigeorgica* au niveau d'un clone (GUH-2), d'un complexe et de l'espèce avec une sensibilité comprise entre 8 et 80 GE par gramme de sol.

Le crible de la cible *nocyr_5027* dans les ADNs extraits des sols avec les amorces qIG20lt n'a pas révélé la présence de l'espèce *N. cyriacigeorgica* dans ces sols bien que la présence d'ADN de *Nocardia* ait été confirmée. L'amélioration de la sensibilité de cette méthode pourrait permettre la détection des bactéries de cette espèce dans le cas où elles seraient présentes en des proportions inférieures au seuil de détection. La méthode culturale n'a pas non plus permis l'identification de *N. cyriacigeorgica*. Ici il me semble indispensable de mettre au point un milieu sélectif spécifiques des *Nocardia* afin d'obtenir des sensibilités qui peuvent être supérieures à celles observées pour la PCRq. La découverte de niches écologiques permettant le développement des *Nocardia* reste un élément important dans la prévention des infections impliquant ces microorganismes.

Pour conclure, ce travail de thèse a initié de nombreuses voies dans la recherche sur les *Nocardia*. Les aspects de génomiques sont le point majeur de ces études et s'inscriront je l'espère comme une référence dans l'étude de ces microorganismes. Les *Nocardia* me semble être le reflet d'un stade d'évolution antérieur à celui de souches connues aujourd'hui comme étant des pathogènes strictes tels que *M. tuberculosis* et *R. equi*. L'évolution plus lente des génomes de *Nocardia* serait responsable de leur statut de pathogène opportuniste qui implique une vie environnementale et dans certains cas une contamination accidentelle de l'animal ou de l'homme. L'étude des génomes par les phénomènes d'évolution rapide impliquant les transferts horizontaux me semble indispensable dans l'appréhension des voies métaboliques pouvant conduire à l'émergence d'un pathogène. Il apparait donc indispensable de poursuivre la recherche dans ce domaine afin de prévenir l'apparition de nouvelles souches dangereuses pour la santé humaine.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abdel-Monem MH, Dewedar A, Hussein M, Mansour S (1991) Study on the pathogenicity of some *Nocardia* spp isolated from tap water of Ismailia City, Egypt. J Egypt Public Health Assoc 66(1-2): 135-144.

Ahn TB, Jeon BS (2006) Protective role of heat shock and heat shock protein 70 in lactacystin-induced cell death both in the rat substantia nigra and PC12 cells. Brain Res 1087(1): 159-167.

Al-Tawfiq JA, Al-Khatti AA (2010) Disseminated systemic *Nocardia farcinica* infection complicating alefacept and infliximab therapy in a patient with severe psoriasis. Int J Infect Dis 14(2): e153-157.

Albuquerque de Barros EV, Manfio GP, Ribiero Maitan V, Mendes Bataus LA, Kim SB, Maldonado LA, Goodfellow M (2003) *Nocardia cerradoensis* sp. nov., a novel isolate from Cerrado soil in Brazil. Int J Syst Evol Microbiol 53(Pt 1): 29-33.

Alonso A, Sanchez P, Martinez JL (2000) *Stenotrophomonas maltophilia* D457R contains a cluster of genes from gram-positive bacteria involved in antibiotic and heavy metal resistance. Antimicrob Agents Chemother 44(7): 1778-1782.

Ambrosioni J, Lew D, Garbino J (2010) Nocardiosis: updated clinical review and experience at a tertiary center. Infection 38(2): 89-97.

Andersson DI, Hughes D (2009) Gene amplification and adaptive evolution in bacteria. Annu Rev Genet 43: 167-195.

Andrzejewski J, Muller G (1975) [The morphology of a *Nocardia asteroides*-bacteriophage (author's transl)]. Zentralbl Bakteriol Orig A 230(3): 379-384.

Aoki H, Sakai H, Kohsaka M, Konomi T, Hosoda J (1976) Nocardicin A, a new monocyclic beta-lactam antibiotic. I. Discovery, isolation and characterization. J Antibiot (Tokyo) 29(5): 492-500.

Bacciarini LN, Posthaus H, Pagan O, Miserez R (1999) *Nocardia nova* causing pulmonary nocardiosis of black crakes (*Limnocorax flavirostra*). Vet Pathol 36(4): 345-347.

Barry DP, Beaman BL (2006) Modulation of eukaryotic cell apoptosis by members of the bacterial order Actinomycetales. Apoptosis 11(10): 1695-1707.

Barry DP, Beaman BL (2007) *Nocardia asteroides* strain GUH-2 induces proteasome inhibition and apoptotic death of cultured cells. Res Microbiol 158(1): 86-96.

Bassam LS, Hasso SA (1997) Mastitis in goats caused by *Nocardia asteroides*. Small Ruminant Research 26: 287-290.

Bassler BL, Losick R (2006) Bacterially speaking. Cell 125(2): 237-246.

Bauman JM, Osenbach R, Hartshorne MF, Youngblood L, Crooks L, Landry AJ, Cawthon MA (1986) Positive indium-111 leukocyte scan in *Nocardia* brain abscess. J Nucl Med 27(1): 60-62.

Beaman BL (1979) Interaction of *Nocardia asteroides* at different phases of growth with in vitro-maintained macrophages obtained from the lungs of normal and immunized rabbits. Infect Immun 26(1): 355-361.

Beaman BL, Maslan S (1977) Effect of cyclophosphamide on experimental *Nocardia asteroides* infection in mice. Infect Immun 16(3): 995-1004.

Beaman BL, Maslan S (1978) Virulence of *Nocardia asteroides* during its growth cycle. Infect Immun 20(1): 290-295.

Beaman BL, Beaman L (1994) *Nocardia* species: host-parasite relationships. Clin Microbiol Rev 7(2): 213-264.

Beaman BL, Beaman L (1998) Filament tip-associated antigens involved in adherence to and invasion of murine pulmonary epithelial cells in vivo and HeLa cells in vitro by *Nocardia asteroides*. Infect Immun 66(10): 4676-4689.

Beaman BL, Tam S (2008) An unusual murine behavior following infection with log-phase *Nocardia asteroides* type 6 strain GUH-2 (*Nocardia cyriacigeorgica* GUH-2). Microbes Infect 10(7): 840-843.

Beaman BL, Gershwin ME, Maslan S (1978) Infectious agents in immunodeficient murine models: pathogenicity of *Nocardia asteroides* in congenitally athymic (nude) and hereditarily asplenic (Dh/+) mice. Infect Immun 20(2): 381-387.

Beaman BL, Burnside J, Edwards B, Causey W (1976) Nocardial infections in the United States, 1972-1974. J Infect Dis 134(3): 286-289.

Beaman BL, Maslan S, Scates S, Rosen J (1980) Effect of route on inoculation on host resistance to *Nocardia*. Infect Immun 28(1): 185-189.

