



HAL
open science

Achromobacter & Pandoraea : diversité et évolution adaptative de populations persistantes au cours de la mucoviscidose et dans l'environnement

Chloé Dupont

► **To cite this version:**

Chloé Dupont. Achromobacter & Pandoraea : diversité et évolution adaptative de populations persistantes au cours de la mucoviscidose et dans l'environnement. Microbiologie et Parasitologie. Université Montpellier, 2016. Français. NNT : 2016MONTT105 . tel-01615036

HAL Id: tel-01615036

<https://theses.hal.science/tel-01615036>

Submitted on 11 Oct 2017

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.

THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur

Délivré par l'**UNIVERSITE MONTPELLIER**

Préparée au sein de l'école doctorale GAIA
Et de l'unité de recherche « Pathogènes Hydriques, Santé,
Environnements » UMR 5569

Spécialité : **MICROBIOLOGIE**

Présentée par **Chloé DUPONT**

ACHROMOBACTER & PANDORAEA
DIVERSITE ET EVOLUTION ADAPTATIVE
DE POPULATIONS PERSISTANTES AU COURS DE LA
MUCOVISCIDOSE ET DANS L'ENVIRONNEMENT

Soutenue le 25 novembre 2016 devant le jury composé de

Pr Catherine NEUWIRTH, PU-PH, CHRU Dijon

Rapporteur

Pr Jean FRENEY, PU-PH, Université de Lyon 1

Président / Rapporteur

Pr Mario VANEECHOUTTE, DR, Université de Gand

Rapporteur

Pr Hélène MARCHANDIN, PU-PH, Université Montpellier

Directeur de thèse

Pr Estelle JUMAS-BILAK, PU-PH, Université Montpellier

Co-Directeur de thèse

Dr Sophie GAUDRIAULT, CR, INRA Montpellier

Examineur

Dr Raphaël CHIRON, PH, CHRU Montpellier

Invité



"Le futur, pour les hommes et autres organismes vivants, est totalement imprévisible ; nous créons notre propre histoire, bien que dans des circonstances que nous n'avons pas choisies"

Steven Rose

Remerciements

Je tiens à remercier en premier lieu mes directrices de thèse, Mesdames Hélène Marchandin et Estelle Jumas-Bilak, de m'avoir accueillie dans leur équipe, m'avoir proposé un sujet digne d'intérêt, m'avoir guidée sur le chemin de la recherche et conseillée tout au long de ces années ; travailler avec vous fut tellement enrichissant ! Je vous remercie de votre confiance, votre disponibilité et de m'avoir enseigné à toujours interpréter un résultat même si il me paraît inexploitable. Grâce à vous l'élaboration de cette thèse qui au départ se trouve être un passage obligé dans une carrière s'est transformée en un parcours passionnant.

Que Madame Catherine Neuwirth et Messieurs Jean Freney et Mario Vaneechoutte trouvent ici l'expression de ma vive considération et de ma sincère reconnaissance pour avoir accepté de juger ce travail en qualité de Rapporteurs.

Je tiens également à exprimer mes plus sincères remerciements à Madame Sophie Gaudriault, pour avoir accepté d'évaluer ce travail et me faire l'honneur de sa présence en tant que membre du jury.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à Monsieur Raphaël Chiron pour sa collaboration et son soutien tout au long de ces années. Il est réellement agréable de travailler avec vous, j'espère que nous continuerons à collaborer et que notre travail permettra de faire avancer la Recherche sur la Mucoviscidose.

Merci à mes collègues

Voilà quatre ans, je passais la porte du labo de bactério et rencontrais une équipe autant dynamique que soudée. Aujourd'hui, il est l'heure pour moi de tous vous remercier pour votre bonne humeur et votre gentillesse.

Aux thésards : merci à Fati (pour nos rigolades), Ayad (pour tous ces gâteaux) et plus particulièrement Emilie, toi (et parfois tes deux ordinateurs) ont été dans mon champs de vision pendant plus de deux ans, les 6 derniers mois m'ont parus bien vides ! Merci pour votre soutien et votre bonne humeur !

A Isa, Steffi, Myriam et Mylène, pour votre aide comme la préparation des milieux dans les moments où j'avais 4 manips en même temps ! Un merci plus particulier à Agnès qui m'a appris l'ECP de manière remarquable et m'a permis de faire des gels magnifiques (s'approchant parfois même de ceux de la chef!).

A Fabien, pour ton entrain, tes explications et tes réponses calmes aux millions de questions posées en 4 ans ! Tu es vraiment un compagnon de bureau très agréable !

A Patricia pour tes conseils avisés, ta bonne humeur et ta bienveillance et à Patrick pour tous ces repas de Noël d'équipe très sympas !

A Christlène, pour cette année de Master à s'être serrées les coudes et pour tous tes conseils (quelque soit l'heure) lors de mes gardes bien chargées de Bactério! Heureusement qu'il n'y a que là que j'étais « Chat noir » !

A Thomas et Ghislaine, vous êtes partis trop tôt... Mais je sais que vous veillez sur le labo de là où vous êtes...

A Monique et Linda, les techniciennes de Muco au CHU, pour leur bonne humeur et leur participation à ce travail. On peut dire qu'*Achromobacter*: vous l'avez dans l'œil !

Aux patients et leur famille, qui m'ont fait confiance et m'ont accueilli chez eux avec beaucoup de sympathie.

Et enfin un Grand Merci à Sara ! Sara, tu es passée par tous les statuts : ma co-interne, ma co-tutrice, ma collègue, ma directrice de thèse d'exercice... Mais surtout mon Amie ! Sans toi je n'en serai certainement jamais arrivée là, tu as ouvert les portes d'IPR en bactério et tu m'as aidée sur le chemin de la force !

Merci pour tous ces moments; entre les gardes, les fous rires en conf', le gala...

Que de souvenirs et j'espère que l'on va continuer à en créer d'aussi bons !



Merci à ma famille

A mes Parents, merci pour votre soutien infailible au cours de toutes ces longues années ! Qui eu cru au lycée que j'aimerais autant les études ? Ça y est c'est enfin terminé & ça en valait la peine ! Je vais enfin pouvoir revenir passer des weekends à Reims et participer à nos agréables moments de vie de famille !

A mes frangins, Axelle & Maxime, merci pour votre soutien et pour les moments de détente et de rigolade au téléphone ! Et à la petite Charline ; il est temps que sa marraine lui souffle un peu dessus comme à fait la mienne ! Ça rend un peu fêlée mais ça ne fait pas de mal !

A Sylviane et Bernard, merci pour tous vos encouragements ! Mathieu n'a plus à s'occuper de moi, il va également pouvoir profiter plus de la famille !

A Salma, et oui, tu es ma famille à Montpellier ! Merci pour m'avoir fait par moments oublier mes bactéries en me « forçant » à sortir, que de bons moments!

Et enfin un incommensurable Merci à Mathieu !! Sans toi, j'aurais vécu bien différemment ces trois années, j'aurais certainement fini... Mais sous la barre des 40 kilos ! Merci pour tout ! Et en particulier pour tes petits plats! Merci surtout pour avoir toujours été là dans les moments de joie comme de doute! Ces dernières années entre nos thèses successives, nos weekends étaient très « cérébrés », vivement que l'on reprenne une vie un peu moins studieuse !



RESUME - ABSTRACT

ACHROMOBACTER & PANDORAEA

Diversité et évolution adaptative de populations persistantes au cours de la mucoviscidose et dans l'environnement

La persistance bactérienne implique une adaptation aux conditions et aux contraintes environnementales, parfois associée à une diversification des génotypes et des phénotypes des populations bactériennes impliquées. Dans le cadre des infections chroniques, la mucoviscidose (CF) est une des pathologies humaines parmi les plus étudiées en termes de persistance et d'adaptation de pathogènes opportunistes. Certains pathogènes opportunistes d'origine environnementale, comme les bactéries des genres *Achromobacter* et *Pandoraea*, considérés comme émergents dans cette pathologie, sont capables de coloniser chroniquement les voies respiratoires des patients CF (VRCF). La colonisation et la persistance impliquent des mécanismes d'adaptations étudiés pour *P. aeruginosa* mais mal connus pour les bactéries émergentes.

Nous avons étudié la persistance de bactéries du genre *Achromobacter* dans les VRCF de 13 patients, ainsi que dans de réseau d'eau d'un centre de soins dentaires, et la persistance de *Pandoraea pulmonicola* dans les VRCF d'un patient, durant des périodes de colonisation allant jusqu'à 7 ans. En parallèle, nous avons étudié la diversité génomique et phénotypique de populations d'*Achromobacter* dans les expectorations de 9 patients. Enfin, une investigation environnementale au domicile de 3 patients colonisés chroniquement par *Achromobacter* a été menée dans le but de connaître la diversité et l'écologie des bactéries de ce genre dans l'environnement proche des patients. Lors de ces différentes études, les espèces d'*Achromobacter* et *Pandoraea* ont été identifiées par méthodes moléculaires et la dynamique du génome ainsi que la diversité phénotypique ont été étudiées.

Nous avons observé une diversité d'espèces de bactéries du genre *Achromobacter* colonisant les VRCF, incluant une espèce non décrite. Les patients colonisés chroniquement l'étaient par un clone unique d'*Achromobacter* ou de *P. pulmonicola*, appuyant l'idée de l'acquisition initiale d'un clone environnemental qui persiste dans le temps. Une importante diversité génomique et phénotypique a été observée au cours du temps mais aussi au sein de populations à un temps donné. Nous avons également mis en évidence une importante diversité de profils d'antibiorésistance au sein de chaque expectoration, dont l'impact clinique reste à évaluer. Enfin, une diversité d'espèces du genre *Achromobacter* a été observée au domicile des patients alors que le clone d'*A. xylosoxidans* adapté aux VRCF des patients n'a pas été isolé dans leurs environnements domestiques. Ces résultats suggèrent qu'après la colonisation initiale et la spécialisation des clones colonisant les VRCF, ceux-ci seraient secondairement incapables de survivre dans l'environnement.

Un clone qui colonise les VRCF s'adapte rapidement aux conditions environnementales particulières de cet habitat et subit une diversification génomique et phénotypique intense par spécialisation de génotypes à différentes niches écologiques, aboutissant à une population clonale diversifiée. Cette diversité assure certainement la persistance de la population clonale par "l'hypothèse d'assurance" selon laquelle quelle que soit la pression environnementale exercée, une bactérie ou un sous-groupe de bactéries sera capable d'y résister.

Mots clés : *Achromobacter*, adaptation, colonisation chronique, diversité, écologie, environnement, épidémiologie, évolution, génomique, mucoviscidose, *Pandoraea*, persistance, phénotype, réseau d'eau, résistance aux antibiotiques.

ACHROMOBACTER & PANDORAEA

Diversity and adaptive evolution of persistent populations in cystic fibrosis and in environment

Bacterial persistence involves adaptation to environmental conditions and constraints, sometimes associated with genotype and phenotype diversification of bacterial populations. In the context of chronic infections, Cystic Fibrosis (CF) is a human disease among the most studied in terms of persistence and adaptation of opportunistic pathogens. Some environmental opportunistic pathogens like *Achromobacter* and *Pandoraea* genera are considered as emerging in CF and are able to chronically colonize CF Respiratory Tract (CFRT). Adaptation mechanisms required for colonization and persistence were studied for *P. aeruginosa* but remain largely unknown for emerging bacteria. We studied *Achromobacter* spp. persistence in the CFRT of 13 patients and in a dental care unit water network, and *Pandoraea pulmonicola* persistence in the CFRT of one patient, during colonization periods up to 7 years. In parallel, we studied *Achromobacter* population genomic and phenotypic diversity in sputum samples from 9 patients. Finally, we made an environmental investigation to study the diversity and the ecology of *Achromobacter* spp. in household of 3 *Achromobacter* chronically colonized CF patients. During these studies, *Achromobacter* and *Pandoraea* species were identified by molecular methods and genome dynamic and phenotypic diversity were studied.

Diversity of *Achromobacter* species colonizing the CFRT is described and included an undescribed species. Chronically colonized patients had a unique *Achromobacter* or *Pandoraea* clone in their CFRT, supporting the initial acquisition of one environmental clone which persists over time. A large genomic and phenotypic diversity has been observed over time and also at the intra-specimen level. A wide antibiotic susceptibility profile diversity was observed within samples and its clinical impact remains to be assessed. Finally, *Achromobacter* species diversity was observed in patient domestic environment but the *Achromobacter* clone adapted to the patient CFRT was not isolated. These results suggested that after initial colonization and specialisation the CFRT, colonizing clones might secondarily be unable to survive in the environment.

A colonizing clone quickly adapts to the specific local conditions of the CFRT and undergoes intense genomic and phenotypic diversification with genotype specialization to the different ecological niches of the heterogeneous CFRT, resulting in a diversified clonal population. This diversity certainly insures the population persistence according to the "bet hedging" theory stating that regardless of the environmental pressures, a bacteria or a subgroup of bacteria will be able to persist.

Key words : *Achromobacter*, adaptation, antibiotic susceptibility, chronic colonization, Cystic Fibrosis, diversity, ecology, environment, epidemiology, evolution, genomic, *Pandoraea*, persistence, phenotype, water network.

SOMMAIRE

Liste des abréviations	4
Liste des tableaux	6
Liste des figures	7
Introduction générale	8
Synthèse bibliographique	12
I Evolution adaptative et relations entre les pathogènes environnementaux et l'homme	13
I.1. Notions d'évolution et d'évolution adaptative des bactéries	13
I.1.1. Etudes <i>in vitro</i> de l'évolution adaptative	14
I.1.2. Evolution adaptative en milieu naturel	17
I.2. Facteurs permettant l'adaptation de bactéries environnementales à l'homme	20
I.2.1. Polyvalence	20
I.2.2. Préadaptation	21
I.2.3. Exposition de l'homme aux bactéries environnementales	23
I.3. Principaux mécanismes de patho-adaptation des pathogènes humains	25
II Niche pulmonaire des patients CF et évolution bactérienne	31
II.1. Pathologie et conséquences pulmonaires	31
II.2. Microbiote respiratoire des VRCF	33
II.2.1. Particularités de la niche écologique	33
II.2.2. Cinétique de la colonisation bactérienne des VRCF	33
II.3. Adaptation des bactéries lors de la persistance dans les VRCF	35
II.3.1. Variations génomiques	36
II.3.2. Variations génétiques	39
II.3.3. Variants à microcolonies	41
II.3.4. La mucoïdie	42
II.3.1. Antibiorésistance et tolérance aux antibiotiques	43
II.3.2. Variations métaboliques	45
II.3.3. Diminution de la virulence	46
II.3.4. Formation de biofilm	52
II.3.5. Adaptation clonale ou adaptation populationnelle ?	54
II.4. Diversité et dynamique des populations bactériennes des VRCF	55

II.4.1.	Une population génétiquement diversifiée _____	56
II.4.2.	Une population phénotypiquement diversifiée _____	58
II.5.	Diversité et dynamique des communautés microbiennes des VRCF _____	61
III	Bactéries d'origine environnementale émergentes dans les VRCF _____	63
III.1.	<i>Achromobacter</i> _____	64
III.2.	<i>Pandoraea</i> _____	64
III.3.	Identification des bactéries appartenant aux genres <i>Achromobacter</i> et <i>Pandoraea</i> _____	66
	Contexte & Objectifs du travail expérimental _____	68
	PARTIE I Epidémiologie des bactéries du genre <i>Achromobacter</i> au CRCM de Montpellier _____	72
I	Introduction _____	73
II	Matériels et Méthodes _____	74
II.1	Recueil des souches _____	74
II.2	Multilocus sequence typing (MLST) _____	74
III	Résultats _____	74
III.1	Diversité d'espèces _____	74
III.2	Diversité des génotypes au sein d'une espèce _____	75
III.3	Diversité d'allèles au sein d'un morphotype _____	76
IV	Discussion & Conclusions _____	76
	PARTIE II Etude longitudinale de l'évolution adaptative d'<i>Achromobacter</i> et <i>Pandoraea</i> lors de colonisations chroniques des VRCF _____	79
I	Introduction _____	80
II	Evolution adaptative d'<i>Achromobacter</i> sp. lors de la colonisation chronique des VRCF de 13 patients _____	81
	Article 1 Dupont C., Michon A.-L., Jumas-Bilak E., Nørskov-Lauritsen N., Chiron R., & Marchandin H. (2015). Inpatient diversity of <i>Achromobacter</i> spp. involved in chronic colonization of Cystic Fibrosis airways. <i>Infection, Genetics and Evolution</i>: 32, 214–223.	
III	Evolution adaptative et patho-adaptation de <i>Pandoraea pulmonicola</i> lors de la colonisation chronique d'un patient CF _____	82
	Article 2 Dupont C., Aujoulat F, Chiron R, Condom P., Jumas-Bilak E., Marchandin H. Highly diversified <i>Pandoraea</i> population during chronic colonization in Cystic Fibrosis: a key to persistence? Soumis à <i>Frontiers in Microbiology</i>	
IV	Conclusion _____	83
	Partie III Etude de la diversité intra-échantillon de populations persistantes d'<i>Achromobacter</i> dans les VRCF : impact sur les résultats d'antibiogramme _____	85
I	Introduction _____	86
II	Diversité génomique et phénotypique des populations clonales d'<i>Achromobacter</i> spp. isolées dans un échantillon _____	87
	Article 3 Dupont C, Jumas-Bilak E., Chiron R, Marchandin H. High diversity of <i>Achromobacter</i> spp. populations within Cystic Fibrosis sputum samples impacts antimicrobial susceptibility testing results. Soumis à <i>Journal of Clinical Microbiology</i>.	

III Complément de discussion	88
Partie IV Habitat et diversité des bactéries du genre <i>Achromobacter</i> au domicile de patients colonisés chroniquement par <i>Achromobacter xylosoxidans</i>	90
I Introduction	91
II Matériels et Méthodes	94
II.1 Choix des patients, consentements, Interface Recherche Bioéthique	94
II.2 Mise au point d'une PCR "spécifique" du genre <i>Achromobacter</i>	94
II. 3 Echantillonnage et recueil des souches	96
III Résultats	97
III.1 Résultats de mise au point de la PCR spécifique	97
III.2 Echantillons positifs	97
III. 3 Diversité d'espèces d' <i>Achromobacter</i>	98
III. 4 Diversité au sein des espèces d' <i>Achromobacter</i>	98
III. 5 Comparaison des isolats d' <i>A. xylosoxidans</i> environnementaux et cliniques	98
III. 6 Autres espèces isolées sur milieu sélectif	98
IV Discussion	99
PARTIE V Persistance environnementale de bactéries du genre <i>Achromobacter</i> : dynamique des populations et succès clonal	103
I Introduction	104
II Etude de la persistance environnementale d'<i>Achromobacter</i> spp. et <i>P. aeruginosa</i> dans une niche technologique hospitalière	105
<small><u>Article 4</u> Abdouchakour F., Dupont C., Grau D., Aujoulat F., Mournetas P., Marchandin H., Parer S., Gibert P., Valcarcel J., Jumas-Bilak E. (2015). Clonal selections of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> and <i>Achromobacter</i> sp. lead to successive colonization waves of water contamination in dental care units. Applied and Environmental Microbiology. 81, 7509-7524</small>	
III Conclusion	107
Discussion générale	109
Conclusion générale	127
Références bibliographiques	129
Annexes	165

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNr 16S	ARN ribosomal 16S
ATP	Adenosine tri-phosphate
BET	Bromure d'éthidium
BGN	Bacille à Gram négatif
CBC	Complexe <i>Burkholderia cepacia</i>
CHRU	Centre Hospitalier Régional Universitaire
CF	Mucoviscidose
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
CRCM	Centre de Ressource et de Compétence pour la Mucoviscidose
ECP	Electrophorèse en Champ Pulsé
EPS	Exopolysaccharides
FS	Fast Switcher
GISA	<i>S. aureus</i> de sensibilité diminuée aux glycopeptides
G6PDH	Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase
Ig	Immunoglobuline
IS	Séquence d'insertion
IU	Infection urinaire
LES	Liverpool Epidemic Strain
LPS	Lipopolysaccharide
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation - Time Of Flight
MLST	Multilocus sequence typing
MMR	Methyl-directed mismatch repair
MNT	Mycobactéries non tuberculeuses
OMS	Organisation Mondiale de la Santé

OPPP	Opportunistic Premise Plumbing Pathogens
PES	Prairie Epidemic Strain
PCR	Polymerase chain reaction
QS	Quorum sensing
RAPD	Random amplified polymorphic DNA
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la métiline
SC	Syndrome cepacia
SCV	Variant à microcolonies
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SS	Slow Switcher
ST	Sequence Type
TLR	Toll Like Receptor
TSSIII	Système de sécrétion de type III
UFC	Unité Formant Colonies
VBNC	Etat viable non cultivable
VEMS	Volume Expiratoire Maximal en 1 seconde
VRCF	Voies respiratoires des patients atteints de mucoviscidose

Liste des tableaux

Tableau 1 : Génotypes (ST) identifiés pour les 37 souches correspondant aux premiers isolats de 2014 de 20 patients suivis au CRCM du CHU de Montpellier.

Tableau 2 : Description des amorces définies pour la PCR « spécifique » du genre *Achromobacter*

Tableau 3 : Description et résultats obtenus des différents prélèvements effectués au domicile de trois patients CF colonisés chroniquement à *A. xylosoxidans* et dans lesquels une bactérie du genre *Achromobacter* a été identifiée.

Tableaux annexe 2 : Description de la totalité des prélèvements effectués aux domiciles de 3 patients CF colonisés chroniquement par *A. xylosoxidans* et des résultats obtenus.

Liste des figures

Figure 1 : Schéma représentatif des 5 classes de mutations du gène codant la protéine CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) décrites dans la mucoviscidose.

(D'après Lopes-Pacheco 2016)

Figure 2 : Schéma représentatif des conséquences pulmonaires des mutations dans le gène *CFTR*.

(D'après Stoltz et al. 2015)

Figure 3 : Epidémiologie des microorganismes colonisant les voies respiratoires des patients atteints de mucoviscidose (VRCF) aux USA en 2014.

Figure 4 : Réseau de régulation de *MucA- δ^{22}* . (D'après Folkesson et al. 2012)

Figure 5 : Modifications du Lipopolysaccharide de *P. aeruginosa* durant la colonisation des VRCF.

(D'après Hauser et al. 2011)

Figure 6 : Modèles alternatifs d'évolution clonale au sein d'un patient.

(Adapté de Lieberman et al., 2014)

Figure 7 : Représentation de l'évolution au sein d'un patient d'une population de *Burkholderia dolosa* menant à une diversification (Adapté de Lieberman et al. 2014)

Figure 8 : Evolution des pathogènes au sein des poumons d'un patient atteint de mucoviscidose.

(D'après Didelot et al. 2016)

Figure 9 : Diversité phénotypique d'isolats provenant d'un même échantillon. (D'après Qin et al. 2012)

Figure 10 : Détermination de l'auxotrophie pour la méthionine de souches isogéniques de *P. aeruginosa* provenant d'un échantillon de patient atteint de mucoviscidose. (D'après Qin et al. 2016)

Figure 11 : Le modèle "climax-attack" proposé dans la mucoviscidose. (D'après Conrad et al. 2012)

Figure 12 : Diversité d'espèces d'*Achromobacter* déterminée par MLST.

Figure 13 : Représentation goeBURST basée sur les données MLST de PubMLST et des 1^{ers} isolats d'*A. xylosoxidans* de 2014 de 16 patients suivis au CRCM du CHU de Montpellier selon la source d'isolement.

Figure 14 : Représentation goeBURST basée sur les données MLST de PubMLST et des 1^{ers} isolats de 2014 de 3 patients suivis au CRCM du CHU de Montpellier selon l'espèce et la source d'isolement.

Figure 15 : Aspect morphologique des colonies obtenues après mise en culture d'un échantillon environnemental sur milieu sélectif spécifique du genre *Achromobacter* après 72h d'incubation à 30°C.

Figure 16 : Arbre de maximum de vraisemblance basé sur la séquence du gène *nrdA* (750bp) montrant la position relative des souches environnementales d'*Achromobacter* de notre étude.

INTRODUCTION GENERALE

La persistance bactérienne implique une adaptation aux conditions et aux contraintes environnementales parfois associée à une diversification des génotypes et des phénotypes des populations bactériennes impliquées.

Dans le cadre des infections chroniques, la mucoviscidose est une des pathologies humaines parmi les plus étudiées en termes de persistance et d'adaptation de pathogènes opportunistes d'origine exogène. La mucoviscidose est une maladie génétique héréditaire autosomale récessive, liée à des mutations dans le gène CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator), qui code pour un canal impliqué dans le transport d'ions chlorures à la surface apicale des cellules épithéliales. Au niveau respiratoire, la perturbation de synthèse ou de fonction de ce canal provoque une déshydratation du mucus des voies respiratoires et perturbe la clairance mucociliaire favorisant ainsi la colonisation par des bactéries d'origines endogène et exogène. Ainsi, les caractéristiques pulmonaires inhérentes à la maladie permettent la colonisation chronique durant des années voire une vie entière par des bactéries opportunistes.

Les voies respiratoires des patients atteints de mucoviscidose (VRCF) constituent un habitat spatialement et temporellement hétérogène soumis à des pressions antibiotiques, immunologiques, physiologiques et biochimiques, contraignant les bactéries à s'adapter pour persister après la primo-colonisation. De nombreuses études se sont focalisées sur l'adaptation et la persistance de *Pseudomonas aeruginosa*, considéré comme le pathogène majeur impliqué dans cette pathologie. Excepté lors de certaines situations épidémiques, les isolats de primo-colonisation de *P. aeruginosa* sont généralement polyclonaux, suggérant une acquisition à partir de sources diverses. Lors de l'isolement initial à partir des VRCF, les souches de *P. aeruginosa* sont indiscernables de leurs homologues environnementales en termes de morphotypes coloniaux observables et de profils de résistance aux antibiotiques. Au cours du temps, de nombreuses modifications qualifiées de patho-adaptatives, c'est-à-dire conduisant à des phénotypes plus adaptés aux conditions des VRCF, ont été décrites, notamment une augmentation d'antibiorésistance, une virulence atténuée associée à une perte de quorum sensing, une perte de motilité ainsi qu'une surproduction d'alginate engendrant des souches mucoïdes formant du biofilm. Récemment, certaines études ont suggéré que cette évolution ne se ferait pas vers un seul clone adapté mais que les populations de pathogènes dans les VRCF seraient hétérogènes, composées de multiples variants dérivés de l'ancêtre primo-colonisant qui coexisteraient tout au long de l'évolution de la maladie.

Pendant de très nombreuses années, *P. aeruginosa* a été considéré comme le pathogène principal dans la mucoviscidose et les infections chroniques engendrées ont été reliées à une plus forte morbi-mortalité. Néanmoins, l'amélioration de la clairance des voies respiratoires, le traitement plus efficace et ciblé contre les agents pathogènes classiques associés à l'augmentation de la durée de vie des patients et à l'amélioration du diagnostic microbiologique ont conduit à un changement de l'épidémiologie des agents pathogènes identifiés chez les patients atteints de mucoviscidose (patients CF). Des micro-organismes émergents, tels que *Stenotrophomonas maltophilia*, *Mycobacterium abscessus*, *Ralstonia* spp., *Achromobacter* spp. et *Pandoraea* spp., plus rarement observés dans d'autres domaines de la médecine, sont de plus en plus fréquemment identifiés, colonisant de manière cumulative environ 25% des patient CF. Les phénotypes de résistance voire de

multirésistance aux antibiotiques de ces pathogènes émergents favoriseraient leur sélection et leur persistance dans les VRCF. L'identification de ces bactéries opportunistes au niveau de l'espèce est parfois difficile, nécessitant le recours à des méthodes moléculaires et, en conséquence, leur épidémiologie reste peu connue. Bien que le rôle pathogène de la plupart d'entre eux ne soit pas clairement établi, leur présence est le plus souvent prise en compte lors de la mise en place de traitements antibiotiques, notamment en cas d'exacerbation pulmonaire. Parmi ces pathogènes, seules les bactéries du genre *Pandoraea* et *Mycobacterium abscessus* ont été associées à une diminution de la fonction pulmonaire. Enfin, tout comme *P. aeruginosa*, ces bactéries opportunistes émergentes sont capables de coloniser chroniquement les VRCF et leurs mécanismes d'adaptation à cette niche ainsi que leur impact clinique sur la fonction pulmonaire sont peu étudiés.

Dans ce contexte, nos travaux ont consisté en l'étude de la diversité et de l'évolution adaptative au cours de la persistance dans divers habitats, clinique CF et environnemental, de pathogènes opportunistes appartenant aux genres *Achromobacter* et *Pandoraea*.

Ce travail est présenté ci-après en plusieurs parties.

Une synthèse bibliographique présente tout d'abord les principaux phénomènes d'adaptation décrits *in vitro*, dans l'environnement naturel et *in vivo* chez l'homme, ainsi que les caractéristiques particulières permettant le passage de bactéries environnementales à l'hôte humain. Après ces données générales sont présentées des données ciblées sur l'adaptation des pathogènes opportunistes environnementaux au cours de la colonisation chronique des VRCF.

Cette synthèse est suivie d'une partie expérimentale présentée selon les 5 axes suivants :

- Etude de l'épidémiologie des bactéries du genre *Achromobacter* chez les patients consultant au Centre de Ressources et de Compétence de la Mucoviscidose (CRCM) de Montpellier.
- Mise en évidence de témoins d'adaptation chez des pathogènes opportunistes d'origine environnementale (genres *Achromobacter* et *Pandoraea*) et étude de leur dynamique au cours de la colonisation chronique des voies respiratoires.
- Description de la diversité de population des bactéries du genre *Achromobacter* au sein des voies respiratoires à un temps donné et impact potentiel de cette diversité sur la prise en charge thérapeutique des patients.
- Etude de l'écologie et de la diversité des bactéries du genre *Achromobacter* au domicile de patients colonisés chroniquement par des bactéries de ce genre.
- Etude de la persistance environnementale d'*Achromobacter* et de *P. aeruginosa* au sein d'une niche technologique dynamique.

Enfin, cette partie expérimentale fera l'objet d'une discussion générale.

La diffusion scientifique autour de nos travaux est à ce jour de 2 publications dans des revues internationales, 2 communications en congrès international et 2 en congrès nationaux. Nous avons également participé à la rédaction de 2 chapitres d'ouvrages (un national, un international), ainsi qu'à une journée des doctorants et à une réunion avec les patients atteints de mucoviscidose et leurs

familles organisée par le CRCM du CHU de Montpellier. Enfin, un article est actuellement soumis pour publication dans une revue internationale et un article est à soumettre.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I Evolution adaptative et relations entre les pathogènes environnementaux et l'homme

I.1. Notions d'évolution et d'évolution adaptative des bactéries

L'échelle de temps durant laquelle une espèce bactérienne a naturellement évolué par rapport à un ancêtre théorique est généralement très importante, couvrant des millions d'années (Rau et al. 2012). En effet, le gène de l'ARN ribosomal 16S (ADNr 16S), utilisé pour reconstruire une phylogénie bactérienne universelle et différencier les espèces, présente une divergence estimée à 1 à 2% par 50 millions d'années (Ochman et al. 1999). Par exemple, la différence de séquences d'ADNr 16S observée entre des bactéries taxonomiquement très proches, *Burkholderia mallei* et *Burkholderia pseudomallei*, parfois considérées comme appartenant à une seule espèce (Godoy et al. 2003), est de 0,15% suggérant une divergence datant de 4 à 7,5 millions d'années (Mira et al. 2006).

Toutefois, des phénomènes d'évolution et de spéciation ont été retracés sur des périodes de temps beaucoup plus courtes chez les bactéries. Par exemple, il y a approximativement 10 000 ans, l'avènement de l'agriculture et de l'élevage a apporté une des plus grandes révolutions sociales observées dans l'histoire de l'humanité (Bocquet-Appel 2002). Les ressources en nourriture plus abondantes et constantes ont permis à l'espèce humaine d'augmenter la taille de sa population de manière extraordinaire. Du point de vue des bactéries pathogènes, les humains sont devenus des hôtes attractifs, se concentrant en populations denses vivant à proximité des animaux d'élevage, maximisant les chances de transmission à des hôtes présentant une plus grande longévité (Mira et al. 2006). Ainsi, il est fort probable que la croissance et l'expansion de l'humanité au Néolithique ait créé les conditions de la spéciation de nouveaux agents pathogènes humains, à l'origine de ce qui fut certainement la première vague de maladies infectieuses humaines émergentes. L'expansion de séquences d'insertions (IS) au sein du génome de nombreuses bactéries a été associée à ce phénomène de spéciation accélérée et représente un modèle exceptionnel d'évolution bactérienne à des échelles de temps de courte et moyenne durée (Mira et al. 2006). En effet, les IS, au-delà d'inactiver les gènes par leur insertion, augmentent le taux de réarrangements génomiques et sont, par exemple, responsables de larges délétions (Parkhill et al. 2003). Des pathogènes spécialistes de l'infection humaine comme *Shigella flexneri* et *Bordetella pertussis* ont ainsi subi une expansion extraordinaire du nombre d'IS et l'hypothèse a été émise que cette expansion d'éléments génétiques mobiles aurait eu lieu au Néolithique lorsque les ancêtres de ces deux espèces ont indépendamment limité leur gamme d'hôtes à l'homme et aux animaux d'élevage (Mira et al. 2006). Le taux d'évolution bactérienne à long terme de gènes moins conservés que celui de l'ADNr 16S, étalonné en utilisant des dates connues d'événements écologiques et géologiques, a tout d'abord été estimé à 10^{-10} - 10^{-9} substitutions par site et par année (Ochman et al. 1999). Ce taux assez faible permettait de suggérer qu'une population récemment installée au sein d'un hôte était complètement monomorphe (Ochman et al. 1999). Cependant, des études récentes ont mis en évidence des taux d'évolution bactérienne de l'ordre de 10^{-7} à 10^{-5} substitutions par site et par an, permettant d'envisager des divergences

génétiques à l'échelle de mois ou d'années (Biek et al. 2015). Bien que ces taux d'évolution restent plus faibles que ceux rapportés pour les virus à ARN (10^{-4} à 10^{-3}), les bactéries ont un plus grand génome, ce qui signifie que leur taux d'évolution par génome peut être comparable voire plus important que ceux de ces virus (Biek et al. 2015). Il y a donc plusieurs échelles temporelles d'évolution bactérienne observables. Ces phénomènes d'évolution rapide des bactéries peuvent être observés à l'échelle d'une vie humaine mais aussi lors d'infections ou de colonisations chroniques d'un hôte. Cette évolution qualifiée d'adaptative s'observe tant au niveau génomique que phénotypique. L'évolution de la résistance aux antibiotiques et de l'adaptation à l'hôte chez des patients colonisés chroniquement par des pathogènes opportunistes s'est d'ailleurs révélée être un modèle remarquable d'évolution adaptative convergente (Didelot et al. 2016).

I.1.1. Etudes *in vitro* de l'évolution adaptative

De nombreuses études d'évolution *in vitro* ont mis en évidence et étudié des mécanismes impliqués dans l'évolution adaptative bactérienne. Des mutations nucléotidiques simples, des réarrangements chromosomiques, ainsi que des duplications de gènes, ont été observés au cours de ces études. Par exemple, des taux de délétion importants ont été rapportés pour des souches de *Salmonella enterica* cultivées dans des milieux riches. Dans ces milieux abondants en nutriments, plusieurs fonctions de biosynthèse d'acides aminés devenaient superflues rendant favorable, en termes de coût génétique, la délétion de gènes codant pour ces fonctions (Nilsson et al. 2005). Une autre étude a montré qu'une réduction génomique pouvait se produire dans cette même espèce à de courtes échelles de temps, lors de repiquages successifs (Nilsson et al. 2005). Toujours dans le cadre de l'adaptation rapide à certaines conditions, parmi six lignées d'*Escherichia coli* adaptées après 2000 générations à 41,5 °C, trois présentaient des événements de duplication et de délétions de gènes (Riehle et al. 2001). De manière intéressante, trois duplications identifiées avaient eu lieu dans la même région génomique, suggérant une évolution convergente à l'origine de l'adaptation à de hautes températures. Cette région de duplication contenait quatre gènes décrits auparavant comme jouant un rôle dans la réponse au stress et la survie dans les milieux oligotrophes¹.

Une étude de l'évolution d'*E. coli* suggère qu'en présence de faibles concentrations en nutriments, différents clones variants présentant une phase de latence de croissance réduite, un taux de croissance maximal augmenté, ou une plus forte capacité à survivre dans des conditions de densité cellulaire élevée, peuvent apparaître au cours du temps (Kinnersley et al. 2009). Les changements périodiques de densité de population et de taux de nutriments peuvent alors contribuer à un équilibre de sélection entre les différents variants coexistants. Ce phénomène de maintien et de coexistence de plusieurs polymorphismes dans une population asexuée haploïde est appelé l'interférence clonale, où des mutations bénéfiques différentes peuvent être portées par différentes sous-populations (Kao and Sherlock 2008). Dans les grandes populations d'êtres vivants haploïdes, la coexistence de variants

¹ A faible teneur en nutriments

présentant des mutations adaptatives bénéfiques va limiter l'expansion dominante d'une des lignées adaptées (Kao and Sherlock 2008).

Trois populations différentes d'*E. coli*, chacune étant initialement isogénique², placées dans des milieux à faible teneur en carbone se sont toutes diversifiées en deux sous-populations présentant différents types de variations adaptatives dans le métabolisme des glucides (Herron and Doebeli 2013). Lors de culture sur des milieux contenant du glucose et de l'acétate comme sources carbonées, les bactéries métabolisent préférentiellement le glucose et excrètent de l'acétate jusqu'à ce que le glucose soit épuisé dans le milieu. Elles effectuent alors la transition glucose-acétate aussi appelée phénomène de diauxie qui permet la consommation d'acétate (Monod, J 1942). Après 1 000 générations de bactéries ayant subi la transition glucose-acétate, deux phénotypes différant par le délai d'engagement dans la voie d'utilisation de l'acétate émergent et coexistent dans les populations testées ; les "slow switcher" (SS) et les "fast switcher" (FS) (Friesen et al. 2004; Spencer et al. 2008). Ces deux phénotypes reflètent un compromis dans le métabolisme des glucides : les souches SS ont une croissance plus importante que les FS quand le glucose est abondant mais ne catabolisent pas aussi efficacement l'acétate tandis que les souches FS présentent une croissance identique quand le glucose est épuisé (Spencer et al. 2008). La reproductibilité de l'apparition de ces deux phénotypes lors de nombreux réplicats est un exemple frappant de convergence évolutive, suggérant un processus adaptatif sous-jacent. Néanmoins, pour plusieurs réplicats, des auteurs ont mis en évidence que les variants SS métabolisant mieux le glucose étaient les premiers à apparaître et à envahir le milieu, suivis par les variants FS métabolisant mieux l'acétate (Herron and Doebeli 2013). Les auteurs considèrent que la coévolution des deux phénotypes SS et FS est favorisée par des interactions écologiques ; tout changement d'environnement induit par les activités métaboliques d'une sous-population abondante créant une nouvelle niche au sein de laquelle une autre sous-population peut évoluer et devenir abondante. Ils notent ensuite que des polymorphismes peuvent être observés au sein des lignées SS et FS et maintenus dans un contexte d'interférence clonale (Herron and Doebeli 2013).

La coopération pour la production collective de biens biologiques est un phénomène écologique fréquent dans les communautés microbiennes. Se développent alors des « profiteurs » (ou tricheurs, « cheats »), c'est-à-dire des mutants non producteurs, qui exploitent ces biens communs. Une étude a analysé la coévolution de souches de *P. aeruginosa* productrices de pyoverdine (« coopérateurs »), un sidérophore piégeant le fer, avec des souches de *P. aeruginosa* non productrices mais capables d'absorber cette pyoverdine (« profiteurs ») (Kümmerli et al. 2015). Dans les conditions de l'étude, des populations mixtes dans lesquelles les lignées de « coopérateurs » et « profiteurs » coexistent sont souvent observées. Les études phénotypiques et génomiques suggèrent que, dans les populations mixtes, les « coopérateurs » sont devenus moins exploitables par les « profiteurs » en réduisant considérablement leurs investissements dans la synthèse de pyoverdine. Les profiteurs ont, quant à eux, amélioré l'efficacité de leur exploitation par des mutations bloquant une voie coûteuse de

² Partageant le même patrimoine génétique

signalisation déclenchée lors de l'absorption du sidérophore (Kümmerli et al. 2015). De plus, les lignées ont toutes deux évolué en réduisant leur motilité, ce qui affecte les interactions sociales en réduisant le mélange des souches et le partage de pyoverdine. Dans l'ensemble, il a été observé une coévolution durant laquelle la coexistence et les interactions des « coopérateurs » et des « profiteurs » ont nécessité une combinaison d'adaptations à l'environnement abiotique et social (Kümmerli et al. 2015).

Enfin, la mesure des taux de croissance de douze populations d'*E. coli* pendant 50 000 générations (21 ans) a montré que le fitness général de la population augmentait apparemment sans limite (Wiser et al. 2013). Les auteurs ont pourtant noté que les mutations délétères apparaissaient plus fréquemment que les mutations bénéfiques mais que leurs conséquences étaient moins importantes que les avantages apportés par les mutations bénéfiques dans les conditions de l'expérience. L'étude de leur croissance *in vitro* a montré que les lignées à fort taux de mutations ou hypermutables présentaient une augmentation de fitness au cours du temps plus rapide que celle de leurs ancêtres et de populations non hypermutables. Les auteurs ont conclu qu'elles seraient particulièrement adaptables face à des conditions environnementales changeantes (Wiser et al. 2013). L'hypermutation est un phénomène fréquent chez les bactéries. On distingue des souches faiblement et fortement hypermutables, avec des taux de mutations respectivement supérieurs de 13 fois et 200 fois à la valeur normale (Matic et al. 1997). Ces taux importants de mutation sont liés à des perturbations dans le système MMR (methyl-directed mismatch repair) impliquant le gène *mutS* codant pour des protéines qui réparent les erreurs de l'ADN polymérase lors de la réplication de l'ADN (Watson et al. 2004). Les erreurs de l'ADN polymérase ne sont donc plus rectifiées et le taux de mutation augmente. Plus récemment, de nouveaux gènes impliqués dans l'hypermutabilité ont été décrits chez *P. aeruginosa* comme le gène *pfpl* (Rodríguez-Rojas and Blázquez 2009). Ce gène joue normalement un rôle protecteur contre les détériorations de l'ADN causées par le stress oxydatif et son inactivation serait impliquée dans l'apparition de variants hypermutateurs.

Les variations et contraintes de niche écologique jouent un rôle important dans l'évolution microbienne. Cette évolution est souvent visible à un niveau phénotypique mais il est le plus souvent difficile de déterminer la base génétique des modifications observées. Pour étudier le lien entre la capacité de *P. aeruginosa* à dégrader de nouveaux sucres et les modifications génétiques sous-jacentes, le génome de nombreux clones a été séquencé après 30 jours d'évolution en présence de différents sucres (Toll-Riera et al. 2016). Les mutations mises en évidence touchaient principalement des gènes impliqués dans la transcription et le métabolisme. De manière très intéressante, l'apparition de nouvelles capacités métaboliques a été reliée à des mutations dans les gènes dupliqués préexistants dans le génome de *P. aeruginosa*. La redondance génétique fournie par duplication permet ainsi à *P. aeruginosa* d'évoluer vers des fonctions métaboliques nouvelles sans compromettre ses fonctions existantes (Toll-Riera et al. 2016). Ceci suggère que des événements de duplication peuvent être le support de phénomènes d'évolution adaptative.

De nombreux phénomènes d'évolution adaptative ont été observés *in vitro* ; ils ont également été observés en milieu naturel en réponse à des conditions environnementales changeantes.

I.1.2. Evolution adaptative en milieu naturel

La question centrale de l'écologie et de l'évolution bactérienne nécessite de pouvoir démarquer nettement les groupes jouant des rôles écologiques distincts (écotypes) de l'ensemble vaste et diversifié des bactéries organisées en communautés naturelles (Koeppel et al. 2008). Pour mieux comprendre l'écologie d'une communauté, il faut identifier les populations non seulement taxonomiquement différentes mais aussi écologiquement distinctes car ce sont ces unités qui contribuent à la diversité, aux fonctions et à l'évolution de la communauté. En effet, des bactéries appartenant à des clusters phylogénétiques identiques pour un gène donné peuvent correspondre à des populations écologiquement distinctes (Koeppel et al. 2008).

Etudier la façon dont les lignées divergent dans l'espace et dans le temps et comment cette divergence conduit à la formation d'écotypes est important pour comprendre la structure et la dynamique des communautés environnementales (Deng et al. 2014). En cas de modification des conditions d'un habitat ou d'une niche écologique, des événements génétiques ou génomiques peuvent permettre l'apparition d'un nouvel écotype (Cohan 2006). Une sélection périodique a alors lieu, cette sélection naturelle pouvant provoquer le remplacement de tous les variants en compétition au sein de l'écotype par le nouveau mutant et ses descendants. Certains auteurs suggèrent que si le concept d'espèce écologique était employé, les écotypes pourraient être considérés comme des espèces car ils représentent des lignées évolutives distinctes qui occupent des niches uniques (Ward et al. 2006).

De nombreux phénomènes d'évolution et d'adaptation de bactéries environnementales à des conditions spécifiques d'habitats ont été décrits. Les études se sont particulièrement focalisées sur les bactéries marines et leurs évolutions et diversifications dans des conditions environnementales changeantes. De nombreuses études ont rapporté des phénomènes d'adaptation bactérienne dans les environnements naturels, et dans ce contexte, nous avons sélectionné et synthétisé des travaux relatant la diversité, la dynamique, la spéciation et l'émergence d'écotypes.

Une étude de la **diversité des écotypes** de *Bacillus simplex* au sein de trois canyons identiques, présentant un versant sud avec une forte exposition au soleil, un versant nord avec moins d'ensoleillement et le fond du canyon avec un meilleur accès à l'eau, a montré des résultats similaires pour les 3 canyons (Sikorski and Nevo 2007). Parmi les 131 souches étudiées, toutes celles provenant du versant sud présentaient un meilleur taux de croissance à des températures hautes tandis qu'aucune différence de température optimale de croissance n'était observée entre les souches. Ceci a été associé à une plus forte sécrétion par ces isolats de certains acides gras conférant une tolérance à la dessiccation. Les auteurs ont noté que les motifs d'adaptation à la chaleur remplaçaient l'histoire phylogénétique des lignées individuelles. Ces résultats suggèrent que l'adaptation des souches à la chaleur du versant sud est continue et que ce stress de température est la force environnementale majeure qui dirige les processus évolutifs identiques observés pour les souches de *B. simplex* dans les 3 canyons (Sikorski and Nevo 2007). Une autre étude basée sur l'analyse multilocus d'isolats de *B. simplex* dans ces environnements a mis en évidence neuf clades présumés dont la distribution était significativement hétérogène, certains étant présents uniquement

Définitions écologiques

- **Le Biome** est un ensemble d'écosystèmes, caractéristique d'une aire biogéographique, nommé à partir de la végétation et des espèces animales qui y prédominent et y sont adaptées. Il est fondamentalement caractérisé par son climat, en particulier températures et précipitations.

- **L'écosystème** est une grande unité d'étude de l'écologie, comprenant un milieu (le biotope), les êtres vivants qui le composent (la biocénose) et toutes les relations qui peuvent exister et se développer à l'intérieur de ce système. Les écosystèmes sont toujours en état de déséquilibre, sans cesse tirés vers un état climacique (état théorique final en équilibre dynamique) par des boucles de rétroaction complexes.

- **L'habitat** représente le milieu dans lequel une population d'individus peut normalement vivre et se développer. Il correspond à une entité écologique incluant espèces et communautés.

- **La niche écologique** a été définie comme un hypervolume à n dimensions dans lequel les dimensions sont les conditions environnementales, les ressources pour la survie et la reproduction d'un être vivant (Hutchinson 1958).

Deux types de niches peuvent être distingués :

* Une niche fondamentale réunissant tous les composants et toutes les conditions environnementales nécessaires à l'existence d'un organisme.

* Une niche réalisée qui est souvent comprise dans la niche fondamentale, réduite à l'espace le plus approprié du fait de compétitions avec d'autres espèces ou génotypes. L'être vivant construit donc sa niche et participe à sa propre évolution par des mécanismes d'adaptation qui peuvent se définir comme l'ajustement fonctionnel de l'être vivant à sa niche. L'**adaptation** est un mécanisme dynamique grâce auquel les êtres vivants maintiennent leur homéostasie physiologique (à l'intérieur d'eux-mêmes) et écologique (entre eux) en réponse aux fluctuations de l'environnement à court et long termes.

D'après le principe de Gause, deux espèces (sauf dans le cas d'espèces symbiotes) ne peuvent occuper une même niche écologique durablement. En effet, il en résulte une compétition et les lois de la sélection naturelle tendent à favoriser celle qui est la mieux adaptée à la niche. Néanmoins, deux espèces peuvent occuper des niches écologiques chevauchantes dans l'espace et/ou dans le temps c'est-à-dire que seulement une partie des dimensions de l'hypervolume de Hutchinson est occupée de manière simultanée. Les ressources disponibles étant un facteur limitant, il en résulte une compétition interspécifique pouvant réduire l'effectif de chacune des deux populations par rapport à l'occupation de toutes les dimensions par une population unique.

Pour résumer, selon l'analogie d'Odum, « la niche écologique, c'est la profession de l'espèce alors que l'habitat en est l'adresse » (Odum et al. 1959).

Définitions bactériologiques

- **La communauté** est l'ensemble des microorganismes appartenant à des populations d'espèces différentes constituant un réseau de relations.

- **La population** est l'ensemble des individus d'une même espèce qui occupe simultanément le même milieu.

- **Une espèce** est l'ensemble des souches dont le génome présente une similarité génomique importante (hybridation ADN-ADN $\geq 70\%$) avec celui de la souche type. On peut parler d'espèce génomique.

- **Un écotype** est un individu ou une population d'individus d'une espèce qui se sont spécialisés à une niche écologique et ont participé à la création de celle-ci. Le(s) phénotype(s) particulier(s) permettant d'identifier un écotype est (sont) déterminé(s) par l'adaptation aux conditions particulières de la niche.

- **Un clone** bactérien est un groupe de cellules dérivées d'une unique cellule ancestrale. Sans dérive génétique, toutes les bactéries d'un clone bactérien sont identiques et identiques à la cellule mère.

- **L'isolat** est une colonie isolée d'une culture bactérienne.

- **La souche** est un isolat phénotypiquement ou génotypiquement caractérisé. C'est « l'unité de travail » du bactériologiste.

au niveau du versant sud, d'autres uniquement au niveau du versant nord et certains au niveau de ces 2 versants (Koeppel et al. 2008). Toujours dans le cadre de l'adaptation à de hautes températures, l'étude des cyanobactéries du tapis microbien de sources chaudes siliceuses alcalines au Park National de Yellowstone a montré une structuration des séquences d'ADNr 16S en lien avec le gradient thermique suggérant l'existence d'écotypes adaptés à des températures distinctes (Ward et al. 2006). De plus, l'analyse de la distribution verticale des variants de l'ADNr 16S a mis en évidence une éventuelle adaptation à la lumière. Il a également été suggéré que certains écotypes adaptés à différents paramètres environnementaux pourraient ne pas présenter de répartition spatiale distincte mais présenter des profils d'expression de gènes spatio-temporels uniques. Par exemple, les populations actives le jour et la nuit pourraient vivre dans un même emplacement spatial mais exprimer différemment certains gènes en présence de lumière ou d'autres paramètres variant (pH, O₂, etc, ...) en fonction du cycle nyctéméral (Ward et al. 2006).

D'autre part, la **dynamique** des bactéries marines durant des périodes de temps court a été étudiée et des modifications saisonnières de la structure de communauté ont été mises en évidence dans différents environnements (Lami et al. 2009; Salter et al. 2015). Dans ce contexte, le clade SAR11 des alphaprotéobactéries est un composant dominant des bactéries marines et son importance écosystémique dans des environnements oligotrophes pourrait provenir de son adaptabilité aux conditions de substrat faibles (Salter et al. 2015). Le séquençage de l'ADNr 16S et des approches d'empreintes moléculaires ont permis de montrer une distribution relative des sous-clades de SAR11 distincte selon la saison, la profondeur et le biome (Brown et al. 2012), potentiellement en relation avec des capacités d'adaptation à différentes conditions environnementales portées par différents écotypes.

La **spéciation écologique** et la **dynamique** temporelle d'une collection de souches de *Shewanella baltica* du centre de la mer Baltique ont également été étudiées en déterminant les caractéristiques génétiques et physiologiques de 46 souches isolées de 3 points d'eau différents durant 12 ans (Deng et al. 2014). Neuf clades ont été systématiquement identifiés par trois approches différentes de génotypage, leur distribution relative variait en fonction de la disponibilité des éléments nutritifs, de l'association à des particules et du temps. L'analyse génomique a suggéré des recombinaisons intra-clades plus fréquentes qu'entre clades pouvant résulter d'une partition de niches. Enfin, au moins deux écotypes majeurs distincts au plan génétique, écologique et physiologique ont été identifiés (Deng et al. 2014). Cette étude suggère que l'analyse génétique associée à l'évaluation physiologique peut fournir une meilleure compréhension du cadre écologique et des trajectoires évolutives des espèces microbiennes. Le génome d'une bactérie présente dans les sédiments profonds océaniques *Pseudoalteromonas* sp. a été comparé au génome étroitement lié de l'écotype isolé d'eau de surface en Antarctique *Pseudoalteromonas haloplanktis* (Qin et al. 2011). L'écotype des sédiments profonds présentait un cluster de gènes impliqué dans la biosynthèse de plusieurs flagelles polaires et latéraux tandis que l'écotype de surface présentait uniquement un flagelle polaire suggérant que la présence de deux systèmes flagellaires est importante pour la survie dans l'environnement profond afin de nager dans l'eau de mer et de se déplacer sur les sédiments pour acquérir des éléments nutritifs provenant de la matière organique particulaire (Qin et al. 2011). De plus, douze îlots génomiques

absents de la souche d'eau de surface ont été identifiés dans le génome de la souche sédimentaire lui conférant des caractéristiques spécifiques comme la résistance aux métaux lourds. Un opéron permettant la production de glycogène était également présent dans cette souche sédimentaire lui permettant de stocker le carbone et l'énergie dans cet environnement particulier (Qin et al. 2011). Toujours dans le contexte de la spécialisation des bactéries marines, le genre de cyanobactéries *Prochlorococcus* qui domine quantitativement le phytoplancton dans les océans tropicaux et subtropicaux est responsable d'une large partie de la photosynthèse globale (Rocap et al. 2003). Il se trouve, à travers le monde, principalement dans les eaux oligotrophes et joue un rôle crucial dans la production d'énergie et le cycle des éléments nutritifs dans l'écosystème océanique (Rusch et al. 2010). La comparaison des génomes de deux souches présentant la plus grande distance évolutive au sein du genre a montré que l'écotype adapté à un fort ensoleillement possédait le plus petit génome de tous les microorganismes phototrophes oxygéniques connus (1,65 Mb) tandis que le génome de son homologue adapté à une faible luminosité avait un génome significativement plus grand (2,4 Mb). La comparaison architecturale des deux génomes a révélé des génomes dynamiques changeant continuellement en réponse à des pressions de sélection multiples. Par la suite, un nouvel écotype dominant la population de surface de *Prochlorococcus* dans le pacifique subéquatorial a été décrit (West et al. 2011). Ce clade semblait mieux adapté aux hautes températures qu'un de ses homologues mais moins adapté à croître dans des environnements oligotrophes. La nature apparemment plus exigeante de ce clade expliquerait sa distribution restreinte à une zone géographique relativement petite comparé aux autres écotypes (West et al. 2011). Enfin, l'analyse métagénomique de 73 échantillons provenant de l'expédition mondiale d'échantillonnage des océans a révélé la présence de deux clades de *Prochlorococcus* non caractérisés (Rusch et al. 2010). L'analyse génétique basée sur 6 différents marqueurs a montré que ces clades étaient proches de lignées connues adaptées aux environnements fortement ensoleillés. Ces deux clades inconnus coexistaient systématiquement et dominaient les eaux de surface concentrées en macronutriments et à faible teneur en fer au niveau du Pacifique équatorial et de l'océan Indien tropical. L'analyse génomique détaillée a indiqué que ces clades comprenaient des organismes adaptés aux environnements appauvris en fer, ayant réduit leurs besoins en fer par la perte de plusieurs protéines contenant du fer probablement impliquées dans la voie photosynthétique (Rusch et al. 2010). La présence et la physiologie de ces clades dans les régions pauvres en fer élargissent la compréhension de la façon dont le bactérioplancton s'adapte aux variations de disponibilité des nutriments dans l'océan.

Enfin, certains **écotypes** sont **émergents** et leurs caractéristiques spécifiques leur permettent d'élargir leur niche et de se propager à d'autres environnements. Dans ce contexte, le génotypage par séquençage de deux gènes d'une collection de 239 souches du pathogène de plante *Ralstonia solanacearum* provenant de différents végétaux de Guyane a mis en évidence que ces souches étaient distribuées dans 3 phylotypes (Deberdt et al. 2014). La majorité des souches d'un phylotype appartenait en fait à un écotype émergent décrit en Martinique. Les souches de Guyane appartenant à cet écotype provenaient d'une grande diversité de plantes, de cultures et de forêts rendant l'hypothèse d'une introduction en Guyane par des plantes d'ornement ou des boutures de bananier

provenant de Martinique improbable. Cet écotype émergent ayant également été décrit au Brésil, il pourrait en fait provenir initialement de la région amazonienne et s'être adapté puis propagé dans la région des Caraïbes (Deberdt et al. 2014).

Dans l'environnement, les bactéries se spécialisant sous forme d'écotypes adaptés à différents microenvironnements peuvent présenter des caractéristiques d'adaptation à certaines contraintes facilitant dans certains cas le passage de l'environnement à l'homme.

I.2. Facteurs permettant l'adaptation de bactéries environnementales à l'homme

L'environnement est un réservoir d'émergence et de persistance d'agents pathogènes humains (Aujoulat et al. 2012; Sobsey and Pillai 2009). Bien que de nombreux facteurs participent à la transmission des bactéries de l'environnement à l'homme, certains semblent plus importants que d'autres. Citons tout d'abord les facteurs liés à la bactérie avec la polyvalence observée chez certains pathogènes opportunistes capables de vivre dans plusieurs habitats distincts. Ensuite, il existe des facteurs qui permettent ou facilitent les interactions avec l'homme aussi appelés facteurs de préadaptation. Enfin, il y a les facteurs qui permettent la rencontre avec l'homme. De fait, l'exposition est une étape essentielle conduisant à l'infection qui inclut des phénomènes complexes prenant en compte les modes de vie des bactéries et de l'homme.

I.2.1. Polyvalence

Les bactéries mutualistes, membres des microbiotes³ humains, sont des candidates pour devenir des pathogènes opportunistes car elles sont déjà adaptées à l'homme, en particulier elles sont tolérées par le système immunitaire (Aujoulat et al. 2012). Ces bactéries mutualistes peuvent diffuser à partir de leur niche originelle et provoquer différentes infections, le plus souvent polymicrobiennes, en atteignant des sites stériles ou des sites anatomiques autres que leur site d'origine (Mitchell 2011). Elles peuvent également envahir leur écosystème microbien d'origine (ou microbiote) en surpassant en nombre les autres membres de leur communauté et provoquer ainsi une infection par dysbiose (Aujoulat et al. 2012).

Dans le cas des anthroozoonoses, la transmission à grande échelle entre les animaux et l'homme peut sélectionner de nouveaux traits de virulence comme une accentuation du caractère invasif, une dissémination accrue, la production de toxines ou la résistance aux agents antimicrobiens (Cutler et al. 2010). Les principales maladies infectieuses qui frappent l'humanité comme la variole, la grippe, la tuberculose, le paludisme, la rougeole, le VIH et la peste ont toutes émergé à partir de réservoirs zoonotiques, ce qui montre que les facteurs de virulence ayant évolué au fil de la transmission entre animaux peuvent permettre une pathogénèse chez l'homme (Cutler et al. 2010).

³ Communauté de microorganismes (bactéries) qui peuplent une niche vivante

Concernant les bactéries environnementales, *P. aeruginosa*, pathogène opportuniste majeur d'origine ubiquitaire, a été très étudié. Il est capable de vivre dans de nombreux habitats, particulièrement les écosystèmes aquatiques et humides comme les rivières, les océans, les eaux usées, et des environnements terrestres variés incluant la rhizosphère, les sols cultivés et les sites pollués en hydrocarbures (Aujoulat et al. 2012). La colonisation de ces habitats variés est permise par une polyvalence métabolique et un fort potentiel d'adaptation aux conditions environnementales changeantes (Frimmersdorf et al. 2010). Cette polyvalence est associée à un répertoire de gènes hautement flexible qui assure la survie dans des environnements divers et permet l'expansion de niches, c'est-à-dire la capacité d'une espèce à augmenter son répertoire de niches (Aujoulat et al. 2012). D'ailleurs, le génome de *P. aeruginosa* est plus grand que celui de la plupart des bactéries causant des infections humaines et son core génome, partagé par toutes les souches de *P. aeruginosa* qu'elles soient cliniques ou environnementales, représente environ 90% du génome total (Kung et al. 2010). De manière surprenante, les gènes de virulence sont contenus dans le core génome de cette bactérie et sont donc partagés par toutes les souches quelle que soit leur origine, c'est pourquoi on utilise parfois l'analogie avec le Couteau Suisse pour décrire cette bactérie (Aujoulat et al. 2012). De plus, au sein de l'espèce, la taille du génome peut varier de 5,2 à 7 Mb suggérant une forte variabilité du génome accessoire (Wiehlmann et al. 2007). La plasticité du génome accessoire de *P. aeruginosa* est responsable de la diversité génomique intra- et inter-clonale. Une analyse génomique comparative de souches de *P. aeruginosa* a indiqué que la capacité de souches individuelles à acquérir ou éliminer des segments génomiques, personnalisant ainsi leurs répertoires génomiques en réponse aux conditions métaboliques de la niche, était un élément important de l'adaptation à l'hôte (Mathee et al. 2008).

Concernant l'expression génique, 8,4% des gènes de *P. aeruginosa* sont impliqués dans la régulation de cette expression. Ce taux est un des plus forts observés dans les génomes bactériens, ce qui permet à *P. aeruginosa* d'adapter l'expression de ses gènes à ses besoins et ce, en fonction de l'environnement dans lequel il se trouve (Stover et al. 2000). Un autre exemple de polyvalence d'expression génique concerne *E. coli* O157:H7 qui est un pathogène qui peut survivre et persister dans divers environnements allant des tractus gastro-intestinaux humains et bovins à l'eau des abreuvoirs agricoles. Il a été récemment rapporté que l'opéron pO157 *ecf* de cette bactérie est thermo-régulé et qu'il contient des gènes codant pour des protéines de surface (Yoon et al. 2005). *In vitro*, des délétions induites dans ces gènes provoquent une altération de la structure de la membrane bactérienne, empêchant la survie lors du passage dans le tractus gastro-intestinal, limitant la persistance dans l'eau des abreuvoirs et augmentant la sensibilité aux antibiotiques et aux détergents (Yoon et al. 2005). Cet opéron, exprimé différemment en fonction de la température, est donc essentiel pour la polyvalence de ce pathogène dans les différents environnements qu'il colonise.

I.2.2. Préadaptation

La diversité des modes de vie bactériens met en jeu des mécanismes d'adaptation à différentes niches. Des différences physico-chimiques évidentes existent entre l'environnement et l'intérieur de

l'organisme humain. Les plus notables concernent la température et la disponibilité de certains nutriments. L'analyse d'un isolat de *P. aeruginosa* PAO1 en bouillon de culture à 22 °C et 37 °C a révélé une transcription différentielle de 6,4% du génome selon la température (Barbier et al. 2014), des modifications majeures étant observées dans le métabolisme bactérien, la réplication et l'acquisition de nutriments. Par exemple, le quorum sensing impliqué dans la communication bactérienne (Cf. partie II.3.3) et la sécrétion d'exoprotéines impliquées dans la pathogénèse de *P. aeruginosa* étaient sur-régulés à 37 °C. En revanche, les gènes codant pour la dégradation de l'arginine, ainsi que ceux codant pour la synthèse d'un sidérophore la pyoverdine, étaient surexprimés à 22 °C. Enfin, des changements d'expression de gènes codant pour la synthèse de sidérophores ont été reliés à une augmentation de la concentration de Fe²⁺ extracellulaire à 37 °C et de Fe³⁺ extracellulaire à 22 °C. Ceci suggère un changement distinct dans la stratégie d'acquisition du fer quand les bactéries passent de l'environnement extérieur à l'hôte (Barbier et al. 2014). L'environnement naturel est pauvre en fer biodisponible, obligeant les bactéries à mettre en place de nombreuses stratégies pour capter le fer environnemental comme l'utilisation de sidérophores. Par ailleurs, une des stratégies de clairance microbienne mise en œuvre par les hôtes vertébrés implique une "immunité nutritionnelle" qui retarde la croissance microbienne par la séquestration du fer (Cherayil 2010). Cette stratégie a été démontrée par des études *in vivo* où de fortes concentrations en fer chez l'hôte augmentent la vulnérabilité infectieuse et favorisent la progression de l'infection (Bertrand 2014). En fait, lors de la détection d'un agent infectieux par le système immunitaire, l'inflammation, et en particulier la surproduction de protéines plasmatiques comme la transferrine, entraîne une diminution du taux de fer plasmatique. La concentration en fer disponible est environ un billion de fois moins importante que les exigences nutritionnelles minimales des bactéries (Cherayil 2010). Dans ce contexte, les sidérophores bactériens, développés pour la survie dans l'environnement naturel, entrent en compétition avec la transferrine sécrétée par l'hôte (Saha et al. 2013). Certains pathogènes comme *Neisseria gonorrhoeae* produisent même des récepteurs cellulaires qui reconnaissent et fixent la transferrine de l'hôte et des auteurs suggèrent que ces récepteurs seraient nécessaires à ces bactéries pour établir l'infection (Cornelissen et al. 1998). Les mécanismes de captation du fer mis en place par les bactéries environnementales peuvent donc être considérés comme une préadaptation permettant à ces pathogènes opportunistes de contrecarrer la séquestration du fer mise en œuvre par l'hôte lors d'une infection (Bertrand 2014).

L'adaptation à la fois à l'environnement extérieur et à l'homme est un défi majeur qui implique parfois des organismes intermédiaires appelés hébergeurs permettant une préadaptation (Aujoulat et al. 2012). L'exemple le plus emblématique est apporté par les amibes et la bactérie pathogène environnementale, *Legionella pneumophila*. Les amibes se nourrissent de bactéries mais *L. pneumophila* possède la capacité de survivre et de se multiplier dans ces protozoaires (Rowbotham 1980). Les macrophages, cellules cibles humaines de cette bactérie, sont également des cellules amiboïdes, malgré leur distance évolutive avec les amibes. Il a alors été suggéré que l'adaptation aux amibes a très certainement servi d'étape de préadaptation à l'environnement interne des macrophages, représentant un pas important dans le processus d'évolution vers la pathogénèse humaine (Rowbotham 1980). La prolifération intracellulaire de *L. pneumophila* dans ces deux hôtes

distants sur le plan évolutif est facilitée par l'exploitation de processus conservés chez les hôtes, qui sont ciblés par des effecteurs bactériens injectés dans la cellule hôte (Price et al. 2014). Par exemple, l'effecteur AnkB fonctionne comme un facteur de virulence nutritionnel en induisant la dégradation des protéines par le protéasome⁴ de l'hôte. *L. pneumophila* est auxotrophe⁵ pour de nombreux acides aminés et ce processus génère des acides aminés intracellulaires, comme la cystéine, qui est une source métabolique importante de carbone et d'énergie au cours de la prolifération intracellulaire mais qui est limitée dans l'hôte humain et amiboïde (Price et al. 2014). Finalement, certaines machineries comme la dégradation des protéines par le protéasome sont hautement conservées à travers le domaine eucaryote et permettent la croissance intracellulaire de *L. pneumophila* dans des hôtes évolutivement éloignés. Les amibes sont aussi connues pour servir de réservoir à un certain nombre d'autres bactéries opportunistes comme *Burkholderia cepacia*, *Ralstonia pickettii*, *E. coli*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium* spp. et *P. aeruginosa* et pourraient servir de "cheval de Troie" pour introduire ces pathogènes pré-adaptés chez l'homme (Barker and Brown 1994; Greub and Raoult 2004).

La multirésistance aux antibiotiques n'est pas une caractéristique propre aux souches cliniques, les isolats de la rhizosphère sont également généralement très résistants (Berg et al. 2005). En effet, autour des racines des plantes sont observés de nombreux micro-organismes producteurs d'antibiotiques, une forte compétition bactérienne, et des taux élevés de transfert horizontal de gènes qui contribuent aux niveaux élevés de résistances naturelles. En plus de la dégradation enzymatique des antibiotiques, des pompes à efflux externalisant les xénobiotiques ont été caractérisées (Barabote et al. 2011). Ces mécanismes impliqués dans la multirésistance aux agressions chimiques et aux biocines dans l'environnement peuvent également être considérés comme des facteurs de préadaptation qui vont permettre aux bactéries de résister aux thérapies lors d'une infection humaine.

1.2.3. Exposition de l'homme aux bactéries environnementales

L'exposition humaine aux bactéries d'origine environnementale est constante mais varie selon les modes et les niveaux de vie des hommes. L'eau, l'air, le sol et les aliments contaminés sont les principaux réservoirs de pathogènes environnementaux. L'eau est certainement le vecteur principal de pathogènes, aussi impliquée dans la contamination de l'air par aérosolisation, du sol par ruissellement et des aliments lors des pratiques agricoles et culinaires. Ainsi, les maladies infectieuses d'origine hydrique demeurent la principale cause de décès dans le monde avec une augmentation d'incidence constante et l'émergence fréquente de nouveaux pathogènes (Theron and Cloete 2002). Dans les pays en voie de développement, les maladies infectieuses liées à l'eau sont principalement les diarrhées infectieuses, pathologies du péril fécal mettant en jeu des agents pathogènes spécialistes

⁴ Complexe enzymatique multiprotéique associé au réticulum endoplasmique

⁵ L'auxotrophie est l'incapacité d'un organisme vivant à synthétiser un composé organique nécessaire à son développement.

(*Salmonella*, *Shigella* ou *Vibrio* par exemple). Dans les régions développées où le péril fécal est jugulé, le développement de réseaux hydriques au sein des habitations a généré de nouveaux modes d'exposition via les biofilms et les aérosols par exemple, mettant en jeu des bactéries pathogènes opportunistes s'étant développées et adaptées à ces réseaux complexes. Dans ce cadre, des pathogènes émergents, "Opportunistic Premise Plumbing Pathogens" (OPPPs) ont été définis comme étant capables de persister et de croître dans les réseaux d'eau domestiques, habitats qu'ils partagent avec l'hôte humain (Falkinham et al. 2015). Ces OPPPs, incluant *L. pneumophila*, *Mycobacterium avium*, et *P. aeruginosa* sont généralement impliqués dans des cas d'infection chez des individus avec des facteurs de risque, comme une immunodépression, un cancer, ou du diabète, et la prise en charge de ces infections nécessite souvent une hospitalisation. Ainsi, le mode d'exposition digestif lié au péril fécal a été partiellement remplacé par des expositions respiratoires et de contact dans les pays développés. Ces pathogènes opportunistes développent alors la capacité de persister dans ces réseaux d'eau et les structures technologiques malgré les contraintes rencontrées.

Par exemple, la capacité de *L. pneumophila* à coloniser les systèmes de distribution d'eau chaude domestique est la première cause de légionellose. Pour lutter contre les pathogènes hydriques, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) recommande une chloration de l'eau de consommation entre 0,2 et 1 mg/L mais *L. pneumophila* est régulièrement isolée d'eau chlorée indiquant que ce traitement n'est pas complètement efficace contre la colonisation du réseau par ce pathogène (Cooper et al. 2008). La persistance d'une souche de *L. pneumophila* de sérotype 1 dans un système de douche durant deux ans et demi, malgré des cycles répétés de chloration à 50 mg/L pendant 1 heure, a ainsi été démontrée par méthode de typage moléculaire (Cooper et al. 2008). D'autre part, les protozoaires ont été identifiés comme jouant un rôle majeur dans la persistance de cette bactérie. En effet, la répllication intracellulaire dans les hôtes eucaryotes est probablement la seule voie de multiplication de *L. pneumophila* dans l'environnement (Abu Kwaik et al. 1998). De plus, la bactérie peut survivre dans les kystes d'*Acanthamoeba* où elle est protégée des biocides. Sous forme planctonique dans des environnements pauvres en nutriments, *L. pneumophila* est capable d'entrer dans un état viable non cultivable (VBNC), qui est un état quiescent dans lequel les bactéries subissent des changements morphologiques, de composition de paroi, d'expression de gènes ou de synthèses protéiques. Les bactéries VBNC ne sont pas détectables par les techniques de cultures conventionnelles (Xu et al. 1982). Les états VBNC les plus connus sont la dormance qui est une forme de vie ralentie, dans lequel la cellule ne se divise plus et la sporulation (Pinto et al. 2015). En état de dormance, *L. pneumophila* peut persister de longues périodes dans des biofilms (où les désinfectants chlorés ne peuvent l'atteindre) couramment constitués dans les systèmes d'eau domestique et les équipements d'air conditionné (Murga et al. 2001). Il est admis que le biofilm joue aussi un rôle capital dans la persistance de cette bactérie. En effet, des mécanismes multiples conduisent à une résistance accrue aux antibiotiques et aux biocides des communautés microbiennes installées en biofilm. Il s'agit, par exemple, de la protection assurée par la matrice d'exopolysaccharides, de l'existence de profils de résistance variés dans la communauté dus à une hétérogénéité d'expression des gènes, et de l'acquisition de gènes de résistances par transferts horizontaux facilités par la densité bactérienne (Thomas et al. 2004). Enfin, en favorisant le broutage

amibien, le biofilm régule la population de protozoaires hôtes hébergeant *L. pneumophila* et de nombreux autres pathogènes humains (Barker and Brown 1994; Greub and Raoult 2004).

Une enquête a déterminé l'influence du matériau des canalisations, du type de désinfectant utilisé et de la durée de stagnation de l'eau sur l'apparition et la persistance de trois pathogènes opportunistes (*L. pneumophila*, *M. avium*, et *P. aeruginosa*) (Wang et al. 2012). Les 3 pathogènes avaient la capacité de coloniser tous les environnements proposés et chaque bactérie présentait une réponse distincte à chaque paramètre étudié. Des différences entre deux échantillonnages successifs ont été observées (augmentation de la présence de *L. pneumophila* et réduction de *P. aeruginosa*) suggérant une dynamique temporelle de la communauté bactérienne dans l'eau de consommation. Allant dans le même sens, une étude plus récente a mis en évidence que les matériaux de plomberie modernes en polyéthylène réticulé permettaient la persistance et la prolifération de *M. avium* (Bukh and Roslev 2014). La persistance des spores de *Bacillus atrophaeus* subsp. *globigii* sur des canalisations en fer corrodées a également été observée (Szabo et al. 2007). Approximativement 50% des spores ayant initialement adhéré à la surface n'étaient plus détectés après un mois, très certainement du fait du cisaillement hydraulique et de la desquamation du biofilm. Les auteurs ont ensuite montré que la chloration n'atteignait pas les zones de corrosion où les spores avaient adhéré et donc que celles-ci pouvaient persister pendant une période prolongée, en présence de teneurs élevées en chlore libre (Szabo et al. 2007).

Tous ces pathogènes d'origine hydrique, potentiellement présents dans notre environnement proche ou domestique, possèdent la capacité de passer de leur habitat environnemental à l'hôte humain et d'entretenir avec l'homme différents types de relations.

1.3. Principaux mécanismes de patho-adaptation des pathogènes humains

Les bactéries, une fois en contact avec l'homme, peuvent développer différents types de relation avec leur hôte, allant de la colonisation à l'infection chronique en passant par l'infection aiguë. La nature de la relation dépend de facteurs liés à l'hôte (immunologiques, physiologiques) mais aussi de la bactérie (variants plus ou moins adaptés, plus ou moins virulents et plus ou moins résistants). La colonisation est l'implantation de bactéries chez l'hôte sans provoquer de dommage induisant des signes cliniques tandis que l'infection est un conflit hôte-bactérie aboutissant à des lésions de l'hôte observables aux niveaux cliniques et biologiques. L'expression clinique de la maladie est le résultat des interactions complexes entre la bactérie et les défenses de l'hôte. L'infection aiguë est une infection provoquant des signes cliniques et biologiques francs chez l'hôte, nécessitant généralement la mise en place rapide d'un traitement tandis que l'infection chronique est la persistance dans le temps de signes cliniques moins marqués malgré l'utilisation d'antibiotiques. Dans le cadre de mucoviscidose, le terme de colonisation des voies respiratoires est communément employé pour qualifier l'infection chronique; néanmoins, une dynamique entre colonisation et infection est observée, les patients colonisés présentant une évolution clinique ponctuée par des phases d'exacerbation pulmonaire infectieuses s'apparentant à des infections aiguës. Certains auteurs suggèrent que de nombreux pathogènes

humains importants au cours du XIX^{ème} siècle comme les agents responsables de la peste, de la lèpre ou de la diphtérie se trouvent en situation de déclin évolutif du fait de leur faible capacité d'adaptation en dehors de leur niche répliquative étroite qui est l'homme malade (Georgiades and Raoult 2010). En effet, ces pathogènes sont allopatriques⁶ et en situation d'impasse évolutive du fait de leur isolement génétique et de leur génome réduit (pangénome proche du core génome des espèces) qui ne permettent plus une vie hors d'une situation de parasitisme. Pour ces auteurs, de nouveaux variants pathogènes émergeront en permanence à partir de complexes d'espèces généralistes présents dans les microbiotes humains mais aussi dans les microbiotes animaux et dans l'environnement auxquels l'homme est fortement exposé. Ces complexes d'espèces généralistes ont un mode de vie sympatrique⁷, une fréquence élevée de transferts horizontaux de gènes et un grand pangénome (Tettelin et al. 2008; Via 2009). Pour les pathogènes opportunistes, la pathogénèse n'est pas forcément liée à la virulence moléculaire c'est-à-dire à des facteurs de virulence spécifiques mais plutôt à l'adaptation ou patho-adaptation de la bactérie à l'hôte. Cette adaptation s'observe en microbiologie par des modifications génomiques et génétiques ayant des conséquences phénotypiques favorables dans le milieu dans lequel se trouve le pathogène. Il est à noter que les bactéries appartenant aux microbiotes humains sont particulièrement adaptées à leur hôte. Les phénomènes patho-adaptatifs sont nombreux et concernent de nombreux pathogènes humains. Nous allons décrire les principaux phénomènes biologiques qui permettront par la suite de mieux comprendre les enjeux de la patho-adaptation au cours de la persistance bactérienne dans le tractus respiratoire des patients atteints de mucoviscidose, objet principal de ce travail.

Il y a de plus en plus de preuves que la **plasticité génomique et l'hypermutation** confèrent aux pathogènes une capacité d'adaptation rapide à un milieu changeant dans les infections chroniques. Les délétions sont fréquentes lors de l'adaptation à l'hôte. En effet, les espèces bactériennes spécialistes étroitement associées à un hôte, en particulier les bactéries intracellulaires, présentent généralement un plus petit génome et moins de copies des gènes d'ARN ribosomal que les bactéries libres environnementales (Georgiades and Raoult 2010). Ces délétions peuvent s'accumuler à long terme lors des processus de spéciation comme par exemple chez les *Rickettsies* (Georgiades and Raoult 2010) ou se produire brutalement lors de l'évolution adaptative chez un patient (Teyssier et al. 2003). Les réarrangements génomiques avec en particulier des grandes inversions de blocs génomiques s'observent entre bactéries proches adaptées à des hôtes différents particulièrement dans les genres *Brucella* et *Salmonella* (Jumas-Bilak et al. 1998; Liu et al. 2007). Des mutations et des phénomènes de recombinaisons homologues sur de petites portions génomiques sans changement significatif de la taille du génome sont observés chez *Helicobacter pylori* (Kraft et al. 2006; Cellini 2014). Cette bactérie colonise l'estomac de plus de la moitié de la population humaine de façon asymptomatique et peut être à l'origine de pathologies digestives graves. La comparaison de génomes d'isolats obtenus d'un même hôte à un temps T ou de manière séquentielle dans le temps, a

⁶ Espèces phylogénétiquement proches isolées les unes des autres du fait de facteurs géographiques

⁷ Espèces phylogénétiquement proches, vivant au sein de mêmes habitats

confirmé un taux de mutations important pour cette espèce; environ 30 mutations par an et par génome (Oh et al. 2006). Il s'agit d'un phénomène d'hypermutation car *H. pylori* ne contient pas tous les gènes impliqués dans le processus de réparation de l'ADN, gènes qui sont présents dans le génome de la plupart des bactéries (Didelot et al. 2016). Une étude ayant comparé des souches d'*E. coli* pathogènes et microbiotiques n'a pas mis en évidence de différence de taux de mutation entre ces souches. En revanche, parmi les souches cliniques, les souches hypermutables étaient majoritairement responsables d'infections urinaires (IU) (Denamur et al. 2002). Une étude de souches responsables d'IU dans 3 pays a également décrit que 23% des souches étaient hypermutables (Baquero et al. 2004). De même, l'étude de 95 souches de *Neisseria meningitidis* du groupe A a révélé que plus de la moitié était hypermutable (Richardson et al. 2002). Enfin, dans le cadre de la plasticité génomique, des transferts horizontaux de gènes sont décrits chez des pathogènes humains. Par exemple, l'analyse de génome de souches clinique d'*Acinetobacter johnsonii*, une espèce rarement impliquée dans les infections humaines, a montré que les souches cliniques avaient acquis de nombreux gènes de résistance aux antibiotiques par transferts horizontaux de gènes (Montaña et al. 2016).

Lors d'un contact avec l'homme, certaines bactéries mettent en place des stratégies d'**échappement au système immunitaire**. Dans certains cas, cet échappement est un mécanisme de virulence aigu. Par exemple, la capsule du pneumocoque inhibe la phagocytose, ce qui conduit à une infection aiguë. Dans d'autres cas, cet échappement permet à la bactérie de persister en créant des niches particulières provoquant ainsi des infections latentes ou chroniques. Ainsi, certaines bactéries comme *Mycobacterium tuberculosis* ou *Brucella* spp. sont protégées par les macrophages au lieu d'être éliminées par ces phagocytes professionnels. Dans le macrophage, elles modifient l'environnement intra-vacuolaire et évite leur dégradation et favorise leur persistance grâce à une réduction de présentation des antigènes de surface ou par le contrôle des voies d'apoptose (Dobrindt et al. 2010). D'autre part, des bactéries pathogènes opportunistes endogènes comme *Streptococcus pneumoniae* ou *Haemophilus influenzae* peuvent être portées de façon asymptomatique au sein du microbiote bien qu'ayant la capacité de provoquer une infection en cas de déséquilibre de leur communauté microbienne. Il en est de même pour certains pathogènes stricts. Ainsi, durant un portage à long terme de *N. meningitidis*, une réduction d'expression de certains gènes codant pour des protéines de surface limite la détection par le système immunitaire (Alamro et al. 2014). L'antigène-O du lipopolysaccharide de *Salmonella* sp. est un déterminant antigénique majeur dont la synthèse et la composition sont déterminées par les opérons de la glycosyltransférase (*gtr*). L'expression de ces gènes est sous le contrôle de la "variation/inversion de phase" et ils peuvent être exprimés à des fréquences différentes menant à des antigènes O différents moins reconnus par le système immunitaire (Broadbent et al. 2010). Enfin, des modifications structurales peuvent permettre l'échappement au système immunitaire. Par exemple, certaines conditions peuvent mener à un état viable non cultivable (VBNC) dans lequel certaines bactéries spiralées comme *H. pylori* présentent une forme coccoïde (Cellini 2014). Ce morphotype représente une stratégie importante de survie bactérienne dans des conditions défavorables et permet également d'échapper au système

immunitaire grâce à une modification significative du peptidoglycane de la paroi cellulaire qui ne stimule plus la sécrétion d'IL8 par les cellules gastriques (Chaput et al. 2006).

De façon paradoxale, une des patho-adaptations observées chez les bactéries pathogènes est la **diminution de virulence**. Celle-ci se manifeste surtout lors d'infections chroniques en permettant une dégradation moindre de la niche, essentiellement par une limitation de l'inflammation locale. Les stratégies de persistance, pathogène ou mutualiste, chez l'hôte dépendent des conditions physiopathologiques et immunitaires de l'hôte mais impliquent aussi des caractéristiques bactériennes (Dobrindt et al. 2010). Lors des bactériuries asymptomatiques caractérisées par un portage urinaire à long terme de bactéries sans symptômes cliniques, de nombreux isolats d'*E. coli* ressemblent à des souches uropathogènes mais présentent des caractères de virulence diminués (Mabbett et al. 2009). L'analyse d'une souche isolée lors d'une bactériurie asymptomatique a révélé que la perte de facteurs de virulence provenait de multiples mutations et délétions indiquant que la réduction génomique est un mécanisme d'adaptation mis en jeu lors de la colonisation chronique de la vessie (Klemm et al. 2006). D'autre part, le rôle de la capsule dans les maladies pneumococciques systémiques est bien connu. Toutefois, des variants non capsulés sont fréquents au cours de certaines infections localisées comme les conjonctivites alors qu'ils sont 10 000 fois moins virulents dans le modèle murin que les formes capsulées (Valentino et al. 2014; Watson and Musher 1990).

Un autre exemple encore plus emblématique de la perte de virulence est apporté par la mélioïdose, une maladie potentiellement fatale causée par *Burkholderia pseudomallei*. Cette bactérie est considérée comme un pathogène obligatoire car l'isolement de ce pathogène à partir d'un échantillon humain traduit forcément une infection qui nécessite un traitement (Price et al. 2013). Toutefois, l'étude des cas de mélioïdose survenus en Australie durant une période de 23 ans a révélé qu'un patient sur 707 survivants a développé un portage asymptomatique persistant de *B. pseudomallei*. Deux souches isolées de ce patient à 12 ans d'intervalle ont été totalement séquencées. Parmi les 23 mutations observées, la majorité était non-synonyme et presque la moitié de celles-ci était prédite comme fonctionnellement délétère, démontrant une nette tendance à la sélection positive. Le génome de la souche de *B. pseudomallei* a également subi une réduction substantielle au cours du temps avec 4 délétions dans un chromosome provoquant la perte de 221 gènes incluant des gènes codant pour des métabolismes secondaires, la survie environnementale et la pathogénèse. Finalement, une mutation par décalage du cadre de lecture a été identifiée dans un gène codant un composant important de la capsule polysaccharidique, suggérant une atténuation de virulence (Price et al. 2013). Cette étude illustre donc un cas clinique unique au cours duquel un agent infectieux connu pour être potentiellement mortel a montré une capacité de colonisation latente à long terme.

Certains facteurs requis lors d'une infection aiguë comme le système de sécrétion de type III ou la sécrétion d'exotoxines peuvent être perdus ou atténués lors d'une infection chronique. Pourquoi ces fonctions sont-elles désavantageuses lors de l'infection chronique? (Nguyen et al., 2006). Une partie de l'explication peut résider dans la balance coût-bénéfice à exprimer des fonctions invasives (Nguyen et al., 2006). Lors d'une infection aiguë, les conditions rencontrées peuvent forcer les agents pathogènes à léser l'hôte sous peine d'être éradiqués. Si la disponibilité en nutriments est faible par exemple, l'atteinte de l'hôte pour rendre disponible ces nutriments peut être critique pour la croissance

et la survie de la bactérie (Nguyen et al., 2006). La valeur du préjudice de l'hôte pourrait également augmenter face à une réponse immunitaire aiguë intense. A l'inverse, de nombreuses infections chroniques se produisent dans des tissus endommagés où l'accès aux nutriments est facilité et la réponse immunitaire "essoufflée". Dans ces environnements, les bénéfices des fonctions invasives sont diminués conduisant à leur perte au cours du temps. Historiquement, les facteurs de virulence sont désignés comme des facteurs nécessaires à l'infection. Une vision plus complète serait de distinguer des "facteurs invasifs" favorisant l'infection aiguë ou la dissémination au sein de l'hôte et des "facteurs de persistance" requis lors d'infections chroniques (Nguyen et al., 2006).

La production d'éléments structuraux de surface représente également une patho-adaptation permettant la persistance chez l'hôte et le développement d'infections chroniques. C'est le cas de la sécrétion de rhamnolipides, qui sont des biosurfactants glycolipidiques extracellulaires qui agissent sur les phospholipides des membranes eucaryotes et du surfactant pulmonaire. Ils perturbent ainsi le transport mucociliaire, inhibent la phagocytose et contribuent donc à la colonisation du tissu pulmonaire par *P. aeruginosa* particulièrement au cours de la mucoviscidose (Abdel-Mawgoud et al. 2010). La plupart des produits glycosylés sécrétés participent à la **formation de biofilm** qui est une structure impliquée dans la persistance microbienne. Ainsi, la formation de biofilm sur des dispositifs médicaux implantés comme des prothèses de hanche ou de genou par des bactéries du genre *Staphylococcus* conduit à des infections chroniques (Resch et al. 2005). Les bactéries au sein de ces biofilms sont plus résistantes aux antibiotiques et au système immunitaire que leurs homologues planctoniques. Outre l'encombrement stérique empêchant les agents antimicrobiens et les effecteurs du système immunitaire d'atteindre leur cible, les bactéries dans le biofilm ont une activité métabolique modifiée. La paroi de ces bactéries semble être un élément très actif lors de ce type d'infection chronique car des gènes impliqués dans la synthèse de protéines de liaison, d'adhésines et d'enzymes impliquées dans la synthèse de l'enveloppe sont significativement surexprimés (Resch et al. 2005). La fermentation, l'activité uréasique et la réponse au stress oxydatif sont également surexprimées dans le biofilm. Dans ce contexte, ces facteurs doivent contribuer à la survie, à la persistance et à la croissance dans le biofilm. A l'inverse, les facteurs de virulence aiguë les plus agressifs comme les toxines et les protéases sont surexprimés en croissance planctonique mais pas dans le biofilm (Resch et al. 2005). *H. pylori* est également capable de former du biofilm dans l'estomac menant à une résistance aux traitements antibiotiques et facilitant la persistance bactérienne et la chronicité de l'infection (Cellini 2014).

Enfin, la capacité des bactéries à développer une **résistance aux antibiotiques** a été largement rapportée au cours de ces dernières années. Les bactéries acquièrent et utilisent différents mécanismes de résistance *in vivo* incluant des modifications de pompes à efflux et/ou de porines, une perméabilité membranaire altérée et des sécrétions enzymatiques comme les β -lactamases (Aleksun and Levy 2007; Martins et al. 2013). Ces mécanismes de résistances peuvent apparaître ou être modifiés au cours de l'infection humaine par l'exposition fréquente à de nombreuses classes d'antibiotiques associée parfois à une mauvaise observance de la prescription (Blasi and Johnston 2007). Par exemple, lors d'infections urinaires à *E. coli* et d'infections ostéoarticulaires à *Klebsiella pneumoniae* traitées respectivement par céfuroxime et méropénème, des cas d'apparition de

résistance au traitement ont été rapportés par acquisition de plasmides de résistance et de gènes codant pour une carbapénémase (Robino et al. 2013). De plus, dans les populations bactériennes, un changement phénotypique vers un état à croissance lente de certaines cellules, leur confère une tolérance vis-à-vis des antibiotiques (Gardner et al. 2007). De fait, approximativement 0,001% à 0,1% des cellules d'une population clonale présentent une tolérance à un traitement prolongé avec des doses élevées d'antibiotiques bactéricides (Kint et al. 2012). Cette fraction comprend des bactéries dites persistantes ou "persisters" en anglais, décrites il y a 70 ans (Bigger 1944) qui sont des variants phénotypiques extrêmement tolérants à de fortes concentrations en antibiotiques par un mécanisme bien distinct de la résistance. Les antibiotiques bactéricides agissent en modifiant des cibles actives pour produire des produits toxiques, dont la formation d'espèces réactives de l'oxygène, qui contribuent à l'action létale de la plupart de ces antibiotiques (Kohanski et al. 2010). Cet état dans lequel les cibles sont en grande partie inactives, se caractériserait ainsi par une tolérance aux antibiotiques. La résistance aux antibiotiques est donc particulièrement impliquée dans la patho-adaptation des bactéries à l'hôte humain.

Concernant les infections chroniques, la mucoviscidose est une des pathologies humaines parmi les plus étudiées en termes de persistance et d'adaptation de pathogènes opportunistes d'origine environnementale. En effet, des caractéristiques pulmonaires particulières, inhérentes à la maladie, permettent la colonisation chronique durant des années voire une vie entière par des bactéries opportunistes d'origine environnementale qui doivent s'adapter à cette niche après la primo-colonisation et deviennent difficiles voire impossibles à éradiquer. Les phénomènes de patho-adaptation jouent donc un rôle majeur dans la maladie infectieuse CF et seront détaillés dans la partie II.

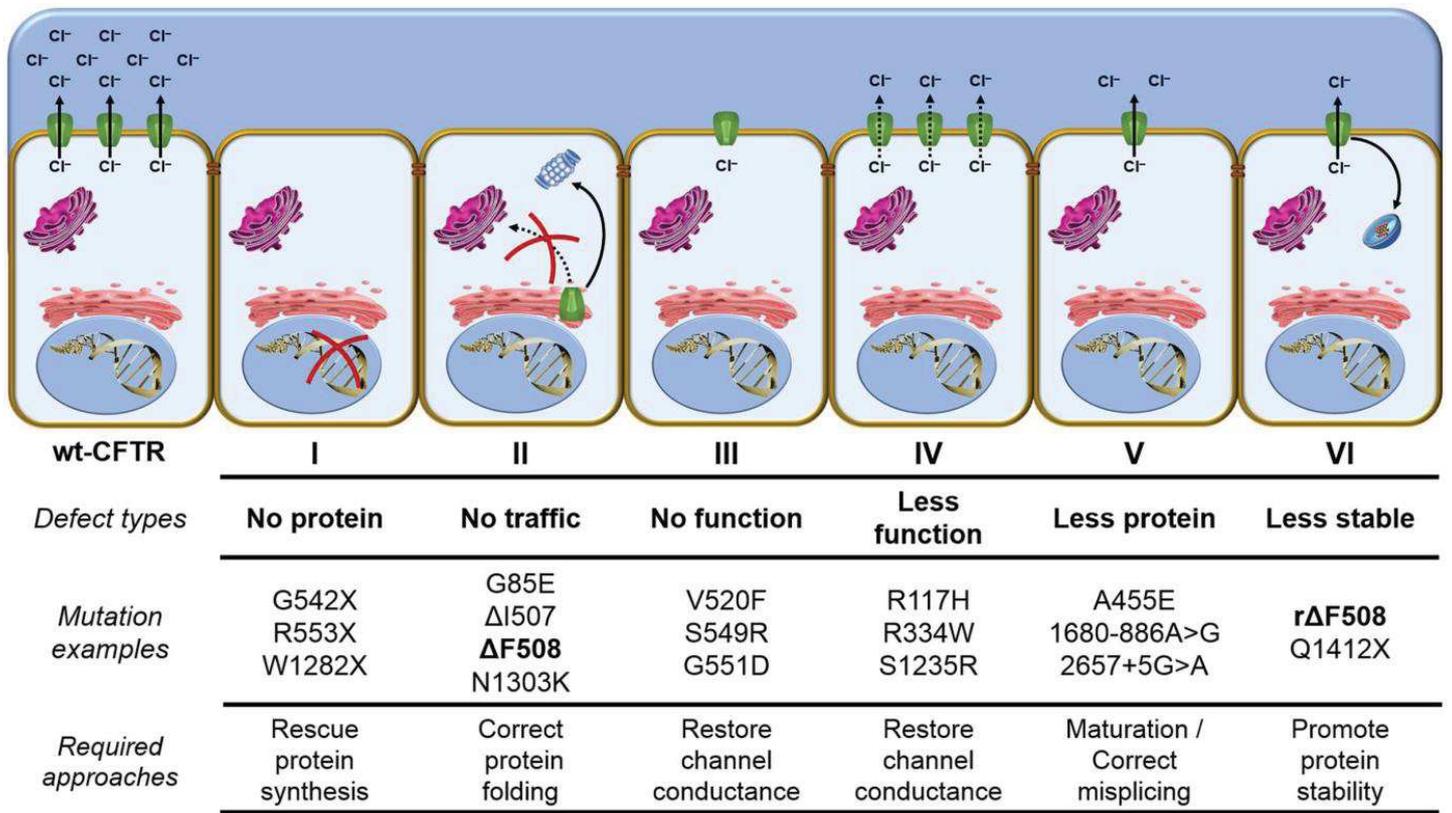


Figure 1 Schéma représentatif des 6 classes de mutations du gène codant la protéine CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) décrites dans la mucoviscidose. (D'après Lopes-Pacheco 2016)
Description des principales anomalies de la protéine CFTR et principales mutations connues pour chaque classe.

II Niche pulmonaire des patients CF et évolution bactérienne

II.1. Pathologie et conséquences pulmonaires

Génétique

La mucoviscidose est une pathologie génétique héréditaire autosomale récessive affectant une naissance sur 5359, majoritairement dans la population caucasienne. Cette maladie est liée à des mutations dans le gène *CFTR* (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) situé sur le bras long du chromosome 7 (7q31). Ce gène code pour une protéine de 1480 acides aminés nommée CFTR qui est un canal impliqué dans le transport d'ions chlorures à la surface apicale des cellules épithéliales (O'Sullivan and Freedman 2009). Les tissus et organes principalement affectés sont les cellules épithéliales de l'appareil respiratoire, du tractus intestinal, du pancréas, des glandes sudoripares et du tractus génital. Les manifestations cliniques les plus importantes sont pulmonaires et pancréatiques. Actuellement, 2800 mutations ont été répertoriées⁸ et la mutation la plus fréquemment identifiée, nommée $\Delta F508$, correspond à une délétion d'un codon phénylalanine en position 508. Cette mutation est identifiée chez 83% des patients en France dont la moitié environ est homozygote (Vaincre la Mucoviscidose et Ined 2014). En fonction du type de mutation, les conséquences sur la protéine sont variables et vont d'une simple diminution de son activité à l'absence de son expression. Les mutations sont ainsi regroupées en 6 classes en fonction du niveau d'altération de la fonction de la protéine (Lopes-Pacheco 2016). Les mutations de classe 1 entraînent un défaut de production de la protéine CFTR ; il y a donc très peu ou pas de canaux chlorures fonctionnels. Les mutations de classe 2 impliquent un défaut de maturation du CFTR, les canaux mutés n'atteignent pas la membrane plasmique où leur fonction est requise. Les mutations de classe 3 touchent la régulation de la protéine CFTR ancrée dans la membrane. Les mutations de classe 4 aboutissent à un défaut de conductance, les mutations de classe 5 de provoquent une synthèse réduite de CFTR fonctionnel et enfin, la sixième classe de mutations provoque la production de protéines moins stables à la surface membranaire et dégradées par le lysosome (Figure 1). Cette variabilité génétique explique la grande diversité des expressions cliniques observées chez les patients, tant en termes d'âge d'apparition des premiers symptômes que d'évolution de la maladie. La sévérité de l'atteinte respiratoire conditionne le pronostic vital dans la majorité des cas. Ces dernières années, les progrès de prise en charge ont permis une augmentation régulière de l'espérance de vie des patients qui atteint aujourd'hui 40 ans en moyenne (<http://ww.cff.org/>).

Conséquences pulmonaires

La protéine CFTR est exprimée lors du développement embryonnaire et fœtal, des altérations *in utero* sont donc possibles (Trezise et al. 1993). En effet, les études peu après la naissance de porcelets CF révèlent des anomalies structurales de la trachée avec une lumière rétrécie, des modifications

⁸ (<http://www.genet.sickkids.on.ca/StatisticsPage.html>)

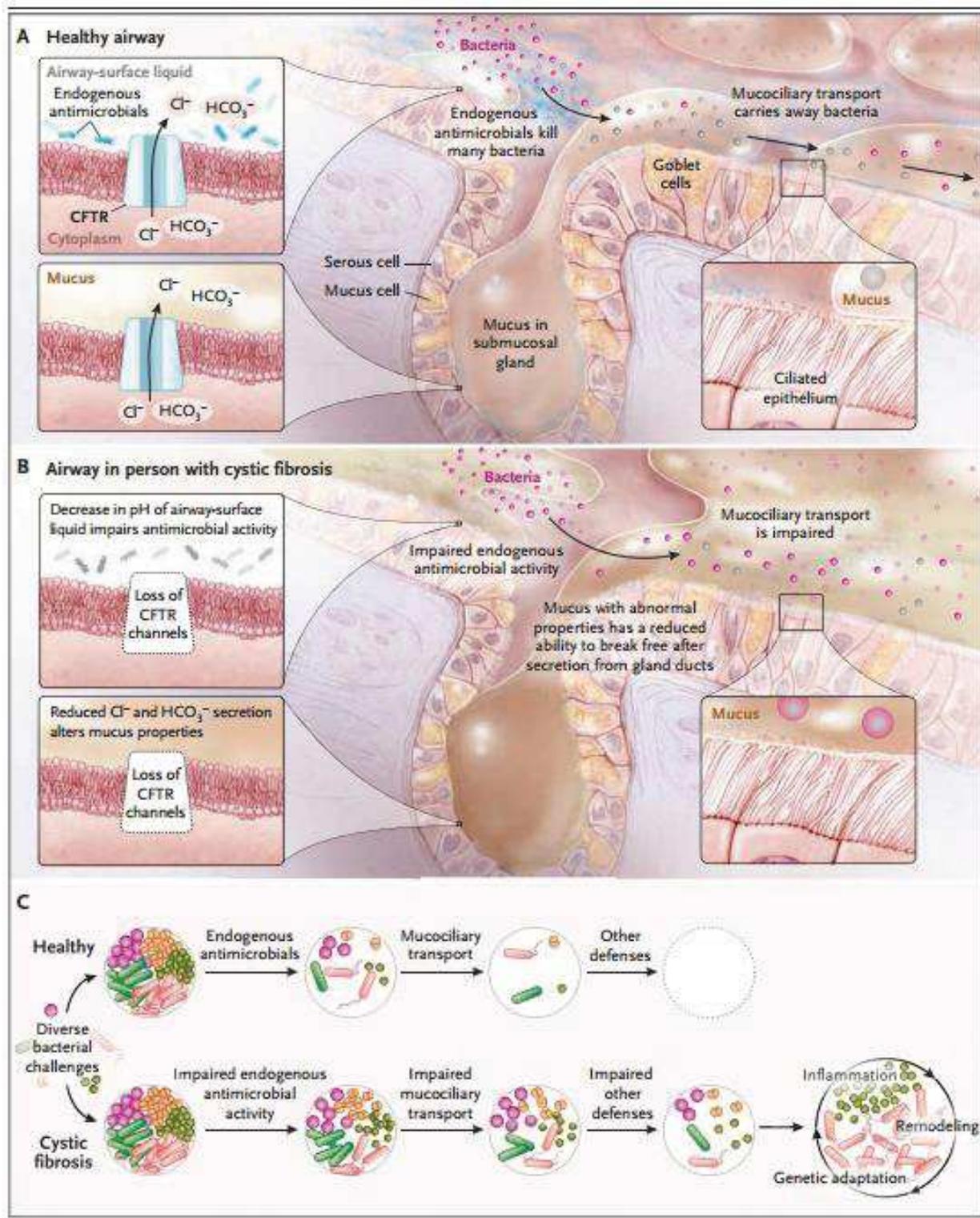


Figure 2 Schéma représentatif des conséquences pulmonaires des mutations dans le gène *CFTR* (D'après Stoltz et al. 2015).

A. Les voies respiratoires de personnes saines sont protégées par les bactéries inhalées et aspirées qui entrent dans les poumons. Le surfactant (gauche) contient des agents antimicrobiens endogènes qui tuent les bactéries. Le transport mucociliaire (droite), transport par de cils mobiles du mucus produit par les glandes sous-muqueuses, élimine les bactéries en dehors des voies respiratoires.

B. Les voies respiratoires des patients atteints de mucoviscidose présentent au moins deux défauts de défenses. La perte du canal chlorure qui conduit normalement les chlorures et les bicarbonates à la surface cellulaire provoque une acidification du surfactant qui inhibe l'activité antimicrobienne endogène. La perte de ces canaux au niveau des glandes sous-muqueuses provoque une stase du mucus.

C. Quand les bactéries entrent dans les voies respiratoires d'un patient sain (en haut), elles sont tuées par l'activité antimicrobienne du surfactant, le transport mucociliaire les élimine et d'autres défenses incluant les phagocytes participent à l'élimination. Chez les patients atteints de mucoviscidose (en bas), l'activité antimicrobienne et le transport mucociliaire sont peu efficaces et les autres défenses peuvent également être altérées. Finalement, les défenses de l'hôte sont débordées et la prolifération des bactéries est associée à l'inflammation et au remodelage des tissus. Les bactéries s'adaptent à cet environnement ce qui leur permet d'y persister.

cartilagineuses, une hypoplasie des glandes muqueuses ainsi qu'une modification de l'orientation des faisceaux des muscles lisses (Meyerholz et al. 2010; Tuggle et al. 2014).

La protéine CFTR inhibe la sécrétion d'ions chlorures ; néanmoins, les canaux sodiques épithéliaux siègent en parallèle des canaux chlorures dans la membrane apicale et la perte de conductance du chlorure amplifie les propriétés électrophysiologiques dépendantes du sodium. L'hypochlorie associée à une forte concentration en sodium extracellulaire provoque une déshydratation du mucus des voies respiratoires, ce qui réduit la hauteur de la couche liquide périciliaire et perturbe la clairance mucociliaire (Stoltz et al. 2015) qui est un mécanisme de défense important des voies respiratoires. La clairance mucociliaire protège les poumons en piégeant les agents pathogènes et les particules dans le mucus qui est ensuite transporté hors des voies respiratoires par les mouvements ciliaires. Les patients à un stade de mucoviscidose avancé peuvent présenter un transport mucociliaire ralenti du fait d'un mucus épais et déshydraté. De plus, certaines particules de mucus après avoir été sécrétées par les glandes sous-muqueuses ne se libèrent pas et ne sont pas éliminées, leur accumulation et leur stase facilitant la colonisation bactérienne (Stoltz et al. 2015) (Figure 2).

D'autre part, la mutation de la protéine CFTR bloque la sécrétion normale de molécules de bicarbonate par les cellules épithéliales, il en résulte une acidification du liquide de surface périciliaire réduisant considérablement l'activité antibactérienne locale (Coakley et al. 2003). La réduction de cet effet antibactérien du à l'acidification des VRCF pourrait être l'une des premières étapes critiques menant à la colonisation microbienne chronique des poumons normalement stériles. Il a été montré que la réalisation précoce d'aérosols de bicarbonate de sodium dans le modèle expérimental du porcelet CF pouvait corriger ce défaut de défenses (Stoltz et al. 2010).

Du fait de ces perturbations, un cercle vicieux entre infection et inflammation s'installe dans les VRCF mais son origine est longtemps restée inconnue. Néanmoins, dans le modèle expérimental du porcelet CF, les poumons de nouveau-nés ne présentent pas de signes d'inflammation ; en revanche, ceux-ci échouent à éliminer une colonisation par *Staphylococcus aureus*, contrairement aux voies respiratoires des porcelets nouveau-nés sains (Stoltz et al. 2010). Il a ainsi été démontré que les nouveau-nés ont un défaut de défenses empêchant l'élimination bactérienne, ce qui précéderait et initierait la cascade inflammatoire dans les VRCF ainsi que le remodelage des voies aériennes. D'autre part, les réponses inflammatoires ultérieures, les rétrocontrôles de l'inflammation et la réponse immunitaire adaptative pourraient également être anormales (Cohen and Prince 2012). Dans les premières années de vie, l'augmentation progressive de l'inflammation des voies aériennes témoigne de la réponse de l'hôte à la colonisation bactérienne initiale qui correspond très probablement au microbiote oral contenant des bactéries telles que *S. pneumoniae*, *H. influenzae* et *S. aureus* qui migrent vers les voies respiratoires basses (O'Sullivan and Freedman 2009).

Toutes ces anomalies identifiées au niveau des VRCF empêchent donc l'éradication des pathogènes et il en résulte souvent au cours du temps une colonisation permanente par certains pathogènes. Lors de cette persistance, de nombreuses pressions spécifiques à cette niche écologique mènent à la sélection de clones adaptés.

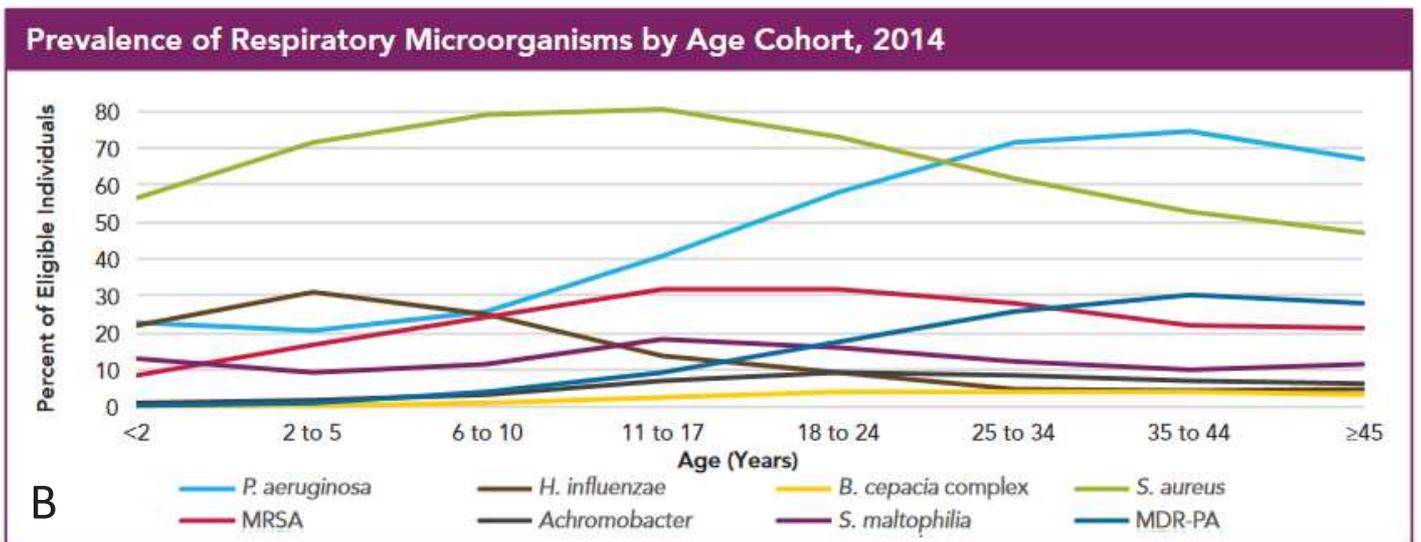
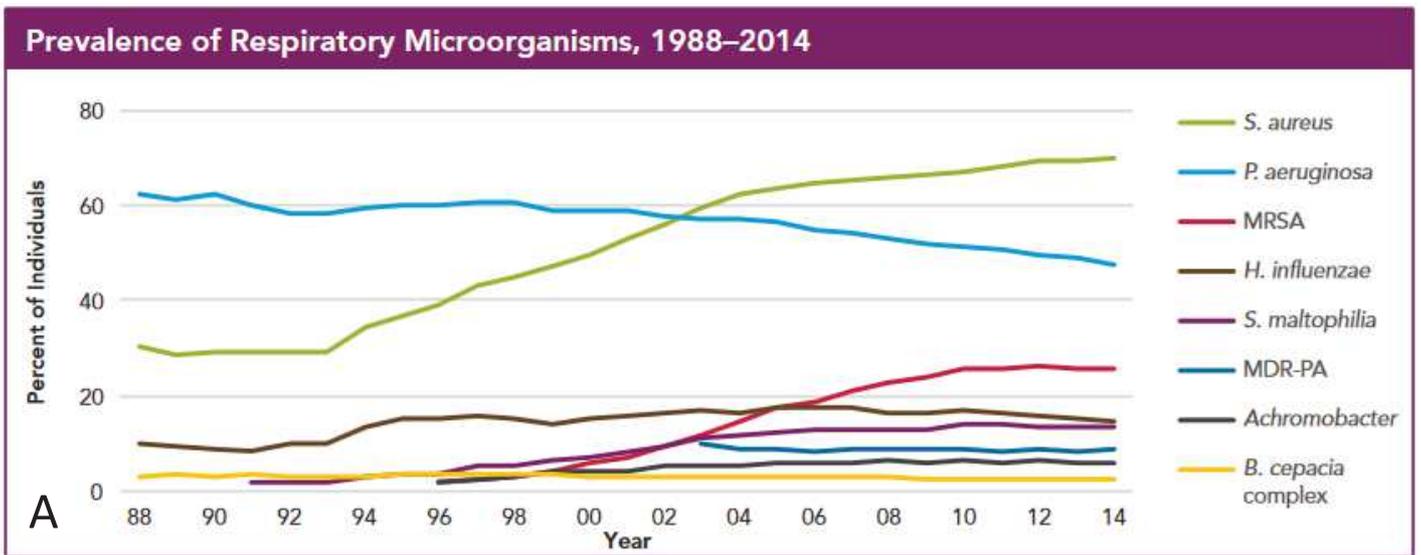


Figure 3 Épidémiologie des microorganismes colonisant les voies respiratoires des patients atteints de mucoviscidose (VRCF) aux USA en 2014. (Adapté de Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry : Annual Data Report 2014)

A) Changement d'épidémiologie et évolution de la prévalence des espèces bactériennes entre 1988 et 2014

B) Prévalence des bactéries colonisant les VRCF par âge aux USA en 2014

MRSA : *S. aureus* méticillino-résistant; MDR-PA: *P. aeruginosa* multirésistant aux antibiotiques.

II.2. Microbiote respiratoire des VRCF

II.2.1. Particularités de la niche écologique

Les VRCF constituent un habitat spatialement et temporellement hétérogène soumis à des pressions antibiotiques, immunologiques, physiologiques et biochimiques différentes de celles rencontrées dans les poumons de personnes non atteintes de mucoviscidose (Brockhurst et al. 2005; Yang et al. 2011a). Les patients sont fortement exposés aux antibiotiques au cours de leur vie avec des cures multiples d'antibiotiques souvent utilisés en associations et administrés par voie orale, locale (aérosols) ou intraveineuse. Cette exposition conduit à une forte pression de sélection et à des opportunités de colonisation pour certains pathogènes résistants (Johansen et al. 2004). De plus, la compétition avec les autres microorganismes présents dans la niche, le stress osmotique et la faible teneur en oxygène résultant de la haute viscosité du mucus sont d'importants facteurs qui peuvent influencer l'installation d'un microbiote pathologique (Folkesson et al. 2012). D'autre part, cette niche est soumise à un fort stress oxydant dû à la sécrétion d'azote et d'espèces réactives de l'oxygène par les polynucléaires. Ce stress oxydant est amplifié par la malabsorption des antioxydants alimentaires par la muqueuse intestinale des patients CF (Hudson 2001). Enfin, les bactéries subissent aussi les variations qui se produisent dans les VRCF au cours de l'infection ; par exemple, la réponse inflammatoire mal régulée de l'hôte aux pathogènes conduit à des changements structuraux extensifs et irréversibles (Regamey et al. 2011).

Toutes ces contraintes et leurs variations au sein de la niche ou des niches que représentent les VRCF impliquent une adaptation permanente des bactéries qui se manifeste par une dynamique génomique, génétique et phénotypique des populations bactériennes.

II.2.2. Cinétique de la colonisation bactérienne des VRCF

Le système respiratoire supérieur sain possède son propre microbiote, incluant des corynébactéries, des staphylocoques, des streptocoques non- et alpha-hémolytiques, ainsi que des espèces de *Neisseria* (Charlson et al. 2011). Les voies aériennes basses, longtemps considérées comme stériles, peuvent être colonisées par un faible inoculum de nombreuses espèces des genres *Pseudomonas*, *Prevotella*, *Streptococcus*, *Fusobacterium*, *Veillonella* et *Haemophilus* (Zakharkina et al. 2013; Charlson et al. 2011).

Au cours de la mucoviscidose, les bactéries impliquées dans les infections respiratoires peuvent appartenir au microbiote des voies aériennes supérieures (*S. pneumoniae*, *H. influenzae* et *S. aureus*) ou appartenir au groupe des bactéries opportunistes d'origine environnementale (bactéries du groupe *Burkholderia cepacia*, *P. aeruginosa*, *S. maltophilia*, et divers bacilles à Gram négatif (BGN) non fermentants ainsi que les mycobactéries non tuberculeuses). La prévalence de ces différentes espèces bactériennes varie en fonction de l'âge. Chez l'enfant, ce sont les espèces *H. influenzae* et *S. aureus* qui sont le plus communément isolées (Figure 3). Par exemple, *S. aureus* a été isolé des

liquides de lavage broncho-alvéolaires de 50% des patients durant leurs 6 premiers mois de vie (Rosenfeld et al. 1999). Bien que le rôle pathogène de ces bactéries endogènes reste controversé, leur implication est reconnue lorsqu'elles sont isolées en grande quantité dans les expectorations au cours des exacerbations pulmonaires (Hauser et al. 2011). De plus, les infections respiratoires chroniques dues à *S. aureus* et aux bactéries du microbiote oral peuvent contribuer à l'inflammation et au déclin de la fonction respiratoire (Flume and Van Der Vliet 2012; Wolter et al. 2013).

A partir de l'âge de 20 ans, l'espèce *P. aeruginosa* est détectée chez une majorité de patients. Sa prévalence en 2014 aux Etats-Unis dépassait 70% chez les patients de plus de 25 ans (Figure 3). A l'âge de 3 ans, 97,5% des patients présenteraient des traces sérologiques de réponse immunitaire contre *P. aeruginosa*, suggérant que l'infection est précoce mais intermittente ou indétectable par culture à ce stade (Burns et al. 2001). Les bactéries de cette espèce sont considérées depuis longtemps comme des pathogènes communément responsables d'infection des VRCF et la colonisation chronique par ces bactéries environnementales est la cause principale d'augmentation de morbidité et mortalité (O'Sullivan and Freedman 2009). Le remplacement des bactéries endogènes provenant des voies respiratoires hautes par *P. aeruginosa* est un événement clé signant la progression de la maladie pulmonaire (O'Sullivan and Freedman 2009). Après une primo-colonisation par *P. aeruginosa*, la bactérie peut être éradiquée ou coloniser les patients de façon sporadique, intermittente ou chronique. La colonisation chronique par cette espèce est délétère et généralement irréversible. Par exemple, une persistance de *P. aeruginosa* a été décrite chez un patient malgré 114 cures d'antibiotiques administrées durant une période de 28 ans (Høiby, Niels 2006). Des concentrations importantes de *P. aeruginosa* dans les VRCF sont généralement associées à une faible diversité microbienne, une fonction pulmonaire altérée et une augmentation de l'inflammation (Zemanick et al. 2013). C'est pourquoi la primo-colonisation doit être dépistée précocement et traitée efficacement, même en dehors d'un épisode d'exacerbation, afin d'éviter ou retarder le passage à la chronicité. Depuis plusieurs années, la prévalence de *P. aeruginosa* chez les patients CF diminue de façon continue (Figure 3) et ceci peut en partie être lié à la généralisation de thérapies agressives afin d'éradiquer les souches acquises initialement (Mogayzel et al. 2014). Concernant l'origine des souches de *P. aeruginosa*, bien que d'assez nombreux cas de transmissions croisées entre patients CF soient décrits, notamment au sein de fratries (Van der Vliet et al. 2006), la plupart des patients présente un génotype unique, suggérant l'acquisition sporadique de *P. aeruginosa* à partir d'un réservoir environnemental (Gibson et al. 2003; Van der Vliet et al. 2006). Toutefois, les réservoirs environnementaux restent peu connus, la souche colonisant les patients n'étant que très rarement isolée dans leur environnement. Ainsi, une investigation au domicile de 50 patients primocolonisés par *P. aeruginosa* a identifié le génotype de *P. aeruginosa* de 9 patients dans leur environnement domestique (Schelstraete et al. 2008). La comparaison de 50 isolats de *P. aeruginosa* CF, non CF et environnementaux par électrophorèse en champ pulsé (ECP) a mis en évidence 4 clusters contenant tous des isolats cliniques (CF et non CF) et environnementaux (AbdulWahab et al. 2014). Deux clusters contenaient uniquement des isolats CF et environnementaux. Ces résultats appuient l'hypothèse de l'acquisition initiale par les patients CF d'un clone environnemental qui s'adapte ensuite aux VRCF au cours de la colonisation chronique. Néanmoins, certains clones de *P.*

aeruginosa ont un succès épidémique mondial parmi la population CF, comme le clone Liverpool epidemic strain (LES) en Angleterre, le clone Prairie Epidemic Strain (PES) au Canada, les clones DK1 et DK2 au Danemark et AUST02-03 en Australie impliqués dans des cas de transmissions croisées entre les patients (Aaron et al. 2010; Cheng et al. 1996; Duong et al. 2015; Parkins et al. 2010; Yang et al. 2011b). Par exemple un centre CF au Canada a décrit que 30% de ses patients étaient colonisés par le clone épidémique PES (Duong et al. 2015).

Comparé à *P. aeruginosa*, la prévalence des autres BGN non fermentants est moindre. En France en 2014, la prévalence des bactéries du complexe *Burkholderia cepacia* (CBC) (*Burkholderia cenocepacia*, *Burkholderia gladioli* et *Burkholderia multivorans*) était de 2% dans la population CF (Figure 3). Parmi ces patients, 0,8% étaient colonisés chroniquement par des espèces appartenant au CBC. Les infections par les bactéries du CBC surviennent généralement plus tardivement dans l'évolution de la maladie et sont corrélées à une détérioration marquée de la fonction respiratoire, ainsi qu'à une augmentation de la mortalité quelle que soit l'atteinte pulmonaire initiale (Liou et al. 2001). Le syndrome cepacia (SC) est un état septique fatal, caractérisé par une exacerbation pulmonaire, une concentration importante des marqueurs inflammatoires, de nouveaux infiltrats multifocaux pulmonaires visibles par radiographie et une bactériémie à CBC (Kalferstova et al. 2015). Cet état inquiétant se développe chez environ 20% des patients colonisés chroniquement par des bactéries du CBC, rendant les bactéries de ce complexe particulièrement redoutées. L'agent causal principal est *Burkholderia cenocepacia*, espèce du CBC majoritairement isolée chez les patients CF et certains clones épidémiques comme ET12 et le ST32 ont été particulièrement décrits dans ce syndrome (Kalferstova et al. 2015). L'impact de ce complexe sur la survie des patients ayant subi une transplantation pulmonaire est tellement préjudiciable que l'infection par ces microorganismes est considérée comme une contre-indication relative voire absolue à la transplantation (Hadjiliadis 2007). D'autres BGN non fermentants opportunistes d'origine environnementale ont un impact clinique moins marqué que *P. aeruginosa* ou le CBC mais sont maintenant fréquemment isolés et considérés comme émergents dans la mucoviscidose avec une prévalence plus importante que le CBC (Mahenthalingam 2014). C'est le cas de *S. maltophilia* et d'*Achromobacter xylosoxidans* dont la prévalence en France en 2014 était respectivement de 10,1% et 5,5%. D'autres bactéries comme *Pandora* spp. sont considérées comme émergentes et peuvent présenter un pouvoir pathogène non négligeable (Mahenthalingam 2014). Les phénotypes de résistance aux antibiotiques de ces pathogènes émergents favoriseraient leur sélection et leur persistance dans les VRCF (Steinkamp et al. 2005). Bien que leur rôle pathogène ne soit pas clairement établi, leur présence est le plus souvent prise en compte lors de la mise en place de traitements antibiotiques, notamment en cas d'exacerbation pulmonaire.

II.3. Adaptation des bactéries lors de la persistance dans les VRCF

Une infection invasive par *P. aeruginosa* met normalement en jeu l'attachement, la colonisation, l'infection locale puis la diffusion systémique par voie sanguine (Qin 2016). Dans le cadre de la mucoviscidose, la colonisation par adhésion à l'épithélium muqueux des voies respiratoires de l'hôte

ne se complique pas d'une diffusion sanguine (Valderrey et al. 2010). En effet, *P. aeruginosa* donne très rarement lieu à des bactériémies chez les patients CF, même pour ceux présentant une charge bactérienne élevée au niveau des VRCF ou présentant une exacerbation pulmonaire (Williams et al. 2010). Le tropisme tissulaire de *P. aeruginosa*, ainsi que son confinement dans les voies respiratoires de l'hôte, constitue un exemple parfait d'infection chronique pouvant durer toute la vie d'un patient. Cette association hôte-bactérie à long terme implique une diminution de pathogénicité de *P. aeruginosa* lors de l'adaptation à l'environnement respiratoire de l'hôte (Cigana et al. 2011; Lee et al. 2006; Smith et al. 2006).

Lors de l'infection chronique des VRCF par un pathogène, des modifications génétiques adaptatives apparaissent, associées à l'émergence d'un grand nombre de phénotypes, dont la majorité n'est habituellement pas observée parmi les types sauvages environnementaux (Marvig et al. 2015). Dans ce chapitre, nous présenterons donc les variations génomiques, génétiques et phénotypiques observées lors de la colonisation chronique des VRCF.

II.3.1. Variations génomiques

De nombreuses bactéries possèdent un génome dit plastique ou flexible, c'est-à-dire présentant de grandes variations de structure et de contenu génique au sein d'une espèce. Cette flexibilité peut parfois s'exprimer lors de l'évolution adaptative observable au cours de l'infection chez l'homme, en particulier lors des infections chroniques. Les nombreuses études de la structure génomique de *P. aeruginosa* montrent que de grands réarrangements, incluant l'acquisition et la délétion de grands blocs d'ADN, sont responsables d'une grande partie de la diversité génétique pouvant être observée particulièrement dans le cadre de la mucoviscidose (Spencer et al. 2003).