Beaman BL, Black CM, Doughty F, Beaman L (1985) Role of superoxide dismutase and catalase as determinants of pathogenicity of *Nocardia asteroides*: importance in resistance to microbicidal activities of human polymorphonuclear neutrophils. Infect Immun 47(1): 135-141.

Beaman BL, Scates SM, Moring SE, Deem R, Misra HP (1983) Purification and properties of a unique superoxide dismutase from *Nocardia asteroides*. J Biol Chem 258(1): 91-96.

Beaman BL, Canfield D, Anderson J, Pate B, Calne D (2000) Site-specific invasion of the basal ganglia by *Nocardia asteroides* GUH-2. Med Microbiol Immunol 188(4): 161-168.

Beaman L, Beaman BL (1993) Interactions of *Nocardia asteroides* with murine glia cells in culture. Infect Immun 61(1): 343-347.

Benabid AL (2010) Gene therapy for Parkinson's disease: do we have the cure? Lancet Neurol 9(12): 1142-1143.

Black CM, Beaman BL, Donovan RM, Goldstein E (1985) Intracellular acid phosphatase content and ability of different macrophage populations to kill *Nocardia asteroides*. Infect Immun 47(2): 375-383.

Boiron P (2006) *Nocardia*; Courvalin P, Leclercq R, Bingen E, editors. 603—610 p.

Boiron P, Provost F, Chevrier G, Dupont B (1992) Review of nocardial infections in France 1987 to 1990. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 11(8): 709-714.

Bourée P, Boiron P (1991) Nocardiose cutanée post-traumatique à *Nocardia brasiliensis*, Post-traumatic cutaneous nocardiosis caused by *Nocardia brasiliensis*. J Mycol Med 1(3): 233-235.

Bourgeois L, Beaman BL (1974) Probable L-forms of *Nocardia asteroides* induced in cultured mouse peritoneal macrophages. Infect Immun 9(3): 576-590.

Bourgeois L, Beaman BL (1976) In vitro spheroplast and L-form induction within the pathogenic Nocardiae. J Bacteriol 127(1): 584-594.

Bredholdt H, Galatenko OA, Engelhardt K, Fjaervik E, Terekhova LP, Zotchev SB (2007) Rare actinomycete bacteria from the shallow water sediments of the Trondheim fjord, Norway: isolation, diversity and biological activity. Environ Microbiol 9(11): 2756-2764.

Bross JE, Gordon G (1991) Nocardial meningitis: case reports and review. Rev Infect Dis 13(1): 160-165.

Brown-Elliott BA, Brown JM, Conville PS, Wallace RJ, Jr. (2006) Clinical and laboratory features of the *Nocardia* spp. based on current molecular taxonomy. Clin Microbiol Rev 19(2): 259-282.

Brown-Elliott BA, Ward SC, Crist CJ, Mann LB, Wilson RW, Wallace RJ, Jr. (2001) In vitro activities of linezolid against multiple *Nocardia* species. Antimicrob Agents Chemother 45(4): 1295-1297.

Brown J, McNeil M (2003) *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Actinomadura*, *Streptomyces*, and other aerobic Actinomycetes; Murray P, Baron E, Pfaller M, Tenover F, Yolken R, editors. Washington D.C: American Society for Microbiology. 502-531 p.

Caldwell KA, Tucci ML, Armagost J, Hodges TW, Chen J, Memon SB, Blalock JE, DeLeon SM, Findlay RH, Ruan Q, Webber PJ, Standaert DG, Olson JB, Caldwell GA (2009) Investigating bacterial sources of toxicity as an environmental contributor to dopaminergic neurodegeneration. PLoS One 4(10): e7227.

Camp DM, Loeffler DA, Razoky BA, Tam S, Beaman BL, LeWitt PA (2003) *Nocardia asteroides* culture filtrates cause dopamine depletion and cytotoxicity in PC12 cells. Neurochem Res 28(9): 1359-1367.

Cavalier-Smith T (1992) Origins of secondary metabolism. Ciba Found Symp 171: 64-80; discussion 80-67.

Chakrabarti P, Nandi SS, Todi SK (2008) *Nocardia* brain abscess in a diabetic patient. Indian J Pathol Microbiol 51(1): 151-153.

Challis GL, Hopwood DA (2003) Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. Proc Natl Acad Sci U S A 100 Suppl 2: 14555-14561.

Challis GL, Ravel J, Townsend CA (2000) Predictive, structure-based model of amino acid recognition by nonribosomal peptide synthetase adenylation domains. Chem Biol 7(3): 211-224.

Chapman G, Beaman BL, Loeffler DA, Camp DM, Domino EF, Dickson DW, Ellis WG, Chen I, Bachus SE, LeWitt PA (2003) In situ hybridization for detection of nocardial 16S rRNA: reactivity within intracellular inclusions in experimentally infected cynomolgus monkeys--and in Lewy body-containing human brain specimens. Exp Neurol 184(2): 715-725.

Chater KF, Biro S, Lee KJ, Palmer T, Schrempf H (2010) The complex extracellular biology of *Streptomyces*. FEMS Microbiol Rev 34(2): 171-198.

Chevalier B, Margery J, Couble A, Rodriguez-Nava V, Debonne JM, Mbaye PS, Boiron P, Laurent F (2009) *Nocardia aroensis* and lung infection: first case report in Africa. Med Trop (Mars) 69(5): 506-508.

Coenye T, Gevers D, Van de Peer Y, Vandamme P, Swings J (2005) Towards a prokaryotic genomic taxonomy. FEMS Microbiol Rev 29(2): 147-167.

Cohan FM (2001) Bacterial species and speciation. Syst Biol 50(4): 513-524.

Collins MD, Goodfellow M, Minnikin DE, Alderson G (1985) Menaquinone composition of mycolic acid-containing actinomycetes and some sporoactinomycetes. J Appl Bacteriol 58(1): 77-86.

Conville PS, Witebsky FG (2007) Organisms designated as *Nocardia asteroides* drug pattern type VI are members of the species *Nocardia cyriacigeorgica*. J Clin Microbiol 45(7): 2257-2259.

Conville PS, Brown JM, Steigerwalt AG, Brown-Elliott BA, Witebsky FG (2008) *Nocardia wallacei* sp. nov. and *Nocardia blacklockiae* sp. nov., human pathogens and members of the "*Nocardia transvalensis* complex". J Clin Microbiol 46(4): 1178-1184.

Conville PS, Brown JM, Steigerwalt AG, Lee JW, Anderson VL, Fishbain JT, Holland SM, Witebsky FG (2004) *Nocardia kruczakiae* sp. nov., a pathogen in immunocompromised patients and a member of the "*N. nova* complex". J Clin Microbiol 42(11): 5139-5145.