L'adaptation à une niche écologique étroite comme les VRCF conduit souvent à la réduction génomique (Rau et al. 2012). Ainsi, lors des phases précoces d'adaptation, les délétions chromosomiques sont fréquentes (Dingemans et al. 2014). La comparaison d'une souche environnementale et de 2 souches CF tardives a montré que certaines régions génomiques présentes dans la souche environnementale n'existaient plus dans les isolats CF tardifs (Spencer et al. 2003). Ces délétions étaient généralement inférieures à 20 kb et la perte d'un locus nécessaire à la biosynthèse de l'antigène O du lipopolysaccharide a été identifiée (Spencer et al. 2003). L'analyse génomique de 20 *P. aeruginosa* PAO1 provenant de patients CF et de l'environnement a révélé des génomes globalement conservés avec, néanmoins, 38 îlots génomiques qui pouvaient diverger entre les souches voire être absents (Ernst et al. 2003). Toutefois, aucune caractéristique génomique spécifique et commune aux souches CF n'a été mise en évidence. Le séquençage de génome de 45 isolats de *P. aeruginosa* provenant de 16 patients CF a mis en évidence de nombreuses délétions pouvant représenter jusqu'à 8% du génome (Rau et al. 2012). Comparé aux estimations des taux d'évolution *in vitro* par délétion chez *Salmonella enterica*, le taux de délétion moyen était 12 à 36 fois plus important. Le génome de *P. aeruginosa* DK2 a une taille de 6,4 Mbp comparé à 4,8 Mbp pour *S. enterica*, suggérant que *P. aeruginosa* a une marge de réduction génomique plus importante (Rau et al. 2012). En effet, *P. aeruginosa* possède un répertoire métabolique étendu lié à la diversité de ses

modes de vie. Ce répertoire génomique n'est probablement plus nécessaire lors de la persistance dans la niche étroite que représentent les voies respiratoires humaines (Aujoulat et al. 2012). Lors de l'étude de Rau *et al.* (2012), les délétions se produisaient par recombinaisons homologues ou illégitimes mais n'étaient pas médiées par des séquences d'insertions (IS) ou les *rrn* comme cela a été rapporté pour certaines bactéries lors de mécanismes d'adaptation à l'hôte (Rau et al. 2012; Teyssier et al. 2003). De fait, les éléments transposables peuvent impacter l'évolution d'un microorganisme en insérant du matériel altérant la fonctionnalité de certains gènes, ou en catalysant des délétions par le biais de recombinaisons homologues ou illégitimes (Rau et al. 2012). L'étude de souches de patients appartenant au clone épidémique LES, par une nouvelle méthode de typage (ArrayTube genotyping system) incluant la détection de séquences géniques et d'îlots génomiques, a mis en évidence une forte variabilité de présence d'îlots génomiques et de prophages (Fothergill et al. 2010a). Les auteurs ont d'ailleurs rapporté que cette instabilité génomique pouvait parfois générer des profils d'ECP variables rendant difficile la comparaison de ces souches clonales émergentes et transmissibles.

Une étude de génomique comparative par séquençage a révélé qu'au cours de la colonisation chronique par *P. aeruginosa* des délétions de grandes régions génomiques pouvaient inclure tous les gènes du système de sécrétion de type III, des gènes codant pour des récepteurs à la pyoverdine associée au Fe^{3+} (ferri-pyoverdine) ou d'autres gènes de virulence (Dingemans et al. 2014). De façon remarquable, un grand nombre de gènes délétés était partagé entre les souches de cette étude et des souches appartenant au clone DK2 d'une autre étude (Rau et al. 2012), suggérant une évolution parallèle des clones de *P. aeruginosa* lors de la persistance. En ce qui concerne les récepteurs des sidérophores (comme la pyoverdine), la délétion de certains gènes codant pour leur synthèse a été décrite au cours de la colonisation chronique des VRCF par *P. aeruginosa*. Par exemple, une délétion d'au moins 100 kb entre deux souches séquentielles isolées d'un même patient a été reliée à une perte d'absorption de pyoverdine certainement due à la perte de synthèse de ces récepteurs (Ernst et al. 2003). Ces récepteurs sont aussi la cible de bactériocines, nommées pyocines (Michel-Briand and Baysse 2002), qui empruntent le transporteur transmembranaire associé aux récepteurs pour entrer dans la cellule bactérienne et la détruire (Elfarash et al. 2014). Ce type de bactériocines exerce donc très certainement une pression de sélection négative sur ces récepteurs des sidérophores durant la colonisation chronique (Dingemans et al. 2014; Tümmler and Cornelis 2005). De plus, ces récepteurs localisés sur la membrane externe bactérienne sont potentiellement immunogènes et la pression de sélection négative exercée par le système immunitaire peut également être responsable de délétions adaptatives des gènes correspondants (Dingemans et al. 2014). L'étude d'isolats CF mélanogènes (sécrétant de la pyomélanine) a également montré des délétions chromosomiques de 66 à 270 kb (Hocquet et al. 2016). En dépit de leur moins bon fitness dans les milieux riches, ces variants ont la capacité d'inhiber les souches proximales présentant un phénotype non producteur de pyomélanine. Ces mutants mélanogènes sont hautement résistants à deux pyocines, ce qui suggère également que les pyocines produites au sein d'une population infectante de *P. aeruginosa* ont la capacité de sélectionner certains mutants. Les interactions intra-spécifiques semblent donc être un facteur

important d'évolution de *P. aeruginosa* au cours de la persistance dans les VRCF (Hocquet et al. 2016).

Enfin, un gène qui devient superflu dans une niche donnée n'est plus soumis à sélection et peut être perdu. Par exemple, une souche productrice de pyoverdine de type II ou III peut utiliser la pyoverdine de type I produite par les souches avoisinantes présentes dans sa niche grâce au récepteur des sidérophores FpvB. Ce mécanisme confère à cette souche un avantage compétitif car elle peut absorber des sidérophores qu'elle ne produit pas. Cependant, après une durée importante de colonisation, la niche pulmonaire est souvent dominée par un clone unique de *P. aeruginosa*. Si ce clone n'est producteur que de pyoverdine de type II et III, il n'y a donc plus de pyoverdine de type I dans le milieu. Dans ce cas, le gène *fpvB* n'est plus utilisé et peut être perdu, ce phénomène est qualifié de perte de sélection (Dingemans et al. 2014). Enfin, durant la colonisation, de nombreux mutants ne sécrètent plus de pyoverdine. L'hypothèse avancée est un coût énergétique trop important pour la production de ces sidérophores (Lamont et al. 2009) alors qu'ils ne sont plus réellement nécessaires lors de la persistance. En effet, dans les conditions d'acidité et de microaérobiose de certaines régions pulmonaires le taux de fer ferreux (Fe^{2+}) augmente et les sidérophores ne sont pas nécessaires pour l'absorption du Fe^{2+} (Dingemans et al. 2014). En résumé, la perte de gène(s) peut être associée à une résistance, un échappement au système immunitaire ou à un gain de fitness, conférant ainsi un avantage sélectif (Dingemans et al. 2014).

D'autres types de réarrangements chromosomiques tels que des inversions chromosomiques ont été documentés pour des souches provenant de patients CF (Kresse et al. 2003; Römling et al. 1997). En effet, Kresse et al. ont montré que la moitié des isolats CF de *P. aeruginosa* de clone C, clone dominant à travers le monde que ce soit en clinique ou dans l'environnement, présente des inversions de grandes régions chromosomiques. L'analyse de ce phénomène suggère un mécanisme d'inversion-insertion induit par une séquence d'insertion IS6100 (Kresse et al. 2003). Un avantage sélectif est conféré par cette insertion d'IS menant à certains phénotypes connus au cours de la persistance comme la déficience en pili de type IV permettant d'échapper au système immunitaire, et l'hypermutation conférant un plus grand pouvoir d'adaptation lors de conditions stressantes (Kresse et al. 2003).

La comparaison par ECP et RAPD (Random amplified polymorphic DNA) de souches de *B. cenocepacia* provenant de 67 patients CF lors d'une épidémie dans un centre de soins en République Tchèque a identifié un profil génomique commun à de nombreux isolats (Drevinek et al. 2005). Néanmoins, les résultats obtenus par ECP avec l'enzyme *SpeI* démontraient une variabilité plus importante entre les souches (avec parfois 8 fragments d'ADN de différence) que ceux obtenus par ECP avec l'enzyme *XbaI* ou par RAPD. Les auteurs ont émis l'hypothèse que la présence abondante d'IS dans le génome du clone étudié provoquait certainement des réarrangements génomiques pouvant être détectés uniquement lors de macro-restriction avec l'enzyme *SpeI* (Drevinek et al. 2005). Chez *B. cenocepacia*, des mouvements d'IS associés à des réarrangements génomiques ont été mis en évidence lors de stress oxydatifs (Drevinek et al. 2010), ce qui suggère que les réarrangements génomiques sont des phénomènes d'évolution adaptative pouvant être mis en œuvre rapidement lors de contraintes environnementales.

Du fait du mode de vie en biofilm et des fortes densités de population bactérienne rencontrées, les VRCF représentent un site propice à l'acquisition de matériel génomique par transfert génétique (Rolain et al. 2011). Les transferts horizontaux de gènes entre les microorganismes dans les VRCF peuvent mener à l'émergence de souches hautement virulentes et multirésistantes aux antibiotiques comme la souche épidémique de *P. aeruginosa* LES B58 qui acquiert facilement des gènes de virulence et de résistance aux antibiotiques (Jani et al. 2016). Les VRCF contiennent une multitude d'espèces microbiennes incluant une communauté de phages qui constitue un réservoir important de gènes mobilisables dont des gènes d'antibiorésistance (Willner et al. 2009). L'ECP d'isolats successifs de *S. aureus* au cours de la colonisation a montré que la fréquence des modifications génomiques était significativement plus importante pour les souches provenant de patients CF que pour celles de patients non CF (Goerke and Wolz 2004). Lors de cette étude, 42% des modifications génomiques observées ont été attribués à des mobilisations de phages. Au delà du fait que les phages de *S. aureus* peuvent véhiculer des facteurs de virulence accessoires comme la staphylokinase, leur mobilisation peut jouer un rôle important durant la colonisation en induisant des modifications génomiques pouvant conduire à des phénotypes plus adaptés (Goerke and Wolz 2004).

II.3.2. Variations génétiques

Lors de mutations génétiques, celles-ci sont soit soumises à la sélection naturelle (mutations darwiniennes), soit échappent à cette sélection et conduisent à une dérive aléatoire (mutations kimuriennes) (Kimura and Ota 1971). La part de ces deux mécanismes dans l'évolution peut être évaluée en mesurant le ratio des mutations changeant la séquence protéique et donc le phénotype (mutations non synonymes) et de celles ne menant pas à un changement phénotypique (mutations synonymes). Les mutations affectant le phénotype seront soumises à la sélection naturelle. L'importance relative de la sélection naturelle et de la dérive aléatoire dans l'évolution des êtres vivants est souvent débattue et dépend de la taille des populations, des pressions de sélection et d'autres facteurs qui ne sont pas tous caractérisés. La distinction entre ces deux mécanismes est importante car savoir quel gène est soumis à sélection renseigne sur les pressions exercées (Nguyen and Singh 2006).

Le séquençage total de génomes d'isolats CF précoces et tardifs de *P. aeruginosa* séparés de 7,5 ans a mis en évidence 68 mutations plus fréquemment non synonymes que synonymes dans le génome des isolats tardifs (Smith et al. 2006). Ce résultat suggère que les changements génétiques observés confèrent un avantage pour la persistance au sein des poumons CF. L'étude de l'évolution dans les VRCF de la lignée DK2 a montré la survenue de changements phénotypiques et métaboliques importants qui ont été reliés à des accumulations de mutations spécifiques dans des gènes impliqués dans l'adaptation aux VRCF, appelés gènes patho-adaptatifs (Damkiær et al. 2013). Une autre étude de souches CF tardives de *P. aeruginosa* a permis d'identifier 98 SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) ainsi que des insertions/délétions génétiques de petite taille (indels) affectant un total de 44 gènes et 4 régions intergéniques, comparé à l'ancêtre commun des souches étudiées (Wong et al. 2012).

Les souches hypermutables de *P. aeruginosa* sont fréquentes dans les infections chroniques, particulièrement au cours de la mucoviscidose. La capacité de ces souches hypermutables à muter rapidement leur fournit probablement un avantage pour s'adapter à l'environnement particulier et variable des VRCF (Hauser et al. 2011). Les isolats de *P. aeruginosa* hypermutables présentent un fitness modérément réduit *in vitro*, une virulence atténuée dans les modèles murins d'infections aiguës systémiques et respiratoires, et une diminution du potentiel initial de colonisation oropharyngée et donc de transmission dans un model murin (Maciá et al. 2005; Mena et al. 2008). A l'inverse, bien qu'elle soit associée à un coût biologique considérable, l'hypermutation favorise la persistance à long terme dans les poumons CF et confère donc un avantage sélectif certainement lié à une plus forte adaptabilité aux conditions variables de la niche (Jolivet-Gougeon et al. 2011). Le statut hypermutable peut être transitoire par la réversion de mutation ou des évènements de recombinaison dans les allèles mutants, permettant au microorganisme de bénéficier temporairement d'une fréquence de mutation élevée pour s'adapter rapidement tout en réduisant le risque d'accumulation de mutations délétères (Jolivet-Gougeon et al. 2011). L'accumulation de polynucléaires lors du processus inflammatoire créant un stress biologique important est généralement associée à une forte fréquence de bactéries hypermutables (Ciofu et al. 2005).

Deux études portant sur la relation entre le statut clinique et l'hypermutation de *P. aeruginosa* ont observé que les patients présentant ce phénotype dans leur voies respiratoires présentaient un Volume Expiratoire Maximal en 1 seconde (VEMS) plus faible (Ferroni et al. 2009; Waine et al. 2008). Néanmoins, ces résultats pourraient également refléter le fait que les souches hypermutables sont observées lors des stades les plus sévères et/ou avancés de la maladie (Waine et al. 2008).

Des souches déficientes en système MMR ont été décrites dans d'assez nombreuses espèces bactériennes et ces souches hypermutables semblent être relativement communes dans les VRCF. Par exemple, pour *H. influenzae*, 14,5% des isolats de patients CF sont hypermutables comparé à seulement 1,4% des isolats de patients non CF (Román et al. 2004). Des souches de *S. aureus* hypermutables présentant des mutations dans les gènes *mutS* et *mutL*, ont également été identifiées (Besier et al. 2008; Prunier et al. 2003). Ces génotypes ont aussi été observés pour *S. maltophilia* et la comparaison d'isolats CF et environnementaux a montré que les isolats fortement mutateurs étaient uniquement observés chez les patients CF (Turrientes et al. 2010).

En termes d'expression génique, les conditions défavorables comme de fortes concentrations en antibiotiques ou un stress oxydatif conduisent à une transition majeure dans les profils d'expression de gènes de *P. aeruginosa* (Folkesson et al. 2012). De nombreux changements sont spécifiques à un stress particulier ; néanmoins, il y a des changements communs en réponse à des antibiotiques différents, ainsi qu'à des stress environnementaux différents comme le choc osmotique ou le manque de magnésium (Aspedon et al. 2006; Bagge et al. 2004). Parmi 2545 gènes étudiés dans un isolat précoce et un isolat tardif après 13 ans de colonisation par *P. aeruginosa* chez un patient CF, 256 gènes étaient surexprimés et 161 étaient sous exprimés dans l'isolat tardif (Windmueller et al. 2015).

II.3.3. Variants à microcolonies

Au cours de la colonisation des VRCF, l'apparition de variants à microcolonies (SCV) a été décrite pour plusieurs espèces bactériennes. Ces variants se présentent sous forme de colonies de petite taille en culture (Chuard et al. 1997) et sont souvent sélectionnés par une exposition prolongée à l'antibiothérapie lors des infections chroniques des VRCF (Hogardt and Heesemann 2010; Schaaff et al. 2003). De fait, ce phénotype a été induit *in vitro* par des antibiotiques comme la kanamycine ou le cotrimoxazole (Anderson et al. 2007; Drenkard and Ausubel 2002) et il est associé à un phénotype de résistance à de nombreux antibiotiques (Drenkard and Ausubel 2002; Häussler et al. 2003; Wei et al. 2011). Les variants à microcolonies sont associés à une persistance dans les VRCF qui est également potentiellement reliée à une résistance plus importante aux défenses immunitaires de l'hôte ainsi qu'à une plus forte capacité d'adhérence aux cellules épithéliales pulmonaires et de formation de biofilm (Malone 2015).

Il a été suggéré que les SCV de *S. aureus* sont des phénotypes de persistance car une surexpression de protéines de liaison à la fibronectine (FnBPs) favorise leur phagocytose par les cellules épithéliales de l'hôte et donc la persistance en milieu intracellulaire. Grâce à cette survie intracellulaire, les SCV forment un réservoir d'infections chroniques en se cachant du système immunitaire et des antibiotiques lors de périodes de forte contraintes et retournent vers le phénotype sauvage extracellulaire lors de périodes plus favorables permettant une recolonisation rapide de l'habitat (Sendi and Proctor 2009; Tuchscher et al. 2010). D'autre part, les SCV intracellulaires de *S. aureus* évitent l'activation du système immunitaire inné de l'hôte et provoquent une destruction moindre des cellules hôtes lors de la persistance tandis que les souches de *S. aureus* sauvages induisent une forte réponse inflammatoire aboutissant à la clairance bactérienne. Ceci peut être expliqué par une réduction d'expression de facteurs de virulence importants dans les SCV, notamment la toxine α (von Eiff et al. 1997; Tuchscher et al. 2010). D'autre part, les SCV de *S. aureus* dépendant de la thymidine, qui sont fréquemment impliqués dans les infections récurrentes et persistantes, sont hypermutables, augmentant encore leurs capacités d'adaptation (Besier et al. 2008).

Les SCV de *P. aeruginosa* peuvent également présenter de fortes capacités d'adhérence et d'auto-agrégation favorisant la formation de biofilm et la persistance *in vivo* mais sont, en revanche, généralement non motiles (von Götz et al. 2004; Kirisits et al. 2005; Wei et al. 2011). Plus récemment, des variants à microcolonies rugueux (RSCV) de *P. aeruginosa* ont été étudiés, ils présentaient une expression élevée des clusters de gènes des polysaccharides *pel* et *psl*, provoquant une augmentation de production d'exopolysaccharides associée à une tolérance aux antibiotiques (Starkey et al. 2009).

Des phénotypes SCV ont également été décrits pour *B. multivorans* et *B. cenocepacia* lors d'échecs de transplantations pulmonaires bilatérales (Häussler et al. 2003). Ces isolats présentaient une forte résistance au pouvoir bactéricide du sérum comparé au phénotype sauvage. Les bactéries du CBC peuvent également présenter des "shiny colony variants" (SHV) qui ont été associés à la persistance dans le modèle murin et qui présentent une diminution de motilité, de virulence et de capacité à former du biofilm (Bernier et al. 2008; Chung et al. 2003; Loutet and Valvano 2010).

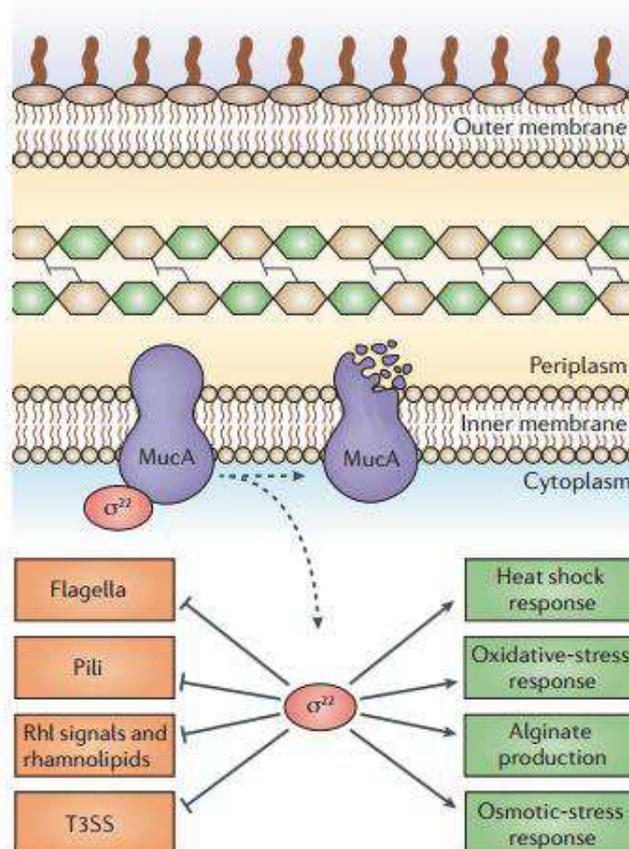


Figure 4 Réseau de régulation de MucA- δ^{22} (D'après Folkesson et al. 2012)

La fonction du facteur δ^{22} de l'ARN polymérase (codé par *algU*) est antagonisée par l'anti-facteur δ MucA par liaison protéine-protéine. Les isolat mucoides de *P. aeruginosa* (qui surproduisent de l'alginate) provenant des voies respiratoires des patients atteints de mucoviscidose présentent le plus souvent des mutations délétères dans le gène *mucA*, laissant δ^{22} libre pour activer la transcription de nombreux gènes comme ceux impliqués dans la production d'alginate et les réponses aux chocs thermiques, au stress osmotique et au stress oxydant. δ^{22} régule également négativement de nombreux facteurs de virulence, incluant les flagelles, les pili, le système de sécrétion de type III et les signaux de quorum sensing Rhl comme les rhamnolipides.

II.3.4. La mucoïdie

Le phénotype mucoïde est une des caractéristiques qui peut être observée au cours de l'infection respiratoire chronique et, concernant *P. aeruginosa*, il s'agit d'un des témoins d'adaptation les plus étudiés au cours de la mucoviscidose (Hauser et al. 2011). Ce phénotype apparaît généralement à la suite d'un stress durant des conditions défavorables comme un choc osmotique, un stress oxydatif, un déficit en magnésium ou une exposition aux antibiotiques dans les VRCF (Folkesson et al. 2012; Schurr et al. 1996). La morphologie mucoïde observable en culture est due à une surproduction d'exopolysaccharides (EPS) de type alginate, un polymère d'acides D-mannuronique et L-glucuronique (Linker and Jones 1966). La production par *P. aeruginosa* d'un autre type d'EPS (Psl) riche en galactose et mannose a été mise en évidence plus récemment ; celui-ci serait essentiel à la formation de biofilm et serait plus secrété par les isolats cliniques tardifs (Huse et al. 2010; Ma et al. 2007). Durant l'infection pulmonaire, les isolats précoces de *P. aeruginosa* ne sont généralement pas mucoïdes tandis que les isolats tardifs peuvent présenter un morphotype mucoïde. Le phénotype mucoïde résulte de mutations dans le gène *muca* (Martin et al. 1993). La protéine MucA séquestre normalement le facteur σ_{22} , nommé AlgU, et ainsi limite l'expression de l'opéron *algD* qui code pour des enzymes de biosynthèse des alginates (Schurr et al. 1996). Lors d'une mutation dans le gène *muca*, σ_{22} est libre et de nombreux gènes dont l'expression est contrôlée par le régulon *algU* sont activés, en particulier les gènes de l'opéron *algD* impliqués dans la production d'alginate (Mathee et al. 1997). De manière intéressante, AlgU (σ_{22}) induit une expression simultanée de gènes impliqués dans la perméabilité membranaire, les efflux d'antibiotiques et la réponse au stress oxydatif et réprime en revanche des gènes du métabolisme central, de motilité et de virulence (Folkesson et al. 2012) (Figure 4). Toutes ces régulations se révèlent avantageuses au cours de l'infection pulmonaire chronique (Cullen et al. 2015).

Une étude ayant comparé des isolats séquentiels de *P. aeruginosa* mucoïdes à des isolats séquentiels non mucoïdes *in vivo* dans le modèle murin a mis en évidence une augmentation de l'inflammation ainsi qu'un déclin de clairance plus importants pour les isolats mucoïdes au cours du temps (Moser et al. 2009). Tirant les mêmes conclusions, une étude a montré que les isolats mucoïdes avaient tendance à persister dans les VRCF lors de primocolonisation (Vidya et al. 2016). D'autre part, les isolats mucoïdes tardifs conservent la capacité à former du biofilm *in vitro* comparé aux isolats non mucoïdes (Lee et al. 2011). La production d'alginate représente toutefois un coût énergétique important pour la bactérie, pouvant expliquer que le phénotype mucoïde soit instable au cours de la colonisation chronique. Ainsi, la plupart des souches non mucoïdes isolées au cours des infections/colonisations chroniques sont des souches mucoïdes qui sont revenues à l'état d'origine (Hogardt and Heesemann 2010).

Des variations de mucoïdie ont également été observées pour des isolats successifs de bactéries du CBC. Contrairement à *P. aeruginosa*, la conversion se fait de l'état mucoïde vers l'état non mucoïde (Zlosnik et al. 2008). Les isolats non mucoïdes tardifs de *B. cenocepacia* ont été associés à une hausse de l'expression de plusieurs facteurs de virulence, ainsi qu'à un déclin plus rapide de la fonction pulmonaire (Zlosnik and Speert 2010). *B. multivorans* présente également une tendance à

évoluer vers le phénotype non mucoïde au cours du temps mais ceci a été associé à une perte de virulence (motilité, système de sécrétion de type IV, ...) (Silva et al. 2011).

II.3.1. Antibiorésistance et tolérance aux antibiotiques

L'augmentation de la résistance aux antibiotiques du microbiote des VRCF peut être attribuée à un certain nombre de facteurs complexes, incluant les transferts horizontaux de gènes, l'hypoxie, la formation de biofilm (Sherrard et al. 2014) et les formes de persistance ou « persisters » (Lewis 2007). Bien que *P. aeruginosa* soit naturellement résistant à de nombreux agents antimicrobiens, les souches isolées des patients CF ont généralement acquis des résistances supplémentaires, touchant le plus souvent la tobramycine, le méropénème et la ciprofloxacine comparé aux isolats de patients non CF (Rao et al. 2012). Au cours des traitements antibiotiques contre les infections à *P. aeruginosa* chez les patients CF, des mutations peuvent apparaître dans les gènes codant par exemple pour les β -lactamases et les pompes à efflux, ce qui augmente la résistance / tolérance aux antibiotiques et l'émergence de clones résistants sous pression antibiotique sélective (Smith et al. 2006). Par exemple, une étude a rapporté que 61% des 204 isolats CF testés présentaient une dé-répression de la β -lactamase AmpC conférant une résistance aux céphalosporines, 88% des isolats sur-exprimaient des pompes à efflux et 53,8% des isolats avaient perdu la porine OprD par mutations dans le gène codant pour cette porine (Llanes et al. 2013).

La multirésistance des souches peut potentiellement être associée à une diminution de la fonction pulmonaire au cours du temps bien que ce ne soit pas toujours le cas (Ren et al. 2012). Lors d'une enquête, les patients CF colonisés par des souches de *P. aeruginosa* multirésistantes présentaient un plus fort déclin du VEMS ainsi qu'un plus grand risque de décès ou de transplantation pulmonaire que les patients colonisés par des souches plus sensibles (Lechtzin et al. 2006). Plus récemment, il a été noté que durant une cure d'antibiotique visant *P. aeruginosa*, l'abondance relative de ce pathogène augmente par rapport aux autres espèces (Daniels et al. 2013). Une explication à cette observation serait que la concentration bactérienne totale diminue sous antibiothérapie mais que le déclin relatif des autres espèces est plus fort que celui de *P. aeruginosa*.

S. aureus résistant à la méticilline (SARM) est également isolé des VRCF et sa prévalence a augmenté ces dernières années (Goss and Muhlebach 2011; Harik et al. 2016). La persistance de ce phénotype de résistance de *S. aureus* dans les VRCF est associée à un plus fort taux de colonisation par *P. aeruginosa* et une morbidité pulmonaire plus marquée (Harik et al. 2016). Les glycopeptides et le linézolide sont des antibiotiques de recours en cas de méticillino-résistance mais des résistances vis-à-vis de ces deux types d'antibiotiques ont été décrites. Des souches de *S. aureus* présentant une sensibilité diminuée aux glycopeptides (GISA) ont été rapportées dans la mucoviscidose et l'exacerbation pulmonaire d'un patient a été attribuée à une souche GISA après un traitement par teicoplanine (Filleron et al. 2011). Les auteurs ont conclu que la prévalence des GISA était très certainement sous-estimée dans cette pathologie du fait de la difficulté de leur détection et que l'émergence de ces souches devait être plus étroitement surveillée (Filleron et al. 2011). Récemment, quatre isolats appartenant à un clone épidémique de SARM résistants au linézolide ont été identifiés, et cette résistance a été reliée à des mutations dans les opérons ribosomiques (de Dios Caballero et

al. 2016). D'autre part, les variants à microcolonies (SCV) de *S. aureus* qui sont communément rencontrés durant l'infection chronique ont été impliqués dans la résistance, en particulier aux aminosides car ces variants présentent un système de transport d'électrons inefficace, système qui est requis pour l'entrée de ces molécules dans la cellule bactérienne (Besier et al. 2008). De plus, les SCV ont la capacité de persister en milieu intracellulaire, ce qui réduit ou annule l'effet de certains antibiotiques qui ne traversent pas la membrane cellulaire eucaryote, comme les aminosides (Von Eiff et al. 2001).

Les bactéries du CBC sont également hautement résistantes aux antibiotiques. Une étude de séquençage de génome a mis en évidence au moins 4 β -lactamases différentes dans une souche CF de *B. cenocepacia* (Holden et al. 2009). Comme pour *P. aeruginosa*, des souches multirésistantes sont plus fréquemment isolées des VRCF que d'échantillons non CF (Cullen and McClean 2015; Zhou et al. 2007) et les isolats précoces sont plus sensibles aux antibiotiques que les isolats tardifs (Coutinho et al. 2011). Seule exception, les isolats de *B. multivorans* deviennent généralement plus sensibles aux β -lactamines au cours de l'infection chronique, ce qui est très peu fréquemment observé pour des isolats cliniques exposés aux antibiotiques *in vivo* (Silva et al. 2011). Ce phénomène est peut être dû à certaines mutations dans des gènes pleiotropiques⁹.

Les souches hypermutables ont été reliées à une augmentation d'antibiorésistance. Ces souches présentent une augmentation de fréquence de mutations et de recombinaisons qui sont des mécanismes importants pour l'acquisition d'antibiorésistance (Jolivet-Gougeon et al. 2011).

Une fraction importante de la population de *P. aeruginosa* en phase pseudo-stationnaire est susceptible d'exister sous forme « persisters » dans les VRCF (Spoering and Lewis 2001). Plus précisément, une étude a montré que lors de la croissance d'isolats tardifs de *P. aeruginosa* CF, la fraction de « persisters » observée était plus importante que dans les populations précoces (Mulcahy et al. 2010). Ces souches présentant une haute fréquence de formation de « persisters » sont des mutants hip pour « high-persisters » et une fois que ces mutants sont sélectionnés, la population forme de manière stable plus de « persisters » que la souche de type sauvage à partir de laquelle le mutant a dérivé (Mulcahy et al. 2010). Lors de cette étude, les isolats tardifs de 71% des patients étudiés étaient des mutants hip. Ces « persisters » présentent une meilleure survie que leurs parents en biofilm face aux antibiotiques et cette survie est augmentée quand ces « persisters » sont en phase stationnaire (Mulcahy et al. 2010). Ces résultats suggèrent que la formation de « persisters » est une cause non négligeable d'inefficacité des antibiotiques lors d'infections des VRCF.

L'accentuation de l'antibiorésistance lors de la colonisation chronique est donc un phénomène partagé par la majorité des bactéries colonisant les VRCF. Les variants résistants sont très certainement sélectionnés par les cures répétées d'antibiotiques et certaines adaptations phénotypiques comme la mucoïdie ou la formation de SCV participent à l'augmentation globale de tolérance aux antibiotiques dans les VRCF.

⁹ Gène codant pour plusieurs fonctions

II.3.2. Variations métaboliques

Des analyses protéomiques et transcriptomiques d'isolats CF à différents stades de l'infection chronique ont montré que l'adaptation aux voies respiratoires nécessite des changements métaboliques significatifs (Behrends et al. 2013; Hoboth et al. 2009). Les isolats respiratoires de *P. aeruginosa* provenant de patients CF ont un taux de croissance généralement lent *in vitro* sur les milieux usuels, suggérant la présence de voies métaboliques défectueuses (Head and Yu 2004). La concentration importantes en acides aminés libres dans les sécrétions respiratoires permet visiblement à ces souches de survivre pendant l'infection et rendent superflues les voies métaboliques nécessaires à la synthèse de ces molécules (Markussen et al. 2014). En accord avec ces conclusions, l'expression de gènes impliqués dans l'absorption de l'arginine, acide aminé présent en concentration importante dans les VRCF, est amplifiée pour certains isolats CF, permettant une meilleure utilisation des ressources dans le milieu (Hoboth et al. 2009). De plus, certaines souches contiennent des mutations dans le gène *lasR* qui code pour un régulateur transcriptionnel, accentuant leur capacité à utiliser les acides aminés exogènes et autres nutriments (D'Argenio et al. 2007). Ces isolats présentent une croissance plus rapide que les isolats ancestraux en milieu riche. Une augmentation de production d'une enzyme clé du catabolisme du carbone, la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH), a également été rapporté pour des isolats CF, permettant une utilisation plus rapide des ressources carbonées exogènes (Silo-Suh et al. 2005). Cette utilisation semble dirigée vers la biosynthèse de composés utile à la survie dans les VRCF puisqu'une mutation dans le gène codant pour la G6PDH a conduit à une diminution de 90% de la production d'alginate, élément essentiel de structuration du biofilm (Silo-Suh et al. 2005).

Lors d'une étude, 36 à 86% des patients étaient colonisés par des souches auxotrophes de *P. aeruginosa*, incapables de survivre en l'absence de facteurs de croissance non nécessaires au phénotype sauvage prototrophe (Taylor et al. 1993). Ces souches auxotrophes requièrent souvent des acides aminés exogènes comme la méthionine, la leucine et l'arginine. Des souches auxotrophes et prototrophes appartenant au même génotype ont été décrites dans les VRCF, indiquant que les souches auxotrophes dérivent de la souche sauvage prototrophe (Barth and Pitt 1995). Par exemple, la source de carbone privilégiée *in vivo* par *P. aeruginosa* est la L-Alanine (Boulette et al. 2009). La perte de la voie d'utilisation de l'alanine dans des isolats tardifs suggère que cet acide aminé aurait un rôle important au stade initial de l'infection mais ne serait plus nécessaire lorsque la colonisation est établie (Jørgensen et al. 2015). D'autre part, les souches auxotrophes semblent être plus communes dans les VRCF de patients présentant des exacerbations ou ayant une pathologie pulmonaire avancée, le pourcentage de souches auxotrophes dans les expectorations ayant été inversement corrélé au VEMS (Thomas et al. 2000). La forte concentration en acides aminés dans la niche respiratoire peut donc exercer une pression sélective sur les pathogènes présents. Dans ce contexte, la réduction métabolique semble concerner de multiples voies métaboliques et peut donc être considérée comme un phénotype d'adaptation lors de la colonisation chronique (Jørgensen et al. 2015).

D'autre part, le métabolisme altéré des cellules épithéliales, la couche de mucus épais et déshydraté ainsi que l'accumulation de biofilm dans le tractus respiratoire, sont considérés comme responsables de l'apparition de régions de microaérobiose voire d'anaérobiose dans les VRCF (Worlitzsch et al. 2002). *P. aeruginosa* est, à tort, considéré comme aérobie strict. Ce pathogène opportuniste est en effet capable de survivre dans des environnements pauvres en oxygène. *In vitro*, ce pathogène présente un plus fort taux de croissance dans une atmosphère contenant 1% d'O₂ qu'en présence de 5, 10 ou 50% d'O₂, indiquant une préférence pour les conditions microaérobies (Sabra et al. 2002). *P. aeruginosa* peut mettre en place plusieurs procédés pour parvenir à survivre à des pO₂ faibles ou en l'absence d'O₂ (Schobert and Jahn 2010). Dans le contexte de la mucoviscidose, cette espèce semble générer rapidement un environnement microaérobie via la sécrétion de composés qui diminuent le taux de transfert d'oxygène dans le but de limiter l'exposition à la bouffée oxydative de la réponse immunitaire (Kim et al. 2003). Dans ces conditions de faible teneur en oxygène, *P. aeruginosa* sécrète trois oxydases pour utiliser plus efficacement l'O₂, dont deux cytochromes oxydases (Alvarez-Ortega and Harwood 2007). Si aucun atome d'oxygène n'est disponible, cette espèce est capable de se servir de ceux des nitrates (NO₃⁻) ou des nitrites (NO₂) comme accepteur terminal d'électrons (Zumft 1997). Ce procédé de dénitrification nécessite 4 réductases permettant de réduire le nitrate en N₂. Bien que *P. aeruginosa* soit considéré comme un bacille à gram négatif non fermentant, cette dénomination fait le plus souvent référence à l'utilisation des glucides. De fait, si, en plus de l'absence d'O₂, il n'y a pas de nitrates ou de nitrites disponibles dans le milieu, deux fermentations permettent la croissance ou la survie de *P. aeruginosa* ; la fermentation de l'arginine en ornithine, qui ne soutient que modérément la croissance avec des colonies visibles en 4 jours en atmosphère anaérobie (Lüthi et al. 1990) et la fermentation du pyruvate en lactate ou en acétate, qui ne permet pas la croissance mais permet la survie (Eschbach et al. 2004). La conversion du pyruvate en lactate et en acétate nécessite la présence respective des loci *ldhA* (qui code pour une lactate déshydrogénase) et *ackA-pta* (qui code pour une phosphotransacétylase et une acétate kinase) et celle-ci est mise en place uniquement dans des conditions anaérobies quand la concentration en nitrate est très limitée (Eschbach et al. 2004). *P. aeruginosa*, colonisateur chronique, peut donc mettre en place de nombreuses stratégies afin de pallier le manque d'oxygène pouvant se produire dans différentes régions pulmonaires.

II.3.3. Diminution de la virulence

Bien que les souches de *P. aeruginosa* adaptées aux poumons provoquent une infection pulmonaire prolongée dans le modèle murin, leur capacité à causer le décès de l'animal est significativement réduite comparé aux souches sauvages (Hoffmann et al. 2005). En effet, lorsqu'elles sont testées dans différents modèles animaux, les souches adaptées à la niche respiratoire présentent un pouvoir pathogène atténué avec en particulier, une infiltration moindre des tissus pulmonaires (Bragonzi et al. 2009; Lorè et al. 2012). Par exemple, l'hypermutation, apparaissant au cours de la colonisation, atténue la virulence de *P. aeruginosa* avec une perte de facteurs de virulence après une période de 3

à 6 ans (Hogardt et al. 2007). Les principaux facteurs de virulence inhibés ou perdus lors de la colonisation chronique sont présentés dans cette partie.

II.3.3.1. Perte de motilité

Le flagelle bactérien est une structure rotative semi-rigide constituée de trois parties principales : un filament externe constitué de monomères de flagelline (FliC) permettant le mouvement, un corps basal ancré dans la membrane plasmique et enfin un crochet joignant le filament et le corps basal (Jarrell and McBride 2008). Une partie du corps basal reliée au crochet est analogue à un moteur électrique et permet la rotation du flagelle comme une hélice. Plus de 40 gènes sont impliqués dans la synthèse du flagelle monotriche de *P. aeruginosa*. Ce flagelle permet la nage dans les environnements aqueux (motilité type swimming) et participe au déplacement sur des surfaces semi-solides (motilité de type swarming) (Frisk et al. 2002; Köhler et al. 2000).

Les pili de type IV sont des structures fibrillaires constituées de monomères de pilline (PilA) présentes en plusieurs copies à la surface de certaines bactéries à Gram négatif (Mattick 2002). Leur biosynthèse et leur fonction impliquent une quarantaine de gènes. En se rétractant, ces pili permettent la motilité de type twitching sur les surfaces solides. Ils sont aussi impliqués avec les flagelles dans la motilité de type swarming (Köhler et al. 2000; Mattick 2002). Tous ces types de motilité ont été reliés à la formation de biofilm (Kirov 2003; O'Toole and Kolter 1998).

Les isolats de *P. aeruginosa* provenant des VRCF présentent souvent des déficiences de motilité de type swimming et swarming, car ils ne produisent pas de flagelles pleinement fonctionnels (Luzar et al. 1985; Mahenthiralingam et al. 1994). Par ailleurs, cette perte de motilité apparaît généralement au cours de la colonisation, les isolats précoces étant motiles (Mahenthiralingam et al. 1994). Cette perte progressive de flagelle a été associée à une ou plusieurs mutations dans des gènes régulant la production flagellaires dont *rpoN*, *vfr*, *fleQ*, ainsi que dans le gène *fliC* codant pour la flagelline (Jyot et al. 2007; Wolfgang et al. 2004). Les pressions sélectives conduisant à la perte flagellaire sont certainement d'ordre immunitaire. En effet, la perte de flagelle permet la résistance à la phagocytose, ainsi que la diminution de reconnaissance par le système immunitaire médiée par le TLR5 (Toll Like Receptor) (Zhang et al. 2005) qui reconnaît la flagelline et déclenche la réponse pro-inflammatoire (Cobb et al. 2004; Hybiske et al. 2004). La perte de motilité conduit également à une réduction de l'activation de l'inflammasome¹⁰ ainsi qu'à la diminution de la sécrétion de l'interleukine 1 β antibactérienne (Patankar et al. 2013). De manière générale, les isolats tardifs ne déclenchent plus l'inflammasome (Huus et al. 2016).

La colonisation chronique des VRCF par *P. aeruginosa* s'accompagne également d'une perte progressive de la motilité de type twitching (Lee et al. 2005a). D'une part, des mutations dans le gène *pilB* perturbent la production de la protéine PilB essentielle à la biosynthèse du pili (Smith et al. 2006). D'autre part, des mutations peuvent également apparaître dans le gène *pilQ* codant pour une protéine transmembranaire nécessaire à l'extrusion du pili à travers la membrane externe (Chang et al. 2007).

¹⁰ Complexe protéique exprimé par les cellules de la lignée granulocytaire impliquées dans l'immunité innée

Enfin, les souches colonisant les VRCF peuvent perdre RpoN, un facteur σ associé à l'ARN polymérase qui induit l'expression des gènes codant pour la synthèse du pili de type IV et du flagelle (Smith et al. 2006). Aucune étude n'a été menée sur le lien entre la perte de motilité de *P. aeruginosa* et le statut clinique des patients.

Des analyses transcriptionnelles d'isolats cliniques tardifs de *B. multivorans* ont également montré une diminution de la transcription de gènes associés à la motilité (Silva et al. 2011). Inversement, de nombreux gènes nécessaires à l'assemblage et à l'adhésion du flagelle sont hautement exprimés par les isolats tardifs de *B. cenocepacia* comparé aux isolats précoces (Mira et al. 2011). L'étude de 551 isolats de CBC provenant d'infections chroniques a montré que la motilité de type swimming n'était pas perdue contrairement à ce qui est observé chez *P. aeruginosa* (Zlosnik et al. 2014). Enfin, une étude récente sur des isolats sanguins de CBC de patients CF au moment du syndrome cepacia a montré que les isolats de 6 patients sur 8 présentaient une perte franche de motilité (Kalferstova et al. 2015). Ce phénotype détectable 24 mois avant le début de cette exacerbation potentiellement fatale pourrait servir de signe d'alerte de développement de ce syndrome dans un avenir proche.

II.3.3.2. Le Quorum sensing

En condition de faible densité de population, les procaryotes se comportent probablement comme des organismes uniques isolés toutefois ; lorsque la population atteint une certaine densité, les bactéries ont la capacité de communiquer entre elles par le mécanisme de quorum sensing (QS) afin de modifier l'expression génique de la population en réponse à ces variations de densité. Ce processus de QS fait intervenir des molécules de signalisation qui sont des auto-inducteurs sécrétés par les bactéries leur permettant de modifier l'expression de différents gènes notamment des gènes de virulence (Schuster and Greenberg 2006).

Plusieurs auto-inducteurs sont synthétisés par *P. aeruginosa* ; néanmoins, deux molécules ont été plus largement étudiées : la 3-oxo-dodecanoyl homosérine lactone qui est produite par le système *LasI/LasR* et la butyryl homosérine lactone produite par le système *RhlI/RhIR* (Schaefer et al. 2002). *In vitro*, l'expression de 6 à 10% des gènes présents dans le génome de *P. aeruginosa* est régulée par le mécanisme de QS (Schuster et al. 2003; Wagner et al. 2003). Parmi ces gènes, plusieurs codent pour des facteurs de virulence majeurs (élastase, protéase alcaline, phospholipase C, pyocyanine, exotoxine A) et d'autres sont impliqués dans la motilité de type swarming et la maturation du biofilm (Girard and Bloemberg 2008; Hoboth et al. 2009; Schaber et al. 2004; Storey et al. 1998; Williams et al. 2010).

Ce système jouerait un rôle prépondérant dans la pathogenèse des infections CF à *P. aeruginosa* par la régulation des facteurs de virulence et la promotion de la formation du biofilm. Toutefois, il a été rapporté que de nombreux isolats CF ne produisaient pas ces homosérines lactones (D'Argenio et al. 2007; Lee et al. 2005a; Smith et al. 2006; Wilder et al. 2009). Il est maintenant acquis que les mutations dans les gènes *lasR* et *rhIR* sont responsables du déficit en QS pour de nombreux isolats CF et surviennent approximativement 15 ans après la primo-colonisation (Bjarnsholt et al. 2010). En aucun cas, il n'a été démontré au cours du temps un mécanisme de QS plus complexe qu'au stade

initial (Willcox et al. 2008; Winstanley and Fothergill 2009). Une explication possible pour ces résultats apparemment paradoxaux serait que malgré le rôle important du QS dans l'infection, le coût métabolique nécessaire pour produire cet important nombre de facteurs favorise l'émergence de "tricheurs" (cheats) ne répondant pas aux auto-inducteurs mais profitant des facteurs synthétisés par les souches associées (Diggle et al. 2007; Sandoz et al. 2007). Cependant, pour certains patients la proportion d'isolats de *P. aeruginosa* ayant une fonction de QS défaillante dépasse 80% rendant l'explication de la "triche sociale" peu probable (Wilder et al. 2009). L'hypothèse alternative est que les mutations touchant les gènes du QS confèrent un avantage adaptatif dans les VRCF en modifiant les profils d'expression d'autres gènes. En effet, les mutants *lasR* présentent une meilleure utilisation de certains acides aminés présents en forte concentration dans les VRCF, une plus forte aptitude à utiliser les nitrates plutôt que l'oxygène dans cette niche faiblement oxygénée, une résistance augmentée à la lyse alcaline et une augmentation d'antibiorésistance avec une sécrétion de β -lactamase augmentée *in vitro* (D'Argenio et al. 2007; Hoffman et al. 2010; Wilder et al. 2009). Les mutations dans *lasR* jouent un rôle dans la progression de la maladie pulmonaire, elles ont été associées à un déclin plus rapide du VEMS (Hoffman et al. 2009). En présence de ces mutants, une réponse inflammatoire exagérée au niveau des cellules épithéliales pulmonaires associée à une forte augmentation d'interleukine 8 plasmatique a été mise en évidence (LaFayette et al. 2015).

Il a récemment été observé que certaines molécules de QS pouvaient être détectées dans les sécrétions respiratoires, le plasma et l'urine des patients CF. Particulièrement, une molécule, la 2-nonyl-4-hydroxy-quinoline (NHQ), qui est en concentration élevée dans le plasma des patients à la phase initiale des exacerbations pulmonaires et diminue significativement après traitement (Barr et al. 2015). Cette molécule pourrait donc être un biomarqueur sensible aux changements de statut clinique des patients.

Les isolats de *B. cenocepacia* déficients en QS sont beaucoup moins fréquents que ceux de *P. aeruginosa* au cours de la colonisation chronique et ce phénotype ne semble pas leur conférer un avantage compétitif *in vivo* (McKeon et al. 2011; Udine et al. 2013). De fait, ces souches déficientes en QS ont une plus grande sensibilité aux antibiotiques, ainsi qu'une perte de virulence *in vitro* (Udine et al. 2013).

Concernant *S. aureus*, un système régulateur de gènes accessoires (*agr*) contrôle l'expression d'une série de toxines et de facteurs de virulence ; néanmoins, le rôle de ce système durant l'infection est controversé (Kong et al. 2006). Bien que, les mutant *agr*, communs dans les infections chroniques CF, soient souvent non hémolytiques (Goerke and Wolz 2004).

II.3.3.3. Système de sécrétion de type III

La majorité des souches de *P. aeruginosa* isolées de l'environnement et d'infections aiguës présente la capacité de sécréter un ensemble de toxines telles que ExoS, ExoT, ExoU et ExoY (Hauser 2009). Lors d'un contact direct entre *P. aeruginosa* et une cellule hôte, ces protéines sont injectées dans le cytoplasme de la cellule à travers un système nommé système de sécrétion de type III (TSSIII). D'un point de vue structural, ce système de sécrétion, composé de 20 protéines, est un analogue des

structures membranaires comme le flagelle et le pili (Filloux 2011). D'un point de vue fonctionnel, l'expression et l'activité de ce TSSIII sont augmentées lors de cultures planctoniques placées en atmosphère pauvre en oxygène (O'Callaghan et al. 2011).

Bien que 90% des isolats environnementaux de *P. aeruginosa* expriment ce TSSIII, seul 47% des isolats de primo-colonisation CF expriment cette protéine (Jain et al. 2004, 2008). De plus, au cours de la persistance pulmonaire, les souches de *P. aeruginosa* perdent progressivement la capacité de synthétiser ces protéines avec seulement 4 à 12% d'isolats sécréteurs dans les VRCF (Dacheux et al. 2000; Jain et al. 2004; Lee et al. 2005b). Pour certaines souches, le déficit en TSSIII est lié à la cascade de signalisation régulant ce système et non aux gènes codant les éléments de structure du TSSIII, des études *in vitro* ayant montré que la complémentation avec une copie intacte de l'activateur transcriptionnel *ExsA* restaurait la sécrétion de type III (Dacheux et al. 2001; Lee et al. 2005b). De plus, les souches ayant un TSSIII conservé peuvent sécréter des toxines ayant perdu leurs activités en raison de mutations dans les gènes codants ces toxines (Lee et al. 2005b).

La présence du TSSIII semble être un désavantage sélectif lors de l'infection chronique. De fait, le système immunitaire des patients CF développe généralement des anticorps contre ce système de sécrétion et la présence d'anticorps contre au moins une de ses protéines structurales (PcrV) est protectrice c'est-à-dire qu'elle conduit à la clairance de *P. aeruginosa* durant les infections pulmonaires aiguës de patients non CF (Banwart et al. 2002; Corech et al. 2005; Frank et al. 2002; Sawa et al. 1999). Il est donc concevable qu'au cours du temps les souches exprimant le TSSIII soient éliminées des VRCF au profit de souches sous-exprimant ou n'exprimant plus ce système. D'autre part, les dommages pulmonaires induits par les toxines sécrétées peuvent être incompatibles avec une persistance à long terme dans la niche pulmonaire et cette hypothèse est supportée par la rareté de souches arborant le gène *exoU* codant pour la toxine la plus cytotoxique sécrétée par le TSSIII (Feltman et al. 2001; Lanotte et al. 2004; Nicas et al. 1985). En effet, les isolats CF présentent généralement un génotype *exoS*⁺/*exoU*⁻ tandis que les isolats d'hémocultures lors d'infections associées aux soins présentent un génotype *exoS*⁻/*exoU*⁺ suggérant qu'*exoU* est un facteur important dans le développement d'infections aiguës (Wareham and Curtis 2007). La toxine *exoS* permet, quant à elle l'invasion et l'internalisation cellulaire. De manière intéressante, chez les patients primo-colonisés, soit tous les isolats expriment le TSSIII, soit aucun ne l'exprime et la présence d'isolats sécréteurs est associée à un plus fort risque de persistance (Jain et al. 2008). Malgré l'implication connue du TSSIII dans les infections aiguës, pour le moment aucune association solide n'a été identifiée entre la présence d'isolats exprimant ce complexe protéique au cours de la colonisation chronique et la diminution de fonction pulmonaire (Jain et al. 2008). Néanmoins, chez un patient hébergeant toujours au moins un isolat exprimant le TSSIII, une association peut exister entre la proportion d'isolats exprimant le TSSIII dans les VRCF et le déclin du VEMS.

Concernant *B. cenocepacia*, une étude a récemment montré que les isolats d'hémoculture au moment du syndrome cepacia présentent une plus forte expression des gènes impliqués dans la biosynthèse du TSSIII (Kalferstova et al. 2015).

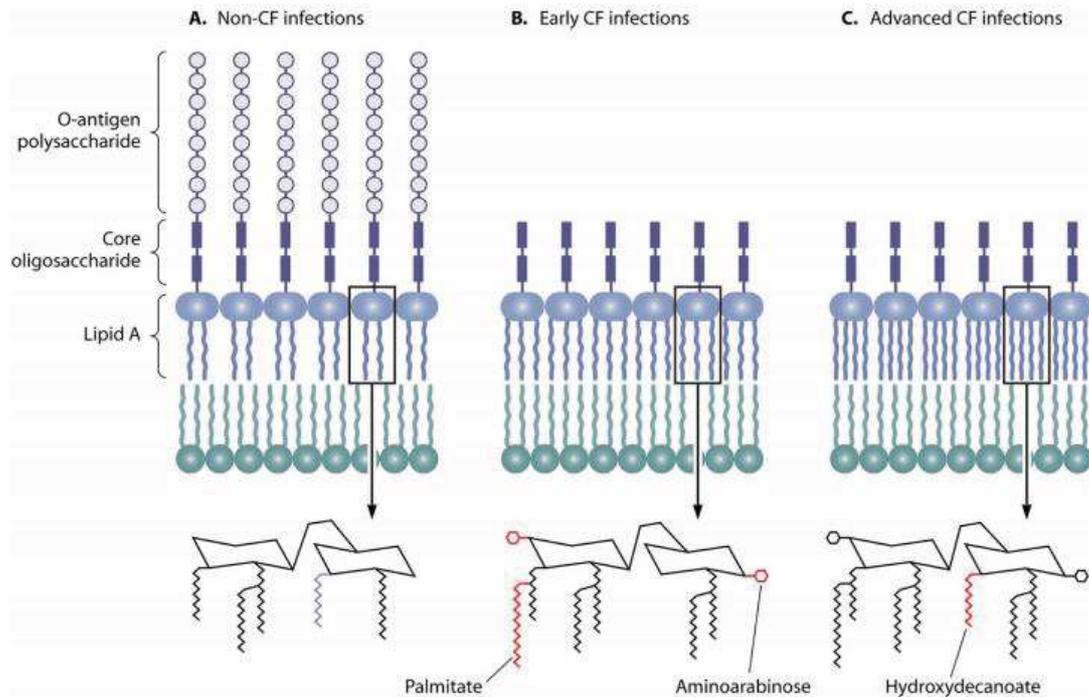


Figure 5 Modifications du lipopolysaccharide de *P. aeruginosa* durant la colonisation des VRCF (D'après Hauser et al. 2011)

A. Structure du lipopolysaccharide (LPS) de souches isolées de l'environnement, d'infections aiguës ou de bronchectasies. Le lipide A, l'oligosaccharide central et l'antigène O sont indiqués. Au bas de la figure, une structure plus détaillée du lipide A est représentée. Les polygones représentent le squelette di-glucosamine biphosphorylé du lipide A et les lignes brisées représentent les groupes acyles (la position du groupe acyle en gris n'est pas certaine).

B. Durant l'infection précoce des VRCF, l'antigène O est fréquemment perdu. De plus, le palmitate (ligne brisée rouge) et l'arabino-arabinose (hexagone rouge) sont ajoutés au lipide A du LPS.

C. Chez les patients avec une maladie avancée, une chaîne hydroxydécanoate (ligne brisée rouge) est retenue, certainement du fait de mutations dans le gène *pagL* qui code une désacylase.

II.3.3.4. Modification du lipopolysaccharide (LPS)

Les bacilles à Gram négatif sont pourvus d'une membrane externe comprenant un feuillet externe composé en grande partie de lipopolysaccharide (LPS). Le LPS est structuré en 3 parties ; un lipide A hautement acétylé qui remplace les phospholipides présents dans la plupart des membranes plasmiques, un oligosaccharide central attaché au lipide A contenant plusieurs sucres atypiques et un antigène O qui est un polysaccharide non essentiel et variable, composé de motifs répétés, se prolongeant vers l'extérieur (Raetz and Whitfield 2002). Compte tenu de la localisation stratégique du LPS à l'interface entre la bactérie et l'environnement, il n'est pas surprenant que cette structure soit modifiée au cours de l'infection chronique des VRCF.

Les isolats de *P. aeruginosa* produisent souvent des quantités faibles voire nulles d'antigène O durant les infections chroniques (Hancock et al. 1983; Lam et al. 1989) (Figure 5). La perte de cet antigène est le résultat d'une accumulation de mutations incluant des décalages du cadre de lecture, des intégrations d'IS ou de larges délétions dans le cluster de gènes responsable de la biosynthèse des polysaccharides (Ernst et al. 2003a; Kresse et al. 2003; Spencer et al. 2003). Etant donné que l'antigène O est responsable de la résistance aux effets bactéricides du sérum humain, sa perte peut expliquer que les patients présentent rarement des bactériémies (Govan and Deretic 1996). De plus, cet antigène O est aussi hautement immunogène et induit une forte production d'anticorps : par conséquent, son absence facilite la persistance au sein des VRCF (Hauser et al. 2011). Enfin, le CFTR semble jouer un rôle de récepteur de motif bactérien en reconnaissant cet antigène et en activant la réponse inflammatoire (Schroeder et al. 2002). L'absence ou le dysfonctionnement de cette protéine CFTR chez les patients CF, ainsi que la modification de l'antigène O du LPS, pourraient diminuer les interactions LPS-CFTR, retarder la réponse immunitaire et empêcher l'élimination bactérienne, ce qui favoriserait la persistance.

La synthèse du lipide A peut également être altérée lors de la colonisation chronique avec des motifs d'acylation spécifiques pour les isolats CF (Ernst et al. 1999). Le lipide A d'isolats environnementaux de *P. aeruginosa* est penta-acylé tandis que les isolats CF contiennent des quantités substantielles de lipide A hexa- et hepta-acylé (Cigana et al. 2009; Ernst et al. 2003b) (Figure 5). Un isolat CF avec un lipide A sous-acylé a également été identifié (Di Lorenzo et al. 2015). Une étude a montré que 100% des 86 isolats de *P. aeruginosa* de patients CF étudiés contenaient un lipide A hexa-acylé avec un groupe palmitate supplémentaire tandis qu'aucun isolat environnemental ou provenant d'infection aiguë n'en présentait (Ernst et al. 2007). L'hexa-acylation a également été observée pour des isolats de primocolonisation chez des enfants de moins d'un an, indiquant que cette modification est précoce lors de la colonisation (Ernst et al. 2007). Chez les patients avec une pathologie pulmonaire avancée, des mutations dans le gène *pagL* codant pour une désacylase causent la rétention d'une chaîne acyl-hydroxydecanoate provoquant une hepta-acylation (Cigana et al. 2009; Ernst et al. 2006). Une autre hepta-acylation du lipide A avec ajout d'un aminoarabinose a été identifiée, elle est présente dans un tiers des isolats CF et absente des isolats d'autres origines étudiés (Ernst et al. 2007).

Les modifications du lipide A ont des conséquences biologiques non négligeables : par exemple, l'addition de cet amino-arabinose augmente la résistance aux peptides antimicrobiens et à certains

antibiotiques (Ernst et al. 1999). Les variations de composition du LPS augmentent l'asymétrie de l'architecture de la membrane et diminuent la perméabilité pour les composés hydrophobes, ce qui augmente la résistance aux antibiotiques (Martins et al. 2013). D'autre part, le niveau d'acylation du lipide A affecte la reconnaissance du LPS par le TLR4 et donc la réponse pro-inflammatoire induite par celui-ci (Alexander and Rietschel 2001; Hajjar et al. 2002). Il a en effet été prouvé que le LPS d'isolats CF tardifs induit une réponse inflammatoire moindre que le LPS d'isolats CF précoces provenant d'un même patient (Cigana et al. 2009). L'impact réel de l'altération du LPS de *P. aeruginosa* sur l'évolution clinique des patients CF n'est pas connu : cependant, le lipide A hepta-acylé a été identifié uniquement dans des cas de pathologie pulmonaire sévère (Ernst et al. 2007). Il a également été montré qu'après une exposition répétée au LPS, les souris CF développent une réponse immunitaire anormale, persistante, associée à des changements structuraux plus importants dans les poumons comparé aux souris de type sauvage, suggérant un rôle pathogène de ce LPS chez les patients (Bruscia et al. 2016).

Dans des isolats séquentiels tardifs de *B. cenocepacia*, l'expression de deux enzymes impliquées respectivement dans la synthèse du lipide A et de l'antigène O est plus faible conduisant à une diminution de la biosynthèse de ces composés (Madeira et al. 2013).

De nombreux facteurs de virulence sont perdus ou atténués au cours de la colonisation chronique et la spécialisation de *P. aeruginosa* dans les VRCF apparaît comme un processus visant à diminuer les effets délétères sur sa niche de persistance (Qin et al. 2014).

II.3.4. Formation de biofilm

Il est généralement accepté que la persistance de *P. aeruginosa* dans les poumons CF résulte de son organisation en biofilm (Gómez and Prince 2007). Bien que les caractéristiques des biofilms varient en fonction des espèces et des conditions de croissance, plusieurs propriétés générales peuvent être décrites. La formation de biofilm chez *P. aeruginosa* est initiée par des bactéries planctoniques qui se lient à une surface par l'intermédiaire du flagelle polaire (Sauer et al. 2002). Cette phase est réversible et un engagement complet vers un mode de vie en biofilm nécessite une fixation de la bactérie sur toute sa longueur grâce aux différentes structures d'adhésion de la bactérie. Ensuite, par le biais de la motilité de type twitching, médiée par les pili de type IV, les bactéries individuelles s'associent en structures nommées microcolonies (Sauer et al. 2002). À l'aide de signaux de QS induisant des changements d'expression de gènes, ces microcolonies évoluent vers des structures pouvant atteindre 100 µm d'épaisseur. Durant ce processus de maturation, les bactéries initient la sécrétion de polysaccharides, de sorte que dans le biofilm mature les bactéries sont enchâssées dans une matrice d'exopolysaccharides (Ryder et al. 2007). L'exopolysaccharide principal du biofilm est l'alginate, constitué d'acide mannuronique et glucuronique (cf. mucoïdie) (Mann and Wozniak 2012). De plus, l'expression des 7 gènes du locus *pel* produit des exopolysaccharides essentiels pour le maintien de la structure du biofilm. Les exopolysaccharides Pst sont riches en mannose et galactose et sont impliqués dans l'adhérence au verre et aux cellules épithéliales, et dans le maintien du biofilm après attachement (Franklin et al. 2011). Les souches environnementales produisent essentiellement Pel ou

PsI. Enfin, une fois que le biofilm est mature, une sous-population de bactéries peut se détacher de la masse, retourner à l'état planctonique et disperser le biofilm (Harmsen et al. 2010).

Bien que les traitements antibiotiques classiques soient efficaces sur les formes planctoniques, leur efficacité est bien moindre sur le biofilm au sein duquel les bactéries présentent une résistance 1000 fois plus importante (Costerton et al. 1999; Koudhi et al. 2015). Bien que la raison précise de ce phénomène ne soit pas clairement établie, plusieurs hypothèses ont été avancées comme une diminution de la pénétration des antibiotiques et des biocides liée à la matrice d'exopolysaccharide ou un métabolisme ralenti avec une croissance lente des bactéries dans le biofilm rendant inefficace une grande majorité d'antibiotiques (Hall-Stoodley et al. 2004). De plus, le mode de vie en biofilm offre un avantage sélectif, il permet aux bactéries de fonctionner comme une unité pluricellulaire, protégée de l'environnement, associée à une plus forte résistance au système immunitaire, à la dessiccation, aux UV et aux variations de pH. Il favorise également la coopération métabolique et les transferts horizontaux de gènes au sein de la communauté (Ferreira et al. 2010; Hansen et al. 2007). La coopération métabolique est donc amplifiée et la production de molécules de QS soutient la formation de biofilm. Une étude a d'ailleurs, montré que le traitement par azithromycine, qui interfère avec la signalisation du QS, aide à la clairance de *P. aeruginosa* dans le modèle chronique murin (Hoffmann et al. 2007). Les bactéries sont donc organisées en biofilm dans les VRCF et ceci est associé à une persistance accrue.

Le fer est un paramètre important jouant un rôle central dans le développement et le maintien du biofilm sur l'épithélium du tractus respiratoire (Banin et al. 2005). Par exemple, l'inhibition expérimentale de l'acquisition du fer par *P. aeruginosa* s'accompagne d'une réduction d'accumulation de biofilm de 58% et d'une augmentation de sa dégradation de 28% (Hunter et al. 2013). Dans les conditions de chronicité, l'environnement hypoxique peut maintenir le fer dans un état réduit Fe(II), plus biodisponible pour les bactéries, et son abondance a été significativement corrélée à la sévérité de la maladie (Hunter et al. 2013; Koley et al. 2011). De manière intéressante, la lactoferrine, qui est un constituant abondant dans les sécrétions muqueuses humaines, bloque le développement du biofilm de *P. aeruginosa* en chélatant le fer ferrique (Singh et al. 2002).

L'étude de sections de tissus pulmonaires CF a révélé la présence de microcolonies et de biofilm mature dans les voies respiratoires (Høiby et al. 2011). Ceci peut paraître étonnant car nous avons précédemment vu que la colonisation chronique était associée à une perte de flagelle et de pili qui sont utiles à la formation de biofilm. Néanmoins, la conversion vers le phénotype mucoïde, souvent mise en évidence lors de colonisations chroniques, résulte d'une surproduction d'alginate, l'exopolysaccharide majoritairement présent dans le biofilm (Gibson et al. 2003). De même, un système de régulation à trois composants nommé SadARS semble jouer un rôle important dans la maturation du biofilm dans les VRCF, notamment dans la formation de macrocolonies observées dans les biofilms matures (Harmsen et al. 2010; Kuchma et al. 2005). D'autre part, il semblerait que ce système SadARS régule négativement les gènes requis pour la synthèse du TSSIII. Le mode de vie en biofilm peut donc être une autre explication à la perte du TSSIII au cours de la persistance.

La comparaison d'isolats CF et non CF a montré que les isolats CF avaient un mode de croissance planctonique réduit et, à l'inverse, une formation de biofilm efficace (Head and Yu 2004). Les

bactéries planctoniques étudiées, comparées à celle en biofilm, présentaient une sensibilité élevée au peroxyde d'hydrogène et une diminution de la capacité de colonisation pulmonaire après aérosolisation dans le modèle de la souris CF. Une étude d'isolats séquentiels de *P. aeruginosa* présentant un même profil génomique a montré que la production de biofilm n'était pas stable en terme de quantité entre les souches mais n'a montré aucune tendance vers une sur- ou sous-production de biofilm au cours du temps (Head and Yu 2004). Chez les patients CF recevant une antibiothérapie insuffisante, le biofilm existe dans toutes les régions anatomiques pulmonaires tandis que pour les patients subissant des traitements antibiotiques agressifs, le biofilm est confiné aux zones conductrices (bronches) et absent des zones respiratoires (bronchioles et alvéoles) (Bjarnsholt et al. 2009). L'ensemble de ces études suggère fortement que *P. aeruginosa* persiste dans les VRCF sous forme de biofilm.

II.3.5. Adaptation clonale ou adaptation populationnelle ?

Il est maintenant accepté que les mutants sur les gènes régulateurs des mécanismes cellulaires centraux (*mucA*, *lasR*, *rpoN*...) sont sélectionnés lors de la phase précoce d'adaptation au cours de la colonisation chronique en réponse aux conditions de stress rencontrées par *P. aeruginosa* dans les VRCF (Damkiær et al. 2013; Folkesson et al. 2012; Marvig et al. 2015). Des taux de mutation similaires et une tendance nette pour la sélection de mutants patho-adaptatifs ont été observés quelle que soit la lignée de *P. aeruginosa* considérée et quelque soit le pays d'origine des patients (Marvig et al. 2015). Ces résultats confirment l'existence d'une signature mutationnelle associée à une sélection positive touchant relativement peu de gènes patho-adaptatifs, contrastant avec les mutations neutres observées dans une multitude d'autres gènes. En résumé, les phénotypes adaptés à la niche pulmonaire des patients CF impliquent une augmentation d'antibiorésistance, une virulence réduite associée à une perte de QS, et de motilité ainsi qu'une surproduction d'alginate engendrant des souches mucoïdes formant du biofilm (Ciofu et al. 2010).

Des progrès ont été faits ces dernières années avec le développement de thérapies agressives précoces d'éradication de *P. aeruginosa* ; malgré cela, une fois que l'infection chronique est établie, elle est quasiment impossible à éradiquer. Bien que les implications cliniques et les modèles d'évolution à long terme des infections chroniques aient été étudiés, les connaissances sont moindres concernant la dynamique des populations permettant à court terme la persistance malgré des cures antibiotiques agressives et en présence de modifications physiologiques permanentes (Caballero et al. 2015). Les échantillons respiratoires de patients sont soumis à des analyses microbiologiques (identification des pathogènes et antibiogramme) et aujourd'hui encore, l'importance d'obtenir des souches « pures » est ancrée dans la pratique des microbiologistes. Cela répond à l'hypothèse d'une population bactérienne infectieuse génétiquement et phénotypiquement uniforme à un temps T. De ce fait, l'étude d'une seule souche par morphotype observé sur les cultures d'isolement est de pratique courante. Toutefois, les poumons CF doivent être considérés comme un habitat constitué de différentes niches anatomiques, plus ou moins acides, plus ou moins oxygénées, dans lesquelles les conditions de disponibilité en nutriments, d'action des facteurs d'inflammation, de biodisponibilité des

antibiotiques, etc., varient. Dans ce contexte, un nombre croissant d'études récentes suggère qu'au lieu d'une évolution vers un seul clone adapté au cours de la persistance, les populations dans les VRCF seraient très hétérogènes, composées de multiples variants dérivés d'un ancêtre commun unique mais coexistant tout au long de l'évolution de la maladie (Workentine et al. 2013) (Figure 6). Ainsi, dans la partie suivante, nous nous sommes intéressés aux études ayant rapporté une diversité et une dynamique des populations bactériennes au sein des VRCF.

II.4. Diversité et dynamique des populations¹¹ bactériennes des VRCF

Les infections bactériennes dans les VRCF sont localisées dans trois zones anatomiques différentes avec des conditions physiologiques et immunologiques distinctes: les sinus paranasaux, microaérobies ou anaérobies, dominés par une sécrétion d'IgA et peu de polynucléaires où les bactéries sont maintenues à distance des cellules épithéliales par le mucus (Aanaes et al. 2013) ; les sécrétions anaérobies au niveau des zones bronchiques, avec la présence d'IgA, d'IgG et de polynucléaires en abondance où les bactéries sont également maintenues à distance des cellules épithéliales par le mucus (Kolpen et al. 2010) ; et enfin la zone alvéolaire aérobie où les IgG et les polynucléaires sont abondants, recrutés par les capillaires alvéolaires et où le biofilm est en contact avec les cellules épithéliales des alvéoles (Bjarnsholt et al. 2009). Du fait de l'adaptation des pathogènes à ces trois différentes niches et sous la pression des thérapies antibiotiques intensives, différentes sous-populations variantes du clone infectant initial de *P. aeruginosa* peuvent apparaître et se développer (Folkesson et al. 2012).

Les environnements hétérogènes tendent donc à héberger des populations bactériennes diversifiées, différents génotypes s'étant adaptés aux différentes conditions locales (Nguyen and Singh 2006). En outre, des conditions changeantes peuvent également contribuer à augmenter la diversité. Ces conditions changeantes existent lors d'une infection pulmonaire chronique comme lors des cures d'antibiotiques, de l'obstruction d'un segment pulmonaire par des sécrétions ou d'un épisode de saignement pulmonaire (Nguyen and Singh 2006). Une telle hétérogénéité peut contribuer au maintien d'une diversité dans la communauté bactérienne résidente ce qui peut avoir des conséquences sur la persistance bactérienne (Figure 6). Les écologues ont depuis longtemps reconnu que la diversité peut améliorer à la fois la productivité et la résistance au stress de nombreux types de communautés biologiques. Ceci a été expliqué par "l'hypothèse d'assurance" qui postule que la présence de diverses sous-populations augmente la gamme des conditions environnementales dans lesquelles certains membres de la communauté vont pouvoir survivre voire prospérer (Yachi and Loreau 1999). Les "effets d'assurance" peuvent apporter un large bénéfice aux populations bactériennes infectantes car leur persistance à long terme dépend de leur capacité à résister aux différents stress environnementaux (Nguyen and Singh 2006).

¹¹ Une population désigne l'ensemble des individus d'une même espèce qui occupe simultanément le même milieu.

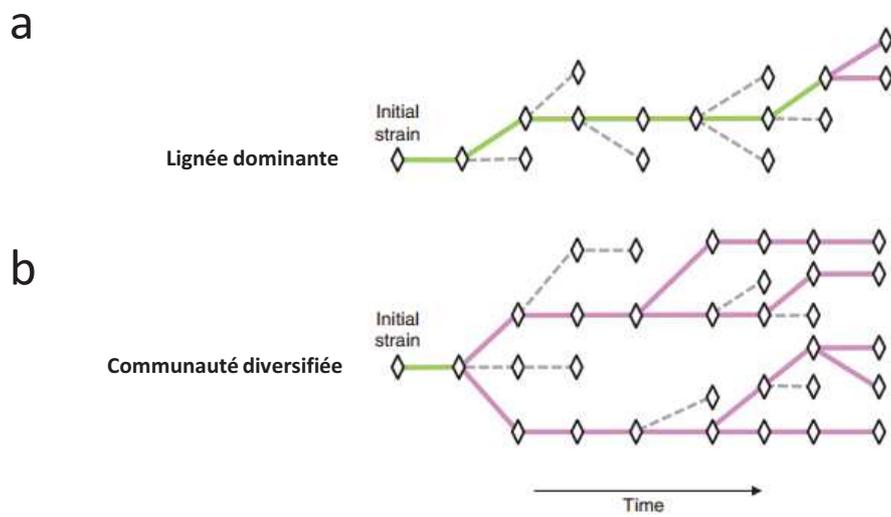


Figure 6 Modèles alternatifs d'évolution clonale au sein d'un patient (Adapté de Lieberman et al., 2014)
 a. Dans le modèle « lignée dominante » d'évolution au sein de l'hôte, les lignées avec des mutations bénéfiques se fixent (lignes vertes), en éliminant leurs ancêtres moins adaptés ou d'autres génotypes émergents temporairement (lignes pointillées). Dans ce modèle, la plupart des mutations observées est fixée et les mutations polymorphiques sont rares, représentant seulement les mutations récentes (lignes magenta).
 b. Dans le modèle « communauté diversifiée », les lignées coexistent et se font concurrence durant de longues périodes de temps. Dans ce modèle, la plupart des mutations est polymorphique.

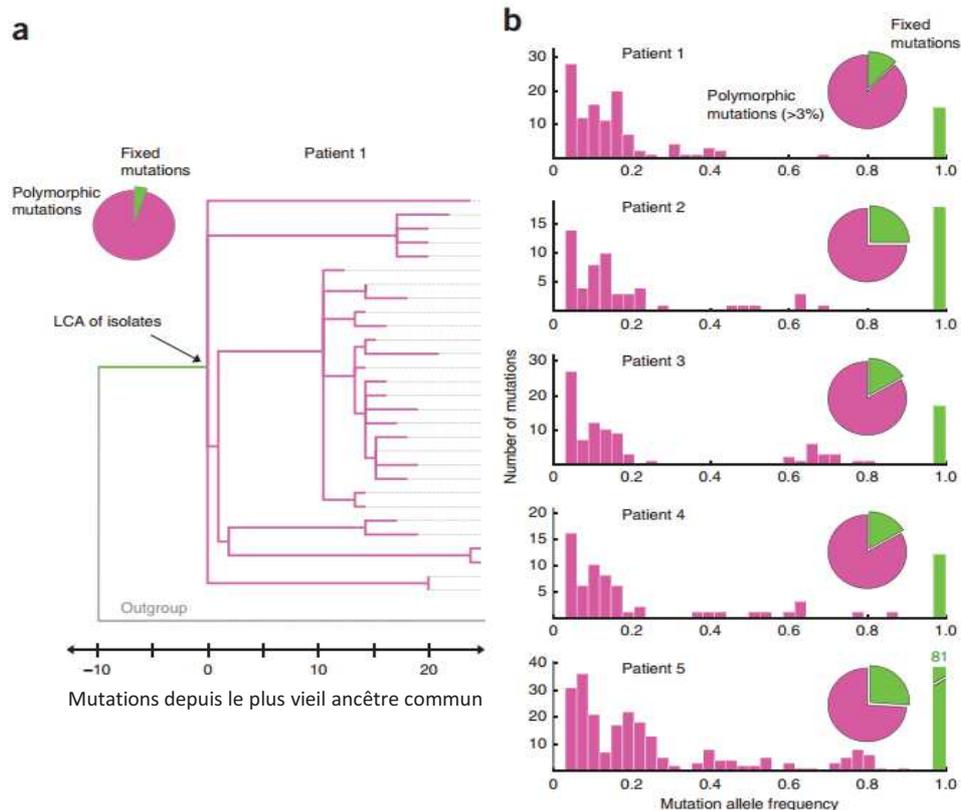


Figure 7 Représentation de l'évolution au sein d'un patient d'une population de *Burkholderia dolosa* menant à une diversification (Adapté de Lieberman et al. 2014)

Les mutations identifiées dans les populations de *B. dolosa* au sein de patients par rapport au groupe externe sont catégorisées comme fixées (en vert) ou polymorphiques (en magenta). Un excès de mutations polymorphiques par rapport aux mutations fixées supporte le modèle de « communauté diversifiée » plutôt que le modèle de « lignée dominante ».

a. Phylogénie par maximum de parcimonie de 29 isolats provenant d'une même expectoration (patient 1) qui montre la coexistence de diverses sous-lignées séparées par de nombreuses mutations nucléotidiques simples accumulées depuis la primocolonisation (LCA) de ce patient. Chaque isolat est représenté par une ligne pointillée.

b. Le modèle « communauté diversifiée » est également soutenu par la distribution des fréquences d'allèles lors du séquençage de la population dans cinq échantillons de patients.

II.4.1. Une population génétiquement diversifiée

Deux modèles opposés d'évolution lors de colonisations chroniques de patients ont été proposés : un modèle de "lignée dominante", dans lequel les mutations bénéfiques conduisent une lignée à dominer dans la population et un modèle de "communauté diversifiée" dans lequel chaque lignée issue de phénomènes adaptatifs différents coexiste à l'équilibre avec les autres lignées (Figure 6). L'étude de multiples isolats au sein d'une expectoration a montré que différents génotypes bactériens d'une même espèce coexistent au sein des VRCF. Par exemple, l'échantillon d'un enfant CF de 3 ans contenait 5 génotypes différents de *P. aeruginosa* tous reliés à l'isolat initial (Nguyen and Singh 2006). Le séquençage total des génomes d'isolats de *Burkholderia dolosa* provenant de 5 patients CF a montré une grande diversité intra-échantillon suggérant que les mutations se fixent rarement dans la totalité de la population mais que des lignées diversifiées coexistent pendant de nombreuses années (Lieberman et al. 2014). Lors de cette étude, la comparaison d'isolats au sein d'un échantillon a mis en évidence 188 mutations avec seulement 10 mutations partagées par l'ensemble des isolats. Les isolats comparés deux à deux différaient en moyenne par 26 mutations et la population était tellement diverse que l'identité complète entre les séquences de deux isolats était extrêmement rare. Les auteurs ont également montré l'existence de multiples polymorphismes au sein de mêmes gènes (Lieberman et al. 2014) (Figure 7b). Cette diversité est le reflet de la coexistence de multiples lignées et l'investigation de la structure de la communauté de *B. dolosa* au sein des VRCF d'un patient a montré une phylogénie profondément ramifiée avec 6 lignées différentes, chacune séparée par au moins 5 mutations spécifiques de lignée (Figure 7a). Pour tous les patients étudiés, il a été estimé que les lignées divergentes coexistaient depuis au moins 5 ans et dans certains cas, le génotype ancestral avait été éliminé de la population (Lieberman et al. 2014). Pour un patient, la communauté présentait un excès de mutations, plus particulièrement de transitions, suggérant une hypermutation qui n'avait encore jamais été décrite chez les membres du CBC. Lors de cette étude, les gènes impliqués dans la synthèse des composants de la membrane externe, la captation du fer et de l'oxygène, la synthèse d'acides aminés, et la résistance aux antibiotiques et au stress présentaient tous des mutations adaptatives (Lieberman et al. 2014). Les auteurs ont donc conclu que sous une forte pression de sélection, de multiples mutations adaptatives apparaissent mais qu'aucune n'est fixée dans la population, générant une diversité durable d'allèles, signature de sélections passées sous l'effet de pressions environnementales diverses.

Allant dans le même sens, la reconstruction phylogénétique de 40 isolats totalement séquencés de *P. aeruginosa* provenant d'un échantillon de patient a révélé la coexistence de deux lignées recombinantes, génétiquement divergentes mais ayant échangé des mutations potentiellement adaptatives (Williams et al. 2010). L'analyse d'isolats de 8 autres patients a mis en évidence la coexistence de lignées dans 75% des cas mais aussi des distances génétiques plus faibles entre les isolats de différents patients qu'au sein de la population d'un même patient dans la plupart des cas (Williams et al. 2010). Plus récemment, une analyse phylogénomique a retracé l'histoire de l'évolution de 3 lignées divergentes de *P. aeruginosa* chez un même patient (Markussen et al. 2014). Ce patient avait été initialement colonisé au niveau des sinus paranasaux par un clone DK1 appartenant

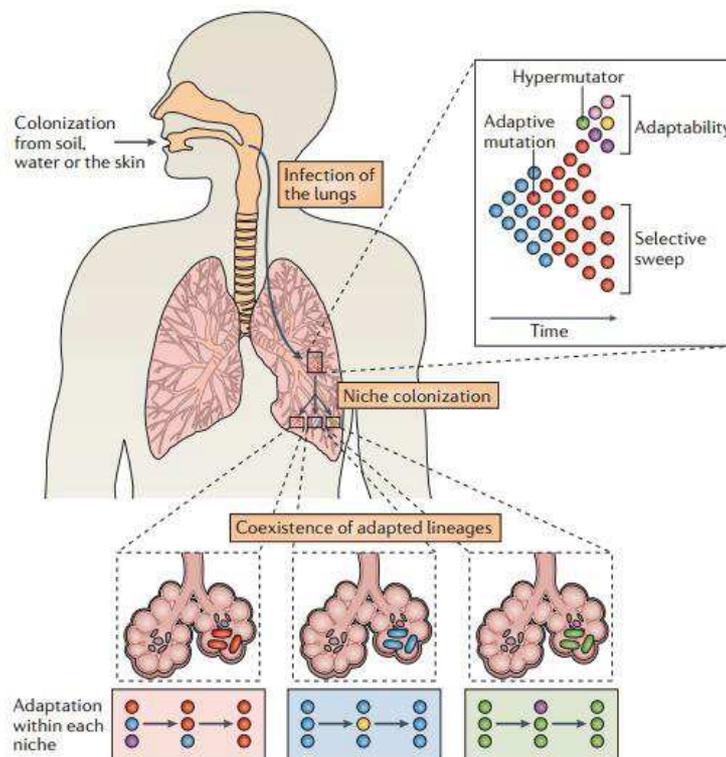


Figure 8 Evolution des pathogènes au sein des poumons d'un patient atteint de mucoviscidose. (D'après Didelot et al. 2016)

L'infection pulmonaire d'un patient atteint de mucoviscidose débute par l'acquisition pulmonaire d'un pathogène d'origine endogène ou exogène et progresse avec une augmentation rapide de la taille de la population pathogène. Les mutations apparaissent occasionnellement et certaines d'entre elles vont être des mutations adaptatives et vont permettre l'émergence d'un clone plus adapté. L'hypermutation est un mécanisme important d'évolution génomique de ces pathogènes, par lequel les souches perdent la fonction de réparation des erreurs de l'ADN polymérase et deviennent hypermutables. Ces souches avec un taux de mutations augmenté ont un potentiel d'évolution augmenté. Pendant que la colonisation progresse, les pathogènes colonisent toutes les niches écologiques des voies respiratoires et l'adaptation séparée à chaque niche conduit à la coexistence de différentes lignées adaptées.

génétiqumnt au cluster nommé A. Rapidement après cette primocolonisation, la population avait divergé vers une lignée génétiquement et phénotypiquement différente appartenant au cluster B présente au niveau des voies respiratoires basses. Enfin, 10 ans plus tard, une autre lignée (cluster C) a divergé à nouveau à partir de la population des sinus et a également migré dans les voies respiratoires basses. Les auteurs ont noté que les isolats des clusters B et C avaient accumulé plus de mutations dans les gènes patho-adaptatifs au cours du temps que la sous-population A associée aux sinus, les contraintes de la niche pulmonaire étant certainement plus fortes (Markussen et al. 2014). Une autre preuve du bien-fondé de la dynamique évolutive à petite échelle de temps a été fournie par l'analyse récente d'une population de *P. aeruginosa* par séquençage total qui montre l'émergence évolutive de deux sous-lignées clonales au sein des VRCF au cours d'une période d'un an (Caballero et al. 2015).

L'analyse par séquençage total de 22 isolats morphologiquement identiques de *P. aeruginosa* au sein d'un même échantillon respiratoire a révélé une diversité de séquences entre les isolats allant de 5 à 64 SNPs et a également montré que les recombinaisons étaient le facteur dominant de la diversification de cette population par rapport aux mutations spontanées (Darch et al. 2015). De plus, le séquençage d'isolats appariés de *P. aeruginosa* d'un même échantillon provenant de trois patients ont tous montré des variations (Chung et al. 2012). Pour les isolats appariés de deux patients, les différences allaient de 1 à 54 SNPs et de 8 à 38 indels alors que pour le dernier patient, porteur de deux isolats hypermutables (mutation *mutS*), les différences étaient de 344 SNPs et 93 indels. D'autre part, des auteurs ont identifié que l'apparition de mutations dans les gènes *mutL* et *mutS* conférant l'hypermutation était corrélée à l'apparition de mutations dans *mucA* et *lasR* impliquant des changements phénotypiques concomitants comme la mucoïdie et la perte de QS (Ciofu et al. 2010).

Une étude de population du clone épidémique LES de *P. aeruginosa* au sein d'expectorations a mis en évidence différents haplotypes, qui ont été définis par l'association différentielle de 15 caractères génétiques et phénotypiques (Mowat et al. 2011). Selon cette définition, les souches ayant les mêmes profils appartenaient au même haplotype. Un total de 1720 isolats provenant de 43 échantillons de 10 patients a été analysé et les isolats ont été classés en 398 haplotypes différents. L'haplotype majoritaire comprenait 66 isolats et 9 autres haplotypes comptaient au moins 30 isolats. Des échantillons prélevés le même jour présentaient des compositions en haplotypes similaires mais cette composition en haplotypes changeait rapidement au cours du temps lors de la colonisation chronique d'un patient (Mowat et al. 2011). En effet, la majorité des caractères génétiques et phénotypiques étudiés se sont révélés hautement dynamiques au cours du temps. Aucune preuve pour la sélection d'un phénotype dominant n'a été mise en évidence bien que, comme lors de l'étude de Ciofu *et al*, certains caractères phénotypiques semblaient avoir tendance à apparaître en même temps dans un même isolat (Mowat et al. 2011).

D'autre part, il a été montré *in vitro* que les conditions au sein du biofilm peuvent conduire à une diversification génétique sans qu'il n'y ait de pressions extérieures et que la diversité résultante confère une forme d'assurance biologique qui peut protéger la communauté face à des conditions défavorables (Boles et al. 2004). Cette diversité serait médiée par la réparation des cassures double-brin qui apparaissent sous contrainte dans le biofilm (Boles and Singh 2008). En effet, ces cassures

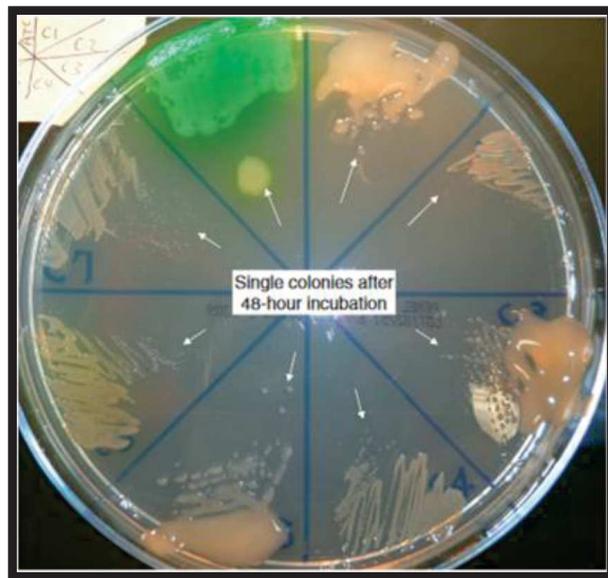


Figure 9 Diversité phénotypique d'isolats provenant d'un même échantillon. (D'après Qin et al. 2012)
Comparaison de croissance (taille des colonies) de 7 isolats isogéniques de *P. aeruginosa* provenant d'un échantillon de patient sur une gélose Mueller Hinton après 48 heures d'incubation à 35 °C. A partir d'une souche d'hémoculture de phénotype sauvage PA- ATCC 27853 (verte) en haut à gauche, 7 souches isogéniques de C1 à C7 isolées d'une expectoration d'un patient atteint de mucoviscidose ont été ensemencées dans le sens des aiguilles d'une montre.

sont létales si elles ne sont pas réparées par la recombinaison RecA et ce système de réparation peut lui-même induire des mutations pouvant expliquer l'apparition de variants.

Tous ces résultats vont à l'encontre du modèle de la "lignée dominante", en démontrant que la diversification est inhérente à l'adaptation, répondant aux différentes pressions de sélection qui s'exercent dans les VRCF (Figure 8). Ces observations sont au contraire en accord avec l'interférence clonale ; dans les grandes populations haploïdes, des mutations bénéfiques multiples émergent et sont en concurrence, empêchant les lignées correspondantes d'atteindre la fixation (Fogle et al. 2008; Hegreness et al. 2006). En plus de la taille importante de la population (parfois 10^8 unité formant colonies (UFC)/ ml d'expectoration) et de la variété des pressions exercées, la structure branchée des VRCF peut entraver la capacité d'une lignée à dominer l'ensemble des VRCF. Dans certains cas, les lignées peuvent toutefois évoluer de façon convergente, en réponse à des forces sélectives communes à plusieurs zones pulmonaires (Lieberman et al. 2014).

II.4.2. Une population phénotypiquement diversifiée

Cette diversité génétique observée dans les populations des VRCF est associée à l'émergence et à la coexistence de différents phénotypes comme des variants non pigmentés, avec des tailles de colonies variables, mucoïdes ou non, ... (Li et al. 2005) répondant à l'hypothèse d'assurance face à un environnement dynamique. Cette hétérogénéité observée en culture est révélatrice de l'émergence d'une certaine multicellularité bactérienne c'est-à-dire d'une population hétérogène formée de plusieurs variants du clone infectant initial (Qin 2016).

Les nombreuses et importantes études phénotypiques de populations de *P. aeruginosa* dans les VRCF ont toutes mis en évidence une très grande diversité phénotypique au sein des échantillons étudiés (Clark et al. 2015; Darch et al. 2015; Qin 2016; Williams et al. 2010; Winstanley et al. 2016; Workentine and Surette 2011) (Figure 9).

Une étude de population a trouvé une prévalence identique d'isolats mucoïdes et non mucoïdes au sein d'expectorations de patients (Workentine et al. 2013). Une analyse microscopique de poumons explantés a permis de préciser que les variants mucoïdes et non mucoïdes de *P. aeruginosa* étaient localisés dans des niches différentes, les bactéries mucoïdes étaient localisées dans les sécrétions au niveau des bronches tandis que les bactéries non mucoïdes étaient localisées dans les alvéoles et bronchioles (Bjarnsholt et al. 2009).

Nous avons vu précédemment que le QS diminue au cours du temps dans les souches de *P. aeruginosa* colonisant les VRCF (Bjarnsholt et al. 2010; Wilder et al. 2009). Une étude a mis en évidence une coexistence d'isolats QS-compétents et QS-déficients chez plusieurs patients (Wilder et al. 2009). Comme attendu, les isolats QS-déficients présentaient une croissance plus importante en présence d'acides aminés et une résistance augmentée à la lyse alcaline (Cf. partie Quorum sensing). Ces propriétés confèrent un avantage dans certaines conditions car les acides aminés sont abondants dans les VRCF et leur catabolisme conduit à des alcalinisations localisées (Wilder et al. 2009). Néanmoins, aucun échantillon ne contenait 100% de souches QS-déficientes. Comme pour la mucoïdie, les isolats QS-déficients et QS-compétents colonisent peut-être des microenvironnements

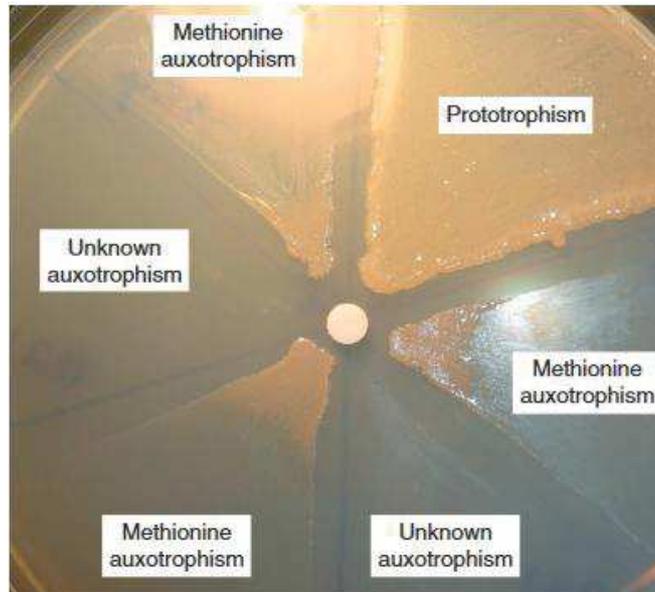


Figure 10 Détermination de l'auxotrophie pour la méthionine de souches isogéniques de *P. aeruginosa* provenant d'un échantillon de patient atteint de mucoviscidose (D'après Qin et al. 2016). La déficience de biosynthèse de la méthionine est basée sur l'exigence en méthionine pour la croissance dans un milieu minimal M9 salé contenant 1% de glucose comme source unique de carbone. Pour cela, un disque stérile de 6 mm contenant de la méthionine est placé au centre de la gélose.

différents ou coexistent et fluctuent en concentration selon "l'hypothèse d'assurance" en fonction des conditions locales.

Une diversité de résistance aux antibiotiques a également été rapportée pour des isolats au sein d'échantillons. L'analyse de 101 expectorations CF avec isolement de 4 colonies de *P. aeruginosa* par morphotype colonial a montré qu'il y avait en moyenne 4 morphotypes par échantillon avec environ 3 profils de résistance différents par morphotype (Foweraker et al. 2005). Les auteurs ont conclu que prélever et étudier uniquement une colonie de chaque morphotype comme il est généralement fait en laboratoire d'analyse bactériologique conduit à une sous-estimation de la résistance aux antibiotiques. Tirant les mêmes conclusions, il a été montré que la résistance *in vitro* aux antibiotiques augmentait significativement quand plusieurs isolats morphologiquement identiques étaient mélangés (Darch et al. 2015).

Concernant l'auxotrophie, une étude a montré que la prévalence des mutants auxotrophes au sein d'expectorations était très variable (Fothergill et al. 2010b). Pour un patient, l'étude de la population de *P. aeruginosa* au début d'une exacerbation a montré qu'aucun des isolats n'était auxotrophe tandis qu'au cours de l'exacerbation, 57,5% des isolats présentaient ce phénotype. Les acides aminés étant abondant dans le milieu en cas d'exacerbation, l'auxotrophie est certainement un avantage dans ce cas et ces mutants ont certainement été sélectionnés (Figure 10). Des auteurs ont également rapporté la coexistence de lignée hypermutables et non hypermutables dans les VRCF (Marvig et al. 2013; Qin et al. 2014).

L'étude de Markussen et al, qui a montré une diversification génétique d'un clone initial de *P. aeruginosa* en 3 lignées majeures anatomiquement séparées, a rapporté que ces 3 sous-populations étaient clairement différenciables sur la base de la mucoïdie, du temps de doublement, des capacités métaboliques et des profils d'expression globaux de gènes (Markussen et al. 2014). Le cluster B à croissance plus rapide était constamment sous-représenté voire absent de la population totale échantillonnée des VRCF. Les membres de ce cluster colonisaient très certainement une niche pulmonaire particulière, difficilement échantillonnable (Markussen et al. 2014). Les auteurs ont conclu que la génération et le maintien de cette diversité était le résultat d'une partition des sous-lignées dans des niches physiquement séparées soumises à des pressions différentes aboutissant à des phénotypes d'adaptation différents.

Des isolats provenant de zones pulmonaires légèrement et fortement altérées d'un même patient ont montré des différences en termes de besoins nutritionnels, de résistance au système immunitaire et aux antibiotiques et de virulence (Jorth et al. 2015). Finalement, *P. aeruginosa* présente une diversité de population pour de nombreuses caractéristiques phénotypiques considérées précédemment comme altérées au cours de la patho-adaptation (Winstanley et al. 2016). Néanmoins, lors de comparaisons de plusieurs variants au sein d'échantillons successifs, les phénotypes diffèrent significativement indiquant que les populations au sein des individus sont aussi dynamiques que diverses (Workentine and Surette 2011).

Lors de l'étude de la relation entre la population et le statut clinique de patients, une prévalence plus importante d'isolats présentant une surproduction de pyocyanine et d'élastase a été montrée durant une période d'exacerbation pour deux patients (Fothergill et al. 2010a). Néanmoins, une tendance

inverse a été observée pour le dernier patient étudié avec une baisse graduelle du nombre d'isolats surproducteurs au cours de l'exacerbation. Pour tous les patients, au début de l'exacerbation, la majorité des isolats était verts, lisses et non mucoïdes tandis que ce phénotype majoritaire diminuait au cours de l'exacerbation au profit d'isolats blancs/mucoïdes et blanc-jaunâtre/lisses/non-mucoïdes. L'étude de l'hyperproduction de pyocyanine, qui est une caractéristique connue du clone LES, a montré que seuls 10% des souches d'une population de *P. aeruginosa* LES CF présentaient cette caractéristique. En revanche, cette étude a montré une possible corrélation positive entre la présence de ces variants et la survenue d'exacerbations (Workentine and Surette 2011).

Suite à l'avènement du séquençage de génomes à haut débit, il y a eu de rapides progrès dans la compréhension générale de l'adaptation et de l'évolution des bactéries lors de la colonisation chronique des VRCF. Toutefois, ces progrès concernent essentiellement *P. aeruginosa*. Dans ce cadre, de nombreux gènes patho-adaptatifs ont été identifiés. Plus récemment, ces études se sont adressées à l'évolution des populations infectantes sur une courte échelle de temps, révélant des diversités génétiques et phénotypiques élevées et très dynamiques (Winstanley et al. 2016). Si les conséquences cliniques de cette importante diversité ne sont pas entièrement démontrées, les implications sont certaines sur le diagnostic bactériologique, en particulier sur les tests de sensibilité aux antibiotiques qui peuvent se trouver faussés (Winstanley et al. 2016).

Le développement *in situ* chez le patient de génotypes différents apparaît donc comme un phénomène général notamment basé sur des mutations ayant tendance à toucher les mêmes groupes de gènes dits patho-adaptatifs mais avec des modifications spécifiques pour chaque souche (Qin et al. 2014). La diversité des isolats étudiés lors des travaux présentés est une preuve convaincante que ces populations sont bien plus complexes et dynamiques que ce que l'on pouvait imaginer sans qu'aucune sélection apparente d'un phénotype ou d'un génotype dominant au cours du temps n'ait été démontrée (Workentine et al. 2013). Cette diversité importante au sein des VRCF est en faveur de la radiation adaptative, qui est l'évolution rapide, à partir d'un ancêtre commun d'un ensemble de souches caractérisées par une grande diversité génétique et morphologique, chacune étant adaptée à une niche particulière (Jørgensen et al. 2015). En conclusion, ces études apportent la preuve que l'hétérogénéité de l'environnement hautement structuré et complexe des poumons CF favorise l'évolution dynamique et le maintien à long terme de la diversité de la population pathogène lors de l'infection chronique (Markussen et al. 2014). Dans ce chapitre, nous avons considéré la diversité à l'échelle de populations, donc une structuration intra-spécifique mais dans l'environnement naturel, les bactéries sont organisées en communautés, qui sont un niveau supérieur de complexité à considérer.

II.5. Diversité et dynamique des communautés¹² microbiennes des VRCF

Les VRCF sont un habitat complexe hébergeant une communauté hétérogène incluant des bactéries, de virus et des champignons (Conrad et al. 2013). Parmi les champignons, *Aspergillus* spp. et *Candida* spp. sont les plus communs et, parmi les virus, des pathogènes humains communs, ainsi que des bactériophages, sont décrits. Les événements de colonisation, la chronologie de cette colonisation par divers différents pathogènes et les interactions entre les différentes souches microbiennes qui s'en suivent compliquent le travail des thérapeutes. Au lieu d'une infection monomicrobienne, la maladie infectieuse au cours de la mucoviscidose est considérée comme une pathologie polymicrobienne et doit être considérée comme le résultat de changements dynamiques dans les diverses populations microbiennes avec une modification concomitante de la physiologie de la communauté (Conrad et al. 2013; Peters et al. 2012; Sibley et al. 2006). Les patients sont colonisés par une communauté polymicrobienne complexe, composée initialement de bactéries principalement observées dans les voies respiratoires hautes, incluant les bactéries anaérobies, dont l'espèce la plus commune est *Prevotella* (Surette 2014). Chez les jeunes patients, *S. aureus*, *H. influenzae* et *P. aeruginosa* sont communs, tandis que chez les patients plus âgés, *P. aeruginosa* domine généralement l'écosystème pulmonaire, souvent accompagné par d'autres pathogènes comme *S. aureus*, les bactéries du CBC, *S. maltophilia* et *Achromobacter* spp. (Conrad et al. 2013; Mahenthalingam 2014).

Pendant de très nombreuses années, *P. aeruginosa* a été considéré comme le pathogène majeur dans la mucoviscidose et les infections chroniques par celui-ci ont été liées à une plus forte morbi-mortalité. Néanmoins, l'amélioration de la clairance des voies respiratoires, le traitement plus efficace et ciblé contre les agents pathogènes connus et l'augmentation de la durée de vie des patients a conduit à l'émergence de nouveaux agents pathogènes comme *Achromobacter* spp., *M. abscessus*, *Pandoraea* spp., *Ralstonia* spp. et *S. maltophilia* (Green and Jones 2015; Hector et al. 2016; Surette 2014). L'épidémiologie des agents pathogènes lors de la mucoviscidose continue de changer et des micro-organismes émergents, rarement mis en évidence au cours d'autres pathologies sont de plus en plus fréquemment identifiés (Parkins and Floto 2015; Salsgiver et al. 2015).

D'autre part, des communautés spécifiques ont été associées à certains génotypes CFTR et il a été décrit que les femmes présentaient généralement une plus faible diversité de taxons bactériens dans leurs VRCF (Klepac-Ceraj et al. 2010; Zhao et al. 2014). Les patients avec une pathologie peu avancée présentent une plus forte diversité bactérienne pulmonaire que les patients avec une pathologie avancée et que ceux présentant une infection chronique à *P. aeruginosa* ou à bactéries du CBC (Cox et al. 2010; Parkins and Floto 2015).

Lors de l'étude par microarray du microbiote pulmonaire de patients, 158 familles bactériennes ont été détectées et la majorité des taxons identifiés n'avait jamais été associée à la mucoviscidose (Cox et

¹² Une communauté est un ensemble d'organismes appartenant à des populations d'espèces différentes constituant un réseau de relations.

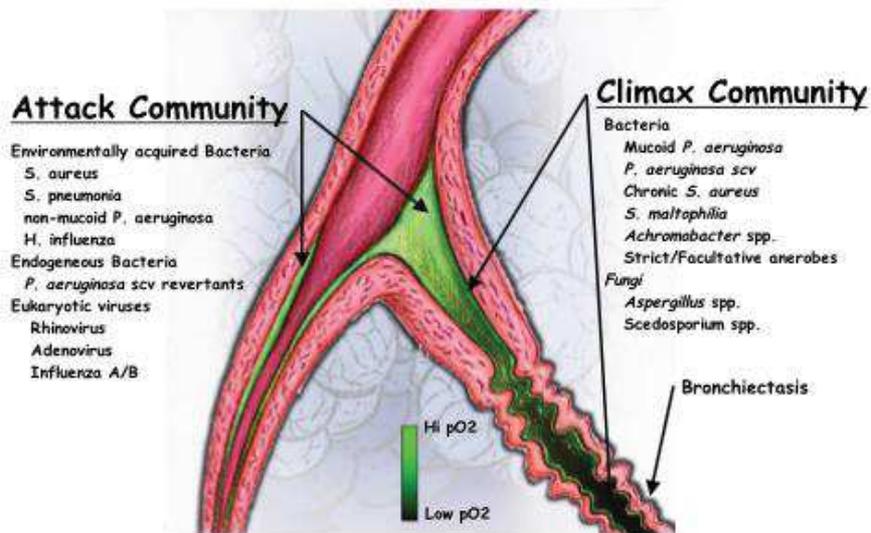


Figure 11 Le modèle "climax-attack" proposé dans la mucoviscidose (D'après Conrad et al. 2012). Les communautés d'attaque sont constituées de pathogènes bactériens et de virus eucaryotes. Ces communautés induisent une réponse immunitaire forte associée à une destruction tissulaire. Les tissus abîmés sont ensuite colonisés par une communauté climacique constituée de bactéries aérobies et anaérobies facultatives en périphérie des bronches et de bactéries anaérobies strictes au centre des bronches.

al. 2010). De 78 à 1012 taxons du niveau de l'espèce ont été identifiés par patient et 1837 taxons différents ont été détectés dans toute l'étude. La présence de 45 taxons étaient positivement corrélée à l'âge avancé des patients, dont près de la moitié appartenaient à la famille des *Pseudomonadaceae* (Cox et al. 2010).

D'autre part, les interactions entre les espèces bactériennes coexistant dans les VRCF peuvent potentiellement agir sur la progression de la maladie. Dans ce cadre, il est important d'identifier les principaux collaborateurs / concurrents et les influences environnementales dans le but d'améliorer la thérapeutique et de limiter le déclin pulmonaire (Whiley et al. 2015).

Une infection ancienne et guérie à *S. aureus* favoriserait la colonisation par *P. aeruginosa*. Les enfants recevant une thérapie continue anti-staphylococcique ont un plus fort risque de développer une infection à *P. aeruginosa* (Stutman et al. 2002). Il est possible que l'infection initiale par *S. aureus* induise des lésions tissulaires permettant ensuite une meilleure fixation d'autres agents pathogènes comme *P. aeruginosa* (Govan and Nelson 1992). Aux Etats-Unis, l'étude de 5820 enfants et adultes CF a identifié l'infection par *S. aureus* comme un marqueur d'augmentation de survie (Liou et al. 2001). Bien qu'induisant des dommages tissulaires initiaux, la colonisation par *S. aureus* prévient donc certainement des infections par des pathogènes plus virulents comme *P. aeruginosa* qui apparaissent plus facilement lorsque *S. aureus* est éradiqué des VRCF (Smyth 2005). Néanmoins, certains patients sont colonisés par *P. aeruginosa* et *S. aureus* de manière concomitante et une étude sur l'impact clinique des infections respiratoires des patients CF de moins de 2 ans a montré que si *S. aureus* seul n'affecte pas la survie, les patients présentant *S. aureus* associé à *P. aeruginosa* ont un taux de survie à 10 ans moindre que les patients présentant *P. aeruginosa* seul (Hudson et al. 1993). Les interactions entre ces bactéries sont donc certainement plus complexes que ce que l'on peut imaginer.

Toujours dans le cadre des interactions entre pathogènes, la co-culture en biofilm de 4 espèces de streptocoques oraux et du clone LES de *P. aeruginosa* a montré une potentialisation de la production de facteurs de virulence par *P. aeruginosa* (Whiley et al. 2015). Des études sur des modèles animaux ont également mis en évidence que l'association de *P. aeruginosa* avec des bactéries du microbiote oro-pharyngé augmentait la sécrétion de facteurs de virulence par *P. aeruginosa* et provoquait des dommages tissulaires plus importants qu'avec *P. aeruginosa* seul (Duan et al. 2003; Sibley et al. 2008). Néanmoins, ces interactions sont complexes et sont déterminées par les conditions environnementales et l'ordre d'arrivée des différentes espèces. Par exemple, en atmosphère riche en CO₂, *Streptococcus oralis* peut à l'inverse antagoniser le clone LES par la production d'H₂O₂ et altérer significativement la dynamique et l'apparence du biofilm produit par ce clone (Whiley et al. 2015). De plus, si ces différentes espèces de streptocoques oraux sont inoculés dans le milieu avant *P. aeruginosa*, elles peuvent inhiber la croissance de ce pathogène.

Enfin, quand l'infection des VRCF est considérée en termes d'écologie microbienne, deux états alternatifs de la communauté peuvent être définis; un état quiescent (correspondant aux stades où les patients sont cliniquement stables) et un état agressif (correspondant aux stades où les patients présentent des exacerbations pulmonaires) (Conrad et al. 2013). Les phases d'exacerbations pulmonaires sont généralement dominées par des taxons bactériens qui sont similaires aux taxons

isolés dans les états cliniques stables (Zhao et al. 2012). Par exemple, les exacerbations aiguës peuvent résulter de révertants à croissance rapide dérivés de bactéries à croissance lente, de populations microbiennes endogènes ou de changements dans l'expression de gènes provoquant une plus forte réponse immunitaire (Bjarnsholt et al. 2009; Rogers et al. 2012).

Des auteurs ont finalement suggéré l'existence de deux grandes classes fonctionnelles de communautés bactériennes ; une communauté d'attaque, virulente et transitoire induisant une forte réponse immunitaire associée aux exacerbations pulmonaires qui secondairement crée un microenvironnement favorisant l'établissement d'une communauté climacique¹³ qui est à croissance plus lente et intrinsèquement résistante aux antibiotiques (Conrad et al. 2013) (Figure 11). Le métagénome de la communauté d'attaque est riche en gènes de virulences, les facteurs codés provoquent une réponse immunitaire innée intense et en conséquence initient le remodelage des VRCF. Le métagénome de la communauté climacique est riche en gènes favorisant la colonisation chronique et provoquant une diminution de sensibilité aux antibiotiques (Conrad et al. 2013). Les communautés d'attaque sont généralement dynamiques et incluent des populations de *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Pseudomonas aeruginosa* non mucoïdes et des virus comme les Influenza virus ou les Rhinovirus. A l'inverse, les communautés climaciques sont composées d'espèces bactériennes et fongiques "clés de voute", persistantes et à croissance lente, dont les métabolismes sont bien adaptés aux microenvironnements des VRCF (Bjarnsholt et al. 2009; Conrad et al. 2013; Yang et al. 2011b). Sont incluses dans ces communautés climaciques des espèces ou des populations bactériennes connues comme *P. aeruginosa* et *S. aureus* adaptées aux VRCF, *S. maltophilia*, *Achromobacter* spp. et des bactéries anaérobies strictes (Figure 11). Généralement, l'appartenance à une communauté, ainsi que la fonction et l'évolution au sein de cette communauté, dépendent de l'histoire de la colonisation des VRCF, incluant l'ordre et les conditions d'arrivée de chaque microorganisme (Fukami et al. 2007). Il y a donc une relation très forte entre la structure de la communauté bactérienne, le stade de la maladie et le statut clinique des patients. L'étude de la dynamique de la communauté est donc importante car elle sous-tendrait certains changements cliniques.

III Bactéries d'origine environnementale émergentes dans les VRCF

Concernant les bactéries adaptables et capables de coloniser chroniquement les VRCF, nous avons vu que *P. aeruginosa* était particulièrement étudié. Néanmoins, avec les nouvelles prises en charges thérapeutiques et l'augmentation de la durée de vie des patients, l'épidémiologie de la colonisation des VRCF change (Lipuma 2010). En effet, d'autres pathogènes opportunistes d'origine environnementale comme les bactéries du genre *Achromobacter*, *Burkholderia gladioli*, *Ralstonia mannitolilytica*, *Pandoraea* sp., *S. maltophilia*, et les mycobactéries non tuberculeuses sont

¹³ État théorique dans lequel une communauté a atteint un état d'équilibre stable et durable dans les conditions abiotiques du milieu.

considérées comme émergentes dans la mucoviscidose, infectant de manière cumulative environ 25% des patient CF et étant multirésistantes aux antibiotiques (Hansen et al. 2010; Hauser et al. 2011; Mahenthiralingam 2014; Sibley et al. 2006). Parmi ces pathogènes, les seuls associés à une diminution de la fonction pulmonaire sont les bactéries du genre *Pandoraea* et *M. abscessus* (Hector et al. 2016; Mahenthiralingam 2014). Tout comme *P. aeruginosa*, ces bactéries sont capables de coloniser chroniquement les VRCF et leurs mécanismes d'adaptation à cette (ces) niche(s), ainsi que leur impact clinique sur la fonction pulmonaire, sont peu décrits (Hector et al. 2016). C'est le cas des bactéries des genres *Achromobacter* et *Pandoraea* sur lesquels nos travaux ont particulièrement porté.

III.1. *Achromobacter*

Une synthèse bibliographique des données microbiologiques et cliniques a été réalisée pour les bactéries du genre *Achromobacter* dans le cadre de la rédaction du chapitre « Bacilles à Gram négatif non fermentants divers » à paraître dans l'édition 2016 du Précis de Microbiologie Clinique, Section VIII, Chapitre 5 aux éditions ESKA.

Un bilan des isolats de BGN non fermentants autres que ceux des genres *Pseudomonas* et *Acinetobacter* a tout d'abord été établi montrant que durant 1,5 an, au CHU de Montpellier, les bactéries du genre *Achromobacter* se classent au second rang des identifications les plus fréquentes derrière les bactéries du genre *Stenotrophomonas* et sont majoritairement isolées du tractus respiratoire des patients atteints de mucoviscidose (page 8/48 de l'annexe 1). Sont ensuite successivement présentés les données taxonomiques, les habitats et sources de contamination, le pouvoir pathogène et les facteurs favorisant les infections, les méthodes du diagnostic bactériologique et la résistance aux antibiotiques des bactéries du genre *Achromobacter* (pages 22-23/48 de l'annexe 1). Le paragraphe sur *Achromobacter* vous est présenté en page suivante.

III.2. *Pandoraea*

Le genre *Pandoraea*, appartenant au phylum des protéobactéries et à la famille des *Burkholderiaceae* a été séparé du genre *Burkholderia* en 2000 et comprend 10 espèces validées et 4 genomospécies (Anandham et al. 2010; Coenye et al. 2000; Daneshvar et al. 2001; Sahin et al. 2011). Dans l'environnement, ce genre a été décrit dans le sol, la rhizosphère, l'eau, la boue, les sédiments et des aliments comme du lait en poudre (Coenye et al. 2000; Daneshvar et al. 2001; Schneider et al. 2006). Les bactéries de ce genre ont également été isolées d'échantillons d'eau de la mer Méditerranée, que ce soit sous forme libre ou associées au plancton (Fera et al. 2007). Cinq espèces ont été isolées d'échantillons biologiques humains ; quatre ont été isolées uniquement d'échantillons respiratoires de patients CF (*P. apista*, *P. pulmonicola*, *P. pnomenusa*, *P. sputorum*) et *P. norimbergensis* a été isolée à partir de deux échantillons de patients non CF, une hémoculture et un liquide de lavage broncho-alvéolaire (Coenye et al. 2000). Actuellement, 23 génomes de *Pandoraea* spp. sont disponibles pour 10 souches provenant de patients CF, une souche provenant des fèces d'une poule et 12 souches provenant de l'environnement dont 9 isolées du sol et de la rhizosphère, une d'un bioréacteur, une de

Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales

Dans cet ordre, trois familles comprennent des BGN-NF responsables d'infections chez l'homme, les familles *Alcaligenaceae*, *Comamonadaceae* et *Oxalobacteraceae*. Parmi les genres impliqués, *Achromobacter* est le plus fréquemment isolé.

Famille Alcaligenaceae

Achromobacter

Le genre *Achromobacter* a été décrit en 1981 par Yabuuchi et Yano et contenait originellement uniquement l'espèce *Achromobacter xylosoxidans* (anciennement *Alcaligenes xylosoxidans* (Yabuuchi & Yano, 1981)). Les espèces *Alcaligenes piechaudii*, *Alcaligenes ruhlandii* et *Alcaligenes denitrificans* ont par la suite également été reclassées dans le genre *Achromobacter* et ce genre comprend actuellement 15 espèces validement publiées dont plus de la moitié a été décrite au cours des cinq dernières années : *Achromobacter aegrifaciens*, *Achromobacter animicus*, *Achromobacter anxifer*, *Achromobacter denitrificans*, *Achromobacter dolens*, *Achromobacter insolitus*, *Achromobacter insuavis*, *Achromobacter marplatensis*, *Achromobacter mucicolens*, *Achromobacter piechaudii*, *Achromobacter pulmonis*, *Achromobacter ruhlandii*, *Achromobacter spanius*, *Achromobacter spiritinus* et *A. xylosoxidans* (Yabuuchi & Yano, 1981 ; Coenye *et al.*, 2003b ; Vandamme *et al.*, 2013a ; Vandamme *et al.*, 2013b). Des travaux récents suggèrent toutefois que les espèces *A. spiritinus* et *A. marplatensis* pourraient en fait correspondre à une seule espèce (Gomilla *et al.*, 2014).

Bien que décrits dans des sols particulièrement pollués, les eaux et les plantes, l'habitat d'*Achromobacter* spp. n'est pas clairement défini. Au niveau domestique, certaines espèces ont été isolées à partir de l'eau d'une piscine intérieure, ainsi que de tuyaux d'évacuation (Holmes *et al.*, 1977 ; Amoureux *et al.*, 2013b). En milieu hospitalier, *Achromobacter* sp. a notamment été isolé de distributeurs de papiers désinfectants, de diverses solutions désinfectantes, d'eau distillée et d'eau de fauteuils de centres de soins dentaires (Holmes *et al.*, 1977 ; Vu-Thien *et al.*, 1998 ; Molina-Cabrillana *et al.*, 2007 ; Liaqat & Sabri, 2009 ; Kampf *et al.*, 2014 ; Abdouchakour *et al.*, 2015). Des isolats humains appartenant aux quinze espèces d'*Achromobacter* sont décrits dans la littérature. Au sein des espèces décrites récemment, les espèces *A. animicus*, *A. mucicolens*, *A. spiritinus* et *A. dolens* n'ont d'ailleurs été isolées que d'échantillons humains à ce jour. Quatorze des espèces du genre *Achromobacter* ont été identifiées dans les sécrétions respiratoires de patients atteints de mucoviscidose. *A. marplatensis* n'a été isolé que chez des pa-

tients atteints de mucoviscidose et, à l'inverse, *A. piechaudii* n'a été identifié que chez des patients non atteints de mucoviscidose.

Le genre *Achromobacter* comprend des pathogènes opportunistes impliqués dans divers cas d'infections humaines. Ce sont communément des cas d'infections associées aux soins faisant généralement suite à une chirurgie ou ayant un matériel comme porte d'entrée : bactériémie sur cathéter, endocardite sur valve prothétique, péritonite chez des patients en dialyse péritonéale, ... (Aisenberg *et al.*, 2004 ; Melgosa *et al.*, 2004 ; Tena *et al.*, 2005 ; Ahmed *et al.*, 2009 ; Cankaya *et al.*, 2014 ; Hugon *et al.*, 2015). Certaines épidémies ont été décrites, ayant des liquides de soins ou de diagnostic comme sources de contamination (solutions désinfectantes, gel pour échographie, ...) (Hugon *et al.*, 2015 ; Molina-Cabrillana *et al.*, 2007 ; Olshtain-Pops *et al.*, 2011). Ainsi, ont récemment été décrites deux épidémies de bactériémies chez des patients immunocompromis, l'une en unité néonatale de soins intensifs (Turel *et al.*, 2013), l'autre en service d'oncologie-hématologie pédiatrique impliquant une souche ayant une capacité de survie accrue dans les solutions désinfectantes (Hugon *et al.*, 2015). Les cas d'infections impliquent majoritairement l'espèce *A. xylosoxidans* devant *A. denitrificans* (péritonite chez dialysés péritonéaux, abcès rénal) (Sgrella *et al.*, 2012 ; Tsai *et al.*, 2012 ; Cankaya *et al.*, 2014) et *A. piechaudii* isolée lors de bactériémies (Kay *et al.*, 2001 ; Krause *et al.*, 2012) ainsi que d'échantillons pharyngés et de plaies. Toutefois, l'identification n'a pas toujours été conduite à l'aide de méthodes moléculaires adaptées permettant de reconnaître les espèces du genre autres qu'*A. xylosoxidans*.

Le genre *Achromobacter* est considéré comme émergent chez les patients à haut risque infectieux : affections malignes, neutropéniques, brûlés, ... (Gómez-Cerezo *et al.*, 2003 ; Ng *et al.*, 2014 ; Tena *et al.*, 2014) mais aussi chez patients atteints de mucoviscidose qu'il colonise de manière chronique (Mahenthalingam, 2014) et chez lesquels sa prévalence a augmenté ces dernières années (augmentation de 8,5 à 16% de patients colonisés dans un centre italien entre 2005 et 2010 (Trancassini *et al.*, 2014)). Plusieurs études décrivent des acquisitions sporadiques suggérant une origine domestique environnementale de la bactérie ; certains cas de contaminations croisées entre patients atteints de mucoviscidose ont également été décrits (Ridderberg *et al.* 2011 ; Amoureux *et al.* 2013a ; Hansen *et al.*, 2013).

Le taux de mortalité en cas de bactériémie varie de 13,6 à 48% (Shie *et al.*, 2005 ; Turel *et al.*, 2013), la sévérité des infections étant le plus souvent attribuée au terrain débilisé de l'hôte plus qu'à la virulence de la souche, les bactéries du genre *Achromobacter* ayant pendant longtemps été considérées comme peu virulentes. Elles ont toutefois assez fréquemment la capacité à former du biofilm ; certains clones ont également associés à un déclin plus important de la fonction respiratoire que d'autres chez les patients atteints de mucoviscidose. La comparaison d'isolats environnementaux et d'échantillons respiratoires de patients atteints de mucoviscidose a permis de mettre en évidence, chez les souches cliniques, des caractéristiques génomiques particulières permettant l'adaptation à un style de vie pathogène (présence d'un système de sécrétion de type III, de toxines, ainsi qu'un « ilot polysaccharidique » pour la synthèse de capsule) (Li *et al.*, 2013). Enfin, un niveau d'inflammation similaire à celui généré par *P. aeruginosa* a été démontré chez des patients atteints de mucoviscidose et colonisés au long cours par *Achromobacter* (Hansen *et al.*, 2010).

Les bactéries du genre *Achromobacter* sont des BGN-NF droits, non sporulés, aérobies strict, mobiles grâce à une ciliature péritriche (Holmes *et al.*, 1977) mais celle-ci peut être dégénérée ne laissant subsister qu'un ou deux flagelles latéraux ou polaires. Non exigeants, ils cultivent sur différents types de milieux comme des milieux pauvres et la gélose MacConkey mais seules certaines espèces sont capables de pousser sur gélose cétrimide. Les colonies ne sont pas pigmentées et toutes les espèces sont capables de croître en présence de 1,5% de NaCl. En revanche, toutes les espèces ne cultivent pas en présence de xylose ou de 4,5% de NaCl et toutes n'assimilent pas le glucose (Vandamme *et al.* 2013a ; Vandamme *et al.*, 2013b). La recherche d'une oxydase et d'une activité catalasique sont positives. La spectrométrie de masse et le séquençage de l'ADNr 16S sont des méthodes fiables pour l'identification du genre *Achromobacter* mais trop peu discriminantes pour permettre une identification fiable de l'espèce (Almuzara *et al.*, 2015 ; Rodrigues *et al.*, 2015). Un schéma MLST pour l'identification d'espèce a été proposé en 2012 basé sur le séquençage des gènes domestiques *nrDA*, *lepA*, *nusA*, *rpoB*, *nuoL*, *eno* et *gltB* (Spilker *et al.*, 2012). Les mêmes auteurs ont publié plus récemment que le séquençage du gène *nrDA* (765bp) permettait, à lui seul, une identification d'espèce fiable au sein du genre *Achromobacter* (Spilker *et al.*, 2013). Cette approche, utilisée pour identifier les espèces isolées chez les patients atteints de mucoviscidose, a permis de préciser leur implication relative (notamment celle d'*A. insuavis* et d'*A. dolens* comparativement à *A. xylosoxidans*) dans différents pays et a révélé plusieurs espèces encore non décrites dans le genre (Coward *et al.*, 2015). Certaines approches basées sur l'amplification et le séquençage des gènes *bla_{OXA}* codant des b-lactamases de classe D considérées comme spécifiques d'espèce (*bla_{OXA-258}* et *A. ruhlandii* ; *bla_{OXA-114}* et *bla_{OXA-114}*-like et *A. xylosoxidans*) ont également été proposées pour l'identification de certaines espèces du genre (Turton *et al.*, 2011 ; Papalia *et al.*, 2013).

Le typage moléculaire d'*Achromobacter* sp. peut être effectué en utilisant le MLST, la rep-PCR ou l'électrophorèse en champ pulsé (Spilker *et al.*, 2012 ; Amoureux *et al.*, 2013a ; Dupont *et al.*, 2015). Deux études ont démontré que les résultats de typage par électrophorèse en champ pulsé étaient identiques que l'on utilise l'enzyme *SpeI* ou *XbaI* mais que les résultats obtenus étaient d'interprétation plus aisée avec *SpeI*, les profils présentant un nombre de fragments d'ADN plus faible (Dupont *et al.*, 2015 ; Ridderberg *et al.*, 2011). Une approche de multiplex-rep PCR combinant les amorces permettant d'amplifier les séquences répétées ERIC, REP et BOX est également discriminante pour comparer des isolats cliniques (Dupont *et al.*, 2015).

A. xylosoxidans et *A. denitrificans* sont naturellement résistants à de nombreuses céphalosporines (céfalotine, céfoxitime, céfuroxime, céfotaxime, ceftriaxone, céfépime), à l'aztréonam, aux aminosides, au triméthoprim, à la fosfomycine, ainsi qu'à certaines quinolones (Philippon, 2006). Ainsi, le phénotype sauvage de ces espèces d'*Achromobacter* vis-à-vis des b-lactamines se caractérise par une sensibilité aux pénicillines (ticarcilline et pipéracilline notamment), à la ceftazidime, au moxalactam et à l'imipénème, et une résistance aux céphalosporines citées ci-dessus, un phénotype relativement rare, également observé pour *Bordetella bronchiseptica*. La b-lactamase de classe D OXA-114 produite par *A. xylosoxidans* ne semble pas jouer un rôle majeur dans la résistance naturelle de cette espèce aux b-lactamines (Doi *et al.*, 2008). Une sensibilité naturelle à la cipro-

floxacin et à l'association triméthoprim-sulfaméthoxazole est également notée.