Conville PS, Brown JM, Steigerwalt AG, Lee JW, Byrer DE, Anderson VL, Dorman SE, Holland SM, Cahill B, Carroll KC, Witebsky FG (2003) *Nocardia veterana* as a pathogen in North American patients. J Clin Microbiol 41(6): 2560-2568.

Corti ME, Villafane-Fioti MF (2003) Nocardiosis: a review. Int J Infect Dis 7(4): 243-250.

Coutant-Perronne V, Lutz V, Mainardi JL, Acar JF, Kugelstadt P, Goldstein F (1995) Meningitis caused by *Nocardia* without brain abscess detectable by computed tomography. Presse Med 24(27): 1271.

Darzi MM, Mir MS, Nashiruddullah N, Kamil SA (2006) Nocardiosis in domestic pigeons (Columba livia). Vet Rec 158(24): 834-836.

Demain AL (1998) Induction of microbial secondary metabolism. Int Microbiol 1(4): 259-264.

Demain AL, Fang A (2000) The natural functions of secondary metabolites. Adv Biochem Eng Biotechnol 69: 1-39.

Diaz-Corrales FJ, Colasante C, Contreras Q, Puig M, Serrano JA, Hernandez L, Beaman BL (2004) *Nocardia otitidiscaviarum* (GAM-5) induces parkinsonian-like alterations in mouse. Braz J Med Biol Res 37(4): 539-548.

Dobrindt U, Hochhut B, Hentschel U, Hacker J (2004) Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. Nat Rev Microbiol 2(5): 414-424.

Driver JA, Logroscino G, Gaziano JM, Kurth T (2009) Incidence and remaining lifetime risk of Parkinson disease in advanced age. Neurology 72(5): 432-438.

Durmaz R, Atasoy MA, Durmaz G, Adapinar B, Arslantas A, Aydinli A, Tel E (2001) Multiple nocardial abscesses of cerebrum, cerebellum and spinal cord, causing quadriplegia. Clin Neurol Neurosurg 103(1): 59-62.

Engelsma MY, Roozenburg I, Joly JP (2008) First isolation of *Nocardia crassostreae* from Pacific oyster Crassostrea gigas in Europe. Dis Aquat Organ 80(3): 229-234.

Exmelin L, Malbruny B, Vergnaud M, Prosvost F, Boiron P, Morel C (1996) Molecular study of nosocomial nocardiosis outbreak involving heart transplant recipients. J Clin Microbiol 34(4): 1014-1016.

Falk RH, Dimock FR, Sharkey J (1979) Prosthetic valve endocarditis resulting from *Nocardia asteroides*. Br Heart J 41(1): 125-127.

Feistner GJ, Beaman BL (1987) Characterization of 2,3-dihydroxybenzoic acid from *Nocardia asteroides* GUH-2. J Bacteriol 169(9): 3982-3987.

Feling RH, Buchanan GO, Mincer TJ, Kauffman CA, Jensen PR, Fenical W (2003) Salinosporamide A: a highly cytotoxic proteasome inhibitor from a novel microbial source, a marine bacterium of the new genus *Salinospora*. Angew Chem Int Ed Engl 42(3): 355-357.

Fellows GA, Kalsi PS, Martin AJ (2007) *Nocardia farcinica* brain abscess in a patient without immunocompromise. Br J Neurosurg 21(3): 301-303.

Filice GA, Beaman BL, Remington JS (1980) Effects of activated macrophages on *Nocardia asteroides*. Infect Immun 27(2): 643-649.

Fleming A (2001) On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. 1929. Bull World Health Organ 79(8): 780-790.

Frank-Cannon TC, Tran T, Ruhn KA, Martinez TN, Hong J, Marvin M, Hartley M, Trevino I, O'Brien DE, Casey B, Goldberg MS, Tansey MG (2008) Parkin deficiency increases vulnerability to inflammation-related nigral degeneration. J Neurosci 28(43): 10825-10834.

Freland C, Fur JL, Nemirovsky-Trebucq B, Lelong P, Boiron P (1995) Primary cutaneous nocardiosis caused by *Nocardia otitidiscaviarum*: two cases and a review of the literature. J Trop Med Hyg 98(6): 395-403.

Friedman CS, Beaman BL, Chun J, Goodfellow M, Gee A, Hedrick RP (1998) *Nocardia crassostreae* sp. nov., the causal agent of nocardiosis in Pacific oysters. Int J Syst Bacteriol 48 Pt 1: 237-246.

Gasson MJ (1980) Indicator technique for antimetabolic toxin production by phytopathogenic species of *Pseudomonas*. Appl Environ Microbiol 39(1): 25-29.

Gezici AR, Daglioglu E, Ergungor F, Okay O, Polat O (2008) Cerebral abscess caused by *Nocardia nova*. Neurol Neurochir Pol 42(2): 153-156.

Gezuele E (1972) Fatal infection by *Nocardia brasiliensis* in an armadillo. Sabouraudia 10(1): 63-65.

Ghione I, Di Fonzo A, Saladino F, Del Bo R, Bresolin N, Comi GP, Rango M (2007) Parkin polymorphisms and environmental exposure: decrease in age at onset of Parkinson's disease. Neurotoxicology 28(3): 698-701.

Goodfellow M, Pirouz T (1982) Numerical classification of sporoactinomycetes containing meso-diaminopimelic acid in the cell wall. J Gen Microbiol 128(3): 503-527.

Goodfellow M, Williams ST (1983) Ecology of actinomycetes. Annu Rev Microbiol 37: 189-216.

Groenewegen HJ (2003) The basal ganglia and motor control. Neural Plast 10(1-2): 107-120.

Hahn MW (2006) The microbial diversity of inland waters. Curr Opin Biotechnol 17(3): 256-261.

Hamid ME, Maldonado L, Sharaf Eldin GS, Mohamed MF, Saeed NS, Goodfellow M (2001) *Nocardia africana* sp. nov., a new pathogen isolated from patients with pulmonary infections. J Clin Microbiol 39(2): 625-630.

Hanada M, Sugawara K, Kaneta K, Toda S, Nishiyama Y, Tomita K, Yamamoto H, Konishi M, Oki T (1992) Epoxomicin, a new antitumor agent of microbial origin. J Antibiot (Tokyo) 45(11): 1746-1752.

Harada H, Endo Y, Sekiguchi M, Setoguchi A, Momoi Y (2009) Cutaneous nocardiosis in a cat. J Vet Med Sci 71(6): 785-787.

Hattori Y, Kano R, Kunitani Y, Yanai T, Hasegawa A (2003) *Nocardia africana* isolated from a feline mycetoma. J Clin Microbiol 41(2): 908-910.

Hopwood DA (1997) Genetic Contributions to Understanding Polyketide Synthases. Chem Rev 97(7): 2465-2498.