La résistance acquise est largement rapportée chez *Achromobacter* par production de différentes b-lactamases plasmidiques ou transposables (CARB, PSE, ...) mais aussi par hyperproduction de la b-lactamase naturelle. Des isolats multirésistants présentant une résistance à la ceftazidime et à l'imipénème sont aussi décrits, notamment chez les patients atteints de mucoviscidose, compliquant encore les options thérapeutiques (Yamamoto *et al.*, 2012 ; El Salabi *et al.*, 2012). Ainsi, une souche isolée d'un patient atteint de mucoviscidose possédant une b-lactamase à spectre étendu (BLSE) transférables de type VEB-1, ainsi que des souches produisant des métallo-β-lactamases transférables de classe B, comme IMP-1, IMP-2, IMP-10 ou VIM-1, déjà identifiées chez *P. aeruginosa*, ont été décrites (Riccio *et al.*, 2001 ; Iyobe *et al.*, 2002 ; Sofianou *et al.*, 2005). Les mécanismes de résistance naturelle et acquise aux autres familles d'antibiotiques, ainsi que ceux présentés par les autres espèces du genre sont encore peu explorés.

Les agents considérés comme les plus actifs sur *Achromobacter* spp. sont la pipéracilline-tazobactam, le mérépénème et le triméthoprim-sulfaméthoxazole. Concernant les céphalosporines, la ceftazidime est plus active que le céfépime mais plusieurs études rapportent des résistances élevées d'*A. xylosoxidans* à la ceftazidime chez les patients atteints de mucoviscidose et il est probable que l'exposition fréquente de ces patients à cette molécule prescrite contre *P. aeruginosa* soit à l'origine de ces résistances (Saiman *et al.*, 2001 ; Barrado *et al.*, 2013). Les aminosides, les fluoroquinolones, la fosfomycine et l'aztréonam ont tous une activité médiocre sur ce genre. Les tétracyclines ont une activité variable mais sont vulnérables aux pompes à efflux et, au sein de cette classe, la tigécycline a très peu d'effet (Abbott & Peleg, 2015).

Il n'y a pas de thérapie optimale pour traiter les infections à *Achromobacter* sp. Les infections pulmonaires sont difficiles à traiter ; néanmoins, les souches répondent généralement bien aux pénicillines à spectre étendu comme la ticarcilline et la pipéracilline, ainsi qu'aux céphalosporines (Swenson & Sadikot, 2015). Au vu de toutes les résistances possiblement acquises venant se surajouter aux résistances naturelles, la réalisation d'un antibiogramme pour déterminer ou ajuster le traitement d'une infection à *Achromobacter* sp. est nécessaire. Une association d'antibiotiques est recommandée pour le traitement des exacerbations pulmonaires à *Achromobacter* sp. chez les patients atteints de mucoviscidose (Gibson *et al.*, 2003) et l'utilisation simultanée d'antibiotiques inhalés, comme la colistine, peut également être envisagée (Biswas *et al.*, 2013).

l'eau d'un lac, et une d'un bambou. Les 23 génomes disponibles correspondent aux espèces suivantes : *Pandoraea pnomenusa* (n=8), *Pandoraea apista* (n=5), *Pandoraea* sp. (n=3), *Pandoraea pulmonicola* (n=1), *Pandoraea norimbergensis* (n=1), *Pandoraea faecigallinarum* (n=1), *Pandoraea thiooxydans* (n=1), *Pandoraea oxalativorans* (n=1), *Pandoraea vervacti* (n=1) and *Pandoraea sputorum* (n=1). Les bactéries de ce genre sont capables de croître sur les géloses sélectives pour les bactéries du CBC et une erreur d'identification peut potentiellement survenir si des tests moléculaires ne sont pas utilisés (Coenye et al. 2000; Pimentel and MacLeod 2008). L'identification des bactéries de ce genre est réellement compliquée et de nombreux isolats ont été incorrectement identifiés soit au niveau du genre, soit au niveau de l'espèce selon la méthode utilisée (Ambrose et al. 2016). Bien que l'épidémiologie des bactéries de ce genre ne soit pas connue, du fait de la faible prévalence de ces bactéries dans la population CF, *P. apista* et *P. pulmonicola* sont les espèces majoritairement identifiées chez les patients CF aux Etats-Unis et en Irlande respectivement (Costello et al. 2011; Lipuma 2010).

Parmi les pathogènes émergents dans la mucoviscidose, *Pandoraea* est le seul genre avec *Burkholderia* (*Burkholderia gladioli*) défini comme pathogène et associé à un faible espoir post-transplantation pulmonaire (Mahenthalingam 2014; Stryjewski et al. 2003). Neuf cas de bactériémies ont été rapportés, et seulement un de ces cas concernait un patient CF (Coenye et al. 2000; Daneshvar et al. 2001; Johnson et al. 2004; Pimentel and MacLeod 2008; Stryjewski et al. 2003; Woods et al. 2004). La bactériémie observée chez le patient CF a fait suite à une candidémie et l'espèce identifiée était *P. apista*, néanmoins, seule la région V3 de l'ADNr 16S avait été séquencé (Johnson et al. 2004). Une étude récente a relié une exacerbation pulmonaire d'un patient CF à la primocolonisation concomitante par une bactérie du genre *Pandoraea* (Pugès et al. 2015). En France, le premier cas clinique a été rapporté en 2013 chez un patient CF (Kokcha et al. 2013). Les bactéries de ce genre sont capables de coloniser chroniquement les VRCF et récemment une transmission croisée de *P. pulmonicola* entre un patient colonisé chroniquement et cinq autres patients CF suivis dans le même centre a été décrite (Degand et al. 2015; Ee et al. 2015; Jørgensen et al. 2003; Kokcha et al. 2013; Martínez-Lamas et al. 2011). Le suivi de ces patients a montré que 3 patients sont décédés, qu'un autre a présenté un déclin des fonctions respiratoires tandis que les deux autres patients sont restés cliniquement stables ; cependant, ces patients étant tous également colonisés par *P. aeruginosa*, la part attribuable à *P. pulmonicola* dans le déclin pulmonaire n'était pas quantifiable (Degand et al. 2015). Les bactéries de ce genre sont typiquement multirésistantes aux antibiotiques, néanmoins, les souches sont généralement sensibles à l'imipenem et au cotrimoxazole (Green and Jones 2015; Johnson et al. 2004; Martínez-Lamas et al. 2011). Des gènes de virulence connus dans le genre *Burkholderia* ont été identifiés dans le génome de la souche type de *P. apista* (Lipuma 2010). Il s'agit de gènes codant pour les flagelles, l'adhésion cellulaire, la capsule et les systèmes de sécrétion de type III et IV (Millard et al. 2015). D'autres part, le séquençage total de génome de deux isolats environnementaux a montré que ces souches étaient capables de produire des molécules de QS (Ee et al. 2014). *P. pulmonicola* est décrite comme la plus virulente du genre, avec une virulence expérimentale dans le modèle *Galleria mellonella* égale ou supérieure à celle de *Burkholderia cenocepacia* J2315 (Costello et al. 2011). C'est la seule espèce isolée d'échantillons biologiques

humains qui peut *in vitro* former du biofilm et envahir les cellules épithéliales pulmonaires et qui est capable de translocation à travers l'épithélium respiratoire (que ce soient des souches CF ou non). Lors d'un épisode de colonisation chronique, un isolat tardif de cette espèce a montré une augmentation très significative de virulence comparé à un isolat précoce (Caraher et al. 2008).

D'autre part, les patients colonisés chroniquement développent une réponse immunitaire adaptative spécifique et une étude ayant identifié des anticorps dirigés contre *Pandora* chez 6 patients a montré que 4 de ces patients ont présenté un déclin de la fonction pulmonaire plus rapide que ce qui était attendu lors des mesures précédentes de la fonction respiratoire (Jørgensen et al. 2003). Enfin, il a été démontré que les espèces de *Pandora* induisent une synthèse importante d'Interleukine 6 et d'Interleukine 8 par l'hôte, mécanisme de virulence inhérent à ce genre contribuant probablement à sa pathogénicité (Caraher et al. 2008). En effet, les bactéries du genre *Pandora* peuvent induire une réponse pro-inflammatoire plus importante que *P. aeruginosa* (Costello et al. 2014). Néanmoins, en présence de *P. aeruginosa*, cette réponse pro-inflammatoire est significativement réduite. En effet, le surnageant de culture de *P. aeruginosa* peut inhiber la croissance de bactéries du genre *Pandora* indiquant que l'inhibition ne serait pas due à un facteur sécrété par *P. aeruginosa* en réponse à la présence de *Pandora* (Costello et al. 2014). Cette compétition en faveur de *P. aeruginosa* ne semble pas générale car il a été décrit pour deux patients un remplacement apparent de *P. aeruginosa* lors de l'établissement d'une colonisation chronique par *Pandora apista* (Jørgensen et al. 2003).

Concernant l'évolution génomique au cours de la colonisation chronique, des études d'isolats de *Pandora apista* et *Pandora sputorum* utilisant des techniques d'ECP et de rep-PCR ont montré une stabilité des profils au cours du temps (Atkinson et al. 2006; Fernández-Olmos et al. 2012a). De plus, le séquençage total des génomes de deux isolats de *P. sputorum* provenant d'un même patient à 11 mois d'intervalle n'a pas montré de différence significative entre ces deux souches. En revanche, ces deux isolats cliniques présentaient 152 gènes codant principalement pour des facteurs de virulence non décrits dans le génome d'une souche environnementale de *P. sputorum* (Ee et al. 2015). Les bactéries appartenant au genre *Pandora* sont donc considérées comme émergentes dans la mucoviscidose et leur pouvoir pathogène semble non négligeable. Néanmoins, les phénomènes d'adaptation et d'évolution de ces bactéries dans les VRCF sont très peu étudiés.

III.3. Identification des bactéries appartenant aux genres *Achromobacter* et *Pandora*

Ces dernières années, de nombreux pathogènes considérés comme émergents ont été rapportés dans le contexte de la mucoviscidose et certains présentent la capacité de persister dans les VRCF (Mahenthalingam 2014). Nombre de ces pathogènes, et parmi eux *Achromobacter* spp. et *Pandora* spp., peuvent être mal identifiés au laboratoire de microbiologie médicale (Hogardt et al. 2009; Van daele et al. 2005). Malgré l'avènement de nouvelles techniques d'identification, l'identification d'espèces voire de genres d'intérêt dans la mucoviscidose reste un défi. De plus, les souches adaptées aux VRCF présentent des modifications phénotypiques et métaboliques

compliquant leur identification, particulièrement lors de l'utilisation de tests biochimiques (Ferroni et al. 2003).

La technique d'identification bactérienne par spectrométrie de masse, Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation - Time-Of-Flight (MALDI-TOF) a pris place dans les laboratoires d'analyse français depuis environ 5 ans. Cette technique rapide actuellement utilisée en routine dans de nombreux laboratoires permet un gain de temps dans l'identification et la prise en charge des infections. Elle améliore l'identification des espèces de bactéries atypiques associées aux VRCF (Fernández-Olmos et al. 2012b). Néanmoins, les bases de données des différents systèmes actuellement commercialisées ne sont pas équivalentes et sont le plus souvent incomplètes, notamment si l'on considère les genres de bactéries émergentes ou « atypiques » au cours de la mucoviscidose. En ce qui concerne le genre *Achromobacter*, les espèces étant très proches, l'identification au niveau de l'espèce n'est pas certaine (Gomila et al. 2014). Concernant *Pandoraea*, des auteurs ont rapporté qu'un isolat identifié *P. apista* (score>2) avec une base de données avait été identifié *P. pnomenusa* (score>2) un an après avec une autre base de données (Ambrose et al. 2016). Concernant les méthodes moléculaires, le gène de l'ARNr 16S est reconnu pour être très conservé entre les espèces et pour permettre une identification fiable : néanmoins, pour certaines espèces au sein de genres comme *Achromobacter* et *Pandoraea*, ce gène peut s'avérer trop peu discriminant avec seulement une paire de base de différence entre deux espèces (Coenye et al. 2004; Gomila et al. 2014).

La taxonomie instable d'*Achromobacter* et *Pandoraea* avec des reclassifications et des descriptions fréquentes de nouvelles espèces complique encore l'identification de ces bactéries. Par exemple, très récemment, l'espèce *Pandoraea terrae* a été décrite, trois nouvelles espèces ont été décrites à partir de souches anciennement comprises dans l'espèce *Achromobacter denitrificans* : *A. agilis*, *A. pestifer*, *A. kerstersii* et *A. deleyi* tandis que l'espèce *Achromobacter spiritinus* a été fusionnée à l'espèce *A. marplatensis* (Gomila et al. 2014; Jeong et al. 2016; Vandamme et al. 2016a, 2016b). Dans ce contexte et face aux soucis d'identification fiable au niveau de l'espèce par les méthodes citées précédemment, l'utilisation de gènes alternatifs est nécessaire, et des approches de multilocus sequence typing (MLST) basée sur le séquençage de 7 gènes domestiques ont été proposées. Pour *Achromobacter*, un schéma MLST basé sur le séquençage des gènes *nrdA*, *nuoL*, *gltB*, *eno*, *nusA*, *rpoB* et *lepA* a été proposé en 2012 (Spilker et al. 2012). Son application à 28 souches identifiées *A. xylooxidans* par MALDI-TOF, a permis de révéler que 9 de ces souches appartenaient en fait à l'espèce *A. rhulandii*, une à *A. dolens* et une autre à *A. insuavis* (Rodrigues et al. 2015). Outre l'identification d'espèces ayant des séquences d'ADNr 16S proches, le MLST permet également l'identification et la comparaison de génotypes au sein d'une espèce. Par la suite, il a été montré que le séquençage du gène *nrdA* permettait, à lui seul, une identification fiable de l'espèce (Spilker et al. 2013). Concernant le genre *Pandoraea*, aucun schéma MLST n'a été publié; en revanche, le séquençage du gène *gyrB* ou du gène *bla_{OXA}* a été proposé pour l'identification de l'espèce (Coenye and LiPuma 2002; Schneider and Bauernfeind 2015). Toute étude nécessite donc une étape d'identification précise, afin de décrire le plus fidèlement possible l'épidémiologie des colonisations des VRCF par les bactéries opportunistes émergentes.

**CONTEXTE & OBJECTIFS
DU TRAVAIL EXPERIMENTAL**

Au cours de la synthèse bibliographique, nous avons pu constater que, quel que soit l'environnement étudié, des phénomènes d'évolution adaptative sont fréquemment observés dans le domaine *Bacteria*. Les variations des conditions environnementales peuvent entraîner la formation de nouveaux écotypes, mieux adaptés aux nouvelles conditions. Nous avons également observé que le comportement pathogène des bactéries environnementales opportunistes est complexe, souvent de nature écologique ou adaptative, et très différent des mécanismes de virulence, souvent de nature biochimique, connus pour les pathogènes obligatoires. D'autre part, une fois que le contact est établi, les relations entretenues avec l'homme peuvent être de différentes natures, allant du portage à l'infection, influencées par différents paramètres.

Dans le cadre de la mucoviscidose, toutes les études s'accordent à dire que des mécanismes d'adaptation sont mis en place au cours du temps par les bactéries colonisant chroniquement le tractus respiratoire des patients, représentant un habitat très particulier. En effet, au cours de la persistance, des mutations dans les gènes patho-adaptatifs mènent à des génotypes / phénotypes mieux adaptés à l'environnement pulmonaire. Récemment, des études de population ont mis en évidence une forte diversité génomique et phénotypique au sein de souches clonales colonisant les VRCF suggérant la présence d'écotypes adaptés aux différentes conditions de cet habitat hétérogène. Dans ce contexte, les travaux de recherche portent presque exclusivement sur le pathogène majeur dans cette pathologie, *P. aeruginosa*, et relient adaptation à la niche et morbidité. Néanmoins, ces dernières années, l'épidémiologie de la colonisation bactérienne respiratoire des patients CF à travers le monde a changé. En effet, des bactéries opportunistes environnementales émergentes sont décrites et certaines possèdent, comme *P. aeruginosa*, la capacité de coloniser chroniquement les VRCF. Ces bactéries sont généralement multirésistantes aux antibiotiques et leur éradication est difficile dès la colonisation initiée. Peu d'études se sont intéressées à ces pathogènes émergents et les connaissances des phénomènes d'adaptation à l'habitat pulmonaire CF mis en œuvre au cours de la colonisation chronique et de leur impact sur le statut clinique des patients sont très modestes. Comme pour *P. aeruginosa*, l'acquisition de ces pathogènes est généralement considérée comme d'origine environnementale bien que leur écologie ne soit pas réellement connue. Comme nous l'avons vu, les genres *Achromobacter* et *Pandoraea* présentent un intérêt particulier parmi les pathogènes émergents associés à la mucoviscidose.

Comme illustré dans la synthèse bibliographique, j'ai participé à la rédaction d'un chapitre de livre sur les bacilles à Gram négatif non fermentants.

Chapitre de livre

Dupont C., Jumas-Bilak E., Marchandin H. « Précis de bactériologie clinique » 3^e Edition. Bacilles à Gram négatif non fermentants divers. Riegel P. Eska. A paraître.

Parmi les 197 patients suivis au Centre de Ressources et de Compétences de la Mucoviscidose (CRCM) du Languedoc-Roussillon au moment de notre étude, 12 patients étaient colonisés chroniquement par des bactéries appartenant au genre *Achromobacter* et un patient était colonisé chroniquement par une bactérie du genre *Pandoraea*.

L'objectif principal de ce travail est d'étudier la diversité et l'évolution adaptative au cours de la persistance au sein de divers habitats de pathogènes opportunistes considérés comme émergents dans la mucoviscidose.

Pour cela, notre travail est structuré en objectifs secondaires complémentaires.

Objectif 1

Connaître l'épidémiologie des bactéries du genre *Achromobacter* au CRCM de Montpellier.

Le travail correspondant n'a pas été intégré à la thèse sous forme d'article ; tous les résultats sont présentés dans la partie expérimentale. Ce travail s'est intégré dans le cadre de la participation à une étude nationale sur l'épidémiologie d'*Achromobacter* coordonnée par le laboratoire de bactériologie du CHU de Dijon.

Objectif 2

Mettre en évidence des témoins d'adaptation au cours de la persistance dans les VRCF des pathogènes opportunistes émergents *Achromobacter* et *Pandoraea* et tenter de relier certains phénomènes d'adaptation à l'évolution du statut clinique du patient.

Les résultats ont fait l'objet d'une publication internationale, de la soumission d'une publication, d'une communication internationale et deux communications nationales :

Publication acceptée

Dupont C., Michon A.-L., Jumas-Bilak E., Nørskov-Lauritsen N., Chiron R., & Marchandin H. (2015). Inpatient diversity of *Achromobacter* spp. involved in chronic colonization of Cystic Fibrosis airways. *Infection, Genetics and Evolution*. 32 : 214-223.

Publication soumise

Dupont C., Aujoulat F, Chiron R, Condom P., Jumas-Bilak E., Marchandin H. Highly diversified *Pandoraea* population during chronic colonization in Cystic Fibrosis: a key to persistence. soumise à *Frontiers in Microbiology*.

Communications

Dupont C., Chiron R., Aujoulat F., Condom P., Jumas-Bilak E., Marchandin H. Phenotypic and genotypic variability of *Pandoraea pulmonicola* during chronic colonization is associated to microbiota composition shift and pulmonary exacerbation. 29th Annual North American Cystic Fibrosis Conference, October, 2015, Phoenix, Arizona, USA.

Dupont C., Michon A.L., Chiron R., Jumas-Bilak E., Marchandin H. Modifications génotypiques adaptatives au cours de la colonisation chronique des voies respiratoires des patients atteints de mucoviscidose par les pathogènes environnementaux du genre *Achromobacter*. Congrès de l'Association Francophone d'Ecologie Microbienne AFEM, Octobre 2013, Parent, France, 4^{ème} prix du meilleur poster

Dupont C., Michon A.L., Nørskov-Lauritsen N., Chiron R., Jumas-Bilak E., Marchandin H. Persistance et variabilité d'*Achromobacter insuavis* et *Achromobacter dolens* dans les voies respiratoires au cours de la mucoviscidose. Congrès de la Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse, RICAI, Novembre 2014, Paris, France

Objectif 3

Décrire la diversité génotypique et phénotypique de populations persistantes d'*Achromobacter* au sein des VRCF à un temps donné et analyser l'impact de cette diversité sur la prise en charge thérapeutique des patients.

Ce travail a mené à la rédaction d'un article international:

Publication acceptée

Dupont C., Jumas-Bilak E., Chiron R, Marchandin H. High diversity of *Achromobacter* spp. populations within Cystic Fibrosis sputum samples impacts antimicrobial susceptibility testing results. *Journal of Clinical Microbiology*. 55 : 1.

Objectif 4

Préciser l'écologie des bactéries du genre *Achromobacter* au domicile de patients colonisés chroniquement par des bactéries de ce genre, étudier la diversité des populations environnementales domestiques et préciser les liens épidémiologiques entre l'environnement domestique et les patients.

Le travail correspondant n'a pas été intégré à la thèse sous forme d'article ; néanmoins, tous les résultats sont présentés dans la partie expérimentale. Une partie des résultats a été présentée sous forme d'une communication orale:

Communication orale :

Réunion bisannuelle du Centre de Ressources et de Compétences de la Mucoviscidose (CRCM) CHRU de Montpellier. Recherche environnementale domestique de bactéries du genre *Achromobacter*. Mai 2016, Montpellier, France.

Dupont C.

Objectif 5

Etudier les mécanismes d'adaptation et la dynamique de colonisation de bactéries du genre *Achromobacter* lors de la persistance environnementale au sein d'une niche technologique soumise à de fortes contraintes.

Les résultats ont fait l'objet d'une publication internationale et d'une communication orale :

Publication acceptée

Abdouchakour F., **Dupont C.**, Grau D., Aujoulat F., Mourmetas P., Marchandin H., Parer S., Gibert P., Valcarcel J., Jumas-Bilak E. (2015). Clonal selections of *Pseudomonas aeruginosa* and *Achromobacter* sp. lead to successive colonization waves of water contamination in dental care units. *Applied and Environmental Microbiology*. 81 : 7509-7524

Communication orale

Journée des doctorants IM2E (Montpellier, Mars 20015) : Emergence, compétition et colonisation bactérienne dans l'eau de fauteuils dentaires.

Dupont C., Abdouchakour F., Grau D., Aujoulat F., Parer S., Valcarcel J., Marchandin H., Jumas-Bilak E.

L'ensemble des résultats sera discuté en termes de succès infectieux, de diversité, dynamique et de persistance et de relations hôte/pathogène permettant *in fine* de considérer leur rôle au sein de pathobiomes, un concept émergent dans le domaine de l'infectiologie.

Le concept de pathobiome est un support intéressant de réflexion dans le cadre de la mucoviscidose et a fait l'objet d'un chapitre de livre ainsi que d'une communication à un congrès international.

Chapitre de livre

Romano-Bertrand S., **Dupont C.**, Marchandin H., Jumas-Bilak E. and Licznar-Fajardo P. 2015. « The Battle Against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs ». Reducing pathobiomes could slow arms race between man and microbes. A. Méndez-Vilas <http://www.microbiology5.org/vol1.html>.

Communication

Dupont C., Aujoulat F., Michon A.L., Romano-Bertrand S., Nørskov-Lauritsen N., Chiron R., Jumas-Bilak E., Marchandin H. Pathobiome : a valuable concept in Cystic Fibrosis, Pathobiome congress, Juin 2015, Paris, France

PARTIE I
EPIDEMIOLOGIE DES BACTERIES DU GENRE
***ACHROMOBACTER* AU CRCM DE MONTPELLIER**

I Introduction

Du fait des difficultés d'identification précise des espèces d'*Achromobacter*, l'épidémiologie de ces pathogènes émergents reste mal connue. Les taux de prévalence des bactéries du genre *Achromobacter* dans les différents centres CF varient entre 3 et 30%, la majorité des taux rapportés oscillant autour de 10% (Amoureux et al. 2016a; Cools et al. 2016; De Baets et al. 2007; Kanellopoulou et al. 2004a; Raso et al. 2008; Ridderberg et al. 2011). D'autre part, les différentes études de prévalence des bactéries de ce genre chez les patients CF ont montré une augmentation de ces taux au cours du temps. Par exemple, un centre au Danemark a rapporté une augmentation de prévalence de 6% à 10% entre 2005 et 2009 (Ridderberg et al. 2011) et en Italie, un centre a observé que la prévalence des bactéries de ce genre avait presque doublé entre 2005 et 2010, passant de 8,9 à 16% (Trancassini et al. 2014).

Dans certains centres, des génotypes d'*Achromobacter* partagés par plusieurs patients ont été décrits, suggérant des transmissions croisées ou des sources de contaminations communes (Hansen et al. 2013; Magni et al. 2010; Trancassini et al. 2014 ; Van daele et al. 2005). Ces sources sont toutefois rarement identifiées dans le cadre de la mucoviscidose, comparé aux infections associées aux soins impliquant ce pathogène chez des patients non CF (Amoureux et al. 2016a; Cools et al. 2016; Kanellopoulou et al. 2004a; Krzewinski et al. 2001). Dans ce contexte, il nous a paru intéressant d'identifier précisément, en utilisant des méthodes moléculaires adaptées, les espèces et génotypes d'*Achromobacter* isolées des VRCF de patients de notre centre afin de connaître la prévalence des bactéries de ce genre, d'étudier la diversité d'espèces chez les patients colonisés et d'identifier de possibles partages de génotypes bactériens entre patients. De plus, connaître les taux de colonisations sporadiques, intermittentes et chroniques préciserait les types de relations hôtes-bactéries établies entre *Achromobacter* et les patients de notre centre.

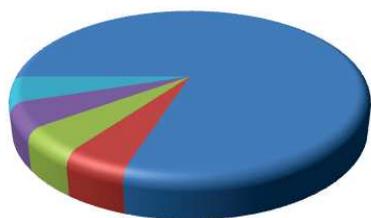
Dans ce cadre, nous avons participé à une étude épidémiologique nationale des bactéries du genre *Achromobacter* colonisant les patients CF, étude coordonnée par le laboratoire de bactériologie du CHU de Dijon. Durant l'année 2014 et pour chaque patient du CRCM de Montpellier, les isolats de chaque premier échantillon positif à *Achromobacter* ont été analysés. L'étude prévoyait le séquençage du gène *nrpA*, ayant été décrit comme le plus discriminant du schéma MLST pour identifier l'espèce ; toutefois, nous avons souhaité séquencer les 7 gènes du schéma MLST afin d'identifier les différents génotypes de chaque espèce (Spilker et al. 2012, 2013). De plus, nous avons confronté les séquences des souches des patients du CRCM de Montpellier à celles présentes dans la base de données internationale PubMLST afin de comparer les génotypes obtenus à ceux déjà décrits, qu'ils soient d'origine CF, non CF ou environnementale.

Tableau 1 Génotypes (ST) identifiés pour les 37 souches correspondant aux premiers isolats de 2014 de 20 patients suivis au CRCM du CHU de Montpellier. Les cases grisées représentent les nouveaux allèles et nouveaux STs que nous avons déposés. Les cases de couleurs représentent les STs partagés entre les souches de différents patients.

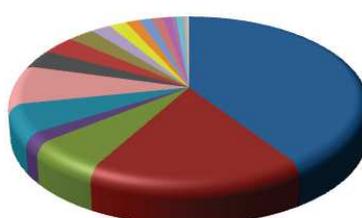
La correspondance des N° de patients avec l'étude de Dupont et al. 2015 est donnée en seconde colonne. S = sporadique, I = intermittente, C = chronique, ST = sequence type, MLST = multilocus sequence typing.

Patient de l'étude	Patient (Dupont et al. 2015)	type de colonisation	N° souche	Numéro d'allèle des 7 gènes du schéma MLST							ST (MLST)
				<i>nusA</i>	<i>rpoB</i>	<i>eno</i>	<i>gltB</i>	<i>lepA</i>	<i>nuoL</i>	<i>nrdA</i>	
A. xylosoxidans											
P1	P5	C	1 n°79	14	26	2	2	59	13	3	ST 27
			1 n°80								
			1 n°81								
P2	P4	C	2 n°31	1	21	1	4	62	8	2	ST 323
			2 n°32								
P3	-	S	3 n°52	1	115	2	2	62	8	2	ST 324
P4	-	S	4 n°76	6	93	2	2	62	8	1	ST 325
P5	P11	C	5 n°32	1	26	2	4	59	2	5	ST 2
			5 n°33								
P6	-	S	6 n°20	1	26	2	2	86	4	2	ST 175
			6 n°21								
			6 n°22								
P7	P6	C	7 n°28	1	26	7	2	59	3	2	ST 5
			7 n°29								
			7 n°30								
P8	-	S	8 n°48	10	43	6	2	65	5	7	ST 22
P10	P7	C	10 n°39	14	26	2	2	59	13	3	ST 27
P11	-	I	11 n°25	4	40	2	4	62	8	2	ST 290
			11 n°26								
			11 n°27								
P13	P3	C	13 n°38	2	118	2	2	116	8	2	ST 326
P14	P12	C	14 n°71	7	119	8	2	59	4	1	ST 327
			14 n°72								
P16	P8	C	16 n°35	1	115	2	2	62	8	2	ST 324
			16 n°36								
			16 n°37								
P17	-	S	17 n°73	64	39	2	1	59	4	2	ST 137
P19	-	S	19 n°33	1	26	2	2	59	8	2	ST 180
			19 n°34								
P20	P2	C	20 n°67	9	40	2	4	59	8	2	ST 328
			20 n°68								
			20 n°69								
A. mucicolens											
P12	-	S	12 n°70	115	117	31	86	18	39	105	ST 330
A. insuavis											
P18	-	S	18 n°40	28	51	86	18	57	93	19	ST 331
A. aegrifaciens											
P21	-	S	21 n°69	116	20	41	31	117	28	29	ST 332
			21 n°70			39	87	31		106	
Achromobacter sp.											
P9	-	S	9 n°66	114	116	97	85	115	31	104	ST 329

A



B



- *A. xylosoxidans*
- *A. aegrifaciens*
- *Achromobacter sp.*
- *A. dolens*
- *A. spanius*
- *A. marplatensis*
- *A. deleyi*
- *A. animicus*
- *A. denitrificans*
- *A. agilis*
- *A. insuavis*
- *A. mucicolens*
- *A. ruhlandii*
- *A. insolitus*
- *A. peichaudii*
- *A. pulmonis*
- *A. kerstersii*
- *A. anxifer*
- *A. pestifer*

Figure 12 Espèces d'*Achromobacter* déterminées par MLST.

A) Espèces identifiées pour les 1ers isolats de 2014 de 20 patients suivis au CRCM du CHU de Montpellier
 B) Espèces présentes dans la base de donnée PubMLST en septembre 2016

II Matériels et Méthodes

II.1 Recueil des souches

Les souches d'*Achromobacter* étudiées ont été obtenues lors d'analyses de routine d'échantillons broncho-pulmonaires (majoritairement obtenus par expectoration spontanée) de patients atteints de mucoviscidose consultant au CRCM du CHU de Montpellier. Au laboratoire de bactériologie du CHU de Montpellier, les échantillons sont ensemencés sur plusieurs milieux riches et sélectifs et les bactéries obtenues en culture, sont identifiées à l'aide du spectromètre de masse MALDI-TOF Microflex™ LT (Bruker Daltonics) et de la base de données MALDI Biotyper® DB-5627 MSP list (Bruker Daltonics). Une colonie par morphotype est ré-isolée et identifiée puis la culture du ré-isolément est congelée pour conservation à -80 °C dans un bouillon de congélation contenant du glycérol. Pour chaque échantillon, une colonie de chaque morphotype a été étudiée.

II.2 Multilocus sequence typing (MLST)

Pour chaque souche, 7 gènes domestiques (*nusA*, *rpoB*, *eno*, *gltB*, *lepA*, *nuoL* et *nrdA*) ont été amplifiés par PCR selon la méthode de Spilker *et al.* (Spilker *et al.* 2012) et séquencés. L'extraction d'ADN, l'amplification et le séquençage sont décrits dans l'article 1 : « Inpatient diversity of *Achromobacter* spp. involved in chronic colonization of Cystic Fibrosis airways » (Dupont *et al.* 2015). Les séquences sont ensuite alignées au codon à l'aide du logiciel ClustalW implémenté dans BioEdit® puis comparées aux séquences des allèles déposés dans la base de données internationale PubMLST (<http://pubmlst.org/>). Pour une souche donnée, la combinaison des allèles de chacun des 7 gènes, donne un code qui correspond à un numéro de ST (Séquence Type). Chaque ST est affilié à une espèce. Pour les STs non connus de notre étude, nous nous sommes basés sur le gène *nrdA* qui est le plus discriminant afin de déterminer l'espèce en cause (Spilker *et al.* 2013). Les STs différant par seulement un ou deux allèles sont associés en complexes clonaux.

III Résultats

III.1 Diversité d'espèces

Au total, nous avons étudié 40 souches provenant des échantillons de 20 patients.

Pour 9 patients, un seul morphotype colonial a été observé après culture de l'échantillon tandis que pour 11 patients, 2 ou 3 morphotypes étaient identifiés par échantillon. Parmi les 20 patients, 9 étaient colonisés chroniquement¹⁴ et sont inclus dans l'article 1 présenté dans la partie expérimentale

¹⁴ Trois cultures positives par an, séparées par au moins un mois d'intervalle, pendant au moins 2 ans

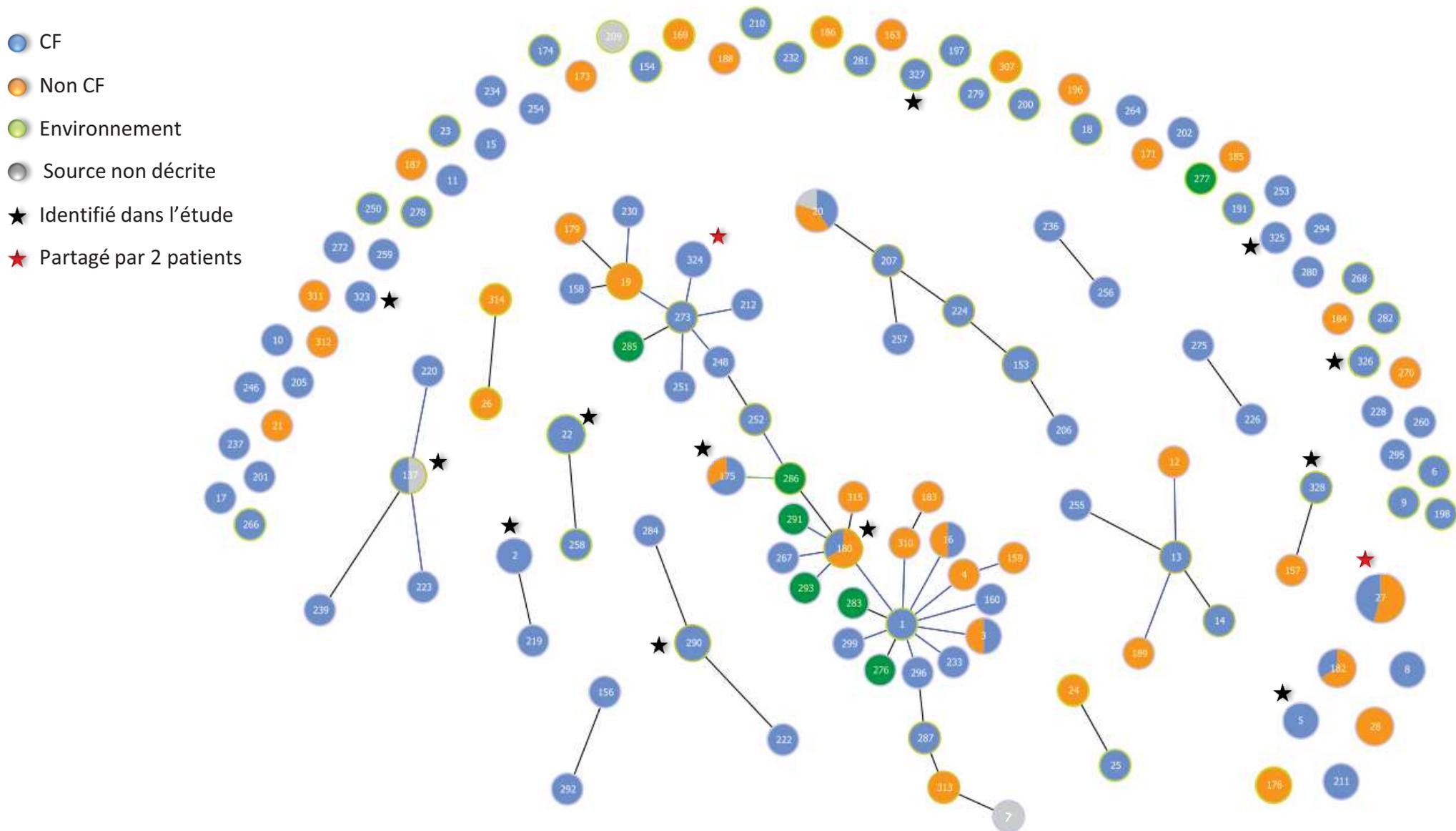


Figure 13 Représentation goeBURST basée sur les données MLST de PubMLST et des 1^{ers} isolats d'*A. xylosoxidans* de 2014 de 16 patients suivis au CRCM du CHU de Montpellier selon la source d'isolement.

Les STs sont groupés en fonction de leur profils alléliques. Chaque cercle correspond à un ST et le nombre dans le cercle correspond à la désignation du ST dans la base de données PubMLST. La taille de chaque cercle est proportionnelle au nombre d'isolat déposé pour chaque ST. Les liaisons entre les STs correspondent à de simples ou doubles variations de locus entre ces STs qui sont alors regroupés en complexes clonaux.

suivante de ce manuscrit (Tableau 1). Parmi les 11 patients restants, 10 étaient colonisés sporadiquement¹⁵ et 1 était colonisé de façon intermittente¹⁶ (Lambiase et al. 2011).

Au total, nous avons observé 5 espèces différentes : 16 patients (80%) étaient colonisés par *A. xylosoxidans* et 4 patients étaient colonisés respectivement par *A. insuavis*, *A. mucicolens*, *A. aegrifaciens* et une espèce non décrite (Tableau 1). Les espèces *A. xylosoxidans*, *A. insuavis* et *A. aegrifaciens* sont les espèces majoritairement déposées dans PubMLST. Néanmoins, nous n'avons pas identifié l'espèce *A. ruhlandii*, qui est la 4^{ème} majoritairement déposée dans la base de données (Figure 12). Nous pouvons noter que les espèces non décrites sont en 5^{ème} position pour la prévalence dans la base de données, suggérant que de nombreuses espèces d'*Achromobacter* restent à décrire (Figure 12).

III.2 Diversité des génotypes au sein d'une espèce

Parmi les souches isolées des 16 patients colonisés par *A. xylosoxidans*, nous avons mis en évidence 14 ST différents. Neuf patients (56%) étaient colonisés par des souches de 8 STs connus. Parmi les 7 patients colonisés par un ST inconnu, 3 étaient colonisés par des souches présentant des combinaisons nouvelles d'allèles connus (P2, P4 et P20), et 4 étaient colonisés par des souches présentant un ou plusieurs allèles inconnus (P3, P13, P14 et P16) (Tableau 1). Ces nouveaux STs ont été déposés dans la base de données PubMLST et un numéro leur a été attribué (ST323 à ST333) (<http://pubmlst.org/>).

Parmi les 8 STs connus (9 patients), 6 faisaient partie d'un complexe clonal et parmi ceux-ci, 2 STs (ST180 et ST252) appartenaient au complexe clonal majoritaire qui relie entre eux 34 STs parmi les 135 STs déposés (Figure 13). Les 2 STs connus restants (ST5 et ST27) n'appartenaient pas à un complexe clonal.

Parmi les 6 nouveaux STs d'*A. xylosoxidans*, le ST324 appartient au complexe clonal majoritaire, le ST328 forme un complexe clonal avec le ST157 déjà déposé, tandis que les 4 autres STs n'appartiennent pas à un complexe clonal.

Deux paires de patients ont présenté dans leurs VRCF des souches d'*A. xylosoxidans* de ST identiques :

- Deux patients colonisés chroniquement et sporadiquement étaient colonisés par une souche de ST inconnu nommé ST324, faisant partie du complexe clonal majoritaire (Figure 13).
- Deux patients étaient colonisés chroniquement par des souches de ST27 (correspondance article 1 : patient 5 et patient 7), nous pouvons affirmer grâce aux résultats de l'analyse par ECP conduite dans notre étude (Dupont et al. publiée en 2015) que les souches de ces deux patients sont différentes. Le ST27 est celui pour lequel le plus de souches ont été déposées dans la base de données (11/171 souches d'*A. xylosoxidans* déposées) avec une majorité d'isolats non CF provenant de France,

¹⁵ Moins de 3 cultures positives sur une année jusqu'à la date d'isolement en 2014

¹⁶ Au moins 3 cultures positives non consécutives sur une année jusqu'à la date d'isolement en 2014

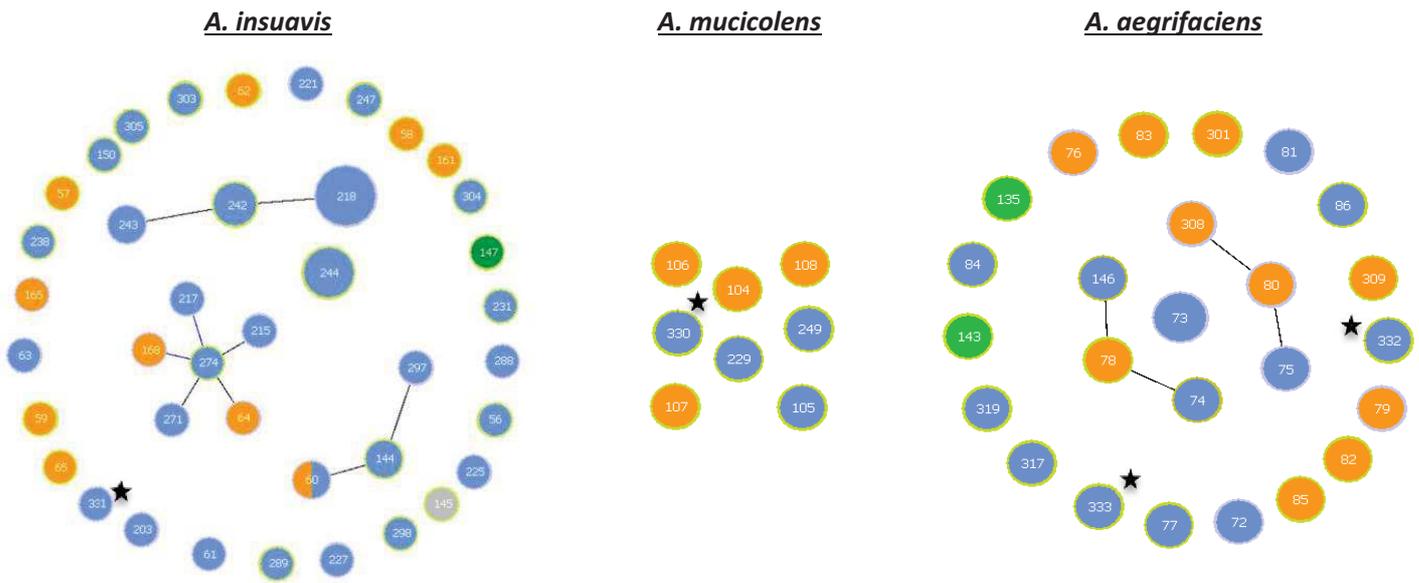


Figure 14 Représentation goeBURST basée sur les données MLST de PubMLST et des 1^{ers} isolats de 2014 de 3 patients suivis au CRCM du CHU de Montpellier selon l'espèce et la source d'isolement.

Les STs sont groupés en fonction de leur profils alléliques. Chaque cercle correspond à un ST et le nombre dans le cercle correspond à la désignation du ST dans la base de données PubMLST. La taille de chaque cercle est proportionnelle au nombre d'isolat déposé pour chaque ST. Les liaisons entre les STs correspondent à de simples ou doubles variations de locus entre ces STs qui sont alors regroupés en complexes clonaux.

● CF ● Non CF ● Environnement ● Source non décrite

★ Identifié dans l'étude ★ Partagé par 2 patients de l'étude

Thaïlande et Espagne. Il est à souligner que 3 des STs déjà connus d'*A. xylosoxidans* colonisant 4 patients de notre étude comportent des souches d'origine CF et non CF alors que seulement 7 STs sur les 135 STs d'*A. xylosoxidans* déposés dans PubMLST contiennent des souches de ces deux origines (Figure 13).

Concernant les 3 autres espèces et l'espèce non décrite, toutes les souches ont un ST qui était inconnu dans la base de données et présentaient de 1 à 6 nouveaux allèles (Tableau 1). Aucun de ces STs ne faisait partie d'un complexe clonal (Figure 14). La majorité des STs déposés pour *A. insuavis* et *A. mucicolens* sont d'origine CF et seul un ST (ST60) d'*A. insuavis* contient des souches CF et non CF. Concernant *A. aegrifaciens*, la moitié des ST décrits sont d'origine CF et l'autre moitié d'origine non CF (figure 14).

III.3 Diversité d'allèles au sein d'un morphotype

Dix des 11 échantillons avec au moins deux morphotypes coloniaux contenaient des souches de STs identiques. Néanmoins, les VRCF d'un patient colonisé par l'espèce *A. aegrifaciens* présentaient deux morphotypes coloniaux dont les STs différaient par 4 allèles sur 7 (Tableau 1) ; un allèle différait par 4 nucléotides, les 3 allèles restants différaient par seulement 1 nucléotide.

IV Discussion & Conclusions

Grâce à cette étude épidémiologique, nous montrons que la prévalence des bactéries du genre *Achromobacter* spp. était d'environ 10% (20 patients / 197) chez les patients du CRCM de Montpellier en 2014. Cette prévalence est comparable à celles des autres études françaises et internationales (Amoureux et al. 2016a; Cools et al. 2016; Ridderberg et al. 2011). Nous avons mis en évidence une diversité d'espèces avec 5 espèces d'*Achromobacter* colonisant 20 patients.

A. xylosoxidans était l'espèce majoritairement isolée, colonisant 80% des patients recensés en 2014. Ce résultat rejoint celui d'autres études ayant identifié par méthode moléculaire discriminante entre 61% et 81% de bactéries de cette espèce (Amoureux et al. 2013; Coward et al. 2016; Ridderberg et al. 2011; Spilker et al. 2013; Trancassini et al. 2014). Néanmoins, certains patients CF sont colonisés par des espèces peu décrites et au cours de notre étude épidémiologique, nous avons observé que 20% des patients étaient colonisés par une souche n'appartenant pas à l'espèce *A. xylosoxidans* voire inconnue. Toutes les espèces connues identifiées dans notre étude avaient déjà été décrites dans un contexte de mucoviscidose (Vandamme 2013a, Vandamme 2013b). Les espèces *A. insuavis*, *A. mucicolens* et *A. aegrifaciens* ont également été observées lors de colonisation de patients du centre de Dijon (Amoureux et al. 2016a). En revanche, lors de l'étude dijonnaise, seuls 57% des patients étaient colonisés par *A. xylosoxidans* et les espèces *A. animicus*, *A. spanius*, *A. insolitus* et *A. spiritinus/marplatensis* avaient été identifiées par séquençage du gène *nrdA*. En effet, certains patients de cette étude ont successivement présenté jusqu'à 4 espèces différentes d'*Achromobacter*

dans leurs voies respiratoires au cours de la période étudiée, augmentant la diversité d'espèces observée (Amoureux et al. 2016a). Cette étude ayant été menée sur une période de 7 ans, les résultats ne peuvent donc pas être strictement comparés à ceux de notre étude réalisée sur un an seulement.

Lors de notre étude, *A. xylosoxidans* était la seule espèce identifiée chez les patients colonisés de manière chronique ou intermittente, suggérant une meilleure capacité de persistance pour cette espèce. D'autres études ont également observé qu'*A. xylosoxidans* était l'espèce majoritairement observée lors de colonisations chroniques, même si *A. insuavis* et *A. ruhlandii* étaient aussi retrouvés (Amoureux et al. 2016a; Ridderberg et al. 2012a). Pour le moment aucune autre espèce n'a été décrite lors de colonisation chronique. Lors du suivi de ces patients (2014 à 2016), les souches d'*A. aegrifaciens*, *A. mucicolens* et *Achromobacter* sp. n'ont pas été à nouveau identifiées chez les patients correspondants et ont donc été considérées comme éradiquées, tandis qu'un patient était toujours colonisé de manière sporadique par *A. insuavis*. De plus, deux colonisations sporadiques et une colonisation intermittente par *A. xylosoxidans* sont devenues chroniques appuyant l'hypothèse que toutes les espèces d'*Achromobacter* ne présenteraient pas le même potentiel de persistance dans les VRCF.

Si nous avons uniquement séquencé le gène *nrdA* (765 pdb) (Spilker et al. 2013), nous aurions conclu que 12 patients partageaient le même génotype d'*A. xylosoxidans* avec au moins un autre patient alors qu'en réalité seuls 4 patients partageaient un ST avec un autre patient. Le schéma MLST complet permet donc d'être plus précis dans l'étude épidémiologique. Lors de notre étude, nous avons mis en évidence une forte diversité de STs, avec 14 STs différents pour les 16 patients colonisés par *A. xylosoxidans*. En Espagne, une étude similaire a mis en évidence pour 15 patients CF, 13 STs correspondant à 6 espèces ou génogroupes¹⁷ différents (Barrado et al. 2013). En parallèle, ils ont identifiés 11 STs correspondant à 7 espèces ou génogroupes différents pour 11 patients non CF.

Lors de cette étude, nous avons observé le partage de STs entre deux paires de patients. Les souches ST27 colonisant 2 patients n'étaient pas identiques en ECP suggérant l'absence de lien épidémiologique entre les souches (Dupont et al. 2015). Tirant les mêmes conclusions, une étude en Grande-Bretagne a récemment rapporté la colonisation de 4 patients par des souches de même ST d'*A. insuavis*, les séquences génomiques de ces souches différaient par au moins 385 SNPs, rendant une infection croisée peu probable (Coward et al. 2016). Une autre étude récente a également montré que les souches de patients partageant le même ST n'appartiennent généralement pas au même génotype en ECP (Amoureux et al. 2016a). De manière très intéressante, une autre étude a rapporté que deux patients CF et un patient non CF d'un même hôpital étaient également colonisés par le ST27 (Barrado et al. 2013). A l'inverse de notre étude, les profils d'ECP de ces souches étaient identiques, suggérant une transmission croisée ou une source commune de contamination mais aucun lien épidémiologique n'a été établi entre ces patients. Ce ST27 présente donc un certain

¹⁷ Souches appartenant à une espèce génomique non décrite dont les génomes présentent une similarité importante (hybridation ADN-ADN $\geq 70\%$)

succès épidémiologique qui pourrait être lié à une meilleure capacité de colonisation pulmonaire. Une étude portant sur l'épidémiologie de *P. aeruginosa* dans une population CF a observé la prépondérance de 2 STs non isolés de patients non CF, suggérant une capacité spécifique de ces clones à coloniser les VRCF (van Mansfeld et al. 2010).

Nous n'avons pas démontré de forte incidence de transmissions croisées de bactéries du genre *Achromobacter* dans notre CRCM alors que dans la littérature, la transmission par contact direct entre les patients ou par une source commune semble non négligeable. L'étude par RAPD de souches d'*Achromobacter* de patients provenant de 46 centres CF aux USA a montré qu'aucun génotype n'était partagé entre les différents centres tandis qu'au sein des centres, 5 présentaient des paires de patients porteurs des mêmes génotypes dans leurs VRCF (Krzewinski et al. 2001). Deux de ces paires concernait une fratrie, une autre paire concernait des amis, et deux n'ont pas été épidémiologiquement reliés. Dans un centre CF en Grèce, 5 patients sur 71 présentaient des souches de profil identique en ECP (Kanellopoulou et al. 2004a). Lors d'une enquête sur la colonisation par *A. xylosoxidans* de 13 patients présents dans un centre de réhabilitation CF en Belgique, seulement 2 génotypes avaient été identifiés (Van Daele et al. 2005). Plus récemment, une nouvelle enquête sur les souches des patients présents dans ce centre a montré qu'un des deux génotypes était toujours présent, suggérant une transmission continue d'*A. xylosoxidans* parmi les patients CF belges depuis plus de 10 ans (Cools et al. 2016).

Enfin, nous avons mis en évidence la coexistence de deux génotypes d'*A. aegrifaciens* au sein des VRCF d'un même patient. Le génotypage par RAPD de 13 à 19 isolats par patient CF au cours du temps a identifié un génotype unique pour 13 des 15 patients étudiés (Krzewinski et al. 2001). Les deux patients restants ont présenté, deux génotypes distincts, avec un génotype identifié seulement sporadiquement dans une expectoration. Une autre étude épidémiologique a également observé la co-colonisation des VRCF par des génotypes différents durant des périodes de temps court, inférieures à un an (Amoureux et al. 2016a). Il n'y a donc que très peu de patients décrits comme étant colonisés par plusieurs génotypes d'*Achromobacter*, comparé à *P. aeruginosa* et *S. maltophilia* pour lesquels plusieurs génotypes par patient sont fréquemment mis en évidence (Krzewinski et al. 2001; Van Daele et al. 2006).

Les résultats de notre étude montrent une diversité d'espèces et de génotypes d'*Achromobacter* colonisant la population de patients mais aussi une diversité de STs chez un même patient. Même s'il reste à étudier la relation génétique entre les souches appartenant au nouveau ST colonisant deux patients, la transmission croisée entre patients est certainement rare dans notre centre ce qui suggère une contamination à partir des environnements proches de chaque patient. Notre étude confirme la fréquence du ST27, majoritaire dans PubMLST, chez des patients CF et non CF à travers le monde. Ce génotype pourrait avoir une meilleure adaptabilité à l'homme et une meilleure capacité à persister dans les VRCF. Ces résultats sont analogues à ceux de Van Mansfeld et collaborateurs sur l'épidémiologie de *P. aeruginosa*, suggérant que les bactéries du genre *Achromobacter* ont une épidémiologie similaire de celle de ce pathogène (van Mansfeld et al. 2010).

PARTIE II
ETUDE LONGITUDINALE DE L'EVOLUTION ADAPTATIVE
D'*ACHROMOBACTER* ET DE *PANDORAEA* LORS DE
COLONISATIONS CHRONIQUES DES VRCF

I Introduction

La persistance des bactéries des genres *Achromobacter* et *Pandoraea* est évoquée pour expliquer la colonisation chronique des VRCF mais les études sur l'évolution adaptative de ces pathogènes émergents lors de la colonisation chronique sont rares. Les études des espèces du genre *Pandoraea*, basées sur l'ECP, la rep-PCR ou le séquençage total de génome, n'ont pas mis en évidence de variations génomiques au cours du temps (Atkinson et al. 2006; Ee et al. 2015; Fernández-Olmos et al. 2012a). Concernant le genre *Achromobacter*, une colonisation initiale évolue vers la colonisation chronique dans 11 à 30% des cas (Cools et al. 2016) et cette colonisation chronique a été plus étudiée que celle par *Pandoraea* du fait d'une prévalence plus importante des bactéries de ce genre. Une étude par ECP des souches de 21 patients colonisés chroniquement a montré que tous les patients étaient colonisés au cours du temps par le même génotype (Amoureux et al. 2013a). Pour 10 patients, le génotype majoritaire présentait des sous-types (différant par moins de 3 fragments d'ADN en ECP) et pour 5 patients, une co-colonisation par 2 génotypes différents a été mise en évidence, détectée une seule fois ou sur une période de moins d'un an. Lors de cette étude, une augmentation de résistance des bactéries du genre *Achromobacter* au cours de la colonisation chronique a été rapportée, particulièrement vis-à-vis de la famille des carbapénèmes (Amoureux et al. 2013a). Ces pathogènes émergents sont donc capables de persister dans l'habitat pulmonaire CF et certains mécanismes d'adaptations semblent similaires à ceux mis en place par *P. aeruginosa* lors de la colonisation chronique. Ces mécanismes d'adaptations associés à la persistance sont à rapprocher de ceux décrits dans la partie bibliographique de ce travail pour *P. aeruginosa* lors de la colonisation chronique.

D'autre part, les bactéries du genre *Pandoraea* peuvent se révéler particulièrement pathogènes et une augmentation de virulence entre des isolats pulmonaires précoces et tardifs a été décrite (Ambrose et al. 2016; Costello et al. 2011; Mahenthiralingam 2014). Dans ce contexte, tenter de relier la virulence et la dynamique de colonisation à l'évolution du statut clinique du patient serait intéressant lors de l'étude de la colonisation chronique du patient de notre centre.

Etudier l'adaptation de ces pathogènes opportunistes au cours de longues périodes de colonisation permettrait d'augmenter les connaissances des facteurs impliqués dans leur persistance, de comparer les mécanismes d'adaptation mis en œuvre par ces différents pathogènes et d'appréhender leurs relations avec le statut clinique des patients. La 2^{ème} partie expérimentale de ce travail consiste donc à mettre en évidence des témoins d'une évolution adaptative chez *Achromobacter* et *Pandoraea* lors de leur persistance dans les VRCF pendant des périodes de temps allant jusqu'à 7 ans et à relier la présence des différents variants observés au statut clinique du patient.

II Evolution adaptative d'*Achromobacter* sp. lors de la colonisation chronique des VRCF de 13 patients

Le but de cette étude est d'étudier la diversité des isolats d'*Achromobacter* au cours de la colonisation chronique des VRCF afin de mettre en évidence des témoins d'évolution adaptative pour ce pathogène émergent. Pour cela, nous avons analysé les souches isolées du tractus respiratoire de 12 patients du CRCM de Montpellier et d'un patient danois du centre CF d'Aarhus pendant des périodes de temps comprises entre 13 mois et 5 ans. Nous avons étudié un total de 118 isolats ; de 5 à 26 isolats, provenant de 3 à 10 échantillons par patient. La colonisation chronique des patients a été définie selon les critères de Pereira et collaborateurs soit 3 cultures positives par an, séparées par au moins un mois d'intervalle, pendant au moins 2 ans (Pereira et al. 2011).

Pour toutes ces souches, nous avons étudié la dynamique du génome par ECP après macro-restriction par les enzymes *Xba*I et *Spe*I et par multiplex rep-PCR (MR-PCR) qui est une amplification simultanée de 3 types de séquences répétées présentes dans le génome bactérien, les séquences REP, ERIC et BOX. Nous avons également étudié l'hétérogénéité intragénomique de la région V3 des copies du gène *rrs* par PCR ADN_r 16S-Temporal Temperature Gel Electrophoresis (TTGE). Enfin, concernant l'identification des espèces, le séquençage du gène *nrdA* a été effectué pour chaque souche présentant des profils d'ECP ou de MR-PCR distincts ; le MultiLocus Sequence Typing (MLST) a été utilisé comme outil supplémentaire de typage pour les souches d'un même patient présentant une forte diversité de profils de MR-PCR ou d'ECP.

Au cours de cette étude, nous avons observé que chaque patient était colonisé par une population de variants d'un même clone différent de celui des autres patients. Pour chaque patient, nous avons observé une variation de profils génomiques au cours du temps mais aussi entre les morphotypes isolés d'un même échantillon. Ces résultats suggèrent la survenue de modifications génomiques intraclonales en lien avec l'adaptation aux VRCF et l'existence d'une population clonale diversifiée.

Les résultats de cette étude ont été publiés dans l'article suivant :

Article I

Dupont C., Michon A.-L., Jumas-Bilak E., Nørskov-Lauritsen N., Chiron R., & Marchandin H. (2015). Inpatient diversity of *Achromobacter* spp. involved in chronic colonization of Cystic Fibrosis airways. *Infection, Genetics and Evolution*: 32, 214–223.



Contents lists available at ScienceDirect

Infection, Genetics and Evolution

journal homepage: www.elsevier.com/locate/meegid

Inpatient diversity of *Achromobacter* spp. involved in chronic colonization of Cystic Fibrosis airways



Chloé Dupont^{a,1}, Anne-Laure Michon^{a,b,1}, Estelle Jumas-Bilak^{a,c}, Niels Nørskov-Lauritsen^d, Raphaël Chiron^e, Hélène Marchandin^{a,b,*}

^a Université Montpellier 1, UMR5119 ECOSYM, Equipe Pathogènes et Environnements, U.F.R des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, 15 avenue Charles Flahault, 34093 Montpellier Cedex 5, France

^b Centre Hospitalier Régional Universitaire de Montpellier, Hôpital Arnaud de Villeneuve, Laboratoire de Bactériologie, 371 avenue du Doyen Gaston Giraud, 34295 Montpellier Cedex 5, France

^c Centre Hospitalier Régional Universitaire de Montpellier, Hôpital Saint-Eloi, Laboratoire d'Hygiène hospitalière, 80 avenue Augustin Fliche, 34295 Montpellier Cedex 5, France

^d Department of Clinical Microbiology, Aarhus University Hospital, Skejby, 8200 Aarhus, Denmark

^e Centre Hospitalier Régional Universitaire de Montpellier, Hôpital Arnaud de Villeneuve, Centre de Ressources et de Compétences de la Mucoviscidose, 371 avenue du Doyen Gaston Giraud, 34295 Montpellier Cedex 5, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 November 2014

Received in revised form 27 February 2015

Accepted 9 March 2015

Available online 16 March 2015

Keywords:

Achromobacter
Cystic Fibrosis
Colonization
Diversity
Genome
Adaptation

ABSTRACT

Achromobacter spp. are increasingly identified in Cystic Fibrosis (CF) patients and their ability to persistently colonize the CF respiratory tract (CFRT) suggests that *Achromobacter* species possess adaptive characteristics. We studied genome dynamics in 118 isolates recovered from 13 patients with *Achromobacter* chronic colonization (5–26 isolates per patient recovered over 13–61 months). Isolates were identified to species level by *nrdA* gene sequencing, subjected to Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) and multiplex rep-PCR (MR-PCR), and *rrs* intragenomic diversity was studied by PCR-Temporal Temperature Gel Electrophoresis (TTGE). Inpatient diversity was assessed: (i) from dynamics of *Xba*I and/or *Spe*I-based pulsotypes, (ii) from comparison of MR-PCR profiles, and (iii) by longitudinal analysis of *rrs* intragenomic diversity. Patients were chronically colonized by *Achromobacter xylosoxidans* ($n = 10$), *Achromobacter dolens* ($n = 1$) or *Achromobacter insuavis* ($n = 2$). All strains displayed genomic diversification over time but *A. insuavis* showed higher pulsotype diversity compared to other species. Intragenomic *rrs* heterogeneity was found in strains from 6 of 13 patients and may be persistently observed. *Achromobacter* genome evolution observed during chronic colonization of the CFRT warrants further investigation of the adaptation features of the different species, as well as of the selective forces driving this adaptation in the CFRT.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Non-fermentative Gram-negative bacilli belonging to the genus *Achromobacter* are considered as worldwide emerging bacteria in the CF population. However, factors involved in this emergence remain unknown. The clinical relevance of *Achromobacter* colonization remains unclear (Hauser et al., 2011), although the level of inflammation caused by *Achromobacter xylosoxidans* was recently shown to be similar to that induced by *Pseudomonas aeruginosa* in chronically infected CF patients (Hansen et al.,

2010). *A. xylosoxidans* was for long considered to be the major species recovered from the CF respiratory tract (CFRT). However, based on the recent availability of two Multi Locus Sequence Typing (MLST) schemes (Spilker et al., 2012; Ridderberg et al., 2012), a greater diversity of species than initially suspected was found. Indeed, among the 8 species characterized in the past two years, namely *Achromobacter aegrifaciens*, *Achromobacter animicus*, *Achromobacter anxifer*, *Achromobacter insuavis*, *Achromobacter dolens*, *Achromobacter spiritinus*, *Achromobacter mucicolens* and *Achromobacter pulmonis* (Vandamme et al., 2013a,b), 7 were found in CF patients.

Achromobacter CFRT colonization may be transient, intermittent or chronic (Tan et al., 2002). Chronic colonization has been related to the persistence of clonally related strains in all studies conducted so far using diverse molecular typing methods including Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE), amplification of repetitive bacterial sequences (rep-PCR) and randomly amplified

* Corresponding author at: Unité de Bactériologie, U.F.R des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, 15 avenue Charles Flahault, 34093 Montpellier Cedex 5, France. Tel.: +33 4 11 75 94 30; fax: +33 4 11 75 94 63.

E-mail address: helene.marchandin@univ-montp1.fr (H. Marchandin).

¹ These two authors contributed equally to this work.

polymorphic DNA (RAPD) (Magni et al., 2010; Ridderberg et al., 2011; Amoureux et al., 2013a).

Achromobacter species may be found in environmental and human clinical samples, and apparently display adaptive characteristics (Amoureux et al., 2013b). Moreover, the CFRT is a particular niche that undergo major events of bacterial adaptation and selection linked to biotic selective pressures like osmotic pressure, immunological defenses and inflammation associated to abiotic constraints, particularly repeated antimicrobial treatment. Among long-term CFRT colonizers, studies have mainly focused on *P. aeruginosa* and showed this pathogen to harbor numerous adaptive traits (Hauser et al., 2011; Yang et al., 2011). For *Achromobacter* spp., indirect evidence suggested adaptation to the CFRT. The few genome sequences currently available showed a genome size of 7 Mb (Strnad et al., 2011; Jakobsen et al., 2013), a relatively large genome in the prokaryotic world, comparable to that of *P. aeruginosa*, a large polyvalent core genome metaphorically described as a “Swiss knife” (Aujoulat et al., 2012). Comparative genomics of CF and environmental *Achromobacter* isolates revealed that CF isolates possessed unique genetic determinants facilitating the adaptation to a pathogenic lifestyle, such as genes encoding functions mediating bacterial/host interactions (adherence, colonization, and invasion) (Li et al., 2013). Magni et al. observed a partition between RAPD profiles of persistent *A. xylosoxidans* isolates and those of intermittently recovered strains and suggested these differences to mirror bacterial adaptive changes occurring during chronic lung colonization (Magni et al., 2010). Finally, intragenomic *rrs* heterogeneity, another genetic feature that could have a function in the bacterial adaptation to the environment (López-López et al., 2007; Jensen et al., 2009), was found at high frequency in CF *Achromobacter* isolates (Michon et al., 2010).

The aim of our study was to survey *Achromobacter* intrapatient isolate diversity during chronic colonization. For this purpose, we studied genome dynamics by PFGE and multiplex rep-PCR, and *rrs* intragenomic heterogeneity by PCR-Temporal Temperature Gel Electrophoresis (TTGE).

2. Materials and methods

2.1. Patients and isolates

The study included isolates from patients attending the CF center of the Montpellier University Hospital, a large regional French CF center caring for more than 200 children and adults each year. Isolates from a patient attending the Aarhus University Hospital (Denmark) were also included in this study. Chronic colonization (CC) was defined as \geq three positive cultures per year separated by a minimum of one-month intervals, for at least 2 years (Pereira et al., 2011). Sputum cultures were conducted according to national recommendations. Routine phenotypic-based identification was based on Gram stain, cytochrome oxidase activity, API 20 NE system (bioMérieux) and/or Microflex™ matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) (Bruker Daltonics). *Achromobacter* spp. isolates recovered during routine analysis of respiratory tract specimens were stored frozen at -80°C . One to 4 isolates showing different colonial morphology were stored per sample. Age at first detection of *Achromobacter*, colonizations by other pathogens, days of antibiotic therapy per study year of *Achromobacter* colonization and antimicrobial regimens were recorded.

2.2. Pulsed-field gel electrophoresis of *Xba*I and *Spe*I-digested DNA

Genomic DNAs were prepared in agarose plugs as described previously (Gouby et al., 1994). Endonucleases were selected from

in silico analysis of *Achromobacter* sp. strain A8 (Strnad et al., 2011), *A. xylosoxidans* strain NH44784 (Jakobsen et al., 2013) and *A. xylosoxidans* strain NBRC 15126 with available whole genome sequences (GenBank accession numbers NC_014640, HE798385 and CP006958, respectively) using restriction Map of BioEdit software version 7.1.11 (Hall, 1999) (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>).

DNAs were digested with 40 U of either *Spe*I or *Xba*I (New England Biolabs) as described before (Teyssier et al., 2003). Fragments were separated by PFGE using a contour-clamped homogeneous electric field apparatus (CHEF-DRII; Bio-Rad) in a 1% agarose gel in $0.5\times$ Tris–borate-EDTA buffer (TBE) at 12°C . Pulse ramps were 80–5 s for 40 h at 4.5 V cm^{-1} for *Spe*I-digested fragments and 60–2 s for 40 h at 4.5 V cm^{-1} for *Xba*I-digested fragments. The molecular marker used was Lambda ladder (Bio-Rad laboratories). Comparisons of *Spe*I-based pulsotypes obtained for isolates of a species were made using Dice coefficient and unweighted-pair group method using average linkage (UPGMA) clustering as follows: PFGE bands were measured and scored as present (1) or absent (0) in a binary table. Pulsotypes were compared by calculation of the Dice correlation coefficient with DendroUPGMA software (<http://genomes.urv.cat/UPGMA/>) and were clustered into a dendrogram by UPGMA. *Spe*I-generated pulsotypes were denominated using a double lower-case letter for each cluster (aa, bb, cc, ...) in combination with numbers to designate variants inside a cluster. The pulsotype the most frequently observed for isolates in a patient was named using the double lower-case letter only, while aa1, aa2, bb1, cc1, ... were used for the less frequent pulsotypes. *Xba*I-based PFGE patterns were visually compared and denominated as described above using upper-case letters (A, A1, A2, B, B1, C, ...).

2.3. Multiplex BOX-REP-ERIC PCR

DNAs extracted using the MasterPure™ kit were subjected to multiplex amplification of repeated sequences BOX, REP (Repetitive Extragenic Palindromic) and ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus). This multiplex rep-PCR (MR-PCR) used the primers BOXA1R, REP1R, REP2, ERIC1R and ERIC2 previously described (Versalovic et al., 1991, 1995; Mercier et al., 1996). The polymerase chain reaction (PCR) was performed in $50\text{ }\mu\text{l}$ containing 200 nM of each primer, $200\text{ }\mu\text{M}$ of each deoxynucleotide triphosphate (dNTP), 2.5 U of *Taq* polymerase (Promega) in the appropriate buffer, 50 ng of genomic DNA, 2 mM of MgCl_2 , and 3.5% DMSO. The conditions for amplification were: initial denaturation (95°C for 3 min) followed by 30 cycles of denaturation (90°C , 30 s), annealing (40°C , 1 min) and extension (72°C , 4 min), and a single final extension step (16 min at 72°C). Depending on the DNA concentration in amplification products, from 2 to $10\text{ }\mu\text{l}$ of each amplified DNA were separated on a 1.5% agarose gel in TBE $0.5\times$ buffer containing $500\text{ }\mu\text{g/ml}$ ethidium bromide. The MR-PCR patterns were visually compared and designed as described for pulsotypes by lower-case letters (a, a1, a2, b, c, ...).

2.4. Index of diversity and concordance of typing methods

The index of diversity and the degree of congruence between typing methods were calculated by using Comparing Partitions, an online tool for quantitative assessment of partition congruence (<http://www.comparingpartitions.info/>). The discriminatory ability of the typing methods was evaluated using the Simpson's index of Diversity (SID: with 95% confidence intervals) (Hunter and Gaston, 1988); an index >0.90 has been considered for defining a method as valuable for typing isolates with confidence. Intermethod concordance was calculated using the adjusted Wallace coefficient

(AW) that indicates the probability that two strains classified as the same type by one method will also be classified as the same one when using the other method. A high value of Wallace's coefficient indicates that partitions defined by a given method could have been predicted from the results of another method, suggesting that the use of both methodologies is redundant. (Carriço et al., 2006; Severiano et al., 2011).

2.5. Species identification, MLST and nucleotide sequence accession numbers

DNA was extracted using the MasterPure™ kit as recommended by the manufacturer (Epicentre®). The DNA amount was evaluated by UV spectrophotometry and diluted at 50 µg per ml. *nrdA* gene sequencing (765 nt) or MLST based on *ndrA* (449 nt), *nusA*, *gltB*, *nuoL*, *eno*, *lepA*, and *rpoB* genes were performed according to Spilker et al. (2013). *nrdA* gene sequencing was performed for one strain per MR-PCR, *XbaI*-PFGE and *SpeI*-PFGE profile for species identification, and MLST was used as an additional typing tool for selected strains exhibiting high MR-PCR or PFGE pattern diversity in a patient. Sequence types (STs) were identified in the *Achromobacter* PubMLST database (<http://pubmlst.org/achromobacter>) and data of this study submitted to this database. The nucleotide sequences determined in this study have been deposited in the GenBank data library under accession numbers KP030861-KP031105 (*A. insuavis*), KP082968-KP082970 (*A. dolens*), and KP082948-KP082967 and KP082971-KP082989 (*A. xylosoxidans*).

2.6. Study of 16S rRNA gene diversity by PCR-TTGE

A 199 bp fragment overlapping the 16S rDNA V3 variable region was amplified using the primers HDA1-GC and HDA2 (Ogier et al., 2002), as described elsewhere (Michon et al., 2010). TTGE was performed as described previously (Michon et al., 2010), except for electrophoresis conditions, which were optimized for *Achromobacter* V3 region *rrs* analysis as follows: 53 V for 16 h with an initial temperature of 67 °C and a final temperature of 70 °C corresponding to an increase of 0.2 °C/h. A ladder representative of 6 different *rrs* V3 regions found in *Achromobacter* spp. (Michon et al., 2012) was loaded on each TTGE gel. TTGE band analysis and sequencing were performed as described by Michon et al. (2010). TTGE bands were numbered according to their migration distance. TTGE profiles with a single band were designed by the band number (1, 2, 3, ...) and profiles comprising multiple TTGE bands revealing intragenomic *rrs* heterogeneity were designed by the combination of band numbers (2 + 3, 5 + 6, ...).

3. Results

3.1. *Achromobacter* spp. chronic colonization: patient and isolate characteristics

Twelve out of the 200 patients (6%) attending the CF center of the University Hospital of Montpellier during 2012 were considered chronically colonized by *Achromobacter* sp. on the basis of routine microbiological follow-up. In addition to these 12 patients, one patient from Denmark chronically colonized by *Achromobacter* was included in the study. Patient characteristics, *Achromobacter* colonization data and studied isolates are presented in Supplementary Table S1. Age at first *Achromobacter* acquisition ranged from 23 months to 33 years. Chronic colonization was documented for time intervals between 28 months and 15 years in the 13 patients. Investigations were conducted on a total of 118 isolates as follows: 5–26 isolates recovered from 3 to 10 samples per patient during intervals of 13–61 months of *Achromobacter* colonization depending on the patient.

3.2. Genomic diversity of the overall *Achromobacter* spp. population involved in CF chronic colonization studied by PFGE and MR-PCR

In silico analysis revealed that 5 endonucleases, *PacI*, *PsiI*, *SpeI*, *SwaI* and *XbaI*, had 5–100 restriction sites in the three whole genome sequences of *Achromobacter* available. *PacI* and *SwaI* generated a too low number of DNA fragments (8–11 and 5–8 restriction sites, respectively, depending on the genome considered) and an even lower number of DNA fragments that could be resolved by PFGE (3–7 for *PacI* and 2–5 for *SwaI*, range considered: 25–750 kb). *PsiI* had a larger number of restriction sites (58 or 63) but generated DNA fragments with an irregular size distribution within the resolution window of PFGE (results not shown). We retained *XbaI* (69–98 restriction sites, 44–65 DNA fragments with sizes regularly distributed between 25 and 700 kb) and *SpeI* (29–39 restriction sites, 19–32 fragments with sizes regularly distributed between 25 and 700 kb) enzymes for this study. These *in silico* data were confirmed by assays performed on selected strains for 11 patients of the study (data not shown).

PFGE and MR-PCR were performed on all isolates ($n = 118$); however, different subsets of isolates were analyzed by *XbaI*-based PFGE ($n = 100$), *SpeI*-based PFGE ($n = 77$) or by both approaches ($n = 58$). Indeed, *SpeI*-based pulsotypes were only studied for a selection of isolates with either identical or related *XbaI*-pulsotypes for each patient with the aim to comparatively study the ability of both endonucleases to detect large genomic modifications. *SpeI*-based PFGE was also the only method performed for some isolates with high *XbaI*-pulsotype diversity (patient 1) because of an easier pulsotype interpretation due to the lower number of generated DNA fragments. The Simpson's Index of Diversity (SID) calculated for the 3 typing methods was 0.948 (CI 95%, 0.937–0.959) for MR-PCR, 0.958 (CI 95%, 0.946–0.969) for *XbaI*-based PFGE and 0.977 (CI 95%, 0.961–0.993) for *SpeI*-based PFGE, indicating that the 3 approaches were valuable for typing *Achromobacter* spp. isolates with confidence. However, PFGE was more discriminatory than MR-PCR in the 3 subsets of isolates of this study, i.e., isolates analyzed by *XbaI*-based PFGE and MR-PCR, by *SpeI*-based PFGE and MR-PCR or by the 3 approaches. For example, for the 58 isolates analyzed by the 3 approaches, PFGE separated the isolates into 34 pulsotypes irrespective of the endonuclease (SID = 0.962; CI 95%, 0.939–0.985) while MR-PCR produced 20 banding patterns and had a significantly lower discriminatory index (SID = 0.929; CI 95%, 0.899–0.957) ($p = 0.015$) (Fig. 1).

PFGE and MR-PCR did not give strictly congruent results, as some strains with identical pulsotype displayed diverse MR-PCR patterns, and some strains with identical MR-PCR pattern showed different pulsotypes (Supplementary Table S1). Considering the results obtained for the subset of 58 isolates analyzed by MR-PCR, *XbaI*-based and *SpeI*-based PFGE, PFGE analyses were fully congruent (AW of 1.00) and were thus predictive of each other but poorly predictive of MR-PCR typing. Indeed, the probability of two strains of identical *XbaI*- or *SpeI*-pulsotype also sharing the same MR-PCR pattern was 69.4%. Conversely, the probability of two strains of identical MR-PCR pattern sharing the same pulsotype was only 38% (AW = 0.378) (Fig. 1).

3.3. Diversity to the species level assessed by *nrdA* gene sequencing

nrdA gene sequencing revealed that 10 patients of the Montpellier CF center were colonized by *A. xylosoxidans* while one patient was colonized by *A. dolens*, and the remaining patient by *A. insuavis* as observed for the Danish patient (patient 13). It also underlined the inaccuracy of phenotypic means for species identification in the genus *Achromobacter* because *A. dolens* and *A. insuavis* were not recognized by API 20NE or MALDI-TOF MS analysis. No

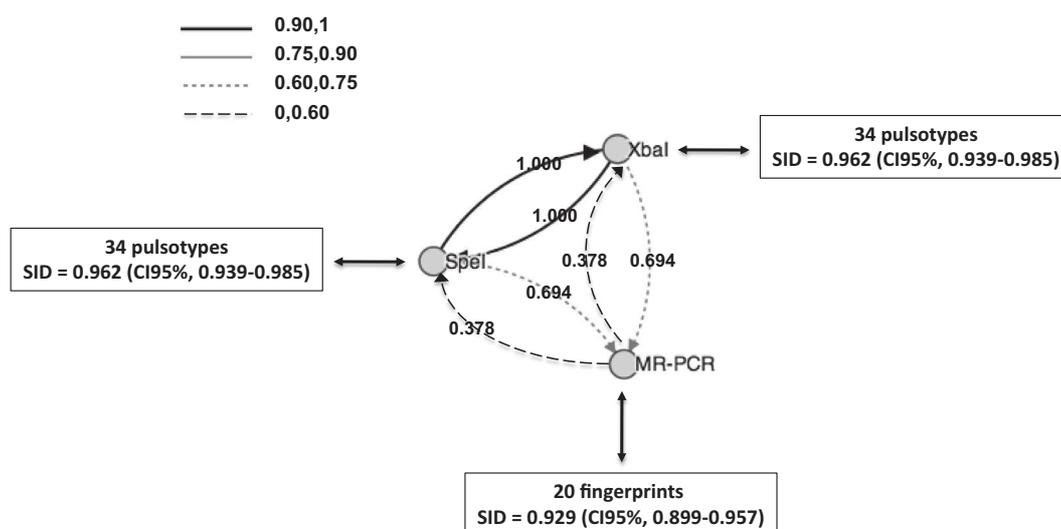


Fig. 1. Diversity of a 58 *Achromobacter* spp. population studied by *XbaI*-based PFGE, *SpeI*-based PFGE and multiplex-rep PCR (MR-PCR) and congruence of the 3 typing methods. Diagram corresponds to adjusted Wallace coefficient (AW) between *XbaI*-based PFGE (*XbaI*), *SpeI*-based PFGE (*SpeI*) and multiplex-rep PCR (MR-PCR). Arrows of different types correspond to different values of AW (see legend). AW values are indicated at corresponding arrow. Number of observed banding patterns and Simpson's Index of Diversity (SID) are indicated near the method name.

patient was co-colonized by different *Achromobacter* species (Table 1, Supplementary Table S1).

3.4. Genomic diversity and dynamics of *A. xylosoxidans* during chronic colonization

3.4.1. Genomic diversity of *A. xylosoxidans* at inter and intra-patient levels

Visual inspection of the fingerprints obtained by PFGE and MR-PCR, as well as UPGMA analysis of *SpeI*-generated pulsotypes, revealed that each patient carried isolates displaying patterns unrelated to those of the isolates recovered in another patient, except for isolate Ax 194 from patient 8, that displayed an identical MR-PCR pattern (Supplementary Table S1) and related pulsotype to those displayed by isolates from patient 7 (Fig. 2A, Supplementary Table S1). Analysis of five isolates recovered from the 2 specimens sampled in the following 7 months for patient 8 showed that none was related to isolate Ax 194 but that all were related to other isolates from this patient. This suggested a transient colonization after cross-contamination between patients 8 and 7 who consulted to the same CF center 48 h apart in March 2012 (data not shown). Because of this transient colonization, which did not allow any follow-up of genomic diversification of the strain in patient 8, strain Ax 194 was excluded from further inpatient diversity study.

Beside this exception, each patient carried *Achromobacter* isolates showing more than 15 DNA fragments of difference in *XbaI*-based PFGE, more than 14 DNA fragments of difference in *SpeI*-based PFGE and more than 10 bands of difference in MR-PCR compared to strains isolated in other patients (data not shown). PFGE and MR-PCR methods thus clustered the *A. xylosoxidans* population similarly, with isolates from separate patients being classified into distinct clusters. The UPGMA analysis of *SpeI*-generated pulsotypes is shown in Fig. 2A; with the exception of isolate Ax 194, Dice similarity values <40% were observed between clusters.

For isolates recovered from a same patient, 1–3 related pulsotypes were usually observed. These pulsotypes differed by no more than 5 DNA fragments (Table 1, Supplementary Table S1). Diversity of *SpeI*-generated pulsotypes is shown in Fig. 2A, clustering of

strains from a patient was associated to Dice coefficient values all above 70%. Similarly, 1–4 related MR-PCR patterns differing by no more than 3 bands were mainly observed for isolates recovered from the same patient. Surprisingly, a single isolate in patient 6 (Ax 26) reproducibly showed 8 MR-PCR bands of difference compared to other isolates analyzed for this patient whereas no variability was observed among isolates in PFGE (Table 1, Supplementary Table S1). To further characterize the link between isolates in this patient, Ax 26 and Ax 27, recovered from the same specimen, were subjected to MLST revealing that the two strains belonged to a same ST, ST5. Based on PFGE and MLST analyses, the Ax 26 isolate was thus considered to be related to other isolates recovered in patient 6.

Of note, genomic diversity at the intraspecimen level that accounted for inpatient diversity was observed by PFGE and/or MR-PCR for 11 out of the 22 samples containing multiple strains and in 6 out of the 9 patients presenting such samples.

Altogether, the interpatient strain variability that exceeded inpatient strain variability in serial isolates supported that chronic colonization could be attributed to patient-specific populations of *A. xylosoxidans*.

3.4.2. Genomic diversification in *A. xylosoxidans* during chronic colonization

Dynamics of pulsotypes and MR-PCR patterns obtained for isolates successively recovered from each of the 10 patients with *A. xylosoxidans* CC are presented in Fig. 2A and B, Table 1, and Supplementary Table S1.

Among the 10 patients, no variability in pulsotypes could be identified for two patients (patients 6 and 9), while isolates of two or three pulsotypes were observed in the majority of the patients ($n = 8$). Most frequently (patients 2, 3, 4, 11, and 12), a single isolate not observed any more in the 1–4 samples analyzed during the 5.5 to 31-month follow-up displayed a pulsotype differing from that of other isolates. For the three remaining patients (patients 5, 7 and 8), isolates displaying the variant pulsotypes were identified in 2–3 serial specimens sampled over 4.5 to 33-month periods (Fig. 2B).

Four out of the 10 patients harbored isolates showing variable MR-PCR patterns during CC (patients 2, 4, 6 and 12) but contrarily

Table 1
Summarized inpatient molecular fingerprinting results for *Achromobacter* spp. isolates according to species identification and patient.

Patient according to species identification ^a	PFGE						MR-PCR			TTGE			Other pathogen (CC) ^d	DOT per year ^e
	XbaI			SpeI			Profile (n)/study isolates (n)	Isolates with major profile (n)	Max number of band difference	Profile number (names of profiles)	Study isolates (n)	Isolates with major profile (n)		
	Pulsotypes (n)/study isolates (n)	Isolates with major pulsotype (n)	Max number of fragment difference	Pulsotypes (n)/study isolates (n)	Isolates with major pulsotype (n)	Max number of fragment difference								
<i>A. xylosoxidans</i>														
Patient 2	2/9	8	1	2/2	NA	5	3/9	4	2	1 (2)	9	9	MSSA	137
Patient 3	2/6	5	1	2/2	NA	2	1/6	6	0	1 (3)	6	6	Pa	92
Patient 4	2/8	7	3	2/2	NA	2	2/8	5	3	1 (2 + 3)	8	8	MRSA	144
Patient 5	2/10	6	3	2/10	6	4	1/10	10	0	1(3)	10	10	MSSA, Af	137
Patient 6	1/8	8	0	1/1	NA	NA	4/8	3	8	1 (2)	8	8	MSSA, Af	86
Patient 7	3/7	3	4	3/7	3	2	1/7	7	0	2 (2 + 3/3)	7	6 (2 + 3)	Pa, Af	89
Patient 8 ^b	3/8	4	3	3/3	0	2	1/8	8	0	1 (2)	8	8	MSSA, Af	83
Patient 9 ^c	1/6	6	0	1/1	NA	NA	1/6	6	0	2 (2 + 3/3)	6	5 (2 + 3)	MSSA	105
Patient 11	2/5	4	4	2/2	NA	4	1/5	5	0	2 (2/2 + 3)	5	4 (2)	Pa, MSSA	178
Patient 12	2/9	8	1	2/9	8	2	2/9	6	1	2 (3 + 4/3)	9	6 (3 + 4)	MSSA	188
<i>A. dolens</i>														
Patient 10	1/6	6	0	1/1	1	NA	3/6	3	2	1 (1)	6	6	None	68
<i>A. insuavis</i>														
Patient 1	8/8	0	5	24/26	2	9	4/26	12	5	2 (5 + 6/5)	26	17 (5 + 6)	MRSA	14
Patient 13	5/9	3	8	5/9	3	5	3/9	5	2	1 (5)	9	9	MSSA	75

Grey: stability of the considered result over the study period; SpeI-based PFGE results were extrapolated from XbaI-based results based on the 100% congruence found for both approaches.

^a Identification based on *nrda* gene sequencing and/or MLST.

^b Results are indicated for related isolates only, isolate Ax 194 unrelated to other isolates recovered from patient 8 was not included in this table.

^c For patient 9, PCR-TTGE results were considered as stable during CC because the only isolate displaying profile 2 + 3 was the isolate unrelated to others by PFGE and MR-PCR methods.

^d CC, chronic colonization; MSSA; methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*; Pa, *Pseudomonas aeruginosa*; MRSA, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; Af, *Aspergillus fumigatus*.

^e DOT, days of antibiotic therapy per study year of *Achromobacter* colonization

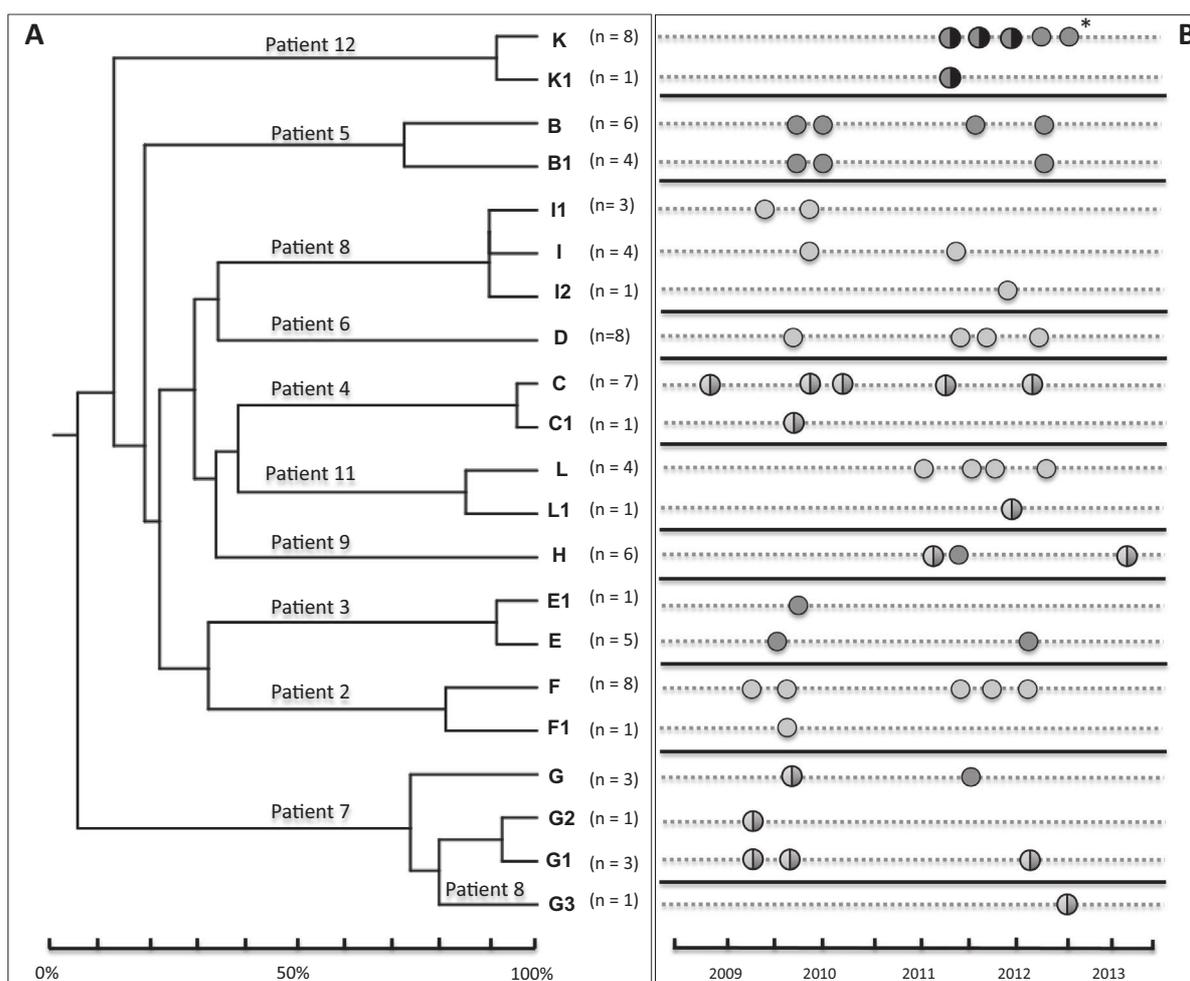


Fig. 2. A. Diversity and molecular links among *A. xylosoxidans* isolates chronically colonizing 10 CF patients assessed by UPGMA cluster analysis of *SpeI*-generated pulsotypes constructed with Dice coefficient. Patient designation is indicated on the dendrogram branches. The Dice's coefficient scale is at the bottom of the dendrogram. The pulsotype nomenclature is indicated according to [Supplementary Table S1](#) and (n = X) indicates the number of isolates with the indicated pulsotype. B. Schematic representation of temporal trends of pulsotypes and PCR-TTGE profiles during chronic colonization. Both *XbaI*-generated and *SpeI*-generated pulsotypes were considered here based on the 100% congruence found for both approaches. Time scale is indicated at the bottom of the figure and recovery of each pulsotype is indicated horizontally according to the time scale by a circle. Pulsotypes observed for strains recovered in a sample are shown as stacked circles. Grey-scale coding of the circles represents PCR-TTGE profiles observed for the corresponding isolate as follows: monocolored circles indicate monoband TTGE profiles, bicolor circles indicate biband profiles, light grey for band 2, medium grey for band 3, dark grey for band 4. *Indicates the only sample containing *A. xylosoxidans* isolates with different TTGE patterns: a monocolored circle was used referring to the profile presented by the majority of isolates in this sample (2 out of the 3 isolates recovered in the sample displayed TTGE pattern 3 while the remaining isolate showed pattern 3 + 4).

to pulsotypes, the less frequent MR-PCR patterns were persistently observed over time for the 4 patients (up to 31 months for pattern f1 in patient 2) ([Table 1](#), [Supplementary Table S1](#)).

Combining both PFGE and MR-PCR results and considering a fixed period of time of 5 months for all patients, the percentage of *A. xylosoxidans* genomes that changed within a single patient varied from 0% (patient 9) to 67% (patient 2), this percentage was also variable according to the period for a patient (patients 2, 4, 8 and 12). Over all the study period, only one out of the 10 patients (patient 9) was colonized by a strain showing stable fingerprints during CC ([Table 1](#), [Supplementary Table S1](#)). For strains of other patients, genomic modifications were revealed by PFGE and/or MR-PCR suggesting that different modes of *A. xylosoxidans* genome diversification occur during CC of the CFRT. Large genomic rearrangements were observed by PFGE analysis in isolates recovered from 8 patients, where 1–4 DNA fragments of difference observed in *XbaI*-based analysis and 2–5 DNA fragments of difference in *SpeI*-based analysis represented 1–3 genomic modifications. In 3 patients, these large genomic rearrangements coexisted with events involving smaller parts of the genome

revealed by MR-PCR (patients 2, 4 and 12). In patient 6, no large genomic rearrangements were observed in PFGE analyses but the clone colonizing the patient displayed the highest diversity observed in MR-PCR in terms of both diversity of banding patterns over time (n = 4) and number of differences in amplified bands (up to 8).

3.4.3. Diversity and dynamics of *rrs* copies in *A. xylosoxidans* during chronic colonization

We used PCR-TTGE to study *rrs* sequence heterogeneity in *Achromobacter* spp. isolates. Sequencing the 6 bands with different migration distances ([Fig. 3](#)) revealed by TTGE showed that 6 nucleotidic positions were variable within the *rrs* V3 region, each sequence differing from the others by one base. Seven TTGE patterns were observed, 4 monoband profiles (1, 2, 3 and 5) and 3 biband profiles (2 + 3, 3 + 4 and 5 + 6). Three TTGE bands (bands 2, 3 and 4) and 4 TTGE patterns (2, 3, 2 + 3, 3 + 4) were only observed for *A. xylosoxidans* isolates.

Identical TTGE patterns were identified during the entire study period for *A. xylosoxidans* isolates recovered from 6 out of the 10

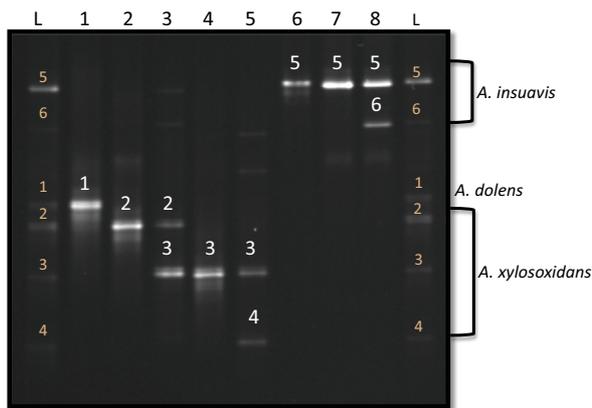


Fig. 3. TGGE profiles of amplified V3 16S rRNA gene for 8 *Achromobacter* spp. isolates. Lane 1, *A. dolens* strain Ad 208; lanes 2–5, *A. xylosoxidans* isolates Ax 93, Ax 273, Ax 13, and Ax 99, respectively; lanes 6–8, *A. insuavis* J09011452, Ai 346 and Ai 411, respectively. L, ladder, mix of four isolates with profiles 1, 2, 3 + 4 and 5 + 6 (*A. dolens* Ai 208, *A. xylosoxidans* Ax 191, *A. xylosoxidans* Ax 198 and *A. insuavis* Ai 16, respectively). Each band number is noted on the band. Bands with low intensity are artifactual bands observed in TTGE, i.e., heteroduplexes and bands with delayed migration.

patients (Table 1). For the 4 remaining patients, including the only patient (patient 9) colonized by isolates showing stable PFGE and MR-PCR fingerprints, 2 different PCR-TTGE patterns were observed, usually for isolates recovered from serial samples (Fig. 2B, Supplementary Table S1).

No correlation could be established between PCR-TTGE and typing results, because isolates could present identical or different pulsotypes and/or identical or different MR-PCR patterns independently of their TTGE profile (Table 1, Supplementary Table S1).

3.5. Dynamics of *A. dolens* during chronic colonization

Only one patient (patient 10) was colonized by *A. dolens* in our study. For this patient, the 6 studied isolates were recovered from 3 specimens sampled over a 17-month period and displayed a unique pulsotype and a stable PCR-TTGE profile (band 1) differing from those of other species. Only MR-PCR patterns were variable among isolates recovered over time in this patient, three related MR-PCR profiles being observed. One MR-PCR profile (m) was detected in the 3 samples, while profiles m1 and m2 appeared over time within a sample (Supplementary Table S1), the 3 profiles being observed in the last sample analyzed.

3.6. Genomic diversity and dynamics of *A. insuavis* during chronic colonization

Two patients (patients 1 and 13) were chronically colonized by *A. insuavis*. Twenty-six isolates recovered from 10 samples over a 4-year period and 9 isolates recovered from 9 samples over a 5-year period were analyzed for patients 1 and 13, respectively. PFGE analysis showed a higher diversity over time for the isolates successively recovered from both patients colonized by *A. insuavis* compared to *A. xylosoxidans* isolates recovered from other patients with a similar length colonization period. Indeed, 24 and 5 *SpeI* pulsotypes were observed for the 26 and 9 isolates analyzed for patients 1 and 13, respectively (Table 1). For patient 1, a similar exceptionally high diversity of pulsotypes was observed after *XbaI*-macrorestriction, none of the first 8 isolates recovered from 3 samples collected in this patient over a 3-year period presenting an identical pulsotype. The number of DNA fragments differing between pulsotypes of isolates also exceeded that observed for isolates in other patients because up to 8 *XbaI*-generated DNA

fragments (patient 13) or 9 *SpeI*-generated DNA fragments (patient 1) may differ between pulsotypes. By contrast, a lower diversity of MR-PCR patterns (3 and 4 MR-PCR patterns observed for isolates of patients 13 and 1, respectively) and a 2–5-band difference between MR-PCR patterns were observed, similar to the variability observed for some other serial isolates, such as *A. xylosoxidans* isolates in patient 6 (Table 1).

The UPGMA analysis of *SpeI*-generated pulsotypes is shown in Fig. 4A; isolates recovered in each patient were grouped into two clearly distinct clusters. Isolate clusters were delineated with 70% and 53% Dice coefficient cutoff values for patient 13 and 1, respectively.

In PCR-TTGE, band 5 was observed for all *A. insuavis* isolates and band 6 was observed in biband profile 5 + 6 only. The monoband PCR-TTGE pattern 5 was observed for all the 9 isolates recovered in patient 13. For patient 1, PCR-TTGE results showed strains displaying TTGE patterns 5 ($n = 9$) and 5 + 6 ($n = 17$) that persisted over the period of colonization studied, being recovered either from a specimen or from serial samples (Supplementary Table S1).

Because of the high diversity of their PFGE patterns, all the 37 *A. insuavis* isolates were subjected to MLST. The 9 isolates of patient 13 belonged to the same as yet unknown ST (ST 244). For patient 1, the 26 isolates belonged to 3 STs including two unknown STs, ST 242 and ST 243, as follows: 20 isolates belonged to ST 218, 4 to the ST 242 differing from ST 218 by one nucleotide transition in the *nrDA* gene sequence, and 2 to the ST 243 differing from ST 242 by one nucleotide transition in the *lepA* gene sequence. The 3 STs thus belonged to the same clonal complex. Similar levels of MR-PCR and PFGE fingerprint diversity were observed among the 3 STs (Supplementary Table S1) and no clustering of isolates according to their ST was observed (Fig. 4B). The 6 strains belonging to the 2 minor STs all presented the monoband PCR-TTGE pattern 5 compared to strains of ST 218 that mainly displayed the pattern 5 + 6 (17 out of 20 isolates); they were all recovered in samples together with strains belonging to ST 218 and were mainly observed in specimens from the more recent period of colonization (Fig. 4B). We therefore hypothesized that minor STs have emerged from ST 218 by point mutations.

3.7. Biotic and abiotic pressures and *Achromobacter* genomic diversification

Most patients were chronically colonized by other pathogens (methicillin-susceptible or methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *P. aeruginosa*, and/or *Aspergillus fumigatus*) and the number of days of antibiotic therapy per study year of *Achromobacter* colonization varied from 14 to 188 days. The different genomic features seemed to be independent of other pathogens chronically colonizing the patient CFRT, as well as of the antibiotic pressure estimated from the days of therapy per study year of *Achromobacter* colonization (Table 1). For example, the two patients whose isolates showed genomic diversification by all the methods used in this study (patients 1 and 12) were the patients submitted to the lowest (14 days/year) and the highest (188 days/year) antibiotic pressure, respectively. Moreover, no specific drug or antibiotic combination could be linked to the occurrence of *Achromobacter* genomic modifications.

4. Discussion

During 2012, 6% (12/200) and 8.6% (13/151) of patients attending the CF centers at Montpellier and Aarhus, respectively, were chronically colonized by *Achromobacter*. These percentages fall within the range reported in the literature, i.e., from 5.6% to 12.8% of patients (Kanellopoulou et al., 2004; De Baets et al.,

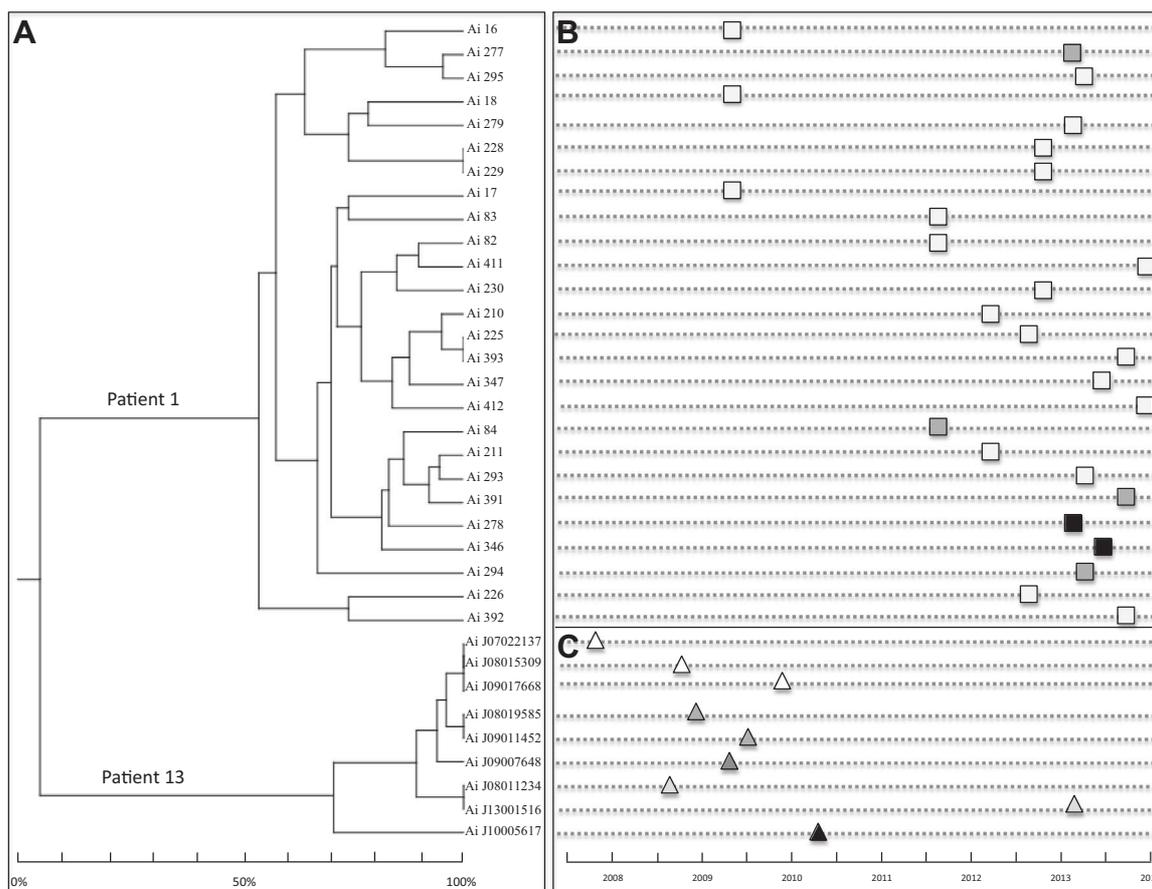


Fig. 4. A. Diversity and molecular links among 35 *A. insuavis* isolates chronically colonizing 2 CF patients assessed by UPGMA cluster analysis of *SpeI*-generated pulsotypes constructed with Dice coefficient. Patient designation is indicated on the dendrogram branches. The Dice's coefficient scale is at the bottom of the dendrogram. B. Schematic representation of temporal trends of pulsotypes and Sequence Types (ST) for *A. insuavis* isolates recovered during chronic colonization in patient 1. Time scale is indicated at the bottom of the Fig. C and recovery of each pulsotype is indicated horizontally according to the time scale by a square: white squares indicate isolates belonging to ST 218, grey squares indicate isolates belonging to ST 242, and dark squares indicate isolates belonging to ST 243. C. Schematic representation of temporal trends of pulsotypes for *A. insuavis* recovered during chronic colonization in patient 13 (all isolates of ST 244). Time scale is indicated at the bottom of the figure and recovery of each pulsotype is indicated horizontally according to the time scale by a triangle: white triangles indicate isolates of pulsotype N, light grey triangles indicate isolates of pulsotype N1, medium grey triangles indicate isolates of pulsotype N2, dark grey triangle indicates isolate of pulsotype N3, and black triangle indicates isolate of pulsotype N4.

2007; Pereira et al., 2011). First French data recently published showed that 6.7% of patients were chronically colonized by *A. xylosoxidans* identified by phenotypic testing, *rrs* and *bla*_{OXA-114} gene sequencing in the Dijon, Burgundy CF center (Amoureux et al., 2013a). Regarding species involved in CFRT chronic colonization, we identified *A. xylosoxidans* to be the major species identified in patients attending the Montpellier CF center on the basis of *nrdA* gene sequencing, a single locus sequence allowing differentiation of the several *Achromobacter* species that can infect persons with CF (Spilker et al., 2013). Chronic colonization of CF patients by *Achromobacter* spp. strains has been commonly reported and attributed to *A. xylosoxidans* (Kanellopoulou et al., 2004; Raso et al., 2008; Amoureux et al., 2013a). However, few studies specifically described the relative distribution of species during chronic colonization in CF patients based on housekeeping gene sequencing allowing undoubted species identification. Our results together with those of Barrado et al. showed that *A. xylosoxidans* is the major species identified by molecular means (Barrado et al., 2013). However, results from other studies, although not specifically designed to study isolates recovered during chronic colonization suggested that *Achromobacter* species distribution could be variable according to the country (Spilker et al., 2013; Wang et al., 2013).

Molecular typing methods mainly used in previous studies of *Achromobacter* spp. isolated from CF or non-CF patients included PFGE of DNA digested by diverse endonucleases according to the

study, i.e., *XbaI*, *DraI*, *SmaI* and *SpeI*; rep-PCR including automated rep-PCR DNA fingerprinting using DiversiLab® system and RAPD (Kaur et al., 2009; Magni et al., 2010; Lambiase et al., 2011; Ridderberg et al., 2011; Amoureux et al., 2013a). Although DiversiLab® was shown a useful tool as efficient as *XbaI*-based PFGE to compare isolates recovered simultaneously from different CF patients when an outbreak is suspected, PFGE remains the reference method for long-term survey of chronically colonized CF patients because serial isolates displaying identical or related pulsotypes in a patient may be classified as different by rep-PCR due to minor variations in profiles (Amoureux et al., 2013a). PFGE was also considered to be the most discriminatory method among phenotypic and genotypic methods including resistotyping, plasmid profiling, whole-cell protein fingerprinting and RAPD (Kaur et al., 2009). *XbaI* is the endonuclease used in a majority of studies (Lambiase et al., 2011; Ridderberg et al., 2011). Here, we compared PFGE experiments based on *XbaI* and *SpeI* selected from the number of restriction sites in 3 *Achromobacter* spp. genomes and the deduced sizes of restriction fragments. We showed that discriminatory power was similar using either enzyme, as observed in the sole previous study using *SpeI* (Ridderberg et al., 2011). However, *SpeI* macrorestriction fingerprints were composed of a lower number of DNA fragments, thereby making the fingerprint interpretation easier and the longitudinal survey of genomic modifications more accurate.

Although the guidelines edited by Tenover et al. for interpreting pulsotypes were not intended for analysis of sets of isolates collected over extended periods as done herein, they are widely used as soon as PFGE is used as a typing method. Based on the results obtained herein on related and unrelated *Achromobacter* isolates, we showed that interpreting criteria proposed can be applied to *A. xylosoxidans* epidemiological studies (Tenover et al., 1995), even in the context of chronic colonization. Indeed, for both *Xba*I- and *Spe*I-generated pulsotypes, no more than 4 and 5 DNA fragments differed between pulsotypes of isolates of a patient while at least 14–15 DNA fragments of difference were observed between unrelated isolates in different patients. A 70% Dice coefficient value can also be considered as a valuable threshold for defining clusters of related *A. xylosoxidans* isolates. Despite the few number of patients colonized by *A. insuavis* in our study, strikingly different observations were made for related isolates belonging to this species, with pulsotypes that may differ by up to 8 DNA fragments in *Xba*I-based PFGE or 9 DNA fragments in *Spe*I-based PFGE, and isolate clusters supported by low Dice coefficient values of about 50%. According to Greenwood et al. showing that within some species (e.g., *Enterococcus faecium*) related isolates can exhibit significant pulsotype variation (6–10 band differences) (Greenwood et al., 2012), our results showed that PFGE-based epidemiological studies on *A. insuavis* should be interpreted using criteria considering such a potentially high strain variability even over short periods of time.

Molecular typing usually revealed that patients harbored their own strains and documented rare cases of cross-contamination among patients of a center or among patients of a family (Lambiase et al., 2011; Pereira et al., 2011; Ridderberg et al., 2011; Turton et al., 2011; Amoureux et al., 2013a). Accordingly, we showed in this study that long-term colonizing strain populations were patient-specific and that one patient chronically colonized by *A. xylosoxidans* showed a transient colonization by a second strain related to that of another patient of the same CF center. As previously observed, the strain firstly colonizing the patient persisted while the second one disappeared (Amoureux et al., 2013a).

During CC of the CFRT, studies either showed that isolates exhibit identical macrorestriction profiles (Kanellopoulou et al., 2004; Lambiase et al., 2011) or concluded that patients carried a single, persistent strain but variations observed between rep-PCR and/or PFGE profiles were not further discussed (Ridderberg et al., 2011; Amoureux et al., 2013a).

In our longitudinal study, we aimed to explore some adaptive traits of *Achromobacter* spp. during CC of the CFRT and to relate the adaptation to particular genome dynamics. Despite its limitation, i.e., the lack of exhaustiveness of isolate collection (exclusion of some isolates with negative subculture, analysis limited to isolates of separate phenotypes within a sample), our study revealed that genomic diversification is a quite constant finding during *Achromobacter* CC because only one out of the 13 studied patients harbored strains with identical pulsotypes and MR-PCR profiles during 13–61 month period of CC. These results were concordant with those reinterpreted from the study of Amoureux et al., in which 4 out of 14 patients harbored isolates with identical PFGE and rep-PCR patterns over shorter periods of colonization (2–17 months) (Table 2 in Amoureux et al., 2013a). Several types of genomic diversity were detected either in PFGE and/or in MR-PCR assays and variations detected by one method or the other were not related to each other suggesting that diverse mechanisms including large and smaller genomic rearrangements accounted for *Achromobacter* genomic variability over time. A similar observation was made from the comparison of PFGE and rep-PCR patterns obtained by Amoureux et al. for serial CF *Achromobacter* isolates (Amoureux et al., 2013a). No general pattern of genome dynamics during CC of the CFRT could be

established but the fact that some clusters displayed only macrorestriction-based diversity, others only PCR-based diversity and others both diversity levels, stresses the need to decipher the genomic mechanisms involved. Particularly, for *A. insuavis*, additional related and unrelated strains have to be studied and the mechanisms supporting the outstanding genomic plasticity in some *A. insuavis* strains persistently colonizing the CFRT has to be investigated. Looking for insertion sequences (IS) and their role could be performed based on the well-known role of IS in the bacterial genomic rearrangements. In *Achromobacter* sp., IS26 and/or IS440 were previously found in 37.5% (9 out of 24) of the strains studied (Traglia et al., 2012) and may be explored. Performing comparative genomics of successively clinical isolates may also be helpful but, contrarily to virulence factors, adaptation markers could be hardly detected on genomic data.

rrn heterogeneity has been suggested to facilitate bacterial adaptation with different variants of rRNA being functional under different environmental conditions (López-López et al., 2007; Jensen et al., 2009). *Achromobacter* sp. A8 (Strnad et al., 2011) and *A. xylosoxidans* NBRC 15126 have 3 *rrs* copies (<http://rrndb.umms.med.umich.edu/>) and a previous study of common CF bacteria showed *A. xylosoxidans* as one of the species displaying the greatest intragenomic *rrs* heterogeneity rate (Michon et al., 2010). In accordance with this, we found that 6 of 13 patients harbored strains displaying intragenomic *rrs* sequence heterogeneity. *rrs* heterogeneity is regarded as a dynamic process originating in genetic divergence of *rrs* copies followed by a lack of intragenomic concerted evolution that could occur if heterogeneity confers a selective advantage to the bacteria (Santoyo and Romero, 2005; Jensen et al., 2009). Longitudinal study of *rrs* sequence heterogeneity showed that serial *Achromobacter* strains may present different TTGE profiles and investigations performed on longer periods of time may help to precise if strains with intragenomic heterogeneity may persist or not in the CFRT and if modification of their pulsotypes and PCR-TTGE profiles during CC of the CFRT may be related to concerted evolution and its associated recombination events (Teyssier et al., 2003).

5. Conclusion

Achromobacter spp. genomic diversity was a constant finding during CC of the CFRT, none of the patients harboring isolates with identical pulsotypes, MR-PCR and PCR-TTGE profiles. Genomic diversification mode varied, being detected by one or several methods used in this study and may be highly variable according to species and/or strain. The study of additional isolates from patients colonized by *A. insuavis* is notably required based on the striking difference in genomic diversification over time observed in our study for *A. insuavis* compared to *A. xylosoxidans*.

The role of genomic diversification of *Achromobacter* populations during CC of the CFRT in adaptation/pathogenesis is thus suggested but remains to be explained. Further studies should therefore consider *Achromobacter* CC of the CFRT in all its complexity by matching complete genome sequencing of successive isolates of clonally related *Achromobacter* strains with ecological studies. Finally, the question of the origin of genomic diversity, i.e., a dynamic process occurring in the patient after transmission of a strain or a more passive process linked to the transmission and the subsequent maintenance of a prior diversified population from the environment should be addressed by studying *Achromobacter* diversity in the environments near CF patients.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge Linda Aleyrangues, Monique Alvado and Agnès Masnou for their excellent technical

assistance, and Sofia Mikou and Marie-Neige Plantard for their contribution to the acquisition of microbiological data. This work was partly supported by the Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche, France, and the association ADEREMPHA, Sauzet, France.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2015.03.012>.

References

- Amoureux, L., Bador, J., Siebor, E., Taillefumier, N., Fanton, A., Neuwirth, C., 2013a. Epidemiology and resistance of *Achromobacter xylosoxidans* from cystic fibrosis patients in Dijon, Burgundy: First French data. *J. Cyst. Fibros.* 12, 170–176.
- Amoureux, L., Bador, J., Fardeheb, S., Mabilie, C., Couchot, C., Massip, C., Salignon, A.L., Berlie, G., Varin, V., Neuwirth, C., 2013b. Detection of *Achromobacter xylosoxidans* in hospital, domestic, and outdoor environmental samples and comparison with human clinical isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 7142–7149.
- Aujoulat, F., Roger, F., Bourdier, A., Lotthé, A., Lamy, B., Marchandin, H., Jumas-Bilak, E., 2012. From environment to man: genome evolution and adaptation of human opportunistic bacterial pathogens. *Genes (Basel)*. 3, 191–232. <http://dx.doi.org/10.3390/genes3020191>.
- Barrado, L., Brañas, P., Orellana, M.Á., Martínez, M.T., García, G., Otero, J.R., Chaves, F., 2013. Molecular characterization of *Achromobacter* isolates from cystic fibrosis and non-cystic fibrosis patients in Madrid, Spain. *J. Clin. Microbiol.* 51, 1927–1930.
- Carriço, J.A., Silva-Costa, C., Melo-Cristino, J., Pinto, F.R., de Lencastre, H., Almeida, J.S., Ramirez, M., 2006. Illustration of a common framework for relating multiple typing methods by application to macrolide-resistant *Streptococcus pyogenes*. *J. Clin. Microbiol.* 44, 2524–2532.
- De Baets, F., Schelstraete, P., Van Daele, S., Haerynck, F., Vanechoutte, M., 2007. *Achromobacter xylosoxidans* in cystic fibrosis: prevalence and clinical relevance. *J. Cyst. Fibros.* 6, 75–78.
- Gouby, A., Neuwirth, C., Bourg, G., Bouziges, N., Carles-Nurit, M.-J., Despaux, E., Ramuz, M., 1994. Epidemiological study by pulsed-field gel electrophoresis of an outbreak of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a geriatric hospital. *J. Clin. Microbiol.* 32, 301–305.
- Greenwood, D., Barer, M., Slack, R., Irving, W., 2012. Typing of bacteria. *Medical Microbiology*, C. Linvingstone, Elsevier.
- Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp.* Ser. 41, 95–98.
- Hauser, A.R., Jain, M., Bar-Meir, M., McColley, S.A., 2011. Clinical significance of microbial infection and adaptation in cystic fibrosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 24, 29–70.
- Hansen, C.R., Pressler, T., Nielsen, K.G., Jensen, P.Ø., Bjarnsholt, T., Høiby, N., 2010. Inflammation in *Achromobacter xylosoxidans* infected cystic fibrosis patients. *J. Cyst. Fibros.* 9, 51–58.
- Hunter, P.R., Gaston, M.A., 1988. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J. Clin. Microbiol.* 26, 2465–2466.
- Jakobsen, T.H., Hansen, M.A., Jensen, P.Ø., Hansen, L., Riber, L., Cockburn, A., Kolpen, M., Ronne Hansen, C., Ridderberg, W., Eickhardt, S., Hansen, M., Kerpedjiev, P., Alhede, M., Qvortrup, K., Burmølle, M., Moser, C., Köhl, M., Ciofu, O., Givskov, M., Sørensen, S.J., Høiby, N., Bjarnsholt, T., 2013. Complete genome sequence of the cystic fibrosis pathogen *Achromobacter xylosoxidans* NH44784-1996 complies with important pathogenic phenotypes. *PLoS One* 8, e68484.
- Jensen, S., Frost, P., Torsvik, V.L., 2009. The nonrandom microheterogeneity of 16S rRNA genes in *Vibrio splendidus* may reflect adaptation to versatile lifestyles. *FEMS Microbiol. Lett.* 294, 207–215.
- Kanellopoulou, M., Pournaras, S., Iglezos, H., Skarmoutsou, N., Papafrangas, E., Maniatis, A.N., 2004. Persistent colonization of nine cystic fibrosis patients with an *Achromobacter (Alcaligenes) xylosoxidans* clone. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 23, 336–339.
- Kaur, M., Ray, P., Bhatta, M., Sharma, M., 2009. Epidemiological typing of clinical isolates of *Achromobacter xylosoxidans*: comparison of phenotypic and genotypic methods. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 28, 1023–1032.
- Lambiase, A., Catania, M.R., Del Pezzo, M., Rossano, F., Terlizzi, V., Sepe, A., Raia, V., 2011. *Achromobacter xylosoxidans* respiratory tract infection in cystic fibrosis patients. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 30, 973–980.
- Li, X., Hu, Y., Gong, J., Zhang, L., Wang, G., 2013. Comparative genome characterization of *Achromobacter* members reveals potential genetic determinants facilitating the adaptation to a pathogenic lifestyle. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 6413–6425.
- López-López, A., Benlloch, S., Bonfá, M., Rodríguez-Valera, F., Mira, A., 2007. Intra-genomic 16S rDNA divergence in *Haloarcula marismortui* is an adaptation to different temperatures. *J. Mol. Evol.* 65, 687–696.
- Magni, A., Trancassini, M., Varesi, P., Iebba, V., Curci, A., Pecoraro, C., Cimino, G., Schippa, S., Quattrucci, S., 2010. *Achromobacter xylosoxidans* genomic characterization and correlation of randomly amplified polymorphic DNA profiles with relevant clinical features of cystic fibrosis patients. *J. Clin. Microbiol.* 48, 1035–1039.
- Mercier, E., Jumas-Bilak, E., Allardet-Servent, A., O'Callaghan, D., Ramuz, M., 1996. Polymorphism in *Brucella* strains detected by studying distribution of two short repetitive DNA elements. *J. Clin. Microbiol.* 34, 1299–1302.
- Michon, A.-L., Aujoulat, F., Roudière, L., Soulier, O., Zornio, I., Jumas-Bilak, E., Marchandin, H., 2010. Intra-genomic and intraspecific heterogeneity in *rrs* may surpass interspecific variability in a natural population of *Veillonella*. *Microbiology* 156, 2080–2091.
- Michon, A.-L., Jumas-Bilak, E., Imbert, A., Aleyrangues, L., Counil, F., Chiron, R., Marchandin, H., 2012. Intra-genomic and intraspecific heterogeneity of the 16S rRNA gene in seven bacterial species from the respiratory tract of cystic fibrosis patients assessed by PCR-Temporal Temperature Gel Electrophoresis. *Pathol. Biol. (Paris)* 60, e30–35.
- Ogier, J.C., Son, O., Gruss, A., Tailliez, P., Delacroix-Buchet, A., 2002. Identification of the bacterial microflora in dairy products by temporal temperature gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 3691–3701.
- Pereira, R.H., Carvalho-Assef, A.P., Albano, R.M., Folescu, T.W., Jones, M.C., Leão, R.S., Marques, E.A., 2011. *Achromobacter xylosoxidans*: characterization of strains in Brazilian cystic fibrosis patients. *J. Clin. Microbiol.* 49, 3649–3651.
- Raso, T., Bianco, O., Grosso, B., Zucca, M., Savoia, D., 2008. *Achromobacter xylosoxidans* respiratory tract infections in cystic fibrosis patients. *APMIS* 116, 837–841.
- Ridderberg, W., Bendstrup, K.E., Olesen, H.V., Jensen-Fangel, S., Nørskov-Lauritsen, N., 2011. Marked increase in incidence of *Achromobacter xylosoxidans* infections caused by sporadic acquisition from the environment. *J. Cyst. Fibros.* 10, 466–469.
- Ridderberg, W., Wang, M., Nørskov-Lauritsen, N., 2012. Multilocus sequence analysis of isolates of *Achromobacter* from patients with cystic fibrosis reveals infecting species other than *Achromobacter xylosoxidans*. *J. Clin. Microbiol.* 50, 2688–2694.
- Santoyo, G., Romero, D., 2005. Gene conversion and concerted evolution in bacterial genomes. *FEMS Microbiol. Rev.* 29, 169–183.
- Severiano, A., Pinto, F.R., Ramirez, M., Carriço, J.A., 2011. Adjusted Wallace coefficient as a measure of congruence between typing methods. *J. Clin. Microbiol.* 49, 3997–4000.
- Spilker, T., Vandamme, P., Lipuma, J.J., 2012. A multilocus sequence typing scheme implies population structure and reveals several putative novel *Achromobacter* species. *J. Clin. Microbiol.* 50, 3010–3015.
- Spilker, T., Vandamme, P., Lipuma, J.J., 2013. Identification and distribution of *Achromobacter* species in cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros.* 12, 298–301.
- Strnad, H., Ridl, J., Paces, J., Kolar, M., Vitek, C., Paces, V., 2011. Complete genome sequence of the haloaromatic acid-degrading bacterium *Achromobacter xylosoxidans* A8. *J. Bacteriol.* 193, 791–792.
- Tan, K., Conway, S.P., Brownlee, K.G., Etherington, C., Peckham, D.G., 2002. *Alcaligenes* infection in cystic fibrosis. *Pediatr. Pulmonol.* 34, 101–104.
- Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Goering, R.V., Mickelsen, P.A., Murray, B.E., Persing, D.H., Swaminathan, B., 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* 33, 2233–2239.
- Teyssier, C., Marchandin, H., Siméon de Buochberg, M., Ramuz, M., Jumas-Bilak, E., 2003. Atypical 16S rRNA gene copies in *Ochrobactrum intermedium* strains reveal a large genomic rearrangement by recombination between *rrn* copies. *J. Bacteriol.* 185, 2901–2909.
- Traglia, G.M., Almuzara, M., Merkl, A.K., Adams, C., Galanter, L., Vay, C., Centrón, D., Ramirez, M.S., 2012. *Achromobacter xylosoxidans*: an emerging pathogen carrying different elements involved in horizontal genetic transfer. *Curr. Microbiol.* 65, 673–678.
- Turton, J.F., Mustafa, N., Shah, J., Hampton, C.V., Pike, R., Kenna, D.T., 2011. Identification of *Achromobacter xylosoxidans* by detection of the *bla*(OXA-114-like) gene intrinsic in this species. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 70, 408–411.
- Vandamme, P., Moore, E.R., Cnockaert, M., De Brandt, E., Svensson-Stadler, L., Houf, K., Spilker, T., Lipuma, J.J., 2013a. *Achromobacter animicus* sp. nov., *Achromobacter mucicolens* sp. nov., *Achromobacter pulmonis* sp. nov. and *Achromobacter spiritinus* sp. nov., from human clinical samples. *Syst. Appl. Microbiol.* 36, 1–10.
- Vandamme, P., Moore, E.R., Cnockaert, M., Peeters, C., Svensson-Stadler, L., Houf, K., Spilker, T., Lipuma, J.J., 2013b. Classification of *Achromobacter* genogroups 2, 5, 7 and 14 as *Achromobacter insuavis* sp. nov., *Achromobacter aegrifaciens* sp. nov., *Achromobacter anxifer* sp. nov. and *Achromobacter dolens* sp. nov., respectively. *Syst. Appl. Microbiol.* 36, 474–482.
- Versalovic, J., Kapur, V., Koeuth, T., Mazurek, G.H., Whittam, T.S., Musser, J.M., Lupski, J.R., 1995. DNA fingerprinting of pathogenic bacteria by fluorophore-enhanced repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 119, 23–29.
- Versalovic, J., Koeuth, T., Lupski, J.R., 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* 19, 6823–6831.
- Wang, M., Ridderberg, W., Hansen, C.R., Høiby, N., Jensen-Fangel, S., Olesen, H.V., Skov, M., Lemming, L.E., Pressler, T., Johansen, H.K., Nørskov-Lauritsen, N., 2013. Early treatment with inhaled antibiotics postpones next occurrence of *Achromobacter* in cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros.* 12, 638–643.
- Yang, L., Jelsbak, L., Molin, S., 2011. Microbial ecology and adaptation in cystic fibrosis airways. *Environ. Microbiol.* 13, 1682–1689.

III Evolution adaptative et patho-adaptation de *Pandoraea pulmonicola* lors de la colonisation chronique d'un patient CF

Les bactéries du genre *Pandoraea* sont des bactéries opportunistes émergentes d'origine environnementale colonisant chroniquement les VRCF. Les bactéries de ce genre, tout comme *P. aeruginosa* et *B. cenocepacia*, sont considérées comme pathogènes (Mahenthalingam 2014). Du fait de leur faible prévalence, peu de travaux ont étudié la colonisation chronique par les bactéries de ce genre.

L'objectif de ce travail était d'étudier l'évolution adaptative de bactéries appartenant au genre *Pandoraea* au cours du temps de la colonisation chronique d'un patient du CRCM de Montpellier et de relier les variants génotypiques et phénotypiques observés au statut clinique du patient. Pour cela, nous avons étudié 31 souches, provenant de 18 échantillons prélevés durant une période de 7 ans. L'identification de l'espèce *P. pulmonicola* a été réalisée par le séquençage des gènes de l'ARNr 16S et *gyrB*. La dynamique du génome a été évaluée par ECP, ERIC-PCR et PCR ADNr 16S-TTGE tandis que les caractéristiques phénotypiques étudiées comprenaient la résistance aux antibiotiques, la motilité, la production de biofilm et l'étude de la virulence dans le modèle *Caenorhabditis elegans*. Les données cliniques du patient ont été collectées à partir de son dossier médical au CRCM du CHU de Montpellier.

Toutes les souches étudiées appartenaient à un même clone. Nous avons observé des variations génomiques et phénotypiques des isolats au cours du temps mais également pour des colonies de morphotypes distincts isolés au sein d'un même échantillon. De plus, au moment d'une forte exacerbation pulmonaire du patient, nous avons observé qu'une souche de génotype minoritaire était plus virulente que les autres dans le modèle *C. elegans*. Ces résultats suggèrent la diversification d'une population clonale en relation avec la patho-adaptation dans les VRCF.

Les résultats de cette étude ont été présentés dans l'article suivant :

Article II

Dupont C, Aujoulat F, Chiron R, Condom P., Jumas-Bilak E., Marchandin H. Highly diversified *Pandoraea* population during chronic colonization in Cystic Fibrosis: a key to persistence?

Soumis à *Frontiers in Microbiology*

Highly diversified *Pandoraea pulmonicola* population during chronic colonization in Cystic Fibrosis

Chloé DUPONT¹, Fabien AUJOLAT¹, Raphaël CHIRON², Pauline CONDOM¹, Estelle JUMAS-BILAK¹,
Hélène MARCHANDIN^{1*}

¹University of Montpellier, France, ²University Hospital of Montpellier, France

Submitted to Journal:
Frontiers in Microbiology

Specialty Section:
Infectious Diseases

Article type:
Original Research Article

Manuscript ID:
234482

Received on:
01 Oct 2016

Frontiers website link:
www.frontiersin.org

In review

Conflict of interest statement

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest

Author contribution statement

Conceived and designed the study: CD, FA, EJB, HM ;
Designed and performed the acquisition of clinical isolate collection: HM ;
Performed the acquisition of clinical data: RC, PC ;
Performed the acquisition of microbiological data: CD, FA, PC, HM ;
Performed the microbial analyses: CD, FA ;
Analyzed and interpreted the data: CD, FA, EJB, HM ;
Drafted the paper: CD, FA, HM ;
Critically revised the manuscript: RC, PC, EJB.
All authors read and approved the final manuscript.

Keywords

Cystic Fibrosis, Pandoraea, Diversity., Persistence, Adaptation, Biological, Biofilm formation, motility, antimicrobial resistance, Virulence

Abstract

Word count: 233

Several environmental bacteria are considered as opportunistic pathogens in Cystic Fibrosis (CF) and are able to persistently colonize the respiratory tract (CFRT). Beside *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* complex, *Pandoraea* spp. are defined as pathogenic. During chronic colonization, adaptive evolution and diversified population have been demonstrated, notably for *P. aeruginosa*. However, the persistence of *Pandoraea* in the CFRT remains largely unexplored.

We studied genomic and phenotypic traits of *Pandoraea pulmonicola* isolates successively recovered from the airways of a single CF patient and relate the results to qualitative and quantitative evolution of other cultivable pathogens and to patient clinical status.

A total of 31 isolates recovered from 18 sputum samples over a 7-year period in a single CF patient were studied. Genome dynamics was assessed by Pulsed-Field Gel Electrophoresis, ERIC-PCR fingerprinting and 16S rRNA gene PCR-Temporal Temperature Gel Electrophoresis. Phenotypic features included antimicrobial susceptibility, motility, biofilm production and virulence in *Caenorhaditis elegans* model.

Variability was observed for all the characteristics studied leading to highly diversified patterns (24 patterns) for the 31 clonally related isolates. Some of these modifications, mainly genomic events were concomitantly observed with CFRT microbiota composition shifts and with severe exacerbations.

The diversity of *P. pulmonicola* population studied, observed for isolates recovered from successive samples but also within a sample suggested that existence of a diversified population may represent a patho-adaptive strategy for host persistence in the heterogeneous and fluctuating CFRT environment.

Funding statement

No funding to declare

Ethics statements

(Authors are required to state the ethical considerations of their study in the manuscript, including for cases where the study was exempt from ethical approval procedures)

Does the study presented in the manuscript involve human or animal subjects: No

1 **Highly diversified *Pandoraea pulmonicola* population during**
2 **chronic colonization in Cystic Fibrosis**

3
4 **Chloé Dupont¹, Fabien Aujoulat¹, Raphaël Chiron², Pauline Condom³, Estelle Jumas-**
5 **Bilak^{1,4}, Hélène Marchandin^{1,3*}**

6
7 ¹ Equipe Pathogènes Hydriques, Santé, Environnements; UMR5569 Hydrosiences
8 Montpellier; U.F.R des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques; Université Montpellier,
9 Montpellier, France

10 ² Centre de Ressources et de Compétences pour la Mucoviscidose, Hôpital Arnaud de
11 Villeneuve, Centre Hospitalier Universitaire de Montpellier, Montpellier, France

12 ³ Laboratoire de Bactériologie, Hôpital Arnaud de Villeneuve, Centre Hospitalier
13 Universitaire de Montpellier, Montpellier, France

14 ⁴ Laboratoire d'Hygiène hospitalière, Hôpital Saint-Eloi, Centre Hospitalier Universitaire de
15 Montpellier, Montpellier , France

16
17 ***Correspondence:**

18 Prof. Hélène Marchandin

19 helene.marchandin@umontpellier.fr

20
21 **Key words:** Cystic fibrosis; *Pandoraea*; diversity; persistence; adaptation; biofilm; motility;
22 antimicrobial resistance; virulence

23
24 **Running title:** Diversity in CF *Pandoraea pulmonicola* persisting population

25
26 This work was presented in part at the 29th Annual North American Cystic Fibrosis
27 Conference, October 8-10, 2015, Phoenix, Arizona.

29 **Abstract**

30 Several environmental bacteria are considered as opportunistic pathogens in Cystis Fibrosis
31 (CF) and are able to persistently colonize the respiratory tract (CFRT). Beside *Pseudomonas*
32 *aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* complex, *Pandoraea* spp. are defined as pathogenic.
33 During chronic colonization, adaptive evolution and diversified population have been
34 demonstrated, notably for *P. aeruginosa*. However, the persistence of *Pandoraea* in the
35 CFRT remains largely unexplored. We studied genomic and phenotypic traits of *Pandoraea*
36 *pulmonicola* isolates successively recovered from the airways of a single CF patient and relate
37 the results to qualitative and quantitative evolution of other cultivable pathogens and to
38 patient clinical status.

39 A total of 31 isolates recovered from 18 sputum samples over a 7-year period in a single CF
40 patient were studied. Genome dynamics was assessed by Pulsed-Field Gel Electrophoresis,
41 ERIC-PCR fingerprinting and 16S rRNA gene PCR-Temporal Temperature Gel
42 Electrophoresis. Phenotypic features included antimicrobial susceptibility, motility, biofilm
43 production and virulence in *Caenorhaditis elegans* model.

44 Variability was observed for all the characteristics studied leading to highly diversified
45 patterns (24 patterns) for the 31 clonally related isolates. Some of these modifications, mainly
46 genomic events were concomitantly observed with CFRT microbiota composition shifts and
47 with severe exacerbations.

48 The diversity of *P. pulmonicola* population studied, observed for isolates recovered from
49 successive samples but also within a sample suggested that existence of a diversified
50 population may represent a patho-adaptive strategy for host persistence in the heterogeneous
51 and fluctuating CFRT environment.

52

53 **1 Introduction**

54 The genus *Pandoraea* was described in 2000, it belongs to the family *Burkholderiaceae* and
55 comprises 10 species mainly cultured from sputum of Cystic Fibrosis (CF) patients or soil.
56 Currently, 20 *Pandoraea* genomes are totally sequenced, including a unique *P. pulmonicola*
57 genome. *Pandoraea* species are considered as emerging pathogens and infection led to the
58 production of high levels of antibodies, and to a worsened CF lung disease (Jørgensen *et al.*
59 2003; Mahenthiralingam, 2014; Degand *et al.*, 2015). After first colonization, *Pandoraea* spp.
60 were able to chronically colonize the CF respiratory tract (CFRT) (Kokcha *et al.*, 2013), were
61 transmissible between patients (Jørgensen *et al.* 2003; Degand *et al.*, 2015) and can produce
62 severe lung diseases and bacteremia (Pimentel *et al.*, 2008; Kokcha *et al.*, 2013). The
63 pathogenicity appears mainly supported by a pro-inflammatory response induction
64 significantly greater than with *P. aeruginosa* (Caraher *et al.*, 2008; Costello *et al.*, 2014) and
65 the treatment may be complicated by multidrug resistance conferred by carbapenem-
66 hydrolyzing oxacillinases (Caraher *et al.*, 2008). *Pandoraea pulmonicola* showed an ability to
67 invade human lung epithelial cells, not shared by other *Pandoraea* species (Caraher *et al.*,
68 2008) and was the most virulent species, being as virulent as *Burkholderia cenocepacia* in the
69 *Galleria mellonella* larvae model (Costello *et al.*, 2011). The potential involvement of
70 *Pandoraea* in complex interactions between microorganisms within the CF airways was also
71 suggested (Costello *et al.*, 2014).

72
73 During long-term colonization, adaptive evolution was found in most CF pathogens and was
74 particularly studied for *P. aeruginosa* and *Burkholderia* spp. (Silva *et al.*, 2011). In *P.*
75 *aeruginosa*, evolutionary adaptation and phenotype diversification occur during CFRT
76 colonization (Hauser *et al.*, 2011; Winstanley *et al.*, 2016 for reviews). These variations
77 generally lead to decreased immunogenicity and virulence while antibiotic resistance globally
78 increases. In addition, some studies revealed a diversified population within a sample and
79 suggested that this diversity may also represent an adaptive strategy for host persistence
80 (Lieberman *et al.*, 2014; Winstanley *et al.*, 2016).

81
82 Adaptive behavior of other CF pathogens has received less attention although an increased
83 virulence has been suggested during chronic colonization for *P. pulmonicola* (Costello *et al.*,
84 2011). Here, we studied the diversity of genomic and phenotypic traits of *P. pulmonicola*
85 isolates recovered from the airways of a CF patient over a 7-year period. Results were related
86 to the overall dynamics of the cultivable CFRT pathogens and to the patient clinical status.

87 88 **2 Materials & Methods**

89 90 **2.1 Patient, bacterial isolates, clinical and follow-up microbiological data**

91 *Pandoraea* isolates were recovered from 18 sputum samples from a single CF patient
92 attending the CF center of the University Hospital of Montpellier, South of France. All
93 samples were analyzed according to national recommendations (Société Française de
94 Microbiologie, 2015) and the initial isolate was identified by 16S rRNA gene sequencing.
95 Isolates were named with numbers (1 to 18) according to chronological sampling order, and
96 isolates with different colonial morphotypes in a sample were named with the same number
97 followed by apostrophe(s). Selected co-colonizing *P. aeruginosa* (Pa13 isolated in September
98 2013) and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (Sa14 isolated in January 2014)
99 isolated at the time of or close to the most severe pulmonary exacerbation experienced by the
100 patient during the study period, were also studied. Sputum culture results (bacterial
101 identification, load) and clinical data (forced expiratory volume in 1 second (FEV₁), body

102 mass index, pulmonary exacerbations/stable status, antibiotic courses) were recorded. This *in*
103 *vitro* study did not require an ethical committee agreement because it involved bacterial
104 strains acquired during routine diagnostic procedures, only general data patient were reported,
105 and no patient intervention occurred with the obtained results; non-opposition has been
106 verbally obtained from the patient.

107

108 **2.2. Antimicrobial susceptibility testing**

109 Antimicrobial susceptibility testing was performed according to the 2016 recommendations of
110 the Antibiogram Committee of the French Society for Microbiology ([http://www.sfm-](http://www.sfm-microbiologie.org/UserFiles/files/casfm/CASFM2016_V1_0_FEVRIER.pdf)
111 [microbiologie.org/UserFiles/files/casfm/CASFM2016_V1_0_FEVRIER.pdf](http://www.sfm-microbiologie.org/UserFiles/files/casfm/CASFM2016_V1_0_FEVRIER.pdf)). Disc diffusion
112 method was performed for amikacin, amoxicillin +/- clavulanic acid, aztreonam, cefalotin,
113 cefepime, cefoxitin, cefpirom, cefotaxime, ceftazidime, chloramphenicol, ciprofloxacin,
114 colistin, cotrimoxazole, fosfomycin, gentamicin, imipenem, isepamicin, levofloxacin,
115 moxalactam, nalidixic acid, netilmicin, ofloxacin, piperacillin, piperacillin/tazobactam,
116 tetracycline, ticarcillin +/- clavulanic acid and tobramycin (Bio-Rad®). E-test (bioMérieux®)
117 was performed when inhibition zone diameters were observed around discs, and MIC results
118 that differed by more than two dilutions were considered as different.

119

120 **2.3 Motility and biofilm formation**

121 Motility of *Pandoraea* isolates was tested in semi-solid agar according to Kirov *et al.*, 2004.
122 Biofilm formation was evaluated after 72h of growth for *Pandoraea* isolates and after 48h of
123 growth for *P. aeruginosa* and *S. aureus* at 37 °C in microtitre plates NUNC®-polystyrene
124 (Abdouchakour *et al.*, 2015). Isolates were categorized as non-adherent or weakly,
125 moderately, or strongly adherent according to Stepanovic *et al.* (Stepanovic *et al.*, 2000).
126 Experiments were performed in triplicate.

127

128 **2.4 Virulence assay in *Caenorhabditis elegans***

129 Virulence assays were performed in *C. elegans* model as previously described (Mosser *et al.*,
130 2015), except that NGM agar plates were inoculated with bacterial culture grown in
131 Trypticase Soy Broth (TSB) for 24h and incubated at 37 °C for 28h. *Escherichia coli* OP50,
132 avirulent in *C. elegans* model, and *Pandoraea* Pp14' were included in each experiment. The
133 effect of *Pandoraea* culture supernatant on virulence and biofilm formation of 2 co-
134 colonizing isolates (*S. aureus* Sa14 and *P. aeruginosa* Pa13) was tested by replacing TSB
135 used for the initial culture of Sa14 and Pa13 by a mix of TSB 2X and *Pandoraea* culture
136 supernatant (0.22µm filtration of 48h culture in TSB at 37 °C) (vol/vol).

137

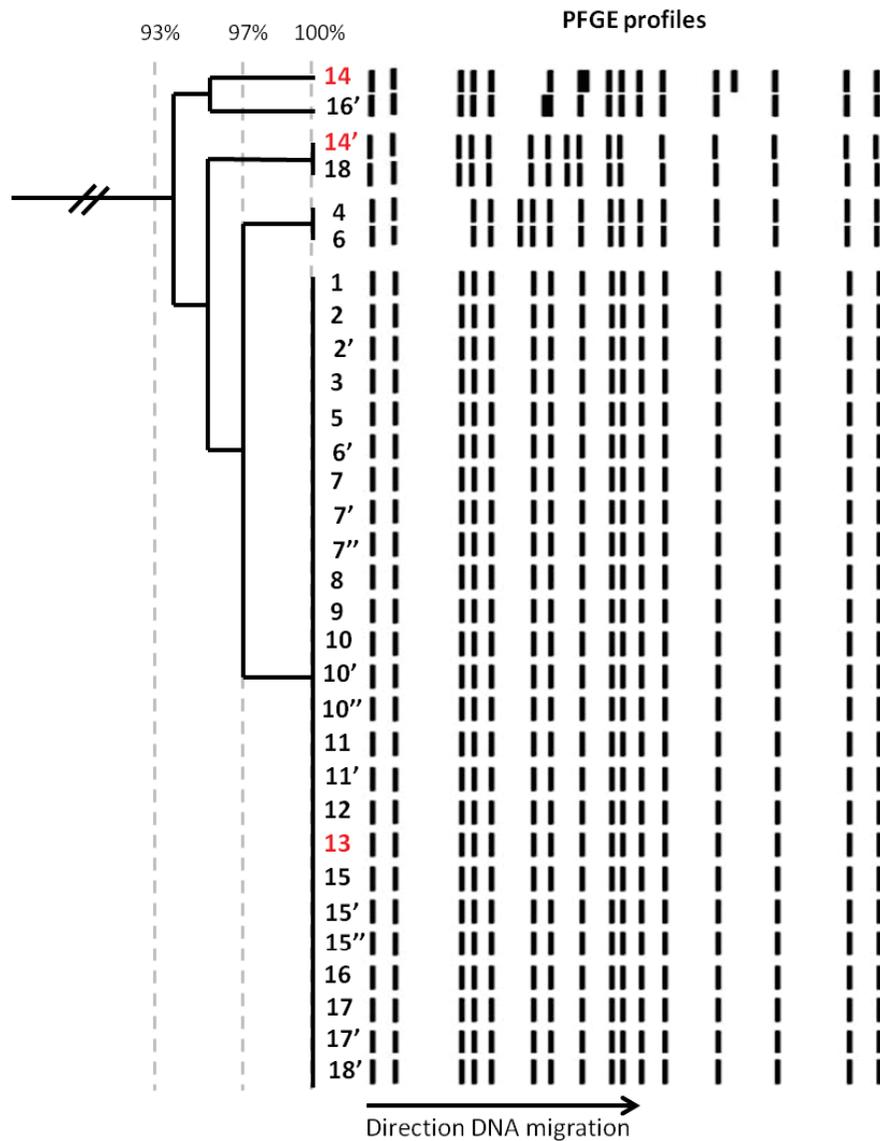
138 **2.5 Gene sequencing and genome fingerprinting**

139 16S rRNA and *gyrB* gene sequencing were performed as previously described (Carlier *et al.*,
140 2002; Coeyne & LiPuma, 2002). Pulsed-Field Gel Electrophoresis after DNA
141 macrorestriction by *Xba*I (Dupont *et al.*, 2015), 16S rRNA gene PCR-Temporal Temperature
142 Gel Electrophoresis (Dupont *et al.*, 2015), and Enterobacterial repetitive intergenic consensus
143 sequence-based PCR (ERIC-PCR) fingerprints (Atkinson *et al.*, 2006) were performed as
144 previously described. Pulsotype clustering analysis was based on Dice coefficient and
145 Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean (UPGMA)
146 (<http://genomes.urv.cat/UPGMA/>). Simpson's Index of Diversity and Adjusted Wallace
147 Coefficient (AWC) were calculated by using Comparing Partitions
148 (<http://www.comparingpartitions.info/>). AWC was used to evaluate the degree of congruence
149 among all isolates' features.

150

Figure 1

A



B

PFGE (<i>Xba</i> I)	ERIC-PCR	16S rDNA PCR-TTGE	MIC values CTX / PZT	Swimming motility	Swarming motility	Biofilm production	Combined profile	
P3	E6 (D)	1	>32 / >256	-	-	-	1	★
P5	E6 (D)	1	>32 / >256	-	+	-	2	
P4	E5 (D)	1	>32 / >256	-	-	-	3*	★
	E2 (A)	1	>32 / >256	-	-	w	4	★
P2	E4 (C)	1	>32 / >256	+	+	-	5	★
	E5 (D)	1+2	>32 / 64	-	-	-	6	
P1	E2 (A)	1	>32 / >256	+	+	-	7	
	E1 (A)	1	>32 / >256	-	+	-	8	★
	E1 (A)	1	>32 / >256	+	+	w	9	★
	E3 (B)	1	>32 / >256	+	-	w	10	★
	E3 (B)	1	>32 / >256	+	-	-	11	
	E5 (D)	1	>32 / >256	+	-	-	12	
	E5 (D)	1	>32 / >256	+	-	-	12	
	E6 (D)	1	12 / >256	+	-	-	13	
	E1 (A)	1	>32 / >256	+	+	-	14	★
	E7 (B)	1+2	8 / >256	+	+	-	15	★
	E7 (B)	1	>32 / >256	+	-	w	16	★
	E7 (B)	1	32 / >256	+	-	w	16	
	E7 (B)	1	>32 / >256	+	-	-	17	
	E3 (B)	1	>32 / >256	+	-	-	11	
	E1 (A)	1	>32 / >256	-	+	-	8	
	E5 (D)	1	>32 / >256	-	-	w	18	
	E5 (D)	1	>32 / >256	+	-	-	12	
	E6 (D)	1	16 / >256	-	-	-	19	
	E1 (A)	1	>32 / >256	+	-	w	20	
	E1 (A)	1	>32 / >256	+	-	-	21	
	E2 (A)	1	>32 / >256	-	-	-	22	
	E2 (A)	1	>32 / >256	-	-	w	23	
E6 (D)	1	>32 / >256	-	+	-	24		
E6 (D)	1	>32 / >256	+	-	-	13		
E2 (A)	1	>32 / >256	-	-	-	22	★	

Fig. 1. Genomic and phenotypic variability among 31 *Pandoraea pulmonicola* isolates recovered from 18 sputum specimens sampled over a 7-year period in a CF patient.

A. Genomic diversity among of *Xba*I-generated pulsotypes obtained for sequential isolates assessed by clustering analysis based on Dice coefficient and Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean (UPGMA). The Dice's coefficient scale is shown at the top of the dendrogram. Strains were named with numbers (1 to 18) according to chronological sampling order, and strains with different colonial morphotypes in a sample were named with the same number followed by apostrophe(s) (for example 10, 10', 10'' correspond to 3 morphotypes recovered from the tenth sample out of 18). The supernatants of the 3 strains noted in red (13, 14 and 14') were included in the virulence assays in *Caenorhabditis elegans* model.

B. Summary of variability observed for genotypic and phenotypic characteristics. P1 to P5 are the different pulsotypes observed after *Xba*I-macrorestriction and Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE). E1 to E7 are the different profiles observed by Enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence-based PCR (ERIC-PCR). A to D corresponded to ERIC-PCR clusters formed by very related profiles differing by no more than 2 bands. Banding patterns obtained by 16S rDNA PCR-Temporal Temperature Gel Electrophoresis (TTGE) were named according to the bands observed as follows: 1 for profile composed by the unique band 1, and 1+2 for profile composed by the two bands 1 and 2. Minimal Inhibitory Concentrations (MIC) were given for cefotaxime (CTX) and piperacillin-tazobactam (PZT) in mg/L and bold type indicated values differing by more than two dilutions from others. The combined profile was established on the basis of the results presented in the 7 preceding columns; if the 7 traits were common, isolates were assigned the same combined profile. Stars indicated strains isolated at the time of an episode of pulmonary exacerbation (one color per episode).

+, positive; -, negative; w, weak; *, strain with combined profile 3 also diverged by a punctual mutation in the *gyrB* sequence.

151 **3 Results**

152

153 **3.1 Genetic relatedness and variations among *Pandoraea* isolates**

154 Thirty-one *Pandoraea* isolates were recovered from 18 sputum samples (2 to 3 colonial
155 morphotypes differing by their size, color and/or form and visually detected during the
156 routine analysis of the sputum samples were analyzed for 10 samples) over a 7-year period of
157 colonization (May 2008-February 2015) in a 22-year-old CF male patient. Partial 16S rDNA
158 sequences of 1445 bp were identical for 29 isolates, the two remaining sequences (isolates
159 Pp6 and Pp8) differing by one identical single nucleotide. The most related 16S rDNA
160 sequences for type strains were those of *P. pulmonicola* CCUG 38759^T (>99.6% identity) and
161 *Pandoraea pnomenus* CCUG 38742^T (99.2%). Partial *gyrB* gene sequences (672 bp) were
162 identical for 30 isolates, the sequence of isolate Pp14' displaying one point mutation. The
163 *gyrB* sequences presented 93.5% identity with that of the closest species *P. pulmonicola*
164 strain DSM 16583^T, a value compatible with the intraspecific variability described in other
165 *Pandoraea* species (Coenye & LiPuma, 2002). These results suggested that the 31 isolates
166 belonged to *P. pulmonicola*.

167

168 Molecular fingerprints revealed the *P. pulmonicola* isolates to be clonally related thereby
169 confirming the chronic colonization. Main pulsotype P1 was observed for 25 isolates while 4
170 other pulsotypes differing by no more than 5 DNA fragments from pulsotype P1, were each
171 observed for one or two isolates (Fig. 1). ERIC-PCR appeared more discriminative (7
172 profiles, E1 to E7 in Figure 1 and Simpson's Index of Diversity, SID=0.862) than PFGE
173 (SID=0.351) but non congruent with PFGE clusterisation (AWC=0.003) (Fig. 1). The
174 grouping of closely related ERIC-PCR profiles in clusters named A to D in Figure 1 did not
175 enhance the congruence with PFGE profiles clusterisation (Fig. 1). The 16S rRNA gene PCR-
176 TTGE showed that a majority of isolates (29/31) harbored identical V3 region in all *rrs*
177 copies. Copies with sequences differing by a guanine base addition (position 389 in the V3
178 region, *Escherichia coli* K12 numbering (Sundquist et al. 2007)) were found in the isolates
179 Pp6 and Pp8 (Fig. 1), isolates which displayed in consequence different 16S rDNA
180 sequences.

181

182 **3.2 Phenotype-wide variations among *P. pulmonicola* isolates**

183 All isolates were multidrug resistant. For most antibiotics, no inhibition zone diameters were
184 observed around discs. MICs were performed for piperacillin-tazobactam, cefotaxime,
185 imipenem and cotrimoxazole. Differences of 2 dilutions or more were observed for
186 cefotaxime MIC for Pp8 and for piperacillin-tazobactam MIC for Pp6 compared with MIC
187 values obtained for other isolates (Fig. 1). Resistance traits (MICs) were congruent with 16S
188 rRNA gene PCR-TTGE profiles (AWC=1.00). Swimming and swarming motilities were
189 observed for 58% and 29% of the isolates, respectively. Eight *P. pulmonicola* isolates (26%)
190 were weak biofilm producers, the others being non-adherent. In most cases (except Pp14/14'
191 and Pp10'/10''), different colonial morphotypes in the same sample differed in their ability to
192 swim, to swarm or to adhere (Fig. 1). Motility and adhesion were unrelated to other traits,
193 such as resistance or genotype (AWC<0.1).

194

195 **3.3 Overall variability trends**

196 Variability was observed for all the characteristics studied, either for isolates recovered from
197 serial samples but also between all isolates showing distinct colonial morphotypes within a
198 sample. When results were combined, 24 sub-types were identified for the 31 clonally related
199 isolates, highlighting that studied *Pandoraea* population was highly diverse (Fig. 1). The only

Figure 2

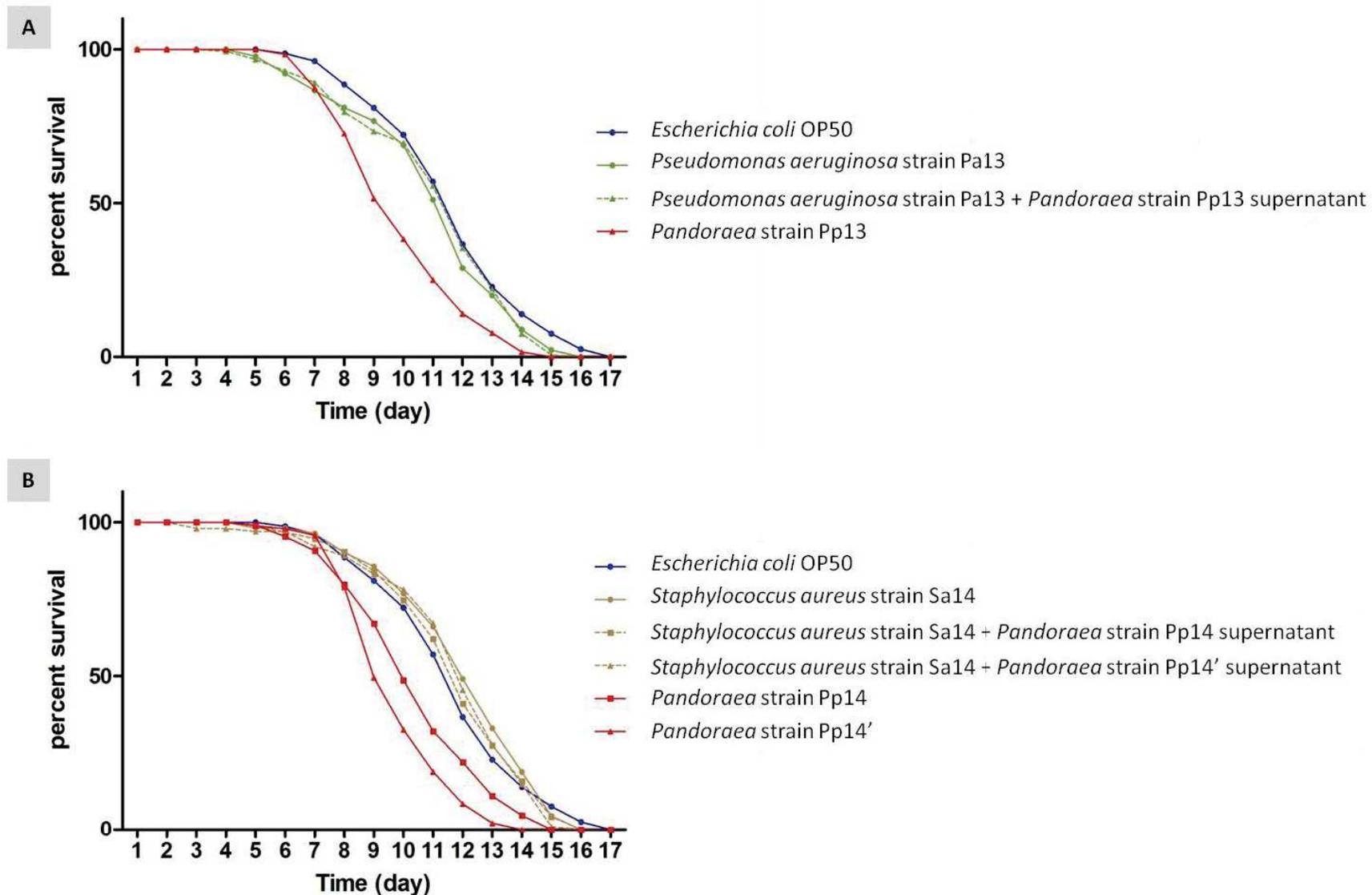


Fig. 2. Survival curves of *Caenorhabditis elegans* fed either with *Pandoraaea pulmonicola*, co-colonizing pathogen or co-colonizing pathogen supplemented with *Pandoraaea* culture supernatant, compared to control (avirulent *Escherichia coli* OP50).

A. Worm life span for strains recovered from sample 13 (September 2013): *P. aeruginosa* strain Pa13, *P. pulmonicola* strain Pp13, and *P. aeruginosa* strain Pa13 supplemented with *P. pulmonicola* strain Pp13 supernatant.

B. Worm life span for strains recovered from sample 14 (January 2014, at the time of the most severe episode of pulmonary exacerbation experienced by the patient over the 7-year study period): *S. aureus* strain Sa14, *P. pulmonicola* strains Pp14 and Pp14', and *S. aureus* strain Sa14 supplemented with *P. pulmonicola* strain Pp14 or Pp14' supernatant.

200 association observed between studied characteristics was that the 2 isolates Pp6 and Pp8
201 (displaying 16S rDNA differing by one identical single nucleotide and intragenomic
202 heterogeneity) were the only isolates with distinct antibiotypes. No chronological trend was
203 observed for phenotypic and genotypic feature variability (Fig. 1).
204

205 **3.4 Virulence and co-virulence**

206 For all *P. pulmonicola* isolates, the survival time of *C. elegans* was lower than that observed
207 for the *E. coli* control strain (mean time required to kill 50% of the worm population or time
208 to death 50 (TD50) = 11.6 days) (data not shown). Isolates exhibited variable virulence levels
209 towards *C. elegans* since TD50 ranged from 8.4 to 11.1 days (average 9.8 days) (Fig. 2). The
210 relation between virulence expressed in nematode, isolation date, isolate sub-type and clinical
211 status appeared unclear, except for the most virulent isolate (Pp14') recovered in January
212 2014 at the time of the most severe pulmonary exacerbation (Fig. 3).
213

214 Both co-colonizing isolates of *S. aureus* (Sa14) and *P. aeruginosa* (Pa13) exhibited weak
215 virulence in the nematode model (TD50 = 11.9 and 11.1 days, respectively), lower than those
216 of *P. pulmonicola* Pp14, Pp14' and Pp13, respectively grown from the same sample (Fig. 2).
217 Growth in the presence of *P. pulmonicola* supernatant did not affect the virulence of the co-
218 colonizing isolates (Fig. 2). Regarding biofilm formation, *P. aeruginosa* Pa13 was weak
219 biofilm producer, while *S. aureus* Sa14 was moderately biofilm producer. No effects on *S.*
220 *aureus* or *P. aeruginosa* biofilm production were observed in assays with *Pandoraea*
221 supernatant (data not shown).
222

223 **3.5 Longitudinal variability, relation to microbiological and clinical data**

224 The patient is the only patient colonized by *Pandoraea* in our regional center caring for about
225 250 CF patients. He was diagnosed with CF at birth and is homozygous for the δ -F508
226 mutation. He was chronically colonized by *P. aeruginosa* and *S. aureus* and first acquired
227 *Pandoraea* in May 2008. During the 7-year study period, the patient experienced 11 episodes
228 of pulmonary exacerbation and received 12 courses of antibiotics (Fig. 3). During the overall
229 study period, a 10%-decrease of FEV₁ was noted while body mass index increased from 14 to
230 20.5. The most severe pulmonary exacerbation occurred in January 2014 and was associated
231 with significant pulmonary impairment (Fig. 3).
232

233 *P. pulmonicola* was recovered from all the sputum sampled during the study period. The
234 patient was also persistently colonized by *P. aeruginosa*, *S. aureus* and *Candida albicans* but
235 *P. pulmonicola* was the dominant bacterium or one of the dominant bacteria in 72% of the
236 sputum samples. *P. pulmonicola* load ranged from $2 \cdot 10^4$ to $\geq 10^8$ CFU/ml, being $\geq 10^8$
237 CFU/ml in 67% of the samples (Fig. 3). Samples were analyzed at the time of 7 out of the 11
238 episodes of exacerbation. In 5 cases, *Pandoraea* was the dominant pathogen and bacterial
239 load were $\geq 10^8$ CFU/ml in 4 cases. Isolates displaying minor pulsotypes were mostly
240 recovered at the time of pulmonary exacerbation (4/6 isolates, 67%), including isolate Pp14'
241 which was non-motile, non-adherent and more virulent in *C. elegans* than other *Pandoraea*
242 isolates. Contrarily, swimming and swarming motilities were mainly observed for isolates not
243 recovered during exacerbation (13/18 isolates, 72% and 5/9 stains, 55.5%, respectively).
244 Weak biofilm formation, 16S rRNA gene sequence heterogeneity and distinct antibiotypes
245 were equally observed for isolates recovered during exacerbation or stable clinical status. The
246 5 isolates that both swim and swarmed were isolated in the first year of patient colonization
247 (Fig. 1) but adhesion, as well as other features, appeared unrelated to the date of isolation.
248

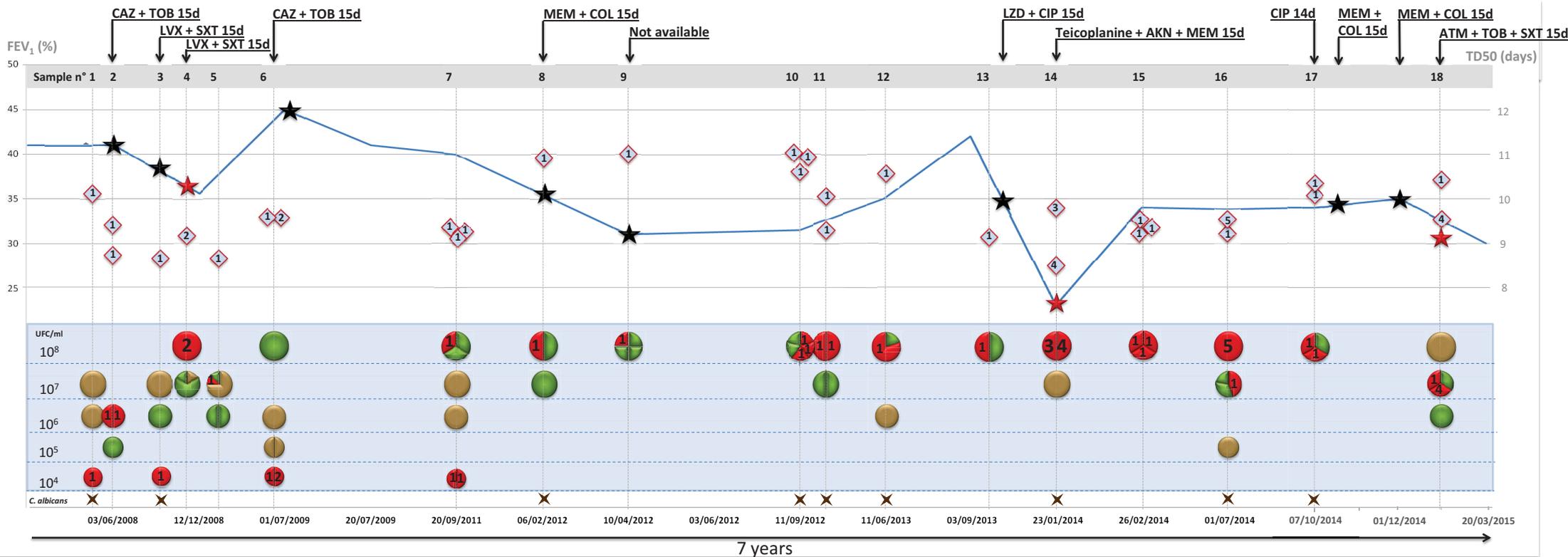


Fig. 3. Evolution of cultivable pathogens, *Pandoraea* pulsotype, and virulence according to patient clinical status and antimicrobial courses.

Data are presented horizontally for the 7-year period of patient clinical and microbiological follow-up and time scale indicated at the bottom of the figure (dd/mm/yyyy).

For each of the 18 sputum samples, data are presented vertically. Bacteria are indicated according to load (left scale in Colony Forming Unit (CFU)/ml) and color code: *Pandoraea pulmonicola*, red circle; *Pseudomonas aeruginosa*, green circle; *Staphylococcus aureus*, gold circle. Brown cross at the bottom indicates the presence of *Candida albicans*. Circles separated in different parts indicate the relative representation of different species (bicolor) or of different colonial morphotypes (unicolor). Lozenges represent life span of *Caenorhabditis elegans* fed with *Pandoraea* isolate (time to death 50, TD50, scale to the right). Numbers 1 to 5 in circles and lozenges indicate the pulsotype of corresponding *Pandoraea* isolate.

The curve represents forced expiratory volume in 1 second (FEV₁, left scale (%)). Stars indicate exacerbation periods and red stars exacerbation episodes with isolation of *Pandoraea* isolates with different pulsotypes. Black arrows indicate antibiotic courses (antimicrobial agents and treatment length in days are indicated on the arrow). AKN, amikacine; ATM, aztreonam; CAZ, ceftazidime; CIP, ciprofloxacin; COL, colistin; LVX, levofloxacin; LZD, linezolid; MEM, meropenem; SXT, cotrimoxazole; TOB, tobramycin.

249 **4 Discussion**

250
251 Bacterial diversification in CF niche has been described for the main pathogens involved in
252 the infectious pathogenesis of CF, *P. aeruginosa*, *Burkholderia* spp. and *Stenotrophomonas*
253 *maltophilia* (Lieberman et al., 2016; Pompilio et al., 2016; Winstanley et al., 2016). We
254 demonstrated herein that variability during persistence in the CFRT is also a main biological
255 trait for the emerging pathogen *P. pulmonicola*. High intraclonal genotypic and phenotypic
256 variability was highlighted with 24 different sub-types found for 31 isolates. All the variants
257 observed herein in a single patient highlight a highly complex *P. pulmonicola* population
258 probably involved in a patho-adaptive process. However, we did not observe a regular
259 gradient of modifications between early and late isolates for a given trait or for combinations
260 of traits as previously described during CF lung adaptation of other opportunistic pathogens
261 (Hauser et al., 2011; Lieberman et al., 2016; Pompilio et al., 2016; Winstanley et al., 2016).
262 Therefore, the detection of co-existing variants in the same specimen rather argues in favor of
263 the presence in the CFRT of a population of variants. Coexisting variants are then detected or
264 not depending on both their presence in the sample analyzed and their recognition during
265 analysis. Such intra-population diversity, usually considered as conferring an adaptive ability
266 to fluctuating environmental conditions, may thus be one of the major traits supporting
267 *Pandoraea* adaptation to the CF lung (Lieberman et al., 2014; Winstanley et al., 2016).

268
269 All phenotypic characters studied herein are major patho-adaptive traits in the CF context
270 (Hauser et al., 2011) and variability was observed for all of them. Regarding genotyping,
271 serial *Pandoraea* isolates in a patient were previously shown to present related but variable
272 profiles only when ERIC or BOX-PCR were used (Atkinson et al., 2006). Our study
273 confirmed variability in ERIC-PCR profiles but is the first showing pulsotype diversity
274 among clonally related persistent *Pandoraea* strains. Variations in PFGE profiles could be
275 due to genome modifications such as mutations but, more probably, rearrangements, which
276 were previously related to the patho-adaptation of *P. aeruginosa* in the CFRT (Kresse et al.,
277 2003). As described previously for *Achromobacter* sp. strains persisting in CFRT, ERIC-PCR
278 detected more variations than PFGE suggesting a genome flexibility involving small modules
279 not detected by macrorestriction (Dupont et al., 2015). *rrn* intragenomic heterogeneity has
280 also been described in adaptive evolution of other CFRT persisters, notably *Achromobacter*
281 *xylooxidans* and *S. maltophilia* (Michon et al., 2012). It generally leads to concerted
282 evolution by homologous recombination between *rrn* that can promote chromosome
283 rearrangements (Teyssier et al., 2003). Therefore, the heterogeneity of V3 *rrs* region and its
284 dynamics assessed by PCR-TTGE has been considered herein as another witness of genomic
285 events occurring in persistent *P. pulmonicola*.

286
287 *P. pulmonicola* was reported as the predominant *Pandoraea* species among Irish CF patients
288 (Costello et al., 2011) while *Pandoraea apista* is one of the most frequently isolated species
289 from CF patients in USA (LiPuma, 2010). However, identification remains challenging in
290 routine practice because mass spectrometry databases are incomplete and molecular
291 identification may still be required for accurate knowledge on epidemiology and clinical
292 implications of *Pandoraea*. In France, the first human case involving *P. pulmonicola* was
293 reported in 2013 in a CF patient chronically colonized who died of *P. aeruginosa* sepsis
294 (Kokcha et al., 2013). The epidemic spread of *P. pulmonicola* was also firstly described
295 among 6 CF patients resulting in chronic colonization in the 6 patients who were also
296 chronically colonized by *P. aeruginosa*; among them, 3 patients died, 2 patients remained
297 clinically stable, and the remaining patient had a decline in lung function (Degand et al.,
298 2015). During the 7-year period of the present study, the patient chronically colonized by *P.*

299 *pulmonicola* presented a 10%-decrease of FEV₁ and had 11 pulmonary exacerbations
300 including one with a major FEV₁ decrease. During the overall study period, *Pandoraea* was a
301 major representative of the microbiota cultured from the CFRT and dynamics of colonization
302 may have been driven by antipseudomonal therapies (Kokcha *et al.*, 2013). Regarding
303 virulence, *P. pulmonicola* isolates were either weak biofilm producers or non-adherent,
304 corroborating previous results suggesting that biofilm formation is not a major virulence
305 factor in this genus (Caraher *et al.* 2008). A previous study showed that interactions occurred
306 between *Pandoraea* spp. and *P. aeruginosa*, i.e., *P. pulmonicola* and *P. apista* growth was
307 significantly inhibited by *P. aeruginosa* (Costello *et al.*, 2014) and cellular components, as yet
308 unidentified, rather than secreted factors were involved in such interactions (Costello *et al.*,
309 2011). In the conditions of our study, evaluating effects of *Pandoraea* culture supernatant on
310 *P. aeruginosa* and *S. aureus* virulence or biofilm formation, no interacting effects were
311 observed. A previous study showed that virulence increased between two sequential *P.*
312 *pulmonicola* isolates (Costello *et al.*, 2011). Here, we found all the isolates to be mildly
313 pathogenic in *C. elegans* model but at the time of the most severe exacerbation, one
314 *Pandoraea* isolate was the most virulent isolate recovered during the study. If virulence
315 factors remain largely unknown for *P. pulmonicola*, predicated virulence factors related to
316 those in the genus *Burkholderia* were found in the *P. apista* type strain genome (Millard *et*
317 *al.*, 2015). Similarly, genes responsible for virulence, disease, and defense, were identified in
318 *P. pnomenusa* genomes, with unique genes being identified in clinical isolates compared with
319 environmental isolates (Ee *et al.*, 2015).

320
321 Finally, despite the comparison of whole genome sequences of two *P. pnomenusa* isolates
322 recovered 11 months apart in a CF patient did not reveal variability, except for one gene
323 encoding a predicted phage tail protein (Ee *et al.*, 2015), the results of our study prompt to
324 sequence additional serial or unrelated *P. pulmonicola* CF isolates with the aim to get
325 complementary information on nucleotide and gene content but also on whole genome
326 structure and ultimately to better understand host-bacteria relationships.

327 328 **Conflict of Interest**

329 The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or
330 financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.
331

332 **Author Contributions**

333 Conceived and designed the study: CD, FA, EJB, HM ; Designed and performed the
334 acquisition of clinical isolate collection: HM ; Performed the acquisition of clinical data: RC,
335 PC ; Performed the acquisition of microbiological data: CD, FA, PC, HM ; Performed the
336 microbial analyses: CD, FA ; Analyzed and interpreted the data: CD, FA, EJB, HM ; Drafted
337 the paper: CD, FA, HM ; Critically revised the manuscript: RC, PC, EJB. All authors read and
338 approved the final manuscript.

339 **Acknowledgments**

340 The authors gratefully acknowledge Linda Aleyrangues and Monique Alvaro for their
341 excellent technical assistance.

342

343

344 **References**

- 345 Atkinson, R.M., Lipuma, J.J., Rosenbluth, D.B., Dunne, W.M Jr. (2006) Chronic colonization
346 with *Pandoraea apista* in cystic fibrosis patients determined by repetitive-element-sequence
347 PCR. *J. Clin. Microbiol.* 44, 833-836.
- 348 Caraher, E., Collins, J., Herbert, G., Murphy, P.G., Gallagher, C.G., Crowe, M.J., *et al.*
349 (2008). Evaluation of *in vitro* virulence characteristics of the genus *Pandoraea* in lung
350 epithelial cells. *J. Med. Microbiol.* 57, 15-20.
- 351 Carlier, J.P., Marchandin, H., Jumas-Bilak, E., Lorin, V., Henry, C., Carrière, C., *et al.* (2002)
352 *Anaeroglobus geminatus* gen. nov., sp. nov., a novel member of the family *Veillonellaceae*.
353 *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52, 983-986.
- 354 Coenye, T., Falsen, E., Hoste, B., Ohlén, M., Goris, J., Govan, J.R., *et al.* (2000). Description
355 of *Pandoraea* gen. nov. with *Pandoraea apista* sp. nov., *Pandoraea pulmonicola* sp. nov.,
356 *Pandoraea pnomenus* sp. nov., *Pandoraea sputorum* sp. nov. and *Pandoraea*
357 *norimbergensis* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50, 887-899.
- 358 Coenye, T., and LiPuma, J.J. (2002). Use of the *gyrB* gene for the identification of *Pandoraea*
359 species. *FEMS Microbiol. Lett.* 208, 15-19.
- 360 Costello, A., Herbert, G., Fabunmi, L., Schaffer, K., Kavanagh, K.A., Caraher, E.M., *et al.*
361 (2011) Virulence of an emerging respiratory pathogen, genus *Pandoraea*, *in vivo* and its
362 interactions with lung epithelial cells. *J. Med. Microbiol.* 60, 289-299.
- 363 Costello, A., Reen, F.J., O'Gara, F., Callaghan, M., McClean, S. (2014) Inhibition of co-
364 colonizing cystic fibrosis-associated pathogens by *Pseudomonas aeruginosa* and
365 *Burkholderia multivorans*. *Microbiology.* 160, 1474-1487.
- 366 Degand, N., Lotte, R., Decondé Le Butor, C., Segonds, C., Thouverez, M., Ferroni, A., *et al.*
367 (2015) Epidemic spread of *Pandoraea pulmonicola* in a cystic fibrosis center. *BMC Infect.*
368 *Dis.* 15, 583. doi: 10.1186/s12879-015-1327-8.
- 369 Dupont, C., Michon, A.L., Jumas-Bilak, E., Nørskov-Lauritsen, N., Chiron, R., Marchandin,
370 H. (2015) Inpatient diversity of *Achromobacter* spp. involved in chronic colonization of
371 Cystic Fibrosis airways. *Infect. Genet. Evol.* 32, 214-223.
- 372 Ee, R., Ambrose, M., Lazenby, J., Williams, P., Chan, K.G., Roddam, L. (2015) Genome
373 sequences of two *Pandoraea pnomenus* isolates recovered 11 months apart from a Cystic
374 Fibrosis patient. *Genome Announc.* doi: 10.1128/genomeA.01389-14.
- 375 Fernández-Olmos, A., Morosini, M.I., Lamas, A., García-Castillo, M., García-García, L.,
376 Cantón, R., *et al.* (2012). Clinical and microbiological features of a cystic fibrosis patient
377 chronically colonized with *Pandoraea sputorum* identified by combining 16S rRNA
378 sequencing and matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry.
379 *J. Clin. Microbiol.* 50, 1096-1098.
- 380 Hauser, A.R., Jain, M., Bar-Meir, M., McColley, S.A. (2011). Clinical significance of
381 microbial infection and adaptation in cystic fibrosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 24, 29-70.
- 382 Jørgensen, I.M., Johansen, H.K., Frederiksen, B., Pressler, T., Hansen, A., Vandamme, P., *et*
383 *al.* (2003). Epidemic spread of *Pandoraea apista*, a new pathogen causing severe lung disease
384 in cystic fibrosis patients. *Pediatr. Pulmonol.* 36, 439-446.
- 385 Kirov, S.M., Castrisios, M., Shaw, J. (2004). *Aeromonas* flagella (polar and lateral) are
386 enterocyte adhesins that contribute to biofilm formation on surfaces. *Infect. Immun.* 72, 1939-
387 1945.

388 Kokcha, S., Bittar, F., Reynaud-Gaubert, M., Mely, L., Gomez, C., Gaubert, J.Y., *et al.*
389 (2013). *Pandoraea pulmonicola* chronic colonization in a cystic fibrosis patient, France. *New*
390 *Microbes New Infect.* 1, 27-29.

391 Kresse, A.U., Dinesh, S.D., Larbig, K., Römling, U. (2003). Impact of large chromosomal
392 inversions on the adaptation and evolution of *Pseudomonas aeruginosa* chronically
393 colonizing cystic fibrosis lungs. *Molecular microbiology.* 47, 145-158.

394 Lieberman, T.D., Flett, K.B., Yelin, I., Martin, T.R., McAdam, A.J., Priebe, G.P., *et al.*
395 (2014). Genetic variation of a bacterial pathogen within individuals with cystic fibrosis
396 provides a record of selective pressures. *Nat. Genet.* 46, 82-87.

397 LiPuma, J.J. (2010). The changing microbial epidemiology in cystic fibrosis. *Clin. Microbiol.*
398 *Rev.* 23, 299-323.

399 Mahenthiralingam, E. (2014). Emerging cystic fibrosis pathogens and the microbiome.
400 *Paediatr. Respir. Rev.* 15:13-15.

401 Millard, A.D., Westblade, L.F., LiPuma, J.J., Vavikolanu, K., Read, T.D., Pallen, M.J., *et al.*
402 (2015) Draft genome sequence of the *Pandoraea apista* LMG 16407 type strain. *Genome*
403 *Announc.* doi: 10.1128/genomeA.01300-15.

404 Mosser, T., Talagrand-Reboul, E., Colston, S.M., Graf, J., Figueras, M.J., Jumas-Bilak, E., *et*
405 *al.* (2015). Exposure to pairs of *Aeromonas* strains enhances virulence in the *Caenorhabditis*
406 *elegans* infection model. *Front. Microbiol.* 6, 1218. doi: 10.3389/fmicb.2015.01218.

407 Pimentel, J.D., and MacLeod, C. (2008). Misidentification of *Pandoraea sputorum* isolated
408 from sputum of a patient with cystic fibrosis and review of *Pandoraea* species infections in
409 transplant patients. *J. Clin. Microbiol.* 46, 3165-3168.

410 Pompilio, A., Crocetta, V., Ghosh, D., Chakrabarti, M., Gherardi, G., Vitali, L., *et al.* (2016).
411 *Stenotrophomonas maltophilia* phenotypic and genotypic diversity during a 10-year
412 colonization in the lungs of a cystic fibrosis patient. *Front. Microbiol.* 7, 1551.
413 doi:10.3389/fmicb.2016.01551.

414 Pugès, M., Debelleix, S., Fayon, M., Mégraud, F., Lehours, P. (2015). Persistent infection
415 because of *Pandoraea sputorum* in a young cystic fibrosis patient resistant to antimicrobial
416 treatment. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 34, 1135-1137.

417 Silva, I.N., Ferreira, A.S., Becker, J.D., Zlosnik, J.E., Speert, D.P., He, J., *et al.* (2011).
418 Mucoid morphotype variation of *Burkholderia multivorans* during chronic cystic fibrosis lung
419 infection is correlated with changes in metabolism, motility, biofilm formation and virulence.
420 *Microbiology.* 157, 3124-3137.

421 Société Française de Microbiologie. Chapter 20: Infections broncho-pulmonaires et
422 mucoviscidose. *In: Référentiel en microbiologie médicale.* REMIC, Edition 5.1; 2015:193-
423 200.

424 Stepanovic, S., Vukovic, D., Dakic, I, Savic, B., Svabic-Vlahovic, M. (2000). A modified
425 microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J. Microbiol.*
426 *Methods.* 40, 175-179.

427 Sundquist, A., Bigdeli, S., Jalili, R., Druzin, M.L., Waller, S., Pullen, K.M., *et al.* (2007).
428 Bacterial flora-typing with targeted, chip-based pyrosequencing. *BMC Microbiol.* 7, 108. doi:
429 10.1186/1471-2180-7-108.

430 Winstanley, C., O'Brien, S., Brockhurst, M. (2016). *Pseudomonas aeruginosa* evolutionary
431 adaptation and diversification in cystic fibrosis chronic lung infections. *Trends Microbiol.* 24,
432 327-337.
433

In review

434 **Legends to figures**

435

436 **Fig. 1. Genomic and phenotypic variability among 31 *Pandoraea pulmonicola* isolates**
437 **recovered from 18 sputum specimens sampled over a 7-year period in a CF patient.**

438 **A.** Genomic diversity among of *Xba*I-generated pulsotypes obtained for sequential isolates
439 assessed by clustering analysis based on Dice coefficient and Unweighted Pair Group Method
440 with Arithmetic mean (UPGMA).

441 The Dice's coefficient scale is shown at the top of the dendrogram. Isolates were named with
442 numbers (1 to 18) according to chronological sampling order, and isolates with different
443 colonial morphotypes in a sample were named with the same number followed by
444 apostrophe(s) (for example 10, 10', 10'' correspond to 3 morphotypes recovered from the
445 tenth sample out of 18). The supernatants of the 3 isolates noted in red (13, 14 and 14') were
446 included in the virulence assays in *Caenorhabditis elegans* model.

447

448 **B.** Summary of variability observed for genotypic and phenotypic characteristics.

449 Isolates are in the same vertical order as in figure 1A. P1 to P5 are the different pulsotypes
450 observed after *Xba*I-macrorestriction and Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE). E1 to E7
451 are the different profiles observed by Enterobacterial repetitive intergenic consensus
452 sequence-based PCR (ERIC-PCR). A to D corresponded to ERIC-PCR clusters formed by
453 very related profiles differing by no more than 2 bands. Banding patterns obtained by 16S
454 rDNA PCR-Temporal Temperature Gel Electrophoresis (TTGE) were named according to the
455 bands observed as follows: 1 for profile composed by the unique band 1, and 1+2 for profile
456 composed by the two bands 1 and 2. Minimal Inhibitory Concentrations (MIC) were given for
457 cefotaxime (CTX) and piperacillin-tazobactam (PZT) in mg/L and bold type indicated values
458 differing by more than two dilutions from others.

459 The combined profile was established on the basis of the results presented in the 7 preceding
460 columns; if the 7 traits were common, isolates were assigned the same combined profile.

461 Stars indicated isolates recovered at the time of an episode of pulmonary exacerbation (one
462 color per episode).

463 +, positive; -, negative; w, weak.

464 *, isolates with combined profile 3 also diverged by a point mutation in the *gyrB* sequence.

465

466 **Fig. 2. Survival curves of *Caenorhabditis elegans* fed either with *Pandoraea pulmonicola*,**
467 **co-colonizing pathogen or co-colonizing pathogen grown in the presence of *Pandoraea***
468 **culture supernatant, compared to control (avirulent *Escherichia coli* OP50).**

469 **A.** Worm life span for isolates recovered from sample 13 (September 2013): *P. aeruginosa*
470 Pa13, *P. pulmonicola* Pp13, and *P. aeruginosa* Pa13 cultured in the presence of *P.*
471 *pulmonicola* Pp13 supernatant.

472

473 **B.** Worm life span for isolates recovered from sample 14 (January 2014, at the time of the
474 most severe episode of pulmonary exacerbation experienced by the patient over the 7-year
475 study period): *S. aureus* Sa14, *P. pulmonicola* Pp14 and Pp14', and *S. aureus* Sa14 grown in
476 the presence of *P. pulmonicola* Pp14 or Pp 14' supernatant.

477

478 **Fig. 3. Diversity of cultivable pathogens, *Pandoraea* pulsotype, and virulence according**
479 **to patient clinical status and antimicrobial courses.**

480 Data are presented horizontally for the 7-year period of patient clinical and microbiological
481 follow-up and time scale indicated at the bottom of the figure (dd/mm/yyyy).

482 For each of the 18 sputum samples, data are presented vertically. Bacteria are indicated
483 according to load (left scale in Colony Forming Unit (CFU)/ml) and color code: *Pandora*
484 *pulmonicola*, red circle; *Pseudomonas aeruginosa*, green circle; *Staphylococcus aureus*, gold
485 circle. Brown cross at the bottom indicates the presence of *Candida albicans*. Segmented
486 circles indicate the relative representation of different species (bicolor) or of different colonial
487 morphotypes (unicolor). Lozenges represent life span of *Caenorhabditis elegans* fed with
488 *Pandora**aea* isolate (time to death 50, TD50, scale to the right). Numbers 1 to 5 in circles and
489 diamonds indicate the pulsotype of corresponding *Pandora**aea* isolate.
490 The curve represents forced expiratory volume in 1 second (FEV₁, left scale (%)). Stars
491 indicate exacerbation periods and red stars exacerbation episodes with isolation of *Pandora**aea*
492 isolates with different pulsotypes. Black arrows indicate antibiotic courses (antimicrobial
493 agents and treatment length in days are indicated on the arrow).
494 AKN, amikacine; ATM, aztreonam; CAZ, ceftazidime; CIP, ciprofloxacin; COL, colistin;
495 LVX, levofloxacin; LZD, linezolid; MEM, meropenem; SXT, cotrimoxazole; TOB,
496 tobramycin.
497

In review

IV Conclusion

Les patients inclus dans cette étude étaient tous colonisés par une population clonale diversifiée d'*Achromobacter* ou *P. pulmonicola*. Les souches isolées au cours de la persistance chez un même patient appartenaient à une même population clonale alors que ces populations étaient différentes entre patients. Toutefois, pour un patient colonisé par *Achromobacter*, nous avons mis en évidence une colonisation sporadique par une seconde souche, identique à celle colonisant un autre patient CF, et comme observé lors de précédentes études, cette souche exogène différente de la population clonale du patient n'a pas persisté dans le temps (Amoureux et al. 2013a). Néanmoins, un travail récent a montré que pour 8 patients, des espèces distinctes d'*Achromobacter* avaient été identifiées au sein d'un même échantillon ou d'échantillons successifs, allant jusqu'à 4 espèces différentes identifiées chez un patient au cours de la colonisation (Amoureux et al. 2016a). De plus, une étude sur la persistance d'*Achromobacter* dans les VRCF de 15 patients a montré pour un patient le remplacement d'un génotype par un autre en ECP, 5 ans après la colonisation initiale (Barrado et al. 2013). Lors de nos deux études sur *Achromobacter* et *Pandoraea*, aucun de ces deux scénarios n'a été observé.

L'ECP est considérée comme la méthode de référence pour la surveillance à long terme de la colonisation chronique car des isolats présentant des pulsotypes identiques pouvant présenter des profils de rep-PCR différents (Amoureux et al. 2013a). Pour la majorité des patients étudiés ici, nous avons observé des souches présentant des variations de pulsotypes au cours du temps, suggérant que la diversification génomique est un phénomène associé à la persistance lors de la colonisation chronique. Notre étude est la première à avoir mis en évidence une diversité génomique intraclonale chez *P. pulmonicola* au cours de la persistance.

Lors de nos deux études nous avons considéré que la diversité observée était intra-clonale alors que certains pulsotypes différaient entre eux par 7 fragments d'ADN ou plus. Selon les critères de Tenover et collaborateurs, de telles variations excluent un lien épidémiologique (Tenover et al. 1995). Toutefois, au moins 15 fragments de différence ont été comptabilisés entre des pulsotypes non reliés de patients différents, suggérant que dans les conditions de notre étude, les seuils définis par Tenover et al. ne peuvent pas être utilisés par défaut. Ceci est également soutenu par les résultats d'une autre étude montrant qu'en cas d'exposition à un fort stress oxydant, de fortes variations génomiques pouvaient générer des profils d'ECP considérés comme non reliés (> 7 fragments d'ADN de différence) (Drevinek et al. 2010). Lors de notre étude, nous avons conclu qu'un coefficient de Dice \geq 70% pouvait être considéré comme un seuil pour la définition de clusters d'isolats d'*A. xylosoxidans* apparentés chez un même patient. Néanmoins, ceci ne pouvait être appliqué aux souches d'*A. insuavis* et doit donc être étudié et ajusté pour chaque cas.

Les variations de profils observées au cours du temps en ECP entre des souches appartenant à une population clonale peuvent être le reflet de modifications génomiques comme des réarrangements, qui ont déjà été rapportés lors de l'adaptation de *P. aeruginosa* dans les VRCF (Kresse et al. 2003). D'autre part, lors de nos études sur *Achromobacter* et *Pandoraea*, plusieurs types de diversité

génomique ont été détectés par ECP, MR-PCR et PCR ADN_r16S-TTGE. Les variations détectées par une méthode n'étaient pas reliées à celles détectées par une autre, suggérant que divers mécanismes d'évolution génomique adaptative, incluant des réarrangements de diverses tailles, participent à la variabilité génomique d'*Achromobacter* et de *Pandoraea* au cours du temps.

Récemment, l'étude des séquences totales des génomes de souches précoces et tardives d'*Achromobacter* au cours de la colonisation chronique a montré que la majorité des mutations observées apparaissait dans les gènes responsables du métabolisme général de la bactérie (ex : gènes impliqués dans la biosynthèse du tryptophane ou de la glycine) mais que certains gènes impliqués dans la virulence et la résistance aux antibiotiques étaient également concernés (Ridderberg et al. 2015). Par exemple, des mutations ont été identifiées dans les gènes impliqués dans les systèmes de sécrétion de types I et III, ainsi que dans des gènes impliqués dans la formation ou la fonction du pili et des flagelles. Les auteurs ont également observé des mutations dans 6 gènes ou régulateurs de gènes impliqués dans la résistance aux antibiotiques, incluant de larges délétions affectant des gènes répresseurs de pompes à efflux ou codant des β -lactamases. Ces modifications dans des gènes patho-adaptatifs sont similaires à ce qui a été rapporté pour *P. aeruginosa* lors de la colonisation chronique, appuyant l'idée d'une sélection négative de ces gènes nécessaires à l'initiation d'une infection aiguë, au cours de la persistance (Ridderberg et al. 2015).

Enfin, concernant *P. pulmonicola*, une forte diversité phénotypique a également été mise en évidence, incluant des caractères ayant été décrits comme patho-adaptatifs dans le cadre de la mucoviscidose, comme la motilité (Hauser et al. 2011). Toutes les souches de *P. pulmonicola* étaient peu virulentes dans le modèle *C. elegans* ; toutefois, au moment d'une forte exacerbation ayant conduit à l'hospitalisation du patient, un isolat présentant un pulsotype minoritaire, retrouvé en forte concentration dans l'expectoration, s'est révélé être le plus virulent de l'étude.

La colonisation chronique par *Achromobacter* et *Pandoraea* est donc due à la persistance d'une population clonale diversifiée dans les VRCF. La forte diversité génétique et phénotypique des isolats au cours du temps, démontre une fois de plus la complexité des populations bactériennes au sein des VRCF et le lien probable de cette diversité avec le processus patho-adaptatif. Nous avons donc montré que comme pour *P. aeruginosa*, la variabilité intra-clonale durant la persistance est une caractéristique biologique dominante pour les pathogènes émergents des genres *Achromobacter* et *Pandoraea*. De plus, les variations génomiques et phénotypiques observées entre divers morphotypes d'un même échantillon dans chaque étude suggèrent également l'existence d'une diversité intra-échantillon. Ces résultats et les données de la littérature sur les populations CF de *P. aeruginosa* nous ont conduit à étudier de façon plus exhaustive la diversité des populations clonales d'*Achromobacter* spp. au sein des VRCF à un temps donné au sein d'un même échantillon.

PARTIE III
ETUDE DE LA DIVERSITE INTRA-ECHANTILLON DE
POPULATIONS PERSISTANTES D'ACHROMOBACTER
DANS LES VRCF

IMPACT SUR LES RESULTATS D'ANTIBIOGRAMME

I Introduction

Les bactéries du genre *Achromobacter* présentent une résistance naturellement élevée aux antibiotiques, avec un profil sauvage caractéristique défini par une sensibilité aux pénicillines (ticarcilline et pipéracilline notamment), au moxalactam et aux carbapénèmes, et une résistance à la majorité des céphalosporines (céfalotine, céfoxitine, céfuroxime, céfotaxime, ceftriaxone, céfépime) mais pas à la ceftazidime. La résistance acquise est largement décrite chez *Achromobacter*, notamment dans le cadre de la colonisation chronique des VRCF. Au cours de la colonisation, une perte de régulation de la production de pompes à efflux et de β -lactamases, ainsi qu'une perte de sensibilité à l'imipénème, ont été rapportées, limitant les options thérapeutiques (Amoureux et al. 2013a; Ridderberg et al. 2015). Une étude récente a comparé la concentration minimale inhibitrice et la concentration minimale inhibant la formation de biofilm de 5 antibiotiques (amikacine, aztréonam, colistine, lévofloxacine, et tobramycine) vis-à-vis de 68 isolats CF d'*Achromobacter* appartenant aux espèces *A. xylosoxidans* ($n = 50$), *A. denitrificans* ($n = 3$), *A. dolens* ($n = 5$), *A. insolitus* ($n = 5$) et *A. ruhlandii* ($n = 5$) (Tom et al. 2016). A l'exception de la colistine et de la lévofloxacine, tous les antibiotiques nécessitaient des concentrations égales ou supérieures aux concentrations les plus élevées testées pour inhiber la croissance des bactéries planctoniques ou en biofilm. Bien que la pathogénicité d'*Achromobacter* spp. ne soit pas clairement définie, la multirésistance est certainement un paramètre important de la pathogenèse lors d'infections au cours de la mucoviscidose. De plus, la multirésistance d'*Achromobacter* spp. peut contribuer à l'augmentation globale de la résistance dans la communauté. Par exemple, au cours de la colonisation chronique, un transfert de plasmide codant pour une métallo- β -lactamase a été décrit entre une souche d'*Achromobacter* productrice de carbapénémase et une souche de *Klebsiella pneumoniae* initialement sensible aux carbapénèmes (Yamamoto et al. 2016). Les agents considérés comme les plus actifs sur *Achromobacter* spp. sont la pipéracilline-tazobactam, les carbapénèmes (particulièrement le méropénème) et le triméthoprime-sulfaméthoxazole. La ceftazidime est également utilisée bien que plusieurs études décrivent une augmentation de résistance au cours de la colonisation (Amoureux et al. 2013a; Barrado et al. 2013). Nous avons vu dans la synthèse bibliographique qu'une forte diversité génotypique et phénotypique était observée au sein des populations de *P. aeruginosa* colonisant les patients CF. Concernant la résistance aux antibiotiques, l'étude de nombreuses expectorations de patients a montré une importante diversité de profils de résistance au sein de populations de *P. aeruginosa* d'un même échantillon, avec des profils de résistance différents pour des colonies présentant pourtant un même morphotype (Foweraker et al. 2005). Une autre étude a montré que la résistance *in vitro* aux antibiotiques augmentait significativement quand on étudiait un mélange de plusieurs isolats morphologiquement identiques d'un même échantillon (Darch et al. 2015). Enfin, différents profils de résistances ont été observés pour des isolats de *P. aeruginosa* morphologiquement identiques et présentant des profils d'ECP identiques toujours isolés d'un même échantillon (Foweraker et al. 2009). Toutes ces études ont montré la coexistence, au sein d'un même échantillon, de souches

résistantes et sensibles à des antibiotiques ou combinaisons d'antibiotiques (Darch et al. 2015; Foweraker et al. 2005, 2009).

Concernant les bactéries du genre *Achromobacter*, la description d'un cas d'exacerbation et de déclin pulmonaire très rapide causé par *A. xylosoxidans* chez un patient, malgré l'utilisation d'antibiotiques par voie intraveineuse, a conclu que de nombreuses zones d'incertitude subsistaient quant à la prise en charge clinique de l'infection, au rôle du traitement d'éradication, et aux exigences de contrôle de l'infection (Talbot and Flight 2016). Notre étude précédente dont l'objectif principal n'était pas de décrire la diversité intra-échantillon d'*Achromobacter* spp. a toutefois montré son existence, avec l'observation par les méthodes d'ECP et de MR-PCR, de variations génomique entre différents morphotypes d'un même échantillon. La présente étude vise à étudier spécifiquement la diversité intra-échantillon d'*Achromobacter* avec une attention particulière portée à la résistance aux antibiotiques.

II Diversité génomique et phénotypique des populations clonales d'*Achromobacter* spp. isolées dans un échantillon

Du fait de leur multirésistance aux antibiotiques, le traitement des infections par les bactéries du genre *Achromobacter* n'est pas aisé. La prise en charge de ces infections doit toujours reposer sur des résultats d'antibiogramme et, en laboratoire de routine, les tests de résistance aux antibiotiques sont généralement réalisés sur une colonie de chaque morphotype. Toutefois, la diversité intra-clonale que nous avons observé lors de la persistance et dans un même échantillon, pose la question de l'existence de variants pour la résistance aux antibiotiques au sein de même échantillon.

L'objectif de notre travail était d'évaluer la diversité des profils génomiques de colonies d'*Achromobacter* provenant d'un même échantillon, ainsi que la diversité de leurs profils d'antibiorésistance. Pour cela, nous avons étudié 132 souches d'*Achromobacter* spp. provenant d'expectorations de 9 patients, 8 colonisés par *A. xylosoxidans* et un colonisé par *A. insuavis*, précédemment inclus dans notre étude (Dupont et al. 2015). Au maximum trois colonies par morphotype ont été étudiées soit entre 8 et 27 colonies par échantillon. L'analyse génomique a été effectuée par ECP et la résistance aux antibiotiques a été analysée par la méthode de diffusion en milieu gélosé.

Au cours de ce travail, nous avons mis en évidence une importante diversité génomique au sein de populations clonales présentes dans un même échantillon, ainsi qu'une importante diversité de profils de résistance.

Les résultats de cette étude sont présentés dans l'article suivant :

Article III

Dupont C, Jumas-Bilak E., Chiron R, Marchandin H. High diversity of *Achromobacter* spp. populations within Cystic Fibrosis sputum samples impacts antimicrobial susceptibility testing results.

Accepté pour publication dans Journal of Clinical Microbiology.



Impact of High Diversity of *Achromobacter* Populations within Cystic Fibrosis Sputum Samples on Antimicrobial Susceptibility Testing

AQ: au **Chloé Dupont,^a Estelle Jumas-Bilak,^{a,b} Anne-Laure Michon,^{a,c} Raphaël Chiron,^d Hélène Marchandin^{a,c}**

AQ: aff Université Montpellier, UMR5569 Hydrosociences Montpellier, Equipe Pathogènes Hydriques, Santé, Environnements, U.F.R des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Montpellier, France^a; Centre Hospitalier Régional Universitaire de Montpellier, Hôpital Saint-Eloi, Laboratoire d'Hygiène hospitalière, Montpellier, France^b; Centre Hospitalier Régional Universitaire de Montpellier, Hôpital Arnaud de Villeneuve, Laboratoire de Bactériologie, Montpellier, France^c; Centre Hospitalier Régional Universitaire de Montpellier, Hôpital Arnaud de Villeneuve, Centre de Ressources et de Compétences pour la Mucoviscidose, Montpellier, France^d

ABSTRACT Chronic colonization by opportunistic environmental bacteria is frequent in the airways of cystic fibrosis (CF) patients. Studies of *Pseudomonas aeruginosa* evolution during persistence have highlighted the emergence of pathoadaptive genotypes and phenotypes, leading to complex and diversified inpatient colonizing populations also observed at the intraspecimen level. Such diversity, including heterogeneity in resistance profiles, has been considered an adaptive strategy devoted to host persistence. Longitudinal genomic diversity has been shown for the emergent opportunistic pathogen *Achromobacter*, but phenotypic and genomic diversity has not yet been studied within a simple CF sputum sample. Here, we studied the genomic diversity and antimicrobial resistance heterogeneity of 132 *Achromobacter* species strains (8 to 27 strains of identical or distinct colonial morphotypes per specimen) recovered from the sputum samples of 9 chronically colonized CF patients. We highlighted the high within-sample and within-morphotype diversity of antimicrobial resistance (disk diffusion) and genomic (pulsed-field gel electrophoresis) profiles. No sputum sample included strains with identical pulsotypes or antibiotic susceptibility patterns. Differences in clinical categorization were observed for the 9 patients and concerned 3 to 11 antibiotics, including antibiotics recommended for use against *Achromobacter*. Within-sample antimicrobial resistance heterogeneity, not predictable from colonial morphology, suggested that it may represent a selective advantage against antibiotics in an *Achromobacter* persisting population and potentially compromise the antibiotic management of CF airway infections.

KEYWORDS *Achromobacter*, antimicrobial susceptibility, cystic fibrosis, diversity, genome

Bacterial adaptation during persistence in the respiratory tract of cystic fibrosis (CF) patients has mainly been studied for *Pseudomonas aeruginosa* showing that pathoadaptation mechanisms are particularly efficient, leading to rare and hardly achievable *P. aeruginosa* eradication. Many studies have revealed a variety of phenotypic pathoadaptative traits during long-term colonization, such as auxotrophy and metabolic modifications, quorum-sensing alterations, biofilm production, loss of motility and virulence factors, emergence of mucoid colonies, and an increase of antibiotic resistance (for a review, see reference 1). Moreover, numerous genomic modifications, which were either directly related to phenotype or not, were observed (1, 2). Other species, such as the *Burkholderia cepacia* complex, *Stenotrophomonas maltophilia*, and

Received 18 September 2016 Returned for modification 30 September 2016 Accepted 25 October 2016

Accepted manuscript posted online 2 November 2016

Citation Dupont C, Jumas-Bilak E, Michon A-L, Chiron R, Marchandin H. 2017. Impact of high diversity of *Achromobacter* populations within cystic fibrosis sputum samples on antimicrobial susceptibility testing. J Clin Microbiol 55:000–000. <https://doi.org/10.1128/JCM.01843-16>.

Editor Robin Patel, Mayo Clinic

Copyright © 2016 American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Address correspondence to Hélène Marchandin, helene.marchandin@umontpellier.fr.

Staphylococcus aureus, also displayed adaptive features during lung persistence that were not observed in non-CF patients (3). Most studies that focused on sequential isolates gave results that were interpreted in terms of the longitudinal adaptive evolution of the colonizing strain based on the “assumption that bacterial populations at any given time are genetically uniform” (4). The standard approach in routine clinical microbiology has for a long time been based on the same lasting dogma, i.e., analysis (identification and antimicrobial susceptibility testing) of a single “pure” colony for each potential pathogen. However, CF *P. aeruginosa* populations were shown to be highly diverse. Indeed, in the same sputum sample, colonies that were assayed for a range of phenotypic traits, known to be altered during evolutionary adaptation, showed significant within-specimen diversity (4–7). The resulting coexistence of variant lineages in the respiratory tract of CF patients suggested that they arose from diverse selection pressures in the lung and then developed distinct evolutionary pathways (5, 6, 8). This diversity is considered in French microbiological procedures for CF samples, which recommend the performance of antimicrobial susceptibility testing on each *P. aeruginosa* colonial morphotype detected by visual inspection of agar medium plates (9). However, morphotypes were previously shown to be unreliable predictors of antimicrobial susceptibility (10), suggesting that, depending on the choice of colonies to be submitted for *in vitro* antimicrobial susceptibility testing, results may not reflect the overall resistance exhibited by the *P. aeruginosa* population in the CF lung.

Members of the genus *Achromobacter* are recognized as emerging opportunistic pathogens in CF (11) with variable prevalence depending on CF centers and on the occurrence of outbreaks (12). *Achromobacter xylosoxidans* is the most prevalent species that chronically colonizes CF airways. Its ability to induce local inflammation, as done by *P. aeruginosa*, suggests its pathogenicity (13). Previous studies reporting longitudinal genetic and phenotypic variations of *A. xylosoxidans* during chronic colonization (14–16) prompt the assessment of the intraspecimen diversity of *Achromobacter* species populations by studying the genome fingerprint (pulsed-field gel electrophoresis [PFGE]) and antibiotic susceptibility profile variability.

RESULTS

Patients, morphotype diversity, and studied strains. At the time of sampling, the 9 patients were 11 to 52 years old and were chronically colonized by *Achromobacter* sp. for 5 to 18 years. We observed 3 to 11 different colony morphotypes per sputum sample (Table 1) (an average of 5.5 morphotypes per specimen) and studied a total of 50 colonial morphotypes defined at the intraspecimen level. For some morphotypes, only 1 (3 samples, 6 morphotypes) or 2 (5 samples, 6 morphotypes) colonies could be picked for analysis. In total, we studied 132 colonies (8 to 27 colonies per specimen).

Genomic diversity of *Achromobacter* sp. at intrasputum level. For each patient, colonies corresponded to identical or clonally related strains in PFGE. According to the results of a previous study, including strains from these 9 patients (15), no cross-transmission between patients was observed (Fig. 1). In addition, identical pulsotypes were observed during both previous and current studies, thereby showing that the 9 patients are colonized by persisting strains.

No sputum sample harbored colonies with identical PFGE profiles. We found 2 to 8 different pulsotypes per sputum sample (Fig. 1; Table 1), with an average of 3.5 PFGE profiles per specimen. Pulsotypes were mostly unrelated to the colonial morphotype (Fig. 1). Indeed, within 45 morphotypes (90%), at least one colony shared an identical pulsotype with at least one colony of a distinct morphotype. Contrarily, 16 morphotypes of the 44 for which more than one colony was studied (36.4%) included strains of different pulsotypes, and in all of the samples studied, at least one colonial morphotype gathered colonies with different PFGE profiles. The number of morphotypes was not related to the number of distinct PFGE profiles in a sample (Fig. 1; Table 1).

Heterogeneity of antibiotic susceptibility patterns. The coefficient of variation (CV) ranged from 38% to 68% for the 16 antimicrobial agents and the 132 strains tested, with imipenem and colistin presenting the lowest zone of inhibition (ZOI) measure

TABLE 1 Summarized data for the 9 patients and samples included in the study and main results of intrasample and intramorphotype diversity study

Patient designation	Age (yr)	<i>Achromobacter</i> colonization period (yr)	Sputum sample data		Pulsotype diversity		Antimicrobial susceptibility diversity ^a				
			No. of morphotypes	No. of strains studied	Pulsotype no. per sample	Pulsotype no. per morphotype	Antibiotype diversity per sample		Antibiotype diversity per morphotype		Antimicrobial agents with different clinical categorization (S/R) ^b
							CV (%)	No. (%) of antimicrobial agents with distinct clinical categorization (S/R)	CV (%)	No. (%) of antimicrobial agents with distinct clinical categorization (S/R)	
P1	52	18	7	16	3	1 to 2	15	7 (44)	0–10	0–3 (0–19)	AMC, PIP, TPZ, CAZ, C, LEV, SXT
P2	17	10	11	27	2	1 to 2	21	11 (69)	3–27	1–6 (6–37.5)	AMX, AMC, TIC, <u>TCC</u> , CAZ, IMP, CS, C, CIP, LEV, SXT
P3	20	9	4	12	2	1 to 2	9	3 (19)	6–9	0–1 (0–6)	AMX, <u>ETM</u> , C
P4	15	13	3	9	4	1 to 2	21	4 (25)	7–18	1–3 (6–19)	TPZ, <u>CS</u> , C, SXT
P5	19	9	5	15	6	1 to 3	19	6 (37.5)	2–12	0–3 (0–19)	CAZ, CS, C, LEV, SXT, TET
P6	13	9	6	13	8	1 to 3	20	5 (31)	7–14	0–2 (0–12.5)	PIP, TPZ, <u>CAZ</u> , <u>CIP</u> , LEV
P8	20	11	7	21	3	1 to 3	20	6 (37.5)	2–17	0–3 (0–19)	AMC, TIC, <u>CAZ</u> , MEM, CS, C
P11	25	6	4	11	2	1 to 2	11	3 (19)	5–11	0–2 (0–12.5)	ETM, CS, SXT
P12	11	5	3	8	2	1 to 2	21	7 (44)	13–27	2–5 (12.5–31)	AMX, AMC, CAZ, MEM, CS, C, SXT

^aCV, coefficient of variation of zones of inhibition measured in millimeters; S, susceptible; R, resistant (includes resistant and intermediate clinical categorizations).

^bAMX, amoxicillin; AMC, amoxicillin-clavulanic acid; PIP, piperacillin; TPZ, piperacillin-tazobactam; TIC, ticarcillin; TCC, ticarcillin-clavulanic acid; CAZ, ceftazidime; IMP, imipenem; ETM, ertapenem; MEM, meropenem; CS, colistin; C, chloramphenicol; LEV, levofloxacin; CIP, ciprofloxacin; SXT, trimethoprim-sulfamethoxazole; TET, tetracycline. Underlined antimicrobial agent names indicates that clinical categorization varied at the intrasample level only while identical at the intramorphotype level.

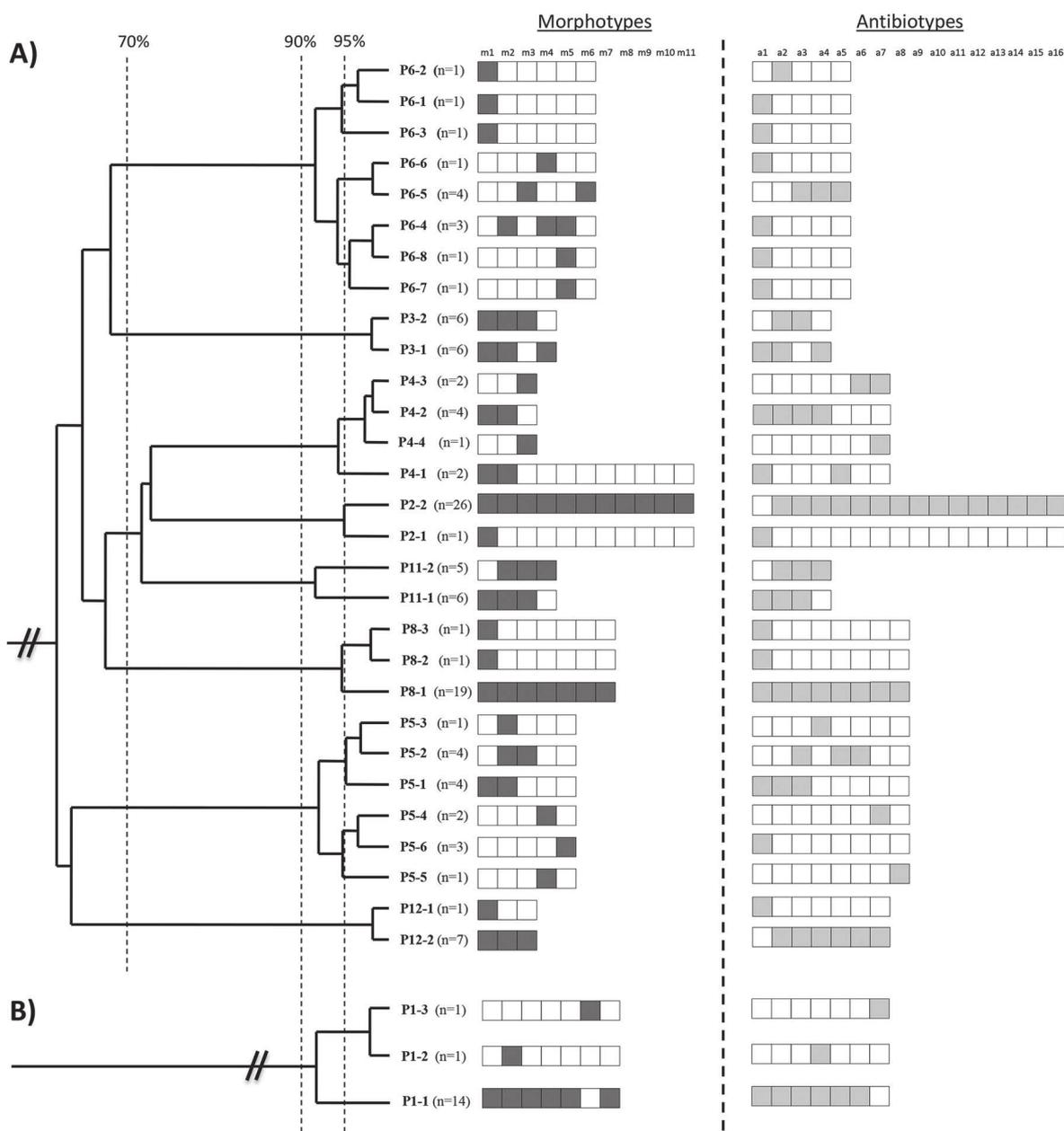


FIG 1 Relation between genomic and phenotypic variability among 132 strains recovered from sputum samples in 9 patients chronically colonized by *Achromobacter* spp. (A) *A. xylosoxidans*; (B) *A. insuavis*. (Left) Genomic diversity among XbaI-generated pulsotypes at the interpatient level and at the intrasample level. Dendrogram was obtained by clustering analysis based on the Dice coefficient and unweighted pair group method with arithmetic means (UPGMA). The Dice coefficient scale is shown at the top of the dendrogram. Pulsotypes were named after the patient number (P1, P2, etc.) and a unique number for each pulsotype observed. The number of strains showing a pulsotype is indicated after the pulsotype name. (Right) Diversity of colonial morphotypes and of antimicrobial susceptibility patterns in relation to pulsotypes. The different colonial morphotypes and antibiotypes were defined at the intraspecimen level and were designed by m1, m2, etc. (up to 3 colonies were studied per colonial morphotype) and a1, a2, etc., respectively. The dark gray boxes represent the different morphotypes observed for strains with the opposite PFGE profile. The light gray boxes represent the different antibiotypes presented by strains with the opposite PFGE profile.

dispersion and tetracycline and ertapenem presenting the highest ZOI measure dispersion (Tables 2 and 3). Within a specimen, global CV varied from 9% to 21% with different situations observed depending on the sample; variability was observed for the 16 antimicrobial agents in 2 cases, and variability was detected for 7 to 15 agents in other cases. The antimicrobial agent showing the highest variability in ZOI measures varied according to the sample but was co-trimoxazole in 5 samples. Within a morphotype, CVs of up to 27% were observed (Table 1).

TABLE 2 Intrasample diversity of *in vitro* activity of 16 antimicrobial agents according to breakpoints used for clinical categorization

Species	Antibiotic breakpoint (mm) ^a															
	AMX	AMC	TIC	TCC	PIP	TPZ	CAZ	ETM	IPM	MEM	CS ^d	C	CIP	LEV	SXT	TET
<i>Enterobacteriaceae</i>	19	19	23	23	17–20	17–20	19–22	22–25	16–22	16–22	17	19–22	19–22	13–16		
<i>P. aeruginosa</i>			18	18	18	18	16		17–20	18–24		22–25	17–20			
<i>Acinetobacter</i> spp.			15–20	15–20	18–21	18–21	15–18		17–23	15–21		21	18–21	13–16	12–15	
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>														12–17	16	
<i>B. cepacia</i>							18–21			16–20					11–16	

^aBreakpoints are those edited by the Antibiogram Committee of the French Society for Microbiology in 2016 (CA-SFM 2016) for *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp., *Stenotrophomonas maltophilia*, and *Burkholderia cepacia*. AMX, amoxicillin (25 µg); AMC, amoxicillin-clavulanic acid (20 µg/10 µg); PIP, piperacillin (75 µg); TPZ, piperacillin-tazobactam (75 µg/10 µg); TIC, ticarcillin (75 µg); TCC, ticarcillin-clavulanic acid (75 µg/10 µg); CAZ, ceftazidime (30 µg); IMP, imipenem (10 µg); ETM, ertapenem (10 µg); MEM, meropenem (10 µg); CS, colistin (50 µg); C, chloramphenicol (30 µg); LEV, levofloxacin (5 µg); CIP, ciprofloxacin (5 µg); SXT, trimethoprim-sulfamethoxazole (1.25 µg/23.75 µg); TET, tetracycline (30 µg).

Eighteen discrepant categorizations, mainly affecting levofloxacin (*n* = 5 samples) and ciprofloxacin susceptibility results (*n* = 3 samples), were observed when the different thresholds available for other Gram-negative bacilli were applied (Table 2). In the absence of recommended thresholds for *Achromobacter* spp., these observations highlighted the impact of the choice of breakpoints edited for other bacilli on *Achromobacter* susceptibility results.

Differences in clinical categorization were observed for the 9 patients and concerned 3 to 11 antibiotics (Fig. 2), with chloramphenicol, ceftazidime, colistin, and co-trimoxazole being the most affected agents and ticarcillin-clavulanic acid, imipenem, and tetracycline being the less affected agents (Table 1). Divergent categorization was mainly noted within a morphotype (Table 1) and was observed for one to six antimicrobial agents within 34 of the 44 morphotypes for which more than one colony was studied (77%).

Altogether, our results showed that depending on the patient, the antimicrobial agent, and the strain morphotype, antimicrobial susceptibility patterns may be incompletely described when only one colony of each morphotype in a sputum sample is selected for antimicrobial susceptibility testing.

Finally, no clear relation between antibiotypes and pulsotypes was observed because we found that among the 17 pulsotypes, including several strains, the majority (*n* = 14; 82%) included strains presenting distinct antibiotypes (Fig. 2), but conversely, among the 24 antibiotypes presented by several strains in a sample, strains mostly had identical pulsotypes (*n* = 14; 58%).

DISCUSSION

The few longitudinal studies available in the literature reported genetic, genomic, and phenotypic variations in CF *Achromobacter* strains over time. Dynamics of phenotype (biofilm formation, motility, antimicrobial resistance), genotype (studied by PFGE, rep-PCR, randomly amplified polymorphic DNA [RAPD]), and genome (whole-genome sequencing [WGS]) suggested within-host evolution of clonal lineages linked to adaptation or pathoadaptation mechanisms. For example, WGS comparing longitudinally collected isolates of *A. xylosoxidans* and *Achromobacter insuavis* that were isolated from CF patients identified strain-specific mutations in genes mostly involved in general metabolism but also in virulence and antimicrobial resistance (17). Moreover, genome fingerprint diversity was a frequent finding during *Achromobacter* persistence (12 out of the 13 patients in the study by Dupont et al. [15] and 10 out of the 14 patients in the study by Amoureux et al. [14]).

Although not designed to study within-sample diversity, these studies suggested that genomic variants may coexist within samples. In a previous study, PFGE and/or multiplex rep-PCR detected genomic diversity at the intraspecimen level in 11 out of 22 samples containing multiple *Achromobacter* strains and in 6 out of the 9 patients studied (15). Intraspecimen diversity in *P. aeruginosa* populations was recently demonstrated with heterogeneous populations composed of multiple coexisting variants derived from a single ancestor in a CF lung (7). Regarding phenotype, studies investi-

TABLE 3 Intrasample diversity of *in vitro* activity of 16 antimicrobial agents according to breakpoints used for clinical categorization

Patient	^a	Antibiotic ^b															
		AMX	AMC	TIC	TCC	PIP	TPZ	CAZ	ETM	IPM	MEM	CS ^c	C	CIP	LEV	SXT	TET
1	Minimum ZOI (mm)	8	14	30	33	18	20	14	32	30	27	23	9	12	15	15	25
	Maximum ZOI (mm)	15	25	40	44	44	44	24	40	38	38	28	23	20	23	30	30
	ZOI CV ^b (%)	17	14	13	8	26	26	16	8	8	10	5	25	17	14	20	8
2	Minimum ZOI (mm)	10	15	15	18	34	32	6	11	17	23	6	6	6	9	6	6
	Maximum ZOI (mm)	30	25	36	32	43	42	24	24	40	34	28	18	23	21	22	6
	ZOI CV (%)	30	16	23	18	7	8	34	20	17	10	34	28	21	21	46	0
3	Minimum ZOI (mm)	18	19	32	30	36	36	21	20	26	24	16	10	9	9	20	6
	Maximum ZOI (mm)	23	25	36	35	40	40	26	34	36	34	23	19	12	13	28	6
	ZOI CV (%)	6	8	4	4	5	5	7	19	8	9	12	20	8	11	13	0
4	Minimum ZOI (mm)	6	6	6	6	10	10	6	6	32	12	6	15	6	10	6	6
	Maximum ZOI (mm)	6	14	10	12	20	21	12	6	36	18	26	20	20	20	23	9
	ZOI CV (%)	0	27	14	21	19	18	25	0	3	16	44	13	37	30	61	9
5	Minimum ZOI (mm)	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	10	6	6	6	6	6
	Maximum ZOI (mm)	6	6	6	6	6	6	18	6	6	6	33	30	12	23	40	23
	ZOI CV (%)	0	0	0	0	0	0	42	0	0	0	29	38	19	55	69	51
6	Minimum ZOI (mm)	6	6	6	6	6	9	6	6	6	6	13	22	13	11	30	6
	Maximum ZOI (mm)	6	6	6	6	23	24	30	20	18	6	23	34	27	33	40	11
	ZOI CV (%)	0	0	0	0	41	35	51	44	27	0	21	16	24	30	13	11
8	Minimum ZOI (mm)	6	6	14	21	40	40	6	6	32	6	6	9	6	6	6	6
	Maximum ZOI (mm)	16	25	44	45	45	45	45	12	40	28	12	25	10	12	6	6
	ZOI CV (%)	26	31	22	19	5	5	40	26	8	47	23	35	11	21	0	0
11	Minimum ZOI (mm)	6	24	6	27	6	6	6	12	30	29	10	6	6	6	6	6
	Maximum ZOI (mm)	18	28	6	35	6	6	6	32	34	32	20	12	10	10	25	6
	ZOI CV (%)	23	6	0	7	0	0	0	25	5	3	30	22	12	12	32	0
12	Minimum ZOI (mm)	6	10	30	25	30	30	11	6	24	16	10	10	6	6	6	6
	Maximum ZOI (mm)	30	19	40	38	40	40	22	10	40	28	23	28	10	10	30	10
	ZOI CV (%)	36	25	11	14	8	8	29	14	16	19	34	34	18	19	43	15
Total	Minimum ZOI (mm)	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	Maximum ZOI (mm)	30	28	44	45	45	45	45	40	40	38	33	34	27	33	40	30
	ZOI CV (%)	47	41	58	50	51	50	58	65	38	47	39	39	41	45	60	68

^aZOI CV, coefficient of variation of zones of inhibition measured in millimeters.

^bAMX, amoxicillin (25 µg); AMC, amoxicillin-clavulanic acid (20 µg/10 µg); PIP, piperacillin (75 µg); TPZ, piperacillin-tazobactam (75 µg/10 µg); TIC, ticarcillin (75 µg); TCC, ticarcillin-clavulanic acid (75 µg/10 µg); CAZ, ceftazidime (30 µg); IMP, imipenem (10 µg); ETM, ertapenem (10 µg); MEM, meropenem (10 µg); CS, colistin (50 µg); C, chloramphenicol (30 µg); LEV, levofloxacin (5 µg); CIP, ciprofloxacin (5 µg); SXT, trimethoprim-sulfamethoxazole (1.25 µg/23.75 µg); TET, tetracycline (30 µg). Shading indicates that clinical categorization was variable according to the breakpoints used; bold type indicates the antibiotic with the highest CV values.

^cSusceptibility breakpoint of 12 mm was applied according to Biswas et al. (26).

gating up to 15 characteristics for up to 40 colonies of *P. aeruginosa* cultured from a single CF specimen showed a high and dynamic diversity, including pathoadaptive traits, such as antibiotic resistance, making accurate diagnosis and treatment challenging (4). *P. aeruginosa* population genomics revealed extensive within-patient genetic diversity (4). In our study, dedicated to intraspecimen *A. xylosoxidans* diversity, each patient was colonized by at least two related strains in PFGE. Despite the fact that it is likely that strain diversity, which is a dynamic process highly dependent on niche conditions, may have evolved since the previous study by Dupont et al. (15), we compared the pulsotype diversity observed in both studies. For *A. xylosoxidans*, diversity was either the same (5 patients) or greater (3 patients) within a unique sample in the present study than that observed for strains collected over 13 to 38 months. The most striking example was noted for strains in patient 6 because no genomic variation was previously observed during a 3-year period of colonization (2009 to 2012), while 9 genomic profiles were found for strains recovered from a unique specimen in 2015. For patient 1, who was colonized by *A. insuavis*, we previously found an exceptionally high

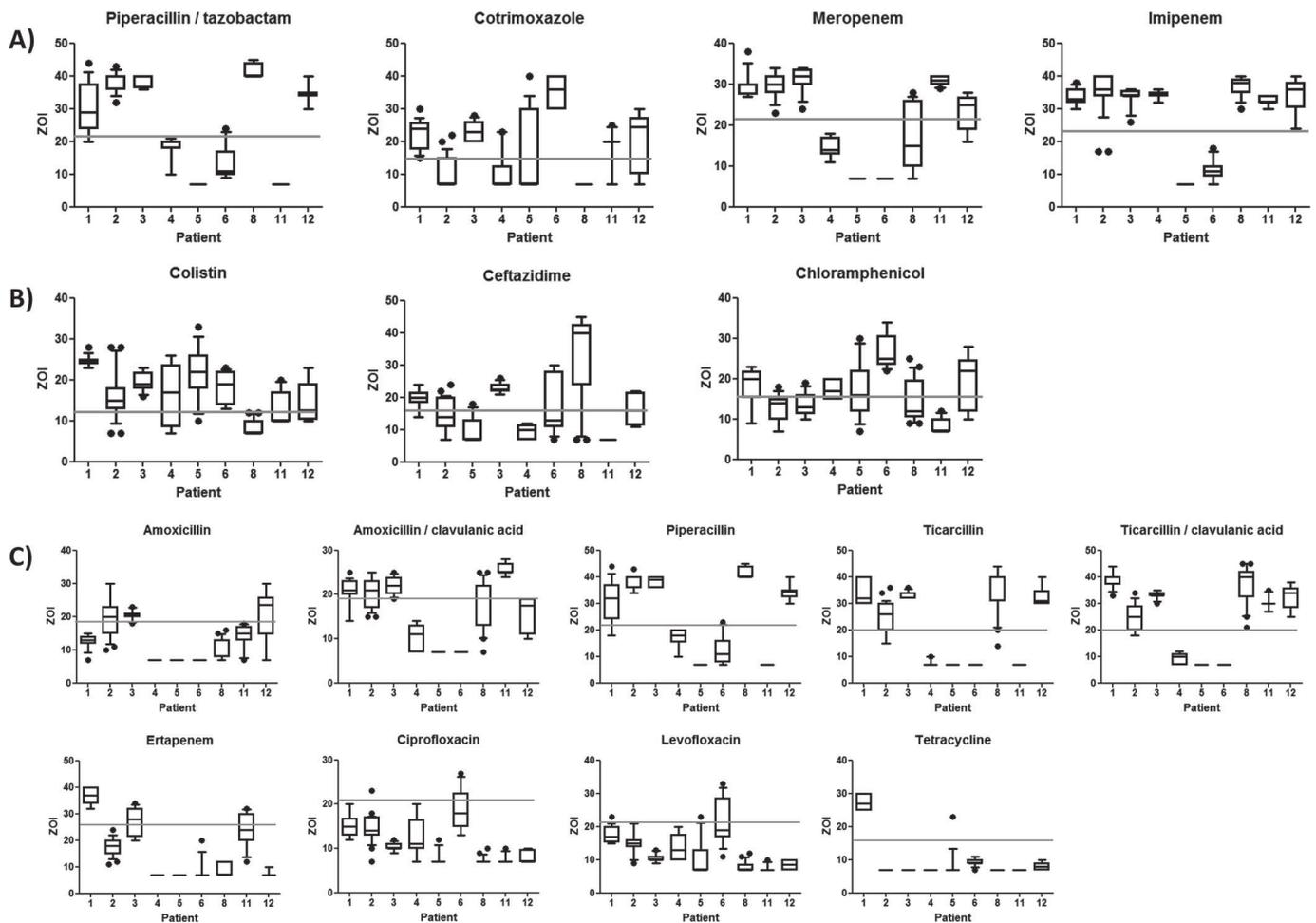


FIG 2 Intrasample variations in antimicrobial susceptibilities toward 16 antimicrobial agents of *Achromobacter* spp. recovered from sputum specimens in 9 patients. (A) First-line antibiotics; (B) second-line antibiotics; (C) other antimicrobial agents. Whiskers plots illustrate the spread of zone of inhibition (ZOI) measures in millimeters for multiple strains within a sample in 9 patients chronically colonized with *Achromobacter* insuavis (patient 1) or *Achromobacter* xylosoxidans (other patients) for the 16 antimicrobials agents studied. For each patient, 8 to 27 strains were analyzed. The gray line indicates the susceptibility cutoff point edited for *Acinetobacter* sp. by the Antibiogram Committee of the French Society for Microbiology in 2016 or, when not available, that edited for *Enterobacteriaceae*. For colistin, the cutoff was that defined by Biswas et al. (26).

genomic diversity over the 5-year period of colonization studied (15), contrasting with the low intraspecimen diversity observed here, suggesting that strain behavior and persistence strategy may differ according to the species.

The main consequence of within-specimen diversity on the therapeutic management of CF airway infections may be the incomplete evaluation of population resistance.

Treatment options for such infections are often limited by the innate resistance of *Achromobacter* spp. to most cephalosporins except ceftazidime and to the aminoglycosides. *In vitro* studies showed that the most active drugs against *A. xylosoxidans* were carbapenems, piperacillin-tazobactam, minocycline, and co-trimoxazole (18–20). The most active additive or synergistic combinations were chloramphenicol plus minocycline, ciprofloxacin plus imipenem, and ciprofloxacin plus meropenem (21). Consequently, first-line treatment options against *A. xylosoxidans* included piperacillin-tazobactam, carbapenems (imipenem and meropenem), and trimethoprim-sulfamethoxazole, while second-line drugs are ceftazidime, minocycline, colistin, and chloramphenicol (22). In addition, acquired resistance in *Achromobacter* spp., leading to multidrug resistance and pan-resistance has been reported for CF strains (23, 24). Therefore, it has been recommended that antimicrobial therapy should be directed by susceptibility testing (25). In this study, we used a disk diffusion assay, a method that

has been frequently used in routine practice and, despite the fact that it is not a reference method, has been shown to be able to predict the MIC values for some antibiotics that are active against *Achromobacter* spp. like carbapenems, cotrimoxazole, and colistin in comparative studies of resistance test methods (19, 26). In the absence of specific recommendations to perform antimicrobial susceptibility testing and to interpret results for *Achromobacter* spp., most laboratories currently applied, by default, recommendations edited for other Gram-negative bacilli in order to provide interpreted antibiograms to clinicians. For example, some authors used thresholds defined for *P. aeruginosa* (27) despite it being incompletely transposable to *Achromobacter* spp. due to distinct intrinsic resistances. Here, we showed that clinical categorization may vary according to the choice made for result interpretation. In addition, as previously described for *P. aeruginosa* (28), we highlighted the existence of heterogeneous *Achromobacter* populations in all of the the sputum samples analyzed with the coexistence of susceptible and resistant strains. The different antibiotic resistance profiles were observed within sputum samples independently of the colonial morphotype and pulsotype. First described here for *Achromobacter* spp., similar results were previously obtained during a survey of 101 sputum samples studying 4 *P. aeruginosa* colonies per morphotype and showing an average of 3 resistance profiles per morphotype (29). Our study thus showed that *Achromobacter* spp. are CF pathogens, for which the intrasample and the intramorphotype antimicrobial susceptibility diversity leads to an underestimation of antibiotic resistance and impairs current strategies of antimicrobial susceptibility testing on each colonial morphotype (10, 30). Consequently, some authors have suggested that performing direct sputum susceptibility testing may be more accurate and may overcome the impact of resistance phenotype diversity (30, 31). However, such approaches likely underestimate resistances harbored by minor subpopulations. Exploring the overall intrasample *Achromobacter* diversity remains challenging, labor-intensive, and cost-effective. Moreover, bacterial population diversity is a highly dynamic process, during which minor variants may emerge and become predominant under specific selection pressure conditions (32). Hence, changes in antimicrobial resistance during exacerbation periods have been previously demonstrated for *P. aeruginosa* populations (28).

In conclusion, our results showed that *Achromobacter* spp. display a highly diversified population during chronic colonization in CF patients and that this diversity is significantly undersampled during the routine processing of CF sputum samples, even if one colony of each colonial morphotype is considered in the analyses, as recommended for *P. aeruginosa*. Together with the absence of specific breakpoints for *Achromobacter* spp., our results questioned the clinical relevance of antimicrobial susceptibility testing on persisting *Achromobacter* in CF.

Although all of the underlying processes promoting diversity remain unelucidated (33), by conferring an adaptive ability to diverse environmental conditions, diversity is usually considered a selective advantage for a bacterial population (34). Beside antimicrobial resistance, the population diversity probably concerns other pathoadaptive features that enhance the persistence of *Achromobacter* in the CF lung, like biofilm formation and motility (16).

METHODS

Patients, samples, and strains. Nine patients chronically colonized by *A. xylosoxidans* ($n = 8$) or *Achromobacter insuavis* ($n = 1$) and attending the CF center of the Montpellier University Hospital, a large regional French CF center caring for more than 200 children and adults each year, were included. Patients were previously included in a study on within-patient genomic diversity of *Achromobacter* spp. involved in chronic colonization defined according to Pereira et al. (35). During this previous study, *Achromobacter* strains that were recovered over colonization periods of 13 to 51 months between November 2008 and September 2013 were analyzed (15). Patients who attended the CF center in 2015 were included in this study, and their numbering is identical in reference 15 and herein: P1 to P6, P8, P11, and P12.

Specimens were routine sputum samples collected in 2015 for diagnostic purposes in the nine patients. At the time of sampling, patients P1, P5, and P6 experienced an episode of pulmonary exacerbation while clinical status was stable for other patients. Fifty microliters of sputum was cultured for 48 h at 37°C on chocolate agar PolyViteX (PVX; bioMérieux). The primary culture was collected and diluted in physiological serum. Dilutions from 10^{-6} to 10^{-8} were cultured on chocolate agar plates to

obtain a maximum of 200 visually distinct colonies. The genus identification of colonies was performed by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) using a Microflex LT mass spectrometer and a MALDI BioTyper DB 5627 MSP list database (Bruker Daltonics). Every time it was possible, three *Achromobacter* colonies of each morphotype were selected per sputum sample with the help of a magnifying glass and were subcultured on Trypticase soy agar (BD). Morphotypes were defined by three different parameters: the size, the color, and the form of the colonies.

Pulsed-field gel electrophoresis of SpeI-digested DNA. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) was performed after DNA macrorestriction by SpeI as previously described (15). The profiles were visually analyzed and annotated with a letter corresponding to the patient and a number corresponding to the pulsotype. PFGE bands were measured and scored as present (1) or absent (0) in a binary table, and the Dice coefficient and unweighted pair group method with arithmetic means (UPGMA) (<http://genomes.urv.cat/UPGMA/>) were used for pulsotype clustering analysis.

Determination of antibiotic susceptibility. All selected colonies were individually tested for antimicrobial susceptibility by disk diffusion assay on Mueller-Hinton agar (BD). The 16 antimicrobial agents tested and disk (Bio-Rad) load are indicated in the Table 2 and 3 footnotes. Bacterial inoculum was standardized to a 0.5 McFarland standard. Colonies from the same specimen were assayed the same day by the same operator using the same batch of antibiotic disks and Mueller-Hinton agar plates. Measures of zones of inhibition (ZOI) and coefficient of variation (CV) were reported at both the intraspecimen and the intramorphotype levels. Data were analyzed with GraphPad Prism using box and whiskers. The whiskers were drawn down to the 10th percentile and up to the 90th. Points below and above the whiskers were drawn as individual dots.

In the absence of specific breakpoints for *Achromobacter* spp., results were compared to the different breakpoints edited by the Antibiogram Committee of the French Society for Microbiology in 2016 (CA-SFM 2016) (<http://www.sfm-microbiologie.org/>) for defining susceptible, intermediate, and resistant categories for different Gram-negative bacilli (*P. aeruginosa*, *Acinetobacter*, *Stenotrophomonas maltophilia*, and *Enterobacteriaceae*). For colistin, we used the diameter breakpoint of 12 mm proposed by Biswas et al. because of its good correlation with the MICs obtained by the Etest on *Achromobacter* in the context of CF (26).

For antibiotic definition and further analysis of the impact of intraspecimen diversity on antimicrobial susceptibility results, both the intermediate and resistant categories were pooled in the resistant category and results were interpreted according to the breakpoints of CA-SFM 2016 for *Acinetobacter* or, when not available, according to those for *Enterobacteriaceae*.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors gratefully acknowledge Linda Aleyrangues and Monique Alvado for their excellent technical assistance.

REFERENCES

- Hauser AR, Jain M, Bar-Meir M, McColley SA. 2011. Clinical significance of microbial infection and adaptation in cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev* 24:29–70. <https://doi.org/10.1128/CMR.00036-10>.
- Hogardt M, Heesemann J. 2010. Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* during persistence in the cystic fibrosis lung. *Int J Med Microbiol* 300:557–562. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2010.08.008>.
- Goerke C, Wolz C. 2004. Regulatory and genomic plasticity of *Staphylococcus aureus* during persistent colonization and infection. *Int J Med Microbiol* 294:195–202. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2004.06.013>.
- Winstanley C, O'Brien S, Brockhurst MA. 2016. *Pseudomonas aeruginosa* evolutionary adaptation and diversification in cystic fibrosis chronic lung infections. *Trends Microbiol* 24:327–337. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.01.008>.
- Wilder CN, Allada G, Schuster M. 2009. Instantaneous within-patient diversity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing populations from cystic fibrosis lung infections. *Infect Immun* 77:5631–5639. <https://doi.org/10.1128/IAI.00755-09>.
- Marvig RL, Johansen HK, Molin S, Jelsbak L. 2013. Genome analysis of a transmissible lineage of *Pseudomonas aeruginosa* reveals pathoadaptive mutations and distinct evolutionary paths of hypermutators. *PLoS Genet* 9:e1003741. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003741>.
- Workentine ML, Sibley CD, Glezerson B, Purighalla S, Norgaard-Gron JC, Parkins MD, Rabin HR, Surette MG. 2013. Phenotypic heterogeneity of *Pseudomonas aeruginosa* populations in a cystic fibrosis patient. *PLoS One* 8:e60225. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060225>.
- Jorth P, Staudinger BJ, Wu X, Hisert KB, Hayden H, Garudathri J, Harding CL, Radey MC, Rezayat A, Bautista G, Berrington WR, Goddard AF, Zheng C, Angermeyer A, Brittnacher MJ, Kitzman J, Shendure J, Fligner CL, Mittler J, Aitken ML, Manoil C, Bruce JE, Yahr TL, Singh PK. 2015. Regional isolation drives bacterial diversification within cystic fibrosis lungs. *Cell Host Microbe* 18:307–319. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.07.006>.
- Société Française de Microbiologie. 2015. Chapter 20. Infections broncho-pulmonaires et mucoviscidose. In *Référentiel en microbiologie médicale*. Edition 5.1. REMIC.
- Clark ST, Diaz Caballero J, Cheang M, Coburn B, Wang PW, Donaldson SL, Zhang Y, Liu M, Keshavjee S, Yau YC, Waters VJ, Elizabeth Tullis D, Guttman DS, Hwang DM. 2015. Phenotypic diversity within a *Pseudomonas aeruginosa* population infecting an adult with cystic fibrosis. *Sci Rep* 5:10932. <https://doi.org/10.1038/srep10932>.
- Mahenthalingam E. 2014. Emerging cystic fibrosis pathogens and the microbiome. *Paediatr Respir Rev* 15(Suppl):13–15.
- Cools P, Ho E, Vranckx K, Schelstraete P, Wurth B, Franckx H, Ieven G, Van Simaey L, Van Daele S, Verhulst S, De Baets F, Vaneechoutte M. 2016. Epidemic *Achromobacter xylosoxidans* strain among Belgian cystic fibrosis patients and review of literature. *BMC Microbiol* 16:122. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0736-1>.
- Hansen CR, Pressler T, Nielsen KG, Jensen PØ, Bjarnsholt T, Høiby N. 2010. Inflammation in *Achromobacter xylosoxidans* infected cystic fibrosis patients. *J Cyst Fibros* 9:51–58. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2009.10.005>.
- Amoureux L, Bador J, Siebor E, Taillefumier N, Fanton A, Neuwirth C. 2013. Epidemiology and resistance of *Achromobacter xylosoxidans* from cystic fibrosis patients in Dijon, Burgundy: first French data. *J Cyst Fibros* 12:170–176. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2012.08.005>.
- Dupont C, Michon AL, Jumas-Bilak E, Nørskov-Lauritsen N, Chiron R, Marchandin H. 2015. Inpatient diversity of *Achromobacter* spp. involved in chronic colonization of cystic fibrosis airways. *Infect Genet Evol* 32:214–223. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.03.012>.
- Trancassini M, Iebba V, Citerà N, Tuccio V, Magni A, Varesi P, De Biase RV,

AQ: F

- Totino V, Santangelo F, Gagliardi A, Schippa S. 2014. Outbreak of *Achromobacter xylosoxidans* in an Italian cystic fibrosis center: genome variability, biofilm production, antibiotic resistance, and motility in isolated strains. *Front Microbiol* 5:138.
17. Ridderberg W, Nielsen SM, Nørskov-Lauritsen N. 2015. Genetic adaptation of *Achromobacter* sp. during persistence in the lungs of cystic fibrosis patients. *PLoS One* 10:e0136790. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136790>.
 18. Saiman L, Chen Y, Tabibi S, San Gabriel P, Zhou J, Liu Z, Lai L, Whittier S. 2001. Identification and antimicrobial susceptibility of *Alcaligenes xylosoxidans* isolated from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 39:3942–3945. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.11.3942-3945.2001>.
 19. Almuzara M, Limansky A, Ballerini V, Galanternik L, Famiglietti A, Vay C. 2010. *In vitro* susceptibility of *Achromobacter* spp. isolates: comparison of disk diffusion, Etest and agar dilution methods. *Int J Antimicrob Agents* 35:68–71. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2009.08.015>.
 20. Llorca Otero L, Girón Moreno R, Buendía Moreno B, Valenzuela C, Guiu Martínez A, Alarcón Cavero T. 2016. *Achromobacter xylosoxidans* infection in an adult cystic fibrosis unit in Madrid. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 34:184–187. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2015.05.006>.
 21. Goss CH, Burns JL. 2007. Exacerbations in cystic fibrosis. 1: Epidemiology and pathogenesis. *Thorax* 62:360–367. <https://doi.org/10.1136/thx.2006.060889>.
 22. Abbott IJ, Peleg AY. 2015. *Stenotrophomonas*, *Achromobacter*, and non-melioid *Burkholderia* species: antimicrobial resistance and therapeutic strategies. *Semin Respir Crit Care Med* 36:99–110. <https://doi.org/10.1055/s-0034-1396929>.
 23. Yamamoto M, Nagao M, Hotta G, Matsumura Y, Matsushima A, Ito Y, Takakura S, Ichiyama S. 2012. Molecular characterization of IMP-type metallo- β -lactamases among multidrug-resistant *Achromobacter xylosoxidans*. *J Antimicrob Chemother* 67:2110–2113. <https://doi.org/10.1093/jac/dks179>.
 24. Lobo LJ, Tulu Z, Aris RM, Noone PG. 2015. Pan-resistant *Achromobacter xylosoxidans* and *Stenotrophomonas maltophilia* infection in cystic fibrosis does not reduce survival after lung transplantation. *Transplantation* 99:2196–2202. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000000709>.
 25. Gibson RL, Burns JL, Ramsey BW. 2003. Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 168:918–951. <https://doi.org/10.1164/rccm.200304-505SO>.
 26. Biswas S, Dubus JC, Reynaud-Gaubert M, Stremmer N, Rolain JM. 2013. Evaluation of colistin susceptibility in multidrug-resistant clinical isolates from cystic fibrosis, France. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 32:1461–1464. <https://doi.org/10.1007/s10096-013-1898-5>.
 27. Wang M, Ridderberg W, Hansen CR, Høiby N, Jensen-Fangel S, Olesen HV, Skov M, Lemming LE, Pressler T, Johansen HK, Nørskov-Lauritsen N. 2013. Early treatment with inhaled antibiotics postpones next occurrence of *Achromobacter* in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 12:638–643. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2013.04.013>.
 28. Fothergill JL, Mowat E, Ledson MJ, Walshaw MJ, Winstanley C. 2010. Fluctuations in phenotypes and genotypes within populations of *Pseudomonas aeruginosa* in the cystic fibrosis lung during pulmonary exacerbations. *J Med Microbiol* 59:472–481. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.015875-0>.
 29. Foweraker JE, Laughton CR, Brown DF, Bilton D. 2005. Phenotypic variability of *Pseudomonas aeruginosa* in sputa from patients with acute infective exacerbation of cystic fibrosis and its impact on the validity of antimicrobial susceptibility testing. *J Antimicrob Chemother* 55:921–927. <https://doi.org/10.1093/jac/dki146>.
 30. Serisier DJ, Tuck A, Matley D, Carroll MP, Jones G. 2012. Antimicrobial susceptibility and synergy studies of cystic fibrosis sputum by direct sputum sensitivity testing. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 31:3211–3216. <https://doi.org/10.1007/s10096-012-1687-6>.
 31. Zebouh M, Thomas C, Honderlick P, Lemee L, Segonds C, Wallet F, Husson MO. 2008. Direct antimicrobial susceptibility testing method for analysis of sputum collected from patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 7:238–243. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2007.10.002>.
 32. Mowat E, Paterson S, Fothergill JL, Wright EA, Ledson MJ, Walshaw MJ, Brockhurst MA, Winstanley C. 2011. *Pseudomonas aeruginosa* population diversity and turnover in cystic fibrosis chronic infections. *Am J Respir Crit Care Med* 183:1674–1679. <https://doi.org/10.1164/rccm.201009-1430OC>.
 33. Markussen T, Marvig RL, Gómez-Lozano M, Aanæs K, Burleigh AE, Høiby N, Johansen HK, Molin S, Jelsbak L. 2014. Environmental heterogeneity drives within-host diversification and evolution of *Pseudomonas aeruginosa*. *mBio* 5:e01592-14.
 34. Lieberman TD, Flett KB, Yelin I, Martin TR, McAdam AJ, Priebe GP, Kishony R. 2014. Genetic variation of a bacterial pathogen within individuals with cystic fibrosis provides a record of selective pressures. *Nat Genet* 46:82–87.
 35. Pereira RH, Carvalho-Assef AP, Albano RM, Folescu TW, Jones MC, Leão RS, Marques EA. 2011. *Achromobacter xylosoxidans*: characterization of strains in Brazilian cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol* 49:3649–3651. <https://doi.org/10.1128/JCM.05283-11>.

III Complément de discussion

Au cours de cette étude, nous avons observé une importante diversité génomique au sein des populations d'*Achromobacter* colonisant les VRCF des 9 patients, avec de 2 à 8 profils observés en ECP pour les colonies d'un même échantillon clinique. De plus, nous avons mis en évidence que les colonies appartenant à un même morphotype pouvaient présenter des pulsotypes différents. Une analyse génomique de populations de *P. aeruginosa* a d'ailleurs rapporté que la diversité génomique au sein d'un échantillon d'un patient pouvait être comparable à la diversité observée dans d'autres études portant sur des isolats séquentiels de patients CF sur périodes d'études de 7 à 30 ans (Chung et al. 2012). Lors de notre étude, pour 5 patients nous avons observé la même diversité génomique entre les études de colonisation chronique et intra-échantillon, et pour 3 patients, nous avons observé une plus forte diversité génomique intra-échantillon.

D'autre part, nous avons observé une forte diversité de profils d'antibiorésistance au sein des 9 expectorations, les colonies obtenues à partir d'une même expectoration présentant de 4 à 16 profils différents. Il n'y a pas de recommandations spécifiques concernant l'interprétation des antibiogrammes effectués sur les bactéries du genre *Achromobacter* et nous avons constaté que selon les seuils choisis parmi les recommandations disponibles, l'interprétation clinique pouvait être différente. Enfin, nous avons montré que des colonies d'un même morphotype présentant un pulsotype identique pouvaient présenter des antibiotypes différents tandis que des colonies de morphotypes et de pulsotypes différents pouvaient présenter des profils de résistance identiques. Comme lors d'une précédente étude de populations CF de *P. aeruginosa*, nos résultats n'ont pas montré de relation entre génotypes et phénotypes (Leone et al. 2008). Ceci est peut-être dû au fait que l'ECP n'est pas adaptée à la détection de différences génétiques subtiles et que l'expression de certains gènes, non observable par des méthodes génomiques, peut être affectée par les conditions environnementales (Leone et al. 2008).

Nous avons montré que les antibiotiques utilisés en première ligne dans le traitement des infections à *Achromobacter* pouvaient être atteints par cette diversité phénotypique et qu'au sein d'un même échantillon d'expectorations un mélange de souches sensibles et résistantes vis-à-vis de divers antibiotiques était observé. De manière surprenante, une étude a montré que cette hétérogénéité de profils de résistance persistait pendant et après le traitement antibiotique, sans enrichissement en variants de *P. aeruginosa* résistants ou sélection négative des variants sensibles (Workentine and Surette 2011). De plus, il a été démontré que les patients pouvaient répondre à un traitement antibiotique lors d'exacerbations aiguës, même lorsque les isolats de *P. aeruginosa* étaient résistants *in vitro* (Smith et al. 2003). Une des hypothèses pourrait être une synergie entre les antibiotiques utilisés (Foweraker et al. 2009), néanmoins, des auteurs ont également mis en évidence une hétérogénéité de profils de résistance au sein de populations infectantes face à des associations synergiques d'antibiotiques (Foweraker et al. 2009). Plusieurs auteurs suggèrent que la résistance de *P. aeruginosa* isolés des VRCF soient étudiée sans isolement préalable dans le but d'étudier la résistance globale des populations de bacilles à Gram négatif (BGN) dans la communauté (Serisier et

al. 2012; Zebouh et al. 2008). Néanmoins, cette méthode présente certaines limites, comme une perte de sensibilité de détection d'espèces minoritaires de BGN présentes dans le crachat.

Nous avons donc mis en évidence que, comme pour *P. aeruginosa*, lors de la colonisation chronique par *Achromobacter*, la population dans les VRCF est hautement diversifiée et pourrait être un des facteurs menant à des échecs de prise en charge thérapeutique de par son impact potentiel sur les résultats de l'antibiogramme.