Hopwood DA (1999) Forty years of genetics with *Streptomyces*: from in vivo through in vitro to in silico. Microbiology 145 (Pt 9): 2183-2202.

Hoshino Y, Chiba K, Ishino K, Fukai T, Igarashi Y, Yazawa K, Mikami Y, Ishikawa J (2011) Identification of nocobactin NA biosynthetic gene clusters in *Nocardia farcinica*. J Bacteriol 193(2): 441-448.

Houang ET, Lovett IS, Thompson FD, Harrison AR, Joekes AM, Goodfellow M (1980) *Nocardia asteroides* infection--a transmissible disease. J Hosp Infect 1(1): 31-40.

Inamadar AC, Palit A, Peerapur BV, Rao SD (2004) Sporotrichoid nocardiosis caused by *Nocardia nova* in a patient infected with human immunodeficiency virus. Int J Dermatol 43(11): 824-826.

Ishikawa J, Yamashita A, Mikami Y, Hoshino Y, Kurita H, Hotta K, Shiba T, Hattori M (2004) The complete genomic sequence of *Nocardia farcinica* IFM 10152. Proc Natl Acad Sci U S A 101(41): 14925-14930.

Isik K, Chun J, Hah YC, Goodfellow M (1999) *Nocardia salmonicida* nom. rev., a fish pathogen. Int J Syst Bacteriol 49 Pt 2: 833-837.

Jannat-Khah D, Kroppenstedt RM, Klenk HP, Sproer C, Schumann P, Lasker BA, Steigerwalt AG, Hinrikson HP, Brown JM (2010) *Nocardia mikamii* sp. nov., isolated from human pulmonary infections in the USA. Int J Syst Evol Microbiol 60(Pt 10): 2272-2276.

Jodlowski TZ, Melnychuk I, Conry J (2007) Linezolid for the treatment of *Nocardia* spp. infections. Ann Pharmacother 41(10): 1694-1699.

Joly B, Cluzel R (1975) The role of heavy metals and their derivatives in the selection of antibiotics resistant gram-negative rods (author's transl). Ann Microbiol (Paris) 126B(1): 51-61.

Jones D, Metzger HJ, Schatz A, Waksman SA (1944) Control of Gram-Negative Bacteria in Experimental Animals by Streptomycin. Science 100(2588): 103-105.

Juhas M, van der Meer JR, Gaillard M, Harding RM, Hood DW, Crook DW (2009) Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution. FEMS Microbiol Rev 33(2): 376-393.

Jurado V, Boiron P, Kroppenstedt RM, Laurent F, Couble A, Laiz L, Klenk HP, Gonzalez JM, Saiz-Jimenez C, Mouniee D, Bergeron E, Rodriguez-Nava V (2008) *Nocardia altamirensis* sp. nov., isolated from Altamira cave, Cantabria, Spain. Int J Syst Evol Microbiol 58(Pt 9): 2210-2214.

Kaewkla O, Franco CM (2010) *Nocardia callitridis* sp. nov., an endophytic actinobacterium isolated from a surface-sterilized root of an Australian native pine tree. Int J Syst Evol Microbiol 60(Pt 7): 1532-1536.

Kageyama A, Sato H, Nagata M, Yazawa K, Katsu M, Mikami Y, Kamei K, Nishimura K (2002) First human case of nocardiosis caused by *Nocardia pseudobrasiliensis* in Japan. Mycopathologia 156(3): 187-192.

Kanemitsu K, Kunishima H, Saga T, Harigae H, Ishikawa S, Takemura H, Kaku M (2003) Efficacy of amikacin combinations for nocardiosis. Tohoku J Exp Med 201(3): 157-163.

Katz L (1997) Manipulation of Modular Polyketide Synthases. Chem Rev 97(7): 2557-2576.

Kawakami O, Kenmochi J, Sugiura M, Kato H, Takagi S, Ando T (2008) Case report of *Nocardia* brain abscess that needs to be distinguished from metastatic brain tumor. Rinsho Shinkeigaku 48(6): 401-405.

Khan Z, Al-Sayer H, Chugh TD, Chandy R, Provost F, Boiron P (2000) Antimicrobial susceptibility profile of soil isolates of *Nocardia asteroides* from Kuwait. Clin Microbiol Infect 6(2): 94-98.

Khan ZU, Neil L, Chandy R, Chugh TD, Al-Sayer H, Provost F, Boiron P (1997) *Nocardia asteroides* in the soil of Kuwait. Mycopathologia 137(3): 159-163.

Kikuchi S, Shinpo K, Tsuji S, Takeuchi M, Yamagishi S, Makita Z, Niino M, Yabe I, Tashiro K (2003) Effect of proteasome inhibitor on cultured mesencephalic dopaminergic neurons. Brain Res 964(2): 228-236.

Klatte S, Rainey FA, Kroppenstedt RM (1994) Transfer of *Rhodococcus aichiensis* Tsukamura 1982 and *Nocardia amarae* Lechevalier and Lechevalier 1974 to the genus *Gordona* as *Gordona aichiensis* comb. nov. and *Gordona amarae* comb. nov. Int J Syst Bacteriol 44(4): 769-773.

Klein-Gitelman MS, Szer IS (1991) Disseminated *Nocardia brasiliensis* infection: an unusual complication of immunosuppressive treatment for childhood dermatomyositis. J Rheumatol 18(8): 1243-1246.

Koch C, Drees R, Hartmann FA, McGuirk SM, Prichard MA (2009) *Nocardia arthritidis* infection in the distal metaphysis of the metatarsal III and IV bone of a heifer. J Am Vet Med Assoc 234(5): 669-673.

Kohbata S, Beaman BL (1991) L-dopa-responsive movement disorder caused by *Nocardia asteroides* localized in the brains of mice. Infect Immun 59(1): 181-191.

Kohbata S, Shimokawa K (1993) Circulating antibody to *Nocardia* in the serum of patients with Parkinson's disease. Adv Neurol 60: 355-357.

Kostman JR, DiNubile MJ (1993) Nodular lymphangitis: a distinctive but often unrecognized syndrome. Ann Intern Med 118(11): 883-888.

Kristal BS, Conway AD, Brown AM, Jain JC, Ulluci PA, Li SW, Burke WJ (2001) Selective dopaminergic vulnerability: 3,4-dihydroxyphenylacetaldehyde targets mitochondria. Free Radic Biol Med 30(8): 924-931.

Krithika R, Marathe U, Saxena P, Ansari MZ, Mohanty D, Gokhale RS (2006) A genetic locus required for iron acquisition in *Mycobacterium tuberculosis*. Proc Natl Acad Sci U S A 103(7): 2069-2074.

Kunisawa T (1995) Identification and chromosomal distribution of DNA sequence segments conserved since divergence of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. J Mol Evol 40(6): 585-593.