PARTIE IV
HABITAT ET DIVERSITE DES BACTERIES DU GENRE
***ACHROMOBACTER* AU DOMICILE DE PATIENTS**
COLONISES CHRONIQUEMENT PAR *ACHROMOBACTER*
XYLOSOXIDANS

I Introduction

Concernant l'acquisition de pathogènes dans le cadre de la mucoviscidose, des transmissions croisées d'agents pathogènes sont décrites, particulièrement dans le milieu hospitalier, et de nombreuses précautions sont mises en place dans les centres afin de les éviter. Une étude a montré que, dans 50% des cas, l'air de la chambre d'un patient CF hospitalisé contenait la souche de *P. aeruginosa* présente dans ses poumons et que, dans 23% des cas, cette souche était isolée des surfaces de la douche après la toilette du patient (Ferroni et al. 2008). Concernant les risques dans les centres spécialisés (CRCM), la recherche de la contamination de l'air par les pathogènes respiratoires après consultation a montré que 8% des prélèvements d'air étaient positifs (Zuckerman et al. 2009). Une autre analyse a montré que lors de la toux d'un patient dans une pièce, *P. aeruginosa* était détectable à 4 mètres autour du patient et pouvait persister pendant 45 minutes, l'aération des salles entre deux patients est donc importante pour limiter les risques de transmission (Knibbs et al. 2014). Toutefois, nous avons vu lors de la synthèse bibliographique que les souches de *P. aeruginosa* acquises par les patients proviennent très majoritairement de réservoirs environnementaux plutôt que de transmissions croisées (Oliver and Mena 2010; Pirnay et al. 2009). Une étude a montré que le clone C de *P. aeruginosa*, qui est épidémique chez les patients CF, peut être isolé d'environnements variés comme des eaux de rivière, de piscine ou de consommation (Romling et al. 2005). Peu d'études ont porté sur les sources précises d'acquisition des pathogènes environnementaux par les patients et l'écologie de ces pathogènes reste très peu connue (Remold et al. 2011). Les quelques études ayant recherché ces pathogènes dans l'environnement se sont particulièrement focalisées sur *P. aeruginosa* (Pirnay et al. 2005; Schelstraete et al. 2008).

A l'hôpital, dans le cadre d'infections associées au soins, ce pathogène a été identifié dans des réservoirs divers incluant de l'eau de consommation, des tuyaux d'évacuation et du matériel dentaire (Loveday et al. 2014).

Certaines études ont également porté sur l'environnement domestique. Par exemple, l'analyse de 960 échantillons prélevés dans 20 maisons de volontaires sains a permis d'isoler 23 *P. aeruginosa* dans 13 maisons (Remold et al. 2011). Dans 8 de ces maisons, des souches de *P. aeruginosa* ont été isolées des siphons des lavabos ou des siphons des douches des salles de bain, et dans deux cas, la vasque de la salle de bain était également contaminée. Dans 2 maisons, la bactérie a été identifiée dans les siphons de l'évier de la cuisine. Dans une de ces maisons, le plan de travail de la cuisine, des ustensiles de vaisselle et le bol d'eau d'un animal de compagnie étaient également contaminés, suggérant une contamination à partir du siphon ou de l'eau (Remold et al. 2011). Dans cette même maison, ce pathogène a également été identifié dans de l'eau stagnante sur une chaise à l'extérieur. Lors de cette étude, les souches de *P. aeruginosa* n'ont pas été comparées par des moyens moléculaires. Concernant les zones plus sèches, *P. aeruginosa* a été isolé d'un composteur extérieur (Remold et al. 2011). Dans le cadre de la mucoviscidose, l'étude de 102 maisons de patients CF en Allemagne a identifié *P. aeruginosa* dans 71,6% d'entre elles et, comme lors de l'étude de Remold et al., les auteurs ont conclu que cette espèce était principalement localisée au niveau des zones

d'évacuation d'eau (Regnath et al. 2004). De fait, environ 40% des évacuations de douche, 35% des siphons de lavabos de salles de bain et d'éviers de cuisine et 26,5% des toilettes étaient contaminés. En revanche, les ustensiles de cuisine et de salle de bains, proches des points positifs, étaient peu fréquemment contaminés (Regnath et al. 2004). Lors de cette étude, les génotypes des souches environnementales n'ont pas été comparés. Une investigation environnementale au domicile de 50 patients effectuée juste après la découverte de la primocolonisation à *P. aeruginosa*, a détecté des bactéries de cette espèce dans 18 maisons représentant 6% des échantillons effectués (Schelstraete et al. 2008). Pour 9 maisons, le génotype de la souche environnementale était identique à celui de la souche du patient. Lors de cette enquête, 72% des échantillons positifs provenaient de la salle de bain, en particulier des siphons et les auteurs ont conclu que les procédures de nettoyage préventives devaient particulièrement cibler cette pièce (Schelstraete et al. 2008). Enfin, le recueil de 11 674 échantillons de 7 maisons de patients CF et de 8 maisons témoins lors de 3 à 8 visites par maison a également rapporté que 28% des échantillons de siphon étaient contaminés au moins une fois par *P. aeruginosa* (Purdy-Gibson et al. 2015). Finalement, l'étude de 86 maisons de volontaires sains au Japon a montré que les endroits les plus contaminés de la maison, abritant parfois *P. aeruginosa*, étaient les siphons et tuyaux d'évacuation, ainsi que les éponges et torchons, permettant la dispersion des bactéries dans la maison (Ojima et al. 2002). Toutes ces études ont donc permis d'observer que la contamination des siphons était un problème général et que son contrôle pourrait diminuer les risques d'exposition. Concernant la fréquence d'entretien de la maison, la comparaison de prévalence de *P. aeruginosa* dans les maisons CF n'a pas mis en évidence de corrélation entre l'absence de ce pathogène et une fréquence de nettoyage plus élevée (Regnath et al. 2004). Néanmoins, lors de cette étude, la nature des produits ménagers utilisés n'a pas été répertoriée.

Certains patients évitent de se baigner en piscine ou de consommer l'eau du réseau par peur de contamination. Sur ce point, une étude de l'eau de piscines privées et publiques et de l'eau de consommation, menée pendant une période de 2 ans, s'est révélée rassurante (Barben et al. 2005). Seules 6 piscines sur un total de 130 testées (5%) étaient contaminées par *P. aeruginosa*, dont 3 pataugeoires privées pour enfants. En ce qui concerne l'eau de consommation, 2 prélèvements de premier jet sur 152 (1,3%) étaient positifs et aucun prélèvements de deuxième jet ne contenait *P. aeruginosa* (Barben et al. 2005). Ce point bibliographique nous a permis de proposer aux patients du CRCM de Montpellier des mesures d'entretien des zones d'évacuation d'eau visant à limiter les risques d'exposition (Réunion bisannuelle du CRCM du CHU de Montpellier ; Réunion du collectif des parents et patients du CRCM de Montpellier).

Concernant les bactéries appartenant au CBC, 11 souches appartenant à 4 génomovars différents ont été isolées de 4 maisons de patients CF belges colonisés chroniquement par des bactéries du CBC, majoritairement de terres de plantes en pot ainsi que de l'eau d'un étang, représentant de potentiels réservoirs d'infection (Vanlaere et al. 2005). Lors de cette étude, 17 souches isolées sur milieu spécifique mais n'appartenant pas au genre *Burkholderia* appartenaient en fait au genre *Pandoraea* (3 *Pandoraea norimbergensis* et 14 *Pandoraea* spp.).

L'étude par culture de l'environnement de 6 patients nouvellement colonisés au niveau pulmonaire par divers pathogènes incluant des pathogènes émergents comme *M. abscessus*, *S. maltophilia* et *A.*

xylosoxidans a observé que la majorité des isolats environnementaux n'étaient pas génétiquement liés aux isolats des VRCF, suggérant des sources d'infection alternatives non identifiées (Heirali et al. 2016). Néanmoins, deux souches environnementales de *P. aeruginosa* et de *Sphingomonas* sp. étaient identiques à celles colonisant deux patients. Concernant les bactéries du genre *Achromobacter*, les auteurs ne les ont pas mentionnées dans la liste des bactéries environnementales et ne semblent donc pas les avoir identifiées dans l'environnement des patients (Heirali et al. 2016).

Une étude française s'est particulièrement intéressée à la prévalence environnementale des bactéries du genre *Achromobacter* (Amoureux et al. 2013b). Au total, 339 prélèvements ont été effectués incluant des prélèvements des tuyaux d'évacuation et des toilettes de plusieurs services hospitaliers et de 16 maisons de volontaires sains, ainsi que des prélèvements de sols, d'eaux, et de plantes dans l'environnement naturel. Lors de cette étude, les auteurs ont décrit un milieu sélectif spécifique du genre *Achromobacter* nommé MCXVAA, contenant du xylose (5 g/L), de l'aztréonam (20 mg/L), de la vancomycine (20 mg/L) et de l'amphotéricine B (5 mg/L). Après culture sur ce milieu, l'espèce *A. xylosoxidans* était identifiée par MALDI-TOF et séquençage du gène *bla_{OXA-114}* (Amoureux et al. 2013b). Au total, 50 *A. xylosoxidans* ont été identifiés, 33 provenant de l'hôpital, 9 de l'environnement domestique et 8 de l'environnement naturel incluant l'eau de deux rivières, d'un lac et d'un port fluvial (Amoureux et al. 2013b). L'analyse de ces souches par ECP a montré 35 pulsotypes différents, avec 19 pulsotypes différents pour les 33 souches hospitalières. Deux services différents du CHU partageaient la même souche et une souche de rivière présentait le même pulsotype qu'une souche d'un service pédiatrique. Enfin, de manière intéressante, 6 souches environnementales parfois isolées à des dizaines de kilomètres, présentaient des pulsotypes identiques à ceux de souches de patients. Par exemple, un clone isolé dans deux services a été identifié dans les aspirations trachéales de deux patients non CF, et un clone isolé du siphon de la chambre d'hospitalisation d'un patient non CF a été identifié dans la plaie de celui-ci (Amoureux et al. 2013b). Dans tous les cas sauf celui de la plaie, les patients n'ont pas été hospitalisés dans les services où l'isolat clonal a été identifié. Enfin, une souche dans le siphon d'une maison d'un volontaire sain de Dijon avait le même pulsotype qu'une souche colonisant un patient CF habitant à 37 km de Dijon (Amoureux et al. 2013b). Lors de cette étude, les profils de résistance aux antibiotiques des souches environnementales d'*Achromobacter* étaient identiques aux profils de la majorité des isolats de primocolonisation des patients du CRCM de Dijon (résistance à la ciprofloxacine et sensibilité aux pénicillines), appuyant l'hypothèse d'une acquisition environnementale de ces souches. Pour la première fois, des réservoirs environnementaux variés d'*A. xylosoxidans* ont été identifiés, particulièrement les eaux usées, et il a été montré que certains isolats environnementaux n'étaient pas différenciables d'isolats cliniques. Ces résultats suggèrent qu'*A. xylosoxidans* est adapté aux environnements humides hospitaliers, domestiques et naturels jouant un rôle potentiel de réservoirs de cette bactérie pour des patients immunodéficients ou CF (Amoureux et al. 2013b).

Lors de nos études de la colonisation chronique et des populations d'*Achromobacter* dans les VRCF, nous avons observé une forte diversité génomique et phénotypique des isolats appartenant à une même population clonale diversifiée. Ces résultats nous ont conduits à nous poser plusieurs questions

concernant la relation entre la persistance clinique et environnementale mais aussi concernant l'origine de la diversité observée dans les VRCF. En effet, la persistance environnementale pourrait être à l'origine du maintien de la colonisation dans les VRCF par un renouvellement de la contamination à partir de l'environnement et, à l'inverse, le patient pourrait contaminer en permanence son environnement et entretenir voire créer de nouveaux réservoirs. Quant à la diversité observée dans les VRCF, elle pourrait être le fruit d'un processus *in vivo* de diversification liée à l'adaptation à l'habitat pulmonaire mais elle pourrait également être liée à l'acquisition d'une population préalablement diversifiée dans l'environnement ou alors à la combinaison de ces deux phénomènes. Bien qu'une étude environnementale ait été menée sur les bactéries du genre *Achromobacter*, l'investigation aux domiciles de volontaires sains, s'est particulièrement focalisée sur les tuyaux d'évacuation et n'a étudié que les isolats appartenant à l'espèce *A. xylosoxidans* (Amoureux et al. 2013b). Aucune étude n'a porté sur la diversité d'espèces présente dans l'environnement, ni sur l'écologie des bactéries dans l'environnement de patients colonisés chroniquement au niveau pulmonaire.

L'objectif de notre étude était donc d'appréhender la diversité mais aussi l'écologie des bactéries du genre *Achromobacter* au domicile de patients colonisés chroniquement et de caractériser de possibles réservoirs environnementaux. Pour cela, nous avons effectué 275 prélèvements aux domiciles de 3 patients CF colonisés chroniquement par *A. xylosoxidans*.

II Matériels et Méthodes

II.1 Choix des patients, consentements, Interface Recherche Bioéthique

Les trois patients inclus pour cette investigation environnementale étaient colonisés chroniquement par *A. xylosoxidans* et avaient été inclus dans nos précédentes études de la colonisation chronique et de la diversité de population au sein d'un échantillon (patients 2, 5 et 12). Les patients ont donné leur accord pour participer à cette étude. Les patients étant tous mineurs, un consentement éclairé a été signé par le tuteur légal. Enfin, cette étude « Étude de la diversité microbienne dans l'environnement de patients atteints de mucoviscidose et colonisés chroniquement par *Achromobacter* spp.» a obtenu l'aval de l'Interface Recherche Bioéthique (IRB) du CHU de Nîmes sous le numéro IRB 15/07.05.

II.2 Mise au point d'une PCR "spécifique" du genre *Achromobacter*

Choix des amorces :

Un total de 510 séquences d'ADNr 16S de protéobactéries disponibles dans la base de données RDP-II (<https://rdp.cme.msu.edu/>), incluant celles de 8 espèces d'*Achromobacter*, ont été alignées à l'aide du logiciel ClustalW implémenté dans BioEdit®. Trois zones d'environ 20-30 paires de bases, conservées parmi les séquences des bactéries du genre *Achromobacter* et distinctes de celles des

bactéries des autres genres, ont été visuellement identifiées. Les deux zones les plus éloignées l'une de l'autre et permettant une amplification de 172 paires de bases ont été sélectionnées afin de concevoir les amorces directe (F) et inverse (R) (Tableau 2).

Tableau 2 : Description des amorces définies pour la PCR « spécifique » du genre *Achromobacter*

Nom de l'amorce	Séquence (5' – 3')	Taille	T° de fusion	GC%
Ax-638-F	TGCGCAGGCGGTTGCGAAAGAAA	23 pb	72 °C	56,5
Ax-810-R	GCCTCCTGGGATAAACTGA	20 pb	62 °C	55

La comparaison par BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) de ces deux amorces contre la base RDPII a montré qu'elles devraient s'hybrider sur :

- 2520 / 3196 séquences déposées pour des bactéries du genre *Achromobacter*
- 469 / 740 séquences déposées pour des bactéries du genre *Bordetella*
- 99 / 2023 séquences déposées pour des bactéries non classées de la famille *Alcaligenaceae*
- 8 / 128 séquences déposées pour des bactéries du genre *Pigmentiphaga*

Des tests d'amplification ont alors été effectués au laboratoire en utilisant 20 souches bactériennes appartenant à 11 genres différents capables de coloniser les VRCF : 9 souches d'*Achromobacter* sp. et une souche des genres *Bordetella* sp., *Aeromonas* sp., *Roseomonas* sp., *Pseudomonas* sp., *Pandora* sp., *Ochrobactrum* sp., *Cupriavidus* sp., *Burkholderia* sp., *Stenotrophomonas maltophilia* et *Staphylococcus* sp.

La sensibilité de la PCR spécifique a ensuite été déterminée sur une souche d'*A. xylosoxidans*. Des suspensions de différentes concentrations (1 UFC/ml à 10⁶ UFC/ml) ont été extraites par la technique du choc thermique qui consiste à plonger dans de l'eau portée à ébullition 50 µl d'une suspension bactérienne ajustée à une densité optique d'environ 0,5 McFarland pendant 15 min puis de la congeler à -20 °C.

Amplification :

Le mélange d'amplification de 49 µl contenait 0,2 mM de dXTP, 2,5 mM de MgCl₂, 10 µL de Tampon (5X go TAQ flex), 20 pM de chacune des amorces, 26,5 µL d'eau pour préparation injectable (EPPI), 0,5 unité de *Taq* DNA polymérase (Go *Taq*, Proméga). A ce mélange était ajouté 1µl de l'extrait d'ADN. L'amplification était initiée par une étape de dénaturation de 3 min à 95 °C, suivie de 30 cycles d'amplification de 1 min à 94 °C, 45 secondes à 65 °C et 30 secondes à 72 °C, et d'une élongation finale de 10 min à 72 °C.

La migration des amplicons était effectuée par électrophorèse à 100 Volts pendant 20 min en gel d'agarose à 1,5% contenant du bromure d'éthidium (BET) et la révélation était effectuée sur un transilluminateur UV.

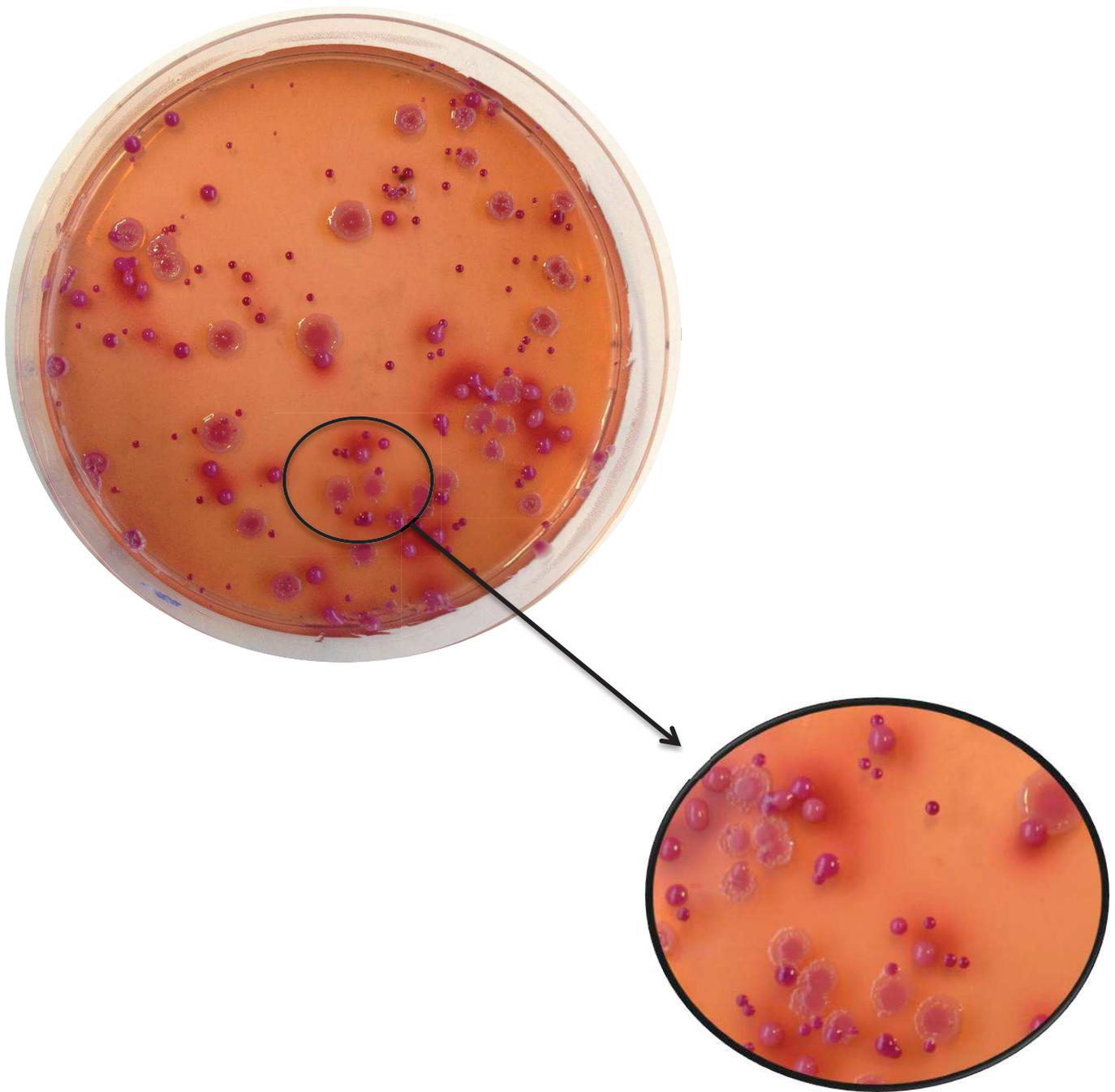


Figure 15 Aspect morphologique des colonies obtenues après mise en culture d'un échantillon environnemental sur milieu sélectif spécifique du genre *Achromobacter* après 72h d'incubation à 30°C.

Chaque morphotype colonial rose était prélevé pour être ensuite identifié par MALDI-TOF puis pour chaque colonie appartenant au genre *Achromobacter*, nous avons séquencé le gène *nrdA*.

II. 3 Echantillonnage et recueil des souches

Un total de 273 échantillons a été prélevé dans 3 maisons de patients CF (de 74 à 119 prélèvements par maison) (Annexe 2). Ces trois patients étaient colonisés chroniquement par *A. xylosoxidans* et avaient été inclus dans nos précédentes études de la colonisation chronique et de la diversité de population au sein d'un échantillon (patients 2, 5 et 12). Tous les échantillons ont été mis en culture dans les 4 heures suivant l'échantillonnage.

Prélèvements de surface :

Les surfaces humides ont été prélevées à l'aide d'écouvillons secs (Copan[®]) tandis que les surfaces sèches ont été prélevées avec des éponges (Puritan[®]). Tous les écouvillons ont ensuite été déchargés dans 2 ml de bouillon trypticase soja (TS) (Becton Dickinson, BD[®]). 100 µl du bouillon étaient ensuite étalés sur une gélose TS et 500 µl étaient étalés sur une gélose sélective des bactéries du genre *Achromobacter* constituée de gélose McConkey (MCK, BD[®]) additionnée de 5 g/L de xylose, 10 mg/l d'aztréonam, 5 mg/l d'amphotéricine B et 5 mg/l de vancomycine (BioRad[®]) adaptée de la publication de Amoureux et al. (2013) avec des concentrations moindres en antibiotiques et en antifongiques (Amoureux et al. 2013b). Les gélosesensemencées étaient ensuite incubées 72 h à 30 °C.

Prélèvements d'eau :

Les prélèvements de 250 ml d'eau ont été recueillis dans des flacons additionnés de 20% de thiosulfate (GOSELIN[®]). Le volume était ensuite filtré sur des membranes de 0,22 µm (Sartorius[®]) puis la membrane était reprise dans 5 ml d'eau du robinet stérilisée par filtration. Le décrochage des bactéries était réalisé par grattage à l'aide d'une öse de 10 µl et vortexage durant 2 min. Enfin, 100 µl des 5 ml de suspension bactérienne étaient platés sur une gélose TS et 500 µl étaient platés sur une gélose sélective. Les gélosesensemencées étaient alors incubées 72 h à 30 °C.

Prélèvements des autres liquides :

50 et 100 µl des liquides prélevés (eau de siphons, évacuation de lave vaisselle, échantillonnage de savon, ...) étaient directement platés sur gélose TS et 300 µl étaient platés sur gélose sélective ; les géloses étaient incubées 72 h à 30 °C.

Traitement des cultures obtenues :

Les communautés cultivables obtenues sur les géloses TS étaient récoltées à l'aide d'un râteau et homogénéisées après mise en suspension dans 1 ml de sérum physiologique. 100 µl du mélange obtenu étaient congelés à -80 °C dans du bouillon de congélation contenant du bouillon TS additionné de 15% de glycérol, 500 µl étaient congelés directement à -80 °C et 5 µl étaient homogénéisés dans 100 µl d'eau osmosée dans le but d'extraire l'ADN de la communauté cultivable par la technique du choc thermique. La PCR spécifique développée pour cette étude était ensuite effectuée sur ces extraits. Les communautés obtenues sur les géloses spécifiques étaient conservées au réfrigérateur le temps d'obtenir les résultats de la PCR spécifique à partir de la gélose TS. En cas d'amplification, les géloses sélectives correspondantes étaient analysées visuellement et les morphotypes coloniaux évoquant *Achromobacter* (colonies roses sur milieu spécifique) étaient ré-isolées (Figure 15).

Tableau 3 Description et résultats obtenus des différents prélèvements effectués au domicile de trois patients CF colonisés chroniquement à *A. xylosoxidans* et dans lesquels une bactérie du genre *Achromobacter* a été identifiée. Le numéro de l'échantillon est composé du numéro du patient suivi par le numéro du prélèvement.

"-" représente les prélèvements pour lesquels aucune autre espèce n'a été identifiée.

O.= *Ochrobactrum* ; P.= *Pseudomonas* ; A.= *Agrobacterium* ; S.= *Stenotrophomonas*; gen.= genogroupe; ST= sequence

Numéro échantillon	Pièce	Origine de l'échantillon	<i>Achromobacter</i> sp. / gène <i>nrDA</i> (ST)	Bactéries associées / MALDI-TOF
P5-11	Cuisine	Eau siphon	<i>A. marplatensis</i>	<i>Ochrobactrum</i> sp.
P5-56	Salle de bain 1	Evacuation lave-linge	<i>A. mucicolens</i>	<i>Bordetella</i> sp., <i>S. maltophilia</i> , <i>Ochrobactrum</i> sp.
P5-58		Tapis de bain	<i>A. spanius</i>	-
P5-50	Salle de bain 2	Eau robinet 1 ^{er} jet	<i>A. xylosoxidans</i> (ST175)	<i>A. radiobacter</i>
P5-64	Autre	Eau sèche-linge hublot	<i>A. xylosoxidans</i> (ST175)	-
P5-71		Eau seau serpillère	<i>A. xylosoxidans</i> (ST175) <i>A. marplatensis</i>	<i>O. anthropi</i> , <i>O. grignonense</i> , <i>Ochrobactrum</i> sp.
P5-72		Ecouvillon serpillère	<i>A. xylosoxidans</i> (ST175)	<i>Ochrobactrum</i> sp.
P5-74		Jardin	Terre potager	<i>A. mucicolens</i> <i>A. mucicolens</i>
P12-26	Cuisine	Evacuation lave-linge	<i>A. aegrifaciens</i>	<i>Bordetella</i> sp., <i>O. anthropi</i> , <i>A. radiobacter</i>
P12-49	Salle de bain	Siphon douche	<i>A. mucicolens</i>	<i>P. nitroreducens</i> , <i>Pseudomonas</i> sp., <i>Ochrobactrum</i> sp.
P12-61		Verre à dent	<i>A. mucicolens</i>	<i>A. radiobacter</i>
			<i>A. mucicolens</i>	
P2-20	Salle de bain	Eau siphon lavabo droit	<i>Achromobacter</i> sp. <i>Achromobacter</i> sp.	<i>A. radiobacter</i> , <i>P. nitroreducens</i>
P2-97	Jardin	Ecouvillon tuyau d'arrosage	<i>A. animicus</i>	<i>Bordetella</i> sp., <i>Pseudomonas</i> sp.
P2-101		Plante (+ racines)	<i>A. spanius</i>	-
			<i>Achromobacter</i> gen. 9	-
P2-106		Terre bac à fleur 3	<i>A. mucicolens</i>	<i>A. radiobacter</i>

Identification des isolats :

Une colonie de chaque morphotype était ensuite analysée par spectrométrie de masse MALDI-TOF utilisant le spectromètre Microflex LT et la base de données MALDI Biotyper (Bruker, USA). Pour chaque isolat appartenant au genre *Achromobacter*, le gène *nrdA* était ensuite amplifié et séquencé pour identifier l'espèce d'*Achromobacter* (Spilker et al. 2013).

III Résultats

III.1 Résultats de mise au point de la PCR spécifique

Concernant les différents essais sur les 11 genres bactériens testés en PCR, seules les bactéries des genres *Achromobacter* et *Bordetella* ont donné des signaux positifs.

Concernant l'étude de la sensibilité de cette méthode, la suspension la plus faiblement concentrée donnant un signal de PCR spécifique positif était celle contenant 10^6 UFC/ml d'*A. xylosoxidans*, soit une sensibilité de la PCR estimée à 10^3 bactéries par tube de PCR.

III.2 Echantillons positifs

Un signal de PCR spécifique positif a été obtenu pour 89 communautés parmi les 273 analysées (33%) et des bactéries du genre *Achromobacter* ont été isolées dans seulement 15 de ces 89 communautés (17%).

Au total, 316 colonies ont été analysées par MALDI-TOF et 22 ont été identifiées comme appartenant au genre *Achromobacter* (14 avec score <2 et 8 avec score ≥ 2). Au final, 21 colonies appartenait au genre *Achromobacter* et une colonie au genre *Bordetella* sp. après séquençage du gène *nrdA*. Ces 21 colonies ont été identifiées à partir des cultures de 15 échantillons, représentant 5,5% des échantillons totaux. Les bactéries de ce genre ont été identifiées au sein des 3 maisons avec de 3 à 8 échantillons positifs par habitation. Parmi les 15 échantillons ayant donné une culture d'*Achromobacter*, 12 provenaient de zones environnementales humides : salle de bain (n=6), jardin (n=4) et cuisine (n=2), et 3 provenaient de terres ou de plantes avec racines (Tableau 3). La majorité de ces prélèvements (82%) provenait donc de zones humides, incluant tapis de bain, verre à dent, conduits d'évacuation, siphons et toilettes. Dans 2 maisons, des bactéries du genre *Achromobacter* ont été mises en évidence dans l'évacuation du lave-linge et pour chacune des 3 maisons, au moins un siphon contenait une bactérie du genre, que ce soit celui du lavabo ou de la douche de la salle de bain, ou de l'évier de la cuisine.

Dans 52 échantillons des bactéries appartenant à d'autres genres qu'*Achromobacter* ont été identifiées et pour 11 échantillons sur 15 contenant des bactéries du genre *Achromobacter* au moins un autre genre a été identifié.

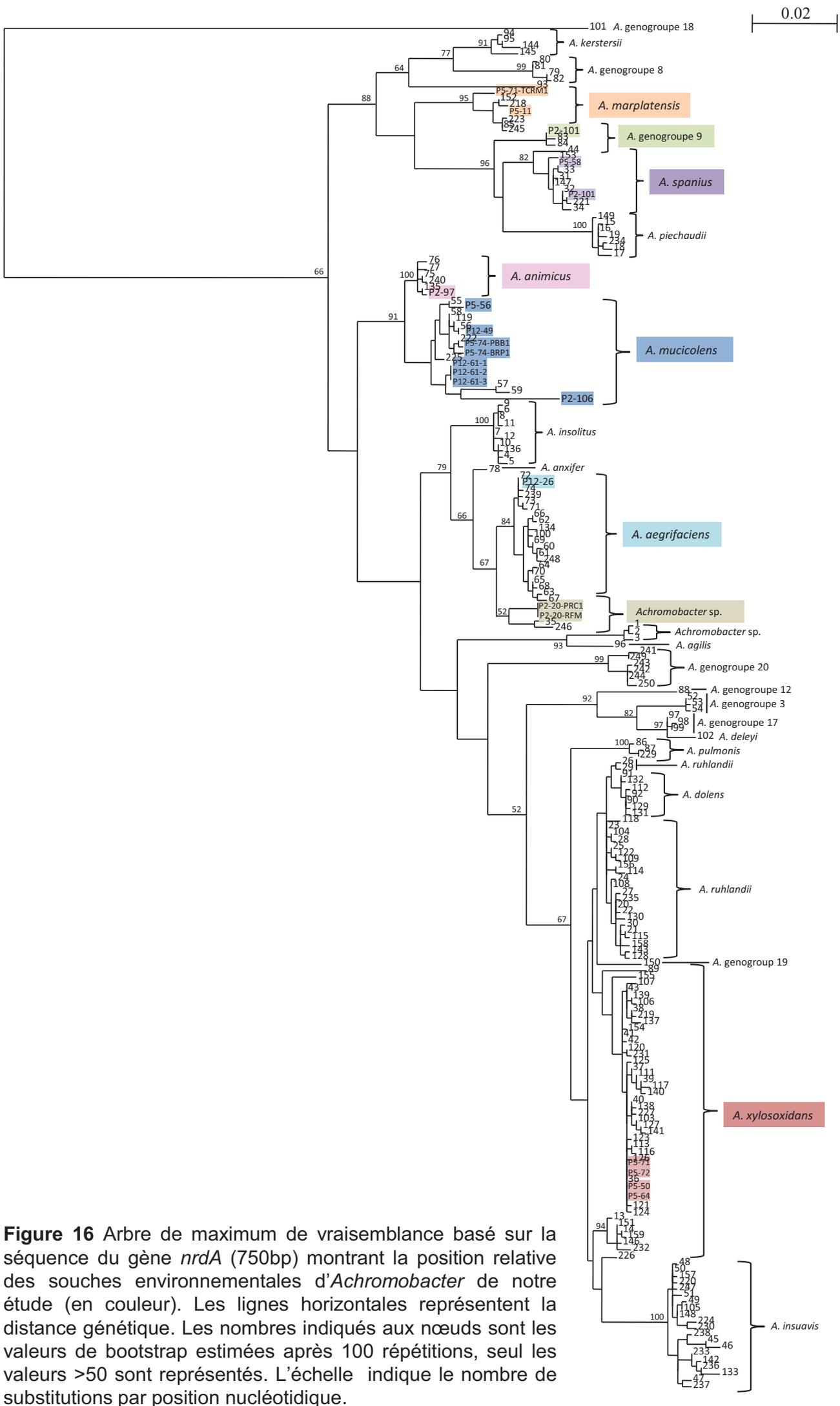


Figure 16 Arbre de maximum de vraisemblance basé sur la séquence du gène *nrdA* (750bp) montrant la position relative des souches environnementales d'*Achromobacter* de notre étude (en couleur). Les lignes horizontales représentent la distance génétique. Les nombres indiqués aux nœuds sont les valeurs de bootstrap estimées après 100 répétitions, seul les valeurs >50 sont représentés. L'échelle indique le nombre de substitutions par position nucléotidique.

III. 3 Diversité d'espèces d'*Achromobacter*

Parmi les 21 souches appartenant au genre *Achromobacter*, nous avons identifié l'espèce en cause ou la plus proche après analyse d'une séquence partielle (765 bp) du gène *nrdA* (Spilker et al. 2013). Nous avons identifié 8 *A. mucicolens* dans 5 échantillons, 4 *A. xylosoxidans* dans 4 échantillons, 2 *A. spanius* dans 2 échantillons, 2 *A. marplatensis* dans 2 échantillons, 1 *A. aegrifaciens*, 1 *A. animicus*, 1 souche appartenant au génogroupe 9 et 2 souches appartenant à une espèce inconnue d'*Achromobacter* phylogénétiquement proche d'*A. aegrifaciens* dans un échantillon (Figure 14). Deux échantillons contenaient 2 espèces différentes d'*Achromobacter* (Tableau 3). Nous avons identifié 4 souches d'*A. xylosoxidans* dans 4 échantillons d'une maison : le seau de ménage, la serpillière, l'eau contenue dans le hublot du sèche-linge et dans le premier jet du robinet du lavabo d'une salle de bain (Tableau 3). *A. mucicolens*, majoritairement identifié dans cette étude et seule espèce présente dans les 3 maisons étudiées, a été isolé dans des échantillons prélevés dans les salles de bain et dans la terre.

III. 4 Diversité au sein des espèces d'*Achromobacter*

Lors de cette étude, nous avons observé deux échantillons contenant *A. spanius* prélevés dans deux maisons distinctes. Ces isolats présentant des gènes *nrdA* différant par 2 nucléotides appartenaient à des génotypes différents (Figure 16). Il en est de même pour les deux isolats de *A. marplatensis* (différant par 9 nucléotides) isolés à partir de l'eau d'un siphon et l'eau d'une serpillière dans une même maison. En revanche, les deux morphotypes d'*Achromobacter* sp. de l'eau du siphon de la maison du patient 2 avaient des séquences *ndrA* identiques. Il en était de même pour les 4 isolats appartenant à l'espèce *A. xylosoxidans* isolés de 4 échantillons différents de la maison du patient 5. Enfin, nous avons identifié 2 échantillons présentant plusieurs morphotypes différents de l'espèce *A. mucicolens* ; dans un cas (P12-61), les trois morphotypes avaient la même séquence *nrdA*, et dans l'autre cas (P5-74), les deux morphotypes avaient 4 nucléotides de différence dans la séquence *nrdA* et n'appartenaient donc pas au même ST (Figure 16).

III. 5 Comparaison des isolats d'*A. xylosoxidans* environnementaux et cliniques

A. xylosoxidans a été identifié dans 4 prélèvements au sein d'une maison et n'a pas été isolé des deux autres domiciles. Après séquençage des 7 gènes du schéma MLST, ces 4 souches appartenaient au ST175. Ce ST ne correspondait pas au ST colonisant chroniquement les VRCF du patient 5 qui est colonisé par le ST27.

III. 6 Autres espèces isolées sur milieu sélectif

Nous avons également identifié 8 échantillons contenant des bactéries du genre *Bordetella*, 3 contenant *S. maltophilia*, 27 contenant des bactéries du genre *Agrobacterium*, 21 contenant des

bactéries du genre *Ochrobactrum* et 18 contenant des bactéries du genre *Pseudomonas* (Annexe 2). Parfois ces espèces étaient en mélange dans l'échantillon. Aucune souche de *P. aeruginosa* n'a été identifiée sur les milieux spécifiques alors qu'il a été décrit que les bactéries de ce genre avaient la capacité de croître sur ce milieu (Amoureux 2013b). Les trois patients étaient colonisés de manière sporadique par *P. aeruginosa* ; au moment de cette investigation les patients 2, 5 et 12 n'avaient pas présenté de *P. aeruginosa* dans leurs expectorations depuis 5 mois, 4 ans et 3 ans et 8 mois respectivement.

IV Discussion

Lors de notre étude, nous avons mis en évidence 15 échantillons contenant des bactéries du genre *Achromobacter*, prélevés dans les 3 maisons de patients. Ce nombre est assez faible comparé au nombre d'échantillons pour lesquels la PCR spécifique d'*Achromobacter* était positive. Les forts taux de bactéries appartenant à d'autres espèces et particulièrement aux genres *Ochrobactrum* sp. et *Agrobacterium* sp. cultivés sur le milieu spécifique possiblement associés à un faible inoculum d'*Achromobacter* ont certainement diminué la sensibilité de la culture sur ce milieu. L'ajout d'un constituant empêchant la croissance de ces bactéries pourrait augmenter la sensibilité de la méthode mais ces bactéries sont particulièrement résistantes aux biocides.

Lors de cette étude, nous avons mis en évidence une diversité environnementale des espèces d'*Achromobacter* avec 8 espèces différentes identifiées dans 15 échantillons (6 décrites et 2 non décrites dont une appartenant à un génogroupe connu). D'autre part, nous avons observé la coexistence de deux espèces différentes d'*Achromobacter* dans 2 échantillons. Concernant les espèces connues, *A. mucicolens* et *A. animicus* n'avaient jamais été décrites dans l'environnement, tout comme les bactéries appartenant au génogroupe 9. Nous ne pouvons pas comparer la diversité d'espèces que nous avons observé aux résultats de l'investigation environnementale dans la région de Dijon publiée en 2013, cette étude ayant étudié spécifiquement *A. xylosoxidans* (Amoureux et al., 2013).

Deux prélèvements contenaient plusieurs morphotypes d'*A. mucicolens*, et deux morphotypes avaient une séquence du gène *nrdA* différente, nous avons donc mis en évidence une diversité génotypique et phénotypique intra-spécifique dans l'environnement naturel. A part *A. xylosoxidans*, lors de notre étude sur la colonisation chronique, aucune des espèces identifiées dans leur domicile n'a été retrouvée dans les VRCF des patients, néanmoins, lors de notre étude épidémiologiques en 2014, deux patients étaient colonisés sporadiquement par *A. aegrifaciens* et *A. mucicolens* respectivement. Le suivi de ces deux patients a montré que la colonisation pulmonaire avait été éradiquée. Une étude épidémiologique de 47 patients sur des périodes allant jusqu'à plus de 10 ans a observé plusieurs cas de colonisation sporadique à *A. aegrifaciens*, *A. animicus* et *A. mucicolens*, trois espèces qui ont été identifiés lors de notre étude environnementale (Amoureux et al. 2016a).

L'espèce *A. xylosoxidans*, colonisant chroniquement les 3 patients de l'étude, a été identifiée dans une seule maison. Le génotypage par MLST des isolats a montré qu'ils appartenaient tous à un

génotype (ST175) différent de celui du patient (ST27). Au vu des sites colonisés par ce ST, le réseau d'eau de cette maison pourrait être sporadiquement colonisé par cette bactérie. Le ST175 a été décrit dans PubMLST pour des souches isolées des voies respiratoires de deux patients CF et d'un patient non CF entre 2011 et 2014, dans l'environnement et dans les VRCF de patients d'une étude publiée (Amoureux et al. 2016a), ainsi que pour une souche d'un patient CF du CRCM de Montpellier lors de notre étude épidémiologique en 2014. Cette conservation de génotype entre souches épidémiologiquement non reliées a aussi été décrite par Amoureux et al. (2013b). La comparaison des souches ST175 clinique et environnementales serait certainement informative. Il est également intéressant de noter que seuls 7 STs d'*A. xylosoxidans* déposés dans PubMLST le sont pour des souches d'origine environnementale et parmi ceux-ci, 6 appartiennent au complexe clonal majoritaire qui regroupe le plus grand nombre de STs. Ces résultats confirment que certains génotypes d'*Achromobacter* capables de coloniser les poumons de patients CF sont présents dans l'environnement.

De nombreuses espèces bactériennes du microbiote respiratoire CF (incluant *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. maltophilia* et les genres *Prevotella*, *Streptococcus* et *Veillonella*) sont présents dans l'environnement domestique de patients CF mais sont généralement distincts des isolats CF (Heirali et al. 2016). Les auteurs ont conclu que les microorganismes infectant les VRCF présentaient des adaptations spécifiques à la niche pulmonaire permettant la colonisation et la persistance et que toutes les souches d'agents présumés pathogènes n'avaient pas la capacité de coloniser les VRCF. Il a également été montré qu'un génotype de *S. maltophilia* persistant dans de nombreux points d'eau ainsi que dans les siphons de différentes pièces d'un centre CF, n'était relié à aucun isolat clinique en ECP (Marzuillo et al. 2009). Il est donc probable que seules des souches de certains génotypes au sein d'une espèce ont la capacité de coloniser les patients. Lors d'une enquête par MLST, plusieurs génotypes de *P. aeruginosa* identifiés dans les VRCF ont également été identifiés dans les milieux naturels mais les génotypes majoritairement identifiés au cours de la mucoviscidose l'étaient uniquement chez les patients (Kidd et al. 2012). Les caractéristiques distinguant les souches capables de coloniser les VRCF au sein de l'ensemble des souches présentes dans les milieux naturels restent toutefois à découvrir (Kidd et al. 2012).

Lors de notre étude, en aucun cas la bactérie responsable de la colonisation chronique du patient n'a été identifiée au domicile de celui-ci, nous n'avons donc pas mis en évidence de réservoir de contamination. Le patient colonisé ne contamine pas son environnement par le biais d'aérosols et de contacts, et il n'y a pas de réservoirs persistants entretenant la colonisation. Notre interprétation face à ce résultat est que les bactéries adaptées depuis des années à l'habitat pulmonaire ont certainement perdu la capacité de survivre dans l'environnement. Allant dans le même sens, une investigation environnementale aux domiciles de patients colonisés par des bactéries du CBC a observé des bactéries de ce complexe dans l'environnement proche des patients mais en aucun cas le génotype colonisant les VRCF du patient (Vanlaere et al. 2005). Les auteurs ont conclu, comme lors de notre étude, que les patients ne colonisent pas leur environnement. De même, l'analyse de 57 brosses à dents d'enfants CF, de leurs frères et sœurs non CF et de volontaires sains n'a pas montré de différence de contamination par *P. aeruginosa* et aucune relation statistique n'a été établie entre la

colonisation pulmonaire à *P. aeruginosa* et la contamination des brosses à dents (Genevois et al. 2015). Bien qu'en moyenne 10% des brosses de l'étude étaient contaminées, la relation n'a été établie qu'entre 2 patients CF et leurs brosses à dents et entre un patient CF et la brosse à dents de son frère. Les souches adaptées aux poumons pourraient avoir perdu la capacité de survivre dans les environnements pauvres tels que les surface inertes.

Des études suggèrent que les souches spécialistes des VRCF ne se transmettent pas entre patients car la transmission de souches de *P. aeruginosa* adaptées, comme des souches hyper-mucoïdes, n'a pour le moment jamais été rapportée (Feliziani et al. 2010; Furukawa et al. 2006; Qin 2016). De plus, des études ont montré que les souches adaptées isolées au cours de stades tardifs de la colonisation, comme les souches hypermutables, perdaient la capacité de coloniser un nouvel hôte dans le modèle murin (Head and Yu 2004; Mena et al. 2007). Concernant les souches hypermutables, il a été évoqué que cette patho-adaptation était associée à la perte de la capacité à survivre dans des habitats environnementaux typiques comme l'eau de consommation (Hogardt et al. 2007).

Comme lors de l'étude de Vanlaere *et al.* (2005) sur les bactéries du genre *Burkholderia*, nos résultats suggèrent que les bactéries du genre *Achromobacter* sont présentes dans l'environnement domestique et que certaines zones pourraient servir de potentielles sources de contamination (Vanlaere et al. 2005). Lors de notre étude, les siphons et tuyaux d'évacuation étaient particulièrement contaminés, incluant notamment des bactéries des genres *Stenotrophomonas* sp., *Bordetella* sp., *Pseudomonas* sp., *Ochrobactrum* sp. et *Agrobacterium* sp., tous également décrits dans les VRCF. Les genres *Ochrobactrum* et *Agrobacterium* étaient majoritaires lors de notre étude, isolés de nombreux échantillons, et c'est la première fois que des bactéries appartenant à ces genres, qui sont également isolées dans les VRCF, sont décrites dans l'environnement domestique de patients (Marchandin et al. 2012; Menuet et al. 2008). Ces bactéries semblent largement répandues dans l'environnement proche des patients et il serait également intéressant de connaître leur écologie. Lors de notre étude, l'analyse des dossiers de patient a montré qu'en aucun cas *Ochrobactrum* ou *Agrobacterium* n'ont été identifiés dans les VRCF des patients pour lesquels l'environnement était contaminé. Néanmoins, nous avons observé qu'un patient au domicile duquel *S. maltophilia* a été identifié dans des siphons avait présenté une colonisation sporadique par cette espèce en 2009 et qu'un patient au domicile duquel *Pseudomonas putida* a été isolé avait été colonisé sporadiquement par une souche de cette espèce en 2012. Il serait intéressant de comparer ces souches cliniques et environnementales.

Finalement, de nombreuses études ont conclu que l'habitat principal et presque exclusif de *P. aeruginosa* dans l'environnement domestique était les siphons et les tuyaux d'évacuation d'eau (Heirali et al. 2016; Purdy-Gibson et al. 2015; Regnath et al. 2004; Remold et al. 2011; Schelstraete et al. 2008). Concernant la primocolonisation par *P. aeruginosa*, environ 20% des patients ne répondent pas aux traitements d'éradication, et ceci pourrait être dû à une réinfection par l'exposition à une niche environnementale persistante (Heirali et al. 2016). Dans ce cadre, le succès de l'éradication par les antibiotiques pourrait être augmenté en associant un traitement environnemental ciblé pour réduire la charge de *P. aeruginosa* dans l'environnement domestique (Heirali et al. 2016). En effet, les siphons contaminés pourraient potentiellement servir de réservoirs et l'augmentation des efforts pour limiter

leur contamination par *P. aeruginosa* réduirait considérablement l'exposition des patients, tout en étant une charge supplémentaire minime pour leurs familles (Purdy-Gibson et al. 2015). Les résultats de notre étude suggèrent que des mesures similaires pourraient également limiter la colonisation par d'autres pathogènes opportunistes et nous suggérons que changer les siphons une fois par an comme recommandé dans tous les lieux publics et l'hôpital pourrait diminuer le risque de contamination bactérienne tout en restant une charge raisonnable pour les familles. C'est ce que nous avons communiqué aux familles lors de réunions d'information (Réunion bisannuelle du CRCM du CHU de Montpellier ; Réunion du collectif des parents et patients du CRCM de Montpellier). Des auteurs ajoutent que le nettoyage / remplacement fréquent des pommeaux de douches et des robinets pourraient réellement réduire le risque de contamination à partir de l'environnement (Heirali et al. 2016). Finalement, il est certainement nécessaire d'adopter une approche globale en examinant les aspects médicaux mais aussi environnementaux de la contamination afin de mieux comprendre l'augmentation mondiale de la prévalence des infections à *Achromobacter* et la possible relation entre l'émergence des bactéries de ce genre et l'activité anthropique, particulièrement dans ces aspects technologiques (Amoureux et al. 2013b).

Bien que nous n'ayons pas identifié la bactérie responsable de la colonisation des patients dans leur environnement, nous savons que les bactéries de ce genre sont capables de persister, particulièrement en milieu hospitalier et nous avons étudié les caractéristiques de la persistance environnementale de bactéries du genre *Achromobacter* pendant une période de 2 ans dans le réseau d'eau d'un centre de soins dentaires.

PARTIE V
PERSISTANCE ENVIRONNEMENTALE DE BACTERIES DU
GENRE *ACHROMOBACTER* :

DYNAMIQUE DES POPULATIONS ET SUCCES CLONAL

I Introduction

Les systèmes de distribution d'eau représentent une niche technologique particulière dans laquelle ont été décrits des pathogènes émergents ou "Opportunistic Premise Plumbing Pathogens" (OPPPs) comme *L. pneumophila*, les mycobactéries non tuberculeuses et *P. aeruginosa* (Falkinham 2015). En termes de gestion des risques infectieux liés à l'eau, ces OPPPs sont les pathogènes préoccupants en milieu hospitalier. Le réseau hydrique hospitalier, ainsi que le matériel médical en contact avec l'eau de ce réseau, sont des habitats favorables au développement de certaines bactéries, particulièrement sous forme de biofilm (Robertson et al. 2015; Vincenti et al. 2014). Nous avons, par exemple, décrit la contamination de l'eau des systèmes de circulation extracorporelle utilisés en chirurgie cardiaque par une mycobactérie non tuberculeuse émergente, *Mycobacterium chelonae* (Dupont et al. 2016).

Concernant les bactéries du genre *Achromobacter*, elles sont considérées comme émergentes dans la mucoviscidose mais sont également de plus en plus décrites chez les patients immunodéprimés, particulièrement les patients atteints de cancers (Claassen et al. 2011; Gómez-Cerezo et al. 2003; Roy 2014). En milieu hospitalier, des bactéries de ce genre ont été retrouvées sur du matériel médical normalement stérile comme un capteur de pression intravasculaire, une solution de contraste, du gel pour échographie, du matériel chirurgical destiné à la réalisation de biopsies, des pompes à morphine, et ces contaminations ont été responsables de plusieurs épidémies d'infections associées aux soins (Gahrn 1988 ; Reina 1988 ; Olshtain 2010 ; Haviar 2016 ; Behrens 2012). Les bactéries du genre *Achromobacter* sont particulièrement résistantes aux biocides, notamment aux produits contenant des ammoniums quaternaires qui sont particulièrement utilisés en milieu hospitalier (Kumar 2006 ; Haviari 2016). D'ailleurs, des bactéries de ce genre ont été isolées de solutions de chlorhexidine. Des vaporisateurs et flacons de solution désinfectante ont également été la source d'épidémies parfois graves (Molina caberilla 2007 ; Hugon 2015 ; Siebor 2007 ; Tena 2005 ; Turel 2013). Dans un cas, l'eau du réseau du service était contaminée et a été utilisée pour la dilution du désinfectant dans un vaporisateur, lui même utilisé ensuite dans la chambre des patients (Hugon 2015). Dans 2 cas, les désinfectants contaminés, utilisés pour décontaminer des flacons d'hémoculture et des cathéters d'hémodialyse, ont été à l'origine de bactériémies (Tena 2005 ; Siebor 2007). Concernant les bactériémies, certaines épidémies ont été récemment décrites en unité néonatale de soins intensifs et en service d'oncologie-hématologie pédiatrique (Hugon et al. 2015; Turel et al. 2013) et une capacité de survie accrue dans les solutions désinfectantes a été décrite pour une des souches responsable d'épidémie (Hugon et al. 2015). Ces bactéries présentent donc un potentiel non négligeable d'adaptation à ces niches technologiques hospitalières.

Lors d'une investigation hospitalière, les eaux usées et particulièrement l'eau des siphons de neuf services échantillonnés sur 10 contenaient *A. xylosoxidans* (Amoureux et al. 2013b). Dans un cas, la contamination du réseau de distribution d'eau a été suspectée car 6 isolats appartenant au même génotype en ECP ont été identifiés dans les siphons des départements d'hématologie et de pédiatrie, deux services situés dans des bâtiments adjacents alimentés en eau par la même canalisation. La

bactérie n'a pas été isolée dans l'eau du réseau mais il est possible que la contamination de ces services par le réseau ait eu lieu des mois voire des années auparavant (Amoureux et al. 2013b). Ces bactéries ont été isolées de siphons de lavabos et de douches, qui sont des lieux souvent en contact avec des produits d'entretien. Ces produits contiennent fréquemment des ammoniums quaternaires et la résistance des bactéries du genre *Achromobacter* à ces composés peut expliquer leur persistance (Amoureux et al. 2013b). Une investigation a montré que 4 fauteuils dentaires étaient contaminés par un clone unique d'*A. xylosoxidans* suggérant que l'eau des fauteuils dentaires représenterait une source de contamination pour les patients externes recevant des soins dentaires (Amoureux et al. 2013b).

Dans un cas, la contamination du réseau de distribution d'eau a été suspectée car 6 isolats appartenant au même génotype en ECP ont été identifiés dans les siphons des départements d'hématologie et de pédiatrie, deux services situés dans des bâtiments adjacents alimentés en eau par la même canalisation. La bactérie n'a pas été isolée dans l'eau du réseau mais il est possible que la contamination de ces services par le réseau ait eu lieu des mois voire des années auparavant.

II Etude de la persistance environnementale d'*Achromobacter* spp. et *P. aeruginosa* dans une niche technologique hospitalière

L'objectif principal de notre étude était d'analyser la dynamique de colonisation du réseau ainsi que les caractéristiques génomiques et phénotypiques des clones dominants de *P. aeruginosa* et d'*Achromobacter* spp. ayant contaminé le réseau d'eau du centre de soins dentaires (CSD) du CHU de Montpellier durant plus de 2 ans.

Pour cela, 17 souches d'*Achromobacter* spp. et 68 souches de *P. aeruginosa* isolées du réseau d'eau ont été étudiées de manière rétrospective. L'analyse génomique a été effectuée par les méthodes d'ECP et de Multiplex rep-PCR et une souche de chaque profil a été identifiée par MLST. Au niveau phénotypique, la capacité de formation de biofilm, l'antibiorésistance et la résistance aux antiseptiques ont été étudiées pour les isolats successifs appartenant à ces deux espèces.

Au cours de cette étude, nous avons observé la persistance de *P. aeruginosa* et d'un génotype appartenant à une nouvelle espèce d'*Achromobacter*. Nous avons observé au cours de la persistance une dynamique de succès clonaux entre *Achromobacter* et *P. aeruginosa* dépendantes des épisodes de décontamination du réseau. De plus, au sein de chaque espèce, nous avons observé au cours du temps une diversification génomique et phénotypique, suggérant une évolution adaptative en réponse aux différentes contraintes environnementales.

Les résultats de cette étude ont été publiés dans l'article suivant :

Article IV

Abdouchakour F., **Dupont C.**, Grau D., Aujoulat F., Mournetas P., Marchandin H., Parer S., Gibert P., Valcarcel J., Jumas-Bilak E. (2015). Clonal selections of *Pseudomonas aeruginosa* and *Achromobacter* sp. lead to successive colonization waves of water contamination in dental care units. *Applied and Environmental Microbiology*. 81, 7509-7524

Pseudomonas aeruginosa and *Achromobacter* sp. Clonal Selection Leads to Successive Waves of Contamination of Water in Dental Care Units

Fatima Abdouchakour,^a Chloé Dupont,^a Delphine Grau,^{a,b} Fabien Aujoulat,^a Patricia Mournetas,^c Hélène Marchandin,^{a,d} Sylvie Parer,^{a,b} Philippe Gibert,^c Jean Valcarcel,^c Estelle Jumas-Bilak^{a,b}

Université de Montpellier, UMR 5569, Équipe Pathogènes Hydriques Santé Environnements, Montpellier, France^a; Centre Hospitalier Régional Universitaire de Montpellier, Département d'Hygiène Hospitalière, Montpellier, France^b; Centre Hospitalier Régional Universitaire de Montpellier, Centre de Soins Dentaire, Montpellier, France^c; Centre Hospitalier Régional Universitaire de Montpellier, Laboratoire de Bactériologie, Montpellier, France^d

Dental care unit waterlines (DCUWs) consist of complex networks of thin tubes that facilitate the formation of microbial biofilms. Due to the predilection toward a wet environment, strong adhesion, biofilm formation, and resistance to biocides, *Pseudomonas aeruginosa*, a major human opportunistic pathogen, is adapted to DCUW colonization. Other nonfermentative Gram-negative bacilli, such as members of the genus *Achromobacter*, are emerging pathogens found in water networks. We reported the 6.5-year dynamics of bacterial contamination of waterlines in a dental health care center with 61 dental care units (DCUs) connected to the same water supply system. The conditions allowed the selection and the emergence of clones of *Achromobacter* sp. and *P. aeruginosa* characterized by multilocus sequence typing, multiplex repetitive elements-based PCR, and restriction fragment length polymorphism in pulsed-field gel electrophoresis, biofilm formation, and antimicrobial susceptibility. One clone of *P. aeruginosa* and 2 clones of *Achromobacter* sp. colonized successively all of the DCUWs: the last colonization by *P. aeruginosa* ST309 led to the closing of the dental care center. Successive dominance of species and clones was linked to biocide treatments. *Achromobacter* strains were weak biofilm producers compared to *P. aeruginosa* ST309, but the coculture of *P. aeruginosa* and *Achromobacter* enhanced *P. aeruginosa* ST309 biofilm formation. Intraclonal genomic microevolution was observed in the isolates of *P. aeruginosa* ST309 collected chronologically and in *Achromobacter* sp. clone A. The contamination control was achieved by a complete reorganization of the dental health care center by removing the connecting tubes between DCUs.

Dental instruments on dental care units (DCUs), such as ultrasonic scalers, air scalers, and high-speed turbine dental handpieces, are cooled by DCU-supplied water, which also irrigates and cools the tooth surface during dental treatment (1). Water is also supplied to the DCU cup filler outlet used by patients for oral rinsing and to the bowl rinse outlet rinsing the DCU spittoon. Therefore, DCU waterlines (DCUWs) consist of a complex network formed by meters of narrow-bore plastic tubing of mostly 2- to 3-mm internal diameter. In narrow-bore tubes, a thin immobile layer of fluid, called the hydrodynamic boundary layer, exists at the interface of the lumen wall and the moving water (2). This hydrodynamic phenomenon is associated with water stagnation when the DCU is not used, and heating of water to at least 20°C enhances the development of microbial biofilm in the tubes (3).

The DCUWs appear to be a technological niche in which complex interactions occur among members of the microbial community (4–6). Regarding bacteria, DCUWs have been shown to promote the formation of biofilm, predominantly seeded from environmental bacteria in the water supply (4–6). More rarely, human bacteria such as staphylococci or oral bacteria have been detected, indicating a retraction of oral fluids from the surgical devices to the waterlines (7, 8). Routine follow-up for water microbial contamination in the dental health care center (DCC) is performed in order to avoid massive microbial contamination and to detect the presence of pathogenic bacteria. The majority of microbial species described in massive DCUW contamination are Gram-negative, aerobic, heterotrophic environmental species

with low pathogenicity (4, 6). However, known pathogens, including *Pseudomonas aeruginosa* (9, 10), *Legionella pneumophila* (11, 12), and nontuberculous mycobacterial species (13, 14), have been detected in DCUWs. For these pathogenic bacteria, the role of DCUW contamination in patient's or dentist's infections or allergic disorders has been suggested by several published cases (11, 15–17).

To avoid backflow from the oral cavity to waterlines, handpieces are equipped with antiretraction devices, but evidence of antiretraction valve failures has been well documented (18, 19). Consequently, guidelines for infection control in dental health care recommend that dental handpieces be cleaned and sterilized between patients and that the waterlines be flushed for 20 to 30 s after each patient for any device connected to the waterlines in order to elute water and air before treating the next patient (20).

Received 17 April 2015 Accepted 12 August 2015

Accepted manuscript posted online 21 August 2015

Citation Abdouchakour F, Dupont C, Grau D, Aujoulat F, Mournetas P, Marchandin H, Parer S, Gibert P, Valcarcel J, Jumas-Bilak E. 2015. *Pseudomonas aeruginosa* and *Achromobacter* sp. clonal selection leads to successive waves of contamination of water in dental care units. *Appl Environ Microbiol* 81:7509–7524. doi:10.1128/AEM.01279-15.

Editor: J. L. Schottel

Address correspondence to Estelle Jumas-Bilak, ebilak@univ-montp1.fr.

Copyright © 2015, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

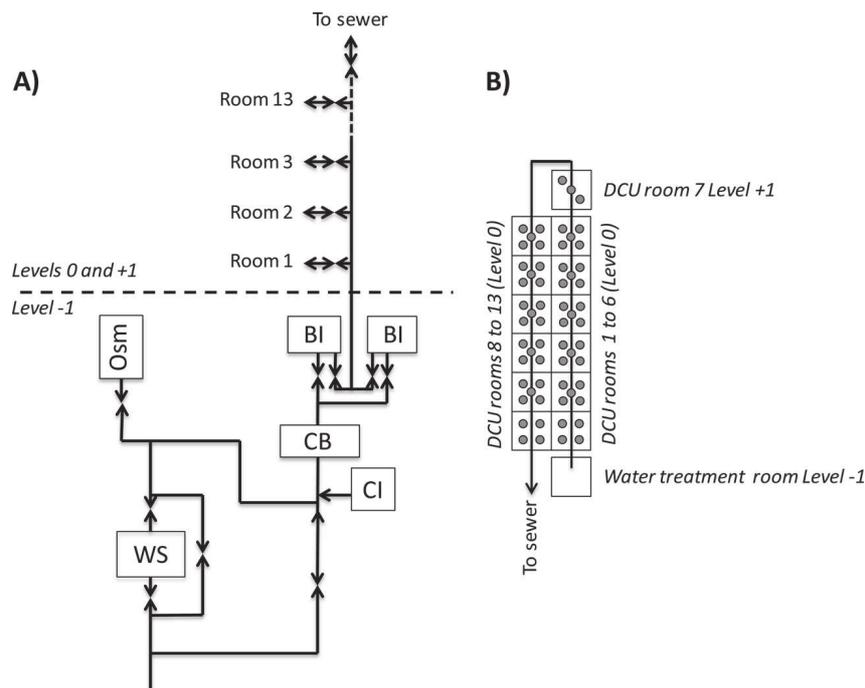


FIG 1 Schematic representation of the dental care center (DCC). (A) Water treatment system of the dental care ward. Arrows indicate the direction of water circulation. Inversed arrows indicate the point of flow control. WS, water softener; Osm, osmoser; CI, chlorinate injector; CB, chlorination mixing bottle; BI, biocide injector (Gamasonic). (B) The 3 levels of the dental care ward with the positions of the 13 dental care rooms on the water supply system. Arrows indicate the direction of water circulation in the pipe from level -1 to levels 0 and $+1$ and then to the sewers. The water pipe feeds 13 rooms, each containing 3 to 5 DCUs (gray circles). This schematic localization of dental care rooms is used in Fig. 5 to represent the dynamics of contamination in the DCC.

Beside retro-contamination, the DCUW can be contaminated by the water supply, which is either drinking-quality water or water from reservoir bottles integrated in the DCU. Generally, the microbial communities in water present a high capacity for biofilm formation and therefore can easily colonize the DCUW (8, 21).

Purging and intensive decontamination are recommended to prevent microbial colonization (21), but some bacteria display both strong adhesion ability to surfaces and high biocide resistance that lead to persistent and refractory colonization. This behavior is particularly displayed by *P. aeruginosa*, a major human opportunistic pathogen that preferentially thrives in aquatic habitats (22, 23). Adaptability to diverse environments and life conditions is a major trait of *P. aeruginosa* determined by the ability of individual strains to acquire genomic segments, giving rise to strains with customized genomic repertoires (24). Moreover, rapid intraclonal microevolution has been described and related to habitat adaptation (25). Similar adaptive behavior has been suggested by genomics in the genus *Achromobacter* (26).

We studied herein the 6.5-year dynamics of bacterial contamination of DCUWs in a dental health care center (DCC) comprising 61 DCUs connected by a short tube on a feeder pipe supplying softened water. The conditions allowed the successive selection of *P. aeruginosa* and *Achromobacter* sp., followed by the emergence and dominance of a clone of *P. aeruginosa*. Contamination control was achieved by a reorganization of the dental center and changes in hygiene procedures.

MATERIALS AND METHODS

DCC settings and water treatment. The DCC of Montpellier University Hospital (France) hosted a general dentistry patient population but

also included at-risk patients. It comprised 61 DCUs branched by a short connection on the same water plumbing pipe located just under the floor of the care rooms. The organization of the water treatment and positions of rooms on the water supply system are represented in Fig. 1. The 13 care rooms of the DCC contained 3 to 5 DCUs. Each DCU was provided with a valve to avoid reflux from its DCUW to another DCU. The system was supplied by water containing 6×10^{-4} mol/liter Ca^{2+} and Mg^{2+} obtained by mixing water from the municipal water system and softened/deionized water. Water was then rechlorinated in a mixing bottle at 1 ppm. A preventive biocide (Sterispray) recommended for dental care waterlines was added with an automatic injector (Gamasonic) ("BI" in Fig. 1) located at the beginning of the pipe for water feeding of the DCU. The water supply network was not looped, and an automatic system at the network end performed a 2-min daily purge of the feeding pipe. Water from the purge went directly to the sewer. Biennial decontamination of the DCC network was performed by shock chlorination at 12.36 ppm in water softener and the network after the terminal water supply valve of each DCU had been closed in order to avoid deleterious oxidation of internal DCU devices. After the shock chlorination, when the chlorinate concentration decreased at 3 ppm, the DCU terminal water supply valves were opened, and a prolonged purge was performed at each DCU in order to allow chlorination and rinse of the DCUW.

Water control and microbiological analysis. The study material included water sampled from DCUWs, from the main water supply, and from water softener. A routine microbiological follow-up by total mesophilic bacteria counting and *P. aeruginosa* specific detection and counting was performed once a month on one DCU of each of the 13 DCC rooms, with all DCUs being analyzed once a year according to hospital guidelines. Results are reported as CFU 100 ml^{-1} water. Except for *P. aeruginosa*, only the majority of colonial morphotypes were identified to the species or genus level. Additional analyses were performed after major corrective

measures in order to evaluate their effects and during periods of heavy contamination, such as September 2012 and the year 2013.

All samples were taken at the beginning of a working day before the first patient care. DCU water samples were obtained after 2 min of purging of the air/water lines equipped with sterile syringes. Water samples were collected in 250-ml sterile bottles containing sodium thiosulfate (20 mg liter⁻¹) for chloride inhibition and passed through a 0.45- μ m-pore filter system. For water containing the preventive biocide (Sterispray), the filters were treated by neutralizer buffer (3 g liter⁻¹ lecithin plus 30 g liter⁻¹ polysorbate 80) to block the inhibitory effect of biocide on bacterial growth. The filters were then incubated on plate count agar (bioMérieux) and pseudomonad selective agar containing cetrime (200 mg liter⁻¹) and nalidixic acid (15 mg liter⁻¹) (Oxoid). Incubation was performed at 30°C during 48 h. The bacteria were identified by Gram staining, oxidase reaction, production of pigments onto King A and King B media (Bio-Rad Laboratories) completed by the API 20NE system (bioMérieux), matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS), and/or 16S rRNA gene sequencing when necessary. Isolates were stored at -80°C in a preservative medium (Bacterial Preservers; Technical Service Consultant, Ltd.).

Gene amplification and sequencing. Genomic DNA was obtained using the MasterPure DNA purification kit (Epicentre, Madison, WI). Multilocus sequence typing (MLST) (*acsA*, *aroE*, *guaA*, *mutL*, *nuoD*, *ppsA*, and *trpE* for *P. aeruginosa* and *lepA*, *nrdA*, *nusA*, *nuoL*, *gltB*, *rpoB*, and *eno* for *Achromobacter*) was performed as previously described (27, 28). Amplification products were sequenced on an ABI 3730xl automatic sequencer (Cogenics, France). Sequence comparison and allele affiliation were performed using <http://www.pubmlst.org>. The combination of allele numbers for each isolate defined the sequence type (ST). The sequences were deposited into the GenBank database, and the undescribed ST was deposited in the pubMLST (*P. aeruginosa*) database as ST1753.

PFGE and genome comparison. For *P. aeruginosa*, restriction fragment length polymorphism (RFLP) in PFGE after digestion by SpeI was performed according to Corne et al. (29). The PFGE patterns were photographed under UV light and visually compared. The Lambda concatamer ladder (Bio-Rad) was used as a molecular size marker. The PFGE patterns of *P. aeruginosa* ST309 DCC isolates were compared *in silico* with the complete genome sequence of *P. aeruginosa* strains BL09 and BL20 (accession no. GCA_000480965.1 and GCF_000480745.1, respectively).

Multiplex rep-PCR. DNAs were extracted using the MasterPure DNA purification kit (Epicentre, Madison, WI) as recommended by the supplier. The amplification of repetitive extragenic palindromic (REP) sequences, the enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC), and BOX was done with the primers previously described (30, 31). The repetitive extragenic palindromic PCR (rep-PCR) was performed in a 50- μ l mixture containing 160 nM each primers, 200 μ M each deoxynucleotide triphosphate (dNTP), 2.5 U *Taq* polymerase (Promega) in the appropriate buffer, 50 ng of genomic DNA, 2 mM MgCl₂, and 3.5% dimethyl sulfoxide. The conditions for amplification were an initial denaturation (95°C, 3 min) followed by 30 cycles of denaturation (90°C, 30 s), annealing (40°C, 1 min), extension (72°C, 4 min), and a final extension step (16 min at 72°C). Amplification products were separated on a 1.5% agarose gel in 0.5 \times Tris-borate-EDTA buffer containing 500 μ g ml⁻¹ ethidium bromide, and the gel was photographed under UV light. A 1-kb DNA ladder (Sigma-Aldrich) was used as a molecular size marker.

Antimicrobial susceptibility testing. Antibiotic susceptibility was tested by disk diffusion assay on Mueller-Hinton agar and interpreted according to the recommendations of the Antibiogram Committee of the French Microbiology Society (CA-SFM) (<http://www.sfm-microbiologie.org>). Susceptibility to topical antimicrobial agents and biocides was tested by agar well diffusion assay—the so-called “biocidogram” (32). The biocides tested were chlorhexidine in alcoholic solution, 10% povidone-iodine in alcohol solution (Betadine), H₂O₂, Sterispray (benzalkonium chloride 1% plus chloramine plus EDTA), Aniosurf [didecylidimethylammonium chloride plus 1,1 hexamethylene bis (5-(4-chlorophenyl) bigua-

nide) digluconate], and Oxyfloor. Briefly, the surface of 5-mm-thick Mueller-Hinton agar plates was inoculated with a bacterial suspension visually adjusted to a 0.5 McFarland standard (10⁸ CFU ml⁻¹) and then diluted 100-fold. Then 8-mm-diameter holes were made in agar plates with a sterile punch, and the wells were loaded with 150 μ l of each compound. The inhibition diameters were measured after 24 h of incubation at 37°C for *P. aeruginosa* and after 48 h of incubation at 37°C for *Achromobacter* sp. using the Antibiotic Zone Reader apparatus (Fisher Lilly). Diameters were compared to those of *P. aeruginosa* ATCC 9027, a strain with the wild-type susceptibility profile used as a quality control in assays of antimicrobial preservatives and efficacy testing. The type strain of *Achromobacter xylosoxidans* was also tested.

Study of biofilm formation. The study of biofilm formation was conducted in flat-bottom 96-well polystyrene microplates (Nunc, Roskilde, Denmark) in tryptic soy broth (TSB). The wells were inoculated by serial dilution of overnight culture (~10⁶ CFU ml⁻¹). The ability of strains to form biofilms was evaluated as described by O'Toole and Kolter (33), with modifications. Briefly, 100 μ l of cultures was transferred into wells of microplates (4 wells/strain) and incubated for 48 h (72 h for *Achromobacter* sp.) at 25, 30, and 37°C. After incubation, the growth was evaluated by determination of the optical density at 570 nm (OD₅₇₀) (GENios; Tecan). The plates were rinsed thoroughly with sterile water to remove planktonic bacteria, and 150 μ l of crystal violet (0.3%) was added to each well. After 15 min at room temperature, the plates were rinsed again and air dried, and the dye was dissolved with 95% ethanol (200 μ l). Crystal violet absorbance was determined at 570 nm. The biofilm assay was performed three times. The averages and standard deviations were calculated for all repetitions of the experiment. The cutoff OD (OD_c) for the microtiter plate test corresponded to 3 standard deviations above the mean OD of the negative control. In all experiments, the ratio of OD to OD_c was calculated. Strains were categorized as nonadherent or weakly, moderately, or strongly adherent according to Stepanovic et al. (34). For the biofilm formation with cocultured *Achromobacter* sp. and *P. aeruginosa*, we mixed diluted cultures equally, and we transferred this culture into the microplates for 48 h. The number of adhering bacteria within the biofilm was determined according to Lopez et al. (35).

Nucleotide sequence accession numbers. The sequences of the isolates determined in this study have been deposited into the GenBank database under accession no. KJ863569 to KJ863645 and KJ867037 to KJ867050.

RESULTS

Synopsis of DCC bacterial contamination. Figure 2 shows that members of the genus *Bacillus* were the major water contaminants in the DCC from 2009 to 2012, with a decrease in the total inoculum in 2010 followed by a reincrease in 2011. In 2012, *P. aeruginosa* and *Achromobacter* appeared and then persistently colonized the DCUWs. From January 2009 to June 2013, water was preventively treated by the Gamasonic system (BI in Fig. 1), which automatically provided 10 ml of Sterispray solution per liter of water in the network, after water softening (“WS” in Fig. 1) and rechlorination (CI and CB in Fig. 1). Additional curative decontaminations were performed regularly by shock chlorination of the softened water supply. Because of massive contaminations in the water softener (WS) and the water before and after Sterispray treatment (BI) in 2012 and 2013, these devices were shunted, the DCUWs being fed by untreated municipal water from June 2013. From June to September, this procedure did not decrease the level of DCUW contamination (>10⁴ CFU/100 ml in 68 samples), despite better microbiological quality of the supplied water: 20 CFU/100 ml before chlorination, <1 CFU/100 ml after chlorination, and absence of *Achromobacter* sp. and *P. aeruginosa*. This observation suggested that the downstream colonization of the DCC

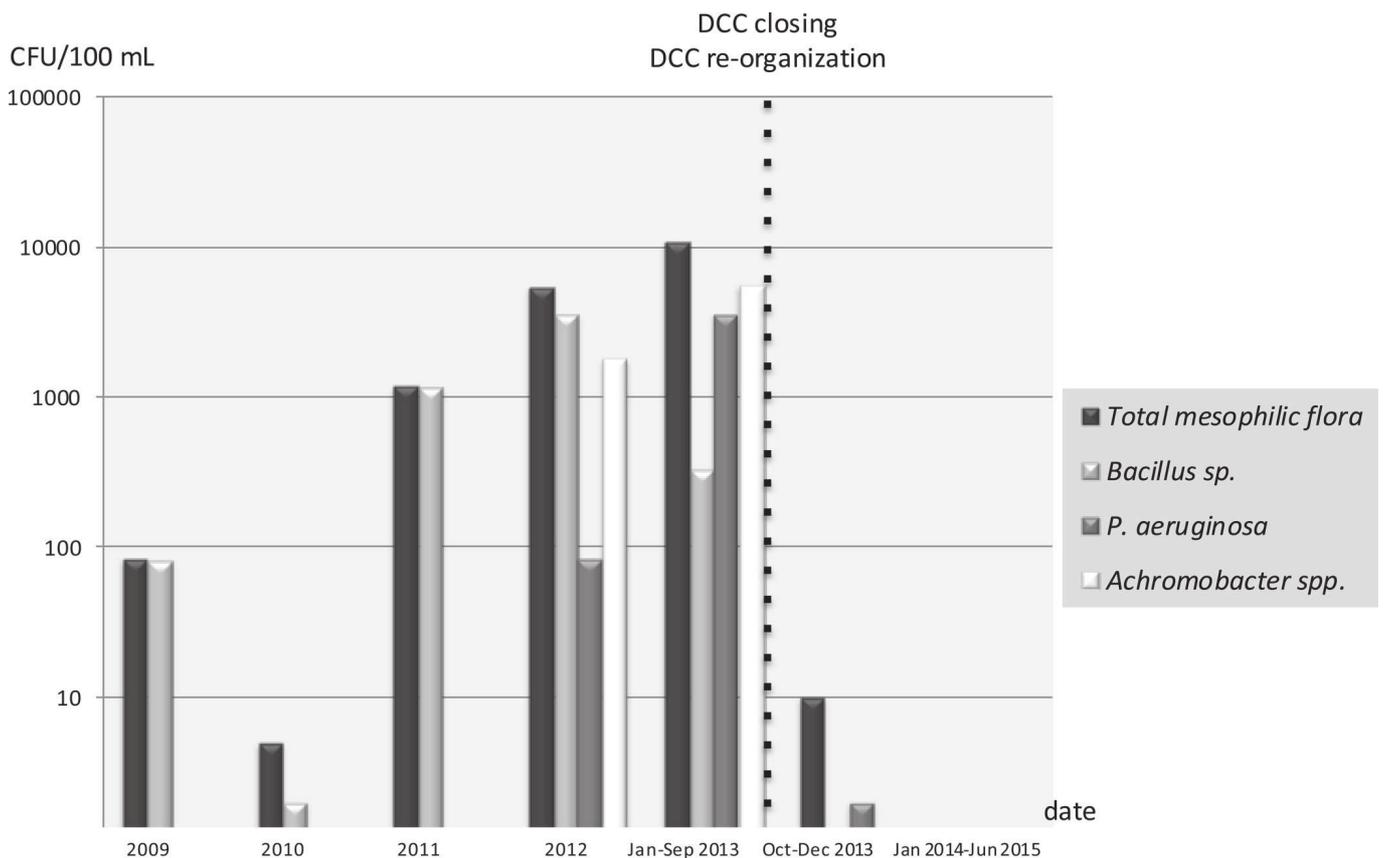


FIG 2 Dynamics of the total mesophilic community and *Bacillus*, *P. aeruginosa*, and *Achromobacter* populations, calculated by the 1-year summation of CFU obtained in each water sample during a 6.5-year period from January 2009 to June 2015. The whole volume of water sampled per year (about 12 liters/year) has been considered, and the results are expressed as mean values in CFU/100 ml. Results for the year 2013 are presented in two parts (separated by a dotted line) corresponding to the periods before and after the DCC closure and water system reorganization.

persisted whatever the quality of supplied water. The closing of the DCC in September 2013 allowed the complete reorganization of the DCC water system. Internal DCU tubes were changed, and decontamination of each DCU was performed by oxidative shock with H_2O_2 at 6 ppm. From October 2013, each DCU was unplugged from the main water feeding tube, and sterile pharmaceutical water with 0.03% H_2O_2 was provided from a bottle attached to each DCU. Only 1 CFU of *P. aeruginosa* was detected in October and November 2013. Since then, no bacteria were detected in the DCUW (Fig. 2).

Molecular typing of *P. aeruginosa* isolates. Sixty-eight isolates of *P. aeruginosa* collected between June 2012 and November 2013 were compared by multiplex rep-PCR (Table 1). A low level of diversity was observed in the population, with only 5 rep-PCR types (0.073 type per sample). Representative patterns of the 5 rep-PCR types are shown in Fig. 3. A large majority of isolates ($n = 58$ [85%]) displayed rep-PCR pattern 2, which was detected throughout the study period (28 June 2012 to November 2013) in DCUWs and once in water before BI (Fig. 1). Isolates displaying rep-PCR pattern 1 ($n = 4$) were detected only once in two care rooms together with isolates of rep-PCR type 2. Isolates of rep-PCR type 3 ($n = 4$) were mainly detected in the water softener (WS) and only once in DCUWs. Isolates with rep-PCR type 4 ($n = 1$) and type 5 ($n = 1$) were recovered only once in DCUWs and water softener (WS), respectively. A subpopulation of 11 isolates

representative of the 5 rep-PCR types and of different dates of sampling for rep-PCR type 2 was submitted to MLST (Table 1). All isolates of rep-PCR type 2 belonged to ST309, whereas isolates of rep-PCR types 1, 4, and 5 belonged to ST253, ST312, and ST252, respectively. Isolates of rep-PCR type 3 had an ST previously undescribed in the pubMLST database and now deposited as ST1753. Molecular typing showed that massive and persistent colonization of the DCUWs involved a *P. aeruginosa* clone of rep-PCR type 2 and ST309.

Molecular identification and typing of *Achromobacter* isolates. A total of 78 *Achromobacter* isolates were recovered from DCUWs between July 2012 and July 2013. Molecular typing by multiplex rep-PCR of 17 representatives showed that colonization of the DCUW involved only 2 clones. The rep-PCR type A was observed for isolates recovered from July 2012 to July 2013, while the rep-PCR type B was observed only once for strains isolated in 5 different rooms in November 2012 (Table 1 and Fig. 4).

MALDI-TOF MS analysis showed the best match (score of >2 for all strains) with *Achromobacter* sp. genomospecies 3. The 16S rRNA gene sequencing showed that both type A and B isolates were most closely related to *Achromobacter denitrificans* (accession no. AJ278451), with 98.7% sequence identity. Type A and B isolates shared 99.6% of their 16S rRNA gene sequences. Multilocus sequencing confirmed that the isolates CYS1 (type A) and DMG18 (type B) belonged to a not yet described species most

TABLE 1 Origin, date of sampling, and genotypes of *Pseudomonas aeruginosa* and *Achromobacter* sp. isolates included in this study

Isolate or strain	DCC room/site of sampling	Sample type	Date of sampling (day/mo/yr)	Profile by:		
				Multiplex rep-PCR	PFGE	ST no. ^a
<i>P. aeruginosa</i>						
T45.9	Montpellier hospital	Clinical	01/11/10			308
PAPE 6	Montpellier city	Water main	2011	2	P3	309d
ATCC 9027 (reference strain)		Clinical (ear)				
CUZ 1	1	DCU water, 2nd flow	28/06/12	2	P1	309
CUZ 2	4	DCU water, 2nd flow	28/06/12	1		253
CUZ 3	10	DCU water, 2nd flow	28/06/12	1		253d
CUZ 4	10	DCU water, 2nd flow	28/06/12	1		253d
CUZ 5	5	DCU water, 2nd flow	28/06/12	1		253
CUZ 6	9	DCU water, 2nd flow	28/06/12	2	P1	309d
CUZ 7	6	DCU water, 2nd flow	28/06/12	2		309d
CXD 2	9	DCU water, 2nd flow	04/07/12	2		309d
CXD 3	10	DCU water, 2nd flow	04/07/12	2	P1	309
CXD 4	9	DCU water, 2nd flow	04/07/12	2		309
CXD 6	10	DCU water, 2nd flow	04/07/12	2	P1	309d
CXE 2	9	DCU water, 2nd flow	04/07/12	2	P1	309
CXE 4	9	DCU water, 2nd flow	04/07/12	2		309d
DKJ 4	2	DCU water, 2nd flow	22/10/12	2	P1	309d
DKJ 6	3	DCU water, 2nd flow	22/10/12	2	P1	309d
DXF 2	Level -1	Water in softener	11/01/13	5		252
ETC 3	12	DCU water, 1st flow	29/04/13	2		309d
ETC 7	11	DCU water, 1st flow	29/04/13	2		309d
FBO 1	9	DCU water, 1st flow	06/06/13	2		309d
FBO 2	9	DCU water, 2nd flow	06/06/13	2		309d
FKR 1	Level -1	Water before analyzer	05/07/13	2	P2	309d
FRM 3	1	DCU water, 2nd flow	09/08/13	2	P1	309d
FRM 6	13	Spittoon water	09/08/13	2	P1	309d
FRM 11	11	DCU water, 2nd flow	09/08/13	2		309d
FRM 12	4	DCU water, 2nd flow	09/08/13	2		309d
FRM 17	8	DCU water, 2nd flow	09/08/13	3	P4	1753d
FRM 18	Level -1	Softened water network	09/08/13	3	P5	1753d
FSN 1	1	DCU water, 2nd flow	23/08/13	2		309d
FSR 3	2	DCU water, 2nd flow	27/08/13	2		309d
FSR 5	3	DCU water, 2nd flow	27/08/13	2		309d
FSR 9	2	DCU water, 2nd flow	27/08/13	2		309d
FST 1	12	DCU water, 2nd flow	27/08/13	2		309d
FST 2	12	DCU water, 2nd flow	27/08/13	2		309d
FST 3	11	DCU water, 2nd flow	27/08/13	2		309d
FST 4	11	DCU water, 2nd flow	27/08/13	2		309d
FWM 1	1	DCU water, 2nd flow	05/09/13	2		309d
FWM 5	2	DCU water, 2nd flow	05/09/13	2		309d
FWM 8	3	DCU water, 2nd flow	05/09/13	2		309d
FWM 10	4	DCU water, 2nd flow	05/09/13	2		309d
FWM 12	5	DCU water, 2nd flow	05/09/13	2		309d
FWM 14	6	DCU water, 2nd flow	05/09/13	2		309d
FWM 16	7	DCU water, 2nd flow	05/09/13	2		309d
FWN 2	Level -1	DCC water entrance	05/09/13	3	P6	1753
FUO 1	1	DCU water, 2nd flow	03/09/13	2		309d
FUO 3	2	DCU water, 2nd flow	03/09/13	2		309d
FUO 5	3	DCU water, 2nd flow	03/09/13	2		309d
FUO 8	4	DCU water, 2nd flow	03/09/13	2		309d
FUO 10	5	DCU water, 2nd flow	03/09/13	2		309d
FUO 13	6	DCU water, 2nd flow	03/09/13	2		309d
FUU 1	1	DCU water, 2nd flow	06/09/13	2		309d
FUU 4	2	DCU water, 2nd flow	06/09/13	2		309d
FUU 6	3	DCU water, 2nd flow	06/09/13	2		309d
FUU 10	10	DCU water, 2nd flow	06/09/13	2		309d
FUU 12	9	DCU water, 2nd flow	06/09/13	2		309d
FUU 13	6	DCU water, 2nd flow	06/09/13	2		309d

(Continued on following page)

TABLE 1 (Continued)

Isolate or strain	DCC room/site of sampling	Sample type	Date of sampling (day/mo/yr)	Profile by:		
				Multiplex rep-PCR	PFGE	ST no. ^a
FUU 15	9	DCU water, 2nd flow	06/09/13	2	P1	309
FWW 1	13	DCU water, 2nd flow	06/09/13	2	P1	309
FWW 2	2	DCU water, 2nd flow	06/09/13	2	P1	309d
FWW 4	3	DCU water, 2nd flow	06/09/13	2	P1	309d
FWW 5	4	DCU water, 2nd flow	06/09/13	2	P1	309d
FWW 9	9	DCU water, 2nd flow	06/09/13	2	P1	309d
FWW 10	6	DCU water, 2nd flow	06/09/13	2	P1	309d
FWW 13	8	DCU water, 2nd flow	06/09/13	2		309d
FWW 14	2	DCU water, 2nd flow	06/09/13	2	P1	309d
FWU	Level -1	Water softener after disinfection	06/09/13	3	P7	1753
GDU	1	DCU water, 2nd flow	10/10/13	2		309d
GDC 3	2	DCU water, 2nd flow	19/11/13	2		309d
<i>Achromobacter</i> sp.						
CXX 1	1	DCU water, 2nd flow	10/07/12	A	A1	
CYS 1	1	DCU water, 2nd flow	17/07/12	A	A2	
DMG 8	3	DCU water, 2nd flow	07/11/12	B	A3	
DMG 10	3	DCU water, 2nd flow	07/11/12	B	A3	
DMG 12	4	DCU water, 2nd flow	07/11/12	B	A3	
DMG 14	5	DCU water, 2nd flow	07/11/12	B	A3	
DMG 15	6	DCU water, 1st flow	07/11/12	B	A3	
DMG 18	12	DCU water, 2nd flow	07/11/12	B	A3	
EDM 8	10	DCU water, 2nd flow	15/02/13	A	A4	
EDM 16	7	DCU water, 2nd flow	15/02/13	A	A4	
EKZ 1	1	DCU water, 1st flow	18/03/13	A	A4	
EPO 3	12	DCU water, 1st flow	15/04/13	A	A4	
EPO12	8	DCU water, 2nd flow	15/04/13	A	A4	
ETC	1	DCU water, 1st flow	22/05/13	A	A4	
FEL 6	2	DCU water, 2nd flow	25/06/13	A	A4	
FKR 3	1	DCU water, 2nd flow	05/07/13	A	A4	
FRM 10	3	DCU water, 2nd flow	19/08/13	A	A5	

^a The letter "d" indicates that the ST was deduced from that of strains displaying the same multiplex rep-PCR profile.

closely related to *Achromobacter dolens* and *Achromobacter ruhlantii*.

Kinetics and success of *P. aeruginosa* and *Achromobacter* clones in DCUWs. Bacterial identification and typing data were integrated into the calendar of microbiological follow-up and decontamination measures of the DCUWs from July 2012 to April 2014 (Fig. 5). In July 2012, a general chlorination and purging were performed in order to eliminate *P. aeruginosa* ST309 that had been detected in 4 rooms in June 2012 (Fig. 5). The procedure allowed the elimination of *P. aeruginosa* ST309 from the DCUW tested and, thereafter, *Achromobacter* sp. clone A colonized the center endemically. Due to both the high inoculum of *Achromobacter* sp. clone A and the large number of colonized rooms in October 2012, new chlorination and prolonged purging were performed, leading to the disappearance of *Achromobacter* sp. clone A. A sporadic reemergence of *P. aeruginosa* ST309 as the sole bacterium isolated in rooms 2 and 3 (Fig. 5 and Table 1) was noted on October, and each DCU in these two rooms was treated by an oxidative shock using H₂O₂ at 6 ppm. After this treatment, a transient colonization of DCU in 4 rooms by *Achromobacter* sp. clone B was noted, followed by a novel episode of contamination of all of the DCUWs by *Achromobacter* sp. clone A. Network decontamination and purging were performed during the 2012 Christmas closure with transient efficacy since *Achromobacter* sp. clone A

reemerged in March 2013. *P. aeruginosa* ST309 and ST1753 persisted in a few rooms besides *Achromobacter* sp. clone A. A new attempt at general decontamination of the main network of DCUWs was performed in August 2013 during the summer closure of the DCC by the use of H₂O₂ at 6 ppm. It led to the dramatic decrease of *Achromobacter* sp. clone A contamination concomitant with the extensive and massive colonization of all DCUs in each room of the DCC by *P. aeruginosa* ST309, the inoculum of this clone in most samples exceeding 10⁵ CFU 100 ml⁻¹. *Achromobacter* sp. clone A persisted in few samples and then became undetectable. Of note, *P. aeruginosa* ST309 had been detected upstream from DCUs in the water treatment room (level -1) on 5 July 2013 before its clonal success in DCUWs in August 2013 (Fig. 5 and Table 1), suggesting the upstream origin of the contamination.

In conclusion, successive waves of dominant bacterial populations in the DCUW seemed to be related to the decontamination procedures.

Biofilm formation. Under the experimental conditions, *P. aeruginosa* strains produced more biofilm than *Achromobacter* sp. strains (Fig. 6 and 7). According the criteria of Stepanovic (21–34), *P. aeruginosa* strains appeared to be high biofilm producers, whereas *Achromobacter* sp. strains were weak producers or non-producers under all conditions tested. Among *P. aeruginosa*

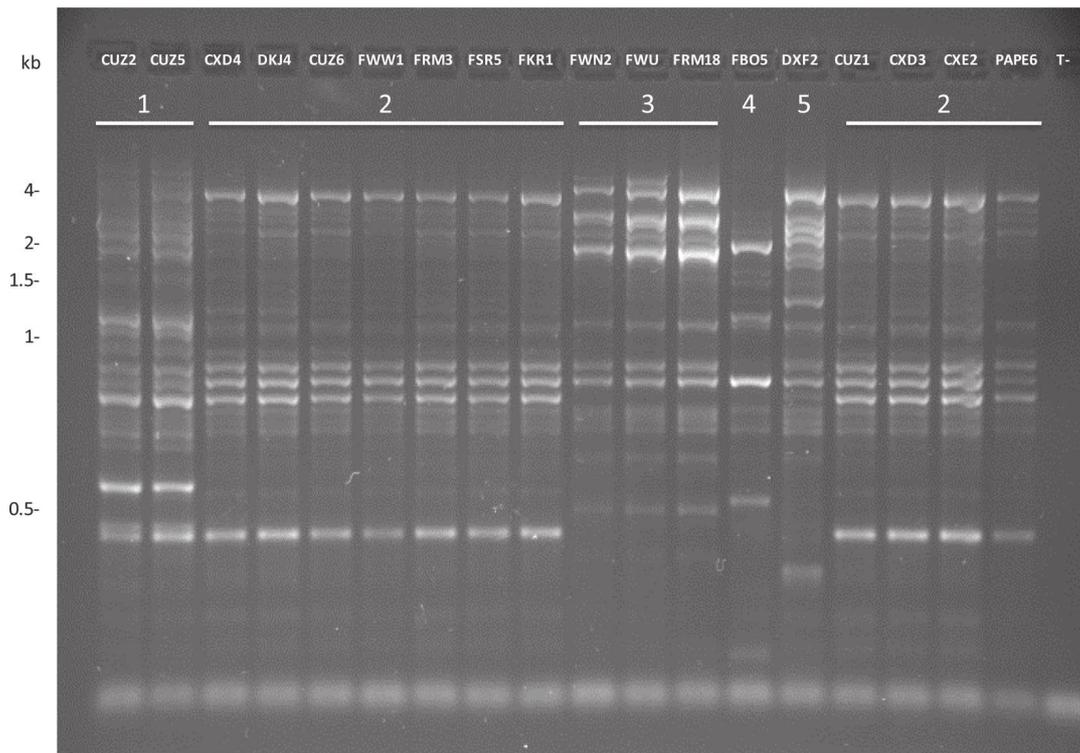


FIG 3 Gel electrophoresis for 18 *P. aeruginosa* isolates showing the 5 multiplex rep-PCR profiles obtained for the *P. aeruginosa* population. The isolates analyzed are indicated at the top of the gel according the nomenclature in Table 1, and the profile types are indicated at the top of the lanes. T-, negative reaction performed without the DNA template. Sizes in kilobases correspond to a 1-kb ladder.

strains, ST309 was the stronger biofilm producer (Fig. 6). The temperature influenced biofilm formation mainly for *P. aeruginosa* ST309, for which the optimum temperature was 25°C (the average temperature in the DCUW). The biofilm formation decreased markedly at 30°C and further at 37°C. *P. aeruginosa* biofilm formation was enhanced when *P. aeruginosa* was cocultured with *Achromobacter* sp. (Fig. 7). Bacterial numbering in the biofilm obtained after coculture showed that *Achromobacter* sp. disappeared from the mature biofilm, suggesting that the biofilm overgrowth observed for *P. aeruginosa* was due to predation against *Achromobacter* sp. rather to a real synergy between populations. Figure 6 indicates the evolution of biofilm formation of strains according the chronology of their isolation in DCUWs. Variations in biofilm formation were not significant among *P. aeruginosa* or *Achromobacter* strains of the same ST or genotype.

Susceptibility of dominant *P. aeruginosa* and *Achromobacter* sp. clones to antimicrobial agents. The effect of the biocide compounds used for water network decontamination (H₂O₂, Sterispray, and chlorine), for surface and surgical material cleaning (Aniosurf and Oxyfloor), and for topical effect in patients of the DCC (chlorhexidine and Betadine) was tested on selected *P. aeruginosa* and *Achromobacter* sp. strains. The 17 *P. aeruginosa* and 9 *Achromobacter* sp. isolates submitted to the biocidogram were selected on the basis of different sampling dates or sites and belonged to different genotypes. Inhibition zone diameters were compared to those of *P. aeruginosa* ATCC 9027, and the results are presented in Table 2.

Most representatives of both species displayed smaller inhibition zone diameters against Sterispray and Aniosurf than *P.*

aeruginosa ATCC 9027 and *A. xylosoxidans* CECT927^T, with no growth inhibition being observed for all *Achromobacter* sp. strains (Table 2). These 2 biocides contained cationic surface-acting agents belonging to the quaternary ammonium compounds (QAC), suggesting the resistance of all isolates to this group of biocides. Because Sterispray was used for water preservation until April 2013, this result may explain the selection of the dominant populations detected in the DCC. The 4 *P. aeruginosa* strains DXF2, FRM17, FRM18, and FWU showing inhibition zone diameters similar to that of *P. aeruginosa* ATCC 9027 were isolated from WS samples upstream from BI in the network (Fig. 1), i.e., before Sterispray injection, or from one DCU in August 2013 after stopping the use of Sterispray. It was noteworthy that *P. aeruginosa* isolate FWN2 sampled at the water supply entrance before WS and BI was tolerant to Sterispray, despite the fact that QAC was not used for municipal water treatment. However, chloramine, which also belongs to the Sterispray formula, was used for municipal water treatment.

For *Achromobacter* sp., a significant difference in behavior against biocides was observed for rep-PCR type A and type B isolates (Table 2). The growth rates also differed notably between the two groups of strains, with type A isolates showing visible growth on agar plates after 24 h of incubation at 37°C, while for type B isolates, a 48-h incubation time was required (data not shown). The rep-PCR type B clone represented by isolate DMG18, which transiently colonized DCUWs in November 2012, displayed small inhibition zone diameters for H₂O₂ and Oxyfloor, two agents acting by production of reactive oxygen species (ROS). This was also observed for 3 strains of type A (CXX1, CYS1, and ETC) isolated

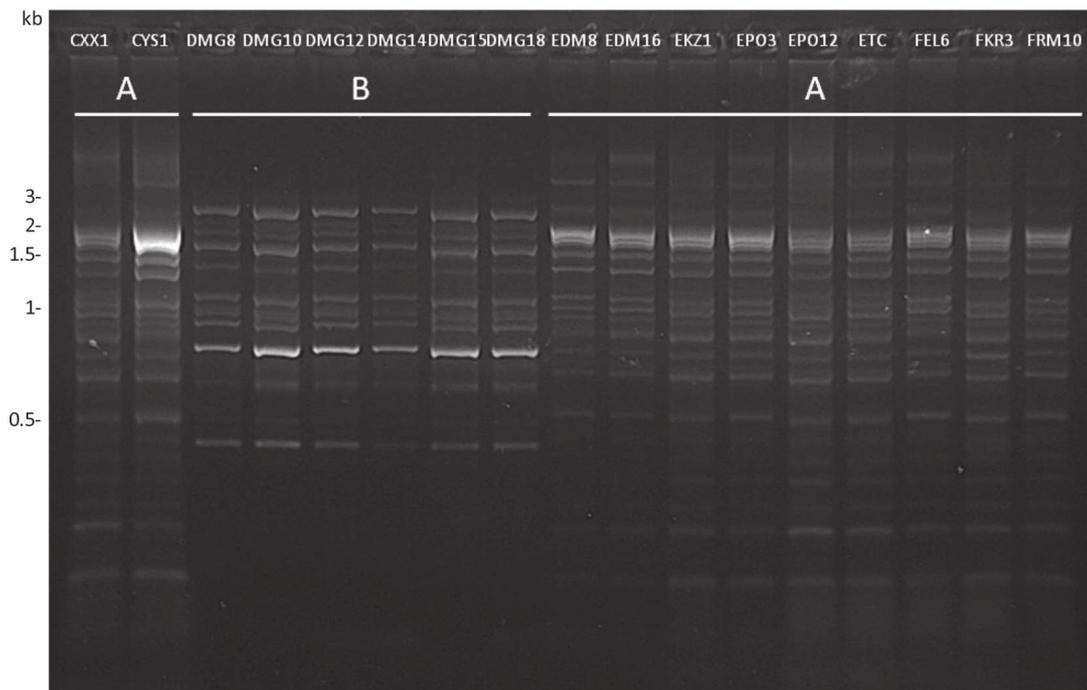


FIG 4 Gel electrophoresis for 17 *Achromobacter* sp. isolates showing multiplex rep-PCR profiles A and B observed in the overall population. The isolate nomenclature is indicated at the top of the gel according to the designations in Table 1, and profile numbering is indicated at the top of lanes. Sizes in kilobases correspond to the 1-kb ladder.

just after H₂O₂ shock procedures in July 2012 and April 2013, whereas other strains of type A, isolated remotely from the H₂O₂ treatment, displayed large inhibition zone diameters around H₂O₂-filled wells (Table 2). Tolerance to ROS of isolate DMG18 could explain the selection of the type B clone just after decontamination of the DCUWs by H₂O₂ shocking, and its low growth rate could explain its rapid replacement by the rep-PCR type A clone in the absence of H₂O₂ in November and December 2012 (Fig. 5 and Table 2). Variation in susceptibility to H₂O₂ was also observed among *P. aeruginosa* isolates but seemed unrelated to the emergence of *P. aeruginosa* genotypes and H₂O₂ treatments (Table 2).

Concerning antimicrobial agents used in human medicine, *P. aeruginosa* isolates displayed inhibition zone diameters equivalent to those obtained for the standard for chlorhexidine and Betadine. The 2 clones of *Achromobacter* sp. were less susceptible to chlorhexidine and more susceptible to Betadine than the *P. aeruginosa* isolates. Resistance to antibiotics appeared unrelated to resistance to biocides. Indeed, all strains of *P. aeruginosa* studied presented the same wild-type antibiotic resistance phenotype in spite of their various levels of tolerance toward biocides. The high level of resistance to antibiotics in the population of *Achromobacter* sp. was noteworthy, with some strains resistant to 5 classes of antibiotics, as observed for the type strain of *A. xylosoxidans*. *Achromobacter* sp. antibiotypes were variable but independent of the date and site of sampling, the genotype, and the profile of resistance to biocides.

Genomic survey of *P. aeruginosa* and *Achromobacter* isolates. The chronological collection of *P. aeruginosa* ST309/rep-PCR type 2 and *Achromobacter* sp. clone A isolates from June 2012 to September 2013 allowed the survey of the intraclonal genomic microevolution by PFGE. Figures 8 and 9 show representative genomic patterns obtained for *P. aeruginosa* and *Achromobacter* sp. isolates, respectively. The *P. aeruginosa* ST309 isolates clearly

differed from the control strain T45.9 (ST308) representative of one of the most prevalent clones found in the water network of the university hospital of Montpellier, where the DCC is hosted (personal unpublished data). Almost all ST309 isolates from the DCC displayed an identical PFGE profile (pulsotype 1), but the FKR1 isolate displayed pulsotype 2, differing from pulsotype 1 by 2 DNA fragments and revealing the occurrence of one genomic modification between strains (Fig. 8). Of note, this difference between pulsotypes was not observed in the multiplex rep-PCR experiment. This observation suggested that the genomic modification involved either a large rearrangement or a punctual mutation in the SpeI site, both mechanisms being detected by SpeI RFLP in PFGE but not by rep-PCR. The availability of complete genome sequences for *P. aeruginosa* ST309 allowed the design of specific primers flanking the SpeI restriction site concerned with the genomic modification. Amplification and sequencing of the corresponding region (300 bp) demonstrated that the SpeI site was present in both pulsotype 1 and 2 isolates. The pulsotype modification was therefore attributed to a genomic rearrangement that involved at least 350 kbp. The FKR1 strain was isolated from the water supply in the technical room near the water entrance in the DCC and just before the injector/analyzer of preventive biocide (Sterispray) (BI in Fig. 1). The FKR1 strain was isolated before the curative decontamination undertaken in August 2013, whereas pulsotype 1 isolates became dominant in the DCUW just after the curative procedure. Another ST309 strain, *P. aeruginosa* isolate PAPE 6, presented rep-PCR type 2 and a pulsotype related to pulsotype 1. Again a genomic rearrangement involving the higher-SpeI fragment was observed in PFGE patterns (Fig. 8B). This strain had been collected 2 years before the DCC contamination during the routine control of the municipal water supply of Montpellier city, thereby confirming the likely upstream origin of the

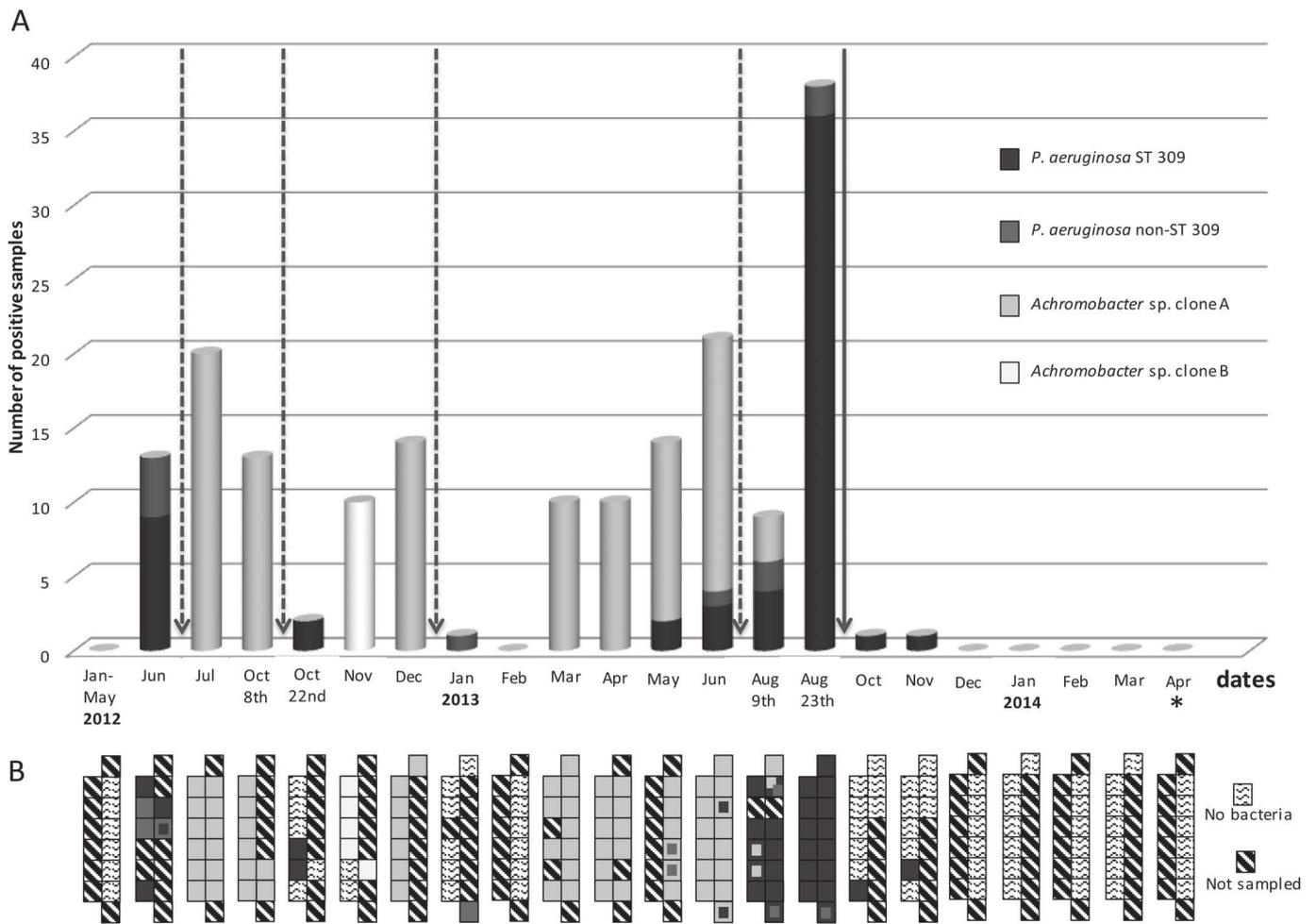


FIG 5 Dynamics of bacterial colonization of the DCUWs and main water. (A) Number of isolates of each type according to MLST and/or multiplex rep-PCR data. Dotted arrows indicate the use of biocide for decontamination, and the solid arrow indicates the closure and the change of water supply in the DCC. *, no bacteria were detected between April 2014 and June 2015. (B) Schematic representation of the dental health care center; each square corresponds to a room as described in Materials and Methods and shown in Fig. 1B. Striped squares, not analyzed; white squares with wavy lines, absence of cultivable bacteria (<1 CFU/100 ml). Other squares are shaded according to the type (species and clone) of colonizing bacteria.

DCC contamination by *P. aeruginosa* originating from the environment outside the hospital. Isolates of ST1753, described herein for the first time (rep-PCR type 3), also displayed intraclonal modifications of PFGE profiles (data not shown) suggestive of genomic rearrangement, as demonstrated for strains of ST309.

For *Achromobacter* sp., all clone B isolates displayed the same pulsotype. In contrast, clone A isolates that succeeded in prolonged colonization displayed 4 pulsotypes mostly differing in the 4 higher-DNA fragments of the PFGE patterns (Fig. 9). Isolates CYS and CXX differed in PFGE but displayed the same biocidogram with reduced susceptibility to H₂O₂ and Oxyfloor. Isolate ETC showed reduced susceptibility to H₂O₂ and Oxyfloor but shared its pulsotype with other isolates displaying full susceptibility to H₂O₂. These results suggested that PFGE profile modifications were not directly linked to the behavior against biocides. The last strain of *Achromobacter* sp. colonizing the DCC (FRM10) that was isolated after the oxidative shock in August 2013 before disappearing displayed a PFGE modification compared with strains isolated from March to July 2013.

DISCUSSION

The originality of this study comes from the description of the bacterial population dynamics at the species and genotype level in a complex water system containing 61 dental chairs during a long period (6.5 years). To our knowledge, molecular follow-up had never been performed to investigate DCU contamination. By this means, the dynamics of contamination has been precisely followed, and equilibrium between bacterial species and genotypes has been studied in relation to environmental conditions.

We demonstrated and characterized herein the colonization of DCUs in the DCC by an undescribed species of the genus *Achromobacter* and by *P. aeruginosa* that emerged in DCC after years of persistent and increasing contamination with *Bacillus* sp. These 3 bacterial species were previously described in DCUWs (4, 10). For *Achromobacter* and *P. aeruginosa*, major clones colonized DCUWs during successive waves of clonal success. The *P. aeruginosa* clone ST309 was detected upstream from the DCUWs in the technical room for water treatment and 2 years before in the main water of the city of Montpellier. These results were in favor of a water

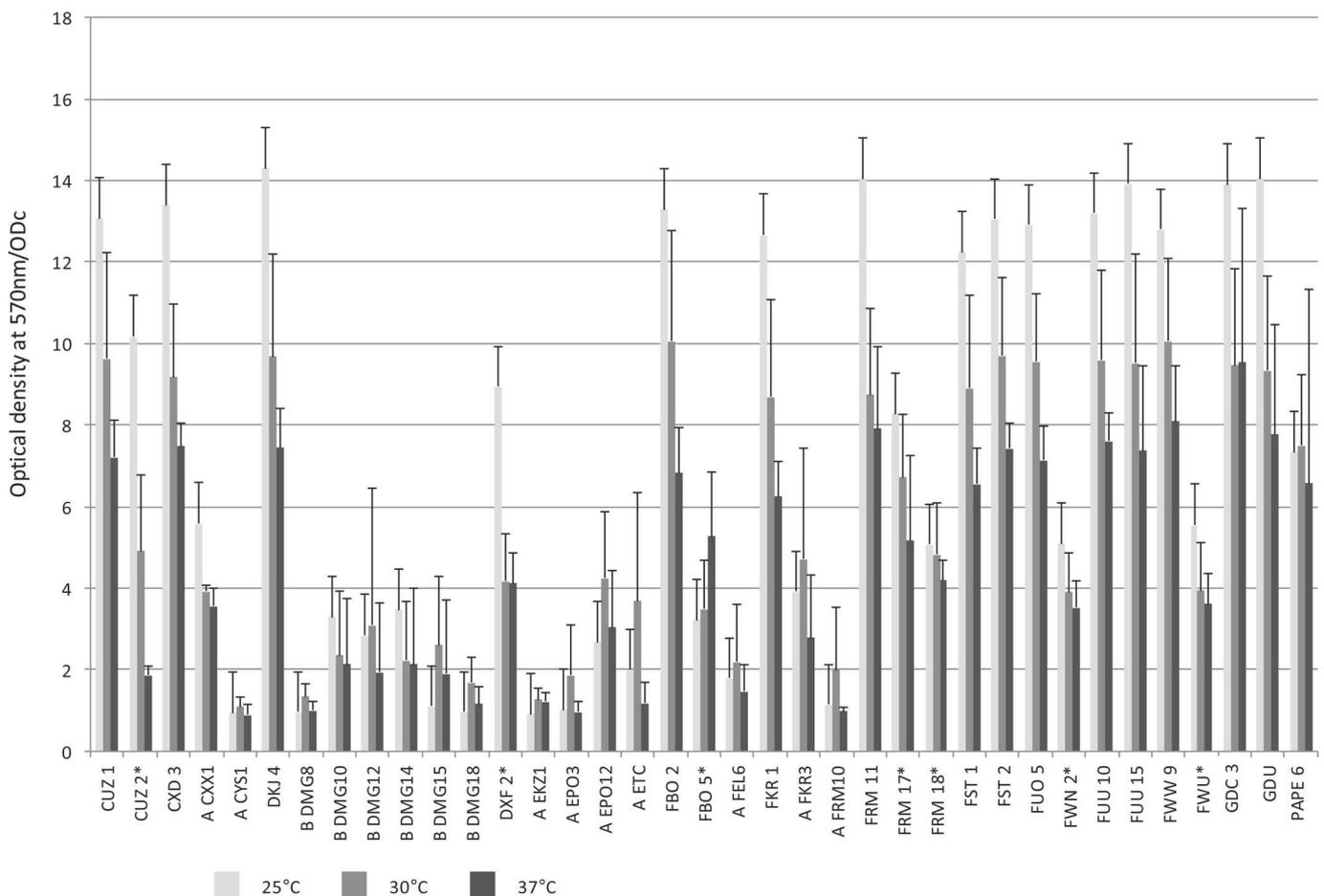


FIG 6 Study of biofilm formation of *P. aeruginosa* and *Achromobacter* sp. strains at three temperatures. Error bars represent the standard deviation. ODC, 3 standard deviations above the mean optical density of the negative control. For *Achromobacter* sp. genotypes A and B, the strain name is preceded by A and B, respectively. *, non-ST309 *P. aeruginosa*.

supply origin of the contamination rather than retraction from surgical devices. Indirect insight in favor of the environmental origin of major clones was the wild phenotype of DCC *P. aeruginosa* regarding antibiotics and antimicrobial topical agents used in human medicine (36, 37). The nonhuman origin of *Achromobacter* sp. was not demonstrated herein, and the isolates presented a potential tolerance to chlorhexidine, which is the most used antiseptic in odontology. Resistance of *Achromobacter xylosoxidans* to chlorhexidine has been previously demonstrated in two cases of infections caused by the use of contaminated chlorhexidine solution to disinfect the patient's skin or medical devices (38–40).

Considering the dynamics of microbial colonization of the DCC, *Achromobacter* sp. was the most prevalent and persistent bacterium in the water system. Particularly, it was present in the water system in July 2012 just after the elimination of *P. aeruginosa*. *Achromobacter* sp. became dominant in the ecosystem even when *P. aeruginosa* ST309 was sporadically detected from October 2012 to July 2013. Then the decontamination procedure in July 2013 eradicated *Achromobacter* sp. and selected *P. aeruginosa* ST309, which further succeeded in DCUWs. Because the colonization dynamics showing alternative dominance of *Achromobacter* sp. and *P. aeruginosa* ST309 may have been driven by differential resistance/tolerance to biocides, we performed a biocidogram,

a method previously shown to be valuable for investigation of susceptibility to antimicrobial topical agents of a large population of bacterial strains isolated during an outbreak period in a burn unit (32). We showed that all of the clones of *Achromobacter* and *P. aeruginosa* that succeeded in the DCC presented reduced inhibition zone diameters to Sterispray, the biocide used for daily preservation of the DCUWs. Cross-resistance or tolerance was observed with Aniosurf used for surface cleaning and surgical material rinsing before sterilization. These commercial biocides contained QAC, suggesting a resistance of DCUW bacterial strains to QAC. The gene *qacF* (quaternary ammonium compound resistance gene) has been described in *P. aeruginosa* on a class 1 integron containing gene cassettes for resistance to carbapenem, aminoglycosides, chloramphenicol, and extended-spectrum β -lactams (41). Because the tolerance to QAC observed in this study was not associated with multiresistance to antibiotics, another mechanism of resistance to QAC than *qacF* in class 1 integron is probable.

For some strains, biocidograms showed a tolerance to 3% H_2O_2 and to Oxyfloor, a biocide containing peracetic acid and thus acting as H_2O_2 by ROS liberation. This tolerance appeared mostly for isolates recovered just after the decontamination procedure by H_2O_2 shock. ROS are classically described as cy-

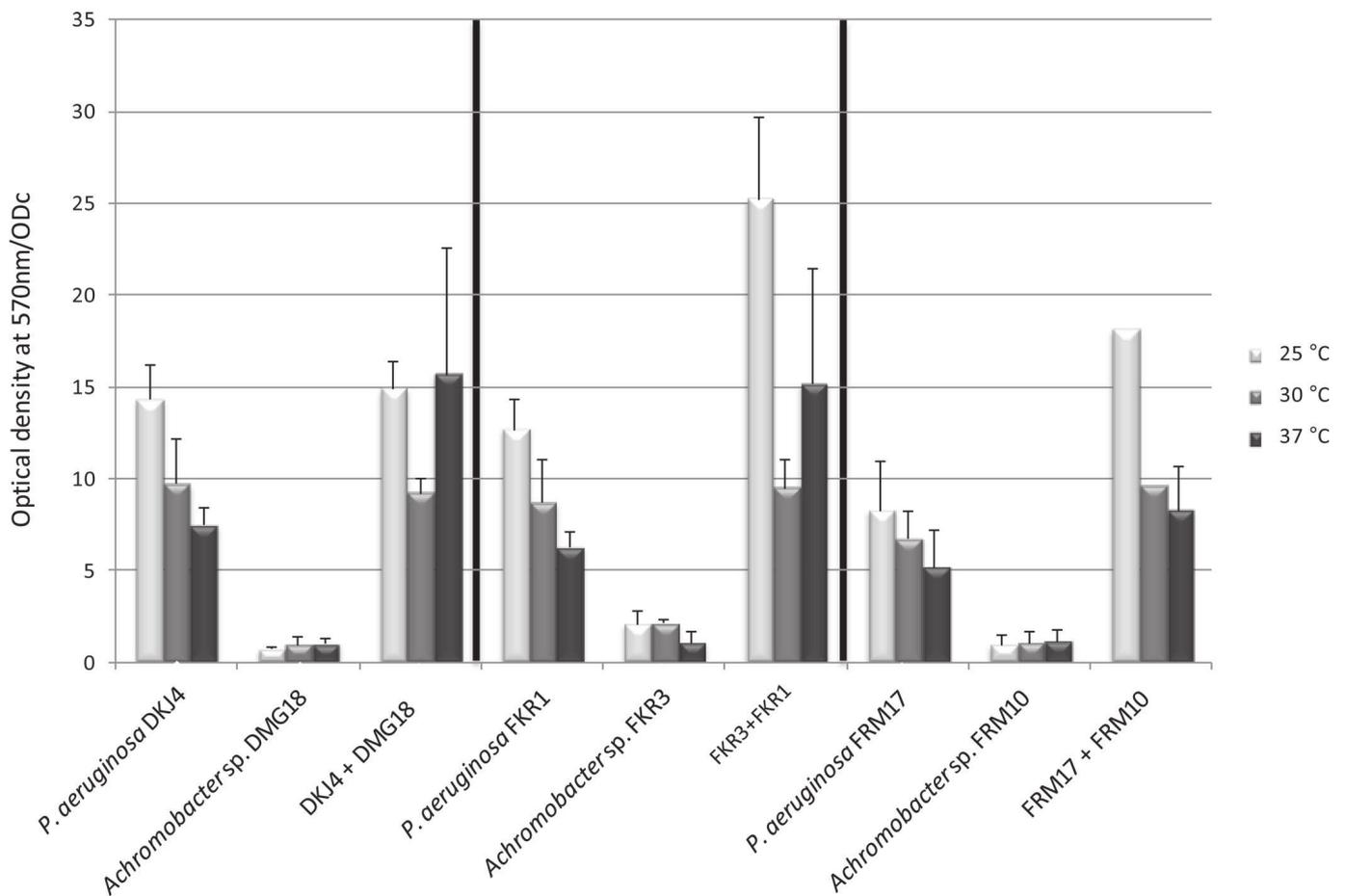


FIG 7 Study of biofilm formation of *P. aeruginosa* and *Achromobacter* sp. strains alone or combined at three temperatures. Error bars represent the standard deviation. ODC, 3 standard deviations above the mean optical density of the negative control.

toxic by nonspecific cell structure oxidization, against which it is unlikely that bacteria would develop resistance (42). However, recent studies showed that *P. aeruginosa* possesses a number of antioxidant defense enzymes under the control of multiple regulatory systems (43). Particularly, *P. aeruginosa* PAO1 adapted to a novel antimicrobial agent (zinc Schiff-base) by prolonged contact showed increased tolerance against hydrogen peroxide (44). Tolerance to H_2O_2 with various expressions related to bacterial adaptation was also described in *A. xylosoxidans* recovered from polluted environments (45).

Altogether, the results from biocidograms were similar for biocides displaying the same mechanism of action (H_2O_2 and Oxy-floer and Sterispray and Aniosurf) and supported a reasonable interpretation explaining the success of the different clones identified in this study. Based on these results, the main hypothesis supporting the occurrence of the successive colonization waves was that Sterispray treatment led to selective dominance of *Achromobacter* sp. over *P. aeruginosa* because *Achromobacter* sp. appeared more tolerant to this biocide than *P. aeruginosa*. After Sterispray use was stopped in April 2013, the decontamination shock in August 2013 reduced the biomasses of both bacteria. Then the population of *P. aeruginosa* succeeded against *Achromobacter* sp. in the absence of Sterispray treatment.

The biocidogram is not a validated assay for determination of biocide effect. However, this study demonstrated that biocide dif-

fusion assays rapidly give valuable results that helped in the investigation of outbreaks or contaminations when a large population of bacterial strains has to be tested, as previously shown for antimicrobial topical agents (32). In contrast with antibiograms, biocidograms should be interpreted by comparison of strain behavior with reference strains or within a population because standardized data linking inhibition zone diameters to susceptibility or resistance are not available.

Biofilm formation is a major mechanism explaining the frequent contamination of technological and medical water-connected devices such as DCUs (1–4). We showed that the *P. aeruginosa* ST309 strain that succeeded in the DCC was considered a high biofilm producer. However, *Achromobacter* sp. that presented low or no biofilm formation capacities also succeeded in DCC colonization during some periods. Finally, the present study that chronologically follows the DCC colonization at the strain and genotype level according to biocide decontamination events suggested that the clonal successes were mainly due to the resistance to biocide treatments rather to the high level of biofilm formation. The main argument is the success of the high-biofilm-forming strain of *P. aeruginosa* ST309 in colonizing the DCC that occurred after the elimination of the low-biofilm-forming *Achromobacter* sp. strain by changes in biocide treatments (5 decontaminations and after the stopping of Sterispray use). As observed in experimental biofilm formation after cocultures, the previous col-

TABLE 2 Results of biocidogram and antibiotyping assays for *Achromobacter* sp. and *P. aeruginosa* DCC isolates^a

Isolate and decontamination procedure	Date (day/mo/yr)	ST/ type	Room of sampling ^b	Antibiotype ^c	Inhibition zone diam (mm) with:							
					Sterispray	3% H ₂ O ₂	Oxyfloor	Aniosurf	Dakin	10% povidone- iodine	Chlorhexidine	Chlorine
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027 (standard for antimicrobial assays)				wt	15	26	28	12.4	20	14.8	21.3	24
<i>A. xylooxidans</i> CECT 927T (standard for antimicrobial assays)				CAF/AzF (R5)	19	13	35	13	29	36	27	30
<i>P. aeruginosa</i> CUZ 1	28/06/12	309	1	wt	8	26	30	8	20	12.4	24.5	20
<i>P. aeruginosa</i> CUZ 2	28/06/12	253	4	wt	8	16.6	18	10.3	22	11.8	20.8	22
<i>P. aeruginosa</i> CXD 3	04/07/12	309	10	wt	11.2	26	30	8	20	15.2	24.2	21
Chlorination in softened water supply + oxidative shock by H ₂ O ₂ in contaminated DCU												
<i>Achromobacter</i> sp. strain CXX1	10/07/12	A	1	CAF (R5)	8	16.9	19.9	8	30	30.2	16	28
<i>Achromobacter</i> sp. strain CYS1	17/07/12	A	1	C (R2)	8	16.9	19.5	8	30.1	34	16.99	30
Chlorination in softened water supply <i>P. aeruginosa</i> DKJ 4												
	22/10/12	309	2	wt	8	16.6	18.8	8	22	13	21.2	21
Chlorination in softened water supply + oxidative shock by H ₂ O ₂ in contaminated DCU												
<i>Achromobacter</i> sp. strain DMG18	07/11/12	B	12	CAF (R5)	8	17.8	20.5	8	29	31	23.5	27
<i>P. aeruginosa</i> DXF 2	11/01/13	252	Level -1	wt	16.6	16.4	16.9	12.1	18	15.2	21.6	22
<i>Achromobacter</i> sp. strain EKZ1	06/03/13	A	1	AzF (R3)	8	38	34	8	29	34	16.6	19
<i>Achromobacter</i> sp. strain EPO3	05/04/13	A	12	CAF (R5)	8	36	34	8	25	32	16.7	25
Chlorination in softened water supply + oxidative shock by H ₂ O ₂ in contaminated DCU												
<i>Achromobacter</i> sp. strain ETC	29/04/13	A	1	AzF (R3)	8	15.4	19.2	8	25.5	31	15.6	18.5
<i>Achromobacter</i> sp. strain FEL6	25/06/13	A	2	AzF (R3)	8	40	34	8	26	32	15.2	29
Sterispray treatment stopped												
<i>Achromobacter</i> sp. strain FKR3	05/07/13	A	1	CAF (R5)	8	40	36	8	25	29	16.6	27
<i>P. aeruginosa</i> FKR 1	05/07/13	309	Level -1	wt	8	26	30.4	8	20	12	24.4	21
Oxidative shock by H ₂ O ₂ in softened water supply												
<i>Achromobacter</i> sp. strain FRM10	09/08/13	A	3	CAF (R3)	8	38	34	8	29	34	17.1	27
<i>P. aeruginosa</i> FRM 11	09/08/13	309	11	wt	11.2	24.6	28.4	8	16	14.5	22.8	20
<i>P. aeruginosa</i> FRM 17	09/08/13	1753	8	wt	15.2	27.6	28.8	12.2	18	17.8	23.9	22
<i>P. aeruginosa</i> FRM 18	09/08/13	1753	Level -1	wt	15.3	26	28	12.3	20	16.6	24.7	23
<i>P. aeruginosa</i> FST 2	03/09/13	309	12	wt	11.2	24	28	9	14	15.2	24.2	21
<i>P. aeruginosa</i> FOU 5	06/09/13	309	3	wt	11.6	26	30	9.2	20	15.6	24.2	20
<i>P. aeruginosa</i> FUU 10	06/09/13	309	10	wt	11.3	26	28	8	14	16.8	23.6	20
<i>P. aeruginosa</i> FWN 2	05/09/13	1753	Level -1	wt	11.6	26	28	12.6	22	13	24.7	22
<i>P. aeruginosa</i> FWU	16/09/13	1753	Level -1	wt	17	15.4	18.7	11.6	20	17	21.9	22
<i>P. aeruginosa</i> FWW 9	06/09/13	309	9	wt	9	26	28	8	18	15.2	24.4	20
<i>P. aeruginosa</i> GDU	10/10/13	309	1	wt	11.2	26	28	9.3	18	16	24.4	20
<i>P. aeruginosa</i> GDC 3	19/11/13	309	2	wt	10.2	26	30	9	14	15.4	24	20

^a The inhibition zone diameter is given in millimeters for each biocide tested (where 8 mm is the hole diameter) on representative isolates selected according to genotype and sampling date and site. The isolates are chronologically presented, and the major decontamination procedures are indicated at the corresponding date. Diameters and antibiotypes in boldface corresponded to particular tolerance or resistance against biocides/antibiotics in the population tested.

^b See Fig. 1 for room denomination.

^c The abbreviations for the antibiotic resistance profile are as follows: wt, wild type (i.e., resistance to cefotaxime only in *P. aeruginosa*); CAF, resistance to cefotaxime, aminoglycosides, and fluoroquinolones; AzF, resistance to aztreonam and fluoroquinolones; C, resistance to cefotaxime; R2, multidrug resistance to 2 classes of antibiotics, R3, multidrug resistance to 3 classes of antibiotics, R5, multidrug resistance to 5 classes of antibiotics.

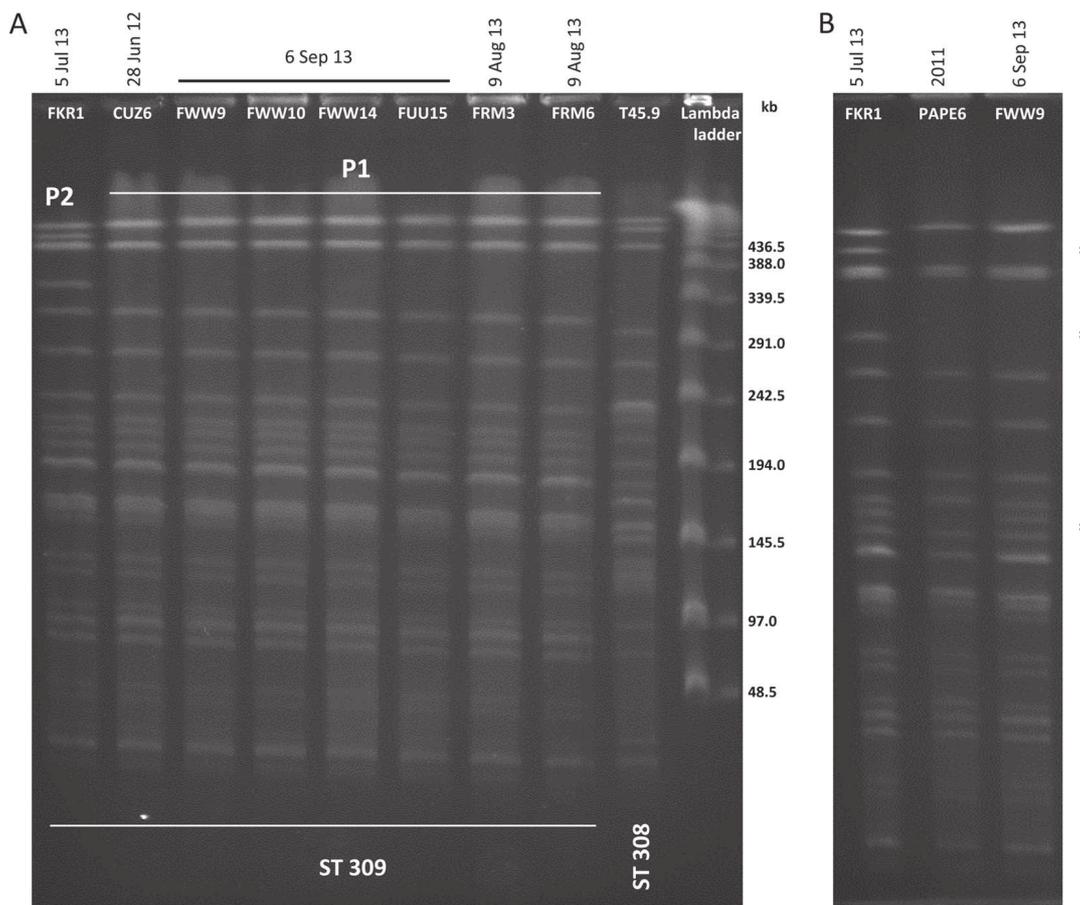


FIG 8 PFGE of SpeI-digested genomic DNA from *P. aeruginosa* isolates. (A) Eight selected *P. aeruginosa* ST309 isolates from DCUWs and the DCC water supply. (B) Comparison of pulsotypes of *P. aeruginosa* ST309 detected in DCC and in the Montpellier city supply. Isolate names, dates of sampling, and profile names are indicated according to the Table 1. The T45.9 lane shows pulsotype of a control isolate (*P. aeruginosa* ST308). Asterisks in panel B represent fragments that differed according to PFGE profile. The Lambda concatemer was used as a molecular size marker.

onization by *Achromobacter* sp. genotype A could lead to *P. aeruginosa* ST309 colonization because of enhanced biofilm formation mainly if the previous *Achromobacter* sp. genotype A biofilm has been deteriorated by biocide treatments.

Depending on the sampling site, the *P. aeruginosa* clone ST309 displayed different but related pulsotypes, suggesting intracolonial genomic rearrangements. Comparative genomics of *P. aeruginosa* presents a picture of a mosaic genome with strain-specific segments that interrupt the core genome (24, 46). As for other bacteria, genome composition and plasticity appear to be related to niche adaptation (24). Some large inversions described by comparative genomics of strains PAO1, PACS2, and PA2192 could probably have been detected by the PFGE genome survey performed herein (11–24). This is also the case for movements of genomic islands of the pKLC102/PAGI-2 family that represent hot spots of inter- and intracolonial genomic diversity in *P. aeruginosa* (46). Because the two ST309 genotypes colonized two different niches, the water in the main pipe before biocide treatment and water in DCUWs, we reasonably assumed that the genomic changes observed by PFGE were related to niche adaptation. Moreover, the genomic sequences of strains BL09 and BL20 that belonged to ST309 suggested that the fragments that underwent rearrangements carried phage sequences and other mobile elements well known to promote such genomic rearrangements.

Genomic variations in related strains were also described by PFGE for members of the genus *Achromobacter* that chronically colonized the respiratory tract of patients with cystic fibrosis (47, 48), a particular niche where different forces and selective pressures are exerted on the respiratory tract microbiota and drive bacterial selection and adaptation. Here, the *Achromobacter* sp. strain FRM10 showing genomic variation was detected during a major change in the DCUW microbial community when the decreasing population of *Achromobacter* was replaced by *P. aeruginosa* ST309, also suggesting that genome modifications might correspond to adaptive processes in the *Achromobacter* sp. population.

The Centers for Disease Control and Prevention and the American Dental Association agreed that the maximum allowable contamination of dental treatment water should not exceed 500 CFU ml⁻¹ (7), an inoculum that roughly corresponds to potable-quality water in European Union countries (ISO/EN 6222). This high threshold is thought to be related to low infectious risk (13), but it appears rather lax considering the microbial dynamics in the DCU niche. From our experience, tolerating 500 CFU ml⁻¹ of water will inevitably lead to uncontrollable waves of bacterial contamination. A high load of pathogenic bacteria as described herein with more than 5.10⁴ CFU 100 ml⁻¹ of *P. aeruginosa*, certainly presented a local risk because dental surgery is becoming more and more invasive (e.g., gingival grafting, dental implant surgery, etc.)

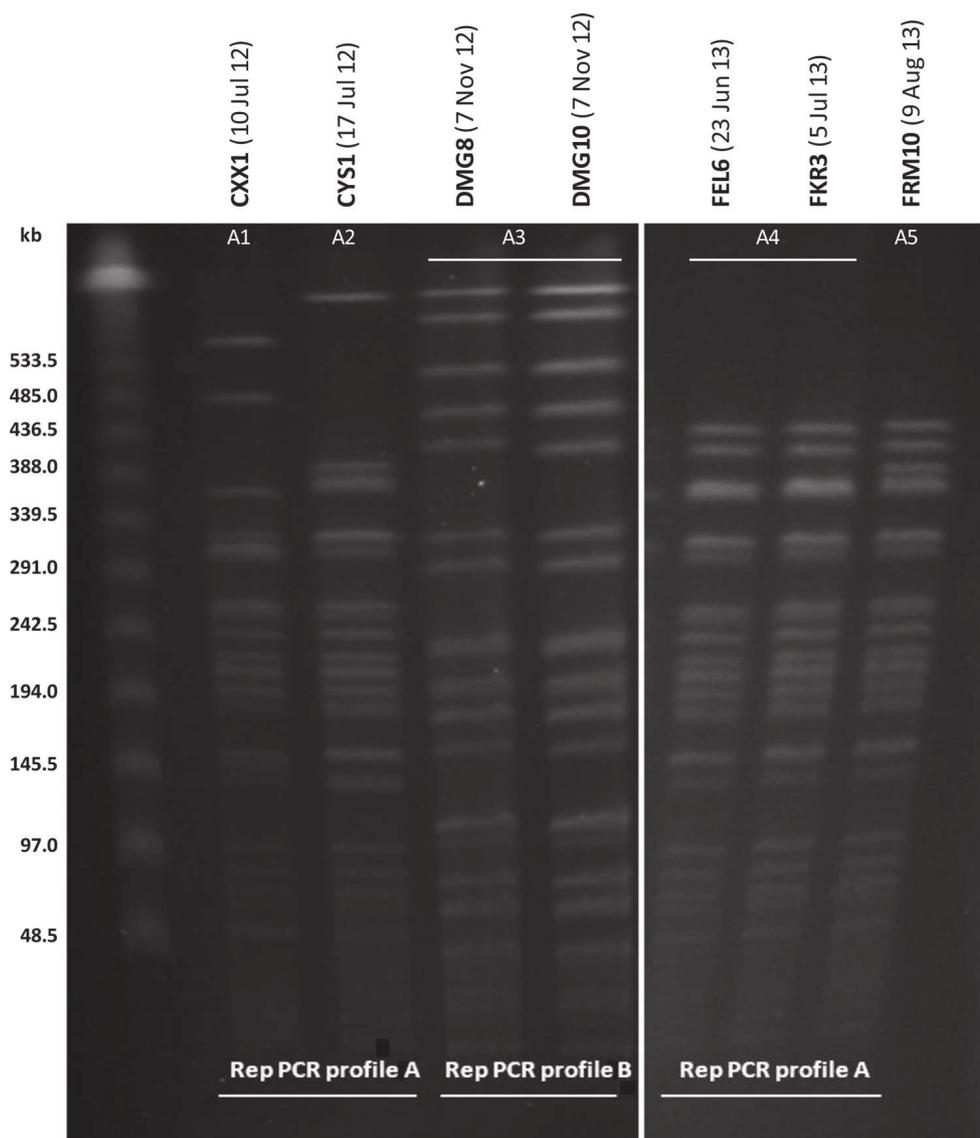


FIG 9 PFGE of SpeI-digested genomic DNA from *Achromobacter* sp. isolates. Isolate names, dates of sampling, and profile names are indicated according to Table 1. The correspondence with multiplex rep-PCR profiles (Fig. 4) is given at the bottom of the gel. The Lambda concatemer was used as a molecular size marker.

and because the aerosolization during dental care can introduce the pathogen both high and deep in the respiratory tract. Moreover, it is conceivable that the frequency of infection could be underestimated for several reasons: (i) most patients in odontology are outpatients without available clinical records, (ii) local infectious complications after dental care or surgery are generally not investigated for microbiology, (iii) the impact of transient colonization of patient's tissues remains even more unknown, (iv) epidemiological links between dental care and sporadic respiratory tract or eye infections are rarely evoked because they have been poorly described in medical literature, and (v) for mycobacterial respiratory tract infections, the clinical manifestations develop months after exposure, rendering the link with dental care impossible to establish. Besides direct pathogenicity, massive bacterial contamination increases the level of endotoxins in the water used for dental care. Endotoxins in DCUWs have been described

to adversely affect healing after gingival surgery (16) and to promote occupational asthma in dentists (17).

The massive and persistent contamination of all DCUs by at least 5.10^4 CFU 100 ml^{-1} of *P. aeruginosa* and the long-term inefficacy of the different control measures led the reorganization of the DCC. Each DCU is now independent from the others, limiting the risk of bacterial diffusion to the whole center from a localized contaminated site and facilitating the control measures in case of contamination. A bottle of sterile pharmaceutical water with 0.03% H_2O_2 is used for the care water supply of each DCU. Since our results suggested adaptive process that led to bacterial H_2O_2 tolerance, it has been proposed to alternate biocides monthly or weekly. After 6 months of new conditions and procedures, less than 1 CFU of mesophilic bacteria per 100 ml of water was detected in 56 samples from all CDD rooms. The contamination of the DCC of Montpellier hospital led to 3 main practical lessons in

DCU management: (i) reduce the water network to its minimal complexity, (ii) perform frequent microbiological assays for early detection of bacterial emergence and to rapidly decipher the history and causes of contaminations, and (iii) alternate biocides. For the latter point, new agents are in development (1, 49, 50), but the role of DCU manufacturers in proposing DCUWs with reduced propensity to biofilm formation should also be required (51). From a more general point of view, we finally consider that the bacterial colonization of DCUWs can be used as a model to investigate the problem of waterborne colonization in health care settings.

ACKNOWLEDGMENTS

We are very grateful to Chantal Gounelle, Sylvie Ivanoff, Christian Rouquette, and Myriam Roura from the Infection Control Lab of the CHRU of Montpellier for excellent technical assistance. We are also indebted to all members of the Direction des Travaux et du Patrimoine of the CHRU of Montpellier, particularly to Jean-Luc Amarger, Sébastien Soler, and Emilie Roseau, for help in gathering technical data.

This work was partly supported by the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, France, the Islamic Bank of Development, and the association ADEREMPHA, Sauzet, France.

REFERENCES

- O'Donnell MJ, Boyle MA, Russell RJ, Coleman DC. 2011. Management of dental unit waterline biofilms in the 21st century. *Future Microbiol* 6:1209–1226. <http://dx.doi.org/10.2217/fmb.11.104>.
- Costerton JW. 2007. The biofilm primer. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Barbeau J, Tanguay R, Faucher E, Avezard C, Trudel L, Côté L, Prévost AP. 1996. Multiparametric analysis of waterline contamination in dental units. *Appl Environ Microbiol* 62:3954–3959.
- Singh R, Stine OC, Smith DL, Spitznagel JK, Jr, Labib ME, Williams HN. 2003. Microbial diversity of biofilms in dental unit water systems. *Appl Environ Microbiol* 69:3412–3420. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.69.6.3412-3420.2003>.
- Trabelsi H, Sellami A, Dendena F, Sellami H, Cheikh-Rouhou F, Makni F, Ben DS, Ayadi A. 2010. Free-living amoebae (FLA): morphological and molecular identification of *Acanthamoeba* in dental unit water. *Parasite* 17:67–70. <http://dx.doi.org/10.1051/parasite/2010171067>.
- Walker JT, Bradshaw DJ, Bennett AM, Fulford MR, Martin MV, Marsh PD. 2000. Microbial biofilm formation and contamination of dental-unit water systems in general dental practice. *Appl Environ Microbiol* 66:3363–3367. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.66.8.3363-3367.2000>.
- Lancellotti M, de Oliveira MP, de Ávila FA. 2007. Research on *Staphylococcus* species in biofilm formation in water pipes and sensibility to antibiotics. *Braz J Oral Sci* 6:1283–1288.
- Petti S, Tarsitani G. 2006. Detection and quantification of dental unit water line contamination by oral streptococci. *Infect Control Hosp Epidemiol* 27:504–509. <http://dx.doi.org/10.1086/504500>.
- Al-Hiyasat S, Ma'ayeh SY, Hindiyyeh MY, Khader YS. 2007. The presence of *Pseudomonas aeruginosa* in the dental unit waterline systems of teaching clinics. *Int J Dent Hyg* 5:36–44. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1601-5037.2007.00221.x>.
- de Oliveira AC, Maluta RP, Stella AE, Rigobelo EC, Marin JM, de Ávila FA. 2008. Isolation of *Pseudomonas aeruginosa* strains from dental office environments and units in Barretos, state of São Paulo, Brazil, and analysis of their susceptibility to antimicrobial drugs. *Braz J Microbiol* 39:579–584. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822008000300032>.
- Atlas RM, Williams JF, Huntington MK. 1995. *Legionella* contamination of dental-unit waters. *Appl Environ Microbiol* 61:1208–1213.
- Veronesi L, Capobianco E, Affanni P, Pizzi S, Vitali P, Tanzi ML. 2007. *Legionella* contamination in the water system of hospital dental settings. *Acta Biomed* 78:117–122.
- Dutil S, Veillette M, Mériaux A, Lazure L, Barbeau J, Duchaine C. 2007. Aerosolization of mycobacteria and legionellae during dental treatment: low exposure despite dental unit contamination. *Environ Microbiol* 9:2836–2843. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01395.x>.
- Schulze-Röbbecke R, Feldmann C, Fischeider R, Janning B, Exner M, Wahl G. 1995. Dental units: an environmental study of sources of potentially pathogenic mycobacteria. *Tuber Lung Dis* 76:318–323. [http://dx.doi.org/10.1016/S0962-8479\(05\)80030-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0962-8479(05)80030-9).
- Pankhurst CL, Coulter WA. 2007. Do contaminated dental unit waterlines pose a risk of infection? *J Dent* 35:712–720. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jdent.2007.06.002>.
- Putnins EE, Di Giovanni D, Bhullar AS. 2001. Dental unit waterline contamination and its possible implications during periodontal surgery. *J Periodontol* 72:393–400. <http://dx.doi.org/10.1902/jop.2001.72.3.393>.
- Singh TS, Mabe OD. 2009. Occupational exposure to endotoxin from contaminated dental unit waterlines. *SADJ* 64:10–14.
- Berlutti F, Testarelli L, Vaia F, De Luca M, Dolci G. 2003. Efficacy of anti-retraction devices in preventing bacterial contamination of dental unit water lines. *J Dent* 31:105–100. [http://dx.doi.org/10.1016/S0300-5712\(03\)00004-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0300-5712(03)00004-6).
- Artini M, Scoarughi GL, Papa R, Dolci G, De Luca M, Orsini G, Pappalardo S, Costerton JW, Selan L. 2008. Specific anti cross-infection measures may help to prevent viral contamination of dental unit waterlines: a pilot study. *Infection* 36:467–471. <http://dx.doi.org/10.1007/s15010-008-7246-5>.
- Kohn WG, Collins AS, Cleveland JL, Harte JA, Eklund KJ, Malvitz DM. 2003. Centers for Disease Control and Prevention. Guidelines for infection control in dental health-care settings—2003. *MMWR* 52:1–61.
- Kramer A, Assadian O, Bachfeld D, Meyer G. 2012. Purge and intensive-purge decontamination of dental units contaminated with biofilm. *GMS Krankenhaushygiene Interdisziplinär* 1:1–4.
- Mena KD, Gerba CP. 2009. Risk assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in water. *Rev Environ Contam Toxicol* 201:71–115. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4419-0032-6_3.
- de Bentzmann S, Plésiat P. 2011. The *Pseudomonas aeruginosa* opportunistic pathogen and human infections. *Environ Microbiol* 13:1655–1665. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02469.x>.
- Mathee K, Narasimhan G, Valdes C, Qiu X, Matewish JM, Koehrsen M, Rokas A, Yandava CN, Engels R, Zeng E, Olavarietta R, Doud M, Smith RS, Montgomery P, White JR, Godfrey PA, Kodira C, Birren B, Galagan JE, Lory S. 2008. Dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* genome evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:3100–3105. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0711982105>.
- Bezuidt OK, Klockgether J, Elsen S, Attree I, Davenport CF, Tümmler B. 2013. Intracloonal genome diversity of *Pseudomonas aeruginosa* clones CHA and TB. *BMC Genomics* 14:416. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-14-416>.
- Li X, Hu Y, Gong J, Zhang L, Wang G. 2013. Comparative genome characterization of *Achromobacter* members reveals potential genetic determinants facilitating the adaptation to a pathogenic lifestyle. *Appl Microbiol Biotechnol* 97:6413–6425. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-013-5018-3>.
- Curran B, Jonas D, Grundmann H, Pitt T, Dowson CG. 2004. Development of a multilocus sequence typing scheme for the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol* 42:5644–5649. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.42.12.5644-5649.2004>.
- Spilker T, Vandamme P, Lipuma JJ. 2013. Identification and distribution of *Achromobacter* species in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 12:298–301. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcf.2012.10.002>.
- Corne P, Godreuil S, Jean-Pierre H, Jonquet O, Campos J, Jumas-Bilak E, Parer S, Marchandin H. 2005. Unusual implication of biopsy forceps in outbreaks of *Pseudomonas aeruginosa* infections and pseudoinfections related to bronchoscopy. *J Hosp Infect* 61:20–26.
- Mercier E, Jumas-Bilak E, Allardet-Servent A, O'Callaghan D, Ramuz M. 1996. Polymorphism in *Brucella* strains detected by studying distribution of two short repetitive DNA elements. *J Clin Microbiol* 34:1299–1302.
- Koeth T, Versalovic J, Lupski JR. 1995. Differential subsequence conservation of interspersed repetitive *Streptococcus pneumoniae* BOX elements in diverse bacteria. *Genome Res* 5:408–418.
- Aujoulat F, Lebreton F, Romano S, Delage M, Marchandin H, Brabet M, Bricard F, Godreuil S, Parer S, Jumas-Bilak E. 2011. Comparative diffusion assay to assess efficacy of topical antimicrobial agents against *Pseudomonas aeruginosa* in burns care. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 10:27. <http://dx.doi.org/10.1186/1476-0711-10-27>.
- O'Toole GA, Kolter R. 1998. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol* 30:295–304.
- Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, Savic B, Svabic-Vlahovic M. 2000. A

- modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Methods* 40:175–179.
35. Lopes SP, Howard C, Nuno FA, Pereira MA. 2012. Antibiotic resistance of mixed biofilms in cystic fibrosis: impact of emerging microorganisms on treatment of infection. *Int J Antimicrob Agents* 40:260–263. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.04.020>.
 36. Deredjian A, Colillon C, Brothier E, Favre-Bonté S, Cournoyer B, Nazaret S. 2011. Antibiotic and metal resistance among hospital and outdoor strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Res Microbiol* 162:689–700. <http://dx.doi.org/10.1016/j.resmic.2011.06.007>.
 37. Slekovec C, Plantin J, Cholley P, Thouverez M, Talon D, Bertrand X, Hocquet D. 2012. Tracking down antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates in a wastewater network. *PLoS One* 7:e49300. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0049300>.
 38. Tena D, Carranza R, Barberá JR, Valdezate S, Garrancho JM, Arranz M, Sáez-Nieto JA. 2005. Outbreak of long-term intravascular catheter-related bacteremia due to *Achromobacter xylosoxidans* subspecies *xylosoxidans* in a hemodialysis unit. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 24:727–732.
 39. Molina-Cabrillana J, Santana-Reyes C, González-García A, Bordes-Benítez A, Horcajada I. 2007. Outbreak of *Achromobacter xylosoxidans* pseudobacteremia in a neonatal care unit related to contaminated chlorhexidine solution. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 26:435–437.
 40. Kilvington S, Shovlin J, Nikolic M. 2013. Identification and susceptibility to multipurpose disinfectant solutions of bacteria isolated from contact lens storage cases of patients with corneal infiltrative events. *Cont Lens Anterior Eye* 36:294–298.
 41. Jeong JH, Shin KS, Lee JW, Park EJ, Son SY. 2009. Analysis of a novel class 1 integron containing metallo-beta-lactamase gene VIM-2 in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Microbiol* 47:753–759. <http://dx.doi.org/10.1007/s12275-008-0272-2>.
 42. Ikai H, Odashima Y, Kanno T, Nakamura K, Shirato M, Sasaki K, Niwano Y. 2013. In vitro evaluation of the risk of inducing bacterial resistance to disinfection treatment with photolysis of hydrogen peroxide. *PLoS One* 8:e81316. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0081316>.
 43. Gupta K, Marques CN, Petrova OE, Sauer K. 2013. Antimicrobial tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms is activated during an early developmental stage and requires the two-component hybrid SagS. *J Bacteriol* 195:4975–4987. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.00732-13>.
 44. Cierniak P, Jübner M, Müller S, Bender K. 2013. Insights into mechanisms and proteomic characterisation of *Pseudomonas aeruginosa* adaptation to a novel antimicrobial substance. *PLoS One* 8:e66862. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0066862>.
 45. Bucková M, Godocíková J, Zámocký M, Polek B. 2010. Screening of bacterial isolates from polluted soils exhibiting catalase and peroxidase activity and diversity of their responses to oxidative stress. *Curr Microbiol* 61:241–247. <http://dx.doi.org/10.1007/s00284-010-9601-x>.
 46. Klockgether J, Cramer N, Wiehlmann L, Davenport CF, Tümmler B. 2011. *Pseudomonas aeruginosa* genomic structure and diversity. *Front Microbiol* 2:150. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2011.00150>.
 47. Amoureux L, Bador J, Siebor E, Taillefumier N, Fanton A, Neuwirth C. 2013. Epidemiology and resistance of *Achromobacter xylosoxidans* from cystic fibrosis patients in Dijon, Burgundy: first French data. *J Cyst Fibros* 12:170–176. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcf.2012.08.005>.
 48. Dupont C, Michon AL, Jumas-Bilak E, Norskov-Lauritsen N, Chiron R, Marchandin H. 2015. Inpatient diversity of *Achromobacter* spp. involved in chronic colonization of cystic fibrosis airways. *Infect Genet Evol* 32:214–223. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2015.03.012>.
 49. Puttaiah R, Svoboda KK, Lin SM, Montebugnoli L, Dolci G, Spratt D, Siebert J. 2012. Evaluation of an automated dental unit water system's contamination control protocol. *J Contemp Dent Pract* 13:1–10.
 50. Bansal R, Puttaiah R, Harris R, Reddy A. 2011. Evaluation of two methods in controlling dental treatment water contamination. *J Contemp Dent Pract* 12:73–83.
 51. Coleman DC, O'Donnell MJ, Shore AC, Swan J, Russell RJ. 2007. The role of manufacturers in reducing biofilms in dental chair waterlines. *J Dent* 35:701–711.

III Conclusion

Lors de cette étude, nous avons mis en évidence une très forte contamination bactérienne des fauteuils dentaires par *P. aeruginosa* et *Achromobacter* sp. génogroupe 20, ayant conduit à la fermeture CSD. Les deux clones d'*Achromobacter* sp. (CYS1 et DMG18) correspondent probablement à une nouvelle espèce du genre *Achromobacter* qui fera l'objet d'une description taxonomique. Des études dans d'autres CSD ont également décrit la colonisation de fauteuils par des pathogènes appartenant aux genres *Pseudomonas*, *Legionella*, *Mycobacterium*, *Propionibacterium* et *Stenotrophomonas* (Costa et al. 2015). De fortes concentrations de coliformes et de champignons ont également été rapportées dans un réseau de CSD (Lisboa et al. 2014). Dans ce cadre, de nombreux auteurs suggèrent que ces contaminations de réseau peuvent conduire à des infections, particulièrement chez les patients immunodéprimés. Par exemple, deux cas d'abcès dentaires à *P. aeruginosa* ont été identifiés après exposition à de l'eau contaminée d'un CSD (Martin 1987) et plus récemment, le décès d'une personne de 81 ans est survenu à la suite d'une légionellose contractée lors de soins dentaires (Ricci et al. 2012). L'étude MLST et le typage moléculaire par amplified fragment length polymorphism (AFLP) ont montré que les souches environnementales et cliniques appartenaient au même clone. Au cours de notre étude, nous n'avons pas pu recueillir de données cliniques concernant les potentielles infections ou colonisations de patients ou de chirurgiens dentistes, en lien avec la contamination du réseau du CSD, le risque infectieux associé à la contamination du CSD n'a donc pas pu être évalué.

Nous avons décrit la persistance sur plusieurs années de clones d'*Achromobacter* et de *P. aeruginosa* dans cette niche technologique. Nous avons observé une importante diversité génomique et phénotypique entre les souches clonales au cours du temps ainsi qu'une dynamique de succès clonaux en relation avec les épisodes de décontamination. Nos résultats suggèrent une capacité d'adaptation de ces bactéries face aux différentes pressions environnementales exercées, notamment aux différents biocides utilisés. Une étude environnementale portant sur le genre *Achromobacter* a montré que les bactéries de ce genre peuvent persister dans certains sites pendant de longues périodes (au moins 8 mois), probablement grâce à la formation de biofilm (Amoureux et al. 2013b). En effet, la complexité du réseau d'eau d'alimentation comportant des adoucisseurs et des osmoseurs, ainsi que le faible diamètre des tubulures des fauteuils dentaires favorisent la formation de biofilm (Nikaeen et al. 2009). Dans une étude récente, des bactéries du genre *Achromobacter* placées directement dans un produit biocide fréquemment utilisé en milieu hospitalier français (Surfanios® à 0,25%) a montré qu'au bout de 10 min et 4 h, respectivement 100% et 25% des bactéries en biofilm survivaient. Après seulement 5 minutes de contact, toutes les bactéries planctoniques avaient été tuées (Hugon et al. 2015). Un centre dentaire ayant mis en place un traitement continu du réseau à base de désinfectant a noté que celui-ci ne prévenait pas la contamination par *Legionella* et que les zones traitées continuellement étaient plus contaminées que les zones non traitées ou traitées sporadiquement (Leoni et al. 2015). Ces résultats suggèrent une adaptation des bactéries soumises continuellement aux agents biocides. L'adoption de mesures comprenant l'utilisation d'eau

déminéralisée dans le réseau d'eau et l'application d'un protocole combiné de désinfection en continu et périodique, utilisant différents produits actifs, a permis de contrôler la contamination. Néanmoins, les auteurs ont noté que l'efficacité des mesures adoptées était principalement liée au strict respect des protocoles, en mettant particulièrement l'accent sur la formation du personnel et la surveillance continue de l'environnement (Leoni et al. 2015).

Lors de notre étude, les épisodes de décontamination successifs, utilisant différents biocides, n'ont pas permis d'enrayer la contamination bactérienne qui a augmenté jusqu'à atteindre une apogée nécessitant la fermeture du CSD et la mise en place d'un circuit d'eau stérile indépendant pour chaque fauteuil. Depuis cette réorganisation en septembre 2013, aucune contamination n'a été observée jusqu'à aujourd'hui. Récemment, des auteurs ayant testé différentes méthodes de décontamination sont arrivés aux mêmes conclusions, le CSD a été réorganisé comme lors de notre étude et les auteurs ont noté que l'utilisation d'eau stérile était un point clé pour éviter la recontamination (Lizon et al. 2016). Un autre centre ayant mis en place un traitement continu du réseau à base de désinfectant a noté que celui-ci ne prévenait pas la contamination par *Legionella* et que les zones traitées continuellement étaient plus contaminées que les zones non traitées ou traitées sporadiquement (Leoni et al. 2015). Ces résultats suggèrent une adaptation des bactéries soumises continuellement à ce biocide. L'adoption de mesures comprenant l'utilisation d'eau déminéralisée dans le réseau d'eau et l'application d'un protocole combiné de désinfection en continu et périodique, utilisant différents produits actifs, a permis de contrôler la contamination. Néanmoins, les auteurs ont noté que l'efficacité des mesures adoptées était principalement liée au strict respect des protocoles, en mettant particulièrement l'accent sur la formation du personnel et la surveillance continue de l'environnement (Leoni et al. 2015).

La contamination des réseaux des CSDs représente donc un potentiel réservoir de contamination par des bactéries impliquées dans les infections des patients CF. Comme lors de la colonisation pulmonaire des patients CF, cette contamination est difficile voire impossible à maîtriser et à éradiquer une fois que celle-ci est initiée. Au cours de l'étude de cette persistance environnementale des bactéries du genre *Achromobacter*, nous avons observé une importante diversité comme lors de nos études sur la colonisation chronique des VRCF, suggérant des mécanismes similaires d'évolution adaptative.

DISCUSSION GENERALE

Les changements physiologiques cellulaires au cours de mucoviscidose jouent un rôle dans la susceptibilité intrinsèque des patients à la colonisation et à la persistance bactérienne. Dans le cadre de cette pathologie, nous avons étudié la colonisation et la persistance de pathogènes émergents, dans l'environnement et dans les VRCF. Lors de nos différents travaux, nous avons obtenu des résultats majeurs, concordants entre les différentes études, que celles-ci aient inclus des souches cliniques ou environnementales. En effet, nous avons mis en évidence une diversité d'espèces et de génotypes au sein d'espèces, ainsi qu'une importante diversité intra-clonale ; cette diversité était associée à une dynamique des espèces et des génotypes dans le temps, reflet de l'adaptation des bactéries aux pressions environnementale des différents habitats étudiés.

Diversité

Espèces et nouvelles espèces

L'identification par méthode moléculaire des pathogènes opportunistes des genres *Achromobacter* et *Pandora* est indispensable afin de connaître précisément l'espèce étudiée. *A. xylosoxidans* a toujours été considéré comme l'espèce majoritairement isolée des échantillons cliniques humains mais les méthodes d'identification utilisées n'étaient pas toujours performantes, laissant planer un doute sur l'espèce réellement étudiée. En accord avec des études récentes basées sur le MLST (Amoureux et al. 2013a; Spilker et al. 2013), nous avons observé qu'*A. xylosoxidans* était l'espèce majoritairement isolée dans le contexte de la mucoviscidose. Toutefois, lors de nos deux études, épidémiologique dans les VRCF et écologique aux domiciles des patients, utilisant le MLST ou le séquençage du gène *nrdA*, 20% et 81% des souches identifiées respectivement n'appartenaient pas à *A. xylosoxidans* voire étaient inconnues. Ce résultat appuie l'importance du recours à des méthodes de biologie moléculaire adaptées pour une identification fiable des espèces d'*Achromobacter*.

De manière intéressante, les espèces *A. mucicolens* et *A. animicus* isolées aux domiciles de patients n'avaient jamais été décrites dans l'environnement. Les espèces *A. aegrifaciens* et *A. mucicolens* étaient communes aux deux études, clinique et environnementale, et une espèce non décrite isolée d'un siphon semblait identique à celle identifiée chez un patient. Enfin, une autre espèce non décrite a été identifiée dans le réseau d'eau du CSD. L'isolement de ces espèces inconnues confirme la grande diversité d'espèces dans le genre *Achromobacter*. Ces espèces feront l'objet de descriptions taxonomiques.

Diversité et succès infectieux

Lors de notre investigation au domicile des patients, nous n'avons pas isolé le génotype colonisant les VRCF du patient dans son environnement proche. En revanche, nous avons identifié le ST175 d'*A. xylosoxidans* au domicile d'un patient CF, ST qui a également été identifié dans les VRCF d'un patient lors de l'étude épidémiologique. Ce ST175 a été décrit pour des souches cliniques de patients CF et non CF en Angleterre et une étude récente a montré que deux souches de ST175 colonisant deux patients CF et une souche d'un siphon d'un service d'hématologie dans lequel aucun de ces deux

patients n'avait séjourné présentait des pulsotypes reliés (Amoureux et al. 2016a). Ce génotype semble donc transmissible à l'homme à partir d'un réservoir environnemental. Toutefois, les méthodes de typage ne garantissent pas que deux souches de génotypes identiques soient épidémiologiquement reliées. C'est en particulier le cas si les souches appartiennent à des génotypes dominants. Ainsi, nous avons observé qu'une souche environnementale d'*A. mucicolens* isolée d'un siphon présentait un génotype *nrdA* identique à celui d'un isolat de patient CF sans lien avec la source environnementale. L'étude par ECP des paires de souches environnementales et cliniques présentant des séquences du gène *nrdA* identiques reste à faire et permettra certainement une meilleure compréhension des voies de circulation et de transmission des souches environnementales. Ainsi, une investigation environnementale des bactéries du genre *Achromobacter* a déjà rapporté l'isolement de souches de pulsotypes identiques dans les VRCF d'un patient CF et dans l'eau du domicile d'un volontaire sain, suggérant une contamination à partir du réseau d'eau urbain général (Amoureux et al. 2013b). Lors de notre investigation, 80% des échantillons positifs à *Achromobacter* provenaient des zones humides et les souches d'*A. xylosoxidans* ont toutes été identifiées dans des zones humides alimentées par l'eau de consommation du réseau, suggérant un réservoir « hydrique technologique » pour les bactéries de ce genre.

D'une manière générale, les souches environnementales d'*Achromobacter* sont trop peu étudiées. Seules 25 souches environnementales d'*Achromobacter* ont été déposées dans la base de données PubMLST et, parmi ces souches, 3 appartiennent à des génotypes d'*A. insolitus*, *A. piechaudii* et *A. spanius* pour lesquels des souches clinique d'origine non CF ont été identifiées; les autres appartiennent à des génotypes non identifiés pour des souches cliniques.

Au sein d'une espèce, il pourrait donc y avoir des génotypes plus polyvalents que d'autres, capables de survivre dans des environnements divers incluant l'eau du réseau et l'environnement pulmonaire des patients (Aujoulat et al. 2012). Par exemple, l'étude d'infections humaines à *Mycobacterium marinum* acquises à partir d'environnements hydriques a montré que seuls certains génotypes étaient isolés chez l'homme suggérant des capacités de colonisation humaine différentes selon les génotypes d'une même espèce (Broutin et al. 2012).

A côté de la transmission à partir d'un réservoir environnemental, la transmission croisée entre les patients est un autre moyen de diffusion connu des agents pathogènes associés à la mucoviscidose (Kidd et al. 2012). Dans notre étude, nous avons observé le partage de STs d'*A. xylosoxidans* entre deux paires de patients, dont un ST majoritaire (ST27), décrit pour des souches d'origine clinique isolées de patients CF et non CF, aux Etats-Unis, en Thaïlande, en Espagne, en Belgique et en France. Il serait intéressant de savoir si ce génotype est largement répandu dans l'environnement, présentant ainsi une plus forte probabilité d'exposition des patients et/ou s'il présente une meilleure capacité de colonisation. L'étude par ECP des souches des deux patients colonisés chroniquement par ce ST a montré qu'elles n'appartenaient pas au même clone. Ceci rejoint une étude récente qui a montré que dans la majorité des cas de partage de ST entre patients, les profils d'ECP sont différents (Amoureux et al. 2016a). L'étude par ECP des souches de 9 patients colonisés chroniquement par *A. xylosoxidans* dans un centre CF a montré que 5 de ces patients partageaient le même clone

(Kanellopoulou et al. 2004b). Concernant notre étude, bien qu'il reste un doute sur une transmission croisée entre deux patients, nos résultats suggèrent une acquisition environnementale unique d'*Achromobacter* pour chaque patient alors que la transmission croisée entre patients du CRCM est faible ou inexistante.

Lors de notre investigation, nous avons observé une diversité d'espèces d'*Achromobacter* colonisant l'environnement domestique des patients, tandis que *A. xylosoxidans* présentait la plus forte prévalence de colonisation et de persistance dans les VRCF, suggérant une meilleure capacité de cette espèce à coloniser l'homme et à persister. La forte prévalence de cette espèce a également été rapportée dans d'autres centres CF ainsi que, de manière plus générale, chez les patients non CF (Amoureux et al. 2016a, 2016b; Ridderberg et al. 2012b; Spilker et al. 2013). D'autre part, lors du suivi des patients, nous avons observé que les colonisations par les espèces *A. mucicolens*, *A. aegrifaciens* et une espèce non décrite avaient été éradiquées, que la colonisation par *A. insuavis* était restée sporadique tandis que deux colonisations par *A. xylosoxidans* avaient évolué vers la chronicité. Seules les espèces *A. insuavis* et *A. xylosoxidans* étaient responsables de colonisation chronique dans un autre centre CF français (Amoureux et al. 2016a). Certaines espèces semblent présenter un tropisme pulmonaire plus important que d'autres et la comparaison des séquences de génomes disponibles de souches environnementales et cliniques d'*A. xylosoxidans* avec les génomes de souches environnementales d'espèces moins prévalentes permettrait d'identifier des gènes potentiellement impliqués dans la colonisation humaine.

Pour *P. aeruginosa*, des clones épidémiques (Aaron et al. 2010; Cheng et al. 1996; Duong et al. 2015; Parkins et al. 2010; Yang et al. 2011c) hautement transmissibles entre patients CF sont capables de coloniser les patients et de remplacer des isolats de *P. aeruginosa* initialement présents dans les VRCF (Duong et al. 2015). L'étude récente de 5 cas de remplacement de souches initiales par un clone PES a montré que ces clones "super-infectants" semblaient moins virulents que les isolats remplacés mais qu'ils étaient plus résistants aux antibiotiques, particulièrement à la tobramycine et à la ciprofloxacine (Duong et al. 2015).

Le suivi d'un patient de notre centre colonisé sporadiquement en 2014 par une souche d'*A. xylosoxidans* ST290 a montré que la colonisation de ce patient avait évolué vers la chronicité tandis que la colonisation sporadique de deux patients par d'autres STs d'*A. xylosoxidans* avait été éradiquée. Ce ST290, qui a aussi été identifié dans les VRCF d'un patient colonisé chroniquement du centre CF de Dijon, pourrait posséder une meilleure adaptation aux VRCF (Amoureux et al. 2016a). Des études ayant comparé des souches persistantes et éradiquées de *P. aeruginosa* après primocolonisation n'ont pas mis en évidence de caractéristique clé permettant de prédire l'évolution vers la colonisation chronique (McPherson et al. 2010; Tramper-Stranders et al. 2012). Néanmoins, les souches persistantes avaient tendance à être moins cytotoxiques, moins hypermutables, moins motiles, plus mucoïdes, plus résistantes à la tobramycine et à présenter QS moins efficace que les isolats éradiqués (Tramper-Stranders et al. 2012; Vidya et al. 2016). La résistance à la tobramycine a également été identifiée pour des clones épidémiques, suggérant que certaines caractéristiques sont importantes pour la colonisation initiale et pour la persistance (Duong et al. 2015; Vidya et al. 2016).

Les auteurs ont conclu que l'acquisition initiale d'un clone de *P. aeruginosa* présentant des caractéristiques de clones adaptés était associée à l'échec du traitement d'éradication initial (Vidya et al. 2016). Au final, l'adaptabilité rapide au moment de la colonisation initiale est peut-être un point clé de la persistance.

Le succès des pathogènes opportunistes est souvent relié à leur polyvalence plutôt qu'à l'hyperspécialisation comme c'est le cas pour les pathogènes stricts (Georgiades and Raoult 2010). Nous avons observé une forte diversité sous-tendant une probable polyvalence de certaines espèces et de certains génotypes au sein du genre *Achromobacter* dans le contexte de la mucoviscidose. Toutefois, l'existence de clones à fort potentiel de succès infectieux ne peut pas être exclue car nos observations et celles disponibles dans la littérature restent trop ponctuelles pour en tirer des conclusions générales.

Diversification intraclonale et adaptation

La diversification d'une population est une caractéristique complexe, qui n'est pas mesurable quand on étudie les propriétés biologiques d'une seule colonie bactérienne isolée à un temps T; elle peut uniquement être observée en comparant des individus multiples ou en suivant des individus durant une très longue période de temps (Ackermann 2015). Au cours de nos différents travaux, nous avons réalisé ces deux types d'étude afin d'appréhender la diversité génomique et phénotypique au sein d'un échantillon mais aussi de manière longitudinale au cours du temps.

Lors de nos études de la persistance, qu'elle soit environnementale ou clinique, nous avons observé qu'un seul clone d'*Achromobacter* ou de *Pandoraea* colonisait l'habitat durant la période étudiée, rejoignant des résultats d'études de colonisation chronique des VRCF par *Achromobacter* (Amoureux et al. 2013a; Barrado et al. 2013; Ridderberg et al. 2011). De plus, que ce soit lors de la colonisation des VRCF ou du réseau d'eau du centre de soins dentaires, nous avons observé d'importantes variations génomiques et phénotypiques au sein de populations clonales au cours du temps, suggérant une évolution adaptative. Une étude récente de la colonisation chronique d'un patient par *S. maltophilia* a également observé une importante diversité intra-clonale au cours du temps (Pompilio et al. 2016). Lors de cette étude, la persistance à long terme de deux génotypes distincts a été observée.

Nous avons aussi observé ces variations entre différents morphotypes coloniaux d'un même échantillon, suggérant une diversification avec co-sélection permanente de plusieurs variants. La diversité de profils génomiques au sein d'un échantillon était parfois plus importante que lors de l'étude longitudinale conduite sur plusieurs années. Cette importante diversité génomique au sein d'un même échantillon a également été mise en évidence dans des populations clonales de *P. aeruginosa* et de *B. dolosa* colonisant chroniquement les VRCF (Caballero et al. 2015; Chung et al. 2012; Lieberman et al. 2014; Nguyen and Singh 2006). Nous avons également mis en évidence une grande diversité de profils de résistance, influençant les résultats de l'antibiogramme notamment pour des antibiotiques utilisés en première ligne dans le traitement des infections à *Achromobacter* spp. Ces

résultats suggèrent que la diversité phénotypique est sous-évaluée au laboratoire d'analyses médicales et que l'importante diversité des antibiotypes pourrait contribuer aux échecs d'éradication et à la persistance pulmonaire des bactéries de ce genre malgré une prise en charge thérapeutique paraissant adaptée.

De plus, en épidémiologie des infections, les études de transmission croisée gagneraient en précision par échantillonnage de la population d'une espèce au sein de l'hôte.

Les résultats de notre étude rejoignent ceux des études qui ont observé une importante diversité de profils de résistance au sein de populations de *P. aeruginosa* dans les VRCF (Foweraker et al. 2005, 2009; Workentine et al. 2013). De plus, des différences de production de biofilm et de molécules de QS, de motilité et d'auxotrophie ont été observées au sein de ces populations clonales provenant d'une même expectoration (Clark et al. 2015; Darch et al. 2015; Qin 2016; Winstanley et al. 2016). Nous n'avons pas mis en évidence de corrélation entre le profil génomique et la résistance aux antibiotiques. Il serait intéressant d'étudier la diversité à l'échelle des mutations génétiques ainsi que d'autres caractéristiques phénotypiques citées ci-dessus dans ces populations d'*Achromobacter* afin de mettre en évidence de potentiels gènes subissant des modifications pathoadaptatives et de mieux connaître les phénotypes d'adaptation aux VRCF des bactéries de ce genre.

Un écotype peut augmenter son fitness en s'adaptant aux contraintes environnementales et en modifiant son microenvironnement. Ce phénomène est connu sous le terme de construction de niche (Scott-Phillips et al. 2014). Cette construction est basée sur deux phénomènes subordonnés: causer un changement environnemental et mieux répondre à ce changement que les microorganismes en compétition (Callahan et al. 2014). De manière alternative, un écotype peut retarder la croissance des concurrents; par exemple, en sécrétant un antibiotique tout en exprimant un gène de résistance à celui-ci. Dans de nombreuses situations, une niche, non partagée entre individus, peut être considérée comme un "organisme phénotypique" unique dans son évolution et ses effets écologiques. Il est donc évident que la construction de niche participe à l'adaptation, l'évolution et la diversité microbienne (Odling-Smee et al. 2003, 1996). Lors de notre travail, pour approcher les niches pulmonaires, nous avons étudié des expectorations de patients, ce qui n'est qu'un reflet partiel du milieu intra-pulmonaire. Toutefois, l'importante diversité génomique et phénotypique observée dans les populations clonales étudiées suggère que celle-ci serait un mécanisme inhérent à l'adaptation à l'habitat et qu'elle représenterait la clé de la persistance. La plasticité évolutive des génomes bactériens, couplée à la multitude d'espèces bactériennes sur la planète, limite considérablement notre capacité à contrôler les maladies (Darmon and Leach 2014). Des auteurs évoquent alors que la génomique pourrait être utilisée afin de prédire la progression clinique de l'infection bactérienne vers la chronicité et de proposer la meilleure option de traitement (Didelot et al. 2016). Par séquençage total de génome, il serait ainsi possible de détecter de récents événements d'émergence et d'adaptation bactérienne, de caractériser l'expression des gènes et d'élucider les relations entre le génotype et le phénotype (Didelot et al. 2016).

Dynamique au cours de la persistance & hypothèse d'assurance

Lors de nos études de la persistance d'*Achromobacter* dans le réseau d'eau du centre de soins dentaires et de *P. pulmonicola* dans les VRCF, nous avons mis en évidence des variations dans le temps des espèces majoritaires présentes, particulièrement entre les pathogènes émergents étudiés et *P. aeruginosa*. En effet, lors de notre étude au CSD, nous avons observé la coexistence d'*Achromobacter* et *P. aeruginosa*, avec des vagues de succès clonaux reliées aux pressions environnementales. De plus, lors de nos études de persistance cliniques et environnementales, nous avons observé une dynamique de colonisation par des génotypes et/ou phénotypes différents mais proches appartenant à un clone diversifié. Ces variations sont certainement liées aux fluctuations temporelles de pressions de sélection au sein de l'habitat étudié. Nous avons montré qu'après décontamination du réseau d'eau par H₂O₂, les isolats d'*Achromobacter* étaient très résistants à cette molécule tandis qu'à distance de cet épisode, les isolats dominant retrouvaient un phénotype plus sensible. La décontamination a sûrement sélectionné les souches résistantes dans la population clonale, puis les souches sensibles ont pris le dessus par la suite certainement du fait d'un meilleur fitness en l'absence de biocide. Finalement, lors de cette investigation longitudinale sur 2 ans, l'étude de plusieurs colonies de chaque espèce par échantillon d'eau nous aurait permis d'appréhender au temps T la diversité et les équilibres de génotypes/phénotypes dans les populations d'*Achromobacter* et de *P. aeruginosa* impliquées.

La persistance est certainement le fruit d'une dynamique de colonisation associée à l'existence de populations diversifiées permettant, selon l'hypothèse d'assurance, à une faible fraction de la population de résister, quelles que soient les pressions exercées incluant les procédures utilisées pour éradiquer la contamination (Foweraker et al. 2005; Yachi and Loreau 1999). Nous pouvons supposer que l'hétérogénéité phénotypique est un phénomène très fréquent dans les populations bactériennes (Grote et al. 2015). Néanmoins, les bénéfices apportés par cette diversité ne sont certainement pas tous connus ou compris. Au delà de l'hypothèse d'assurance permettant la survie de populations clonales évoluant dans des environnements changeants de façon imprévisible, la diversité confère certainement d'autres avantages (Dhar and McKinney 2007; de Jong et al. 2011; Smits et al. 2006). Ainsi, le "partage des tâches" entre des individus phénotypiquement hétérogènes dans une population clonale pourrait participer à la persistance de la population de manière altruiste (Ackermann 2015). Ainsi, en conditions oligotrophes, *Bacillus subtilis* sécrète une protéase qui dégrade les protéines extracellulaires et apporte une source nutritive. Seule une minorité de cellules de la population exprime fortement les gènes codant pour cette protéase potentiellement coûteuse à produire mais cette minorité offre un avantage à tous les individus, permettant une survie globale de la population clonale (Veening et al. 2008). Les cellules assurant ce processus coûteux peuvent ne pas croître efficacement mais être continuellement générées par diversification phénotypique (Ackermann 2015). La spécialisation de bactéries dans différentes voies métaboliques peut être avantageuse pour une population, en réduisant la compétition ou en améliorant les interactions métaboliques entre les individus, mais cette même spécialisation peut également permettre la persistance de certains génotypes d'une population clonale face aux fluctuations en nutriments de l'environnementales (Acar

et al. 2008; Kussell et al. 2005). Une étude récente a montré que l'hétérogénéité d'expression de gènes de virulence dans une population de *Salmonella* sérotype Typhimurium permettait le partage de tâches au cours de l'infection mais favorisait également la persistance durant l'exposition aux antibiotiques (Arnoldini et al. 2014). Au final, la diversité permet la persistance de la population clonale tant par l'assurance qu'une sous-population sera toujours capable de survivre dans les conditions environnementales rencontrées que par le "partage des tâches".

Un parallèle peut être fait avec la relation qui a été décrite entre la diversité génétique et la stabilité des communautés microbiennes (Allison and Martiny 2008; Jeffery et al. 2016; Jordán et al. 2015). Il semble concevable que l'hétérogénéité au sein de chaque espèce de la communauté contribue à la diversité totale de cette communauté et donc à sa stabilité (Hughes et al. 2001). Donc au-delà de permettre la persistance d'une population, la diversité intra-population influence le fitness et la persistance de la communauté.

Dans le cadre de nos études, le terme de persistance a concerné toute souche capable de survivre à long terme dans un environnement donné malgré les pressions exercées, incluant les moyens humains employés pour l'éradiquer. Les biofilms et la résistance, qui ont été étudiés au cours de nos travaux, font partie des phénotypes permettant la persistance (Chihara et al. 2015).

Biofilm

Une étude de cas de pneumonies de patients non CF causées par des bactéries du genre *Achromobacter* a montré que les souches isolées de patients sous ventilation mécanique présentaient une plus forte production de biofilm et une résistance plus importante aux carbapénèmes que les souches isolées de patients n'étant pas sous respiration artificielle (Liu et al. 2016). Concernant la mucoviscidose, la tolérance aux antibiotiques conférée par le biofilm de *P. aeruginosa* est reconnue comme une cause majeure de l'échec thérapeutique observé lors de l'infection pulmonaire chronique des patients (Kolpen et al. 2016). Lors de notre étude de la colonisation de VRCF par *P. pulmonicola*, la majorité des bactéries de cette espèce ne produisait pas de biofilm tandis que la souche de *S. aureus* associée étudiée était modérément productrice de biofilm. De même, lors de notre étude au CSD, aucune souche d'*Achromobacter* n'était productrice de biofilm tandis que les souches de *P. aeruginosa* associées étaient fortement productrices. Néanmoins, du fait du caractère rétrospectif de notre étude, seule la capacité à former du biofilm des souches isolées de l'eau a été étudiée et travailler sur les bactéries enchâssées dans le biofilm aurait potentiellement apporté des résultats différents. De plus, nous avons étudié la capacité de formation de biofilm de manière statique en microplaque, ce qui permet un screening rapide. L'utilisation de méthodes en flux continu donnerait certainement une représentation plus juste des conditions environnementales dans le réseau d'eau.

L'adhésion sur les surfaces abiotiques ainsi que l'expression de gènes impliqués dans la structuration du biofilm sont influencés par les conditions environnementales comme la température, la matière organique et le pH (Abdallah et al. 2014). Des auteurs ont observé que certains désinfectants avaient la capacité d'éliminer toutes les cellules viables cultivables d'un biofilm mais qu'aucun n'était capable

d'éradiquer complètement le biofilm de la surface (Abdallah et al. 2015). Lors de notre étude de la contamination du réseau d'eau du CSD, les différents épisodes de décontamination furent inefficaces et seule une réorganisation du centre, incluant le changement des tubulures, l'arrêt de l'utilisation de l'eau du réseau et l'approvisionnement des fauteuils en eau stérile, a permis de remédier à cette contamination. Ceci suggère que les bactéries étaient organisées en biofilm au niveau des canalisations et tubulures, conférant une résistance aux biocides et permettant un essaimage des bactéries dans tout le réseau. D'ailleurs, d'autres centres ayant subi le même niveau de contamination ont également été obligés de restructurer le réseau d'eau approvisionnant les fauteuils dentaires (Leoni et al. 2015; Lizon et al. 2016). Pour certaines espèces comme *P. aeruginosa*, la dispersion des biofilms semble être un processus actif probablement adapté permettant la colonisation de nouvelles niches (Sauer et al. 2002). Trois stratégies distinctes de dispersion de biofilm ont été identifiées, dont deux actives, par le biais de motilités bactériennes (Hall-Stoodley et al. 2004).

Il a été suggéré que certaines co-infections renforçaient la formation de biofilm dans les VRCF, comme celles associant *S. maltophilia* et *P. aeruginosa* (Pompilio et al. 2015) ou *P. aeruginosa* et *B. cenocepacia* (Bragonzi et al. 2012). Une évaluation de ce phénomène a montré que *B. cenocepacia* influençait positivement le développement du biofilm de *P. aeruginosa*. D'ailleurs, certaines communautés bactériennes associées à des infections chroniques comme les plaies, présentent un gain de fitness en résidant dans un biofilm multispécifique (Dalton et al. 2011). Lors de notre étude au CSD, nous avons montré que la présence d'*Achromobacter* qui ne produisait pas de biofilm potentialisait la formation de biofilm de *P. aeruginosa*.

Résistances multiples

Lors de la colonisation du réseau d'eau du CSD, les souches d'*Achromobacter* étaient résistantes à un certain nombre de biocides utilisés quotidiennement, dont la chlorhexidine et deux produits contenant des ammoniums quaternaires, appuyant les résultats d'études précédentes (Hugon et al. 2015; Molina-Cabrillana et al. 2007; Siebor et al. 2007). Les bactéries de ce genre ont une forte capacité d'implantation dans l'environnement hospitalier, et ceci est certainement dû à leur forte résistance aux biocides utilisés quotidiennement pour la désinfection de l'eau et du matériel. De manière notable, l'association de trois espèces pouvant être responsables de colonisations pulmonaires chez les patients CF (*B. cepacia*, *P. aeruginosa*, et *A. xylosoxidans*) a été rapportée sur un chiffon de nettoyage imprégné de biocide (Oie et al. 2012). Cette résistance aux biocides peut alors être considérée comme une caractéristique de préadaptation, permettant la persistance et ainsi l'exposition des patients dans l'environnement hospitalier.

Plusieurs études ont rapporté des épidémies d'infections associées aux soins par des clones de *P. aeruginosa* multirésistants aux antibiotiques (Suarez et al. 2011; Willmann et al. 2015). Les bactéries du genre *Achromobacter* sont naturellement résistantes à de nombreux antibiotiques et ont également la capacité d'acquérir de nouvelles résistances (Amoureux et al. 2013a; Traglia et al. 2012). La co-résistance biocide-antibiotique peut être due à des mécanismes communs tels que la modification de pompe d'efflux (Schindler et al. 2016). Lors de notre étude clinique, certains patients étaient colonisés

au long cours par une souche d'*Achromobacter* multirésistante aux antibiotiques. Concernant les bactéries du genre *Pandoraea*, tous les isolats étudiés, y compris l'isolat de primo-colonisation étaient multi- voire toto-résistants. Les thérapeutiques d'éradication initiale sont ainsi parfois inefficaces. De façon plus étonnante, tous les isolats d'*Achromobacter* du réseau d'eau du CSD étaient aussi multirésistants aux antibiotiques, avec parfois 5 classes d'antibiotiques inefficaces. Pour cette population sans pression de sélection antibiotique notable, la multi-résistance est une pré-adaptation au comportement infectieux (Aujoulat et al. 2012). Cette patho-adaptation augmentant le risque infectieux associé à des bactéries relativement peu virulentes.

D'autre part, une augmentation de la résistance aux antibiotiques par les bactéries du genre *Achromobacter* au cours de la colonisation des VRCF a été décrite et permet également la persistance en augmentant la gamme d'antibiotiques auxquels la population clonale est résistante (Amoureux et al. 2013a ; Ridderberg et al. 2015).

De plus, la résistance aux antibiotiques est possiblement méconnue lors des analyses microbiologiques car elle peut être exprimée par une fraction de la population seulement. Déjà démontrée au sein de populations persistantes de *P. aeruginosa*, une hétérogénéité de profils de résistance aux antibiotiques a été mise en évidence au cours de notre travail pour *A. xylosoxidans* et *A. insuavis* (Foweraker et al. 2005, 2009; Workentine et al. 2013). Nous avons montré qu'elle est fréquente au sein de populations d'*Achromobacter* colonisant de manière persistante les VRCF et concerne des antibiotiques utilisés en première ligne de traitement contre les infections causées par les bactéries de ce genre. Cette diversité d'antibiotypes est une caractéristique supplémentaire qui peut conférer à une population une assurance de survie quelles que soient les pressions antibiotiques exercées.

Relations Hôtes-bactéries

Au cours de la mucoviscidose, particulièrement lors de la colonisation chronique des VRCF, les relations entre les bactéries opportunistes d'origine environnementale et l'hôte impliquent plusieurs niveaux de complexité allant jusqu'aux interactions écologiques alors que, l'infection par les pathogènes spécifiques sont plus du domaine des interactions cellulaires et biochimiques. La persistance de certaines bactéries dans les VRCF nous pousse à nous questionner sur la nature des relations entre l'hôte et ces bactéries et sur l'importance de ne plus considérer un pathogène de manière isolée mais une communauté pathogène. Certains auteurs suggèrent que cette colonisation à long terme pourrait relever de relations de type symbiotique tandis que le concept émergent de pathobiome semble également avoir sa place dans cette pathologie.

Colonisation chronique des VRCF : une symbiose hôte-bactérie ?

La symbiose est une association durable entre deux organismes hétérosécifiques qualifiés de symbiotes où l'organisme le plus volumineux est généralement nommé hôte. La durabilité de l'association est une notion relative qui est caractérisée par une association recouvrant une part

significative de la durée de vie de l'un des deux organismes. Le terme de symbiose (étymologie : vivre ensemble) ne présuppose pas des types d'interactions existant entre les deux organismes impliqués et recouvre aussi bien des relations mutualistes que parasitaires (Moran et al. 2008). Les microorganismes mutualistes ou parasites, vivant sur ou au sein d'autres organismes influencent continuellement l'activité des cellules de leur hôte et sont mutuellement influencés par celles-ci (Vanechoutte and Fani 2009). La symbiose est fréquente dans les communautés marines, d'eaux douces et terrestres et a joué un rôle majeur dans l'émergence de nombreuses formes de vie sur terre (Moran 2006). Les meilleures illustrations de son importance sont les événements qui ont mené à l'évolution des hôtes eucaryotes par l'intermédiaire de plastes et de mitochondries acquis d'ancêtres de cyanobactéries et d' α -protéobactéries respectivement (Moran 2006). Il est maintenant clair que les mécanismes de symbiose sont impliqués dans les grandes radiations évolutives et la diversification écologique.

Si beaucoup de symbiotes sont impliqués dans des interactions de mutualisme claires, fournissant à leurs hôtes nutriments ou défenses, certains cas d'interactions sont moins facilement classés. Une infection microbienne peut être rapidement éliminée par les défenses de l'hôte ou mener à la disparition de celui-ci, ne procurant dans ce cas aucun avantage à long terme pour l'hôte ou le microorganisme. De manière alternative, les microorganismes peuvent établir une persistance dans un site anatomique donné et définir ainsi une nouvelle relation bactérie-hôte (Blaser and Kirschner 2007; Qin et al. 2012). Les infections bactériennes chroniques sont souvent considérées comme une forme de parasitisme, sans bénéfice pour l'hôte. Néanmoins, tout microbe qui établit une infection chronique chez un hôte particulier peut évoluer pour conserver son hôte ou lui être bénéfique dans le but de maintenir sa propre niche écologique (Moran 2006). De nombreux microorganismes associés à l'hôte doivent donc combiner des propriétés mutualistes et pathogènes, dans le sens où ils peuvent envahir de nouveaux sites ou de nouveaux hôtes, sans infliger de dommages conduisant au décès de l'hôte. Bon nombre de stratégies de microorganismes infectant les animaux, les plantes et d'autres hôtes dépendent donc des effets mutualistes qui améliorent les capacités de l'hôte et par conséquent du symbiote (Moran 2006).

Les clones de *P. aeruginosa* colonisant les VRCF feraient ainsi l'objet d'une adaptation à l'hôte, qui ressemble aux changements observés dans les symbiotes bactériens chez les hôtes vertébrés (Qin 2016). Le développement de souches isogéniques de *P. aeruginosa*, affichant des divergences de morphologie, de taux de croissance, d'auxotrophie et de sensibilité aux antibiotiques *in vitro* suggère une séquence adaptative dans une évolution infectieuse symbiotique conduite par les défenses de l'hôte. Prenons l'exemple de l'émergence de l'auxotrophie qui est fréquemment associée à seulement quelques acides aminés spécifiques. Pour certains auteurs, l'absorption sélective ou la perte de biosynthèse de certains acides aminés spécifiques est le reflet de la symbiose bactérie-hôte et de la coévolution durant l'infection chronique, plutôt que de la disponibilité en nutriments (Qin 2016). Le succès à long terme de souches spécifiques de *P. aeruginosa* et la divergence intraclonale observée au sein des VRCF suggèrent l'importance de la multicellularité bactérienne dans le chemin vers la symbiose (Qin 2016). La colonisation par *P. aeruginosa* et la destruction continue des voies aériennes

des patients atteints de mucoviscidose représenteraient alors un exemple de chevauchement entre l'exploitation infectieuse et la symbiose (Qin 2016).

Comme nous l'avons vu lors de la synthèse bibliographique, *P. aeruginosa* donne rarement lieu à des bactériémies chez les patients CF, même en cas de forte charge bactérienne ou d'exacerbation pulmonaire (Williams et al. 2010). Le tropisme tissulaire et le confinement dans les voies respiratoires de l'hôte constituent un exemple sans égal d'infection chronique pouvant durer toute la vie d'un patient. La nature de cette association bactéries-hôte à long terme dépend clairement de la diminution de virulence de *P. aeruginosa* au cours de l'adaptation à l'environnement des VRCF (Cigana et al. 2011; Lee et al. 2006; Moran 2006; Qin et al. 2012; Smith et al. 2006). En effet, les souches adaptées de cette espèce sont connues pour perdre leur motilité, leur pigmentation et leur capacité de sécrétion de toxines et de protéases au cours de l'infection chronique et chaque souche isogénique au sein de la population clonale perd la capacité de provoquer une infection aiguë, quel que soit le statut immunitaire de l'hôte (Hoffmann et al. 2005; Luzar and Montie 1985; Luzar et al. 1985; Qin et al. 2012). L'étude de patients non CF ventilés mécaniquement et en phase aiguë d'infection pulmonaire a montré que dès le 9^{ème} jour, des sous-populations de *P. aeruginosa* déficientes en QS apparaissaient (Köhler et al. 2009). Chez les patients CF, nous avons vu que ce type de variant était détecté en forte proportion au cours de la persistance (Feliziani et al. 2010; Hoffman et al. 2009) et qu'il était associé à une plus faible virulence que celle des souches productrices de QS dans le modèle animal (Willcox et al. 2008). Lors de notre étude de la colonisation chronique d'un patient, nous avons observé que *P. aeruginosa*, *S. aureus* et *P. pulmonicola* étaient très faiblement virulents dans le modèle *C. elegans*. Néanmoins, les seules souches disponibles de *P. aeruginosa* et de *S. aureus* étaient des souches tardives et il aurait été intéressant de pouvoir étudier la virulence de souches plus précoces afin d'observer une éventuelle perte de virulence au cours des sept années de colonisation étudiées.

D'autre part, une fois que la syntrophie¹⁸ du clone sélectionné de *P. aeruginosa* est établie dans les voies respiratoires de l'hôte, ces mêmes voies respiratoires deviennent immunisées contre une colonisation ultérieure par des souches sauvages de *P. aeruginosa*, présentes dans le milieu de vie de l'hôte (Bragonzi et al. 2009; Burns et al. 2001; Qin et al. 2012; Smith et al. 2006). De fait, l'acquisition de souches sauvages non clonales de *P. aeruginosa*, après la détection en laboratoire d'une souche adaptée aux VRCF, a rarement été rapportée (Bragonzi et al. 2009; Burns et al. 2001; Smith et al. 2006). Des études ont montré que les souches de *P. aeruginosa* adaptées aux VRCF présentaient des propriétés antagonistes inter-clonales pour éviter la co-colonisation par une souche sauvage virulente (Qin 2016). En effet, *in vitro*, la croissance d'une souche sauvage a été inhibée par une souche adaptée aux VRCF, auxotrophe et à croissance faible. Les auteurs ont également identifié des phénomènes d'inhibition entre des souches adaptées aux VRCF mais non isogéniques. Ces résultats suggèrent que les souches adaptées pourraient produire des molécules inhibitrices reconnaissant des différences clonales (Qin 2016).

¹⁸ Développement d'un clone auxotrophe au contact d'une espèce (ici extrapolé à l'homme) capable de synthétiser et d'excréter des facteurs de croissance pour lesquels l'autre est exigeant.

Les résultats de nos études ont également mis en évidence que les patients étaient colonisés par un clone unique de *Pandoraea* ou d'*Achromobacter* au cours du temps et la seule co-colonisation que nous ayons détecté s'est révélée sporadique, observée une seule fois au cours de la colonisation chronique. D'autre part, nous avons montré que dans l'environnement domestique proche du patient, il y avait d'autres espèces voire d'autres génotypes appartenant à l'espèce colonisant le patient, dont certains ont déjà été décrits dans la mucoviscidose. Toutefois, en aucun cas, ces souches n'ont été isolées dans les VRCF du patient ; les hypothèses émises à partir de ces observations qui doivent être confirmées en étudiant un nombre de patients plus important, sont que soit ces génotypes n'ont pas la capacité de coloniser le tractus respiratoire, soit le clone adapté aux patients empêche l'implantation d'autres génotypes sauvages environnementaux. Une souche adaptée à la niche pulmonaire de l'hôte peut donc fournir une protection contre une colonisation ultérieure par une souche sauvage plus virulente, qui induirait des dommages pulmonaires, et ceci peut être vu comme une forme de bénéfice pour l'hôte et donc de mutualisme (Qin et al. 2012).

A l'inverse, en aucun cas le génotype d'*Achromobacter* présent dans les VRCF du patient n'a été isolé de l'environnement domestique de celui-ci. Ces résultats rejoignent ceux d'une étude ayant montré que les souches de *P. aeruginosa* adaptées aux VRCF n'étaient généralement plus capables de vivre dans l'environnement naturel comme l'eau de consommation (Hogardt et al. 2007). De manière similaire, la transmission entre patients CF de souches de *P. aeruginosa* adaptées aux VRCF a pour le moment rarement été rapportée (Head and Yu 2004; Mena et al. 2007). Il serait intéressant de comparer la capacité de survie environnementale des bactéries adaptées aux patients à celle des bactéries isolées de l'environnement, comme la résistance à la dessiccation sur une surface ou le taux de survie dans l'eau de consommation. Finalement, cette perte de transmissibilité pourrait également être considérée comme un signe de symbiose.

Dynamique & relations au sein des communautés : notion de pathobiome

L'étude des interactions microbiennes dans le contexte de la mucoviscidose a révélé que divers mécanismes permettaient la coexistence d'espèces en concurrence pour les mêmes ressources (Hibbing et al. 2010). Ainsi, la concentration en nutriments peut influencer les interactions entre les bactéries en co-culture (Harrison 2007; Sibley et al. 2008). Il a été observé que la sécrétion de composés par *P. aeruginosa* pouvait diminuer la croissance de *B. cenocepacia* en co-cultures planctoniques (Al-Bakri et al. 2004; Bragonzi et al. 2012). Pourtant, lorsque ces deux espèces étaient ensemencées simultanément sur une surface, elles produisaient un biofilm mixte stable (Al-Bakri et al. 2004). De manière intéressante, la co-infection par ces deux espèces dans le modèle murin ne modifie pas la capacité de *P. aeruginosa* à établir une infection chronique mais semble augmenter la réponse inflammatoire de l'hôte (Bragonzi et al. 2012). D'ailleurs, chez l'homme, la co-colonisation par *P. aeruginosa* et *B. cenocepacia* peut avoir un impact pulmonaire plus délétère que la simple colonisation par *P. aeruginosa* (Tomlin et al. 2001). L'étude de poumons explantés humains a montré que les bactéries du CBC étaient majoritairement présentes sous forme planctonique ou de petits amas dans les phagocytes et le mucus, tandis que *P. aeruginosa* était identifié dans des structures

"biofilm-like" (Schwab et al. 2014). Dans les zones anaérobies de co-infection avec des bactéries du CBC, la densité des biofilms de *P. aeruginosa* paraissait considérablement réduite. Dans ces zones pulmonaires anaérobies, les bactéries du CBC pouvaient inhiber la croissance en biofilm de *P. aeruginosa* et s'étendre dans la niche à travers le mucus en sécrétant des mucinases leur apportant une source carbonée (Schwab et al. 2014). Les interactions entre les bactéries de ces deux espèces sont donc très complexes, dépendant de l'ordre de colonisation, de la teneur en oxygène et certainement de nombreux autres paramètres. De même, il a été montré qu'en fonction des conditions de l'habitat et de la chronologie de la colonisation par les différentes espèces, les streptocoques du microbiote oro-pharyngé peuvent amplifier la sécrétion de facteurs de virulence par *P. aeruginosa* ou au contraire limiter sa croissance (Whiley et al. 2015). Concernant le biofilm "multi-espèces", la mixité des populations dépendrait en partie des nutriments disponibles (Nielsen et al. 2000). Par exemple, en présence de certaines sources carbonées comme le chlorobiphényle, *Pseudomonas putida* peut se nourrir des métabolites produits par *Burkholderia* sp. et les deux espèces forment alors un biofilm mixte. En revanche, en présence de citrate, utilisable par les deux espèces, chacune formera son propre biofilm avec une structure radicalement différente (Nielsen et al. 2000).

Comme nous l'avons observé lors des colonisations par *Achromobacter* et *Pandoraea*, les patients CF sont généralement colonisés par un clone unique de *S. aureus* au cours des années ; néanmoins, ils peuvent être occasionnellement infectés par une souche supplémentaire génotypiquement différente (Kahl et al. 2003). De manière intéressante, dans 80% des cas, cette nouvelle souche appartient à un groupe *agr* interférant c'est-à-dire avec un système de QS différent, mettant en évidence l'importance des relations entre les bactéries dans les VRCF (Kahl et al. 2003).

Une étude a montré que l'ampleur des changements observés dans le microbiote pulmonaire autour d'une exacerbation était dépendante de la diversité et de la composition de la communauté à l'état basal (Carmody et al. 2013). Ainsi, l'abondance relative des bactéries du genre *Gemella* augmentait au cours de l'exacerbation et celles-ci pouvaient potentiellement être utilisées comme un biomarqueur d'exacerbation pulmonaire. La caractérisation du microbiote pulmonaire de 269 patients CF, couvrant une tranche d'âge de 60 ans, a révélé que 5 genres constituaient le « core » microbiote CF; *Streptococcus*, *Prevotella*, *Rothia*, *Veillonella* et *Actinomyces*. Les pathogènes comme *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Stenotrophomonas* et *Achromobacter* étaient moins prévalents que ces genres mais présentaient une forte tendance à dominer la communauté bactérienne quand ils étaient présents (Coburn et al. 2015). Très récemment, une détérioration clinique inhabituellement rapide et sévère a été rapportée chez un patient colonisé chroniquement par *A. xylosoxidans* et dont l'état clinique était précédemment stable (Talbot and Flight 2016). L'analyse métagénomique des expectorations au moment de cette exacerbation sévère a révélé que la bactérie dominait totalement le microbiote respiratoire. De même, lors de notre étude de la colonisation chronique par *P. pulmonicola*, nous avons noté que ce pathogène émergent était présent dans 100% des échantillons et dominant dans 61% des cas. Chez ce patient nous avons étudié la dynamique de colonisation des VRCF par 3 pathogènes persistants *P. pulmonicola*, *S. aureus* et *P. aeruginosa*. Un génotype minoritaire de *P. pulmonicola* a dominé le microbiote au moment d'une forte exacerbation pulmonaire ayant conduit à l'hospitalisation du patient. Cette souche présentait une plus forte virulence *in vitro* laissant supposer

une plus forte production de facteurs de virulence. Il est possible qu'à cette période, la dynamique de la communauté ait conduit à la sélection de cette souche plus virulente, ce qui répond à la définition du concept de pathobiome présenté ci-après.

Les études du microbiote des VRCF par des méthodes indépendantes de la culture ont révélé des communautés microbiennes très complexes dans lesquelles doivent se jouer des interactions tout aussi complexes (Harrison 2007). L'importance des interactions inter-spécifiques dans la progression de la maladie restent largement inconnues. Comprendre la maladie pulmonaire en termes de communauté et d'écologie évolutive pourrait permettre une meilleure compréhension de la progression de la maladie et de l'influence des thérapeutiques.

Avec la description des microbiotes et la reconnaissance de leur importance en santé humaine, le concept de pathogenèse du scénario "microbe + facteur de virulence = maladie" a évolué vers le concept de pathobiome (Vayssier-Taussat et al. 2014). Le concept de pathobiome considère le pathogène dans son environnement biotique et abiotique dans lequel les interactions entre les microorganismes et l'hôte peuvent conduire à la survenue de nouveaux variants, parfois plus virulents, ou à l'émergence de nouvelles maladies, par la combinaison de phénomènes synergiques/antagonistes entre différents agents pathogènes et non pathogènes (bactéries, champignons ou virus). Les pressions environnementales peuvent façonner les pathobiomes ou au contraire orienter les interactions pathologiques vers des relations de mutualisme (Vayssier-Taussat et al. 2014).

La séparation entre microorganisme pathogène et mutualiste peut être floue et fluctuante, principalement du fait que certains mécanismes (comme les transferts horizontaux de gènes) peuvent rapidement transformer une bactérie mutualiste en pathogène (Leimbach et al. 2013). La déficience de l'hôte est un autre paramètre qui peut modifier des relations de mutualisme et conduire au comportement pathogène de certains microorganismes. L'homme et son microbiote maintiennent généralement une relation symbiotique ; néanmoins, durant une maladie prolongée, au cours de laquelle le microbiote est exposé à de nombreux stress incluant les antibiotiques et d'autres thérapeutiques, l'hypoxie, etc., peut se développer un pathobiome (Defazio et al. 2014; Jones 2010). Une étude a montré que les conditions abiotiques comme les traitements antibiotiques peuvent promouvoir la virulence coopérative entre les bactéries durant l'évolution au sein de l'hôte, améliorant ainsi la propagation d'une maladie infectieuse (Diard et al. 2014). De nouvelles preuves suggèrent que l'exposition prolongée de l'hôte humain à des traumatismes, comme la réanimation prolongée (Patel et al. 2016), la chirurgie (Krezalek et al. 2016 ; Romano-Bertrand et al. 2015) ou une maladie chronique (Defazio et al. 2014), altère le microbiote bénéfique et permet l'émergence des pathogènes. Ces pathogènes peuvent ensuite contourner le système immunitaire et contribuer à la détérioration de la réponse de l'hôte.

Le concept de pathobiome s'applique aux modèles environnementaux et cliniques étudiés dans ce travail. La contamination du réseau d'eau du CSD, peut être considérée comme un pathobiome, où une colonisation initiale par une communauté polymicrobienne a abouti à l'émergence et à la persistance de pathogènes opportunistes comme *P. aeruginosa* et *Achromobacter* sp. pouvant

potentiellement infecter un hôte humain après exposition lors des soins dentaires. Les patients atteints de mucoviscidose subissent des périodes d'exacerbations pulmonaires qui sont reliées à un déséquilibre de la communauté, favorisant l'apparition et/ou la prédominance d'un agent pathogène, comme nous l'avons décrit précédemment pour *Pandora*. L'utilisation fréquente de certains antibiotiques pourrait potentiellement induire ces déséquilibres de communauté pulmonaire. Chez les patients CF, plusieurs études ont mis en évidence un lien entre le microbiote intestinal et le statut respiratoire des patients. L'alimentation aurait un rôle dans le développement du microbiote respiratoire, la diversité du microbiote intestinal serait reliée à des périodes stables au niveau pulmonaire et des communautés spécifiques dans l'intestin ont été identifiées avant des complications respiratoires (Hoen et al. 2015; Madan et al. 2012; Nielsen et al. 2016).

Une meilleure compréhension des forces structurant les populations pathogènes, incluant la plasticité génomique de certains pathogènes et les interactions fines entre l'hôte et son microbiote, pourrait apporter des stratégies de contrôle plus efficaces des infections (Vayssier-Taussat et al. 2014). En effet, plutôt que de cibler le pathogène lui-même pour tenter de l'éradiquer, une approche relativement inefficace dans le cadre de la mucoviscidose, certaines actions visant à restaurer la diversité de la communauté, à moduler les interactions au sein du microbiote ou entre le microbiote et l'hôte, ou visant à modifier les conditions de la niche pourraient se révéler efficaces sur le pathogène considéré et ses effets délétères. Dans ce cadre, les études de métagénomique pourraient aider à comprendre les mécanismes impliqués dans l'évolution du pathobiome, en réponse à de multiples éléments comme les facteurs liés à l'hôte (alimentation, statut immunitaire, ...), aux activités de l'hôte et aux facteurs environnementaux subis par l'hôte (Vayssier-Taussat et al. 2014).

L'importance que pourrait avoir ce concept de pathobiome dans la mucoviscidose a été discutée dans un chapitre de livre de la page 706 à la page 709 :

Romano-Bertrand S., **Dupont C.**, Marchandin H., Jumas-Bilak E. and Licznar-Fajardo P. 2015. « The Battle Against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs ». Reducing pathobiomes could slow arms race between man and microbes. A. Méndez-Vilas <http://www.microbiology5.org/vol1.html>.

Reducing pathobiomes could slow arms race between man and microbes

S. Romano-Bertrand^{1,2}, C. Dupont¹, H. Marchandin^{1,3}, E. Jumas-Bilak^{1,2} and P. Licznar-Fajardo¹

¹Equipe “Pathogènes Hydriques, Santé, Environnements”, UMR 5569 HydroSciences Montpellier, UFR Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, 15 avenue Charles Flahault, 34093 Montpellier, France

²Département d’Hygiène Hospitalière, CHRU Montpellier, Hôpital St Eloi, 80 Avenue Augustin Fliche, 34090 Montpellier, France

³Département de Bactériologie-Virologie, CHRU Montpellier, Hôpital Arnaud de Villeneuve, 371 Av. du Doyen Gaston Giraud, 34295 Montpellier Cedex 5, France

The Koch’s postulates that defined true pathogens are the cornerstones of the twentieth century microbiology. Because medical microbiology was focused on the isolation of true pathogens in pure culture from a patient, the rationale of treatment and prevention was also based on the protection and the fight against the true pathogens. This rationale succeeded since antimicrobial agents have changed the prognosis of most infectious diseases and vaccines have eradicated smallpox or decreased the incidence of other human plagues. However, the end of the 20th century saw the emergence and the spread of multiresistant opportunistic bacteria that threaten to end the antibiotic era. The recent proposal to include antibiotics in the UNESCO list of cultural heritage is almost like an admission of failure. The time has come for new concepts on microbial pathogens that could provide new approaches for the battle against infections.

The « omics » era raised awareness on the huge web of interactions established among living beings and particularly among microorganisms. Considering an individual microbe, whether a true or an opportunistic pathogen, without its associated community or its niche hides most parts of its living cycle. The concept of pathobiome is born in the context of microbial community interactions. It aims at considering the pathogenic agent within its biotic environment but also the community, which harbors accomplished or developing pathogens and can promote their transmission, emergence, pathogenicity or antibioresistance. The pathobiome concept provides a new conceptual frame for very promising developments from fundamental microbiology to infectiology. In this chapter, different tracks to achieve pathobiome reduction or closure will be discussed in the domains of use of antimicrobial agents, management of chronic infections and healthcare-associated infection control. In infectiology, the shift of paradigm from armful specific pathogens to adapted pathobiomes as cause of infectious diseases should lead to a shift of battles against pathogens from specific weapons to biological/ecological control.

Keywords: pathobiome; niche reduction; antimicrobial agents; bacterial communities; hospital environments

1. From bacterial species to community, from pathogen to pathobiome

1.1 Koch and Winogradsky

The basic concept underlying Koch’s postulates [1], and their re-interpretations by molecular microbiologists [2], is the essentialist concept of *monomorphism* that considers the bacterial world as multiple separately evolving species each displaying a restricted range of variations. François Jacob and Elie Wollman in 1961 said “General acceptance of the concept of monomorphism was the first essential step for the establishment, not only of bacterial genetics, but also of bacteriology as a science.” They recognized the “vital services” provided by monomorphism but they tempered as follows: “...it (monomorphism) was illegitimately extended to assert the constancy of bacterial form and function, and to deny to bacterial species all possibility of variation” [3]. Authors accepted the dynamics of bacterial species but remained essentialists, the bacterial species and its variations remaining the main object of study for bacteriologists.

Alternatives to essentialism and to Kochian vision are also old but they gave less conspicuous traditions. The masterful Russian soil microbiologist, Sergeï Winogradsky (1856-1953), developed the interactive microbiology (or microbial ecology) methodologically based on mixed cultures, for instance on the famous and the ever up to date Winogradsky column [4]. In the early 1930s, he described the soil as “...a living environment, a collective entity that possessed the characteristic functions of a living organism” [5]. It is probably the first presentation of microbial communities as global and irreducible biological entities, the first step towards the new microbial ontology based on metagenomic thinking and community systems biology.

However, the disciplinary division of science fields confined the Winogradsky’s tradition to environmental microbiology and the Koch’s tradition to medical microbiology without serious debates along the twentieth century. The advent of metagenomics at the beginning of the twenty-first century appears as a reunification around the interactive vision of Sergeï Winogradsky but, old traditions die hard, the first advances in metagenomics have been promoted by soil microbiologists [6].

1.2 Metagenomics: barcoding species by genomes and defining the genome of the community

Culture methods that had rendered “vital services” [3] to the bacteriology became, at the end of the twentieth century, a technological limitation for the inventory of complex communities mainly because of the very diverse growth requirements of bacteria or the unculturability of lot of them. In the early 2000s, the necessity to develop new methods in bacteriology met the emergence of new generation sequencing technologies [7], this synchrony leading to the advent of metagenomics as a new technology and further as a new discipline.

Metagenomics, also called environmental genomics, consists of the genome-based analysis of entire communities of interacting micro-organisms in diverse ecological contexts. Initially, in 1998, Jo Handelsman and his collaborators defined the metagenome as the collective genome of the total microbial community of a specific environment [8]. Today, most of the metagenomic studies provide a barcoding of the microbial diversity rather than the holistic vision of a whole community genome. Therefore, a more pragmatic definition of metagenomics is the direct genetic analysis of genomes contained within an environmental sample without the prior need for cultivation.

The repertory of species in an ecosystem is generally performed by marker gene amplification metagenomics (i.e., 16S ribosomal RNA gene) [9] and may be more accurately named “meta-genetics” [10]. By contrast, full shotgun metagenomics gives the complete sequences for theoretically all genomes within a community and thereby associates community diversity repertory to functional analysis [11]. For example, the community of microbial organisms living on the skin and mucous membranes of human beings are now extensively characterized by both barcoding and functional analysis [12].

1.3 The human microbiota is a supplementary organ

Microbes on inner and outer human body surfaces are ten times more frequent than the total human cells in the body. Moreover, the microbiota gene repertoire has been estimated to be about 150-times greater than that of the human host [13]. The human microbiota associates bacterial but also archaeal, fungal [14], protozoal and viral populations [15].

Infants are axenic before the birth but as soon as they are *ex utero*, bacteria from mother, family and environment will colonize their skin and mucous surfaces [16] and then evolve by steps until stabilization at the adulthood [17]. In adults, microbiota appears spatially organized particularly on the skin surface [18] and along the gut [19]. The microbiota composition also physiologically varies during the adult life, as it can be seen during elderly [20]. Inter-individual and intra-individual variations are particularly marked concerning taxonomic barcoding but surprisingly the human microbiota is rather constant in terms of functions in spite of the variation in species repertory [21].

Well-known microbiota functions are barrier protection, self and non-self-recognition, nutrition [22] and xenobiotic metabolism [23]. This is in accordance with microbiota location at the interface between human body and outside world. Conversely, changes in environmental conditions such as diet [24–26], lifestyle (stress, smoking, ...) or drug treatments disturb the microbiota and the effect lasts for years in the case of antibiotics consumption [27,28]. Relationships between microbiota disequilibrium and human diseases are more and more described, such as in immune (Crohn’s disease, Inflammatory Bowel Disease (IBD), ulcerative colitis, psoriasis...) [29–31], metabolic (diabetes, obesity...) [32,33] or infectious diseases (*Clostridium difficile* infections, vaginosis) [34–36].

Finally, the properties of human microbiota such as ontogenesis, highly conserved functions and disequilibrium associated to local and systemic human diseases suggest that microbiota acts as a supplementary organ involved in highly regulated physiological functions. Therefore, human beings (and other metazoans) could be considered as supra-organisms or meta-organisms.

1.4 Pathobiome concept

A recent study showed that *Homo sapiens* is not at the top of the food chain as are apex predators (crocodiles, wolves, etc) but rather in the middle of the chain beside anchovies and pigs [37]. Because of ancient and efficient cultural protections against apex predators, the main life-threatening living organisms for humankind are now pathogenic microbes (WHO data). Microbes are also constitutive of the human body but microbial world is highly diverse and human pathogens generally differ from commensal and mutualistic microbes. Unfortunately, separation between pathogen and commensal/mutualistic microorganisms is fuzzy and versatile mainly because horizontal gene transfer (HGT) can change commensal/mutualistic bacteria to pathogens [38]. The case of *Escherichia coli* pathotypes that acquired specific virulence genes and thereby change their lifestyle towards strict human pathogen is particularly emblematic [38]. If we also consider that host deficiencies can change relationships from commensalism or mutualism to pathogenicity or virulence, the frontier between beneficial microbes and bugs become even more moving.

Environmental bacteria can also behave as opportunistic pathogens [39]. In environmental ecosystems, potentially opportunistic pathogens display community lifestyle associated with various other bacteria but also with shelter organisms [40]. They are sheltered by invertebrates, plants and protozoa, which are recognized as hotspots for genetic exchanges and for the emergence of pathogens [40,41]. Given the current and ancient predominance of protozoa, plants and invertebrates, it is likely that bacterial interactions with such organisms have shaped bacterial evolution [42]. Therefore, sheltered bacteria are equipped with factors that overcome the innate defenses of their hosts. Thanks to the

continuity between environmental communities and human microbiota, these factors might secondarily be useful for the adaptation in human beings and might also spread into existing mutualistic or pathogenic bacterial populations [42].

Beside host adaptation and virulence, exchangeable genes frequently encode antimicrobial or multidrug resistance. If antibiotics resistance genes (ARGs) were selected after HGT by antimicrobial selective pressure, resistant clones emerged and currently encounter epidemiological successes leading to therapeutic dead-ends considered as a major threat to global public health [43].

Even if a pathogen fulfills the Koch's postulates and is "pathogen by itself", its dynamics of emergence depends on other members of its associated community and on the gene flow inside and among communities. Moreover, a recent study on the true pathogen *Salmonella enterica* serotype Typhimurium, suggests a general principle by which abiotic conditions such as antibiotic treatment can promote cooperative virulence during within-host evolution, increase duration of transmissibility, and thereby enhance the spread of an infectious disease [44]. The role of associated communities and abiotic conditions in the emergence of opportunistic pathogens is even more salient because, for these agents, exposition, transmission and pathogenicity are the results of complex favorable conditions and interactions rather than specific virulence mechanism [39].

Metagenomic approaches contribute to the pathobiome concept that considers the pathogen within its microbial community context. The pathobiome designs the complex biological entity involved in infection and provides a broader view on infectious diseases than do the pathogen alone. In this chapter, the pathobiome concept will be confronted to 3 examples of current concerns in infectiology and public health: i) reservoirs and transmission of resistant bacteria or resistance and virulence genes involved in water-related infections, ii) acute healthcare-associated infections secondary to microbiota disequilibrium, iii) altered microbiota in chronic infectious diseases such as cystic fibrosis. Different tracks to achieve pathobiome stabilization or reduction will be discussed in the domains of use of antimicrobial agents and management of infections control and of chronic infections.

2. Control the making of superbugs in aquatic environments

2.1 Context

Water ecosystems contain complex bacterial communities mixing autochthonous stable communities and allochthonous species [45]. They are also favorable environments for microbial interactions and adaptation to changing conditions (Fig. 1). Indeed, water ensures a continuum among hydrogeological (underground and superficial systems), technological (domestic, hospital, industrial and waste waters) and living compartments (vital resource for all living beings). In aquatic niches, bacteria from contrasted origin (soil, water, polluted environment, animal and human microbiota) have direct connections with humans through the wide range of water usages. Therefore, waterborne infectious diseases represent a terrible threat to human health: in 2015, the WHO estimates that more than 1000 children under five die daily from diarrheal diseases due to poor sanitation or unsafe drinking water (<http://www.who.int/fr/>). In developed countries, the water networks are generally free of fecal microbes, which are involved in diarrheal diseases in developing countries but autochthonous bacteria belonging to water networks communities (*Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella pneumophila*, *Stenotrophomonas maltophilia*, nontuberculous mycobacteria or *Aeromonas* sp., etc.) caused opportunistic infections particularly when the host presents altered immune response or other underlying conditions. This group of bacteria is currently so-called opportunistic premise plumbing pathogens [46]. Another concern for human health is the richness in ARGs in aquatic natural reservoir, either carried by antibiotics resistant bacteria (ARB) or exchanged between microorganisms thanks to mobile genetic elements (MGE) [47]. The aquatic resistome can provide genes to all members of the microbial community including allochthonous human pathogens, and potentially lead to the emergence of superbugs associating resistance, virulence and close contacts with human through water usages.

Unlike traditional fecal pathogens considered as allochthonous contaminants, opportunistic pathogens and ARBs are part of the resident water microbial community and therefore require new paradigms for their control.

2.2 Water-related resistomes

Aquatic environments are submitted to biotic and abiotic constraints, for instance human-mediated constraints like antibiotics and biocides. These compounds used in human and veterinary medicine can enter the environment via wastewater treatment plant (WWTP) effluents, hospital effluents, application of agricultural waste to fields, and leakage from waste-storage containers and landfills [48]. Effluent from WWTP is one of the major sources of ARGs in aquatic ecosystems and a source for bacterial community composition changes [49]. A study of plasmid metagenomics detected 140 clinically relevant ARGs in a WWTP [50], others showed that ARGs could persist in effluents sludges of a variety of full-scale WWTPs even after disinfection [51] but also in river sediment [52].

Beside antibiotics and biocides, other compounds such as heavy metals can act as co-selectors for ARBs. These co-selection mechanisms include co-resistance (different resistance determinants present on the same genetic element) and cross-resistance (the same genetic determinant responsible for resistance to antibiotics and metals) [53]. Moreover,

environmental selective pressures other than antibiotics, such as metals, detergents, and even nanomaterials, can facilitate the transmission of ARGs by HGT [54].

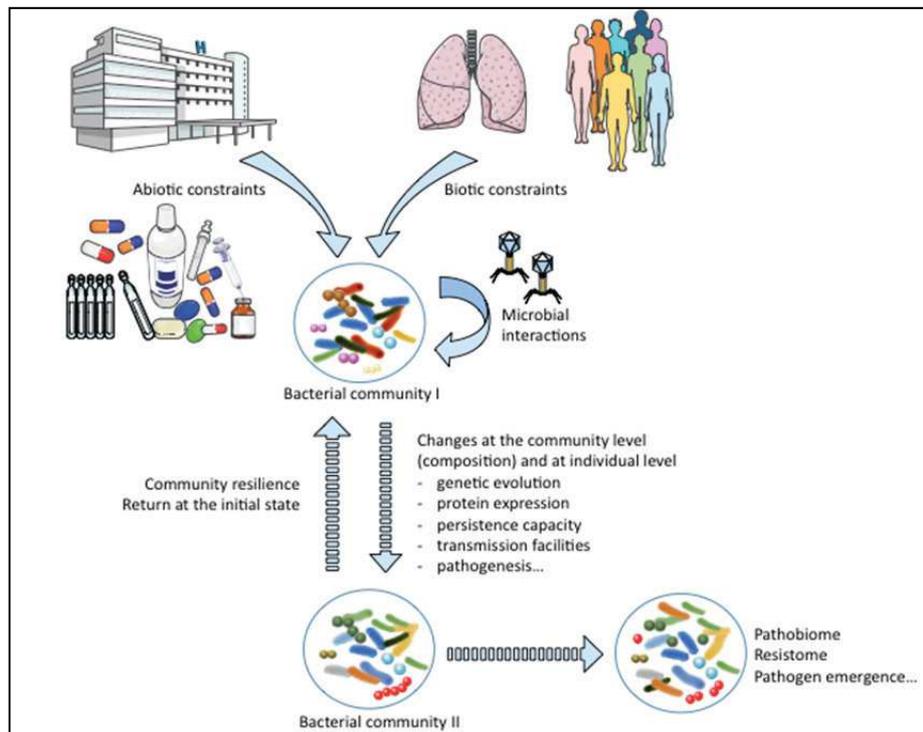


Fig. 1 Microbial community interactions, host environment and human activities, that can play a fundamental role in host adaptation and pathogen emergence.

Finally, bacteria living in polluted environments are frequently ARBs. For instance, potentially virulent and antibiotic resistant strains of *P. aeruginosa* [55] or other opportunistic pathogens [56] are often among the best biodegraders of environmental pollutants. Because of the large occurrence of genetic movements, aquatic ecosystems can be considered as reactors for emergence and spread of ARGs among microbial communities [57,58].

The above data suggest that water ecosystems are training places where bacteria evolve toward antibiotic tolerance or resistance. However, the question of the actual impact of the environmental resistome on the epidemiology of ARB infections remains open even if epidemiological links have been revealed between clinical and environmental species [59,60]. Of recent concern is the detection of the NDM-1 gene encoding resistance to most betalactams in polluted surface waters and chlorinated tap water in India [61]. NDM-1, first found in *E. coli*, is highly mobile and is spreading worldwide [62] in multiple waterborne pathogens, including *Vibrio cholerae* [61].

Hospital and domestic water systems, and more generally premise plumbing systems, are particular ecosystems where microbial communities, in planktonic stage or in biofilm, enter in close contact with humans. Their study would give insights about emergence of resistant clones among clinically relevant bacterial species. Epidemiological link between water networks and ARBs in healthcare-associated infections (HAIs) is demonstrated in numerous studies because hospital is an amplifier of the global infectious risk in developed countries. Within the European Union (EU), it is estimated that 2 million patients every year acquire infections caused by multiresistant bacteria accounting for 175,000 deaths per year in hospitals.

Among environmental ARBs, *P. aeruginosa* is known to cause redoubtable HAI and hospital outbreaks, particularly in patients hospitalized in intensive care units (ICUs). Many studies have demonstrated the transmission of *P. aeruginosa* from water networks and outlets to patients [63,64]. The main reasons for the success of *P. aeruginosa* in hospital water networks are i) the presence of numerous technological niches (osmosis systems, softeners, biomedical devices) where *P. aeruginosa* can develop in biofilm, ii) the use of biocides and antimicrobial agents that can select *P. aeruginosa*, which is particularly resistant, iii) the capacity of *P. aeruginosa* to act as a shuttle between patient microbiota and water community particularly thanks to interface zone such as faucets, U-bend siphons or biomedical devices (ICU ventilators, dialysis machines, endoscope reprocessors, etc.). The hospital water networks and outlets could therefore represent hot spots for pathogenic ARB emergence [65].

Very few studies have investigated resistant bacterial community in the drinking water distribution systems out of hospital. Indeed, in many countries, bacterial parameters defining drinking water quality are based on the quantification of fecal indicators like *E. coli* or *Enterococcus* sp. Resistant bacteria or resistome are nowadays poorly investigated in natural reservoir of drinking water while aquifers, particularly karstic ones, are very vulnerable to pollutants related to

anthropic activities (WWTP, agricultural lands, industries, urban areas...). In a study of Ribeiro and colleagues, the occurrence of antibiotic-resistant *Pseudomonas* sp. in drinking water has been evaluated. They showed that *E. coli* and *Pseudomonas* sp. densities in the water resource varied depending on climatic conditions impacting on water turbidity. Whatever the initial turbidity, *E. coli* was totally eliminated from drinking water while *Pseudomonas* sp. was able to survive to treatments used for drinking water production probably due to aggregations of suspended matters or to intrinsic tolerance to biocides [66]. Through further investigations on *Pseudomonas* strains recovered in water distribution system, authors showed that all presented phenotypic resistance to at least one antibiotic [66].

2.3 The hidden effects of antibiotics in the environment

Water-related resistomes are currently more and more described [67] but there are limited evidences to say whether environmental concentrations of antibiotics enhance the development and spread of resistance in the environment [68]. Such evidences have been provided in outstanding conditions with excessive concentrations of antibiotics only. For instance, streams receiving effluents from a drug-manufacturing site in India displayed huge ciprofloxacin concentration (1mg per g of organic matter) and concurrent high levels of resistance [52]. Authors concluded that antibiotic contamination plays a role in the selection of ARGs and their mobilization from environmental microbes to other species [52].

However, in more regular conditions, the link between antibiotic concentration in environment and resistance is not so clear. Consequently, current guidelines on the environmental risk assessment in the EU, for example, do not explicitly address the effect of antibiotics on the prevalence of antibiotic resistance in the environment [69]. One step toward a better evaluation of the ecological and epidemiological impacts of antibiotics in environment is defining indicators and parameters. Classically, antibiotic activity is explored *in vitro* by the determination of the minimal inhibitory concentration (MIC) leading to the characterization of the pathogenic strains as resistant, intermediate or sensitive to an antimicrobial agent. MIC is thought to be predictive for *in vivo* therapeutic effect. However, MIC definition is unique and doesn't take into account the heterogeneity of drug distribution compartments whether in the human body or in diverse environmental niches where the antimicrobial agent concentrations could be markedly lower. These sub-MIC have biological effects [70] that remain hidden if MIC determination is used as the sole parameter for activity prediction. Therefore, another parameter, so-called minimum selective concentration (MSC) is now taken into consideration. The MSC is reached when its reducing effect on growth of a susceptible strain balances the fitness cost of the resistance in a resistant strain. In other words, it is the lowest antibiotic concentration that allows selection for resistant mutants [71]. It is noteworthy that the selection with sub-MIC not only enriches low-level resistance mutants but also those with clinically relevant levels of resistance. This phenomenon occurs at concentrations several hundred-fold below the lethal concentrations for susceptible microorganisms [71].

While the deleterious effects of pharmaceuticals used at supra-MIC on human microbiota are indisputable and thoroughly studied [72], the effects of sub-MIC on microbiota or environmental communities are poorly documented. Measures of antibiotic concentrations in aquatic environment showed, in general, ng or lower µg-per-liter ranging concentrations [73,74] depending on the antibiotic and nature of water (WWTP effluent, surface water or ground water). These levels are in the same order of magnitude than MSC; so they could provoke enrichment in clinically relevant resistant bacteria, particularly if the mutations leading to resistance have low fitness cost [75]. It also appears that resistant mutants selected at sub-MIC are generally fitter than those selected at high concentrations suggesting that, in the absence of antibiotic pressure, these mutants will be more persistent in bacterial populations than those selected by high antibiotic concentration and having higher fitness cost [71].

Moreover, antibiotic residues not only allow the selection of resistant communities but also promote genetic adaptation, for instance through integron recombinations [76]. Antibiotics should therefore not only be considered as selectors for ARBs but also as resistance promoters.

2.4 Control antibiotics and resistant bacteria in aquatic environments

For most authors, limiting the use of antibiotics in animal production is the most direct route of controlling antibiotic release into the environment, and likely also antibiotic resistance. For instance, multidrug resistance rates of *Enterococcus faecium* in U.S. poultry declined from 84% to 17% following a conversion to organic feeding [77]. However, both organic and conventional cattle lagoon water contain average ARG levels about three times greater than detected in "pristine" river sediments [78]. This indicates that even under minimal antibiotic use conditions such as organic animal husbandry, there is a potential for environmental release of resistance genes. Composting, long-term storage and containment of manures associated or not to on-farm methanogenic biogas facilities could greatly reduce antibiotics and ARG concentrations in aquatic systems [79]. Of course, keeping animals healthy and animal welfare by better management practices is important to reduce antibiotics use [80], but active prevention by vaccines could be also considered. A 99% reduction in the use of antimicrobial agents in Norwegian salmon and rainbow trout aquaculture was achieved from 1987 to 2007 thanks to vaccination, despite a massive increase in fish production [81].

Sanitation and sewage treatment are other hotspots for resistance emergence, as described above for the NDM-1 gene in India, and its worldwide spread. No doubt that sewage collection and treatment protect human if we consider that it is

among the 2.6 billion people lacking access to sanitation that the higher children mortality by diarrheal diseases is observed (WHO data). Traditional WWTP are designed to remove conventional pollutants, including suspended solids, nitrogen, phosphorus, organic matter, and, to some extent, pathogens. However, WWTPs do not remove antibiotics or ARGs whom may either decreased via bacterial death or increased via HGT and/or selective enrichment. Some new technologies appear promising such as thermophilic anaerobic sludge digestion [82] and membrane separation that could be applied to retain microbial cells and their DNA [83]. Source separation sanitation is another strategy that allows separation of waste streams with specific characteristics, for instance hospital wastewater that contains high concentrations of pharmaceuticals and ARBs. The separation of urines that contain toxic compounds and solid that contain ARGs and ARBs in hospital wastewater could also be a valuable strategy [59,73]. Membrane bioreactors can partially remove antibiotics and ARBs before discharging hospital wastewaters into public sewer systems [84]. Advances in the development of such technologies are particularly required because wastewater reuse is becoming a promising strategy for water sustainability.

Control hot spots of antibiotic pollution and antibiotic resistance near hospitals and drug factories is of major concern [84] both locally and globally due to the high spread capacity of ARBs and ARGs [62]. Removing antibiotics from hospital wastewater would be easily regulated in developed countries but decisions and policy measures at the state level are needed and are pending. The effluents of antibiotic manufacturing sites should also be urgently regulated because the levels of antibiotics can reach milligram-per-liter concentrations in studied cases [52]. This is largely more than the amount of any pharmaceuticals excreted in the environment after human or animal usage. It is also urgent to collect exhaustive data because publically available data on antibiotic effluents from drug manufacturing are still very partial. This inventory would serve as basis for policy measures and for the inclusion of environmental consideration in good pharmaceutical practices.

The use of disinfectants to inactivate microbial pathogens in drinking and hospital waters has played a central role in reducing the incidence of waterborne diseases. This strategy of infection control is considered to be among the most successful interventions for preserving and promoting public health. Chlorine-based disinfectants are the most commonly used disinfectants because they are cheap and easy to use. Comparative metagenomics of drinking water treated with either free-chlorine or monochloramine showed differences in microbial community structure [86]. Concerning pathogens, *Legionella*-like genes were more abundant in the free-chlorine-treated samples while mycobacterial genes were more abundant in monochloramine-treated samples. In addition, sequences linked to antibiotic resistance mechanisms were observed in both microbial communities [86]. These data showed that biocide treatments besides killing indicator pathogens could enrich drinking water in autochthonous pathogens and in ARGs. As alternatives to chlorine and chloramines, disinfectants such as ozone, UV and nanotechnologies are gaining popularity [86]. If their efficiency to kill fecal microbes and pathogens is studied and validated, their impact on the autochthonous community and resistome is generally less evaluated. Ozone has been proposed to kill ARBs and destroy ARGs but also to perform oxidative destruction of pharmaceuticals including antibiotics [87].

In order to limit and prevent the emergence of ARBs, evaluation should be a pre-requisite before the wide use of new compounds for water treatment or for other applications leading to their bulk emission into the aquatic environment. For instance, ionic liquids considered as an "environmentally friendly" replacements for organic solvents are widely applied in modern industry and were shown to enhance HGT of ARGs in freshwater microcosms [54].

Several studies showed that chemical treatment of hospital water systems lead to a decrease of point-of-use water contamination but pathogenic bacteria such as *Legionella* sp. and *Pseudomonas* sp. re-grew after chemical shock and persisted during long-term treatment [88]. Moreover, chemical shocks performed for reducing bacterial load in water systems, such as dental care unit waterlines, could select and promote colonization by tolerant pathogens such as *P. aeruginosa* and *Achromobacter* sp. [89]. In comparison, 0.22 µm point-of-use filters limit water contamination in all cases [88]. Moreover, several studies clearly showed that point-of-use filters decrease the incidence of infection and outbreaks caused by water-associated bacteria [90,91]. This suggests that niche closure is more efficient than chemical treatments to limit the proliferation of water autochthonous pathogens.

Consequently, other more innovating strategies are proposed for pathogen niche reduction and driving ecological interactions such as competition, antagonism or predation might be efficient for the control of opportunistic pathogens in water systems [46]. As in human therapeutics, a probiotic approach for water treatment is defined as intentional inoculation of beneficial microbes or choosing conditions that select for a desirable community, which is generally the indigenous non-pathogen community. Competition could be achieved by the production of water with very low carbonaceous nutrients concentrations that allow the development of autochthonous microbial community acting as "placeholders" to close the niche for pathogen growth even after disinfection [92]. For instance, dual sand filters used for drinking water treatment processes harbored a stable bacterial community that could seed the distribution system. Control and modification of the filter community could reduce or close the niches for pathogens, i.e. the hydric pathobiome [93]. Micropredators such as bacteriophages, *Bdelovibrio* and like organisms (BALO) and amoeba as well as their association are also proposed for the control of pathogens in drinking and waste water [94].

Finally, innovating strategies integrating diverse approaches could be used as proposed by Wang et al. (2013): i) use biofilter for controlled seeding of indigenous community; ii) stop massive disinfection to protect indigenous

community; iii) apply nutrient limitation; iv) smartly design water networks; v) incorporate extreme selective predators for pathogens such as bacteriophages.

3. Respect or restore the microbiota equilibrium

3.1 Microbiota and health

The supra-organism constituted by the human body and its microbiota is governed by complex interactions between human cells and microorganisms [95,96]. Microbiota installation is concomitant with the acquisition of the adaptive immunity, the bacterial adaptation to the intestinal niche being a key stage in the maturation of the immunity because it conditions the self-tolerance, the tolerance to mutualistic bacteria and the recognition of pathogens [17,97–99].

The gut gathers both the biggest bacterial community of the human body and a major component of the immune system. For these reasons, gut microbiota equilibrium is a predictive key point for future health [100]. Many authors characterized the role of bacterial components of this community in immune, inflammatory and metabolic systems [101]. Several mechanisms of crosstalk between microbiota and immunity cells were described, with direct impacts on inflammatory regulation but also indirect correlations with many central nervous system (CNS) functions. Based on these discoveries, the description of gut-brain axis has been proposed, and brought new insights in pathophysiology of several diseases [100,102]. This axis schematizes the different interactions between microbiota, immunity, metabolic pathways and nervous system (Fig. 2). Hence, commensal bacteria and probiotics develop functional crosstalk with human cells (epithelial cells, immune cells...). Then, the gut microbiota regulates neural, endocrine, metabolic and immune pathways by upward and downward controls on Hypothalamus-Pituitary Axis (HPA) [102]. On the same principle, the skin microbiota has an influence on local immunity and acts as the first barrier against pathogens colonization [103]. Moreover, it seems that some crosstalk could exist between skin and gut microbiota, and the CNS, leading to the description of the skin-joint-gut-brain axis [104]. These intricate communications between microbiota and immunity cells is considered to be true within all human niches, such as gut, skin, respiratory tract and urogenital tract[105,106].

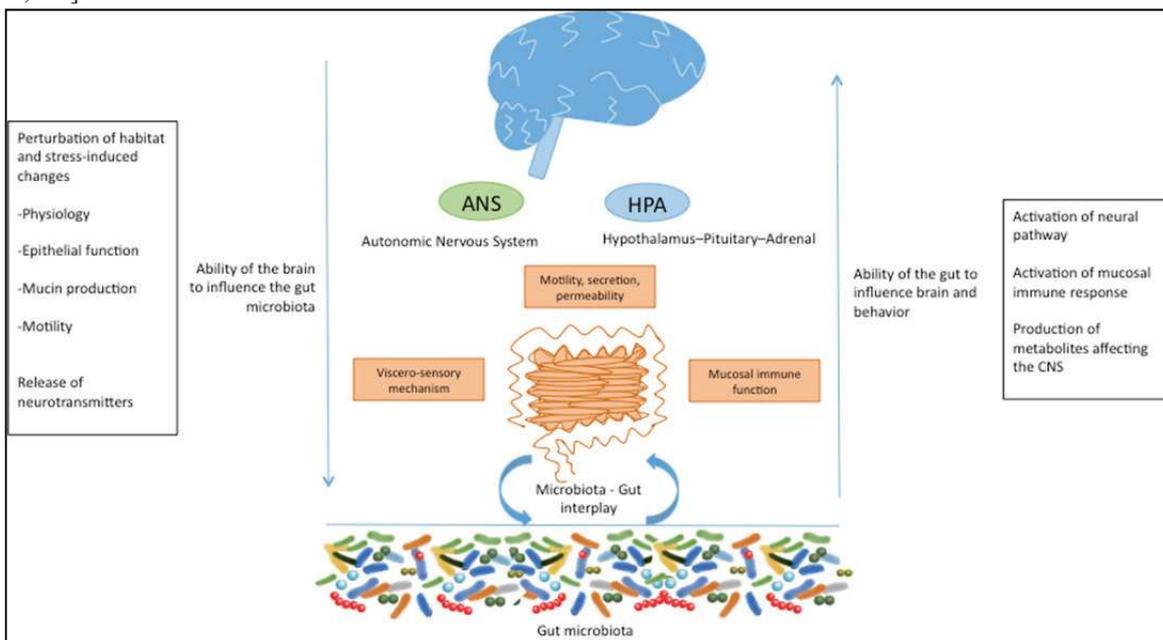


Fig. 2 Gut-brain-axis and crosstalk between microbiota and human cells.

The qualification of “supplementary organ” is particularly attributed to the gut microbiota because it plays a central role in diverse metabolic functions (carbohydrate metabolism, vitamins assimilation...). It is thus essential for several vital functions of the human body. Therefore, the gut microbiota illustrates perfectly the concept of “living together” corresponding to the symbiosis.

The precarious balance, which characterizes microbiota, is subjected to constant reorganization and regulation contributing to its equilibrium [107]. Some endogenous and exogenous factors are important to consider for maintaining this balance. Certain factors can perturb it and promote the occurrence of dysbiosis, which can lead to several pathologies such as inflammatory deregulations, metabolic disturbances or infectious diseases [95,96,107–110].

3.2 Microbiota disequilibrium and consequences

The infectiology paradigm is shifting from a classical concept in which one infection is caused by one bacterium, to a modern concept in which infection emerges from the complex phenomenon of dysbiosis. This shift comes from recent discoveries on the human-associated microbiota and increased knowledge of their composition and roles in health and diseases [21,108]. Among human-associated microbiota, gut microbiota is the more studied one. The gene catalogue for this microbiota references about 10^7 bacterial genes from 1267 subjects [111]. The gut microbiota differs among individuals by bacterial genes content, species and ecology. Three major enterotypes are described: *Bacteroidetes*, *Ruminococaceae*/*Methanobrevibacter* and *Prevotella*, according to the predominant taxa present [112]. Numerous studies also characterized different microbial patterns and their link with certain pathologies such as Crohn's disease, IBD, or CNS disorders. [24,101,102,112–114]. For example, 7 species seem to be powerful markers of liver cirrhosis [115]. Moreover, 28 rarely dominant species in healthy subjects become dominant according to the disease severity in cirrhotic patients. The gene diversity and richness of the gut microbiome can be used as a health indicator for risk detection or prediction in metabolic perturbations [116]. Indeed, the subjects harboring a low gene count in their gut microbiota have higher co-morbidities (adiposity, insulin resistance, dyslipidemia and inflammation) [117]. Moreover, the relative abundance of some species can also be an health indicator, for instance a low proportion of *Faecalibacterium prausnitzii* in the gut microbiota is a dysbiosis signature because of the anti-inflammatory properties of this species [118].

Regarding the skin microbiota, few studies have shown correlations between dysbiosis and pathologies such as psoriasis, atopic dermatitis or acne vulgaris. However, the causative links between them are not demonstrated [119]. As an example, a recent study identifies a specific 'cutanotype' involved in psoriatic lesions. It presents higher richness in *Firmicutes* and *Actinobacteria* [120] associated to a lower overall diversity compared with healthy skin microbiota. Moreover, the global diversity of the skin microbiota in psoriasis seems decreased compare to healthy skin, to the benefit of these Gram-positive phyla [120,121]. In atopic dermatitis, a high rate of *Staphylococcus aureus* carriers is found (about 90% of the patients), especially during exacerbation periods, which seems to modify the barrier effect of the skin and to promote immunity deregulations [122,123]. *S. aureus* presence is associated with a decrease of the global cutaneous microbiota diversity, a significant increase in the proportion of *Staphylococcus epidermidis* [123], and a skin colonization by Gram-negative bacilli such as *Pantoea agglomerans*, *Enterobacter cloacae*, *Chryseobacterium indologenes* and *Acinetobacter lwoffii* [124].

Even if these microbiota disequilibria are more and more documented, they need more studies in order to argue causative links with pathologies and to open new avenues in the management of immune, metabolic, neurologic or infectious pathologies.

3.3 Medical constraints, hospital environment and consequences on microbiota balance

Modern medicine and particularly, therapeutics, intensive care and surgery have increased markedly the life expectancy. The HAIs that cause significant increases of morbidity and mortality for hospitalized patients appear as the price of the modern medicine progress. One major reason for HAIs emergence is that hospital constitutes a particular environment, where unusual conditions for microbiota are present. The consequences of such unusual conditions can lead to microbiota perturbations at both individual (patients and healthcare professionals) and collective levels (unit ecosystems). Among these conditions, the organization of certain units, with pair rooms and several beds rooms exerts a demographic pressure on the patients' microbiota and ecosystems of the unit [125–128]. These conditions are particularly marked in long-stay wards such as gerontology units, or in always-booked units such as in neonatology wards or ICUs [125,127,128]. The physical conditions such as temperature or bed rest are also unusual pressures exerted on microbiota. Moreover, the barrier disruption and the physical aggressions provided by invasive medical devices injured the local conditions of the microbiota and perturb their balance. In the particular case of the surgery, other unusual conditions can perturb microbiota, such as the preoperative length of stay, the stress regarding the surgical intervention and the intensive cares, the use of medical devices and preoperative preparation and antimicrobial prophylaxis [129–132].

3.4 To control HAIs while avoiding microbial resistance

The battle against HAIs is a priority to ensure safety of patients. Since the 1980's, there are 2 major axes for HAIs control, which were the use of efficient antimicrobial agents and the prevention by implementation of hygiene measures [133].

Round 1: antimicrobial agents to treat HAIs and microbes counter-attack

The use of antimicrobial agents such as antibiotic and antiseptic uses, or disinfecting cleaners led to selective conditions that promote the development of bacterial mechanisms of resistance and favor the constitution of resistome within the hospital/patient ecosystems [125–128,130,134–138]. Then, the major consequences of antibiotic administration are a decrease in the bacterial diversity, an increase in the bacterial resistances to antibiotic molecules, and a potential selective effect on pathogenic bacteria. Because hospital acts as an epidemiology amplifier, resistant pathogens emerge in hospital and then diffuse in the community. Consequently, MDR bacteria considerably increased

in past few years, with the emergence of hospital-acquired and community-acquired methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA), vancomycin-resistant *Enterococcus* (VRE), extended-spectrum β -lactamase (ESBL)- and carbapenemase-producing enterobacteria (CPE)... For instances, among Gram-negative species, *E. coli* isolates are frequently ESBL producers, *Klebsiella pneumoniae* strains are more and more resistant to carbapenems, antibiotic molecules that are usually active against MDR bacterial infections, and about 10% of *P. aeruginosa* are carbapenem-resistant, and usually MDR. [133].

Round 2: hygiene measures to prevent HAI and microbes counter-attack

The second strategy of battle against HAI is the prevention. Hygiene measures are based on the careful application of best medical and nursing practices in a safe healthcare environment. However, best hygiene practices are often incompatible with hospital overbooking and daily constraints faced by healthcare workers. To help for the application of hygiene measure, more and more agents that are aggressive for microbiota and ecosystems are used. One example among many, repeated hand hygiene and glove wearing by healthcare workers modify their hand physiological conditions with higher dryness and decrease of lipid secretion. These practices linked to the care activities decrease the barrier effects of the skin with irritation and micro wounds, and lead to a modification of the skin microbiota and a possible colonization by more resistant bacteria from exogenous sources [139,140]. Another example, recent clinical studies are controversial concerning the efficiency of chlorhexidine for daily bathing of ICU patients compared to water-and-soap bathing to prevent HAIs [141–143]. Chlorhexidine bathing leads to a shift of skin microbiota with a reduced rate of gram-negative bacteria compared to water-and-soap bathing [143]. The decrease of gram-negative bacteria such as enterobacteria and nonfermenting bacilli could explain the decrease of HAI incidence after chlorhexidine bathing [143]. However, gram-negative bacteria are also major resident of the normal skin microbiota and are probably involved in the fine-tuning of the skin homeostasis [18]. Consequently, the shift of microbiota caused by chlorhexidine could lead to functional disequilibrium of the skin barrier. Last example, the consequences of the overuse of biocides in hospital water networks have been evoked in the paragraph 2.

Round 3: towards strategies of HAIs control that limit microbes counter-attacks

Curative and preventive use of antibiotics and biocides constitute stresses on microbiota contributing to disturbances and disequilibrium, themselves promoting the emergence of multidrug resistance phenotypes [144,145]. Consequently, more conservative management preserving the microbiota equilibrium are in progress as probiotic and prebiotic use. An effort consisting in a more adapted and targeted utilization of antibiotics and biocides contributes to the commensal microbial communities respect [146]. For examples, recently, some hygiene surgery practices have changed, taking away antiseptic shower replaced by a simple soap shower.

Negative impacts of medicine practices on microbial ecology are more and more studied and understood. Consequently, conserving mutualist communities is now considered in the management of patients to preserve or restore the structure and functions of the patients' microbiota and to prevent the risk of emergence of resistant strains. With this in mind, the old concept of microbiotherapy, i.e., the use of microorganisms to improve host health, has renewed interest. One example is the widely use of probiotics, prebiotics and symbiotics in anti-infective indications, as well as for restoration of immunity disorders [147]. Another alternative approach is the modification of abnormal gut microbiota by faecal transplantation. This strategy is only indicated for *C. difficile* recurrent infections [148]. Because microbiota has a critical position in the transition towards chronic immune diseases, stool transplantation could also contribute to correct immunity imbalance or be beneficial in some diseases (IBD, Crohn's disease, obesity, liver cirrhosis, side effects of antitumor chemotherapy...), but such practices still need more approval standardization [149]. Prebiotics, probiotics and symbiotics act as modulators of the microbiota but other biotherapy agents are predators for bacteria and can be used directly in the infectious site, such infected wounds. "*Bdellovibrio* and like organisms" (BALO) are small gram-negative bacteria that are predators against other gram-negative bacteria species such as *E. coli* and *P. aeruginosa* [150]. Some patents are currently deposited for treatment and prevention of infections by BALO attack. In addition to BALO, bacteriophages are included in the treatment regimen for synergistic effects [151]. As also described for CF treatments (see paragraphe 4.4), the use of bacteriophages in phagotherapy strategy is more and more evoked to replace or complement antimicrobial chemotherapy [152]. The use of phagotherapy is particularly suggested for treatment of infected burn wounds and other HAI caused mainly by *P. aeruginosa*, *S. aureus* and *A. baumannii* [152]. Amoeba are natural grazer of bacteria that act similarly to human phagocytes for destroying bacteria. Certain species such as *Dictyostelium discoideum* has been proposed in treatment of infections caused by bacteria, even MDR strains [151]. It is supposed that contrarily to antibiotics, which kill bacteria but leave toxic bacterial compounds such as endotoxin in the infection site, amoeba consume totally the bacteria and promote healing.

4. Pathobiome of chronic pulmonary infections in cystic fibrosis: a new concept for new weapons

4.1 Context

In the context of increasing investigation of the role of human microbiota in health and diseases, the majority of studies focused on the gut microbiota and several types of disequilibrium have been demonstrated in pathologic situations like

IBD [153,154]. On the other hand, studies showing that systemic inflammation could be abrogated with the administration of broad-spectrum antibiotics underlined the link between microorganisms and inflammatory processes in such chronic diseases [155]. Regarding the respiratory tract, composition and diversity of the airway microbiota has received less attention. However, several studies suggest that observations similar to those made at the gut level could be valuable at the respiratory tract level during chronic respiratory diseases, particularly that dysbiosis and perturbed host-microbe interactions may have a critical role in controlling respiratory immune homeostasis and ultimately airway chronic inflammation and disease progression [105,156]. Studies were mainly conducted in Cystic Fibrosis (CF), chronic obstructive pulmonary disease and asthmatic patients [157–159]. We choose hereafter the CF disease as a model of chronic infection with complex pathogenesis warranting new therapeutic strategies designed to target altered microbiota and its implications.

4.2 CF respiratory tract infection, a chronic polymicrobial disease with complex pathophysiology

CF is a potentially lethal genetic disease with multiorgan pathology. CF respiratory tract (CFRT) is mainly affected with production of thick and sticky mucus in the patient airways, immune local inflammation and abnormal microbial colonization. Direct exposure to environmental microorganisms and to endogenous microbiota from gut and oropharynx is thought to represent the source for initial establishment and further maintain of lung microbiome [158]. Disease evolution is punctuated by repeated pulmonary exacerbations associated with progressive decline in lung function and ultimately death. A modest number of bacterial pathogens, mainly from environmental origin and acting as opportunistic pathogens correlates with pulmonary function decline [160]. Among them, *Pseudomonas aeruginosa* and the *Burkholderia cepacia* complex are the most studied. However, several other non-fermentative Gram-negative bacilli such as *Achromobacter* species, *Burkholderia gladioli*, *Ralstonia mannitolilytica*, *Stenotrophomonas maltophilia*, and *Pandora* species are problematic emerging pathogens, cumulatively infecting approximately 25% of people with CF and being especially resistant to therapy [161–163]. These pathogens also display ability to chronically colonize the CFRT, to form biofilm and to generate inflammation level similar to that induced by *P. aeruginosa* [161]. Moreover, both cultivation-based and -independent methods evidence that CF airway infection is rather a polymicrobial disease [164]. Altered composition of the CFRT microbiota encompasses a reduced overall diversity, an increased rate of *Proteobacteria* and *Firmicutes*, and a decrease of *Bacteroidetes* [158]. On the other hand, specific and/or unexpected sequences as well as atypical microorganisms are found in the CFRT [164–166]. In this context, bacterial richness has been correlated to lung function and significant difference in the microbiota diversity between acute exacerbation and clinical stability has been demonstrated [167]. Certain genera / species are suspected to have important roles in driving change in airway bacterial community composition at exacerbation like members of the genus *Gemella* or of the *Streptococcus milleri* group [168–170].