Lai BC, Marion SA, Teschke K, Tsui JK (2002) Occupational and environmental risk factors for Parkinson's disease. Parkinsonism Relat Disord 8(5): 297-309.

Lalitha P (2009) *Nocardia* keratitis. Curr Opin Ophthalmol 20(4): 318-323.

Lamm AS, Khare A, Conville P, Lau PC, Bergeron H, Rosazza JP (2009) *Nocardia iowensis* sp. nov., an organism rich in biocatalytically important enzymes and nitric oxide synthase. Int J Syst Evol Microbiol 59(Pt 10): 2408-2414.

Laurent F, Freney J, Boiron P (2003) *Nocardia* et Actinomycètes aérobies apparentés.; Freney J, Renaud F, Hansen W, Bollet C, editors. 1-21 p.

Laurent FJ, Provost F, Boiron P (1999) Rapid identification of clinically relevant *Nocardia* species to genus level by 16S rRNA gene PCR. J Clin Microbiol 37(1): 99-102.

le Roes M, Meyers PR (2006) *Nocardia gamkensis* sp. nov. Antonie Van Leeuwenhoek 90(3): 291-298.

Le TN, Mikolasch A, Awe S, Sheikhany H, Klenk HP, Schauer F (2010) Oxidation of aliphatic, branched chain, and aromatic hydrocarbons by *Nocardia cyriacigeorgica* isolated from oil-polluted sand samples collected in the Saudi Arabian Desert. J Basic Microbiol 50(3): 241-253.

Lee S, Basu S, Tyler CW, Pitt PA (2003) A survey of filamentous organisms at the Deer Island treatment plant. Environ Technol 24(7): 855-865.

Lewis KE, Ebden P, Wooster SL, Rees J, Harrison GA (2003) Multi-system Infection with *Nocardia farcinica*-therapy with linezolid and minocycline. J Infect 46(3): 199-202.

Li WJ, Jiang Y, Kroppenstedt RM, Xu LH, Jiang CL (2004) *Nocardia alba* sp.nov., a novel actinomycete strain isolated from soil in China. Syst Appl Microbiol 27(3): 308-312.

Lin YJ, Yang KY, Ho JT, Lee TC, Wang HC, Su FW (2010) Nocardial brain abscess. J Clin Neurosci 17(2): 250-253.

Lo CW, Lai YK, Liu YT, Gallo RL, Huang CM (2011) Staphylococcus aureus hijacks a skin commensal to intensify its virulence: immunization targeting beta-hemolysin and CAMP factor. J Invest Dermatol 131(2): 401-409.

Loeffler DA, Camp DM, Qu S, Beaman BL, LeWitt PA (2004) Characterization of dopamine-depleting activity of *Nocardia asteroides* strain GUH-2 culture filtrate on PC12 cells. Microb Pathog 37(2): 73-85.

Logares R, Brate J, Bertilsson S, Clasen JL, Shalchian-Tabrizi K, Rengefors K (2009) Infrequent marine-freshwater transitions in the microbial world. Trends Microbiol 17(9): 414-422.

Long P, Choi G, Silberman M (1983) Nocardiosis in two Pesquet's parrots (*Psittrichas fulgidus*). Avian Dis 27(3): 855-859.

Lowman W, Aithma N (2010) Antimicrobial susceptibility testing and profiling of *Nocardia* species and other aerobic actinomycetes from South Africa: comparative evaluation of broth microdilution versus the Etest. J Clin Microbiol 48(12): 4534-4540.

Lum CA, Vadmal MS (2003) Case report: *Nocardia asteroides* mycetoma. Ann Clin Lab Sci 33(3): 329-333.

Mahillon J, Chandler M (1998) Insertion sequences. Microbiol Mol Biol Rev 62(3): 725-774.

Maldonado L, Hookey JV, Ward AC, Goodfellow M (2000) The *Nocardia salmonicida* clade, including descriptions of *Nocardia cummidelens* sp. nov., *Nocardia fluminea* sp. nov. and *Nocardia soli* sp. nov. Antonie Van Leeuwenhoek 78(3-4): 367-377.

Maldonado LA, Hamid ME, Gamal El Din OA, Goodfellow M (2004) *Nocardia farcinica*--a significant cause of mastitis in goats in Sudan. J S Afr Vet Assoc 75(3): 147-149.

Manion RE, Bradley SG, Zinneman HH, Hall WH (1964) Interrelationships among Mycobacteria and Nocardiae. J Bacteriol 87(5): 1056-1059.

Manning-Bog AB, McCormack AL, Li J, Uversky VN, Fink AL, Di Monte DA (2002) The herbicide paraquat causes up-regulation and aggregation of alpha-synuclein in mice: paraquat and alpha-synuclein. J Biol Chem 277(3): 1641-1644.

Marahiel MA, Stachelhaus T, Mootz HD (1997) Modular peptide synthetases involved in non-ribosomal peptide synthesis. Chem Rev 97(7): 2651-2674.

Matyar F, Kaya A, Dincer S (2008) Antibacterial agents and heavy metal resistance in Gram-negative bacteria isolated from seawater, shrimp and sediment in Iskenderun Bay, Turkey. Sci Total Environ 407(1): 279-285.

McCord JM, Fridovich I (1969) Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). J Biol Chem 244(22): 6049-6055.

McNabb A, Shuttleworth R, Behme R, Colby WD (1997) Fatty acid characterization of rapidly growing pathogenic aerobic actinomycetes as a means of identification. J Clin Microbiol 35(6): 1361-1368.

McNaught KS, Olanow CW (2006) Proteasome inhibitor-induced model of Parkinson's disease. Ann Neurol 60(2): 243-247.

McNaught KS, Perl DP, Brownell AL, Olanow CW (2004) Systemic exposure to proteasome inhibitors causes a progressive model of Parkinson's disease. Ann Neurol 56(1): 149-162.

McNeil MM, Brown JM (1994) The medically important aerobic actinomycetes: epidemiology and microbiology. Clin Microbiol Rev 7(3): 357-417.

McTaggart LR, Richardson SE, Witkowska M, Zhang SX (2010) Phylogeny and identification of *Nocardia* species on the basis of multilocus sequence analysis. J Clin Microbiol 48(12): 4525-4533.

Menegon A, Board PG, Blackburn AC, Mellick GD, Le Couteur DG (1998) Parkinson's disease, pesticides, and glutathione transferase polymorphisms. Lancet 352(9137): 1344-1346.

Mirza SH, Campbell C (1994) Mycetoma caused by *Nocardia transvalensis*. J Clin Pathol 47(1): 85-86.

Mootsikapun P, Intarapoka B, Liawnoraset W (2005) Nocardiosis in Srinagarind Hospital, Thailand: review of 70 cases from 1996-2001. Int J Infect Dis 9(3): 154-158.