4.3 CF respiratory tract infection, a valuable model to be considered in light of the pathobiome concept

It is however highly probable that more complex perturbations than those of the microbiota occur in the CF airways that represent a particular niche where multiple biotic but also abiotic selective pressures drive bacterial selection and adaptation. Among complex and intricate constraints in the CFRT niche, the most notable are the altered osmotic pressure, immunological defenses and inflammation, and the repeated antimicrobial treatments. Indeed, patients receive various combinations of oral, inhaled and intravenous antibiotics either directed towards specific pathogens or as regular long-term antibiotics in an attempt to prevent infections or to lower bacterial load. Under such a panel of selective pressures, it has been proposed that transition from stable disease to exacerbated status are occasions of dysbiosis and that dysbiosis provokes a dysregulated host immune response which in turn alters growth conditions for microbes in airways promoting further dysbiosis and perpetuating a cycle of inflammation and disordered microbiota [171]. A community study suggests that exacerbations may not necessarily be associated with specific changes in airway bacterial communities but may be associated with changes in only a few operational taxonomic units (OTUs) and/or very minor changes in several OTUs, or may result primarily from host-specific factors such as the nature and degree of inflammatory response to some as yet undefined stimuli [172]. Another study postulates the existence of two major functional communities; a virulent attack community consisting of transient viral and microbial populations that induces strong innate immune response creating microenvironments that facilitate the establishment of a climax community that is slower-growing and inherently resistant to antibiotic therapy [173]. Acute pulmonary exacerbations can then result from aggressively growing revertants derived from slowly growing, endogenous microbial populations, or from a change in bacterial gene expression eliciting stronger immune responses [173].

In such episodes of dysbiosis, perturbed microbes-microbes but also microbes-host interactions may play a crucial role in the disease progression [174]. Studies conducted in animal lung infection model or in *Drosophila* suggested an important contribution of the host microbiota to *P. aeruginosa* infection. Regarding oropharyngeal microbiota usually considered as commensal or mutualistic but avirulent, interactions with pathogenic *P. aeruginosa* isolated from sputum samples of CF patients enhanced lung damage compared to *P. aeruginosa* alone, *P. aeruginosa* virulence gene expression being modulated by host microbiota through interspecies communication mediated by autoinducer-2 [168], [175]. A similar observation has been made for the association of two species of the oropharyngeal microbiota,

Streptococcus constellatus (*S. milleri* group) and *Prevotella intermedia* that induced a 6-fold higher mortality rate than that obtained by each microorganism [176]. Over time, antimicrobial therapy became ineffective in pathogen eradication independently of the suitability of antibiotics and antimicrobial susceptibility patterns of the pathogen identified by standard microbiological cultivation-based diagnosis. This could be attributed to altered drug pharmacokinetics in these patients and to several adaptive and protective features developed by the pathogens such as biofilm and small variant colony formation.

As a global illustration of such a complex evolution of the CF respiratory pathobiome, Figure 3 presents the evolution of cultivable microbial community in terms of species diversity, load and genotype in successive sputum samples of a CF patient with chronic colonization by *Achromobacter xylosoxidans* according to clinical status and antibiotic courses. A highly dynamic community is demonstrated despite low impact of antimicrobial agents against dominant species and major changes in both diversity and load of pathogens are observed over time according to clinical stability or pulmonary exacerbation.

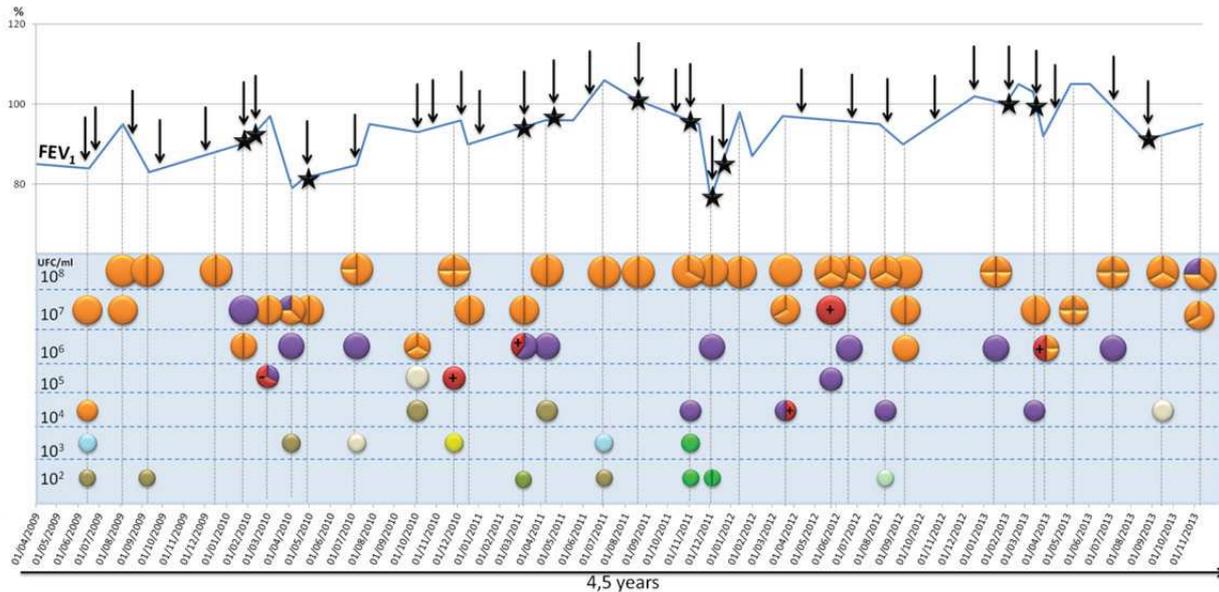


Fig. 3 Community composition and evolution in sputum according to forced expiratory volume in 1 second (FEV₁) for a 13 year-old patient chronically colonized by *A. xylosoxidans*. Data are represented for each sputum vertically: sampling date is indicated at the bottom of the figure. Pathogens are indicated according to color code below and load (left scale in colony forming unit (CFU)/ml.). Circles separated in different parts indicate different species (bicolor) or different colonial morphotypes (unicolor). +/- represents the presence or absence of β -lactamase production for *Haemophilus influenzae*.

- ★ Exacerbation — FEV₁ ↓ Antibiotic course
- *Achromobacter xylosoxidans* ● *Pseudomonas aeruginosa* ● *Serratia* sp. ● *Enterobacter cloacae* ● *Penicillium* sp.
- *Staphylococcus aureus* ● *Haemophilus influenzae* ● *Pseudomonas putida* ● *Candida albicans* ● *Aspergillus fumigatus*

4.4 Battle against CF respiratory tract infection, a multifaceted challenge

Current strategies include antimicrobial therapy administered orally, by inhalation and/or intravenously aiming at eradicate pathogen in early stages of the disease and then at decrease bacterial load and nebulization to favor mucociliary clearance always associated to physiotherapy. Specific drugs are used for their anti-inflammatory effects like azithromycin that interferes with quorum-sensing-dependent virulence factor production, biofilm formation, and oxidative stress resistance in *P. aeruginosa* [177]. Such strategies disrupting coordinated bacterial behavior have a real benefit for the patients and the potential to increase the efficacy of currently available antibiotic drugs [178]. Despite sputum sensitivities may be discordant with the outcome of antibiotic treatment in the patient, once more highlighting the high complexity of the infectious processes in CF, these strategies led to an overall increase in life expectancy during the past decades [179].

However, more recent knowledge on CF respiratory tract infections, notably showing differences in the composition of baseline microbiota and microbiota at pulmonary exacerbation, suggests that novel targets could be considered for therapeutic intervention. News strategies aiming at modulate local inflammation and/or at restore a balanced airway microbiota and/or at counteract altered microorganism interactions have to be considered in this context [180]. For this purpose, a direct approach by using inhaled probiotics [181] or an indirect approach considering interactions between gut and respiratory microbiota via modulation of gut microbiota by ingested probiotics [182] appear promising. Indeed, several studies show the impact of diet on airway microbiota dysbiosis and the modulation of gut microbiota on the frequency of pulmonary exacerbations [166]. Simultaneously, a renewed interest in phage therapy as an alternative or

complement to conventional antibiotic therapy has emerged based on efficacy of bacteriophage therapy in a model of pulmonary infection against CF pathogens such as life-threatening opportunistic bacterial pathogen *Burkholderia cenocepacia* [184].

Finally, unexpected antimicrobial effect has been recently demonstrated for hypertonic saline as yet though to act through mucus rehydration, mucociliary clearance improvement, anti-inflammatory activity and indirect effects by activation of antimicrobial peptides. Beneficial effects of hypertonic saline nebulization on lung function in reducing exacerbations or on the perception of effectiveness of chest physiotherapy may also at least in part be linked to bacterial growth inhibition or killing, biofilm formation inhibition or biofilm disruption, and motility inhibition demonstrated on *P. aeruginosa* isolates behind the concentration used in therapeutics [185].

4.5 Conclusion

Complexity of CF respiratory tract infection pathogenesis confers meaning to the concept of pathobiome and the CFTR microbiome could be considered as a pathogenic complex or a “metapathogen” in this context. This methapathogen thus represents a new target for adapted anti-infectious strategies. New therapeutic strategies that probably will have to be used as complementary weapons against disease have to be designed to target complex modifications of the diversity of the respiratory tract microbiota during airway diseases, to normalize perturbed interactions between microorganisms and between microbes and host cells, and to directly or indirectly modulate airway inflammation. However, if bacterial community has been extensively studied, more global studies are still needed because virobiota and fungal communities have received less attention, as it is also the case for antimicrobial host defenses.

5. Concluding remarks

The three examples of pathobiome developed in this chapter were chosen for their importance in human health but also because they illustrated the shift to the ecological vision of infectious diseases. These examples show that environmental and clinical microbiologies should fuse in a continuum of disciplines because, today, they share concepts, approaches and issues.

The major research concern is now to understand the ecological and evolutionary pressures that shape microbial communities. It is critically important for the optimal use of current anti-infectious agents and for the development of the new strategies evoked herein. New strategies could be gathered with the following objective: changing conditions across the entire environmental and human microbiome continuum to promote the maintenance or the re-establishment of optimal communities, i.e., reduce or close pathobiomes. This is no less than a refoundation of applied and clinical microbiology in the actual complexity of the microbial life. Today, metagenomic data invade scientific databanks but integration of these data in experimental, medical or applicative approaches face barriers, which are the lacks of indicators, parameters and models easily applicable to interpret data and predict risks. This is particularly true for epidemiological surveillances in environment or hospital, and for improving the rationale of infection prevention and patient treatment. Future effort is recommended to demonstrate the feasibility of the pathobiome reduction strategies by the development of effective, practical, and safe protocols.

As for other major global issues of the 21st century, the programmed end of antibiotics is not only a scientific concern but also a cultural and political issue. The example of phage therapy in the 20th century is particularly emblematic. Phage therapy has been used for decades in USSR but subjected to multiple hindrances in USA and Western Europe, countries where the chemical/pharmaceutical lobby is powerful. Consequently, since the ‘rediscovery’ of phages by western scientist 20 years ago, not a single phase III clinical trial has taken place. The battle against infectious diseases and antimicrobial resistance is now a global ecological challenge and thereby it needs to adopt a global plan that should surpass individual and national priorities. Our predicted defeat should force us to slow and stop the arm race against microbes. The consideration of microbes in their ecological dimension in order to reduce the pathobiomes (or to avoid their construction) is a research avenue that deserves urgent developments. Paradoxically, this global challenge will probably go through the development of the personalized medicine, which will consider each patient’s genome, microbiome and environmental conditions for prevention and treatment of infectious diseases and more largely of all other diseases involving dysbiotic microbiome.

References

- [1] Koch R. An address on bacteriological research. *British Medicine Journal*. 1890; 2(1546):380-383.
- [2] Falkow S. Molecular Koch’s postulates applied to microbial pathogenicity. *Review in Infectious Diseases*. 1988; 10:S274-276
- [3] Jacob F, Wollman E. *Sexuality and the genetics of bacteria*. Academic Press. New York: 1961.
- [4] Quinn RA, Whiteson K, Lim Y-W, Salamon P, Bailey B, Mienardi S, Sanchez SE, Blake D, Conrad D, Rohwer F. A Winogradsky-based culture system shows an association between microbial fermentation and cystic fibrosis exacerbation. *The ISME Journal*. 2015; 9:1024-1038.

- [5] Winogradsky S. *La biologie du sol*. Le Mans. Paris: Imprimerie Monnoyer; 1931.
- [6] Rondon MR, August PR, Bettermann AD, Brady SF, Grossman TH, Liles MR, Loiacono KA, Lynch BA, MacNeil IA, Minor C, Tiong CL, Gilman M, Osburne MS, Clardy J, Handelsman J, Goodman RM. Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*. 2000; 66:2541-2547.
- [7] Oulas A, Pavlouidi C, Polymenakou P, Pavlopoulos GA, Papanikolaou N, Kotoulas G, Arvanitidis C, Iliopoulos I. Metagenomics: tools and insights for analyzing next-generation sequencing data derived from biodiversity studies. *Bioinformatics and Biology Insights*. 2015; 9:75-88.
- [8] Handelsman J, Rondon MR, Brady SF, Clardy J, Goodman RM. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chemical Biology*. 1998; 5:R245-249.
- [9] Ong SH, Kukkillaya VU, Wilm A, Lay C, Ho EXP, Low L, Hibberd ML, Nagarajan N. Species identification and profiling of complex microbial communities using shotgun Illumina sequencing of 16S rRNA amplicon sequences. *PLoS ONE*. 2013; 8:e60811.
- [10] Handelsman J. Metagenomics is not enough. *DNA and Cell Biology*. 2008; 27:219-221.
- [11] Johnson ZI, Martiny AC. Techniques for quantifying phytoplankton biodiversity. *Annual Review in Marine Sciences*. 2015; 7:299-324.
- [12] Mathieu A, Delmont TO, Vogel TM, Robe P, Nalin R, Simonet P. Life on human surfaces: skin metagenomics. *PLoS ONE*. 2013; 8:e65288.
- [13] Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, Nielsen T, Pons N, Levenez F, Yamada T, Mende DR, Li J, Xu J, Li S, Li D, Cao J, Wang B, Liang H, Zheng H, Xie Y, Tap J, Lepage P, Bertalan M, Batto J-M, Hansen T, Le Paslier D, Linneberg A, Nielsen HB, Pelletier E, Renault P, Sicheritz-Ponten T, Turner K, Zhu H, Yu C, Li S, Jian M, Zhou Y, Li Y, Zhang X, Li S, Qin N, Yang H, Wang J, Brunak S, Doré J, Guarner F, Kristiansen K, Pedersen O, Parkhill J, Weissenbach J, MetaHIT Consortium, Bork P, Ehrlich SD, Wang J. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*. 2010; 464:59-65.
- [14] Hoffmann C, Dollive S, Grunberg S, Chen J, Li H, Wu GD, Lewis JD, Bushman FD. Archaea and fungi of the human gut microbiome: correlations with diet and bacterial residents. *PLoS ONE*. 2013; 8:e66019.
- [15] Foulongne V, Sauvage V, Hebert C, Dereure O, Cheval J, Gouilh MA, Pariente K, Segondy M, Burguière A, Manuguerra J-C, Caro V, Eloit M. Human skin microbiota: high diversity of DNA viruses identified on the human skin by high throughput sequencing. *PLoS One*. 2012; 7: 8499.
- [16] Aujoulat F, Roudière L, Picaud J-C, Jacquot A, Filleron A, Neveu D, Baum T-P, Marchandin H, Jumas-Bilak E. Temporal dynamics of the very premature infant gut dominant microbiota. *BMC Microbiology*. 2014; 14:2320.
- [17] Collado MC, Cernada M, Bäuierl C, Vento M, Pérez-Martínez G. Microbial ecology and host-microbiota interactions during early life stages. *Gut Microbes*. 2012; 3:352-365.
- [18] Grice EA, Kong HH, Conlan S, Deming CB, Davis J, Young AC, Bouffard GG, Blakesley RW, Murray PR, Green ED, Turner ML, Segre JA. Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome. *Science*. 2009; 324:1190-1192.
- [19] Zhang Z, Geng J, Tang X, Fan H, Xu J, Wen X, Ma ZS, Shi P. Spatial heterogeneity and co-occurrence patterns of human mucosal-associated intestinal microbiota. *The ISME Journal*. 2014; 8:881-893.
- [20] Ottman N, Smidt H, de Vos WM, Belzer C. The function of our microbiota: who is out there and what do they do? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2012; 2:104.
- [21] Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*. 2012; 486:207-214.
- [22] Kau AL, Ahern PP, Griffin NW, Goodman AL, Gordon JI. Human nutrition, the gut microbiome and the immune system. *Nature*. 2011; 474:327-336.
- [23] Maurice CF, Haiser HJ, Turnbaugh PJ. Xenobiotics shape the physiology and gene expression of the active human gut microbiome. *Cell*. 2013; 152:39-50.
- [24] Turnbaugh PJ, Ridaura VK, Faith JJ, Rey FE, Knight R, Gordon JI. The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice. *Science of Translational Medicine*. 2009; 1:6ra14.
- [25] Bushman FD, Lewis JD, Wu GD. Diet, gut enterotypes and health: is there a link? *Nestle Nutritional Institute Workshop*. 2013; 77:65-73.
- [26] Wu GD, Chen J, Hoffmann C, Bittinger K, Chen Y-Y, Keilbaugh SA, Bewtra M, Knights D, Walters WA, Knight R, Sinha R, Gilroy E, Gupta K, Baldassano R, Nessel L, Li H, Bushman FD, Lewis JD. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science*. 2011; 334:105-108.
- [27] Dethlefsen L, McFall-Ngai M, Relman DA. An ecological and evolutionary perspective on human-microbe mutualism and disease. *Nature*. 2007; 449:811-818.
- [28] Dethlefsen L, Relman DA. Incomplete recovery and individualized responses of the human distal gut microbiota to repeated antibiotic perturbation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011; 108(S1):4554-4561.
- [29] Antonelli E, Baldoni M, Giovenali P, Villanacci V, Essatari M, Bassotti G. Intestinal superinfections in patients with inflammatory bowel diseases. *Journal of Crohns Colitis*. 2012; 6:154-159.
- [30] Cohen AD, Dreijer J, Birkenfeld S. Psoriasis associated with ulcerative colitis and Crohn's disease. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 2009; 23:561-565.
- [31] Scher JU, Ubeda C, Artacho A, Attur M, Isaac S, Reddy SM, Marmon S, Neimann A, Brusca S, Patel T, Manasson J, Pamer EG, Littman DR, Abramson SB. Decreased bacterial diversity characterizes the altered gut microbiota in patients with psoriatic arthritis, resembling dysbiosis in inflammatory bowel disease. *Arthritis & Rheumatology*. 2015; 67:128-139.
- [32] Giongo A, Gano KA, Crabb DB, Mukherjee N, Novelo LL, Casella G, Drew JC, Ilonen J, Knip M, Hyöty H, Veijola R, Simell T, Simell O, Neu J, Wasserfall CH, Schatz D, Atkinson MA, Triplett EW. Toward defining the autoimmune microbiome for

- type 1 diabetes. *The ISME Journal*. 2011; 5:82-91.
- [33] Devaraj S, Hemarajata P, Versalovic J. The human gut microbiome and body metabolism: implications for obesity and diabetes. *Clinical Chemotherapy*. 2013; 59:617-628.
- [34] Khan FY, Elzouki A-N. *Clostridium difficile* infection: a review of the literature. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 2014; 7(S1):S6-S13.
- [35] Kalra A, Palcu CT, Sobel JD, Akins RA. Bacterial vaginosis: culture- and PCR-based characterizations of a complex polymicrobial disease's pathobiology. *Current Infectious Diseases Report*. 2007; 9:485-500.
- [36] Twin J, Bradshaw CS, Garland SM, Fairley CK, Fethers K, Tabrizi SN. The potential of metatranscriptomics for identifying screening targets for bacterial vaginosis. *PLoS ONE*. 2013; 8:e76892.
- [37] Bonhomme C, Gervais C, Laurencin D. Recent NMR developments applied to organic-inorganic materials. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*. 2014; 77:1-48.
- [38] Leimbach A, Hacker J, Dobrindt U. *E. coli* as an all-rounder: the thin line between commensalism and pathogenicity. *Current Topic in Microbioly and Immunology*. 2013; 358:3-32.
- [39] Aujoulat F, Roger F, Bourdier A, Lotthé A, Lamy B, Marchandin H, Jumas-Bilak E. From environment to man: genome evolution and adaptation of human opportunistic bacterial pathogens. *Genes*. 2012; 3:191-232.
- [40] Jackson RW, Johnson LJ, Clarke SR, Arnold DL. Bacterial pathogen evolution: breaking news. *Trends in Genetic*. 2011; 27:32-40.
- [41] Moliner C, Fournier P-E, Raoult D. Genome analysis of microorganisms living in amoebae reveals a melting pot of evolution. *FEMS Microbiology Review*. 2010; 34:281-294.
- [42] Waterfield NR, Wren BW, Ffrench-Constant RH. Invertebrates as a source of emerging human pathogens. *Nature Review in Microbiology*. 2004; 2:833-841.
- [43] World Health Organization. WHO | Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014. [Internet]. WHO. [cited: 2015 Jul 2]. Available from: <http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/>.
- [44] Diard M, Sellin ME, Dolowschiak T, Arnoldini M, Ackermann M, Hardt W-D. Antibiotic treatment selects for cooperative virulence of *Salmonella typhimurium*. *Current Biology*. 2014; 24:2000-2005.
- [45] Farnleitner AH, Wilhartitz I, Ryzinska G, Kirschner AKT, Stadler H, Burtscher MM, Hornek R, Szewzyk U, Herndl G, Mach RL. Bacterial dynamics in spring water of alpine karst aquifers indicates the presence of stable autochthonous microbial endokarst communities. *Environmental Microbiology*. 2005; 7:1248-1259.
- [46] Wang H, Edwards MA, Falkinham JO, Pruden A. Probiotic approach to pathogen control in premise plumbing systems? A review. *Environmental Science & Technology*. 2013; 47:10117-10128.
- [47] Baquero F, Martínez J-L, Cantón R. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Current Opinion in Biotechnology*. 2008; 19(3):260-265.
- [48] Kümmerer K. The presence of pharmaceuticals in the environment due to human use--present knowledge and future challenges. *Journal of Environmental Management*. 2009; 90:2354-2366.
- [49] Ding C, He J. Effect of antibiotics in the environment on microbial populations. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2010; 87:925-941.
- [50] Szczepanowski R, Linke B, Krahn I, Gartemann K-H, Gützkow T, Eichler W, Pühler A, Schlüter A. Detection of 140 clinically relevant antibiotic-resistance genes in the plasmid metagenome of wastewater treatment plant bacteria showing reduced susceptibility to selected antibiotics. *Microbiology*. 2009; 155:2306-2319.
- [51] Auerbach EA, Seyfried EE, McMahon KD. Tetracycline resistance genes in activated sludge wastewater treatment plants. *Water Research*. 2007; 41:1143-1151.
- [52] Kristiansson E, Fick J, Janzon A, Grabic R, Rutgersson C, Weijdegård B, Söderström H, Larsson DGJ. Pyrosequencing of antibiotic-contaminated river sediments reveals high levels of resistance and gene transfer elements. *PLoS ONE*. 2011; 6:e17038.
- [53] Baker-Austin C, Wright MS, Stepanauskas R, McArthur JV. Co-selection of antibiotic and metal resistance. *Trends in Microbiology*. 2006; 14:176-182.
- [54] Wang Q, Mao D, Mu Q, Luo Y. Enhanced horizontal transfer of antibiotic resistance genes in freshwater microcosms induced by an ionic liquid. *PLoS ONE*. 2015; 10:e0126784.
- [55] Alonso A, Rojo F, Martínez JL. Environmental and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* show pathogenic and biodegradative properties irrespective of their origin. *Environmental Microbiology*. 1999; 1:421-430.
- [56] Aujoulat F, Romano-Bertrand S, Masnou A, Marchandin H, Jumas-Bilak E. Niches, population structure and genome reduction in *Ochrobactrum intermedium*: clues to technology-driven emergence of pathogens. *PLoS ONE*. 2014; 9:e83376.
- [57] Wellington EMH, Boxall AB, Cross P, Feil EJ, Gaze WH, Hawkey PM, Johnson-Rollings AS, Jones DL, Lee NM, Otten W, Thomas CM, Williams AP. The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in gram-negative bacteria. *Lancet Infectious Diseases*. 2013; 13:155-165.
- [58] Lupo A, Coyne S, Berendonk TU. Origin and evolution of antibiotic resistance: the common mechanisms of emergence and spread in water bodies. *Frontiers in Microbiology*. 2012; 3:18.
- [59] Martinez JL. The role of natural environments in the evolution of resistance traits in pathogenic bacteria. *Proceedings Biological Sciences*. 2009; 276:2521-2530.
- [60] Wright GD. Antibiotic resistance in the environment: a link to the clinic? *Current Opinion in Microbiology*. 2010; 13:589-594.
- [61] Walsh TR, Weeks J, Livermore DM, Toleman MA. Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study. *Lancet Infectious Diseases*. 2011; 11:355-362.
- [62] Berrazeg M, Diene S, Medjahed L, Parola P, Drissi M, Raoult D, Rolain J. New Delhi Metallo-beta-lactamase around the world: an eReview using Google Maps. *Euro Surveillance*. 2014; 19(20).

- [63] Venier A-G, Leroyer C, Slekovec C, Talon D, Bertrand X, Parer S, Alfandari S, Guerin J-M, Megarbane B, Lawrence C, Clair B, Lepape A, Perraud M, Cassier P, Trivier D, Boyer A, Dubois V, Asselineau J, Rogues A-M, Thiébaud R, DYNAPYO study group. Risk factors for *Pseudomonas aeruginosa* acquisition in intensive care units: a prospective multicentre study. *Journal of Hospital Infection*. 2014; 88:103-108.
- [64] Romano S, Bourdier A, Parer S, Masnou A, Burgel L, Raczka F, Lamy B, Jumas-Bilak E, Lotthé A. Peripheral venous catheter and bloodstream infection caused by *Pseudomonas aeruginosa* after a contaminated preoperative shower. *Infection Control and Hospital Epidemiology*. 2013; 34:544-546.
- [65] Lavenir R, Sanroma M, Gibert S, Crouzet O, Laurent F, Kravtsoff J, Mazoyer M-A, Courmoyer B. Spatio-temporal analysis of infra-specific genetic variations among a *Pseudomonas aeruginosa* water network hospital population: invasion and selection of clonal complexes. *Journal of Applied Microbiology*. 2008; 105:1491-1501.
- [66] Flores Ribeiro A, Bodilis J, Alonso L, Buquet S, Feuilloley M, Dupont J-P, Pawlak B. Occurrence of multi-antibiotic resistant *Pseudomonas* spp. in drinking water produced from karstic hydrosystems. *The Science of the Total Environment*. 2014; 490:370-378.
- [67] Martínez JL, Baquero F. Emergence and spread of antibiotic resistance: setting a parameter space. *Upsala Journal of Medical Science*. 2014; 119:68-77.
- [68] Tello A, Austin B, Telfer TC. Selective pressure of antibiotic pollution on bacteria of importance to public health. *Environmental Health Perspectives*. 2012; 120:1100-1106.
- [69] BIO Intelligence Service. Study on the environmental risks of medicinal products, Final Report prepared for Executive Agency for Health and Consumers. 2013. [Internet]. Executive Agency for Health and Consumers. [cited: 2015 Jul 2]. Available from: http://ec.europa.eu/health/files/environment/study_environment.pdf.
- [70] Odenholt I. Pharmacodynamic effects of subinhibitory antibiotic concentrations. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2001; 17:1-8.
- [71] Sandegren L. Selection of antibiotic resistance at very low antibiotic concentrations. *Upsala Journal of Medical Sciences*. 2014; 119:103-107.
- [72] Morgun A, Dzutsev A, Dong X, Greer RL, Sexton DJ, Ravel J, Schuster M, Hsiao W, Matzinger P, Shulzhenko N. Uncovering effects of antibiotics on the host and microbiota using transkingdom gene networks. *Gut*. 2015.
- [73] Watkinson AJ, Murby EJ, Kolpin DW, Costanzo SD. The occurrence of antibiotics in an urban watershed: from wastewater to drinking water. *The Science of the Total Environment*. 2009; 407:2711-2723.
- [74] Kümmerer K. Antibiotics in the aquatic environment--a review--part I. *Chemosphere*. 2009; 75:417-434.
- [75] Gullberg E, Cao S, Berg OG, Ilbäck C, Sandegren L, Hughes D, Andersson DI. Selection of resistant bacteria at very low antibiotic concentrations. *PLoS Pathogens*. 2011; 7:e1002158.
- [76] Guerin E, Cambray G, Sanchez-Alberola N, Campoy S, Erill I, Da Re S, Gonzalez-Zorn B, Barbé J, Ploy M-C, Mazel D. The SOS response controls integron recombination. *Science*. 2009; 324:1034.
- [77] Sapkota AR, Hulet RM, Zhang G, McDermott P, Kinney EL, Schwab KJ, Joseph SW. Lower prevalence of antibiotic-resistant Enterococci on U.S. conventional poultry farms that transitioned to organic practices. *Environmental Health Perspectives*. 2011; 119:1622-1628.
- [78] Pruden A, Arabi M, Storteboom HN. Correlation between upstream human activities and riverine antibiotic resistance genes. *Environmental Science Technology*. 2012; 46:11541-11549.
- [79] Chee-Sanford JC, Mackie RI, Koike S, Krapac IG, Lin Y-F, Yannarell AC, Maxwell S, Aminov RI. Fate and transport of antibiotic residues and antibiotic resistance genes following land application of manure waste. *Journal of Environmental Quality*. 2009; 38:1086-1108.
- [80] Van De Weerd H a, Keatinge R, Roderick S. A review of key health-related welfare issues in organic poultry production. *World's Poultry Science Journal*. 2009; 65:649-684.
- [81] Heuer OE, Kruse H, Grave K, Collignon P, Karunasagar I, Angulo FJ. Human health consequences of use of antimicrobial agents in aquaculture. *Clinical Infectious Diseases*. 2009; 49:1248-1253.
- [82] Diehl DL, LaPara TM. Effect of temperature on the fate of genes encoding tetracycline resistance and the integrase of class 1 integrons within anaerobic and aerobic digesters treating municipal wastewater solids. *Environmental Science & Technology*. 2010; 44:9128-9133.
- [83] Breazeal MVR, Novak JT, Vikesland PJ, Pruden A. Effect of wastewater colloids on membrane removal of antibiotic resistance genes. *Water Research*. 2013; 47:130-140.
- [84] Kovalova L, Siegrist H, Singer H, Wittmer A, McArdell CS. Hospital wastewater treatment by membrane bioreactor: performance and efficiency for organic micropollutant elimination. *Environmental Science & Technology*. 2012; 46:1536-1545.
- [85] Gomez-Alvarez V, Revetta RP, Santo Domingo JW. Metagenomic analyses of drinking water receiving different disinfection treatments. *Applied Environmental Microbiology*. 2012; 78:6095-6102.
- [86] Ngwenya N, Ncube EJ, Parsons J. Recent advances in drinking water disinfection: successes and challenges. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. 2013; 222:111-170.
- [87] Dodd MC. Potential impacts of disinfection processes on elimination and deactivation of antibiotic resistance genes during water and wastewater treatment. *Journal of Environmental Monitoring*. 2012; 14:1754-1771.
- [88] Marchesi I, Marchegiano P, Bargellini A, Cencetti S, Frezza G, Miselli M, Borella P. Effectiveness of different methods to control legionella in the water supply: ten-year experience in an Italian university hospital. *Journal of Hospital Infection*. 2011; 77:47-51.
- [89] Abdouchakour F, Dupont C, Grau D, Aujoulat F, Mournetas P, Marchandin H, Parer S, Gibert P, Valcarcel J, Jumas-Bilak E. Clonal selections of *Pseudomonas aeruginosa* and *Achromobacter* sp. lead to successive colonization waves of water

- contamination in dental care units. *Environmental and Applied Microbiology*. 2015; in press.
- [90] Cervia JS, Farber B, Armellino D, Klocke J, Bayer R-L, McAlister M, Stanchfield I, Canonica FP, Ortolano GA. Point-of-use water filtration reduces healthcare-associated infections in bone marrow transplant recipients. *Transplant Infectious Diseases*. 2010; 12:238-241.
- [91] Zhou ZY, Hu BJ, Qin L, Lin YE, Watanabe H, Zhou Q, Gao XD. Removal of waterborne pathogens from liver transplant unit water taps in prevention of healthcare-associated infections: a proposal for a cost-effective, proactive infection control strategy. *Clinical Microbiology and Infection*. 2014; 20:310-314.
- [92] Vital M, Hammes F, Egli T. Competition of *Escherichia coli* O157 with a drinking water bacterial community at low nutrient concentrations. *Water Research*. 2012; 46:6279-6290.
- [93] Pinto AJ, Xi C, Raskin L. Bacterial community structure in the drinking water microbiome is governed by filtration processes. *Environmental Science & Technology*. 2012; 46:8851-8859.
- [94] Johnke J, Cohen Y, de Leeuw M, Kushmaro A, Jurkevitch E, Chatzinotas A. Multiple micro-predators controlling bacterial communities in the environment. *Current Opinion in Biotechnology*. 2014; 27:185-190.
- [95] Baquero F, Nombela C. The microbiome as a human organ. *Clinical Microbiology and Infection*. 2012; 18(S4):2-4.
- [96] Grice EA, Segre JA. The Human Microbiome: Our Second Genome. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 2012; 13:151-170.
- [97] Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Fierer N, Knight R. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010; 107:11971-11975.
- [98] Martin R, Nauta AJ, Ben Amor K, Knippels LMJ, Knol J, Garssen J. Early life: gut microbiota and immune development in infancy. *Beneficial Microbes*. 2010; 1:367-382.
- [99] Prince AL, Antony KM, Ma J, Aagaard KM. The Microbiome and Development: A Mother's Perspective. *Seminars in Reproductive Medicine*. 2014; 32:14-22.
- [100] Moloney RD, Desbonnet L, Clarke G, Dinan TG, Cryan JF. The microbiome: stress, health and disease. *Mammalian Genome*. 2014; 25:49-74.
- [101] Cerf-Bensussan N, Gaboriau-Routhiau V. The immune system and the gut microbiota: friends or foes? *Nature Review in Immunology*. 2010; 10:735-744.
- [102] Wang Y, Kasper LH. The role of microbiome in central nervous system disorders. *Brain, Behavior, and Immunity*. 2014; 38:1-12.
- [103] Kosiewicz MM, Zirnheld AL, Alard P. Tuning of skin immunity by skin commensal bacteria. *Immunotherapy*. 2013; 5:23-25.
- [104] Eppinga H, Konstantinov SR, Peppelenbosch MP, Thio HB. The microbiome and psoriatic arthritis. *Current Rheumatology Report*. 2014; 16:407.
- [105] Dickson RP, Erb-Downward JR, Huffnagle GB. The role of the bacterial microbiome in lung disease. *Expert Review of Respiratory Medicine*. 2014; 7:245-257.
- [106] Doerflinger SY, Throop AL, Herbst-Kralovetz MM. Bacteria in the vaginal microbiome alter the innate immune response and barrier properties of the human vaginal epithelia in a species-specific manner. *Journal of Infectious Diseases*. 2014; 209:1989-1999.
- [107] Cho I, Blaser MJ. The human microbiome: at the interface of health and disease. *Nature Review in Genetic*. 2012; 13:260-270.
- [108] Turnbaugh PJ, Stintzi A. Human health and disease in a microbial world. *Frontiers in Microbiology*. 2011; 2:190.
- [109] Khanna S, Tosh PK. A clinician's primer on the role of the microbiome in human health and disease. *Mayo Clinic Proceedings*. 2014; 89:107-114.
- [110] Martin R, Miquel S, Langella P, Bermúdez-Humarán LG. The role of metagenomics in understanding the human microbiome in health and disease. *Virulence*. 2014; 5.
- [111] Li J, Jia H, Cai X, Zhong H, Feng Q, Sunagawa S, Arumugam M, Kultima JR, Prifti E, Nielsen T, Juncker AS, Manichanh C, Chen B, Zhang W, Levenez F, Wang J, Xu X, Xiao L, Liang S, Zhang D, Zhang Z, Chen W, Zhao H, Aama JY Al-, Edris S, Yang H, Wang J, Hansen T, Nielsen HB, Brunak S, Kristiansen K, Guarner F, Pedersen O, Doré J, Ehrlich SD, MetaHIT Consortium, Bork P, Wang J, MetaHIT Consortium. An integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome. *Nature Biotechnology*. 2014; 32:834-841.
- [112] Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, Fernandes GR, Tap J, Bruls T, Batto J-M, Bertalan M, Borruel N, Casellas F, Fernandez L, Gautier L, Hansen T, Hattori M, Hayashi T, Kleerebezem M, Kurokawa K, Leclerc M, Levenez F, Manichanh C, Nielsen HB, Nielsen T, Pons N, Poulain J, Qin J, Sicheritz-Ponten T, Tims S, Torrents D, Ugarte E, Zoetendal EG, Wang J, Guarner F, Pedersen O, de Vos WM, Brunak S, Doré J, MetaHIT Consortium, Antolín M, Artiguenave F, Blottiere HM, Almeida M, Brechot C, Cara C, Chervaux C, Cultrone A, Delorme C, Denariac G, Dervyn R, Foerstner KU, Friss C, van de Guchte M, Guedon E, Haimet F, Huber W, van Hylckama-Vlieg J, Jamet A, Juste C, Kaci G, Knol J, Lakhdari O, Layec S, Le Roux K, Maguin E, Mérieux A, Melo Minardi R, M'rine C, Muller J, Oozeer R, Parkhill J, Renault P, Rescigno M, Sanchez N, Sunagawa S, Torrejon A, Turner K, Vandemeulebrouck G, Varela E, Winogradsky Y, Zeller G, Weissenbach J, Ehrlich SD, Bork P. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*. 2011; 473:174-180.
- [113] Brandtzaeg P. Development and basic mechanisms of human gut immunity. *Nutrition Review*. 1998; 56:S5-18.
- [114] Bushman FD, Lewis JD, Wu GD. Diet, gut enterotypes and health: is there a link? *Nestle Nutrition Institute Workshop Series*. 2013; 77:65-73.
- [115] Qin N, Yang F, Li A, Prifti E, Chen Y, Shao L, Guo J, Le Chatelier E, Yao J, Wu L, Zhou J, Ni S, Liu L, Pons N, Batto JM, Kennedy SP, Leonard P, Yuan C, Ding W, Chen Y, Hu X, Zheng B, Qian G, Xu W, Ehrlich SD, Zheng S, Li L. Alterations of the human gut microbiome in liver cirrhosis. *Nature*. 2014; 513:59-64.
- [116] Le Chatelier E, Nielsen T, Qin J, Prifti E, Hildebrand F, Falony G, Almeida M, Arumugam M, Batto J-M, Kennedy S, Leonard

- P, Li J, Burgdorf K, Grarup N, Jørgensen T, Brandslund I, Nielsen HB, Juncker AS, Bertalan M, Levenez F, Pons N, Rasmussen S, Sunagawa S, Tap J, Tims S, Zoetendal EG, Brunak S, Clément K, Doré J, Kleerebezem M, Kristiansen K, Renault P, Sicheritz-Ponten T, de Vos WM, Zucker J-D, Raes J, Hansen T, MetaHIT consortium, Bork P, Wang J, Ehrlich SD, Pedersen O. Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature*. 2013; 500:541-546.
- [117] Cotillard A, Kennedy SP, Kong LC, Prifti E, Pons N, Le Chatelier E, Almeida M, Quinquis B, Levenez F, Galleron N, Gougis S, Rizkalla S, Batto J-M, Renault P, ANR MicroObes consortium, Doré J, Zucker J-D, Clément K, Ehrlich SD. Dietary intervention impact on gut microbial gene richness. *Nature*. 2013; 500:585-588.
- [118] Miquel S, Leclerc M, Martin R, Chain F, Lenoir M, Raguideau S, Hudault S, Bridonneau C, Northen T, Bowen B, Bermúdez-Humarán LG, Sokol H, Thomas M, Langella P. Identification of metabolic signatures linked to anti-inflammatory effects of *Faecalibacterium prausnitzii*. *MBio*. 2015;6(2).
- [119] Zeeuwen PLJM, Kleerebezem M, Timmerman HM, Schalkwijk J. Microbiome and skin diseases. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*. 2013; 13:514-520.
- [120] Alekseyenko AV, Perez-Perez GI, De Souza A, Strober B, Gao Z, Bihan M, Li K, Methé BA, Blaser MJ. Community differentiation of the cutaneous microbiota in psoriasis. *Microbiome*. 2013;1:31.
- [121] Gao Z, Tseng C, Strober BE, Pei Z, Blaser MJ. Substantial alterations of the cutaneous bacterial biota in psoriatic lesions. *PLoS ONE*. 2008; 3:e2719.
- [122] Boguniewicz M, Leung DYM. Atopic dermatitis: a disease of altered skin barrier and immune dysregulation. *Immunology Review*. 2011; 242:233-246.
- [123] Kong HH, Oh J, Deming C, Conlan S, Grice EA, Beatson MA, Nomicos E, Polley EC, Komarow HD, NISC Comparative Sequence Program, Murray PR, Turner ML, Segre JA. Temporal shifts in the skin microbiome associated with disease flares and treatment in children with atopic dermatitis. *Genome Research*. 2012; 22:850-859.
- [124] Bilal JA, Ahmad MI, Robaee AAA, Alzolibani AA, Shobaili HAA, Khowailed MS Al-. Pattern of bacterial colonization of atopic dermatitis in saudi children. *Journal of Clinical Diagnostic Research*. 2013; 7:1968-1970.
- [125] Tullus K, Burman LG. Ecological impact of ampicillin and cefuroxime in neonatal units. *Lancet*. 1989; 1:1405-1407.
- [126] Durand-Gasselín B, Leclercq R, Girard-Pipau F, Deharvengt MC, Rochant H, Astier A, Duval J, Cordonnier C. Evolution of bacterial susceptibility to antibiotics during a six-year period in a haematology unit. *Journal of Hospital Infection*. 1995; 29:19-33.
- [127] Glupczynski Y, Delmée M, Goossens H, Struelens M, Belgian Multicenter ICU Study Group. Distribution and prevalence of antimicrobial resistance among gram-negative isolates in intensive care units (ICU) in Belgian hospitals between 1996 and 1999. *Acta Clinica Belgica*. 2001; 56:297-306.
- [128] Ntagiopoulos PG, Paramythiotou E, Antoniadou A, Giamarellou H, Karabinis A. Impact of an antibiotic restriction policy on the antibiotic resistance patterns of Gram-negative microorganisms in an Intensive Care Unit in Greece. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2007; 30:360-365.
- [129] Coelho JC, Wiederkehr J, Lerner H, Buffara VA Jr, Marchesini JC. Evaluation of preoperative hospitalization duration in skin flora. *Acta Chirurgica Hungarica*. 1990; 31:191-195.
- [130] Kernodle DS, Barg NL, Kaiser AB. Low-level colonization of hospitalized patients with methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci and emergence of the organisms during surgical antimicrobial prophylaxis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1988; 32:202-208.
- [131] Meloni GA, Schito GC. Microbial ecosystems as targets of antibiotic actions. *Journal of Chemotherapy*. 1991; 3(S1):179-181.
- [132] Blum-Menezes D, Bratfich OJ, Padoveze MC, Moretti ML. Hospital strain colonization by *Staphylococcus epidermidis*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2009; 42:294-298.
- [133] European Centre for Disease Prevention and Control. Annual epidemiological report 2014. Antimicrobial resistance and healthcare-associated infections. 2015.
- [134] Archer GL, Armstrong BC. Alteration of staphylococcal flora in cardiac surgery patients receiving antibiotic prophylaxis. *Journal of Infectious Diseases*. 1983; 147:642-649.
- [135] Archer GL. Alteration of cutaneous staphylococcal flora as a consequence of antimicrobial prophylaxis. Review in *Infectious Diseases*. 1991; 13(S10):S805-809.
- [136] Blech MF. [Impact of antibiotic prophylaxis on microbial ecology]. *Annales Françaises d'Anesthésie Réanimation*. 1994; 13(S5):S45-50.
- [137] Zingg W, Demartines N, Imhof A, Senn G, Ruef C. Rapid colonization with methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci after surgery. *World Journal of Surgery*. 2009; 33:2058-2062.
- [138] Rashid M-U, Weintraub A, Nord CE. Effect of new antimicrobial agents on the ecological balance of human microflora [Internet]. *Anaerobe*. 2012 [cited 2012 feb 22]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22155131>.
- [139] Cook HA, Cimiotti JP, Della-Latta P, Saiman L, Larson EL. Antimicrobial resistance patterns of colonizing flora on nurses' hands in the neonatal intensive care unit. *American Journal of Infection Control*. 2007; 35:231-236.
- [140] Rocha LA, Ferreira de Almeida E Borges L, Gontijo Filho PP. Changes in hands microbiota associated with skin damage because of hand hygiene procedures on the health care workers. *American Journal of Infection Control*. 2009; 37:155-159.
- [141] Climo MW, Sepkowitz KA, Zuccotti G, Fraser VJ, Warren DK, Perl TM, Speck K, Jernigan JA, Robles JR, Wong ES. The effect of daily bathing with chlorhexidine on the acquisition of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, vancomycin-resistant *Enterococcus*, and healthcare-associated bloodstream infections: results of a quasi-experimental multicenter trial. *Critical Care Medicine*. 2009; 37:1858-1865.
- [142] Noto MJ, Domenico HJ, Byrne DW, Talbot T, Rice TW, Bernard GR, Wheeler AP. Chlorhexidine bathing and health care-associated infections: a randomized clinical trial. *The Journal of American Medical Association*. 2015; 313:369-378.
- [143] Cassir N, Thomas G, Hraiech S, Brunet J, Fournier P-E, La Scola B, Papazian L. Chlorhexidine daily bathing: Impact on health

- care-associated infections caused by gram-negative bacteria. *American Journal of Infection Control*. 2015; 43:640-643.
- [144] Tezel U, Pavlostathis SG. Quaternary ammonium disinfectants: microbial adaptation, degradation and ecology. *Current Opinion in Biotechnology*. 2015; 33:296-304.
- [145] Nami Y, Haghshenas B, Abdullah N, Barzegari A, Radiah D, Rosli R, Khosroushahi AY. Probiotics or antibiotics: future challenges in medicine. *Journal of Medical Microbiology*. 2015; 64:137-146.
- [146] Morgan DJ, Murthy R, Munoz-Price LS, Barnden M, Camins BC, Johnston BL, Rubin Z, Sullivan KV, Shane AL, Dellinger EP, Rupp ME, Bearman G. Reconsidering contact precautions for endemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant *Enterococcus*. *Infection Control and Hospital Epidemiology*. 2015; 1-10.
- [147] Patel R, DuPont HL. New approaches for bacteriotherapy: prebiotics, new-generation probiotics, and synbiotics. *Clinical Infectious Diseases*. 2015; 60(S2):S108-121.
- [148] Rupnik M. Toward a true bacteriotherapy for *Clostridium difficile* infection. *New England Journal of Medicine*. 2015; 372:1566-1568.
- [149] Cammarota G, Ianiro G, Bibbò S, Gasbarrini A. Fecal microbiota transplantation: a new old kid on the block for the management of gut microbiota-related disease. *Journal of Clinical Gastroenterology*. 2014; 48(S1):S80-84.
- [150] Kadouri DE, To K, Shanks RMQ, Doi Y. Predatory bacteria: a potential ally against multidrug-resistant Gram-negative pathogens. *PLoS ONE*. 2013; 8:e63397.
- [151] Sevgi M, Toklu A, Vecchio D, Hamblin MR. Topical antimicrobials for burn infections - an update. *Recent Patents on Anti-infective Drug Discovery*. 2013; 8:161-197.
- [152] Kutter EM, Kuhl SJ, Abedon ST. Re-establishing a place for phage therapy in western medicine. *Future in Microbiology*. 2015; 10:685-688.
- [153] Goto Y, Kurashima Y, Kiyono H. The gut microbiota and inflammatory bowel disease. *Current Opinion in Rheumatology*. 2015; 27:388-396.
- [154] Zhang Y-J, Li S, Gan R-Y, Zhou T, Xu D-P, Li H-B. Impacts of gut bacteria on human health and diseases. *International Journal in Molecular Sciences*. 2015; 16:7493-7519.
- [155] Young JA, He TH, Reizis B, Winoto A. Commensal microbiota are required for systemic inflammation triggered by necrotic dendritic cells. *Cell Report*. 2013; 3:1932-1944.
- [156] Kobozev I, Reinoso Webb C, Furr KL, Grisham MB. Role of the enteric microbiota in intestinal homeostasis and inflammation. *Free Radical Biology and Medicine*. 2014; 68:122-133.
- [157] Hilty M, Burke C, Pedro H, Cardenas P, Bush A, Bossley C, Davies J, Ervine A, Poulter L, Pachter L, Moffatt MF, Cookson WOC. Disordered microbial communities in asthmatic airways. *PLoS ONE*. 2010; 5:e8578.
- [158] Marsland BJ, Yadava K, Nicod LP. The airway microbiome and disease. *Chest*. 2013; 144:632-637.
- [159] Surette MG. The cystic fibrosis lung microbiome. *Annals of American Thoracic Society*. 2014; 11(S1):S61-65.
- [160] Sibley CD, Rabin H, Surette MG. Cystic fibrosis: a polymicrobial infectious disease. *Future in Microbiology*. 2006; 1:53-61.
- [161] Hansen CR, Pressler T, Nielsen KG, Jensen PØ, Bjarnsholt T, Høiby N. Inflammation in *Achromobacter xylosoxidans* infected cystic fibrosis patients. *Journal of Cystic Fibrosis*. 2010; 9:51-58.
- [162] Hauser AR, Jain M, Bar-Meir M, McColley SA. Clinical significance of microbial infection and adaptation in cystic fibrosis. *Clinical Microbiology Review*. 2011; 24:29-70.
- [163] Dupont C, Michon A-L, Jumas-Bilak E, Nørskov-Lauritsen N, Chiron R, Marchandin H. Intrapatient diversity of *Achromobacter* spp. involved in chronic colonization of Cystic Fibrosis airways. *Infection Genetics and Evolution*. 2015; 32:214-223.
- [164] Sibley CD, Rabin H, Surette MG. Cystic fibrosis: a polymicrobial infectious disease. *Future in Microbiology*. 2006; 1:53-61.
- [165] Harris JK, De Groote MA, Sagel SD, Zemanick ET, Kapsner R, Penvari C, Kaess H, Deterding RR, Accurso FJ, Pace NR. Molecular identification of bacteria in bronchoalveolar lavage fluid from children with cystic fibrosis. *Proceedings Natural Academy of Sciences*. 2007; 104:20529-20533.
- [166] Marchandin H, Anne-Laure M, Estelle J-B. Atypical Bacteria in the CF Airways: Diversity, Clinical Consequences, Emergence and Adaptation [Internet]. In: Sriramulu D, éditeur. *Cystic Fibrosis - Renewed Hopes Through Research*. InTech; 2012 [cited 2014 nov 16] Available from: <http://www.intechopen.com/books/cystic-fibrosis-renewed-hopes-through-research/atypical-bacteria-in-the-cf-airways-diversity-clinical-consequences-emergence-and-adaptation>.
- [167] Paganin P, Fiscarelli EV, Tuccio V, Chianciani M, Bacci G, Morelli P, Dolce D, Dalmastrì C, De Alessandri A, Lucidi V, Taccetti G, Mengoni A, Bevivino A. Changes in cystic fibrosis airway microbial community associated with a severe decline in lung function. *PLoS ONE*. 2015; 10:e0124348.
- [168] Sibley CD, Parkins MD, Rabin HR, Duan K, Norgaard JC, Surette MG. A polymicrobial perspective of pulmonary infections exposes an enigmatic pathogen in cystic fibrosis patients. *Proceedings Natural Academy of Sciences*. 2008; 105:15070-15075.
- [169] Carmody LA, Zhao J, Schloss PD, Petrosino JF, Murray S, Young VB, Li JZ, LiPuma JJ. Changes in cystic fibrosis airway microbiota at pulmonary exacerbation. *Annals of American Thoracic Society*. 2013; 10:179-187.
- [170] Mahenthalingam E. Emerging cystic fibrosis pathogens and the microbiome. *Paediatric Respiratory Review*. 2014; 15(S1):13-15.
- [171] Dickson RP, Erb-Downward JR, Huffnagle GB. The role of the bacterial microbiome in lung disease. *Expert Review in Respiratory Medicine*. 2013; 7:245-257.
- [172] Zhao J, Schloss PD, Kalikin LM, Carmody LA, Foster BK, Petrosino JF, Cavalcoli JD, VanDevanter DR, Murray S, Li JZ, Young VB, LiPuma JJ. Decade-long bacterial community dynamics in cystic fibrosis airways. *Proceedings Natural Academy of Sciences*. 2012; 109:5809-5814.
- [173] Conrad D, Haynes M, Salamon P, Rainey PB, Youle M, Rohwer F. Cystic fibrosis therapy: a community ecology perspective.

- American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology. 2013; 48:150-156.
- [174] Tang AC, Turvey SE, Alves MP, Regamey N, Tümmler B, Hartl D. Current concepts: host-pathogen interactions in cystic fibrosis airways disease. *European Respiratory Review*. 2014; 23:320-332.
- [175] Duan K, Dammel C, Stein J, Rabin H, Surette MG. Modulation of *Pseudomonas aeruginosa* gene expression by host microflora through interspecies communication. *Molecular Microbiology*. 2003; 50:1477-1491.
- [176] Shinzato T, Saito A. A mechanism of pathogenicity of « *Streptococcus milleri* group » in pulmonary infection: synergy with an anaerobe. *Journal of Medical Microbiology*. 1994; 40:118-123.
- [177] Nalca Y, Jänsch L, Bredenbruch F, Geffers R, Buer J, Häussler S. Quorum-sensing antagonistic activities of azithromycin in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1: a global approach. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 2006; 50:1680-1688.
- [178] Rogers GB, Carroll MP, Bruce KD. Enhancing the utility of existing antibiotics by targeting bacterial behaviour? *British Journal of Pharmacology*. 2012; 165:845-857.
- [179] Lipuma JJ. The changing microbial epidemiology in cystic fibrosis. *Clinical Microbiology Review*. 2010; 23:299-323.
- [180] Lopes SP, Azevedo NF, Pereira MO. Microbiome in cystic fibrosis: Shaping polymicrobial interactions for advances in antibiotic therapy. *Critical Review in Microbiology*. 2015; 41:353-365.
- [181] Nembrini C, Sichelstiel A, Kisielow J, Kurrer M, Kopf M, Marsland BJ. Bacterial-induced protection against allergic inflammation through a multicomponent immunoregulatory mechanism. *Thorax*. 2011; 66:755-763.
- [182] Gollwitzer ES, Marsland BJ. Microbiota abnormalities in inflammatory airway diseases - Potential for therapy. *Pharmacology & Therapeutics*. 2014; 141:32-39.
- [183] Madan JC, Koestler DC, Stanton BA, Davidson L, Moulton LA, Housman ML, Moore JH, Guill MF, Morrison HG, Sogin ML, Hampton TH, Karagas MR, Palumbo PE, Foster JA, Hibberd PL, O'Toole GA. Serial analysis of the gut and respiratory microbiome in cystic fibrosis in infancy: interaction between intestinal and respiratory tracts and impact of nutritional exposures. *MBio*. 2012;3.
- [184] Carmody LA, Gill JJ, Summer EJ, Sajjan US, Gonzalez CF, Young RF, LiPuma JJ. Efficacy of bacteriophage therapy in a model of *Burkholderia cenocepacia* pulmonary infection. *Journal of Infectious Diseases*. 2010; 201:264-271.
- [185] Michon A-L, Jumas-Bilak E, Chiron R, Lamy B, Marchandin H. Advances toward the elucidation of hypertonic saline effects on *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis patients. *PLoS ONE*. 2014;9:e90164.

Implications cliniques des résultats de ces travaux

Les différents travaux de cette thèse ont apporté des connaissances scientifiques sur les mécanismes d'adaptation des pathogènes émergents à l'habitat dans lequel ils vivent. Ces résultats peuvent également apporter certaines connaissances concernant le quotidien et la prise en charge thérapeutique des patients.

Tout d'abord, lors de l'investigation environnementale que nous avons menée aux domiciles de patients CF, nous n'avons pas identifié de réservoir environnemental qui pourrait entretenir la persistance d'*Achromobacter* dans les VRCF des patients et les patients ne semblent pas non plus contaminer leur environnement. Toutefois, certains sites humides comme les siphons abritaient de nombreux pathogènes opportunistes émergents dans la mucoviscidose, pouvant potentiellement causer une primocolonisation. D'une façon générale, tout élément provoquant une stagnation d'eau (adoucisseurs, colonnes filtrantes, mousseurs des brise-jets, aérateurs des pommeaux de douche, siphons) va favoriser la formation de biofilm et ce d'autant plus que l'eau est plus contaminée (eaux grises). Le siphon est donc un élément critique qui peut exposer le patient par retrocontamination du point d'eau. D'un point de vue pratique, nous pensons qu'en plus d'une décontamination régulière, un simple changement annuel de ces siphons permettrait de diminuer l'exposition des patients à ces pathogènes. D'autres auteurs proposent également des changements assez fréquents de siphons (Purdy-Gibson et al. 2015; Heirali et al. 2016).

D'autre part, les différents travaux de cette thèse nous ont permis d'observer une importante diversité intra-communautés, intra-espèces et intra-clonales. Au vu de ces résultats, particulièrement ceux concernant la diversité intraclonale des profils de résistance aux antibiotiques dans une expectoration, et des résultats d'études de populations de *P. aeruginosa*, nous pouvons conclure que les tests *in vitro* pratiqués sur des colonies isolées ne reflètent pas la résistance de l'ensemble de la population présente dans les VRCF et semblent donc inadaptés dans le contexte de la colonisation chronique au cours de la mucoviscidose (Serisier et al. 2012 ; Zebouh et al. 2008). Il serait important de développer des méthodes microbiologiques explorant des niveaux supérieurs de complexité, prenant en compte les pathogènes dans leur communauté. Des améliorations considérables concernant la survie des patients CF ont été réalisées au cours des dernières décennies, certaines étant dues à une meilleure prise en charge des infections par les pathogènes majeurs comme *S. aureus* et *P. aeruginosa*. Alors que la recherche se poursuit concernant l'approche optimale pour la prophylaxie, l'éradication et le traitement d'entretien des infections, il reste plusieurs questions sans réponse, posant des dilemmes entre les divers choix thérapeutiques (Jain and Smyth 2012). Les bactéries représentent un challenge supplémentaire en s'adaptant aux VRCF et en développant des mécanismes d'antibiorésistance. Plusieurs pathogènes, hautement résistants aux antibiotiques, ont émergés ces dernières années. Pour la majorité, leur rôle dans la progression de la maladie n'est pas clairement établi et des approches thérapeutiques standardisées visant ces pathogènes ne sont pas définies. Dans ce contexte, il y a un besoin urgent d'essais cliniques comparatifs de nouvelles stratégies antibiotiques

(Jain and Smyth 2012). Dans l'attente de ces nouvelles stratégies, seules des études clinico-biologiques de grandes ampleurs pourraient définir les traitements les plus efficaces.

Plusieurs auteurs ont rapporté que la diversité du microbiote, qu'il soit pulmonaire ou intestinal était reliée à des périodes stables au niveau respiratoire (Carmody et al. 2013 ; Fodor et al. 2012 ; Hoen et al. 2015). Les relations bactériennes dans la communauté semblent très complexes, reliées au statut clinique du patient, et dans ce contexte, il est nécessaire d'essayer de préserver cette diversité. Connaître le temps de résilience de la communauté bactérienne en fonction de l'antibiothérapie utilisée pourrait fournir une information supplémentaire et permettre de faciliter certains choix thérapeutiques (Cuthbertson et al. 2016). De plus, au vu de la diversité des profils d'antibiorésistance que nous avons observés au sein des VRCF et du rapport constant d'antibiorésistance, il serait certainement bénéfique de développer des thérapeutiques ciblées atteignant certains pathogènes, tout en conservant la diversité de la communauté. Dans ce cadre, l'utilisation de bactériophages spécifiques d'espèces, utilisés dans cette pathologie dans certains pays de l'union européenne, et montrant une efficacité sur certains pathogènes majeurs comme *P. aeruginosa*, pourrait permettre d'atteindre certains pathogènes, y compris antibiorésistants, sans bouleverser la diversité de la communauté (Essoh et al. 2013 ; Hraiech et al. 2015). Plusieurs études ont proposé des biomarqueurs, particulièrement des facteurs inflammatoires, qui permettraient de préjuger une exacerbation pulmonaire ; néanmoins, tant que les mécanismes induisant ces exacerbations sont peu connus, l'utilisation d'un panel composite de biomarqueurs pulmonaires serait plus approprié (Rogers et al. 2011). Dans ce cadre, il serait réellement intéressant d'identifier des biomarqueurs chimiques ou biochimiques permettant de qualifier la diversité de la communauté pulmonaire dans le but de prédire l'évolution clinique des patients et tenter de conserver cette diversité avant l'apparition d'exacerbation. Cette diversité pourrait être restaurée par exemple par le biais de probiotiques aerosolisés et oraux, bien que plus d'études soient nécessaires sur ces approches (Anathan et al. 2016).

Enfin, en connaissant mieux les mécanismes sous-jacents de diversification lors de la colonisation pulmonaire, il serait vraiment novateur de concevoir un traitement limitant ces mécanismes qui pourrait être utilisé en association avec les antibiotiques lors des épisodes de primocolonisation.

CONCLUSION GENERALE

A l'heure actuelle, les études explorant les populations et communautés bactériennes démontrent l'immense complexité de ces systèmes biologiques. Ces études mettent en oeuvre des technologies très performantes comme le séquençage de nouvelle génération et la bioinformatique mais restent descriptives et ne parviennent pas à démontrer des liens de causalités entre la diversité des communautés et les phénomènes biologiques ou pathologiques survenant chez les patients. Pour cela, nous manquons encore de modèles ou de systèmes expérimentaux permettant de prendre en compte toute l'étendue de la diversité des populations et des communautés ainsi que leurs dynamiques évolutives dans un contexte clinique. Après les succès de la microbiologie moléculaire du XXe siècle (décryptage des relations moléculaires entre bactéries et cellules hôtes), nous entrons dans une période charnière où l'infectiologie commence à appréhender la complexité des interactions microbiennes et leurs rôles en pathologie sans avoir les outils pour diagnostiquer (biomarqueur) et traiter les déséquilibres écologiques observés. L'éventail des maladies infectieuses concernées par les avancées de l'écologie microbienne s'élargit de jour en jour et les infections au cours de la mucoviscidose sont emblématiques des nouveaux concepts d'écologie appliqués à l'infection humaine.

Cette thèse présente un travail également descriptif qui complète notre connaissance de la diversité microbienne impliquée dans les infections au cours de la mucoviscidose mais ne permet pas d'envisager à court terme des progrès dans la maîtrise de ces infections, ce qui reste pourtant le but de toute recherche en infectiologie. Les études cliniques de grande envergure qui permettraient d'établir des liens de causalité robustes entre diversité et dynamique des communautés microbiennes et statut clinique représentent une voie de recherche incontournable. Elles nécessitent l'inclusion de très nombreux patients, notamment du fait de la diversité des paramètres microbiologiques à étudier, et restent donc difficiles à mettre en place pour des pathogènes émergents comme ceux étudiés dans ce travail. La mise à disposition de méthodes d'étude des communautés est aujourd'hui envisageable en laboratoire de microbiologie médicale du fait des progrès technologiques et bioinformatiques. Cet apport de données d'écologie microbienne pour le suivi des patients est une voie qui pourrait apporter au quotidien des faisceaux de preuves pour améliorer le diagnostic et le traitement.

Références Bibliographiques

- Aanaes, K., Johansen, H.K., Poulsen, S.S., Pressler, T., Buchwald, C., and Høiby, N. **2013**. Secretory IgA as a diagnostic tool for *Pseudomonas aeruginosa* respiratory colonization. *J. Cyst. Fibros.* **12**: 81–87.
- Aaron, S.D., Vandemheen, K.L., Ramotar, K., Giesbrecht-Lewis, T., Tullis, E., Freitag, A., Paterson, N., Jackson, M., Loughheed, M.D., Dowson, C., et al. **2010**. Infection with transmissible strains of *Pseudomonas aeruginosa* and clinical outcomes in adults with cystic fibrosis. *JAMA* **304**: 2145–2153.
- Abdallah, M., Benoliel, C., Drider, D., Dhulster, P., and Chihib, N.-E. **2014**. Biofilm formation and persistence on abiotic surfaces in the context of food and medical environments. *Arch. Microbiol.* **196**: 453–472.
- Abdallah, M., Khelissa, O., Ibrahim, A., Benoliel, C., Heliot, L., Dhulster, P., and Chihib, N.-E. **2015**. Impact of growth temperature and surface type on the resistance of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* biofilms to disinfectants. *Int. J. Food Microbiol.* **214**: 38–47.
- Abdel-Mawgoud, A.M., Lépine, F., and Déziel, E. **2010**. Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **86**: 1323–1336.
- AbdulWahab, A., Taj-Aldeen, S.J., Ibrahim, E., Abdulla, S.H., Muhammed, R., Ahmed, I., Abdeen, Y., Sadek, O., and Abu-Madi, M. **2014**. Genetic relatedness and host specificity of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis and non-cystic fibrosis patients. *Infect. Drug Resist.* **7**: 309–316.
- Abu Kwaik, Y., Gao, L.Y., Stone, B.J., Venkataraman, C., and Harb, O.S. **1998**. Invasion of protozoa by *Legionella pneumophila* and its role in bacterial ecology and pathogenesis. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 3127–3133.
- Acar, M., Mettetal, J.T., and van Oudenaarden, A. **2008**. Stochastic switching as a survival strategy in fluctuating environments. *Nat. Genet.* **40**: 471–475.
- Ackermann, M. **2015**. A functional perspective on phenotypic heterogeneity in microorganisms. *Nat. Rev. Microbiol.* **13**: 497–508.
- Alamro, M., Bidmos, F.A., Chan, H., Oldfield, N.J., Newton, E., Bai, X., Aidley, J., Care, R., Mattick, C., Turner, D.P.J., et al. **2014**. Phase variation mediates reductions in expression of surface proteins during persistent meningococcal carriage. *Infect. Immun.* **82**: 2472–2484.
- Al-Bakri, A.G., Gilbert, P., and Allison, D.G. **2004**. Immigration and emigration of *Burkholderia cepacia* and *Pseudomonas aeruginosa* between and within mixed biofilm communities. *J. Appl. Microbiol.* **96**: 455–463.
- Alekshun, M.N., and Levy, S.B. **2007**. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell* **128**: 1037–1050.
- Alexander, C., and Rietschel, E.T. **2001**. Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. *J. Endotoxin Res.* **7**: 167–202.
- Allison, S.D., and Martiny, J.B.H. **2008**. Colloquium paper: resistance, resilience, and redundancy in microbial communities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105 Suppl 1**: 11512–11519.
- Alvarez-Ortega, C., and Harwood, C.S. **2007**. Responses of *Pseudomonas aeruginosa* to low oxygen indicate that growth in the cystic fibrosis lung is by aerobic respiration. *Mol. Microbiol.* **65**: 153–165.
- Ambrose, M., Malley, R.C., Warren, S.J.C., Beggs, S.A., Swallow, O.F.E., McEwan, B., Stock, D., and Roddam, L.F. **2016**. *Pandoraea pnomenusa* isolated from an Australian patient with cystic fibrosis. *Front. Microbiol.* **7**: 692.

- Amoureux, L., Bador, J., Siebor, E., Taillefumier, N., Fanton, A., and Neuwirth, C. **2013a**. Epidemiology and resistance of *Achromobacter xylosoxidans* from cystic fibrosis patients in Dijon, Burgundy: First French data. *J. Cyst. Fibros.* **12**: 170–176.
- Amoureux, L., Bador, J., Fardeheb, S., Mabile, C., Couchot, C., Massip, C., Salignon, A.-L., Berlie, G., Varin, V., and Neuwirth, C. **2013b**. Detection of *Achromobacter xylosoxidans* in hospital, domestic, and outdoor environmental samples and comparison with human clinical isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**: 7142–7149.
- Amoureux, L., Bador, J., Bounoua Zouak, F., Chapuis, A., de Curraize, C., and Neuwirth, C. **2016a**. Distribution of the species of *Achromobacter* in a French cystic fibrosis centre and multilocus sequence typing analysis reveal the predominance of *A. xylosoxidans* and clonal relationships between some clinical and environmental isolates. *J. Cyst. Fibros.* **15**: 486–494.
- Amoureux, L., Bador, J., Verrier, T., Mjahed, H., De Curraize, C., and Neuwirth, C. **2016b**. *Achromobacter xylosoxidans* is the predominant *Achromobacter* species isolated from diverse non-respiratory samples. *Epidemiol. Infect.* **18**: 1–4.
- Anandham, R., Indiragandhi, P., Kwon, S.W., Sa, T.M., Jeon, C.O., Kim, Y.K., and Jee, H.J. **2010**. *Pandoraea thiooxydans* sp. nov., a facultatively chemolithotrophic, thiosulfate-oxidizing bacterium isolated from rhizosphere soils of sesame (*Sesamum indicum* L.). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **60**: 21–26.
- Ananthan, A., Balasubramanian, H., Rao, S., and Patole, S. **2016**. Probiotic supplementation in children with cystic fibrosis—a systematic review. *Eur. J. Pediatr.* **175**: 1255–1266.
- Anderson, S.W., Stapp, J.R., Burns, J.L., and Qin, X. **2007**. Characterization of small-colony-variant *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from the sputum specimens of five patients with cystic fibrosis. *J. Clin. Microbiol.* **45**: 529–535.
- Arnoldini, M., Vizcarra, I.A., Peña-Miller, R., Stocker, N., Diard, M., Vogel, V., Beardmore, R.E., Hardt, W.-D., and Ackermann, M. **2014**. Bistable expression of virulence genes in *Salmonella* leads to the formation of an antibiotic-tolerant subpopulation. *PLoS Biol.* **12**: e1001928.
- Aspedon, A., Palmer, K., and Whiteley, M. **2006**. Microarray analysis of the osmotic stress response in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **188**: 2721–2725.
- Atkinson, R.M., Lipuma, J.J., Rosenbluth, D.B., and Dunne, W.M. **2006**. Chronic colonization with *Pandoraea apista* in cystic fibrosis patients determined by repetitive-element-sequence PCR. *J. Clin. Microbiol.* **44**: 833–836.
- Aujoulat, F., Roger, F., Bourdier, A., Lotthé, A., Lamy, B., Marchandin, H., and Jumas-Bilak, E. **2012**. From environment to man: genome evolution and adaptation of human opportunistic bacterial pathogens. *Genes* **3**: 191–232.
- Bagge, N., Schuster, M., Hentzer, M., Ciofu, O., Givskov, M., Greenberg, E.P., and Høiby, N. **2004**. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms exposed to imipenem exhibit changes in global gene expression and beta-lactamase and alginate production. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**: 1175–1187.
- Banin, E., Vasil, M.L., and Greenberg, E.P. **2005**. Iron and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**: 11076–11081.
- Banwart, B., Splaingard, M.L., Farrell, P.M., Rock, M.J., Havens, P.L., Moss, J., Ehrmantraut, M.E., Frank, D.W., and Barbieri, J.T. **2002**. Children with cystic fibrosis produce an immune response against exoenzyme s, a type III cytotoxin of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Infect. Dis.* **185**: 269–270.
- Baquero, M.-R., Nilsson, A.I., Turrientes, M. del C., Sandvang, D., Galán, J.C., Martínez, J.L., Frimodt-Møller, N., Baquero, F., and Andersson, D.I. **2004**. Polymorphic mutation frequencies in *Escherichia coli*: emergence of weak mutators in clinical isolates. *J. Bacteriol.* **186**: 5538–5542.

- Barabote, R.D., Thekkiniath, J., Strauss, R.E., Vedyappan, G., Fralick, J.A., and San Francisco, M.J. **2011**. Xenobiotic efflux in bacteria and fungi: a genomics update. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **77**: 237–306.
- Barben, J., Hafen, G., Schmid, J., and Swiss Paediatric Respiratory Research Group **2005**. *Pseudomonas aeruginosa* in public swimming pools and bathroom water of patients with cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros.* **4**: 227–231.
- Barbier, M., Damron, F.H., Bielecki, P., Suárez-Diez, M., Puchałka, J., Albertí, S., Dos Santos, V.M., and Goldberg, J.B. **2014**. From the environment to the host: re-wiring of the transcriptome of *Pseudomonas aeruginosa* from 22°C to 37°C. *PLoS One* **9**: e89941.
- Barker, J., and Brown, M.R.W. **1994**. Trojan Horses of the microbial world: protozoa and the survival of bacterial pathogens in the environment. *Microbiology* **140**: 1253–1259.
- Barr, H.L., Halliday, N., Cámara, M., Barrett, D.A., Williams, P., Forrester, D.L., Simms, R., Smyth, A.R., Honeybourne, D., Whitehouse, J.L., et al. **2015**. *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing molecules correlate with clinical status in cystic fibrosis. *Eur. Respir. J.* **46**: 1046–1054.
- Barrado, L., Brañas, P., Orellana, M.Á., Martínez, M.T., García, G., Otero, J.R., and Chaves, F. **2013**. Molecular characterization of *Achromobacter* isolates from cystic fibrosis and non-cystic fibrosis patients in Madrid, Spain. *J. Clin. Microbiol.* **51**: 1927–1930.
- Barth, A.L., and Pitt, T.L. **1995**. Auxotrophic variants of *Pseudomonas aeruginosa* are selected from prototrophic wild-type strains in respiratory infections in patients with cystic fibrosis. *J. Clin. Microbiol.* **33**: 37–40.
- Behrends, V., Ryall, B., Zlosnik, J.E.A., Speert, D.P., Bundy, J.G., and Williams, H.D. **2013**. Metabolic adaptations of *Pseudomonas aeruginosa* during cystic fibrosis chronic lung infections. *Environ. Microbiol.* **15**: 398–408.
- Berg, G., Eberl, L., and Hartmann, A. **2005**. The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria. *Environ. Microbiol.* **7**: 1673–1685.
- Bernier, S.P., Nguyen, D.T., and Sokol, P.A. **2008**. A LysR-type transcriptional regulator in *Burkholderia cenocepacia* influences colony morphology and virulence. *Infect. Immun.* **76**: 38–47.
- Bertrand, R.L. **2014**. Lag phase-associated iron accumulation is likely a microbial counter-strategy to host iron sequestration: Role of the ferric uptake regulator (*fur*). *J. Theor. Biol.* **359**: 72–79.
- Besier, S., Zander, J., Kahl, B.C., Kraiczy, P., Brade, V., and Wichelhaus, T.A. **2008**. The thymidine-dependent small-colony-variant phenotype is associated with hypermutability and antibiotic resistance in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**: 2183–2189.
- Biek, R., Pybus, O.G., Lloyd-Smith, J.O., and Didelot, X. **2015**. Measurably evolving pathogens in the genomic era. *Trends Ecol. Evol.* **30**: 306–313.
- Bigger, J. **1944**. Treatment of staphylococcal infections with penicillin by intermittent sterilisation. *The Lancet* **244**: 497–500.
- Bjarnsholt, T., Jensen, P.Ø., Fiandaca, M.J., Pedersen, J., Hansen, C.R., Andersen, C.B., Pressler, T., Givskov, M., and Høiby, N. **2009**. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in the respiratory tract of cystic fibrosis patients. *Pediatr. Pulmonol.* **44**: 547–558.
- Bjarnsholt, T., Jensen, P.Ø., Jakobsen, T.H., Phipps, R., Nielsen, A.K., Rybtke, M.T., Tolker-Nielsen, T., Givskov, M., Høiby, N., Ciofu, O., et al. **2010**. Quorum sensing and virulence of *Pseudomonas aeruginosa* during lung infection of cystic fibrosis patients. *PLoS One* **5**: e10115.

- Blaser, M.J., and Kirschner, D. **2007**. The equilibria that allow bacterial persistence in human hosts. *Nature* **449**: 843–849.
- Blasi, F., and Johnston, S.L. **2007**. The role of antibiotics in asthma. *Int. J. Antimicrob. Agents* **29**: 485–493.
- Bocquet-Appel, J. **2002**. paleoanthropological traces of a neolithic demographic transition. *Curr. Anthropol.* **43**: 637–650.
- Boles, B.R., and Singh, P.K. **2008**. Endogenous oxidative stress produces diversity and adaptability in biofilm communities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**: 12503–12508.
- Boles, B.R., Thoendel, M., and Singh, P.K. **2004**. Self-generated diversity produces “insurance effects” in biofilm communities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**: 16630–16635.
- Boulette, M.L., Baynham, P.J., Jorth, P.A., Kukavica-Ibrulj, I., Longoria, A., Barrera, K., Levesque, R.C., and Whiteley, M. **2009**. Characterization of alanine catabolism in *Pseudomonas aeruginosa* and its importance for proliferation in vivo. *J. Bacteriol.* **191**: 6329–6334.
- Bragonzi, A., Paroni, M., Nonis, A., Cramer, N., Montanari, S., Rejman, J., Di Serio, C., Döring, G., and Tümmler, B. **2009**. *Pseudomonas aeruginosa* microevolution during cystic fibrosis lung infection establishes clones with adapted virulence. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **180**: 138–145.
- Bragonzi, A., Farulla, I., Paroni, M., Twomey, K.B., Pirone, L., Lorè, N.I., Bianconi, I., Dalmastri, C., Ryan, R.P., and Bevivino, A. **2012**. Modelling co-infection of the cystic fibrosis lung by *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cenocepacia* reveals influences on biofilm formation and host response. *PLOS ONE* **7**: e52330.
- Broadbent, S.E., Davies, M.R., and van der Woude, M.W. **2010**. Phase variation controls expression of *Salmonella* lipopolysaccharide modification genes by a DNA methylation-dependent mechanism. *Mol. Microbiol.* **77**: 337–353.
- Brockhurst, M.A., Buckling, A., and Rainey, P.B. **2005**. The effect of a bacteriophage on diversification of the opportunistic bacterial pathogen, *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Biol. Sci.* **272**: 1385–1391.
- Broutin, V., Bañuls, A.-L., Aubry, A., Keck, N., Choisy, M., Bernardet, J.-F., Michel, C., Raymond, J.-C., Libert, C., Barnaud, A., et al. **2012**. Genetic diversity and population structure of *Mycobacterium marinum*: new insights into host and environmental specificities. *J. Clin. Microbiol.* **50**: 3627–3634.
- Brown, M.V., Lauro, F.M., DeMaere, M.Z., Muir, L., Wilkins, D., Thomas, T., Riddle, M.J., Fuhrman, J.A., Andrews-Pfannkoch, C., Hoffman, J.M., et al. **2012**. Global biogeography of SAR11 marine bacteria. *Mol. Syst. Biol.* **8**: 595.
- Bruscia, E., Zhang, P.X., Barone, C., Scholte, B., Homer, R.J., Krause, D., and Egan, M.E. **2016**. Increased susceptibility of *cfr* ^{-/-} mice to LPS-induced lung remodeling. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* **310**: 711-719
- Bukh, A.S., and Roslev, P. **2014**. *Mycobacterium avium* complex in day care hot water systems, and persistence of live cells and DNA in hot water pipes. *Curr. Microbiol.* **68**: 428–439.
- Burns, J.L., Gibson, R.L., McNamara, S., Yim, D., Emerson, J., Rosenfeld, M., Hiatt, P., McCoy, K., Castile, R., Smith, A.L., et al. **2001**. Longitudinal assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in young children with cystic fibrosis. *J. Infect. Dis.* **183**: 444–452.
- Caballero, J.D., Clark, S.T., Coburn, B., Zhang, Y., Wang, P.W., Donaldson, S.L., Tullis, D.E., Yau, Y.C.W., Waters, V.J., Hwang, D.M., et al. **2015**. Selective sweeps and parallel pathoadaptation drive *Pseudomonas aeruginosa* evolution in the cystic fibrosis lung. *Mbio* **6**: e00981-15.
- Callahan, B.J., Fukami, T., and Fisher, D.S. **2014**. Rapid evolution of adaptive niche construction in experimental microbial populations. *Evol. Int. J. Org. Evol.* **68**: 3307–3316.

- Caraher, E., Collins, J., Herbert, G., Murphy, P.G., Gallagher, C.G., Crowe, M.J., Callaghan, M., and McClean, S. **2008**. Evaluation of in vitro virulence characteristics of the genus *Pandoraea* in lung epithelial cells. *J. Med. Microbiol.* **57**: 15–20.
- Carmody, L.A., Zhao, J., Schloss, P.D., Petrosino, J.F., Murray, S., Young, V.B., Li, J.Z., and LiPuma, J.J. **2013**. Changes in cystic fibrosis airway microbiota at pulmonary exacerbation. *Ann. Am. Thorac. Soc.* **10**: 179–187.
- Cellini, L. **2014**. *Helicobacter pylori*: A chameleon-like approach to life. *World J. Gastroenterol.* **20**: 5575–5582.
- Chang, Y.-S.T., Klockgether, J., and Tümmler, B. **2007**. An intragenic deletion in *pilQ* leads to nonpiliation of a *Pseudomonas aeruginosa* strain isolated from cystic fibrosis lung. *FEMS Microbiol. Lett.* **270**: 201–206.
- Chaput, C., Ecobichon, C., Cayet, N., Girardin, S.E., Werts, C., Guadagnini, S., Prévost, M.-C., Mengin-Lecreulx, D., Labigne, A., and Boneca, I.G. **2006**. Role of *AmiA* in the morphological transition of *Helicobacter pylori* and in immune escape. *PLoS Pathog.* **2**: e97.
- Charlson, E.S., Bittinger, K., Haas, A.R., Fitzgerald, A.S., Frank, I., Yadav, A., Bushman, F.D., and Collman, R.G. **2011**. Topographical continuity of bacterial populations in the healthy human respiratory tract. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **184**: 957–963.
- Cheng, K., Smyth, R.L., Govan, J.R., Doherty, C., Winstanley, C., Denning, N., Heaf, D.P., van Saene, H., and Hart, C.A. **1996**. Spread of beta-lactam-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a cystic fibrosis clinic. *Lancet Lond. Engl.* **348**: 639–642.
- Cherayil, B.J. **2010**. The role of iron in the immune response to bacterial infection. *Immunol. Res.* **50**: 1–9.
- Chihara, K., Matsumoto, S., Kagawa, Y., and Tsuneda, S. **2015**. Mathematical modeling of dormant cell formation in growing biofilm. *Front. Microbiol.* **6**.
- Chuard, C., Vaudaux, P.E., Proctor, R.A., and Lew, D.P. **1997**. Decreased susceptibility to antibiotic killing of a stable small colony variant of *Staphylococcus aureus* in fluid phase and on fibronectin-coated surfaces. *J. Antimicrob. Chemother.* **39**: 603–608.
- Chung, J.C.S., Becq, J., Fraser, L., Schulz-Trieglaff, O., Bond, N.J., Foweraker, J., Bruce, K.D., Smith, G.P., and Welch, M. **2012**. Genomic variation among contemporary *Pseudomonas aeruginosa* isolates from chronically-infected cystic fibrosis patients. *J. Bacteriol.* **194**: 4857–4866.
- Chung, J.W., Altman, E., Beveridge, T.J., and Speert, D.P. **2003**. Colonial morphology of *Burkholderia cepacia* complex genomovar III: implications in exopolysaccharide production, pilus expression, and persistence in the mouse. *Infect. Immun.* **71**: 904–909.
- Cigana, C., Curcurù, L., Leone, M.R., Ieranò, T., Lorè, N.I., Bianconi, I., Silipo, A., Cozzolino, F., Lanzetta, R., Molinaro, A., et al. **2009**. *Pseudomonas aeruginosa* exploits lipid A and muropeptides modification as a strategy to lower innate immunity during cystic fibrosis lung infection. *PloS One* **4**: e8439.
- Cigana, C., Lorè, N.I., Bernardini, M.L., and Bragonzi, A. **2011**. Dampening Host Sensing and Avoiding Recognition in *Pseudomonas aeruginosa* Pneumonia. *J. Biomed. Biotechnol.* **2011**: 852513.
- Ciofu, O., Riis, B., Pressler, T., Poulsen, H.E., and Høiby, N. **2005**. Occurrence of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients is associated with the oxidative stress caused by chronic lung inflammation. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**: 2276–2282.
- Ciofu, O., Mandsberg, L.F., Bjarnsholt, T., Wassermann, T., and Høiby, N. **2010**. Genetic adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* during chronic lung infection of patients with cystic fibrosis: strong and weak mutators with heterogeneous genetic backgrounds emerge in *muca* and/or *lasR* mutants. *Microbiol. Read. Engl.* **156**: 1108–1119.

- Claassen, S.L., Reese, J.M., Mysliwiec, V., and Mahlen, S.D. **2011**. *Achromobacter xylosoxidans* infection presenting as a pulmonary nodule mimicking cancer. *J. Clin. Microbiol.* **49**: 2751–2754.
- Clark, S.T., Diaz Caballero, J., Cheang, M., Coburn, B., Wang, P.W., Donaldson, S.L., Zhang, Y., Liu, M., Keshavjee, S., Yau, Y.C.W., et al. **2015**. Phenotypic diversity within a *Pseudomonas aeruginosa* population infecting an adult with cystic fibrosis. *Sci. Rep.* **5**: 10932.
- Coakley, R.D., Grubb, B.R., Paradiso, A.M., Gatzky, J.T., Johnson, L.G., Kreda, S.M., O’Neal, W.K., and Boucher, R.C. **2003**. Abnormal surface liquid pH regulation by cultured cystic fibrosis bronchial epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**: 16083–16088.
- Cobb, L.M., Mychaleckyj, J.C., Wozniak, D.J., and López-Boado, Y.S. **2004**. *Pseudomonas aeruginosa* flagellin and alginate elicit very distinct gene expression patterns in airway epithelial cells: implications for cystic fibrosis disease. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **173**: 5659–5670.
- Coburn, B., Wang, P.W., Diaz Caballero, J., Clark, S.T., Brahma, V., Donaldson, S., Zhang, Y., Surendra, A., Gong, Y., Elizabeth Tullis, D., et al. **2015**. Lung microbiota across age and disease stage in cystic fibrosis. *Sci. Rep.* **5**: 10241.
- Coenye, T., and LiPuma, J.J. **2002**. Use of the *gyrB* gene for the identification of *Pandoraea* species. *FEMS Microbiol. Lett.* **208**: 15–19.
- Coenye, T., Falsen, E., Hoste, B., Ohlén, M., Goris, J., Govan, J.R., Gillis, M., and Vandamme, P. **2000**. Description of *Pandoraea* gen. nov. with *Pandoraea apista* sp. nov., *Pandoraea pulmonicola* sp. nov., *Pandoraea pnomenus* sp. nov., *Pandoraea sputorum* sp. nov. and *Pandoraea norimbergensis* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50 Pt 2**: 887–899.
- Coenye, T., Liu, L., Vandamme, P., and LiPuma, J.J. **2001**. Identification of *Pandoraea* species by 16S ribosomal DNA-based PCR assays. *J. Clin. Microbiol.* **39**: 4452–4455.
- Coenye, T., Vanlaere, E., Falsen, E., and Vandamme, P. **2004**. *Stenotrophomonas africana* Drancourt et al. 1997 is a later synonym of *Stenotrophomonas maltophilia* (Hugh 1981) Palleroni and Bradbury 1993. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**: 1235–1237.
- Cohan, F.M. **2006**. Towards a conceptual and operational union of bacterial systematics, ecology, and evolution. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **361**: 1985–1996.
- Cohen, T.S., and Prince, A. **2012**. Cystic fibrosis: a mucosal immunodeficiency syndrome. *Nat. Med.* **18**: 509–519.
- Conrad, D., Haynes, M., Salamon, P., Rainey, P.B., Youle, M., and Rohwer, F. **2013**. Cystic fibrosis therapy: a community ecology perspective. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **48**: 150–156.
- Cools, P., Ho, E., Vranckx, K., Schelstraete, P., Wurth, B., Franckx, H., Ieven, G., Van Simaey, L., Van Daele, S., Verhulst, S., et al. **2016**. Epidemic *Achromobacter xylosoxidans* strain among Belgian cystic fibrosis patients and review of literature. *BMC Microbiol.* **16**: 122.
- Cooper, I.R., White, J., Mahenthiralingam, E., and Hanlon, G.W. **2008**. Long-term persistence of a single *Legionella pneumophila* strain possessing the mip gene in a municipal shower despite repeated cycles of chlorination. *J. Hosp. Infect.* **70**: 154–159.
- Corech, R., Rao, A., Laxova, A., Moss, J., Rock, M.J., Li, Z., Kosorok, M.R., Splaingard, M.L., Farrell, P.M., and Barbieri, J.T. **2005**. Early immune response to the components of the type III system of *Pseudomonas aeruginosa* in children with cystic fibrosis. *J. Clin. Microbiol.* **43**: 3956–3962.
- Cornelissen, C.N., Kelley, M., Hobbs, M.M., Anderson, J.E., Cannon, J.G., Cohen, M.S., and Sparling, P.F. **1998**. The transferrin receptor expressed by gonococcal strain FA1090 is required for the experimental infection of human male volunteers. *Mol. Microbiol.* **27**: 611–616.

- Costa, D., Mercier, A., Gravouil, K., Lesobre, J., Delafont, V., Bousseau, A., Verdon, J., and Imbert, C. **2015**. Pyrosequencing analysis of bacterial diversity in dental unit waterlines. *Water Res.* **81**: 223–231.
- Costello, A., Herbert, G., Fabunmi, L., Schaffer, K., Kavanagh, K.A., Caraher, E.M., Callaghan, M., and McClean, S. **2011**. Virulence of an emerging respiratory pathogen, genus *Pandoraea*, in vivo and its interactions with lung epithelial cells. *J. Med. Microbiol.* **60**: 289–299.
- Costello, A., Reen, F.J., O’Gara, F., Callaghan, M., and McClean, S. **2014**. Inhibition of co-colonizing cystic fibrosis-associated pathogens by *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia multivorans*. *Microbiol. Read. Engl.* **160**: 1474–1487.
- Costerton, J.W., Stewart, P.S., and Greenberg, E.P. **1999**. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* **284**: 1318–1322.
- Coutinho, C.P., Dos Santos, S.C., Madeira, A., Mira, N.P., Moreira, A.S., and Sá-Correia, I. **2011**. Long-term colonization of the cystic fibrosis lung by *Burkholderia cepacia* complex Bacteria: epidemiology, clonal Variation, and genome-wide expression alterations. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **1**: 12.
- Coward, A., Kenna, D.T.D., Perry, C., Martin, K., Doumith, M., and Turton, J.F. **2016**. Use of *nrdA* gene sequence clustering to estimate the prevalence of different *Achromobacter* species among Cystic Fibrosis patients in the UK. *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* **15**: 479–485.
- Cox, M.J., Allgaier, M., Taylor, B., Baek, M.S., Huang, Y.J., Daly, R.A., Karaoz, U., Andersen, G.L., Brown, R., Fujimura, K.E., et al. **2010**. airway microbiota and pathogen abundance in age-stratified Cystic Fibrosis patients. *PLOS ONE* **5**: e11044.
- Cullen, L., and McClean, S. **2015**. Bacterial Adaptation during Chronic Respiratory Infections. *Pathog. Basel Switz.* **4**: 66–89.
- Cullen, L., Weiser, R., Olszak, T., Maldonado, R.F., Moreira, A.S., Slachmuylders, L., Brackman, G., Paunova-Krasteva, T.S., Zarnowiec, P., Czerwonka, G., et al. **2015**. Phenotypic characterization of an international *Pseudomonas aeruginosa* reference panel: strains of cystic fibrosis (CF) origin show less *in vivo* virulence than non-CF strains. *Microbiol. Read. Engl.* **161**: 1961–1977.
- Cuthbertson, L., Rogers, G.B., Walker, A.W., Oliver, A., Green, L.E., Daniels, T.W.V., Carroll, M.P., Parkhill, J., Bruce, K.D., and van der Gast, C.J. **2016**. Respiratory microbiota resistance and resilience to pulmonary exacerbation and subsequent antimicrobial intervention. *ISME J* **10**: 1081–1091.
- Cutler, S.J., Fooks, A.R., and van der Poel, W.H.M. **2010**. Public health threat of new, reemerging, and neglected zoonoses in the industrialized world. *Emerg. Infect. Dis.* **16**: 1–7.
- Dacheux, D., Toussaint, B., Richard, M., Brochier, G., Croize, J., and Attree, I. **2000**. *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolates induce rapid, type III secretion-dependent, but ExoU-independent, oncosis of macrophages and polymorphonuclear neutrophils. *Infect. Immun.* **68**: 2916–2924.
- Dacheux, D., Attree, I., and Toussaint, B. **2001**. Expression of *ExsA* in trans confers type III secretion system-dependent cytotoxicity on noncytotoxic *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolates. *Infect. Immun.* **69**: 538–542.
- Dalton, T., Dowd, S.E., Wolcott, R.D., Sun, Y., Watters, C., Griswold, J.A., and Rumbaugh, K.P. **2011**. An *in vivo* polymicrobial biofilm wound infection model to study interspecies interactions. *PloS One* **6**: e27317.
- Damkiær, S., Yang, L., Molin, S., and Jelsbak, L. **2013**. Evolutionary remodeling of global regulatory networks during long-term bacterial adaptation to human hosts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**: 7766–7771.

- Daneshvar, M.I., Hollis, D.G., Steigerwalt, A.G., Whitney, A.M., Spangler, L., Douglas, M.P., Jordan, J.G., MacGregor, J.P., Hill, B.C., Tenover, F.C., et al. **2001**. Assignment of CDC weak oxidizer group 2 (WO-2) to the genus *Pandoraea* and characterization of three new *Pandoraea* genomospecies. *J. Clin. Microbiol.* **39**: 1819–1826.
- Daniels, T.W.V., Rogers, G.B., Stressmann, F.A., van der Gast, C.J., Bruce, K.D., Jones, G.R., Connett, G.J., Legg, J.P., and Carroll, M.P. **2013**. Impact of antibiotic treatment for pulmonary exacerbations on bacterial diversity in cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros.* **12**: 22–28.
- Darch, S.E., McNally, A., Harrison, F., Corander, J., Barr, H.L., Paszkiewicz, K., Holden, S., Fogarty, A., Crusz, S.A., and Diggle, S.P. **2015**. Recombination is a key driver of genomic and phenotypic diversity in a *Pseudomonas aeruginosa* population during cystic fibrosis infection. *Sci. Rep.* **5**: 7649.
- D’Argenio, D.A., Wu, M., Hoffman, L.R., Kulasekara, H.D., Déziel, E., Smith, E.E., Nguyen, H., Ernst, R.K., Larson Freeman, T.J., Spencer, D.H., et al. **2007**. Growth phenotypes of *Pseudomonas aeruginosa lasR* mutants adapted to the airways of Cystic Fibrosis patients. *Mol. Microbiol.* **64**: 512–533.
- Darmon, E., and Leach, D.R.F. **2014**. Bacterial genome instability. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* **78**: 1–39.
- De Baets, F., Schelstraete, P., Van Daele, S., Haerynck, F., and Vanechoutte, M. **2007**. *Achromobacter xylosoxidans* in cystic fibrosis: prevalence and clinical relevance. *J. Cyst. Fibros.* **6**: 75–78.
- Deberdt, P., Guyot, J., Coranson-Beaudu, R., Launay, J., Noreskal, M., Rivière, P., Vigné, F., Laplace, D., Lebreton, L., and Wicker, E. **2014**. Diversity of *Ralstonia solanacearum* in French Guiana expands knowledge of the “emerging ecotype.” *Phytopathology* **104**: 586–596.
- Defazio, J., Fleming, I.D., Shakhsher, B., Zaborina, O., and Alverdy, J.C. **2014**. The opposing forces of the intestinal microbiome and the emerging pathobiome. *Surg. Clin. North Am.* **94**: 1151–1161.
- Degand, N., Lotte, R., Decondé Le Butor, C., Segonds, C., Thouverez, M., Ferroni, A., Vallier, C., Mély, L., and Carrère, J. **2015**. Epidemic spread of *Pandoraea pulmonicola* in a cystic fibrosis center. *BMC Infect. Dis.* **15**:583
- Denamur, E., Bonacorsi, S., Giraud, A., Duriez, P., Hilali, F., Amorin, C., Bingen, E., Andremont, A., Picard, B., Taddei, F., et al. **2002**. High Frequency of Mutator Strains among Human Uropathogenic *Escherichia coli* Isolates. *J. Bacteriol.* **184**: 605–609.
- Deng, J., Brettar, I., Luo, C., Auchtung, J., Konstantinidis, K.T., Rodrigues, J.L.M., Höfle, M., and Tiedje, J.M. **2014**. Stability, genotypic and phenotypic diversity of *Shewanella baltica* in the redox transition zone of the Baltic Sea. *Environ. Microbiol.* **16**: 1854–1866.
- Dhar, N., and McKinney, J.D. **2007**. Microbial phenotypic heterogeneity and antibiotic tolerance. *Curr. Opin. Microbiol.* **10**: 30–38.
- Di Lorenzo, F., Kubik, Ł., Oblak, A., Lorè, N.I., Cigana, C., Lanzetta, R., Parrilli, M., Hamad, M.A., De Soyza, A., Silipo, A., et al. **2015**. Activation of Human Toll-like Receptor 4 (TLR4)·Myeloid Differentiation Factor 2 (MD-2) by Hypoacylated Lipopolysaccharide from a Clinical Isolate of *Burkholderia cenocepacia*. *J. Biol. Chem.* **290**: 21305–21319.
- Diard, M., Sellin, M.E., Dolowschiak, T., Arnoldini, M., Ackermann, M., and Hardt, W.-D. **2014**. Antibiotic treatment selects for cooperative virulence of *Salmonella typhimurium*. *Curr. Biol. CB* **24**: 2000–2005.
- Didelot, X., Walker, A.S., Peto, T.E., Crook, D.W., and Wilson, D.J. **2016**. Within-host evolution of bacterial pathogens. *Nat. Rev. Microbiol.* **14**: 150–162.
- Diggle, S.P., Griffin, A.S., Campbell, G.S., and West, S.A. **2007**. Cooperation and conflict in quorum-sensing bacterial populations. *Nature* **450**: 411–414.

- Dingemans, J., Ye, L., Hildebrand, F., Tontodonati, F., Craggs, M., Bilocq, F., De Vos, D., Crabbe, A., Van Houdt, R., Malfroot, A., et al. **2014**. The deletion of *TonB*-dependent receptor genes is part of the genome reduction process that occurs during adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the cystic fibrosis lung. *Pathog. Dis.* **71**: 26–38.
- Dios Caballero, J., Pastor, M.D., Vindel, A., Máiz, L., Yagüe, G., Salvador, C., Cobo, M., Morosini, M.-I., del Campo, R., Cantón, R., et al. **2016**. Emergence of *cfr*-mediated Linezolid resistance in a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* epidemic clone isolated from patients with Cystic Fibrosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **60**: 1878–1882.
- Dobrindt, U., Zdziarski, J., Salvador, E., and Hacker, J. **2010**. Bacterial genome plasticity and its impact on adaptation during persistent infection. *Int. J. Med. Microbiol.* **300**: 363–366.
- Drenkard, E., and Ausubel, F.M. **2002**. *Pseudomonas* biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. *Nature* **416**: 740–743.
- Drevinek, P., Vosahlikova, S., Cinek, O., Vavrova, V., Bartosova, J., Pohunek, P., and Mahenthiralingam, E. **2005**. Widespread clone of *Burkholderia cenocepacia* in cystic fibrosis patients in the Czech Republic. *J. Med. Microbiol.* **54**: 655–659.
- Drevinek, P., Baldwin, A., Lindenburg, L., Joshi, L.T., Marchbank, A., Vosahlikova, S., Dowson, C.G., and Mahenthiralingam, E. **2010**. Oxidative stress of *Burkholderia cenocepacia* induces insertion sequence-mediated genomic rearrangements that interfere with macrorestriction-based genotyping. *J. Clin. Microbiol.* **48**: 34–40.
- Duan, K., Dammel, C., Stein, J., Rabin, H., and Surette, M.G. **2003**. Modulation of *Pseudomonas aeruginosa* gene expression by host microflora through interspecies communication. *Mol. Microbiol.* **50**: 1477–1491.
- Duong, J., Booth, S.C., McCartney, N.K., Rabin, H.R., Parkins, M.D., and Storey, D.G. **2015**. Phenotypic and genotypic comparison of epidemic and non-epidemic strains of *Pseudomonas aeruginosa* from individuals with cystic fibrosis. *PLoS One* **10**: e0143466.
- Dupont, C., Michon, A.-L., Jumas-Bilak, E., Nørskov-Lauritsen, N., Chiron, R., and Marchandin, H. **2015**. Inpatient diversity of *Achromobacter* spp. involved in chronic colonization of Cystic Fibrosis airways. *Infect. Genet. Evol. Dis.* **32**: 214–223.
- Dupont, C., Terru, D., Aguilhon, S., Frapier, J.-M., Paquis, M.-P., Morquin, D., Lamy, B., Godreuil, S., Parer, S., Lotthé, A., et al. **2016**. Source-case investigation of *Mycobacterium wolinskyi* cardiac surgical site infection. *J. Hosp. Infect.* **93**: 235–239.
- Ee, R., Lim, Y.-L., Kin, L.-X., Yin, W.-F., and Chan, K.-G. **2014**. Quorum sensing activity in *Pandora* *pnomenusa* RB38. *Sensors* **14**: 10177–10186.
- Ee, R., Ambrose, M., Lazenby, J., Williams, P., Chan, K.-G., and Roddam, L. **2015**. Genome sequences of two *Pandora* *pnomenusa* isolates recovered 11 months apart from a Cystic Fibrosis patient. *Genome Announc.* **3**.
- Elfarash, A., Dingemans, J., Ye, L., Hassan, A.A., Craggs, M., Reimann, C., Thomas, M.S., and Cornelis, P. **2014**. Pore-forming pyocin S5 utilizes the *FptA* ferripyochelin receptor to kill *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **160**: 261–269.
- Ernst, R.K., Yi, E.C., Guo, L., Lim, K.B., Burns, J.L., Hackett, M., and Miller, S.I. **1999**. Specific lipopolysaccharide found in cystic fibrosis airway *Pseudomonas aeruginosa*. *Science* **286**: 1561–1565.
- Ernst, R.K., D'Argenio, D.A., Ichikawa, J.K., Bangera, M.G., Selgrade, S., Burns, J.L., Hiatt, P., McCoy, K., Brittnacher, M., Kas, A., et al. **2003a**. Genome mosaicism is conserved but not unique in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from the airways of young children with cystic fibrosis. *Environ. Microbiol.* **5**: 1341–1349.

- Ernst, R.K., Hajjar, A.M., Tsai, J.H., Moskowitz, S.M., Wilson, C.B., and Miller, S.I. **2003b**. *Pseudomonas aeruginosa* lipid A diversity and its recognition by Toll-like receptor 4. *J. Endotoxin Res.* **9**: 395–400.
- Ernst, R.K., Adams, K.N., Moskowitz, S.M., Kraig, G.M., Kawasaki, K., Stead, C.M., Trent, M.S., and Miller, S.I. **2006**. The *Pseudomonas aeruginosa* lipid A deacylase: selection for expression and loss within the cystic fibrosis airway. *J. Bacteriol.* **188**: 191–201.
- Ernst, R.K., Moskowitz, S.M., Emerson, J.C., Kraig, G.M., Adams, K.N., Harvey, M.D., Ramsey, B., Speert, D.P., Burns, J.L., and Miller, S.I. **2007**. Unique lipid a modifications in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from the airways of patients with cystic fibrosis. *J. Infect. Dis.* **196**: 1088–1092.
- Eschbach, M., Schreiber, K., Trunk, K., Buer, J., Jahn, D., and Schobert, M. **2004**. Long-term anaerobic survival of the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* via pyruvate fermentation. *J. Bacteriol.* **186**: 4596–4604.
- Essoh, C., Blouin, Y., Loukou, G., Cablanmian, A., Lathro, S., Kutter, E., Thien, H.V., Vergnaud, G., and Pourcel, C. **2013**. The susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* Strains from cystic fibrosis patients to bacteriophages. *PLoS One* **8**.
- Falkinham, J.O. **2015**. Common Features of Opportunistic Premise Plumbing Pathogens. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **12**: 4533–4545.
- Falkinham, J.O., Hilborn, E.D., Arduino, M.J., Pruden, A., and Edwards, M.A. **2015**. Epidemiology and ecology of Opportunistic Premise Plumbing Pathogens: *Legionella pneumophila*, *Mycobacterium avium*, and *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ. Health Perspect.* **123**: 749–758.
- Feliziani, S., Luján, A.M., Moyano, A.J., Sola, C., Bocco, J.L., Montanaro, P., Canigia, L.F., Argaraña, C.E., and Smania, A.M. **2010**. Mucoidy, quorum sensing, mismatch repair and antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* from Cystic Fibrosis chronic airways infections. *PLoS ONE* **5**: e12669.
- Feltman, H., Schulert, G., Khan, S., Jain, M., Peterson, L., and Hauser, A.R. **2001**. Prevalence of type III secretion genes in clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol. Read. Engl.* **147**: 2659–2669.
- Fera, M.T., Maugeri, T.L., Gugliandolo, C., Bonanno, D., La Camera, E., Papasergi, S., and Carbone, M. **2007**. Occurrence of *Burkholderia cepacia* complex, *Ralstonia* and *Pandora* species DNAs in the coastal environment of the Straits of Messina (Italy). *Mar. Pollut. Bull.* **54**: 803–808.
- Fernández-Olmos, A., Morosini, M.I., Lamas, A., García-Castillo, M., García-García, L., Cantón, R., and Máiz, L. **2012a**. Clinical and microbiological features of a cystic fibrosis patient chronically colonized with *Pandora* species identified by combining 16S rRNA sequencing and matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* **50**: 1096–1098.
- Fernández-Olmos, A., García-Castillo, M., Morosini, M.-I., Lamas, A., Máiz, L., and Cantón, R. **2012b**. MALDI-TOF MS improves routine identification of non-fermenting Gram negative isolates from cystic fibrosis patients. *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* **11**: 59–62.
- Ferreira, A.G., Leão, R.S., Carvalho-Assef, A.P.D., Folescu, T.W., Barth, A.L., and Marques, E.A. **2010**. Influence of biofilm formation in the susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* from Brazilian patients with cystic fibrosis. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* **118**: 606–612.
- Ferroni, A., Sermet-Gaudelus, I., Abachin, E., Quesnes, G., Lenoir, G., Berche, P., and Gaillard, J.L. **2003**. Phenotypic and genotypic characteristics of non fermenting atypical strains recovered from cystic fibrosis patients. *Pathol. Biol. (Paris)* **51**: 405–411.
- Ferroni, A., Werkhauser-Bertrand, A., Bourgeois, M.L., Beauvais, R., Vrielynck, S., Durand, C., Lenoir, G., Berche, P., and Sermet-Gaudelus, I. **2008**. Bacterial contamination in the environment of hospitalised children with cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros.* **7**: 477–482.

- Ferroni, A., Guillemot, D., Moumile, K., Bernede, C., Le Bourgeois, M., Waernessyckle, S., Descamps, P., Sermet-Gaudelus, I., Lenoir, G., Berche, P., et al. **2009**. Effect of mutator *P. aeruginosa* on antibiotic resistance acquisition and respiratory function in cystic fibrosis. *Pediatr. Pulmonol.* **44**: 820–825.
- Filleron, A., Chiron, R., Reverdy, M.-E., Jean-Pierre, H., Dumitrescu, O., Aleyrangues, L., Counil, F., Jumas-Bilak, E., and Marchandin, H. **2011**. *Staphylococcus aureus* with decreased susceptibility to glycopeptides in cystic fibrosis patients. *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* **10**: 377–382.
- Filloux, A. **2011**. Protein Secretion Systems in *Pseudomonas aeruginosa*: An Essay on Diversity, Evolution, and Function. *Front. Microbiol.* **2**.
- Flume, P.A., and Van Devanter, D.R. **2012**. State of progress in treating cystic fibrosis respiratory disease. *BMC Med.* **10**: 88.
- Fodor, A.A., Klem, E.R., Gilpin, D.F., Elborn, J.S., Boucher, R.C., Tunney, M.M., and Wolfgang, M.C. **2012**. The adult cystic fibrosis airway microbiota is stable over time and infection type, and highly resilient to antibiotic treatment of exacerbations. *PLoS ONE* **7**: e45001.
- Fogle, C.A., Nagle, J.L., and Desai, M.M. **2008**. Clonal interference, multiple mutations and adaptation in large asexual populations. *Genetics* **180**: 2163–2173.
- Folkesson, A., Jelsbak, L., Yang, L., Johansen, H.K., Ciofu, O., Høiby, N., and Molin, S. **2012**. Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the cystic fibrosis airway: an evolutionary perspective. *Nat. Rev. Microbiol.* **10**: 841–851.
- Fothergill, J.L., White, J., Foweraker, J.E., Walshaw, M.J., Ledson, M.J., Mahenthiralingam, E., and Winstanley, C. **2010a**. Impact of *Pseudomonas aeruginosa* genomic instability on the application of typing methods for chronic cystic fibrosis infections. *J. Clin. Microbiol.* **48**: 2053–2059.
- Fothergill, J.L., Mowat, E., Ledson, M.J., Walshaw, M.J., and Winstanley, C. **2010b**. Fluctuations in phenotypes and genotypes within populations of *Pseudomonas aeruginosa* in the cystic fibrosis lung during pulmonary exacerbations. *J. Med. Microbiol.* **59**: 472–481.
- Foweraker, J.E., Laughton, C.R., Brown, D.F.J., and Bilton, D. **2005**. Phenotypic variability of *Pseudomonas aeruginosa* in sputa from patients with acute infective exacerbation of cystic fibrosis and its impact on the validity of antimicrobial susceptibility testing. *J. Antimicrob. Chemother.* **55**: 921–927.
- Foweraker, J.E., Laughton, C.R., Brown, D.F., and Bilton, D. **2009**. Comparison of methods to test antibiotic combinations against heterogeneous populations of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* from patients with acute infective exacerbations in cystic fibrosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**: 4809–4815.
- Frank, D.W., Vallis, A., Wiener-Kronish, J.P., Roy-Burman, A., Spack, E.G., Mullaney, B.P., Megdoud, M., Marks, J.D., Fritz, R., and Sawa, T. **2002**. Generation and characterization of a protective monoclonal antibody to *Pseudomonas aeruginosa* PcrV. *J. Infect. Dis.* **186**: 64–73.
- Franklin, M.J., Nivens, D.E., Weadge, J.T., and Howell, P.L. **2011**. Biosynthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* extracellular polysaccharides, alginate, Pel, and Psl. *Front. Microbiol.* **2**: 167.
- Friesen, M.L., Saxer, G., Travisano, M., and Doebeli, M. **2004**. Experimental evidence for sympatric ecological diversification due to frequency-dependent competition in *Escherichia coli*. *Evol. Int. J. Org. Evol.* **58**: 245–260.
- Frimmersdorf, E., Horatzek, S., Pelnikevich, A., Wiehlmann, L., and Schomburg, D. **2010**. How *Pseudomonas aeruginosa* adapts to various environments: a metabolomic approach. *Environ. Microbiol.* **12**: 1734–1747.
- Frisk, A., Jyot, J., Arora, S.K., and Ramphal, R. **2002**. Identification and Functional Characterization of *flgM*, a Gene Encoding the Anti-Sigma 28 Factor in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **184**: 1514–1521.

- Fukami, T., Beaumont, H.J.E., Zhang, X., and Rainey, P.B. **2007**. Immigration history controls diversification in experimental adaptive radiation. *Nature* **446**: 436–439.
- Furukawa, S., Kuchma, S.L., and O'Toole, G.A. **2006**. Keeping their options open: acute versus persistent infections. *J. Bacteriol.* **188**: 1211–1217.
- Gardner, A., West, S.A., and Griffin, A.S. **2007**. Is bacterial persistence a social trait?. *PLOS ONE* **2**: e752.
- Genevois, A., Roques, C., Segonds, C., Cavalié, L., Brémont, F., Maubisson, L., Mas, E., and Mittaine, M. **2015**. Bacterial colonization status of cystic fibrosis children's toothbrushes: A pilot study. *Arch. Pédiatrie* **22**: 1240–1246.
- Georgiades, K., and Raoult, D. **2010**. Defining pathogenic bacterial species in the genomic era. *Front. Microbiol.* **1**: 151.
- Gibson, R.L., Burns, J.L., and Ramsey, B.W. **2003**. Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **168**: 918–951.
- Girard, G., and Bloemberg, G.V. **2008**. Central role of quorum sensing in regulating the production of pathogenicity factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *Future Microbiol.* **3**: 97–106.
- Godoy, D., Randle, G., Simpson, A.J., Aanensen, D.M., Pitt, T.L., Kinoshita, R., and Spratt, B.G. **2003**. Multilocus sequence typing and evolutionary relationships among the causative agents of Melioidosis and Glanders, *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*. *J. Clin. Microbiol.* **41**: 2068–2079.
- Goerke, C., and Wolz, C. **2004**. Regulatory and genomic plasticity of *Staphylococcus aureus* during persistent colonization and infection. *Int. J. Med. Microbiol.* **294**: 195–202.
- Gómez, M.I., and Prince, A. **2007**. Opportunistic infections in lung disease: *Pseudomonas* infections in cystic fibrosis. *Curr. Opin. Pharmacol.* **7**: 244–251.
- Gómez-Cerezo, J., Suárez, I., Ríos, J.J., Peña, P., García de Miguel, M.J., de José, M., Monteagudo, O., Linares, P., Barbado-Cano, A., and Vázquez, J.J. **2003**. *Achromobacter xylosoxidans* bacteremia: a 10-year analysis of 54 cases. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **22**: 360–363.
- Gomila, M., Prince-Manzano, C., Svensson-Stadler, L., Busquets, A., Erhard, M., Martínez, D.L., Lalucat, J., and Moore, E.R.B. **2014**. Genotypic and phenotypic applications for the differentiation and species-level identification of *Achromobacter* for clinical diagnoses. *PLoS One* **9**: e114356.
- Goss, C.H., and Muhlebach, M.S. **2011**. Review: *Staphylococcus aureus* and MRSA in cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros.* **10**: 298–306.
- Von Götz, F., Häussler, S., Jordan, D., Saravanamuthu, S.S., Wehmhoner, D., Strüssmann, A., Lauber, J., Attree, I., Buer, J., Tümmler, B., et al. **2004**. Expression analysis of a highly adherent and cytotoxic small colony variant of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a lung of a patient with cystic fibrosis. *J. Bacteriol.* **186**: 3837–3847.
- Govan, J.R., and Deretic, V. **1996**. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol. Rev.* **60**: 539–574.
- Govan, J.R., and Nelson, J.W. **1992**. Microbiology of lung infection in cystic fibrosis. *Br. Med. Bull.* **48**: 912–930.
- Green, H., and Jones, A.M. **2015**. The microbiome and emerging pathogens in cystic fibrosis and non-cystic fibrosis bronchiectasis. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* **36**: 225–235.
- Greub, G., and Raoult, D. **2004**. Microorganisms resistant to free-living amoebae. *Clin. Microbiol. Rev.* **17**: 413–433.

- Grote, J., Krysciak, D., and Streit, W.R. **2015**. Phenotypic heterogeneity, a phenomenon that may explain why quorum sensing does not always result in truly homogenous cell behavior. *Appl. Environ. Microbiol.* **81**: 5280–5289.
- Hadjiliadis, D. **2007**. Special considerations for patients with cystic fibrosis undergoing lung transplantation. *Chest* **131**: 1224–1231.
- Hajjar, A.M., Ernst, R.K., Tsai, J.H., Wilson, C.B., and Miller, S.I. **2002**. Human Toll-like receptor 4 recognizes host-specific LPS modifications. *Nat. Immunol.* **3**: 354–359.
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W., and Stoodley, P. **2004**. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**: 95–108.
- Hancock, R.E., Mutharia, L.M., Chan, L., Darveau, R.P., Speert, D.P., and Pier, G.B. **1983**. *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis: a class of serum-sensitive, nontypable strains deficient in lipopolysaccharide O side chains. *Infect. Immun.* **42**: 170–177.
- Hansen, C.R., Pressler, T., Nielsen, K.G., Jensen, P.Ø., Bjarnsholt, T., and Høiby, N. **2010**. Inflammation in *Achromobacter xylosoxidans* infected cystic fibrosis patients. *J. Cyst. Fibros.* **9**: 51–58.
- Hansen, C.R., Pressler, T., Ridderberg, W., Johansen, H.K., and Skov, M. **2013**. *Achromobacter* species in cystic fibrosis: cross-infection caused by indirect patient-to-patient contact. *J. Cyst. Fibros.* **12**: 609–615.
- Hansen, S.K., Rainey, P.B., Haagenen, J.A.J., and Molin, S. **2007**. Evolution of species interactions in a biofilm community. *Nature* **445**: 533–536.
- Harik, N.S., Com, G., Tang, X., Melguizo Castro, M., Stemper, M.E., and Carroll, J.L. **2016**. Clinical characteristics and epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in children with cystic fibrosis from a center with a high MRSA prevalence. *Am. J. Infect. Control* **44**: 409–415.
- Harmsen, M., Yang, L., Pamp, S.J., and Tolker-Nielsen, T. **2010**. An update on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation, tolerance, and dispersal. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **59**: 253–268.
- Harrison, F. **2007**. Microbial ecology of the cystic fibrosis lung. *Microbiol. Read. Engl.* **153**: 917–923.
- Hauser, A.R. **2009**. The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**: 654–665.
- Hauser, A.R., Jain, M., Bar-Meir, M., and McColley, S.A. **2011**. Clinical significance of microbial infection and adaptation in cystic fibrosis. *Clin. Microbiol. Rev.* **24**: 29–70.
- Häussler, S., Lehmann, C., Breselge, C., Rohde, M., Classen, M., Tümmler, B., Vandamme, P., and Steinmetz, I. **2003**. Fatal outcome of lung transplantation in cystic fibrosis patients due to small-colony variants of the *Burkholderia cepacia* complex. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **22**: 249–253.
- Head, N.E., and Yu, H. **2004**. Cross-sectional analysis of clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*: biofilm formation, virulence, and genome diversity. *Infect. Immun.* **72**: 133–144.
- Hector, A., Kirn, T., Ralhan, A., Graepler-Mainka, U., Berenbrinker, S., Riethmueller, J., Hogardt, M., Wagner, M., Pflieger, A., Autenrieth, I., et al. **2016**. Microbial colonization and lung function in adolescents with cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.*
- Hegreness, M., Shores, N., Hartl, D., and Kishony, R. **2006**. An equivalence principle for the incorporation of favorable mutations in asexual populations. *Science* **311**: 1615–1617.

- Heirali, A., McKeon, S., Purighalla, S., Storey, D.G., Rossi, L., Costilhes, G., Drews, S.J., Rabin, H.R., Surette, M.G., and Parkins, M.D. **2016**. Assessment of the microbial constituents of the home environment of individuals with Cystic Fibrosis (CF) and their association with lower airways infections. *PLoS One* **11**: e0148534.
- Herron, M.D., and Doebeli, M. **2013**. Parallel evolutionary dynamics of adaptive diversification in *Escherichia coli*. *PLoS Biol* **11**: e1001490.
- Hibbing, M.E., Fuqua, C., Parsek, M.R., and Peterson, S.B. **2010**. Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**: 15–25.
- Hoboth, C., Hoffmann, R., Eichner, A., Henke, C., Schmoldt, S., Imhof, A., Heesemann, J., and Hogardt, M. **2009**. Dynamics of adaptive microevolution of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* during chronic pulmonary infection in patients with cystic fibrosis. *J. Infect. Dis.* **200**: 118–130.
- Hocquet, D., Petitjean, M., Rohmer, L., Valot, B., Kulasekara, H.D., Bedel, E., Bertrand, X., Plésiat, P., Köhler, T., Pantel, A., et al. **2016**. Pyomelanin-producing *Pseudomonas aeruginosa* selected during chronic infections have a large chromosomal deletion which confers resistance to pyocins. *Environ. Microbiol.*
- Hoen, A.G., Li, J., Moulton, L.A., O'Toole, G.A., Housman, M.L., Koestler, D.C., Guill, M.F., Moore, J.H., Hibberd, P.L., Morrison, H.G., et al. **2015**. Associations between gut microbial colonization in early life and respiratory outcomes in cystic fibrosis. *J. Pediatr.* **167**: 138-147-3.
- Hoffman, L.R., Kulasekara, H.D., Emerson, J., Houston, L.S., Burns, J.L., Ramsey, B.W., and Miller, S.I. **2009**. *Pseudomonas aeruginosa lasR* mutants are associated with cystic fibrosis lung disease progression. *J. Cyst. Fibros.* **8**: 66–70.
- Hoffman, L.R., Richardson, A.R., Houston, L.S., Kulasekara, H.D., Martens-Habbena, W., Klausen, M., Burns, J.L., Stahl, D.A., Hassett, D.J., Fang, F.C., et al. **2010**. Nutrient availability as a mechanism for selection of antibiotic tolerant *Pseudomonas aeruginosa* within the CF airway. *PLoS Pathog.* **6**: e1000712.
- Hoffmann, N., Rasmussen, T.B., Jensen, P.Ø., Stub, C., Hentzer, M., Molin, S., Ciofu, O., Givskov, M., Johansen, H.K., and Høiby, N. **2005**. Novel mouse model of chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection mimicking Cystic Fibrosis. *Infect. Immun.* **73**: 2504–2514.
- Hoffmann, N., Lee, B., Hentzer, M., Rasmussen, T.B., Song, Z., Johansen, H.K., Givskov, M., and Høiby, N. **2007**. Azithromycin blocks quorum sensing and alginate polymer formation and increases the sensitivity to serum and stationary-growth-phase killing of *Pseudomonas aeruginosa* and attenuates chronic *P. aeruginosa* lung infection in *Cftr*(-/-) mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**: 3677–3687.
- Hogardt, M., and Heesemann, J. **2010**. Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* during persistence in the cystic fibrosis lung. *Int. J. Med. Microbiol.* **300**: 557–562.
- Hogardt, M., Hoboth, C., Schmoldt, S., Henke, C., Bader, L., and Heesemann, J. **2007**. Stage-specific adaptation of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* isolates during chronic pulmonary infection in patients with cystic fibrosis. *J. Infect. Dis.* **195**: 70–80.
- Hogardt, M., Ulrich, J., Riehn-Kopp, H., and Tümmler, B. **2009**. EuroCareCF quality assessment of diagnostic microbiology of cystic fibrosis isolates. *J. Clin. Microbiol.* **47**: 3435–3438.
- Høiby, N., Ciofu, O., Johansen, H.K., Song, Z., Moser, C., Jensen, P.Ø., Molin, S., Givskov, M., Tolker-Nielsen, T., and Bjarnsholt, T. **2011**. The clinical impact of bacterial biofilms. *Int. J. Oral Sci.* **3**: 55–65.
- Høiby, Niels **2006**. *P. aeruginosa* in Cystic Fibrosis patients resists host defenses. *Antibiotics.* 571–577.
- Holden, M.T.G., Seth-Smith, H.M.B., Crossman, L.C., Sebahia, M., Bentley, S.D., Cerdeño-Tárraga, A.M., Thomson, N.R., Bason, N., Quail, M.A., Sharp, S., et al. **2009**. The genome of *Burkholderia cenocepacia* J2315, an epidemic pathogen of cystic fibrosis patients. *J. Bacteriol.* **191**: 261–277.