Moser BD, Klenk HP, Schumann P, Potter G, Lasker BA, Steigerwalt AG, Hinrikson HP, Brown JM (2010) *Nocardia niwae* sp. nov., isolated from human pulmonary sources. Int J Syst Evol Microbiol.

Moylett EH, Pacheco SE, Brown-Elliott BA, Perry TR, Buescher ES, Birmingham MC, Schentag JJ, Gimbel JF, Apodaca A, Schwartz MA, Rakita RM, Wallace RJ, Jr. (2003) Clinical experience with linezolid for the treatment of *Nocardia* infection. Clin Infect Dis 36(3): 313-318.

Munoz-Hernandez B, Noyola MC, Palma-Cortes G, Rosete DP, Galvan MA, Manjarrez ME (2009) Actinomycetoma in arm disseminated to lung with grains of *Nocardia brasiliensis* with peripheral filaments. Mycopathologia 168(1): 37-40.

Murakami Y, Kato S, Nakajima M, Matsuoka M, Kawai H, Shin-Ya K, Seto H (1996) Formobactin, a novel free radical scavenging and neuronal cell protecting substance from *Nocardia* sp. J Antibiot (Tokyo) 49(9): 839-845.

Naguib MT, Fine DP (1995) Brain abscess due to *Nocardia brasiliensis* hematogenously spread from a pulmonary infection. Clin Infect Dis 21(2): 459-460.

Nehru B, Verma R, Khanna P, Sharma SK (2008) Behavioral alterations in rotenone model of Parkinson's disease: attenuation by co-treatment of centrophenoxine. Brain Res 1201: 122-127.

Nemoto A, Hoshino Y, Yazawa K, Ando A, Mikami Y, Komaki H, Tanaka Y, Grafe U (2002) Asterobactin, a new siderophore group antibiotic from *Nocardia asteroides*. J Antibiot (Tokyo) 55(6): 593-597.

Nocard E (1888) Note sur la maladie des boeufs de la Guadeloupe connue sous le nom de farcin. Ann Inst Pasteur 2: 293-302.

Obeso JA, Rodriguez-Oroz MC, Goetz CG, Marin C, Kordower JH, Rodriguez M, Hirsch EC, Farrer M, Schapira AH, Halliday G (2010) Missing pieces in the Parkinson's disease puzzle. Nat Med 16(6): 653-661.

Ochman H, Davalos LM (2006) The nature and dynamics of bacterial genomes. Science 311(5768): 1730-1733.

Ogata SA, Beaman BL (1992) Site-specific growth of *Nocardia asteroides* in the murine brain. Infect Immun 60(8): 3262-3267.

Omura S, Takeshima H (1996) Lactacystin: a tool for elucidation of proteasome functions. Tanpakushitsu Kakusan Koso 41(4): 327-336.

Oshiro S, Ohnishi H, Ohta M, Tsuchimochi H (2003) Intraventricular rupture of *Nocardia* brain abscess--case report. Neurol Med Chir (Tokyo) 43(7): 360-363.

Oyetibo GO, Ilori MO, Adebusoye SA, Obayori OS, Amund OO (2010) Bacteria with dual resistance to elevated concentrations of heavy metals and antibiotics in Nigerian contaminated systems. Environ Monit Assess 168(1-4): 305-314.

Palmer DL, Harvey RL, Wheeler JK (1974) Diagnostic and therapeutic considerations in *Nocardia asteroides* infection. Medicine (Baltimore) 53(5): 391-401.

Park FJ, Jaensch S (2009) Unusual multifocal granulomatous disease caused by actinomycetous bacteria in a nestling Derbyan parrot (*Psittacula derbiana*). Aust Vet J 87(1): 63-65.

Parthasarathi K, Ranganathan LS, Anandi V, Zeyer J (2007) Diversity of microflora in the gut and casts of tropical composting earthworms reared on different substrates. J Environ Biol 28(1): 87-97.

Patel JB, Wallace RJ, Jr., Brown-Elliott BA, Taylor T, Imperatrice C, Leonard DG, Wilson RW, Mann L, Jost KC, Nachamkin I (2004) Sequence-based identification of aerobic actinomycetes. J Clin Microbiol 42(6): 2530-2540.

Pavlik I, Svastova P, Bartl J, Dvorska L, Rychlik I (2000) Relationship between IS901 in the *Mycobacterium avium* complex strains isolated from birds, animals, humans, and the environment and virulence for poultry. Clin Diagn Lab Immunol 7(2): 212-217.

Philit F, Boibieux A, Coppere B, Reverdy ME, Peyramond D, Bertrand JL (1994) *Nocardia asteroides* meningitis without brain abscess in an non-immunodepressed adult. Presse Med 23(7): 346.

Pijper A, Pullinger D (1927) South African nocardioses. J Trop Med Hyg 30: 153-156.

Pintado V, Gomez-Mampaso E, Fortun J, Meseguer MA, Cobo J, Navas E, Quereda C, Martin-Davila P, Moreno S (2002) Infection with *Nocardia* species: clinical spectrum of disease and species distribution in Madrid, Spain, 1978-2001. Infection 30(6): 338-340.

Pisoni G, Locatelli C, Alborali L, Rosignoli C, Allodi S, Riccaboni P, Grieco V, Moroni P (2008) Short communication: Outbreak of *Nocardia neocaledoniensis* mastitis in an Italian dairy herd. J Dairy Sci 91(1): 136-139.

Portola O, Guitart R, Gomez F, Olona M, Vidal F, Castro A (2009) Epidemiology and clinical manifestations of infection due to *Nocardia* species in Tarragona, 1997-2008: *Nocardia cyriacigeorgica* is an emerging pathogen. Enferm Infecc Microbiol Clin 27(10): 585-588.

Provost F, Blanc MV, Beaman BL, Boiron P (1996) Occurrence of plasmids in pathogenic strains of *Nocardia*. J Med Microbiol 45(5): 344-348.

Pulverer G, Schutt-Gerowitt H, Schaal KP (1975) Bacteriophages of *Nocardia asteroides*. Med Microbiol Immunol 161(2): 113-122.

Quatrini P, Scaglione G, De Pasquale C, Riela S, Puglia AM (2008) Isolation of Gram-positive n-alkane degraders from a hydrocarbon-contaminated Mediterranean shoreline. J Appl Microbiol 104(1): 251-259.

Quik M, Huang LZ, Parameswaran N, Bordia T, Campos C, Perez XA (2009) Multiple roles for nicotine in Parkinson's disease. Biochem Pharmacol 78(7): 677-685.

Rainey FA, Burghardt J, Kroppenstedt RM, Platte S, Stackebrandt E (1995) Phylogenetic analysis of the genera *Rhodococcus* and *Nocardia* and evidence for the evolutionary origin of the genus *Nocardia* from within the radiation of *Rhodococcus* species. Microbiology 141: 523-528.

Ramos-Vara JA, Wu CC, Lin TL, Miller MA (2007) *Nocardia tenerifensis* genome identification in a cutaneous granuloma of a cat. J Vet Diagn Invest 19(5): 577-580.

Recio E, Colinas A, Rumbero A, Aparicio JF, Martin JF (2004) PI factor, a novel type quorum-sensing inducer elicits pimaricin production in *Streptomyces natalensis*. J Biol Chem 279(40): 41586-41593.

Reynolds TL, Barnes HJ, Wolfe B, Lu L, Camp DM, Malarkey DE (2009) Bilateral nocardial endophthalmitis in a prothonotary warbler (*Protonotaria citrea*). Vet Pathol 46(1): 120-123.

Richardson WH, Schmidt TM, Nealson KH (1988) Identification of an anthraquinone pigment and a hydroxystilbene antibiotic from *Xenorhabdus luminescens*. Appl Environ Microbiol 54(6): 1602-1605.

Ristow H, Schazschneider B, Vater J, Kleinkauf H (1975) Some characteristics of the DNA-tyrocidine complex and a possible mechanism of the gramicidin action. Biochim Biophys Acta 414(1): 1-8.

Rodriguez-Nava V, Khan ZU, Potter G, Kroppenstedt RM, Boiron P, Laurent F (2007) *Nocardia coubleae* sp. nov., isolated from oil-contaminated Kuwaiti soil. Int J Syst Evol Microbiol 57(Pt 7): 1482-1486.

Rodriguez-Nava V, Zoropogui A, Laurent F, Blaha D, Couble A, Mouniee D, Boiron P (2008) La nocardiose, une maladie en expansion, Nocardiosis, an expanding disease. Antibiotiques 10(3): 115-127.

Roth A, Andrees S, Kroppenstedt RM, Harmsen D, Mauch H (2003) Phylogeny of the genus *Nocardia* based on reassessed 16S rRNA gene sequences reveals underspeciation and division of strains classified as *Nocardia asteroides* into three established species and two unnamed taxons. J Clin Microbiol 41(2): 851-856.

Rowland BM, Grossman TH, Osburne MS, Taber HW (1996) Sequence and genetic organization of a *Bacillus subtilis* operon encoding 2,3-dihydroxybenzoate biosynthetic enzymes. Gene 178(1-2): 119-123.

Rucker RR (1949) A streptomycete pathogenic to fish. J Bacteriol 58(5): 659-664.

Ruiz B, Chavez A, Forero A, Garcia-Huante Y, Romero A, Sanchez M, Rocha D, Sanchez B, Rodriguez-Sanoja R, Sanchez S, Langley E (2010) Production of microbial secondary metabolites: regulation by the carbon source. Crit Rev Microbiol 36(2): 146-167.

Sahathevan M, Harvey FA, Forbes G, O'Grady J, Gimson A, Bragman S, Jensen R, Philpott-Howard J, Williams R, Casewell MW (1991) Epidemiology, bacteriology and control of an outbreak of *Nocardia asteroides* infection on a liver unit. J Hosp Infect 18 Suppl A: 473-480.

Sanchez S (2005) Microbial diversity the bright and promising future of microbial manufacturing. Curr Opin Microbiol 8(3): 229-233.

Schaal KP, Bickenbach H (1976) The ecology of nocardioform actinomycetes; Goodfellow M, Brownell GH, A. SJ, editors. London: Academic Press. 337-371 p.

Schazschneider B, Ristow H, Kleinkauf H (1974) Interaction between the antibiotic tyrocidine and DNA in vitro. Nature 249(459): 757-759.

Schlaberg R, Huard RC, Della-Latta P (2008) *Nocardia cyriacigeorgica*, an emerging pathogen in the United States. J Clin Microbiol 46(1): 265-273.

Schlesinger MJ (1990) Heat shock proteins. J Biol Chem 265(21): 12111-12114.

Sileo L, Sievert PR, Samuel MD (1990) Causes of mortality of albatross chicks at Midway Atoll. J Wildl Dis 26(3): 329-338.

Sin N, Kim KB, Elofsson M, Meng L, Auth H, Kwok BH, Crews CM (1999) Total synthesis of the potent proteasome inhibitor epoxomicin: a useful tool for understanding proteasome biology. Bioorg Med Chem Lett 9(15): 2283-2288.

Snyder H, Wolozin B (2004) Pathological proteins in Parkinson's disease: focus on the proteasome. J Mol Neurosci 24(3): 425-442.

Speitling M, Nattewan P, Yazawa K, Mikami Y, Grun-Wollny I, Ritzau M, Laatsch H, Grafe U (1998) Demethyl mutactimycins, new anthracycline antibiotics from *Nocardia* and *Streptomyces* strains. J Antibiot (Tokyo) 51(8): 693-698.

St Leger JA, Begeman L, Fleetwood M, Frasca S, Garner MM, Lair S, Trembley S, Linn MJ, Terio KA (2009) Comparative pathology of nocardiosis in marine mammals. Vet Pathol 46(2): 299-308.

Stachelhaus T, Mootz HD, Marahiel MA (1999) The specificity-conferring code of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases. Chem Biol 6(8): 493-505.

Steingrube VA, Wilson RW, Brown BA, Jost KC, Jr., Blacklock Z, Gibson JL, Wallace RJ, Jr. (1997) Rapid identification of clinically significant species and taxa of aerobic actinomycetes, including *Actinomadura*, *Gordona*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, and *Tsukamurella* isolates, by DNA amplification and restriction endonuclease analysis. J Clin Microbiol 35(4): 817-822.

Steingrube VA, Brown BA, Gibson JL, Wilson RW, Brown J, Blacklock Z, Jost K, Locke S, Ulrich RF, Wallace RJ, Jr. (1995) DNA amplification and restriction endonuclease analysis for differentiation of 12 species and taxa of *Nocardia*, including recognition of four new taxa within the *Nocardia asteroides* complex. J Clin Microbiol 33(12): 3096-3101.

Stevens DA, Pier AC, Beaman BL, Morozumi PA, Lovett IS, Houang ET (1981) Laboratory evaluation of an outbreak of nocardiosis in immunocompromised hosts. Am J Med 71(6): 928-934.

Stratton HM, Seviour RJ, Soddell JA, Blackall LL, Muir D (1996) The opportunistic pathogen *Nocardia farcinica* is a foam-producing bacterium in activated sludge plants. Lett Appl Microbiol 22(5): 342-346.

Strobel GA (1977) Bacterial phytotoxins. Annu Rev Microbiol 31: 205-224.

Suenaga K, Kokubo S, Shinohara C, Tsuji T, Uemura D (1999) Structures of amistatins A and B, novel growth inhibitors of human tumor cell lines from an actinomycete. Tetrahedron letters 40(10): 1945-1948.

Sullivan DC, Chapman SW (2010) Bacteria that masquerade as fungi: actinomycosis/ *Nocardia*. Proc Am Thorac Soc 7(3): 216-221.

Sun W, Zhang YQ, Huang Y, Zhang YQ, Yang ZY, Liu ZH (2009) *Nocardia jinanensis* sp. nov., an amicoumacin B-producing actinomycete. Int J Syst Evol Microbiol 59(Pt 2): 417-420.

Tam S, Barry DP, Beaman L, Beaman BL (2002) Neuroinvasive *Nocardia asteroides* GUH-2 induces apoptosis in the substantia nigra in vivo and dopaminergic cells in vitro. Exp Neurol 177(2): 453-460.

Teasdale ME, Liu J, Wallace J, Akhlaghi F, Rowley DC (2009) Secondary metabolites produced by the marine bacterium *Halobacillus salinus* that inhibit quorum sensing-controlled phenotypes in gram-negative bacteria. Appl Environ Microbiol 75(3): 567-572.

Teintze M, Hossain MB, Barnes CL, Leong J, van der Helm D (1981) Structure of ferric pseudobactin, a siderophore from a plant growth promoting *Pseudomonas*. Biochemistry 20(22): 6446-6457.

Tekaia F, Lazcano A, Dujon B (1999) The genomic tree as revealed from whole proteome comparisons. Genome Res 9(6): 550-557.

Terao K, Ito E, Oarada M, Ohkusu M, Yazawa K, Mikami Y, Igarashi K (1992) Light and electron microscopic studies on experimental nocardia-toxicosis in mice. Mycopathologia 119(2): 115-125.

Tissieres A, Mitchell HK, Tracy UM (1974) Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. J Mol Biol 84(3): 389-398.

Tsuda M, Yamakawa M, Oka S, Tanaka Y, Hoshino Y, Mikami Y, Sato A, Fujiwara H, Ohizumi Y, Kobayashi J (2005) Brasilibactin A, a cytotoxic compound from actinomycete *Nocardia brasiliensis*. J Nat Prod 68(3): 462-464.

Tsukamura M (1982) Numerical analysis of the taxonomy of *Nocardiae* and *Rhodococci*. Microbiol Immunol 26(12): 1101-1119.

Ventura M, Canchaya C, Tauch A, Chandra G, Fitzgerald GF, Chater KF, van Sinderen D (2007) Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. Microbiol Mol Biol Rev 71(3): 495-548.

Vera-Cabrera L, Gomez-Flores A, Escalante-Fuentes WG, Welsh O (2001) In vitro activity of PNU-100766 (linezolid), a new oxazolidinone antimicrobial, against *Nocardia brasiliensis*. Antimicrob Agents Chemother 45(12): 3629-3630.

Wallace RJ, Jr., Steele LC, Sumter G, Smith JM (1988) Antimicrobial susceptibility patterns of *Nocardia* asteroides. Antimicrob Agents Chemother 32(12): 1776-1779.

Wallace RJ, Jr., Brown BA, Tsukamura M, Brown JM, Onyi GO (1991) Clinical and laboratory features of *Nocardia nova*. J Clin Microbiol 29(11): 2407-2411.

Wang PC, Chen SD, Tsai MA, Weng YJ, Chu SY, Chern RS, Chen SC (2009) *Nocardia seriolae* infection in the three striped tigerfish, *Terapon jarbua* (Forsskal). J Fish Dis 32(4): 301-310.

Wider C, Russmann H, Villemure JG, Robert B, Bogousslavsky J, Burkhard PR, Vingerhoets FJ (2006) Long-duration response to levodopa in patients with advanced Parkinson disease treated with subthalamic deep brain stimulation. Arch Neurol 63(7): 951-955.

Wilson RW, Steingrube VA, Brown BA, Blacklock Z, Jost KC, Jr., McNabb A, Colby WD, Biehle JR, Gibson JL, Wallace RJ, Jr. (1997) Recognition of a *Nocardia transvalensis* complex by resistance to aminoglycosides, including amikacin, and PCR-restriction fragment length polymorphism analysis. J Clin Microbiol 35(9): 2235-2242.

Witebsky FG, Conville PS, Wallace RJ, Jr., Brown-Elliott BA, Huard RC, Schlaberg R, Della-Latta P (2008) *Nocardia cyriacigeorgica*--an established rather than an emerging pathogen. J Clin Microbiol 46(7): 2469; author reply 2469-2470.

Xing K, Qin S, Fei SM, Lin Q, Bian GK, Miao Q, Wang Y, Cao CL, Tang SK, Jiang JH, Li WJ (2010) *Nocardia endophytica* sp. nov., a novel endophytic actinomycete isolated from oil-seed plant Jatropha curcas L. Int J Syst Evol Microbiol.

Yamamura H, Hayakawa M, Iimura Y (2003) Application of sucrose-gradient centrifugation for selective isolation of *Nocardia* spp. from soil. J Appl Microbiol 95(4): 677-685.

Yamamura H, Hayakawa M, Nakagawa Y, Iimura Y (2004) Characterization of *Nocardia asteroides* isolates from different ecological habitats on the basis of repetitive extragenic palindromic-PCR fingerprinting. Appl Environ Microbiol 70(5): 3149-3151.

Yao W, Yang Y, Chiao J (1994) IS204: an insertion sequence from *Nocardia asteroides* (*mexicana*) YP21. Plasmid 32(3): 262-269.

Yassin AF, Rainey FA, Steiner U (2001a) *Nocardia cyriacigeorgici* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol 51(Pt 4): 1419-1423.

Yassin AF, Rainey FA, Steiner U (2001b) Nocardia cyriacigeorgici sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol 51(Pt 4): 1419-1423.

Yazawa K, Mikami Y, Otozai K, Uno J, Arai T (1989) In vitro susceptibility of pathogenic *Nocardia* to beta-lactam antibiotics, especially imipenem, a carbapenem antibiotic. Jpn J Antibiot 42(11): 2354-2362.

Yoneyama T, Yamakami I, Mine S, Saeki N, Yamaura A, Ozaki H, Nakazaki M (2004) Nocardial brain abscess: surgery and postoperative antibiotic therapy. No Shinkei Geka 32(5): 457-462.

Zeinali M, Vossoughi M, Ardestani SK (2008) Naphthalene metabolism in *Nocardia otitidiscaviarum* strain TSH1, a moderately thermophilic microorganism. Chemosphere 72(6): 905-909.

Zhao GZ, Li J, Zhu WY, Klenk HP, Xu LH, Li WJ (2011) *Nocardia artemisiae* sp. nov., an endophytic actinobacterium isolated from surface-sterilized stem of Artemisia annua L. Int J Syst Evol Microbiol.