- Hraiech, S., Brégeon, F., and Rolain, J.-M. **2015**. Bacteriophage-based therapy in cystic fibrosis-associated *Pseudomonas aeruginosa* infections: rationale and current status. *Drug Des Devel Ther* **9**: 3653–3663.
- Hudson, V.M. **2001**. Rethinking cystic fibrosis pathology: the critical role of abnormal reduced glutathione (GSH) transport caused by *CFTR* mutation. *Free Radic. Biol. Med.* **30**: 1440–1461.
- Hudson, V.L., Wielinski, C.L., and Regelman, W.E. **1993**. Prognostic implications of initial oropharyngeal bacterial flora in patients with cystic fibrosis diagnosed before the age of two years. *J. Pediatr.* **122**: 854–860.
- Hughes, J.B., Hellmann, J.J., Ricketts, T.H., and Bohannon, B.J.M. **2001**. Counting the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 4399–4406.
- Hugon, E., Marchandin, H., Poirée, M., Fosse, T., and Sirvent, N. **2015**. *Achromobacter* bacteraemia outbreak in a paediatric onco-haematology department related to strain with high surviving ability in contaminated disinfectant atomizers. *J. Hosp. Infect.* **89**: 116–122.
- Hunter, R.C., Asfour, F., Dingemans, J., Osuna, B.L., Samad, T., Malfroot, A., Cornelis, P., and Newman, D.K. **2013**. Ferrous iron is a significant component of bioavailable iron in cystic fibrosis airways. *mBio* **4**.
- Huse, H.K., Kwon, T., Zlosnik, J.E.A., Speert, D.P., Marcotte, E.M., and Whiteley, M. **2010**. Parallel evolution in *Pseudomonas aeruginosa* over 39,000 generations *in vivo*. *mBio* **1**: e00199-10.
- Hutchinson, G.E. **1958**. Concluding remarks. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* **22**: 415–427.
- Huus, K.E., Joseph, J., Zhang, L., Wong, A., Aaron, S.D., Mah, T.-F., and Sad, S. **2016**. Clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from chronically infected Cystic Fibrosis patients fail to activate the inflammasome during both itable Infection and pulmonary exacerbation. *J. Immunol. Baltim.* **196**: 3097–3108.
- Hybiske, K., Ichikawa, J.K., Huang, V., Lory, S.J., and Machen, T.E. **2004**. Cystic fibrosis airway epithelial cell polarity and bacterial flagellin determine host response to *Pseudomonas aeruginosa*. *Cell. Microbiol.* **6**: 49–63.
- Jain, M., Ramirez, D., Seshadri, R., Cullina, J.F., Powers, C.A., Schulert, G.S., Bar-Meir, M., Sullivan, C.L., McColley, S.A., and Hauser, A.R. **2004**. Type III secretion phenotypes of *Pseudomonas aeruginosa* strains change during infection of individuals with cystic fibrosis. *J. Clin. Microbiol.* **42**: 5229–5237.
- Jain, M., Bar-Meir, M., McColley, S., Cullina, J., Potter, E., Powers, C., Prickett, M., Seshadri, R., Jovanovic, B., Petrocheilou, A., et al. **2008**. Evolution of *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion in cystic fibrosis: a paradigm of chronic infection. *Transl. Res. J. Lab. Clin. Med.* **152**: 257–264.
- Jani, M., Mathee, K., and Azad, R.K. **2016**. Identification of novel genomic islands in Liverpool Epidemic Strain of *Pseudomonas aeruginosa* using segmentation and clustering. *Front. Microbiol.* **7**: 1210.
- Jarrell, K.F., and McBride, M.J. **2008**. The surprisingly diverse ways that prokaryotes move. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**: 466–476.
- Jeffery, I.B., Lynch, D.B., and O’Toole, P.W. **2016**. Composition and temporal stability of the gut microbiota in older persons. *ISME J.* **10**: 170–182.
- Jeong, S.E., Lee, H.J., Jia, B., and Jeon, C.O. **2016**. *Pandoraea terrae* sp. nov., isolated from forest soil and emended description of the genus *Pandoraea* Coenye et al., 2000. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*
- Johansen, H.K., Nørregaard, L., Gøtzsche, P.C., Pressler, T., Koch, C., and Høiby, N. **2004**. Antibody response to *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients: a marker of therapeutic success? A 30-year cohort

- study of survival in Danish CF patients after onset of chronic *P. aeruginosa* lung infection. *Pediatr. Pulmonol.* **37**: 427–432.
- Johnson, L.N., Han, J.-Y., Moskowitz, S.M., Burns, J.L., Qin, X., and Englund, J.A. **2004**. *Pandoraea* bacteremia in a cystic fibrosis patient with associated systemic illness. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **23**: 881–882.
- Jolivet-Gougeon, A., Kovacs, B., Le Gall-David, S., Le Bars, H., Bousarghin, L., Bonnaure-Mallet, M., Lobel, B., Guillé, F., Soussy, C.-J., and Tenke, P. **2011**. Bacterial hypermutation: clinical implications. *J. Med. Microbiol.* **60**: 563–573.
- Jones, R.N. **2010**. Microbial etiologies of hospital-acquired bacterial pneumonia and ventilator-associated bacterial pneumonia. *Clin. Infect. Dis.* **51 Suppl 1**: S81-87.
- de Jong, I.G., Haccou, P., and Kuipers, O.P. **2011**. Bet hedging or not? A guide to proper classification of microbial survival strategies. *Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* **33**: 215–223.
- Jordán, F., Lauria, M., Scotti, M., Nguyen, T.-P., Praveen, P., Morine, M., and Priami, C. **2015**. Diversity of key players in the microbial ecosystems of the human body. *Sci. Rep.* **5**: 15920.
- Jørgensen, I.M., Johansen, H.K., Frederiksen, B., Pressler, T., Hansen, A., Vandamme, P., Høiby, N., and Koch, C. **2003**. Epidemic spread of *Pandoraea apista*, a new pathogen causing severe lung disease in cystic fibrosis patients. *Pediatr. Pulmonol.* **36**: 439–446.
- Jørgensen, K.M., Wassermann, T., Johansen, H.K., Christiansen, L.E., Molin, S., Høiby, N., and Ciofu, O. **2015**. Diversity of metabolic profiles of cystic fibrosis *Pseudomonas aeruginosa* during the early stages of lung infection. *Microbiol. Read. Engl.* **161**: 1447–1462.
- Jorth, P., Staudinger, B.J., Wu, X., Hisert, K.B., Hayden, H., Garudathri, J., Harding, C.L., Radey, M.C., Rezayat, A., Bautista, G., et al. **2015**. Regional isolation drives bacterial diversification within Cystic Fibrosis lungs. *Cell Host Microbe* **18**: 307–319.
- Jumas-Bilak, E., Michaux-Charachon, S., Bourg, G., O’Callaghan, D., and Ramuz, M. **1998**. Differences in chromosome number and genome rearrangements in the genus *Brucella*. *Mol. Microbiol.* **27**: 99–106.
- Jyot, J., Sonawane, A., Wu, W., and Ramphal, R. **2007**. Genetic mechanisms involved in the repression of flagellar assembly by *Pseudomonas aeruginosa* in human mucus. *Mol. Microbiol.* **63**: 1026–1038.
- Kahl, B.C., Duebbers, A., Lubritz, G., Haeberle, J., Koch, H.G., Ritzerfeld, B., Reilly, M., Harms, E., Proctor, R.A., Herrmann, M., et al. **2003**. Population dynamics of persistent *Staphylococcus aureus* isolated from the airways of cystic fibrosis patients during a 6-year prospective study. *J. Clin. Microbiol.* **41**: 4424–4427.
- Kalferstova, L., Kolar, M., Fila, L., Vavrova, J., and Drevinek, P. **2015**. Gene expression profiling of *Burkholderia cenocepacia* at the time of cepacia syndrome: loss of motility as a marker of poor prognosis?. *J. Clin. Microbiol.* **53**: 1515–1522.
- Kanellopoulou, M., Pournaras, S., Iglezos, H., Skarmoutsou, N., Papafrangas, E., and Maniatis, A.N. **2004a**. Persistent colonization of nine cystic fibrosis patients with an *Achromobacter* (*Alcaligenes*) *xylosoxidans* clone. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol.* **23**: 336–339.
- Kanellopoulou, M., Pournaras, S., Iglezos, H., Skarmoutsou, N., Papafrangas, E., and Maniatis, A.N. **2004b**. Persistent colonization of nine cystic fibrosis patients with an *Achromobacter* (*Alcaligenes*) *xylosoxidans* clone. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **23**: 336–339.
- Kao, K.C., and Sherlock, G. **2008**. Molecular characterization of clonal interference during adaptive evolution in asexual populations of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat. Genet.* **40**: 1499–1504.

- Kidd, T.J., Ritchie, S.R., Ramsay, K.A., Grimwood, K., Bell, S.C., and Rainey, P.B. **2012**. *Pseudomonas aeruginosa* exhibits frequent recombination, but only a limited association between genotype and ecological setting. *PLoS One* **7**: e44199.
- Kim, E.-J., Sabra, W., and Zeng, A.-P. **2003**. Iron deficiency leads to inhibition of oxygen transfer and enhanced formation of virulence factors in cultures of *Pseudomonas aeruginosa* PA01. *Microbiology* **149**: 2627–2634.
- Kimura, M., and Ota, T. **1971**. Theoretical aspects of population genetics. *Monogr. Popul. Biol.* **4**: 1–219.
- Kinnersley, M.A., Holben, W.E., and Rosenzweig, F. **2009**. *E Unibus Plurum*: Genomic analysis of an experimentally evolved polymorphism in *Escherichia coli*. *PLoS Genet* **5**: e1000713.
- Kint, C.I., Verstraeten, N., Fauvart, M., and Michiels, J. **2012**. New-found fundamentals of bacterial persistence. *Trends Microbiol.* **20**: 577–585.
- Kirisits, M.J., Prost, L., Starkey, M., and Parsek, M.R. **2005**. Characterization of colony morphology variants isolated from *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 4809–4821.
- Kirov, S.M. **2003**. Bacteria that express lateral flagella enable dissection of the multifunctional roles of flagella in pathogenesis. *FEMS Microbiol. Lett.* **224**: 151–159.
- Klemm, P., Roos, V., Ulett, G.C., Svanborg, C., and Schembri, M.A. **2006**. Molecular characterization of the *Escherichia coli* asymptomatic bacteriuria strain 83972: the taming of a pathogen. *Infect. Immun.* **74**: 781–785.
- Klepac-Ceraj, V., Lemon, K.P., Martin, T.R., Allgaier, M., Kembel, S.W., Knapp, A.A., Lory, S., Brodie, E.L., Lynch, S.V., Bohannon, B.J.M., et al. **2010**. Relationship between cystic fibrosis respiratory tract bacterial communities and age, genotype, antibiotics and *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ. Microbiol.* **12**: 1293–1303.
- Knibbs, L.D., Johnson, G.R., Kidd, T.J., Cheney, J., Grimwood, K., Kattenbelt, J.A., O'Rourke, P.K., Ramsay, K.A., Sly, P.D., Wainwright, C.E., et al. **2014**. Viability of *Pseudomonas aeruginosa* in cough aerosols generated by persons with cystic fibrosis. *Thorax* **69**: 740–745.
- Koeppel, A., Perry, E.B., Sikorski, J., Krizanc, D., Warner, A., Ward, D.M., Rooney, A.P., Brambilla, E., Connor, N., Ratcliff, R.M., et al. **2008**. Identifying the fundamental units of bacterial diversity: a paradigm shift to incorporate ecology into bacterial systematics. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**: 2504–2509.
- Kohanski, M.A., Dwyer, D.J., and Collins, J.J. **2010**. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**: 423–435.
- Köhler, T., Curty, L.K., Barja, F., van Delden, C., and Pechère, J.C. **2000**. Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. *J. Bacteriol.* **182**: 5990–5996.
- Köhler, T., Buckling, A., and van Delden, C. **2009**. Cooperation and virulence of clinical *Pseudomonas aeruginosa* populations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**: 6339–6344.
- Kokcha, S., Bittar, F., Reynaud-Gaubert, M., Mely, L., Gomez, C., Gaubert, J.-Y., Thomas, P., and Rolain, J.-M. **2013**. *Pandora pulmonicola* chronic colonization in a cystic fibrosis patient. *New Microbes New Infect.* **1**: 27–29.
- Koley, D., Ramsey, M.M., Bard, A.J., and Whiteley, M. **2011**. Discovery of a biofilm electroline using real-time 3D metabolite analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**: 19996–20001.

- Kolpen, M., Hansen, C.R., Bjarnsholt, T., Moser, C., Christensen, L.D., van Gennip, M., Ciofu, O., Mandsberg, L., Kharazmi, A., Döring, G., et al. **2010**. Polymorphonuclear leucocytes consume oxygen in sputum from chronic *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia in cystic fibrosis. *Thorax* **65**: 57–62.
- Kolpen, M., Appeldorff, C.F., Brandt, S., Mousavi, N., Kragh, K.N., Aydogan, S., Uppal, H.A., Bjarnsholt, T., Ciofu, O., Høiby, N., et al. **2016**. Increased bactericidal activity of colistin on *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in anaerobic conditions. *Pathog. Dis.* **74**.
- Kong, K.-F., Vuong, C., and Otto, M. **2006**. *Staphylococcus* quorum sensing in biofilm formation and infection. *Int. J. Med. Microbiol. IJMM* **296**: 133–139.
- Kouidhi, B., Al Qurashi, Y.M.A., and Chaieb, K. **2015**. Drug resistance of bacterial dental biofilm and the potential use of natural compounds as alternative for prevention and treatment. *Microb. Pathog.* **80**: 39–49.
- Kraft, C., Stack, A., Josenhans, C., Niehus, E., Dietrich, G., Correa, P., Fox, J.G., Falush, D., and Suerbaum, S. **2006**. Genomic changes during chronic *Helicobacter pylori* infection. *J. Bacteriol.* **188**: 249–254.
- Kresse, A.U., Dinesh, S.D., Larbig, K., and Römling, U. **2003**. Impact of large chromosomal inversions on the adaptation and evolution of *Pseudomonas aeruginosa* chronically colonizing cystic fibrosis lungs. *Mol. Microbiol.* **47**: 145–158.
- Krezalek, M.A., DeFazio, J., Zaborina, O., Zaborin, A., and Alverdy, J.C. **2016**. The shift of an intestinal “Microbiome” to a “Pathobiome” governs the course and outcome of sepsis following surgical injury. *Shock Augusta Ga* **45**: 475–482.
- Krzewinski, J.W., Nguyen, C.D., Foster, J.M., and Burns, J.L. **2001**. Use of random amplified polymorphic DNA PCR to examine epidemiology of *Stenotrophomonas maltophilia* and *Achromobacter (Alcaligenes) xylosoxidans* from patients with cystic fibrosis. *J. Clin. Microbiol.* **39**: 3597–3602.
- Kuchma, S.L., Connolly, J.P., and O’Toole, G.A. **2005**. A three-component regulatory system regulates biofilm maturation and type III secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **187**: 1441–1454.
- Kümmerli, R., Santorelli, L.A., Granato, E.T., Dumas, Z., Dobay, A., Griffin, A.S., and West, S.A. **2015**. Co-evolutionary dynamics between public good producers and cheats in the bacterium *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Evol. Biol.* **28**: 2264–2274.
- Kung, V.L., Ozer, E.A., and Hauser, A.R. **2010**. The accessory genome of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **74**: 621–641.
- Kussell, E., Kishony, R., Balaban, N.Q., and Leibler, S. **2005**. Bacterial persistence. *Genetics* **169**: 1807–1814.
- LaFayette, S.L., Houle, D., Beaudoin, T., Wojewodka, G., Radzioch, D., Hoffman, L.R., Burns, J.L., Dandekar, A.A., Smalley, N.E., Chandler, J.R., et al. **2015**. Cystic Fibrosis-adapted *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing *lasR* mutants cause hyperinflammatory responses. *Sci. Adv.* **1**: e1500199
- Lam, M.Y., McGroarty, E.J., Kropinski, A.M., MacDonald, L.A., Pedersen, S.S., Høiby, N., and Lam, J.S. **1989**. Occurrence of a common lipopolysaccharide antigen in standard and clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Clin. Microbiol.* **27**: 962–967.
- Lambiase, A., Catania, M.R., Del Pezzo, M., Rossano, F., Terlizzi, V., Sepe, A., and Raia, V. **2011**. *Achromobacter xylosoxidans* respiratory tract infection in cystic fibrosis patients. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **30**: 973–980.
- Lami, R., Ghiglione, J., Desdevises, Y., West, N.J., and Lebaron, P. **2009**. Annual patterns of presence and activity of marine bacteria monitored by 16S rDNA–16S rRNA fingerprints in the coastal NW Mediterranean Sea. *Aquat. Microb. Ecol.* **54**: 199–210.

- Lamont, I.L., Konings, A.F., and Reid, D.W. **2009**. Iron acquisition by *Pseudomonas aeruginosa* in the lungs of patients with cystic fibrosis. *BioMetals* **22**: 53–60.
- Lanotte, P., Watt, S., Mereghetti, L., Dartiguelongue, N., Rastegar-Lari, A., Goudeau, A., and Quentin, R. **2004**. Genetic features of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients compared with those of isolates from other origins. *J. Med. Microbiol.* **53**: 73–81.
- Lechtzin, N., John, M., Irizarry, R., Merlo, C., Diette, G.B., and Boyle, M.P. **2006**. Outcomes of adults with cystic fibrosis infected with antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Respir. Int. Rev. Thorac. Dis.* **73**: 27–33.
- Lee, B., Haagensen, J.A.J., Ciofu, O., Andersen, J.B., Høiby, N., and Molin, S. **2005a**. Heterogeneity of biofilms formed by nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis. *J. Clin. Microbiol.* **43**: 5247–5255.
- Lee, B., Schjerling, C.K., Kirkby, N., Hoffmann, N., Borup, R., Molin, S., Høiby, N., and Ciofu, O. **2011**. Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* isolates maintain the biofilm formation capacity and the gene expression profiles during the chronic lung infection of CF patients. *APMIS* **119**: 263–274.
- Lee, D.G., Urbach, J.M., Wu, G., Liberati, N.T., Feinbaum, R.L., Miyata, S., Diggins, L.T., He, J., Saucier, M., Déziel, E., et al. **2006**. Genomic analysis reveals that *Pseudomonas aeruginosa* virulence is combinatorial. *Genome Biol.* **7**: R90.
- Lee, V.T., Smith, R.S., Tümmler, B., and Lory, S. **2005b**. Activities of *Pseudomonas aeruginosa* effectors secreted by the Type III secretion system in vitro and during infection. *Infect. Immun.* **73**: 1695–1705.
- Leimbach, A., Hacker, J., and Dobrindt, U. **2013**. *E. coli* as an all-rounder: the thin line between commensalism and pathogenicity. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **358**: 3–32.
- Leone, I., Chirillo, M.G., Raso, T., Zucca, M., and Savoia, D. **2008**. Phenotypic and genotypic characterization of *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis patients. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **27**: 1093–1099.
- Leoni, E., Dallolio, L., Stagni, F., Sanna, T., D'Alessandro, G., and Piana, G. **2015**. Impact of a risk management plan on *Legionella* contamination of dental unit water. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **12**: 2344–2358.
- Lewis, K. **2007**. Persister cells, dormancy and infectious disease. *Nat. Rev. Microbiol.* **5**: 48–56.
- Li, Z., Kosorok, M.R., Farrell, P.M., Laxova, A., West, S.E.H., Green, C.G., Collins, J., Rock, M.J., and Splaingard, M.L. **2005**. Longitudinal development of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* infection and lung disease progression in children with cystic fibrosis. *JAMA* **293**: 581–588.
- Lieberman, T.D., Flett, K.B., Yelin, I., Martin, T.R., McAdam, A.J., Priebe, G.P., and Kishony, R. **2014**. Genetic variation of a bacterial pathogen within individuals with cystic fibrosis provides a record of selective pressures. *Nat. Genet.* **46**: 82–87.
- Linker, A., and Jones, R.S. **1966**. A new polysaccharide resembling alginic acid isolated from *pseudomonads*. *J. Biol. Chem.* **241**: 3845–3851.
- Liou, T.G., Adler, F.R., Fitzsimmons, S.C., Cahill, B.C., Hibbs, J.R., and Marshall, B.C. **2001**. Predictive 5-year survivorship model of cystic fibrosis. *Am. J. Epidemiol.* **153**: 345–352.
- Lipuma, J.J. **2010**. The changing microbial epidemiology in cystic fibrosis. *Clin. Microbiol. Rev.* **23**: 299–323.
- Lisboa, G.M., Lisboa, Y.R.M., Pinheiro, T.M.L., Stegun, R.C., and da Silva-Filho, E.A. **2014**. Microbial diversity in dental unit waterlines. *Acta Odontológica Latinoam.* **27**: 110–114.

- Liu, C., Pan, F., Guo, J., Yan, W., Jin, Y., Liu, C., Qin, L., and Fang, X. **2016**. Hospital acquired pneumonia due to *Achromobacter* spp. in a geriatric ward in China: clinical characteristic, genome variability, biofilm production, antibiotic resistance and integron in isolated strains. *Front. Microbiol.* **7**: 621.
- Liu, W.-Q., Liu, G.-R., Li, J.-Q., Xu, G.-M., Qi, D., He, X.-Y., Deng, J., Zhang, F.-M., Johnston, R.N., and Liu, S.-L. **2007**. Diverse genome structures of *Salmonella paratyphi C*. *BMC Genomics* **8**: 290.
- Lizon, J., Florentin, A., Martrette, J.-M., Rivier, A., Clement, C., and Rabaud, C. **2016**. Microbial control of dental unit water: Feedback on different disinfection methods experience. *Am. J. Infect. Control* **44**: 247–249.
- Llanes, C., Pourcel, C., Richardot, C., Plésiat, P., Fichant, G., Cavallo, J.-D., Mérens, A., Group, on behalf of the G.S., Vu-Thien, H., Leclercq, R., et al. **2013**. Diversity of β -lactam resistance mechanisms in cystic fibrosis isolates of *Pseudomonas aeruginosa*: a French multicentre study. *J. Antimicrob. Chemother.* **68**: 1763–1771.
- Lopes-Pacheco, M. **2016**. CFTR Modulators: Shedding light on precision medicine for cystic fibrosis. *Pharmacol. Ion Channels Channelopathies* 275.
- Lorè, N.I., Cigana, C., Fino, I.D., Riva, C., Juhas, M., Schwager, S., Eberl, L., and Bragonzi, A. **2012**. Cystic Fibrosis-niche adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* reduces virulence in multiple infection hosts. *PLOS ONE* **7**: e35648.
- Loutet, S.A., and Valvano, M.A. **2010**. A decade of *Burkholderia cenocepacia* virulence determinant research. *Infect. Immun.* **78**: 4088–4100.
- Loveday, H.P., Wilson, J.A., Kerr, K., Pitchers, R., Walker, J.T., and Browne, J. **2014**. Association between healthcare water systems and *Pseudomonas aeruginosa* infections: a rapid systematic review. *J. Hosp. Infect.* **86**: 7–15.
- Lüthi, E., Baur, H., Gamper, M., Brunner, F., Villeval, D., Mercemier, A., and Haas, D. **1990**. The *arc* operon for anaerobic arginine catabolism in *Pseudomonas aeruginosa* contains an additional gene, *arcD*, encoding a membrane protein. *Gene* **87**: 37–43.
- Luzar, M.A., and Montie, T.C. **1985**. Avirulence and altered physiological properties of cystic fibrosis strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* **50**: 572–576.
- Luzar, M.A., Thomassen, M.J., and Montie, T.C. **1985**. Flagella and motility alterations in *Pseudomonas aeruginosa* strains from patients with cystic fibrosis: relationship to patient clinical condition. *Infect. Immun.* **50**: 577–582.
- Ma, L., Lu, H., Sprinkle, A., Parsek, M.R., and Wozniak, D.J. **2007**. *Pseudomonas aeruginosa* Psl is a galactose- and mannose-rich exopolysaccharide. *J. Bacteriol.* **189**: 8353–8356.
- Mabbett, A.N., Ulett, G.C., Watts, R.E., Tree, J.J., Totsika, M., Ong, C.Y., Wood, J.M., Monaghan, W., Looke, D.F., Nimmo, G.R., et al. **2009**. Virulence properties of asymptomatic bacteriuria *Escherichia coli*. *Int. J. Med. Microbiol.* **299**: 53–63.
- Maciá, M.D., Blanquer, D., Togoress, B., Sauleda, J., Pérez, J.L., and Oliver, A. **2005**. Hypermutation is a key factor in development of multiple-antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains causing chronic lung infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**: 3382–3386.
- Madan, J.C., Koestler, D.C., Stanton, B.A., Davidson, L., Moulton, L.A., Housman, M.L., Moore, J.H., Guill, M.F., Morrison, H.G., Sogin, M.L., et al. **2012**. Serial analysis of the gut and respiratory microbiome in cystic fibrosis in infancy: interaction between intestinal and respiratory tracts and impact of nutritional exposures. *mBio* **3**.

- Madeira, A., dos Santos, S.C., Santos, P.M., Coutinho, C.P., Tyrrell, J., McClean, S., Callaghan, M., and Sá-Correia, I. **2013**. Proteomic profiling of *Burkholderia cenocepacia* clonal isolates with different virulence potential retrieved from a cystic fibrosis patient during chronic lung infection. *PLoS One* **8**: e83065.
- Magni, A., Trancassini, M., Varesi, P., Iebba, V., Curci, A., Pecoraro, C., Cimino, G., Schippa, S., and Quattrucci, S. **2010**. *Achromobacter xylosoxidans* genomic characterization and correlation of randomly amplified polymorphic DNA profiles with relevant clinical features of cystic fibrosis patients. *J. Clin. Microbiol.* **48**: 1035–1039.
- Mahenthiralingam, E. **2014**. Emerging cystic fibrosis pathogens and the microbiome. *Paediatr. Respir. Rev.* **15 Suppl 1**: 13–15.
- Mahenthiralingam, E., Campbell, M.E., and Speert, D.P. **1994**. Nonmotility and phagocytic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from chronically colonized patients with cystic fibrosis. *Infect. Immun.* **62**: 596–605.
- Malone, J.G. **2015**. Role of small colony variants in persistence of *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis lungs. *Infect. Drug Resist.* **8**: 237–247.
- Mann, E.E., and Wozniak, D.J. **2012**. *Pseudomonas* biofilm matrix composition and niche biology. *FEMS Microbiol. Rev.* **36**: 893–916.
- Marchandin, H., Michon, A., and Jumas-Bilak, E. **2012**. Atypical bacteria in the Cystic Fibrosis airways: diversity, clinical consequences, emergence and adaptation. Cystic Fibrosis - Renewed Hopes Through Research. Dinesh Sriramulu. *InTech*
- Markussen, T., Marvig, R.L., Gómez-Lozano, M., Aanaes, K., Burleigh, A.E., Høiby, N., Johansen, H.K., Molin, S., and Jelsbak, L. **2014**. Environmental heterogeneity drives within-host diversification and evolution of *Pseudomonas aeruginosa*. *mBio* **5**.
- Martin, M.V. **1987**. The significance of the bacterial contamination of dental unit water systems. *Br. Dent. J.* **163**: 152–154.
- Martin, D.W., Schurr, M.J., Mudd, M.H., Govan, J.R., Holloway, B.W., and Deretic, V. **1993**. Mechanism of conversion to mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa* infecting cystic fibrosis patients. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**: 8377–8381.
- Martínez-Lamas, L., Rabade Castedo, C., Martín Romero Domínguez, M., Barbeito Castiñeiras, G., Palacios Bartolomé, A., and Pérez Del Molino Bernal, M.L. **2011**. *Pandoraea sputorum* colonization in a patient with cystic fibrosis. *Arch. Bronconeumol.* **47**: 571–574.
- Martins, A., Hunyadi, A., and Amaral, L. **2013**. Mechanisms of resistance in bacteria: an evolutionary approach. *Open Microbiol. J.* **7**: 53–58.
- Marvig, R.L., Johansen, H.K., Molin, S., and Jelsbak, L. **2013**. Genome analysis of a transmissible lineage of *Pseudomonas aeruginosa* reveals pathoadaptive mutations and distinct evolutionary paths of hypermutators. *PLoS Genet.* **9**: e1003741.
- Marvig, R.L., Sommer, L.M., Molin, S., and Johansen, H.K. **2015**. Convergent evolution and adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* within patients with cystic fibrosis. *Nat. Genet.* **47**: 57–64.
- Marzuillo, C., De Giusti, M., Tufi, D., Giordano, A., Del Cimmuto, A., Quattrucci, S., Mancini, C., and Villari, P. **2009**. Molecular Characterization of *Stenotrophomonas maltophilia* isolates from cystic fibrosis patients and the hospital environment. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **30**: 753–758.
- Mathee, K., McPherson, C.J., and Ohman, D.E. **1997**. Posttranslational control of the algT (algU)-encoded sigma22 for expression of the alginate regulon in *Pseudomonas aeruginosa* and localization of its antagonist proteins MucA and MucB (*AlgN*). *J. Bacteriol.* **179**: 3711–3720.

- Mathee, K., Narasimhan, G., Valdes, C., Qiu, X., Matewish, J.M., Koehrsen, M., Rokas, A., Yandava, C.N., Engels, R., Zeng, E., et al. **2008**. Dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* genome evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**: 3100–3105.
- Matic, I., Radman, M., Taddei, F., Picard, B., Doit, C., Bingen, E., Denamur, E., and Elion, J. **1997**. Highly variable mutation rates in commensal and pathogenic *Escherichia coli*. *Science* **277**: 1833–1834.
- Mattick, J.S. **2002**. Type IV pili and twitching motility. *Annu. Rev. Microbiol.* **56**: 289–314.
- McKeon, S.A., Nguyen, D.T., Viteri, D.F., Zlosnik, J.E.A., and Sokol, P.A. **2011**. Functional quorum sensing systems are maintained during chronic *Burkholderia cepacia* complex infections in patients with cystic fibrosis. *J. Infect. Dis.* **203**: 383–392.
- McPherson, H., Rosenthal, M., and Bush, A. **2010**. Can mucoid *Pseudomonas aeruginosa* be eradicated in children with Cystic Fibrosis?. *Pediatr. Pulmonol.* **45**: 566–568.
- Mena, A., Maciá, M.D., Borrell, N., Moya, B., de Francisco, T., Pérez, J.L., and Oliver, A. **2007**. Inactivation of the mismatch repair system in *Pseudomonas aeruginosa* attenuates virulence but favors persistence of oropharyngeal colonization in Cystic Fibrosis mice. *J. Bacteriol.* **189**: 3665–3668.
- Mena, A., Smith, E.E., Burns, J.L., Speert, D.P., Moskowitz, S.M., Perez, J.L., and Oliver, A. **2008**. Genetic adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients is catalyzed by hypermutation. *J. Bacteriol.* **190**: 7910–7917.
- Menuet, M., Bittar, F., Stremmer, N., Dubus, J.-C., Sarles, J., Raoult, D., and Rolain, J.-M. **2008**. First isolation of two colistin-resistant emerging pathogens, *Brevundimonas diminuta* and *Ochrobactrum anthropi*, in a woman with cystic fibrosis: a case report. *J. Med. Case Reports* **2**: 373.
- Meyerholz, D.K., Stoltz, D.A., Namati, E., Ramachandran, S., Pezzulo, A.A., Smith, A.R., Rector, M.V., Suter, M.J., Kao, S., McLennan, G., et al. **2010**. Loss of Cystic Fibrosis transmembrane conductance regulator function produces abnormalities in tracheal development in neonatal pigs and young children. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **182**: 1251–1261.
- Michel-Briand, Y., and Baysse, C. **2002**. The pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochimie* **84**: 499–510.
- Millard, A.D., Westblade, L.F., LiPuma, J.J., Vavikolanu, K., Read, T.D., Pallen, M.J., Burd, E.M., and Constantinidou, C.I. **2015**. Draft genome sequence of the *Pandoraea apista* LMG 16407 Type Strain. *Genome Announc.* **3**.
- Mira, A., Pushker, R., and Rodríguez-Valera, F. **2006**. The Neolithic revolution of bacterial genomes. *Trends Microbiol.* **14**: 200–206.
- Mira, N.P., Madeira, A., Moreira, A.S., Coutinho, C.P., and Sá-Correia, I. **2011**. Genomic expression analysis reveals strategies of *Burkholderia cenocepacia* to adapt to cystic fibrosis patients' airways and antimicrobial therapy. *PLoS One* **6**: e28831.
- Mitchell, J. **2011**. *Streptococcus mitis*: walking the line between commensalism and pathogenesis. *Mol. Oral Microbiol.* **26**: 89–98.
- Mogayzel, P.J., Naureckas, E.T., Robinson, K.A., Brady, C., Guill, M., Lahiri, T., Lubsch, L., Matsui, J., Oermann, C.M., Ratjen, F., et al. **2014**. Cystic Fibrosis Foundation pulmonary guideline. pharmacologic approaches to prevention and eradication of initial *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Ann. Am. Thorac. Soc.* **11**: 1640–1650.
- Molina-Cabrillana, J., Santana-Reyes, C., González-García, A., Bordes-Benítez, A., and Horcajada, I. **2007**. Outbreak of *Achromobacter xylosoxidans* pseudobacteremia in a neonatal care unit related to contaminated chlorhexidine solution. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **26**: 435–437.

- Monod, J **1942**. « Diauxie et respiration au cours de la croissance des cultures de *B. coli* ». 548–550.
- Montaña, S., Schramm, S.T.J., Traglia, G.M., Chiem, K., Parmeciano Di Noto, G., Almuzara, M., Barberis, C., Vay, C., Quiroga, C., Tolmasky, M.E., et al. **2016**. The genetic analysis of an *Acinetobacter johnsonii* clinical strain evidenced the presence of horizontal genetic transfer. *PLoS One* **11**: e0161528.
- Moran, N.A. **2006**. Symbiosis. *Curr. Biol. CB* **16**: R866–871.
- Moran, N.A., McCutcheon, J.P., and Nakabachi, A. **2008**. Genomics and evolution of heritable bacterial symbionts. *Annu. Rev. Genet.* **42**: 165–190.
- Moser, C., Van Gennip, M., Bjarnsholt, T., Jensen, P.Ø., Lee, B., Hougen, H.P., Calum, H., Ciofu, O., Givskov, M., Molin, S., et al. **2009**. Novel experimental *Pseudomonas aeruginosa* lung infection model mimicking long-term host-pathogen interactions in cystic fibrosis. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* **117**: 95–107.
- Mowat, E., Paterson, S., Fothergill, J.L., Wright, E.A., Ledson, M.J., Walshaw, M.J., Brockhurst, M.A., and Winstanley, C. **2011**. *Pseudomonas aeruginosa* population diversity and turnover in cystic fibrosis chronic infections. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **183**: 1674–1679.
- Mulcahy, L.R., Burns, J.L., Lory, S., and Lewis, K. **2010**. Emergence of *Pseudomonas aeruginosa* strains producing high levels of persister cells in patients with Cystic Fibrosis. *J. Bacteriol.* **192**: 6191–6199.
- Murga, R., Forster, T.S., Brown, E., Pruckler, J.M., Fields, B.S., and Donlan, R.M. **2001**. Role of biofilms in the survival of *Legionella pneumophila* in a model potable-water system. *Microbiol. Read. Engl.* **147**: 3121–3126.
- Nguyen, D., and Singh, P.K. **2006**. Evolving stealth: genetic adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* during cystic fibrosis infections. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**: 8305–8306.
- Nicas, T.I., Frank, D.W., Stenzel, P., Lile, J.D., and Iglewski, B.H. **1985**. Role of exoenzyme S in chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infections. *Eur. J. Clin. Microbiol.* **4**: 175–179.
- Nielsen, A.T., Tolker-Nielsen, T., Barken, K.B., and Molin, S. **2000**. Role of commensal relationships on the spatial structure of a surface-attached microbial consortium. *Environ. Microbiol.* **2**: 59–68.
- Nielsen, S., Needham, B., Leach, S.T., Day, A.S., Jaffe, A., Thomas, T., and Ooi, C.Y. **2016**. Disrupted progression of the intestinal microbiota with age in children with cystic fibrosis. *Sci. Rep.* **6**: 24857.
- Nikaeen, M., Hatamzadeh, M., Sabzevari, Z., and Zareh, O. **2009**. Microbial quality of water in dental unit waterlines. *J. Res. Med. Sci.* **14**: 297–300.
- Nilsson, A.I., Koskiniemi, S., Eriksson, S., Kugelberg, E., Hinton, J.C.D., and Andersson, D.I. **2005**. Bacterial genome size reduction by experimental evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**: 12112–12116.
- O’Callaghan, J., Reen, F.J., Adams, C., and O’Gara, F. **2011**. Low oxygen induces the type III secretion system in *Pseudomonas aeruginosa* via modulation of the small RNAs *rsmZ* and *rsmY*. *Microbiol. Read. Engl.* **157**: 3417–3428.
- Ochman, H., Elwyn, S., and Moran, N.A. **1999**. Calibrating bacterial evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**: 12638–12643.
- Odling-Smee, F., Laland, K., and Feldman, M. **2003**. Niche construction: the neglected process in evolution. Princeton University Press. Princeton.
- Odling-Smee, F.J., Laland, K.N., and Feldman, M.W. **1996**. Niche Construction. *Am. Nat.* **147**: 641–648.
- Odum, E.P. **1959**. Fundamentals of ecology . Saunders. Philadelphia.

- Oh, J.D., Kling-Bäckhed, H., Giannakis, M., Xu, J., Fulton, R.S., Fulton, L.A., Cordum, H.S., Wang, C., Elliott, G., Edwards, J., et al. **2006**. The complete genome sequence of a chronic atrophic gastritis *Helicobacter pylori* strain: Evolution during disease progression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**: 9999–10004.
- Oie, S., Arakawa, J., Furukawa, H., Matsumoto, S., Matsuda, N., and Wakamatsu, H. **2012**. Microbial contamination of a disinfectant-soaked unwoven cleaning cloth. *J. Hosp. Infect.* **82**: 61–63.
- Ojima, M., Toshima, Y., Koya, E., Ara, K., Tokuda, H., Kawai, S., Kasuga, F., and Ueda, N. **2002**. Hygiene measures considering actual distributions of microorganisms in Japanese households. *J. Appl. Microbiol.* **93**: 800–809.
- Oliver, A., and Mena, A. **2010**. Bacterial hypermutation in cystic fibrosis, not only for antibiotic resistance. *Clin. Microbiol. Infect.* **16**: 798–808.
- O'Sullivan, B.P., and Freedman, S.D. **2009**. Cystic fibrosis. *Lancet Lond. Engl.* **373**: 1891–1904.
- O'Toole, G.A., and Kolter, R. **1998**. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol. Microbiol.* **30**: 295–304.
- Parkhill, J., Sebahia, M., Preston, A., Murphy, L.D., Thomson, N., Harris, D.E., Holden, M.T.G., Churcher, C.M., Bentley, S.D., Mungall, K.L., et al. **2003**. Comparative analysis of the genome sequences of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *Nat. Genet.* **35**: 32–40.
- Parkins, M.D., and Floto, R.A. **2015**. Emerging bacterial pathogens and changing concepts of bacterial pathogenesis in cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros.* **14**: 293–304.
- Parkins, M.D., Gregson, D.B., Pitout, J.D.D., Ross, T., and Laupland, K.B. **2010**. Population-based study of the epidemiology and the risk factors for *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infection. *Infection* **38**: 25–32.
- Patankar, Y.R., Lovewell, R.R., Poynter, M.E., Jyot, J., Kazmierczak, B.I., and Berwin, B. **2013**. Flagellar motility Is a key determinant of the magnitude of the inflammasome response to *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* **81**: 2043–2052.
- Patel, J.J., Rosenthal, M.D., Miller, K.R., and Martindale, R.G. **2016**. The gut in trauma. *Curr. Opin. Crit. Care* **22**: 339–346.
- Pereira, R.H.V., Carvalho-Assef, A.P., Albano, R.M., Folescu, T.W., Jones, M.C.M.F., Leão, R.S., and Marques, E.A. **2011**. *Achromobacter xylosoxidans*: characterization of strains in Brazilian cystic fibrosis patients. *J. Clin. Microbiol.* **49**: 3649–3651.
- Peters, B.M., Jabra-Rizk, M.A., O'May, G.A., Costerton, J.W., and Shirliff, M.E. **2012**. Polymicrobial interactions: impact on pathogenesis and human disease. *Clin. Microbiol. Rev.* **25**: 193–213.
- Pimentel, J.D., and MacLeod, C. **2008**. Misidentification of *Pandora* species isolated from sputum of a patient with cystic fibrosis and review of *Pandora* species infections in transplant patients. *J. Clin. Microbiol.* **46**: 3165–3168.
- Pinto, D., Santos, M.A., and Chambel, L. **2015**. Thirty years of viable but nonculturable state research: unsolved molecular mechanisms. *Crit. Rev. Microbiol.* **41**: 61–76.
- Pirnay, J.-P., Matthijs, S., Colak, H., Chablain, P., Bilocq, F., Van Eldere, J., De Vos, D., Zizi, M., Triest, L., and Cornelis, P. **2005**. Global *Pseudomonas aeruginosa* biodiversity as reflected in a Belgian river. *Environ. Microbiol.* **7**: 969–980.
- Pirnay, J.-P., Bilocq, F., Pot, B., Cornelis, P., Zizi, M., Eldere, J.V., Deschaght, P., Vanechoutte, M., Jennes, S., Pitt, T., et al. **2009**. *Pseudomonas aeruginosa* Population Structure Revisited. *PLOS ONE* **4**: e7740.

- Pompilio, A., Crocetta, V., De Nicola, S., Verginelli, F., Fiscarelli, E., and Di Bonaventura, G. **2015**. Cooperative pathogenicity in cystic fibrosis: *Stenotrophomonas maltophilia* modulates *Pseudomonas aeruginosa* virulence in mixed biofilm. *Front. Microbiol.* **6**: 951.
- Pompilio, A., Crocetta, V., Ghosh, D., Chakrabarti, M., Gherardi, G., Vitali, L., Ersilia, F., and Di Bonaventura, G. **2016**. *Stenotrophomonas maltophilia* phenotypic and genotypic diversity during a 10-year colonization in the lungs of a cystic fibrosis patient. *Front. Microbiol.* **7**: 1551.
- Price, C.T.D., Richards, A.M., Von Dwingelo, J.E., Samara, H.A., and Abu Kwaik, Y. **2014**. Amoeba host-*Legionella* synchronization of amino acid auxotrophy and its role in bacterial adaptation and pathogenic evolution. *Environ. Microbiol.* **16**: 350–358.
- Price, E.P., Sarovich, D.S., Mayo, M., Tuanyok, A., Drees, K.P., Kaestli, M., Beckstrom-Sternberg, S.M., Babic-Sternberg, J.S., Kidd, T.J., Bell, S.C., et al. **2013**. Within-host evolution of *Burkholderia pseudomallei* over a twelve-year chronic carriage infection. *Mbio* **4**: e00388-13.
- Prunier, A.-L., Malbruny, B., Laurans, M., Brouard, J., Duhamel, J.-F., and Leclercq, R. **2003**. High rate of macrolide resistance in *Staphylococcus aureus* strains from patients with cystic fibrosis reveals high proportions of hypermutable strains. *J. Infect. Dis.* **187**: 1709–1716.
- Pugès, M., Debelleix, S., Fayon, M., Mégraud, F., and Lehours, P. **2015**. Persistent infection because of *Pandoraea sputorum* in a young Cystic Fibrosis patient resistant to antimicrobial treatment. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **34**: 1135–1137.
- Purdy-Gibson, M.E., France, M., Hundley, T.C., Eid, N., and Remold, S.K. **2015**. *Pseudomonas aeruginosa* in CF and non-CF homes is found predominantly in drains. *J. Cyst. Fibros.* **14**: 341–346.
- Qin, X. **2016**. Chronic pulmonary pseudomonal infection in patients with cystic fibrosis: A model for early phase symbiotic evolution. *Crit. Rev. Microbiol.* **42**: 144–157.
- Qin, N., Yang, F., Li, A., Prifti, E., Chen, Y., Shao, L., Guo, J., Le Chatelier, E., Yao, J., Wu, L., et al. **2014**. Alterations of the human gut microbiome in liver cirrhosis. *Nature* **513**: 59–64.
- Qin, Q.-L., Li, Y., Zhang, Y.-J., Zhou, Z.-M., Zhang, W.-X., Chen, X.-L., Zhang, X.-Y., Zhou, B.-C., Wang, L., and Zhang, Y.-Z. **2011**. Comparative genomics reveals a deep-sea sediment-adapted life style of *Pseudoalteromonas* sp. *ISME J.* **5**: 274–284.
- Qin, X., Zerr, D.M., McNutt, M.A., Berry, J.E., Burns, J.L., and Kapur, R.P. **2012**. *Pseudomonas aeruginosa* syntrophy in chronically colonized airways of cystic fibrosis patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**: 5971–5981.
- Raetz, C.R.H., and Whitfield, C. **2002**. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.* **71**: 635–700.
- Rao, P., McCaughan, J., McCalmont, M., Goldsmith, C.E., Hall, V., Millar, B.C., McCann, M.-A., Downey, D.G., Rendall, J.C., Elborn, J.S., et al. **2012**. Comparison of antibiotic susceptibility patterns in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from adult patients with cystic fibrosis (CF) with invasive *Pseudomonas aeruginosa* from non-CF patients. *J. Cyst. Fibros.* **11**: 349–352.
- Raso, T., Bianco, O., Grosso, B., Zucca, M., and Savoia, D. **2008**. *Achromobacter xylooxidans* respiratory tract infections in cystic fibrosis patients. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* **116**: 837–841.
- Rau, M.H., Marvig, R.L., Ehrlich, G.D., Molin, S., and Jelsbak, L. **2012**. Deletion and acquisition of genomic content during early stage adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to a human host environment. *Environ. Microbiol.* **14**: 2200–2211.
- Regamey, N., Jeffery, P.K., Alton, E.W.F.W., Bush, A., and Davies, J.C. **2011**. Airway remodelling and its relationship to inflammation in cystic fibrosis. *Thorax* **66**: 624–629.

- Regnath, T., Kreutzberger, M., Illing, S., Oehme, R., and Liesenfeld, O. **2004**. Prevalence of *Pseudomonas aeruginosa* in households of patients with cystic fibrosis. *Int. J. Hyg. Environ. Health* **207**: 585–588.
- Remold, S.K., Brown, C.K., Farris, J.E., Hundley, T.C., Perpich, J.A., and Purdy, M.E. **2011**. Differential habitat use and niche partitioning by *Pseudomonas* species in human homes. *Microb. Ecol.* **62**: 505–517.
- Ren, C.L., Konstan, M.W., Yegin, A., Rasouliyan, L., Trzaskoma, B., Morgan, W.J., Regelmann, W., and Scientific Advisory Group, Investigators, and Coordinators of the Epidemiologic Study of Cystic Fibrosis **2012**. Multiple antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and lung function decline in patients with cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros.* **11**: 293–299.
- Resch, A., Rosenstein, R., Nerz, C., and Götz, F. **2005**. Differential gene expression profiling of *Staphylococcus aureus* cultivated under biofilm and planktonic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 2663–2676.
- Ricci, M.L., Fontana, S., Pinci, F., Fiumana, E., Pedna, M.F., Farolfi, P., Sabattini, M.A.B., and Scaturro, M. **2012**. Pneumonia associated with a dental unit waterline. *The Lancet* **379**: 684.
- Richardson, A.R., Yu, Z., Popovic, T., and Stojiljkovic, I. **2002**. Mutator clones of *Neisseria meningitidis* in epidemic serogroup A disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**: 6103–6107.
- Ridderberg, W., Bendstrup, K.E.M., Olesen, H.V., Jensen-Fangel, S., and Nørskov-Lauritsen, N. **2011**. Marked increase in incidence of *Achromobacter xylosoxidans* infections caused by sporadic acquisition from the environment. *J. Cyst. Fibros.* **10**: 466–469.
- Ridderberg, W., Wang, M., and Nørskov-Lauritsen, N. **2012a**. Multilocus sequence analysis of isolates of *Achromobacter* from patients with cystic fibrosis reveals infecting species other than *Achromobacter xylosoxidans*. *J. Clin. Microbiol.* **50**: 2688–2694
- Ridderberg, W., Wang, M., and Nørskov-Lauritsen, N. **2012b**. Multilocus sequence analysis of isolates of *Achromobacter* from patients with cystic fibrosis reveals infecting species other than *Achromobacter xylosoxidans*. *J. Clin. Microbiol.* **50**: 2688–2694.
- Ridderberg, W., Nielsen, S.M., and Nørskov-Lauritsen, N. **2015**. Genetic adaptation of *Achromobacter* sp. during persistence in the lungs of cystic fibrosis patients. *PLoS One* **10**: e0136790.
- Riehle, M.M., Bennett, A.F., and Long, A.D. **2001**. Genetic architecture of thermal adaptation in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**: 525–530.
- Robertson, P., Smith, A., Mead, A., Smith, I., Khanna, N., Wright, P., Joannidis, P., Boyd, S., Anderson, M., Hamilton, A., et al. **2015**. Risk-assessment-based approach to patients exposed to endoscopes contaminated with *Pseudomonas* spp. *J. Hosp. Infect.* **90**: 66–69.
- Robino, L., Cordeiro, N., Garcia-Fulgueiras, V., Bado, I., Algorta, G., and Vignoli, R. **2013**. Treatment failure due to acquisition of antibiotic resistance: report of two clinical cases. *Rev. Chil. Infectologia* **30**: 326–328.
- Rocap, G., Larimer, F.W., Lamerdin, J., Malfatti, S., Chain, P., Ahlgren, N.A., Arellano, A., Coleman, M., Hauser, L., Hess, W.R., et al. **2003**. Genome divergence in two *Prochlorococcus* ecotypes reflects oceanic niche differentiation. *Nature* **424**: 1042–1047.
- Rodrigues, E.R.A., Ferreira, A.G., Leão, R.S., Leite, C.C.F., Carvalho-Assef, A.P., Albano, R.M., and Marques, E.A. **2015**. Characterization of *Achromobacter* species in cystic fibrosis patients: comparison of bla(OXA-114) PCR amplification, multilocus sequence typing, and Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* **53**: 3894–3896.
- Rodríguez-Rojas, A., and Blázquez, J. **2009**. The *Pseudomonas aeruginosa* *pfpl* gene plays an antimutator role and provides general stress protection. *J. Bacteriol.* **191**: 844–850.

- Rogers, G.B., Hoffman, L.R., Johnson, M.W., Mayer-Hamblett, N., Schwarze, J., Carroll, M.P., and Bruce, K.D. **2011**. Using bacterial biomarkers to identify early indicators of cystic fibrosis pulmonary exacerbation onset. *Expert Rev Mol Diagn* **11**: 197–206.
- Rogers, G.B., Carroll, M.P., and Bruce, K.D. **2012**. Enhancing the utility of existing antibiotics by targeting bacterial behaviour?. *Br. J. Pharmacol.* **165**: 845–857.
- Rolain, J.M., Fancello, L., Desnues, C., and Raoult, D. **2011**. Bacteriophages as vehicles of the resistome in cystic fibrosis. *J. Antimicrob. Chemother.* **66**: 2444–2447.
- Román, F., Cantón, R., Pérez-Vázquez, M., Baquero, F., and Campos, J. **2004**. Dynamics of long-term colonization of respiratory tract by *Haemophilus influenzae* in cystic fibrosis patients shows a marked increase in hypermutable strains. *J. Clin. Microbiol.* **42**: 1450–1459.
- Romano-Bertrand, S., Frapier, J.-M., Calvet, B., Colson, P., Albat, B., Parer, S., and Jumas-Bilak, E. **2014**. Dynamics of the surgical microbiota along the cardiothoracic surgery pathway. *Front Microbiol* **5**: 787.
- Römling, U., Schmidt, K.D., and Tümmler, B. **1997**. Large genome rearrangements discovered by the detailed analysis of 21 *Pseudomonas aeruginosa* clone C isolates found in environment and disease habitats. *J. Mol. Biol.* **271**: 386–404.
- Romling, U., Kader, A., Sriramulu, D.D., Simm, R., and Kronvall, G. **2005**. Worldwide distribution of *Pseudomonas aeruginosa* clone C strains in the aquatic environment and cystic fibrosis patients. *Environ. Microbiol.* **7**: 1029–1038.
- Rosenfeld, M., Emerson, J., Accurso, F., Armstrong, D., Castile, R., Grimwood, K., Hiatt, P., McCoy, K., McNamara, S., Ramsey, B., et al. **1999**. Diagnostic accuracy of oropharyngeal cultures in infants and young children with cystic fibrosis. *Pediatr. Pulmonol.* **28**: 321–328.
- Rowbotham, T.J. **1980**. Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. *J. Clin. Pathol.* **33**: 1179–1183.
- Roy, P. **2014**. Pulmonary Infection Caused by *Achromobacter xylosoxidans* in a patient with carcinoma of epiglottis: a rare case. *J. Clin. Diagn. Res.* **8**: DD01-02.
- Rusch, D.B., Martiny, A.C., Dupont, C.L., Halpern, A.L., and Venter, J.C. **2010**. Characterization of *Prochlorococcus* clades from iron-depleted oceanic regions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**: 16184–16189.
- Ryder, C., Byrd, M., and Wozniak, D.J. **2007**. Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Curr. Opin. Microbiol.* **10**: 644–648.
- Sabra, W., Kim, E.-J., and Zeng, A.-P. **2002**. Physiological responses of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 to oxidative stress in controlled microaerobic and aerobic cultures. *Microbiology* **148**: 3195–3202.
- Saha, R., Saha, N., Donofrio, R.S., and Bestervelt, L.L. **2013**. Microbial siderophores: a mini review. *J. Basic Microbiol.* **53**: 303–317.
- Sahin, N., Tani, A., Kotan, R., Sedláček, I., Kimbara, K., and Tamer, A.U. **2011**. *Pandoraea oxalativorans* sp. nov., *Pandoraea faecigallinarum* sp. nov. and *Pandoraea vervacti* sp. nov., isolated from oxalate-enriched culture. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **61**: 2247–2253.
- Salsgiver, E.L., Fink, A.K., Knapp, E.A., LiPuma, J.J., Olivier, K.N., Marshall, B.C., and Saiman, L. **2015**. Changing epidemiology of the respiratory bacteriology of patients with Cystic Fibrosis. *Chest.* **149**:390-400
- Salter, I., Galand, P.E., Fagervold, S.K., Lebaron, P., Obernosterer, I., Oliver, M.J., Suzuki, M.T., and Tricoire, C. **2015**. Seasonal dynamics of active SAR11 ecotypes in the oligotrophic Northwest Mediterranean Sea. *ISME J.* **9**: 347–360.

- Sandoz, K.M., Mitzimberg, S.M., and Schuster, M. **2007**. Social cheating in *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**: 15876–15881.
- Sauer, K., Camper, A.K., Ehrlich, G.D., Costerton, J.W., and Davies, D.G. **2002**. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J. Bacteriol.* **184**: 1140–1154.
- Sawa, T., Yahr, T.L., Ohara, M., Kurahashi, K., Gropper, M.A., Wiener-Kronish, J.P., and Frank, D.W. **1999**. Active and passive immunization with the *Pseudomonas* V antigen protects against type III intoxication and lung injury. *Nat. Med.* **5**: 392–398.
- Schaaff, F., Bierbaum, G., Baumert, N., Bartmann, P., and Sahl, H.-G. **2003**. Mutations are involved in emergence of aminoglycoside-induced small colony variants of *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Med. Microbiol.* **293**: 427–435.
- Schaber, J.A., Carty, N.L., McDonald, N.A., Graham, E.D., Cheluvappa, R., Griswold, J.A., and Hamood, A.N. **2004**. Analysis of quorum sensing-deficient clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Med. Microbiol.* **53**: 841–853.
- Schaefer, A.L., Taylor, T.A., Beatty, J.T., and Greenberg, E.P. **2002**. Long-chain acyl-homoserine lactone quorum-sensing regulation of *Rhodobacter capsulatus* gene transfer agent production. *J. Bacteriol.* **184**: 6515–6521.
- Schelstraete, P., Daele, S.V., Boeck, K.D., Proesmans, M., Lebecque, P., Leclercq-Foucart, J., Malfroot, A., Vaneechoutte, M., and Baets, F.D. **2008**. *Pseudomonas aeruginosa* in the home environment of newly infected cystic fibrosis patients. *Eur. Respir. J.* **31**: 822–829.
- Schindler, B.D., and Kaatz, G.W. **2016**. Multidrug efflux pumps of Gram-positive bacteria. *Drug Resist. Updat.* **27**: 1–13.
- Schneider, I., and Bauernfeind, A. **2015**. Intrinsic carbapenem-hydrolyzing oxacillinases from members of the genus *Pandoraea*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **59**: 7136–7141.
- Schneider, I., Queenan, A.M., and Bauernfeind, A. **2006**. Novel carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-62 from *Pandoraea pnomenus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**: 1330–1335.
- Schobert, M., and Jahn, D. **2010**. Anaerobic physiology of *Pseudomonas aeruginosa* in the cystic fibrosis lung. *Int. J. Med. Microbiol.* **300**: 549–556.
- Schroeder, T.H., Lee, M.M., Yacono, P.W., Cannon, C.L., Gerçeker, A.A., Golan, D.E., and Pier, G.B. **2002**. CFTR is a pattern recognition molecule that extracts *Pseudomonas aeruginosa* LPS from the outer membrane into epithelial cells and activates NF-kappa B translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**: 6907–6912.
- Schurr, M.J., Yu, H., Martinez-Salazar, J.M., Boucher, J.C., and Deretic, V. **1996**. Control of *AlgU*, a member of the sigma E-like family of stress sigma factors, by the negative regulators *MucA* and *MucB* and *Pseudomonas aeruginosa* conversion to mucoidy in cystic fibrosis. *J. Bacteriol.* **178**: 4997–5004.
- Schuster, M., and Greenberg, E.P. **2006**. A network of networks: quorum-sensing gene regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int. J. Med. Microbiol.* **296**: 73–81.
- Schuster, M., Lostroh, C.P., Ogi, T., and Greenberg, E.P. **2003**. Identification, timing, and signal specificity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-controlled genes: a transcriptome analysis. *J. Bacteriol.* **185**: 2066–2079.
- Schwab, U., Abdullah, L.H., Perlmutter, O.S., Albert, D., Davis, C.W., Arnold, R.R., Yankaskas, J.R., Gilligan, P., Neubauer, H., Randell, S.H., et al. **2014**. Localization of *Burkholderia cepacia* complex bacteria in cystic fibrosis lungs and interactions with *Pseudomonas aeruginosa* in hypoxic mucus. *Infect. Immun.* **82**: 4729–4745.

- Scott-Phillips, T.C., Laland, K.N., Shuker, D.M., Dickins, T.E., and West, S.A. **2014**. The niche construction perspective: a critical appraisal. *Evol. Int. J. Org. Evol.* **68**: 1231–1243.
- Sendi, P., and Proctor, R.A. **2009**. *Staphylococcus aureus* as an intracellular pathogen: the role of small colony variants. *Trends Microbiol.* **17**: 54–58.
- Serisier, D.J., Tuck, A., Matley, D., Carroll, M.P., and Jones, G. **2012**. Antimicrobial susceptibility and synergy studies of cystic fibrosis sputum by direct sputum sensitivity testing. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **31**: 3211–3216.
- Sherrard, L.J., Tunney, M.M., and Elborn, J.S. **2014**. Antimicrobial resistance in the respiratory microbiota of people with cystic fibrosis. *Lancet* **384**: 703–713.
- Sibley, C.D., Rabin, H., and Surette, M.G. **2006**. Cystic fibrosis: a polymicrobial infectious disease. *Future Microbiol.* **1**: 53–61.
- Sibley, C.D., Duan, K., Fischer, C., Parkins, M.D., Storey, D.G., Rabin, H.R., and Surette, M.G. **2008**. Discerning the complexity of community interactions using a *Drosophila* model of polymicrobial infections. *PLoS Pathog.* **4**: e1000184.
- Siebor, E., Llanes, C., Lafon, I., Ogier-Desserrey, A., Duez, J.M., Pechinot, A., Caillot, D., Grandjean, M., Sixt, N., and Neuwirth, C. **2007**. Presumed pseudobacteremia outbreak resulting from contamination of proportional disinfectant dispenser. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **26**: 195–198.
- Sikorski, J., and Nevo, E. **2007**. Patterns of thermal adaptation of *Bacillus simplex* to the microclimatically contrasting slopes of “Evolution Canyons” I and II, Israel. *Environ. Microbiol.* **9**: 716–726.
- Silo-Suh, L., Suh, S.-J., Phibbs, P.V., and Ohman, D.E. **2005**. Adaptations of *Pseudomonas aeruginosa* to the cystic fibrosis lung environment can include deregulation of *zwf*, encoding glucose-6-phosphate dehydrogenase. *J. Bacteriol.* **187**: 7561–7568.
- Silva, I.N., Ferreira, A.S., Becker, J.D., Zlosnik, J.E.A., Speert, D.P., He, J., Mil-Homens, D., and Moreira, L.M. **2011**. Mucoïd morphotype variation of Burkholderia multivorans during chronic cystic fibrosis lung infection is correlated with changes in metabolism, motility, biofilm formation and virulence. *Microbiol. Read. Engl.* **157**: 3124–3137.
- Smith, A.L., Fiel, S.B., Mayer-Hamblett, N., Ramsey, B., and Burns, J.L. **2003**. Susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates and clinical response to parenteral antibiotic administration: lack of association in cystic fibrosis. *Chest* **123**: 1495–1502.
- Smith, E.E., Buckley, D.G., Wu, Z., Saenphimmachak, C., Hoffman, L.R., D’Argenio, D.A., Miller, S.I., Ramsey, B.W., Speert, D.P., Moskowitz, S.M., et al. **2006**. Genetic adaptation by *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**: 8487–8492.
- Smits, W.K., Kuipers, O.P., and Veening, J.-W. **2006**. Phenotypic variation in bacteria: the role of feedback regulation. *Nat. Rev. Microbiol.* **4**: 259–271.
- Smyth, A. **2005**. Prophylactic antibiotics in cystic fibrosis: a conviction without evidence?. *Pediatr. Pulmonol.* **40**: 471–476.
- Sobsey, M.D., and Pillai, S.D. **2009**. Where future emerging pathogens will come from and what approaches can be used to find them, besides VFARs. *J. Water Health* **7 Suppl 1**: S75–93.
- Spencer, C.C., Tyerman, J., Bertrand, M., and Doebeli, M. **2008**. Adaptation increases the likelihood of diversification in an experimental bacterial lineage. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**: 1585–1589.

- Spencer, D.H., Kas, A., Smith, E.E., Raymond, C.K., Sims, E.H., Hastings, M., Burns, J.L., Kaul, R., and Olson, M.V. **2003**. Whole-genome sequence variation among multiple isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **185**: 1316–1325.
- Spilker, T., Vandamme, P., and Lipuma, J.J. **2012**. A multilocus sequence typing scheme implies population structure and reveals several putative novel *Achromobacter* species. *J. Clin. Microbiol.* **50**: 3010-3015
- Spilker, T., Vandamme, P., and Lipuma, J.J. **2013**. Identification and distribution of *Achromobacter* species in cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros.* **12**: 298–301.
- Spoering, A.L., and Lewis, K. **2001**. Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobials. *J. Bacteriol.* **183**: 6746–6751.
- Starkey, M., Hickman, J.H., Ma, L., Zhang, N., De Long, S., Hinz, A., Palacios, S., Manoil, C., Kirisits, M.J., Starner, T.D., et al. **2009**. *Pseudomonas aeruginosa* rugose small-colony variants have adaptations that likely promote persistence in the cystic fibrosis lung. *J. Bacteriol.* **191**: 3492–3503.
- Steinkamp, G., Wiedemann, B., Rietschel, E., Krahl, A., Gielen, J., Bärmeier, H., and Ratjen, F. **2005**. Prospective evaluation of emerging bacteria in cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros.* **4**: 41–48.
- Stoltz, D.A., Meyerholz, D.K., Pezzulo, A.A., Ramachandran, S., Rogan, M.P., Davis, G.J., Hanfland, R.A., Wohlford-Lenane, C., Dohrn, C.L., Bartlett, J.A., et al. **2010**. Cystic fibrosis pigs develop lung disease and exhibit defective bacterial eradication at birth. *Sci. Transl. Med.* **2**: 29-31.
- Stoltz, D.A., Meyerholz, D.K., and Welsh, M.J. **2015**. Origins of cystic fibrosis lung disease. *N. Engl. J. Med.* **372**: 351–362.
- Storey, D.G., Ujack, E.E., Rabin, H.R., and Mitchell, I. **1998**. *Pseudomonas aeruginosa lasR* transcription correlates with the transcription of *lasA*, *lasB*, and *toxA* in chronic lung infections associated with cystic fibrosis. *Infect. Immun.* **66**: 2521–2528.
- Stover, C.K., Pham, X.Q., Erwin, A.L., Mizoguchi, S.D., Warrener, P., Hickey, M.J., Brinkman, F.S., Hufnagle, W.O., Kowalik, D.J., Lagrou, M., et al. **2000**. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* **406**: 959–964.
- Stryjewski, M.E., LiPuma, J.J., Messier, Jr., R.H., Reller, L.B., and Alexander, B.D. **2003**. Sepsis, Multiple Organ Failure, and Death Due to *Pandoraea pnomenusa* Infection after Lung Transplantation. *J. Clin. Microbiol.* **41**: 2255–2257.
- Stutman, H.R., Lieberman, J.M., Nussbaum, E., and Marks, M.I. **2002**. Antibiotic prophylaxis in infants and young children with cystic fibrosis: a randomized controlled trial. *J. Pediatr.* **140**: 299–305.
- Suarez, C., Peña, C., Arch, O., Dominguez, M.A., Tubau, F., Juan, C., Gavaldá, L., Sora, M., Oliver, A., Pujol, M., et al. **2011**. A large sustained endemic outbreak of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*: a new epidemiological scenario for nosocomial acquisition. *BMC Infect. Dis.* **11**: 272.
- Surette, M.G. **2014**. The cystic fibrosis lung microbiome. *Ann. Am. Thorac. Soc.* **11 Suppl 1**: S61-65.
- Szabo, J.G., Rice, E.W., and Bishop, P.L. **2007**. Persistence and decontamination of *Bacillus atrophaeus* subsp *globigii* spores on corroded iron in a model drinking water system. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 2451–2457.
- Talbot, N.P., and Flight, W.G. **2016**. Severe *Achromobacter xylosoxidans* infection and loss of sputum bacterial diversity in an adult patient with cystic fibrosis. *Paediatr. Respir. Rev.* **20**: 27-29
- Taylor, R.F., Hodson, M.E., and Pitt, T.L. **1993**. Adult cystic fibrosis: association of acute pulmonary exacerbations and increasing severity of lung disease with auxotrophic mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *Thorax* **48**: 1002–1005.

- Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Goering, R.V., Mickelsen, P.A., Murray, B.E., Persing, D.H., and Swaminathan, B. **1995**. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* **33**: 2233–2239.
- Tettelin, H., Riley, D., Cattuto, C., and Medini, D. **2008**. Comparative genomics: the bacterial pan-genome. *Curr. Opin. Microbiol.* **11**: 472–477.
- Teysier, C., Marchandin, H., Siméon De Buochberg, M., Ramuz, M., and Jumas-Bilak, E. **2003**. Atypical 16S rRNA gene copies in *Ochrobactrum intermedium* strains reveal a large genomic rearrangement by recombination between *rrn* copies. *J. Bacteriol.* **185**: 2901–2909.
- Theron, J., and Cloete, T.E. **2002**. Emerging waterborne infections: contributing factors, agents, and detection tools. *Crit. Rev. Microbiol.* **28**: 1–26.
- Thomas, S.R., Ray, A., Hodson, M.E., and Pitt, T.L. **2000**. Increased sputum amino acid concentrations and auxotrophy of *Pseudomonas aeruginosa* in severe cystic fibrosis lung disease. *Thorax* **55**: 795–797.
- Thomas, V., Bouchez, T., Nicolas, V., Robert, S., Loret, J. f., and Lévi, Y. **2004**. *Amoebae* in domestic water systems: resistance to disinfection treatments and implication in *Legionella* persistence. *J. Appl. Microbiol.* **97**: 950–963.
- Toll-Riera, M., Millan, A.S., Wagner, A., and MacLean, R.C. **2016**. The Genomic Basis of Evolutionary Innovation in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLOS Genet* **12**: e1006005.
- Tom, S.K., Yau, Y.C.W., Beaudoin, T., LiPuma, J.J., and Waters, V. **2016**. Effect of high-dose antimicrobials on biofilm growth of *Achromobacter* Species isolated from cystic fibrosis patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* **60**: 650–652.
- Tomlin, K.L., Coll, O.P., and Ceri, H. **2001**. Interspecies biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Can. J. Microbiol.* **47**: 949–954.
- Traglia, G.M., Almuzara, M., Merquier, A.K., Adams, C., Galanternik, L., Vay, C., Centrón, D., and Ramírez, M.S. **2012**. *Achromobacter xylosoxidans*: An emerging pathogen carrying different elements involved in horizontal genetic transfer. *Curr. Microbiol.* **65**: 673–678.
- Tramper-Stranders, G.A., van der Ent, C.K., Molin, S., Yang, L., Hansen, S.K., Rau, M.H., Ciofu, O., Johansen, H.K., and Wolfs, T.F.W. **2012**. Initial *Pseudomonas aeruginosa* infection in patients with cystic fibrosis: characteristics of eradicated and persistent isolates. *Clin. Microbiol. Infect.* **18**: 567–574.
- Trancassini, M., Iebba, V., Citerà, N., Tuccio, V., Magni, A., Varesi, P., De Biase, R.V., Totino, V., Santangelo, F., Gagliardi, A., et al. **2014**. Outbreak of *Achromobacter xylosoxidans* in an Italian Cystic fibrosis center: genome variability, biofilm production, antibiotic resistance, and motility in isolated strains. *Front. Microbiol.* **5**: 138.
- Trezise, A.E., Chambers, J.A., Wardle, C.J., Gould, S., and Harris, A. **1993**. Expression of the cystic fibrosis gene in human foetal tissues. *Hum. Mol. Genet.* **2**: 213–218.
- Tuscherr, L., Heitmann, V., Hussain, M., Viemann, D., Roth, J., von Eiff, C., Peters, G., Becker, K., and Löffler, B. **2010**. *Staphylococcus aureus* small-colony variants are adapted phenotypes for intracellular persistence. *J. Infect. Dis.* **202**: 1031–1040.
- Tuggle, K.L., Birket, S.E., Cui, X., Hong, J., Warren, J., Reid, L., Chambers, A., Ji, D., Gamber, K., Chu, K.K., et al. **2014**. Characterization of defects in ion transport and tissue development in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (*CFTR*)-knockout rats. *PLoS One* **9**: e91253.
- Tümmler, B., and Cornelis, P. **2005**. Pyoverdine Receptor: a Case of Positive Darwinian Selection in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **187**: 3289–3292.

- Turel, O., Kavuncuoglu, S., Hosaf, E., Ozbek, S., Aldemir, E., Uygur, T., Hatipoglu, N., and Siraneci, R. **2013**. Bacteremia due to *Achromobacter xylosoxidans* in neonates: clinical features and outcome. *Braz. J. Infect. Dis.* **17**: 450–454.
- Turrientes, M.C., Baquero, M.R., Sánchez, M.B., Valdezate, S., Escudero, E., Berg, G., Cantón, R., Baquero, F., Galán, J.C., and Martínez, J.L. **2010**. Polymorphic Mutation Frequencies of Clinical and Environmental *Stenotrophomonas maltophilia* Populations. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**: 1746–1758.
- Udine, C., Brackman, G., Bazzini, S., Buroni, S., Van Acker, H., Pasca, M.R., Riccardi, G., and Coenye, T. **2013**. Phenotypic and genotypic characterisation of *Burkholderia cenocepacia* J2315 mutants affected in homoserine lactone and diffusible signal factor-based quorum sensing systems suggests interplay between both types of systems. *PLoS One* **8**: e55112.
- Valderrey, A.D., Pozuelo, M.J., Jiménez, P.A., Maciá, M.D., Oliver, A., and Rotger, R. **2010**. Chronic colonization by *Pseudomonas aeruginosa* of patients with obstructive lung diseases: cystic fibrosis, bronchiectasis, and chronic obstructive pulmonary disease. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **68**: 20–27.
- Valentino, M.D., McGuire, A.M., Rosch, J.W., Bispo, P.J.M., Burnham, C., Sanfilippo, C.M., Carter, R.A., Zegans, M.E., Beall, B., Earl, A.M., et al. **2014**. Unencapsulated *Streptococcus pneumoniae* from conjunctivitis encode variant traits and belong to a distinct phylogenetic cluster. *Nat. Commun.* **5**: 5411.
- Van Daele, S., Verhelst, R., Claeys, G., Verschraegen, G., Franckx, H., Van Simaey, L., de Ganck, C., De Baets, F., and Vanechoutte, M. **2005**. Shared genotypes of *Achromobacter xylosoxidans* strains isolated from patients at a cystic fibrosis rehabilitation center. *J. Clin. Microbiol.* **43**: 2998–3002.
- Van Daele, S., Vanechoutte, M., De Boeck, K., Knoop, C., Malfroot, A., Lebecque, P., Leclercq-Foucart, J., Van Schil, L., Desager, K., and De Baets, F. **2006**. Survey of *Pseudomonas aeruginosa* genotypes in colonised cystic fibrosis patients. *Eur. Respir. J.* **28**: 740–747.
- Vandamme, P.A., Peeters, C., Inganäs, E., Cnockaert, M., Houf, K., Spilker, T., Moore, E.R., and LiPuma, J.J. **2016a**. Taxonomic dissection of *Achromobacter denitrificans* Coenye et al. 2003 and proposal of *Achromobacter agilis* sp. nov., nom. rev., *Achromobacter pestifer* sp. nov., nom. rev., *Achromobacter kerstersii* sp. nov. and *Achromobacter deleyi* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*
- Vandamme, P.A., Peeters, C., Cnockaert, M., Gomila, M., Moore, E.R.B., Spilker, T., and LiPuma, J.J. **2016b**. Reclassification of *Achromobacter spiritinus* Vandamme et al. 2013 as a later heterotypic synonym of *Achromobacter marplatensis* Gomila et al. 2011. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **66**: 1641–1644.
- Vanechoutte, M., and Fani, R. **2009**. From the primordial soup to the latest universal common ancestor. *Research in Microbiology* **160**: 437–440.
- Vanlaere, E., Coenye, T., Samyn, E., Van den Plas, C., Govan, J., de Baets, F., de Boeck, K., Knoop, C., and Vandamme, P. **2005**. A novel strategy for the isolation and identification of environmental *Burkholderia cepacia* complex bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **249**: 303–307.
- Van Mansfeld, R., Jongerden, I., Bootsma, M., Buiting, A., Bonten, M., and Willems, R. **2010**. The population genetics of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from different patient populations exhibits high-level host specificity. *PLoS One* **5**: e13482.
- Vayssier-Taussat, M., Albina, E., Citti, C., Cosson, J.-F., Jacques, M.-A., Lebrun, M.-H., Le Loir, Y., Ogliastro, M., Petit, M.-A., Roumagnac, P., et al. **2014**. Shifting the paradigm from pathogens to pathobiome: new concepts in the light of meta-omics. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **4**: 29.
- Veening, J.-W., Igoshin, O.A., Eijlander, R.T., Nijland, R., Hamoen, L.W., and Kuipers, O.P. **2008**. Transient heterogeneity in extracellular protease production by *Bacillus subtilis*. *Mol. Syst. Biol.* **4**: 184.

- Via, S. **2009**. Natural selection in action during speciation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**: 9939–9946.
- Vidya, P., Smith, L., Beaudoin, T., Yau, Y.C., Clark, S., Coburn, B., Guttman, D.S., Hwang, D.M., and Waters, V. **2016**. Chronic infection phenotypes of *Pseudomonas aeruginosa* are associated with failure of eradication in children with cystic fibrosis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **35**: 67–74.
- Vincenti, S., Quaranta, G., De Meo, C., Bruno, S., Ficarra, M.G., Carovillano, S., Ricciardi, W., and Laurenti, P. **2014**. Non-fermentative gram-negative bacteria in hospital tap water and water used for haemodialysis and bronchoscope flushing: prevalence and distribution of antibiotic resistant strains. *Sci. Total Environ.* **499**: 47–54.
- Von Eiff, C., Heilmann, C., Proctor, R.A., Woltz, C., Peters, G., and Götz, F. **1997**. A site-directed *Staphylococcus aureus hemB* mutant is a small-colony variant which persists intracellularly. *J. Bacteriol.* **179**: 4706–4712.
- Von Eiff, C., Becker, K., Metze, D., Lubritz, G., Hockmann, J., Schwarz, T., and Peters, G. **2001**. Intracellular persistence of *Staphylococcus aureus* small-colony variants within keratinocytes: a cause for antibiotic treatment failure in a patient with darier's disease. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **32**: 1643–1647.
- Wagner, V.E., Bushnell, D., Passador, L., Brooks, A.I., and Iglewski, B.H. **2003**. Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing regulons: effects of growth phase and environment. *J. Bacteriol.* **185**: 2080–2095.
- Waine, D.J., Honeybourne, D., Smith, E.G., Whitehouse, J.L., and Dowson, C.G. **2008**. Association between hypermutator phenotype, clinical variables, mucoid phenotype, and antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Clin. Microbiol.* **46**: 3491–3493.
- Wang, H., Masters, S., Hong, Y., Stallings, J., Falkinham, J.O., Edwards, M.A., and Pruden, A. **2012**. Effect of disinfectant, water age, and pipe material on occurrence and persistence of *Legionella*, mycobacteria, *Pseudomonas aeruginosa*, and two amoebas. *Environ. Sci. Technol.* **46**: 11566–11574.
- Ward, D.M., Bateson, M.M., Ferris, M.J., Köhl, M., Wieland, A., Koepfel, A., and Cohan, F.M. **2006**. Cyanobacterial ecotypes in the microbial mat community of Mushroom Spring (Yellowstone National Park, Wyoming) as species-like units linking microbial community composition, structure and function. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **361**: 1997–2008.
- Wareham, D.W., and Curtis, M.A. **2007**. A genotypic and phenotypic comparison of type III secretion profiles of *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis and bacteremia isolates. *Int. J. Med. Microbiol.* **297**: 227–234.
- Watson, D.A., and Musher, D.M. **1990**. Interruption of capsule production in *Streptococcus pneumoniae* serotype 3 by insertion of transposon *Tn916*. *Infect. Immun.* **58**: 3135–3138.
- Watson, M.E., Jr, Burns, J.L., and Smith, A.L. **2004**. Hypermutable *Haemophilus influenzae* with mutations in *mutS* are found in cystic fibrosis sputum. *Microbiol. Read. Engl.* **150**: 2947–2958.
- Wei, Q., Tarighi, S., Dötsch, A., Häussler, S., Müsken, M., Wright, V.J., Cámara, M., Williams, P., Haenen, S., Boerjan, B., et al. **2011**. Phenotypic and genome-wide analysis of an antibiotic-resistant small colony variant (SCV) of *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One* **6**: e29276.
- West, N.J., Lebaron, P., Strutton, P.G., and Suzuki, M.T. **2011**. A novel clade of *Prochlorococcus* found in high nutrient low chlorophyll waters in the South and Equatorial Pacific Ocean. *ISME J.* **5**: 933–944.
- Whiley, R.A., Fleming, E.V., Makhija, R., and Waite, R.D. **2015**. Environment and colonisation sequence are key parameters driving cooperation and competition between *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis strains and oral commensal streptococci. *PLoS One* **10**: e0115513.

- Wiehlmann, L., Wagner, G., Cramer, N., Siebert, B., Gudowius, P., Morales, G., Köhler, T., van Delden, C., Weinel, C., Slickers, P., et al. **2007**. Population structure of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**: 8101–8106.
- Wilder, C.N., Allada, G., and Schuster, M. **2009**. Instantaneous within-patient diversity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing populations from cystic fibrosis lung infections. *Infect. Immun.* **77**: 5631–5639.
- Willcox, M.D.P., Zhu, H., Conibear, T.C.R., Hume, E.B.H., Givskov, M., Kjelleberg, S., and Rice, S.A. **2008**. Role of quorum sensing by *Pseudomonas aeruginosa* in microbial keratitis and cystic fibrosis. *Microbiol. Read. Engl.* **154**: 2184–2194.
- Williams, B.J., Dehnbostel, J., and Blackwell, T.S. **2010**. *Pseudomonas aeruginosa*: host defence in lung diseases. *Respirol. Carlton Vic* **15**: 1037–1056.
- Willmann, M., Bezdan, D., Zapata, L., Susak, H., Vogel, W., Schröppel, K., Liese, J., Weidenmaier, C., Autenrieth, I.B., Ossowski, S., et al. **2015**. Analysis of a long-term outbreak of XDR *Pseudomonas aeruginosa*: a molecular epidemiological study. *J. Antimicrob. Chemother.* **70**: 1322–1330.
- Willner, D., Furlan, M., Haynes, M., Schmieder, R., Angly, F.E., Silva, J., Tammadoni, S., Nosrat, B., Conrad, D., and Rohwer, F. **2009**. Metagenomic analysis of respiratory tract DNA viral communities in cystic fibrosis and non-cystic fibrosis individuals. *PLoS One* **4**: e7370.
- Windmueller, N., Witten, A., Block, D., Bunk, B., Sproeer, C., Kahl, B.C., and Mellmann, A. **2015**. Transcriptional adaptations during long-term persistence of *Staphylococcus aureus* in the airways of a cystic fibrosis patient. *Int. J. Med. Microbiol.* **305**: 38–46.
- Winstanley, C., and Fothergill, J.L. **2009**. The role of quorum sensing in chronic cystic fibrosis *Pseudomonas aeruginosa* infections. *FEMS Microbiol. Lett.* **290**: 1–9.
- Winstanley, C., O'Brien, S., and Brockhurst, M.A. **2016**. *Pseudomonas aeruginosa* evolutionary adaptation and diversification in cystic fibrosis chronic lung infections. *Trends Microbiol.* **24**: 327–337.
- Wiser, M.J., Ribeck, N., and Lenski, R.E. **2013**. Long-term dynamics of adaptation in asexual populations. *Science* **342**: 1364–1367.
- Wolfgang, M.C., Jyot, J., Goodman, A.L., Ramphal, R., and Lory, S. **2004**. *Pseudomonas aeruginosa* regulates flagellin expression as part of a global response to airway fluid from cystic fibrosis patients. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**: 6664–6668.
- Wolter, D.J., Emerson, J.C., McNamara, S., Buccat, A.M., Qin, X., Cochrane, E., Houston, L.S., Rogers, G.B., Marsh, P., Prehar, K., et al. **2013**. *Staphylococcus aureus* small-colony variants are independently associated with worse lung disease in children with cystic fibrosis. *Clin. Infect. Dis.* **57**: 384–391.
- Wong, A., Rodrigue, N., and Kassen, R. **2012**. Genomics of adaptation during experimental evolution of the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Genet.* **8**: e1002928.
- Woods, C.W., Bressler, A.M., LiPuma, J.J., Alexander, B.D., Clements, D.A., Weber, D.J., Moore, C.M., Reller, L.B., and Kaye, K.S. **2004**. Virulence associated with outbreak-related strains of *Burkholderia cepacia* complex among a cohort of patients with bacteremia. *Clin. Infect. Dis.* **38**: 1243–1250.
- Workentine, M., and Surette, M.G. **2011**. Complex *Pseudomonas* population structure in cystic fibrosis airway infections. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **183**: 1581–1583.
- Workentine, M.L., Sibley, C.D., Glezerson, B., Purighalla, S., Norgaard-Gron, J.C., Parkins, M.D., Rabin, H.R., and Surette, M.G. **2013**. Phenotypic heterogeneity of *Pseudomonas aeruginosa* populations in a cystic fibrosis patient. *PLOS ONE* **8**: e60225.

- Worlitzsch, D., Tarran, R., Ulrich, M., Schwab, U., Cekici, A., Meyer, K.C., Birrer, P., Bellon, G., Berger, J., Weiss, T., et al. **2002**. Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway *Pseudomonas* infections of cystic fibrosis patients. *J. Clin. Invest.* **109**: 317–325.
- Xu, H.S., Roberts, N., Singleton, F.L., Attwell, R.W., Grimes, D.J., and Colwell, R.R. **1982**. Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. *Microb. Ecol.* **8**: 313–323.
- Yachi, S., and Loreau, M. **1999**. Biodiversity and ecosystem productivity in a fluctuating environment: The insurance hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**: 1463–1468.
- Yamamoto, M., Matsumura, Y., Gomi, R., Matsuda, T., Tanaka, M., Nagao, M., Takakura, S., Uemoto, S., and Ichiyama, S. **2016**. Interspecies dissemination of a mobilizable plasmid harboring *bla_{IMP-19}*: the possibility of horizontal gene transfer in a single patient. *Antimicrob. Agents Chemother.* **60**: 5412-5419
- Yang, L., Jelsbak, L., and Molin, S. **2011a**. Microbial ecology and adaptation in cystic fibrosis airways. *Environ. Microbiol.* **13**: 1682–1689.
- Yang, L., Jelsbak, L., Marvig, R.L., Damkiaer, S., Workman, C.T., Rau, M.H., Hansen, S.K., Folkesson, A., Johansen, H.K., Ciofu, O., et al. **2011b**. Evolutionary dynamics of bacteria in a human host environment. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**: 7481–7486.
- Yang, L., Rau, M.H., Yang, L., Høiby, N., Molin, S., and Jelsbak, L. **2011c**. Bacterial adaptation during chronic infection revealed by independent component analysis of transcriptomic data. *BMC Microbiol.* **11**: 184.
- Yoon, J.W., Lim, J.Y., Park, Y.H., and Hovde, C.J. **2005**. Involvement of the *Escherichia coli* O157 : H7(pO157) *ecf* operon and lipid A myristoyl transferase activity in bacterial survival in the bovine gastrointestinal tract and bacterial persistence in farm water troughs. *Infect. Immun.* **73**: 2367–2378.
- Zakharkina, T., Heinzel, E., Koczulla, R.A., Greulich, T., Rentz, K., Pauling, J.K., Baumbach, J., Herrmann, M., Grünewald, C., Dienemann, H., et al. **2013**. Analysis of the airway microbiota of healthy individuals and patients with chronic obstructive pulmonary disease by T-RFLP and clone sequencing. *PloS One* **8**: e68302.
- Zebouh, M., Thomas, C., Honderlick, P., Lemee, L., Segonds, C., Wallet, F., and Husson, M.-O. **2008**. Direct antimicrobial susceptibility testing method for analysis of sputum collected from patients with cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros.* **7**: 238–243.
- Zemanick, E.T., Harris, J.K., Wagner, B.D., Robertson, C.E., Sagel, S.D., Stevens, M.J., Accurso, F.J., and Laguna, T.A. **2013**. Inflammation and airway microbiota during cystic fibrosis pulmonary exacerbations. *PloS One* **8**: e62917.
- Zhang, Z., Louboutin, J.-P., Weiner, D.J., Goldberg, J.B., and Wilson, J.M. **2005**. Human airway epithelial cells sense *Pseudomonas aeruginosa* infection via recognition of flagellin by Toll-like receptor 5. *Infect. Immun.* **73**: 7151–7160.
- Zhao, J., Schloss, P.D., Kalikin, L.M., Carmody, L.A., Foster, B.K., Petrosino, J.F., Cavalcoli, J.D., VanDevanter, D.R., Murray, S., Li, J.Z., et al. **2012**. Decade-long bacterial community dynamics in cystic fibrosis airways. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**: 5809–5814.
- Zhao, J., Murray, S., and LiPuma, J.J. **2014**. Modeling the Impact of Antibiotic Exposure on Human Microbiota. *Sci. Rep.* **4**: 4345.
- Zhou, J., Chen, Y., Tabibi, S., Alba, L., Garber, E., and Saiman, L. **2007**. Antimicrobial susceptibility and synergy studies of *Burkholderia cepacia* complex isolated from patients with cystic fibrosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**: 1085–1088.

Zlosnik, J.E.A., and Speert, D.P. **2010**. The role of mucoidy in virulence of bacteria from the *Burkholderia cepacia* complex: a systematic proteomic and transcriptomic analysis. *J. Infect. Dis.* **202**: 770–781.

Zlosnik, J.E.A., Hird, T.J., Fraenkel, M.C., Moreira, L.M., Henry, D.A., and Speert, D.P. **2008**. Differential mucoid exopolysaccharide production by members of the *Burkholderia cepacia* complex. *J. Clin. Microbiol.* **46**: 1470–1473.

Zlosnik, J.E.A., Mori, P.Y., To, D., Leung, J., Hird, T.J., and Speert, D.P. **2014**. Swimming motility in a longitudinal collection of clinical isolates of *Burkholderia cepacia* complex bacteria from people with cystic fibrosis. *PLOS ONE* **9**: e106428.

Zuckerman, J.B., Zuaro, D.E., Prato, B.S., Ruoff, K.L., Sawicki, R.W., Quinton, H.B., and Saiman, L. **2009**. Bacterial contamination of cystic fibrosis clinics. *J. Cyst. Fibros.* **8**: 186–192.

Zumft, W.G. **1997**. Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* **61**: 533–616.

ANNEXES

ANNEXE 1

Chapitre de livre

Dupont C., Jumas-Bilak E., Marchandin H. « Précis de bactériologie clinique » 3^e Edition. Bacilles à Gram négatif non fermentants divers. Riegel P. Eska. A paraître.

BACILLES À GRAM NÉGATIF NON FERMENTANTS DIVERS

N° 5

Chloé Dupont, Estelle Jumas-Bilak et Hélène Marchandin

■ Considérations générales

Définition/métabolisme des glucides

Les bacilles à Gram négatif non fermentants (BGN-NF) sont des bacilles pour la plupart aérobies stricts, qui n'utilisent pas les 'sucres'/glucides comme source d'énergie ou qui les dégradent par des voies métaboliques autres que la fermentation. Cette dénomination fait le plus souvent référence à l'utilisation du glucose et le groupe des BGN-NF comprend des bactéries non glucidolytiques mais aussi des bactéries capables d'utiliser le glucose uniquement par des réactions d'oxydation. L'absence de fermentation peut être vérifiée à l'aide du milieu de Kligler (« Kligler Iron Agar ») dont la zone inférieure restera de couleur rouge ou le TSI (« Triple Sugar Iron »). La meilleure méthode pour étudier le métabolisme glucidique des BGN-NF est toutefois l'utilisation du milieu O/F (« Oxydation/Fermentation ») de Hugh et Leifson (Engelkrik & Duben-Engelkrik, 2008). Selon la méthode utilisée, la capacité à fermenter les glucides peut être plus ou moins bien mise en évidence, aboutissant à des modifications du statut métabolique des bactéries concernées. Selon la littérature consultée et l'état des connaissances, certains genres voire certaines espèces au sein d'un genre peuvent avoir été considérée comme NF puis ne plus l'être (exemple d'*Haematobacter missouriensis*) quand le métabolisme des sucres est étudié avec une autre méthode ou qu'un nombre plus important d'isolats est étudié, compliquant l'établissement d'une liste exhaustive des BGN-NF (Wauters & Vaneechoutte, 2011).

Taxonomie

Les BGN-NF - autres que ceux traités dans les autres chapitres de cet ouvrage (*Acinetobacter*, *Burkholderia*, *Moraxella*, *Pseudomonas*, ...) - représentent un groupe de bactéries dont la diversité est importante et dont la taxonomie a subi de nombreuses évolutions incluant des reclassifications et de nombreuses descriptions de nouvelles espèces. A titre d'exemple préliminaire, les genres *Acidovorax*, *Brevundimonas*, *Comamonas*, *Delftia*, *Stenotrophomonas* et *Xanthomonas* ont été créés pour reclasser des espèces initialement classées dans le genre *Pseudomonas*. La classification taxonomique actuelle des genres de BGN-NF inclus dans ce chapitre est présentée en tableau 1. Ces genres appartiennent majoritairement au phylum des *Proteobacteria* et à celui des *Bacteroidetes*. Au sein de ces phyla, ils sont classés

dans des ordres et/ou familles très diverses. Des caractéristiques phénotypiques communes ne préjugent pas systématiquement d'une proximité phylogénétique ; par exemple, les deux genres de BGN-NF donnant des colonies rose, *Roseomonas* et *Methylobacterium*, sont classés dans deux ordres différents.

Au delà de cette classification phylogénétique, de nombreuses classifications ont été proposées basées sur les données phénotypiques, principalement la mobilité, la capacité de croissance sur gélose MacConkey, la pigmentation des colonies, la présence d'une oxydase et la capacité à produire de l'indole.

Habitat / sources de contamination

De manière générale, les différents genres de BGN-NF sont présents dans un large panel d'environnements (sols, eaux, plantes). Leur capacité à persister dans ces divers environnements et à former des biofilms, leur adaptabilité et leur capacité de résistance à certains antiseptiques et désinfectants (chlorhexidine, ammonium quaternaires) en font des contaminants de divers réservoirs d'infection en milieu hospitalier (équipements, solutions médicamenteuses, réseaux d'eau par exemple) et des agents d'infections associées aux soins (Winn *et al.*, 2006). Toutefois, certains genres présentent des spécificités notables, comme le genre *Oligella*, commensal du tractus urogénital humain ; l'espèce *Weeksella virosa*, commensale du tractus urogénital féminin ; l'espèce *Bergeyella zoohelcum*, présente dans le microbiote bucco-dentaire animal et les genres *Ignatzschineria* et *Wohlfahrtiimonas* qui sont associés aux diptères. Pour d'autres genres dont la description est récente et uniquement basée sur des isolats d'origine humaine, le réservoir demeure à ce jour inconnu (exemple du genre *Haematobacter*). Ces particularités sont présentées en tableau 2.

Pouvoir pathogène et facteurs favorisants

Les genres de BGN-NF présentés dans ce chapitre sont des pathogènes opportunistes, d'importance clinique variable selon le genre considéré, pouvant engendrer des infections chez des patients fragilisés mais aussi, de manière plus rare, chez des patients sans comorbidité. Certains sont considérés comme des pathogènes émergents. Leur isolement à partir d'échantillons biologiques humains peut être d'interprétation difficile, ces bactéries pouvant être des pathogènes opportunistes ou des simples contaminants d'origine environnementale dont hydrique. Les

Tableau 1. Taxonomie des genres de bacilles à Gram négatif non fermentants abordés dans ce chapitre ^a

Bacteroidetes; Flavobacteriia; Flavobacteriales; Flavobacteriaceae	
<i>Bergeyella</i>	Vandamme <i>et al.</i> , 1994
<i>Chryseobacterium</i>	Vandamme <i>et al.</i> , 1994
<i>Elizabethkingia</i>	Kim <i>et al.</i> , 2005
<i>Empedobacter</i>	Vandamme <i>et al.</i> , 1994
<i>Flavobacterium</i>	Bergey <i>et al.</i> , 1923
<i>Myroides</i>	Vancanneyt <i>et al.</i> , 1996
<i>Weeksella</i>	Holmes <i>et al.</i> , 1986
Bacteroidetes; Sphingobacteria; Sphingobacteriales; Sphingobacteriaceae	
<i>Sphingobacterium</i>	Yabuuchi <i>et al.</i> , 1983
Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Caulobacterales; Caulobacteraceae	
<i>Brevundimonas</i>	Segers <i>et al.</i> , 1994
<i>Caulobacter</i>	Henrici & Johnson, 1935
Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales	
Aurantimonadaceae	
<i>Aureimonas</i>	Rathsack <i>et al.</i> , 2011
Brucellaceae	
<i>Ochrobactrum</i>	Holmes <i>et al.</i> , 1988
<i>Pseudochrobactrum</i>	Kämpfer <i>et al.</i> , 2006
Methylobacteriaceae	
<i>Methylobacterium</i>	Patt <i>et al.</i> , 1976
Rhizobiaceae; Rhizobium/Agrobacterium group	
<i>Rhizobium</i>	Frank, 1889
Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhodobacterales; Rhodobacteraceae	
<i>Haematobacter</i>	Helsel <i>et al.</i> , 2007
<i>Paracoccus</i>	Davis, 1969
Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhodospirillales; Acetobacteraceae	
<i>Roseomonas</i>	Rihs <i>et al.</i> , 193 (validation en 1998)
Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Sphingomonadales; Sphingomonadaceae	
<i>Sphingomonas</i>	Yabuuchi <i>et al.</i> , 1990
Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales	
Alcaligenaceae	
<i>Achromobacter</i>	Yabuuchi & Yano, 1981
<i>Alcaligenes</i>	Castellani & Chalmers 1919
<i>Kerstersia</i>	Coenye <i>et al.</i> , 2003
<i>Oligella</i>	Rossau <i>et al.</i> , 1987
Comamonadaceae	
<i>Acidovorax</i>	Willems <i>et al.</i> , 1990
<i>Comamonas</i>	De Vos <i>et al.</i> , 1985
<i>Delftia</i>	Wen <i>et al.</i> , 1999
Oxalobacteraceae	
<i>Herbaspirillum</i>	Baldani <i>et al.</i> , 1986
<i>Massilia</i>	La Scola <i>et al.</i> , 2000
Proteobacteria; Betaproteobacteria; Neisseriales; Chromobacteriaceae	
<i>Laribacter</i>	Yuen <i>et al.</i> , 2002
Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Alteromonadales	
Alteromonadaceae	
<i>Alishewanella</i>	Fonnesbech Vogel <i>et al.</i> , 2000
Shewanellaceae	
<i>Shewanella</i>	MacDonell & Colwell, 1986
Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Oceanospirillales; Oceanospirillaceae	
<i>Balneatrix</i>	Dauga <i>et al.</i> , 1993
Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales; Moraxellaceae	
<i>Psychrobacter</i>	Juni & Heym, 1986
Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Xanthomonadales; Xanthomonadaceae	
<i>Dyella</i>	Xie & Yokota, 2005
<i>Ignatzschineria</i>	Tóth <i>et al.</i> , 2007
<i>Stenotrophomonas</i>	Palleroni & Bradbury, 1993
<i>Wohlfahrtiimonas</i>	Tóth <i>et al.</i> , 2008
<i>Xanthomonas</i>	Dowson, 1939

^aPhylum; classe; ordre; famille puis genre sont indiqués successivement suivis de la référence et de l'année de description du genre considéré. Les genres et espèces dont la description est antérieure à 1980 ont tous été validés dans la "approved list of bacterial names" en 1980 (Skerman *et al.*, 1980) amendée en 1989 (Skerman *et al.*, 1989). Les renseignements de ce tableau proviennent de la List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature accessible en ligne: <http://www.bacterio.net/index.html>

infections les plus souvent rapportées sont des infections de la peau et des tissus mous, des infections du tractus respiratoire et du tractus uro-génital et des bactériémies associées ou non aux cathéters. La plupart des BGN-NF décrits dans ce chapitre est également isolée à partir des sécrétions du tractus respiratoire des patients atteints de mucoviscidose, certains ayant la capacité de coloniser chroniquement les patients (*S. maltophilia* et *Achromobacter* spp. principalement) sans que leur rôle pathogène soit toujours clairement établi. En lien avec leur habitat, certains genres induisent des infections particulières comme *B. zoohelcum* des infections suite à des morsures animales, *Oligella ureolytica* des infections du tractus urinaire tandis que les genres *Ignatzschineria* et *Wohlfahrtiimonas* sont des agents d'infections associées aux myiases. Enfin, *Laribacter hongkongensis* a la particularité d'induire des gastroentérites communautaires et des diarrhées du voyageur (Tableau 2).

Les facteurs de risque généraux d'infections par un BGN-NF sont l'immunosuppression et/ou l'existence d'une pathologie sous-jacente (diabète, cancer, mucoviscidose, transplantation, traitement immunosuppresseur), d'un traumatisme (chirurgie, brûlure, plaies diverses), la présence de matériel étranger (cathéter, lentilles, prothèse) et la dialyse (Winn *et al.*, 2006).

La virulence des BGN-NF est généralement considérée comme faible, bien qu'une méconnaissance globale des facteurs de virulence éventuellement impliqués demeure pour la plupart des genres décrits ci-après. Enfin, si dans certaines espèces, des sous-populations adaptées à l'homme ont pu être caractérisées, comme dans le genre *Agrobacterium* (Aujoulat *et al.*, 2011), l'existence de sous-populations capables d'infecter l'homme ou certains catégories de patients (atteints de mucoviscidose, ...) qui seraient distinctes des souches environnementales de la même espèce demeure inconnue pour la plupart des genres décrits ici.

Les méthodes d'étude indépendantes de la culture des microbiotes humains et environnementaux révèlent des séquences affiliées à de nombreux genres cités dans ce chapitre y compris les genres pour lesquels peu de représentants sont cultivés à ce jour. Ces études descriptives de la diversité bactérienne, si elles peuvent permettre d'améliorer les connaissances sur l'habitat de certains BGN-NF, ne permettent actuellement pas d'améliorer celles sur le pouvoir pathogène de ces genres bactériens, leur détection pouvant correspondre à une simple colonisation transitoire par ces BGN-NF largement présents dans de nombreuses niches environnementales.

Diagnostic bactériologique

Les BGN-NF sont non sporulés, la majorité est aérobic stricte et possède une oxydase (Tableau 2). Ils peuvent être mobiles ou immobiles et seuls certains genres peuvent cultiver sur les milieux sélectifs pour les bacilles à Gram négatif et ces caractéristiques vont orienter l'identification des BGN-NF. Il en est de même pour la pigmentation des colonies obtenues. Les schémas d'identification phénotypique incluent également la capacité à produire de l'indole, de l' H_2S , à réduire les nitrates, à hydrolyser gélatine et/ou esculine et la présence d'une uréase (Monteil & Harf-Monteil, 2006 ; Vanechoutte *et al.*, 2011). Ces caractéristiques seront détaillées ci-après d'après les références originales de description des genres et espèces et les ouvrages suivants : le Bergey's manual of systematic bacteriology (Garrity

et al., 2005), le Bergey's manual of determinative bacteriology (Holt *et al.*, 1994) et The Prokaryotes (Rosenberg *et al.*, 2014).

Les espèces bactériennes de ce groupe sont plus aisément identifiées à l'heure où les méthodes d'identification rapide basées sur la spectrométrie de masse et les méthodes d'identification moléculaire sont accessibles à un grand nombre de laboratoires. Pour ce qui concerne la spectrométrie de masse MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight), l'identification sera très dépendante de la base de données utilisée, de sa richesse et de sa représentativité (Tableau 3). Malgré les progrès notables apportés par cette approche à l'identification des BGN-NF, il faut donc garder à l'esprit ses limites, notamment pour l'identification d'espèce dans les genres où toutes les espèces isolées chez l'homme ne sont pas présentes dans la base de données mais aussi pour l'identification d'espèces très proches comme par exemple dans le genre *Achromobacter*. Les méthodes phénotypiques d'identification basées sur la détermination du profil métabolique de la bactérie ont quant à elles beaucoup perdu de leur utilité car elles ne permettent pas l'identification fiable de nombreuses espèces de BGN-NF d'importance clinique. En effet, les similarités phénotypiques entre espèces et la description de nombreuses nouvelles espèces dans la plupart des genres de BGN-NF ont rendu caduques les schémas d'identification précédemment proposés ; à l'exception de l'identification de *Stenotrophomonas maltophilia*, ces méthodes ne sont donc plus considérées comme permettant une identification fiable des espèces au sein de la majorité des genres bactériens décrits dans ce chapitre, elles ont même parfois été prises en défaut pour l'identification de genre. De même, les identifications d'espèces rapportées dans les cas cliniques et autres études non basées sur des méthodes performantes ne peuvent être considérées comme fiables et de nombreuses études ont *a posteriori* montré que certains isolats humains appartenaient à une ou plusieurs autres espèces que celles initialement identifiées (Holt *et al.*, 2005 ; Deschaght *et al.*, 2012 ; Aujoulat *et al.*, 2015). Ceci inclut l'invalidité de résultats de séquençage de l'ADNr 16S pour les genres où ce marqueur n'est pas suffisamment discriminant entre espèces proches comme dans les genres *Achromobacter* ou *Ochrobactrum*.

Résistance aux antibiotiques

Une grande hétérogénéité de profils de sensibilité/résistance aux antibiotiques est observée dans ce groupe. Certaines espèces présentent une grande sensibilité naturelle aux antibiotiques comme *Bergeyella zoohelcum*, *Weeksella virosa*, *Oligella urethralis*, *Paracoccus yeei* et *Shewanella putrefaciens* / *Shewanella algae* tandis que d'autres sont naturellement multi-résistantes aux antibiotiques comme *Stenotrophomonas maltophilia*, *Chryseobacterium* spp., *Myroides* spp., *Achromobacter* spp. et *Ochrobactrum* spp. (Tableau 2) (Courvalin *et al.*, 2006). Plusieurs exemples de phénotypes de résistance naturelle de BGN-NF (*Alcaligenes faecalis*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Chryseobacterium indologenes*, *Elizabethkingia meningoseptica*, *Ochrobactrum anthropi*, *Stenotrophomonas maltophilia* et *Shewanella putrefaciens*) peuvent être visualisés à l'adresse suivante : <http://www.microbes-edu.org/professionnel/prof.html>.

Cette résistance naturelle aux antibiotiques présentée par certaines espèces peut compliquer la prise en charge des infections opportunistes causées et un antibiogramme est donc indis-

pensable pour orienter le traitement adéquat. Les phénotypes de résistance sont également une aide précieuse à l'identification pour de nombreux genres de BGN-NF. Parmi les BGN-NF traités dans ce chapitre, le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie-European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (CA-SFM-EUCAST) n'a émis des recommandations que quant aux conditions de réalisation et d'interprétation de *S. maltophilia* (recommandations du CA-SFM-EUCAST, communiqué 2015 V2.0, www.sfm-microbiologie.org). La réalisation d'un antibiogramme par diffusion en milieu gélosé de Mueller-Hinton apparaît toutefois à recommander pour l'ensemble de ces BGN-NF par rapport aux méthodes en microdilution qui, du fait du caractère aérobic de ces bactéries et de leurs importantes propriétés d'adhésion aux surfaces plastiques, peuvent conduire à des erreurs d'interprétation. Bien que des seuils critiques de sensibilité et résistance aux antibiotiques ne sont donc pas disponibles pour l'ensemble des espèces de ce chapitre, les résultats des tests de sensibilité ont été reportés en « sensible », « intermédiaire » et « résistant » quand ils avaient été interprétés ainsi par les auteurs des études correspondantes.

Importance

La totalité des BGN-NF représente environ 15% de tous les bacilles à Gram négatif isolés des échantillons cliniques humains. Toutefois, il n'y a pas de données limitées aux genres inclus dans ce chapitre. Aussi, pour illustrer l'importance relative de l'isolement des différents genres et espèces de BGN-NF décrits dans la suite de ce chapitre, nous présentons un bilan de leur identification à partir de l'ensemble des échantillons reçus au laboratoire de bactériologie du Centre Hospitalier Régional Universitaire de Montpellier durant une période de 1,5 an (Tableau 4). Un total de 994 isolats de ces BGN-NF a été identifié durant cette période montrant que les genres les fréquemment identifiés sont *Stenotrophomonas* (56% des isolats), *Achromobacter* (23,5%) et *Alcaligenes* (5,4%) devant les genres *Delftia* (3,1 %), *Ochrobactrum* (1,9%), *Agrobacterium/Rhizobium* (1,6%), *Brevundimonas* (1,3%) et *Sphingomonas* (1%) ; les autres genres représentant moins de 1% des isolats.

Les différents genres de bacilles à coloration de Gram négative non fermentants

La présentation des genres de BGN-NF est proposée ci-après en accord avec la classification taxonomique présentée en tableau 1, à l'exception des genres *Weeksella* et *Bergeyella* présentés de manière regroupée et des genres *Ignatzschineria* et *Wohlfahrtiimonas* dont la présentation fait l'objet d'un seul paragraphe. Les caractéristiques générales, principales et/ou originales des genres inclus dans ce chapitre sont présentées en tableau 2. Les caractères permettant d'orienter l'identification des principaux genres de BGN-NF sont donnés en figure 1 et dans les tableaux 5 et 6.

Ce chapitre ne pouvant être exhaustif, certains genres - dont certains de description récente - pour lesquels très peu d'isolats humains ont été décrits dans la littérature seront présentés de manière très succincte, comme cela est le cas par exemple des genres *Balneatrix* et *Caulobacter*.

Bacteroidetes/Chlorobi group; Bacteroidetes; Flavobacteriia; Flavobacteriales; Flavobacteriaceae

La famille *Flavobacteriaceae* comprend les genres d'intérêt clinique *Chryseobacterium*, *Elizabethkingia*, *Empedobacter*, *Myroides*, *Weeksella* et *Bergeyella*. Ces BGN-NF sont tous immobiles, possèdent oxydase et catalase, sont producteurs d'indole et sont résistants à la colistine. Certaines espèces produisent un pigment jaune vif sur gélose au sang tandis que la capacité de culture sur gélose MacConkey est variable (Tableaux 5 et 6). Les *Flavobacteriaceae* représentent le réservoir bactérien connu le plus important de métallo-β-lactamase de classe B (GOB, BlaB, IND, CGB, ERB-1) (Bellais *et al.*, 2002b).

Le genre *Flavobacterium* est le genre type de l'ordre *Flavobacteriales* et de la famille *Flavobacteriaceae*. Il comprend une grande diversité d'espèces bactériennes dont la plupart a été isolée du sol et de divers environnements aquatiques y compris extrêmes (glaciers d'altitude, sédiments polaires, sources chaudes, boues d'épurations). Il comprend également des pathogènes des poissons aux effets désastreux, l'espèce *Flavobacterium psychrophilum* constituant une des menaces les plus importantes pour l'élevage des salmonidés. Les principales espèces d'intérêt médical appartenant initialement à ce genre bactérien ont toutes été reclassées en 1994 dans les genres *Chryseobacterium* (*C. gleum*, *C. indologenes*), *Elizabethkingia* (*E. meningosepticum*), *Empedobacter* (*E. brevis*) et *Myroides* (*M. odoratus*). Parallèlement, le genre *Bergeyella* a été créé pour reclasser une espèce du genre *Weeksella* (Vandamme *et al.*, 1994). Puis en 1996, le genre *Myroides* a été créé (Vancanneyt *et al.*, 1996).

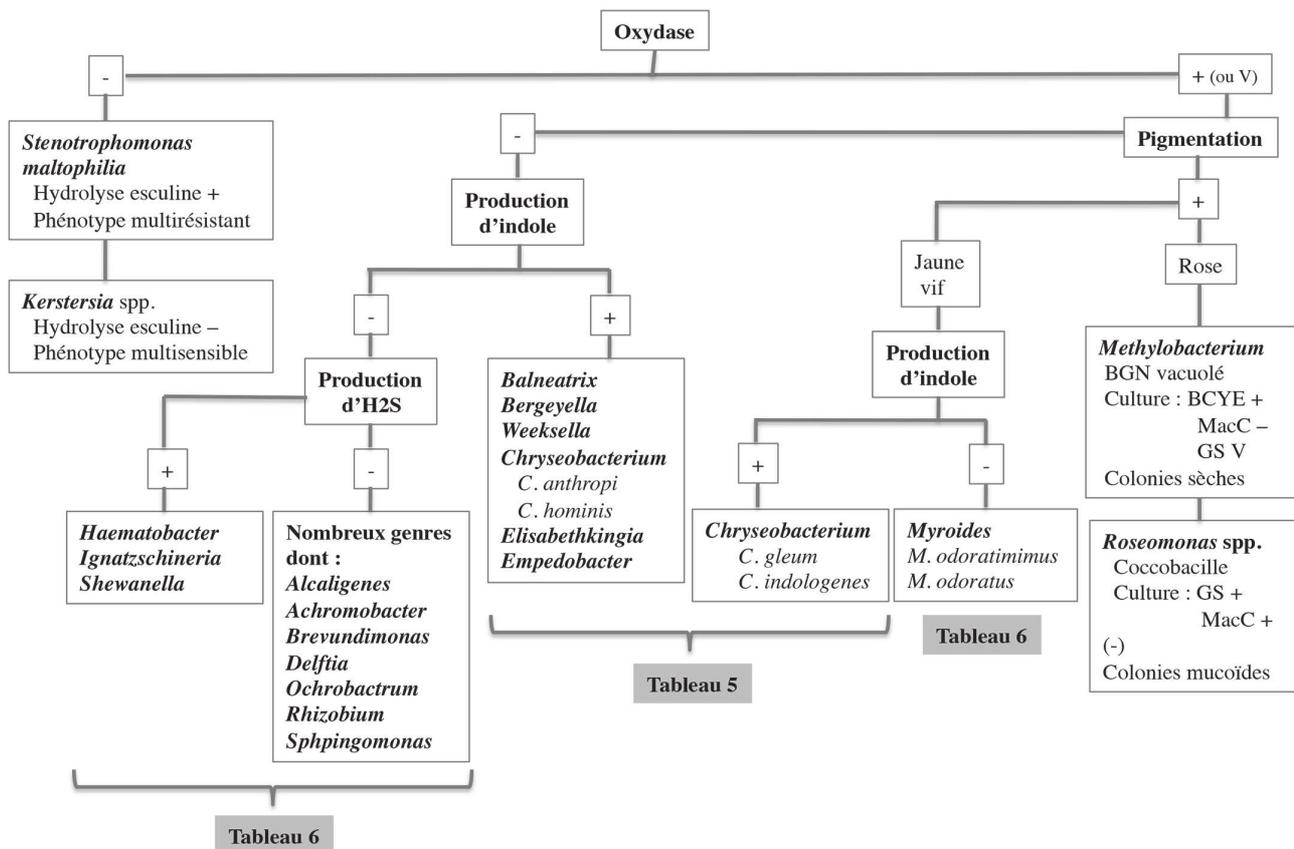
Chryseobacterium

Le genre *Chryseobacterium* a été créé, conjointement aux genres *Bergeyella* et *Empedobacter*, en 1994 lors de la reclassification d'espèces du genre *Flavobacterium* (Vandamme *et al.*, 1994) ; il comprend actuellement une quarantaine d'espèces isolées d'une grande variété d'environnements (sols, eaux, boues, végétaux, produits alimentaires - poisson, viande, lait -, environnement hospitalier, ...). Certaines espèces ont également été isolées d'échantillons biologiques humains bien que leur signification clinique soit rare ; l'espèce *Chryseobacterium indologenes* étant la plus fréquemment identifiée (Vanechoutte *et al.*, 2007). Les infections décrites le sont principalement chez des patients immunodéprimés et/ou présentant des facteurs favorisants et demeurent rares chez les patients immunocompétents (Chen *et al.*, 2013 ; McKew, 2014). Elles incluent des bactériémies et sepsis chez des patients hospitalisés et ayant du matériel implanté, des atteintes du tractus respiratoire : pneumopathies chez des patients ventilés, présentant un lymphome ou hospitalisés en service d'hématologie-oncologie, des infections intra-abdominales dont des péritonites chez des patients dialysés, des méningites post-opératoires et des empyèmes (Lin *et al.*, 2010b ; Chou *et al.*, 2011 ; Afshar *et al.*, 2013 ; Olbrich *et al.*, 2014 ; Wang *et al.*, 2014). Plus rarement, leur présence a été révélée dans des plaies et brûlures, dans un cas d'infection du tractus urinaire et un cas de kératite. Enfin, les espèces de *Chryseobacterium* sont capables de coloniser chroniquement les voies respiratoires des patients atteints de mucoviscidose (Lambiase *et al.*, 2007) ; toutefois, leur rôle dans l'évolution de la pathologie demeure inconnu. Parmi les autres espèces isolées chez l'homme, *Chryseobacterium gleum* a été isolé d'urines et d'expectorations (Lo

Tableau 2. Caractéristiques notables de certains genres de bacilles à coloration de Gram négative non fermentants

Caractéristique	Genre ou espèce présentant la caractéristique
Habitat	
Commensal du tractus uro-génital humain	<i>Oligella</i>
Pouvoir pathogène	
Infections après morsure animale	<i>Bergeyella zoohelcum</i>
Gastro-entérites	<i>Laribacter hongkongensis</i>
Infections associées aux myiases	<i>Ignatzschineria</i> <i>Wohlfahrtiimonas</i>
Type respiratoire aéro-anaérobie facultatif	
	<i>Laribacter hongkongensis</i>
Phénotype	
Pigmentation	
Rose	<i>Methylobacterium</i> <i>Roseomonas</i>
Jaune vif	<i>Chryseobacterium</i> <i>Empedobacter</i> <i>Myroides</i>
Colonies mucoïdes	
	<i>Weeksella</i> <i>Aureimonas</i> <i>Rhizobium pusense</i> <i>Paracoccus yeei</i> <i>Roseomonas</i> <i>Ochrobactrum intermedium</i>
Odeur fruitée	
	<i>Alcaligenes faecalis</i> <i>Myroides</i>
Absence d'oxydase	
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> <i>Kerstesia</i>
Production d'H ₂ S	
	<i>Haematobacter massiliensis</i> <i>Ignatzschineria</i> <i>Shewanella</i>
Résistance aux antibiotiques	
Multirésistance (dont b-lactamines y compris carbapénèmes et aminosides)	
	<i>Chryseobacterium</i> <i>Elisabethkingia</i> <i>Myroides</i> <i>Sphingobacterium multivorum</i> <i>Ochrobactrum</i>
Phénotype caractéristique	
	<i>Achromobacter</i> (sensibilité aux pénicillines, résistance aux céphalosprines)

Figure 1. Caractères généraux orientant l'identification des principaux BGN-NF.



+, caractère positif ; -, caractère négatif ; V : caractère variable ; GS : gélose au sang ; McC : gélose MacConkey.

& Chang, 2014) et a été impliqué dans des cas d'infections respiratoires néonatales (Virok *et al.*, 2014) et très récemment dans un cas de pyonéphrose (Garg *et al.*, 2015). Des isolats affiliés aux espèces *Chryseobacterium anthropi* (Kämpfer *et al.*, 2009), *Chryseobacterium hominis* (Vanechoutte *et al.*, 2007), *Chryseobacterium treverense* (bactériémie chez un patient apparemment sain) (Yassin *et al.*, 2010), *Chryseobacterium joostei* et *Chryseobacterium oranimense* (patients atteints de mucoviscidose) (Fernández-Olmos *et al.*, 2012 ; Sharma *et al.*, 2015) sont également décrits.

Les facteurs de virulence de ces microorganismes demeurent peu connus. La capacité à former du biofilm a été démontrée pour 38% des isolats de *C. indologenes* dans l'étude de Chang et collaborateurs (Chang *et al.*, 2014a) et pour 40% des isolats de *C. gleum* dans l'étude de Lo & Chang (Lo & Chang, 2014). Ce pourcentage est plus important pour les isolats invasifs, 80% des isolats invasifs de *C. indologenes* ayant la capacité de former du biofilm (Chang *et al.*, 2014a). Des taux de mortalité variables sont décrits, notamment en cas de bactériémies (6,25%, 40% ou 64% selon l'étude) versus 35% pour les cas de pneumopathies (Lin *et al.*, 2010b ; Chou *et al.*, 2011 ; Chen *et al.*, 2013). La mortalité est corrélée à l'administration d'antibiotiques actifs dans l'étude de Chen *et al.* tandis qu'aucune relation évidente entre le profil de sensibilité aux antibiotiques de la souche isolée et la réponse au traitement n'a été mise en évidence dans l'étude de Lin questionnant sur la réelle pathogénicité de ces souches (Lin *et al.*, 2010b ; Chen *et al.*, 2013)

Le genre *Chryseobacterium* comprend des BGN-NF aérobies stricts, immobiles, non sporulés. Les colonies des deux espèces les plus fréquemment isolées chez l'homme sont pigmentées en jaune vif par production d'un pigment de type flexirubine et la culture peut dégager une odeur aromatique soutenue. Ces bactéries possèdent catalase, oxydase et DNase, produisent de l'indole, les autres caractères sont présentés en tableau 5.

L'identification des espèces de *Chryseobacterium* par les méthodes biochimiques n'est pas fiable, les bases de données n'incluant le plus généralement que *C. indologenes*. Les performances de la technique MALDI-TOF sont variables selon l'étude considérée. De manière générale, l'identification de *C. indologenes* paraît fiable mais l'utilité de la technique est limitée pour l'identification des autres espèces du genre (Homem de Mello de Souza *et al.*, 2014). Par exemple, tous les isolats de *C. gleum* dans l'étude de Lo & Chang ont été incorrectement identifiés (majoritairement comme *C. indologenes* ou *Elizabethkingia meningoseptica*) par méthode biochimique (carte Vitek 2 GN). L'utilisation de la spectrométrie de masse MALDI-TOF a permis d'obtenir un score correspondant à une probable identification de l'espèce pour la majorité des isolats (87%) et seuls les 13% restants étaient identifiés de manière fiable au niveau de l'espèce (Lo & Chang, 2014).

Lors de plusieurs études, l'électrophorèse en champ pulsé a été utilisée avec succès pour le typage de souches des espèces *C. indologenes* et *C. gleum* (Lambiase *et al.*, 2007 ; Lo & Chang, 2014 ; Chang *et al.*, 2014a) révélant une diversité génomique

BACILLES À GRAM NÉGATIF NON FERMENTANTS DIVERS

Tableau 3. Représentation des genres et espèces de bacilles à Gram négatif non fermentants isolés chez l'homme et abordés dans ce chapitre dans les bases de données des spectromètres de masse

Genre (nombre total d'espèces dans les bases MBT / Vitek si >1)	Espèce isolée chez l'homme et présente dans ≥ 1 base de données	Présence dans la base de données		Espèce isolée chez l'homme absente des 2 bases de données
		MALDI Biotyper® DB-5627 MSP list (Bruker Daltonics)	Vitek® MS V2.0 (bioMérieux)	
Achromobacter (6/2)	<i>A. denitrificans</i>	1		<i>A. xylosoxidans</i> <i>A. denitrificans</i> * <i>A. xylosoxidans</i> <i>A. denitrificans</i> *
	<i>A. insolitus</i>	1	0	
	<i>A. piechaudii</i>	1	0	
	<i>A. ruhlandii</i>	1	0	
	<i>A. spanius</i>	1	0	
Acidovorax (6/0)	<i>A. avenae</i>	1	0	<i>A. oryzae</i> , <i>A. wautersii</i>
	<i>A. delafieldii</i>	1	0	
	<i>A. temperans</i>	1	0	
Alcaligenes	<i>A. faecalis</i>	1	1	
Alishewanella	<i>A. fetalis</i>	1	0	
Aureimonas	<i>A. altamirensis</i>	1	0	
Balneatrix	<i>B. alpica</i>	1	0	
Bergeyella	<i>B. zoohelcum</i>	1	1	
Brevundimonas (6/2)	<i>B. diminuta</i>	1	1	<i>B. vancouverii</i>
	<i>B. nasdae</i>	1	0	
	<i>B. vesicularis</i>	1	1	
Caulobacter	<i>Caulobacter</i> sp.	1	0	
Chryseobacterium (6/2)	<i>C. gleum</i>	1	1	<i>C. anthropi</i> , <i>C. treverense</i>
	<i>C. indologenes</i>	1	1	
	<i>C. hominis</i>	1	0	
	<i>C. joostei</i>	1	0	
	<i>C. oranimense</i>	1	0	
Comamonas (5/1)	<i>C. aquatica</i>	1	0	
	<i>C. kerstersii</i>	1	0	
	<i>C. testosteroni</i>	1	1	
Delftia	<i>D. acidovorans</i>	1	1	<i>D. lacustris</i> , <i>D. tsuruhatensis</i>
Dyella		0	0	<i>D. japonica</i>
Elizabethkingia (2/1)	<i>E. meningospetica</i>	1	1	<i>E. anophelis</i>
	<i>E. miricola</i>	1	0	
Empedobacter (2/1)	<i>E. brevis</i>	1	1	
	<i>E. falsenii</i>	1 (<i>W. falsenii</i>)	0	
Haematobacter		0	0	<i>H. massiliensis</i> (<i>H. missouriensis</i> / BGN fermentant)
Herbaspirillum (10/0)	<i>H. seropedicae</i>	1	0	
	<i>H. aquaticum</i>	1	0	
	<i>H. huttiense</i>	1	0	
	<i>H. frisingense</i>	1	0	
Ignatzschineria		0	0	<i>I. larvae</i>
Kerstersia	<i>K. gyiorum</i>	1	0	<i>K. similis</i>
Laribacter	<i>L. hongkongensis</i>	1	0	
Massilia	<i>M. timonae</i>	1	0	<i>M. consociata</i> , <i>M. oculi</i>
Methylobacterium (8/5)	<i>M. extorquens</i>	1	0	<i>M. aminovorans</i> , <i>M. lusitanum</i> , <i>M. podarium</i> , <i>M. thiocyanatum</i>
	<i>M. fujiisawaense</i>	1	1	
	<i>M. mesophilicum</i>	1	1	
	<i>M. radiotolerans</i>	1	1	
	<i>M. zatmanii</i>	1	0	
Myroides (2/1)	<i>Myroides</i> spp.	0	1	<i>M. injenensis</i> , <i>M. phaeus</i>
	<i>M. odoratimimus</i>	1	0	
	<i>M. odoratus</i>	1	0	
Ochrobactrum (5/1)	<i>O. anthropi</i>	1	1	<i>O. haematophilum</i> , <i>O. pseudintermedium</i> , <i>pseudogrignonense</i>
	<i>O. intermedium</i>	1	0	
Oligella (2/2)	<i>O. ureolytica</i>	1	1	
<i>O. urethralis</i>	1	1		
Paracoccus (3/1)	<i>P. yeii</i>	1	1	<i>P. sanguinis</i>
Pseudochrobactrum	<i>P. asaccharolyticum</i>	1	0	
Psychrobacter (1/1)	<i>P. phenylpyruvicus</i>	0	1	<i>P. arenosus</i> , <i>P. cibarius</i> , <i>P. faecalis</i> , <i>P. immobilis</i> , <i>nivimaris</i> , <i>P. pulmonis</i> , <i>P. sanguinis</i>
Rhizobium (3/1)	<i>R. radiobacter</i>	1	1	<i>R. larrymoorei</i> , <i>R. pusense</i> , <i>R. vitis</i>
Roseomonas	<i>R. mucosa</i>	1	0	<i>R. aestuarii</i> , <i>R. cervicalis</i> , <i>R. gilardii</i> , <i>R. ludipueritiae</i> , <i>rosea</i>
Shewanella (6/2)	<i>S. algae</i>	1	1	
	<i>S. putrefaciens</i>	1	1	
Sphingobacterium (5 / 3)	<i>S. multivorum</i>	1	1	<i>S. daejeonense</i>
	<i>S. spiritivorum</i>	1	1	
	<i>S. thalophilum</i>	1	1	
Sphingomonas (28/8)	<i>S. parapaucimobilis</i>	1	1	
	<i>S. paucimobilis</i>	1	1	
	<i>S. mucosissima</i>	1	0	
	<i>S. koreensis</i>	1	0	
Stenotrophomonas	<i>S. maltophilia</i>	1	1	
Weeksella	<i>W. virosa</i>	1	1	
Wohlfahrtiimonas	<i>W. chitiniclastic</i>	1	0	

* Le groupe d'espèces est affiché comme un résultat à faible discrimination. Un choix devrait être fait entre les espèces proposées.

Tableau 4. Bacilles à coloration de Gram négative non fermentants identifiés au laboratoire de Bactériologie du CHRU de Montpellier durant 1,5 an*

Espèce bactérienne	Nombre d'isolats / nombre de patients	Origine des isolats d'isolats/nombre de patients si > 1	(nombre
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> 560/281		Tractus respiratoire (317/142) dont 187/99 (non mucoviscidose) , 130/43 (mucoviscidose) et 42 prélèvements respiratoires protégés (42/26 non mucoviscidose) Peau et tissus mous (85/56) (plaies, ulcères, mal perforant plantaire, brûlures, ...) Hémodcultures : 41/18 dont 50% prélevées sur cathéters; cathéters (7/7) Selles : 44/37 dont 33/28 recherche de portage de BMR Urines : 28/23 Autres : échantillons ophtalmologiques (9/6), intra-abdominal (7/5), sinus (5/5), écouvillonnage vaginal (5/5), ...	
<i>Stenotrophomonas</i> sp.	2/2	Liquide péritonéal, échantillon d'origine ostéo-articulaire	
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	220/65	Tractus respiratoire (185/41) dont 159/24 (mucoviscidose) , 26/17 (non mucoviscidose) et 4 prélèvements respiratoires protégés (4/3) Peau et tissus mous (20/13) (plaies, ulcères, ...) Autres : Oreille (5/5), Urines (4/4), hémodcultures (2/2), orifice de drain (2/1), intra-abdominal (1/1) et liquide gastrique (1/1)	
<i>Achromobacter</i> sp.	11 / 8	Expectoration (mucoviscidose) (8/6) , plaie orteil (2/1), hémodculture sur voie veineuse centrale (1/1)	
<i>Achromobacter insolitus</i>	2 / 2	Ulcère de la malléole et aspiration trachéale	
<i>Achromobacter denitrificans</i>	1	Expectoration (mucoviscidose)	
<i>Alcaligenes faecalis</i>	54 / 33	42 peau et tissus mous (22 patients) (plaie, ulcères, kystes, mal perforant plantaire, cicatrice, autres), 7 respiratoires (6) dont 3 LBA et 1 expectoration (mucoviscidose), 3 urines (3), 1 hémodculture (1), 1 oreille (conduit auditif externe) (1)	
<i>Delftia acidovorans</i>	31 / 14	Tractus respiratoire (24/7) dont échantillons respiratoires protégés (7/4); cathéter (3/1); hémodcultures (3/1); ORL (gorge) (1/1)	
<i>Ochrobactrum intermedium</i>	11/4	Biopsie tissulaire (nécrosectomie, pied) (5/1), plaie du bras (3/1), écouvillonnage rectal (dépistage du portage de BMR) (2/1), ongle (1)	
<i>Ochrobactrum</i> spp.	7/7	Tractus respiratoire (6/6 mucoviscidose) , urines (1)	
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	1	Kyste	
<i>Rhizobium radiobacter</i>	16/15	Tractus respiratoire (6/5 mucoviscidose) , hémodcultures (3/3 dont 1 sur cathéter) , plaies (3/3) , ophtalmologie (2/2 dont 1 cornée), portage rectal de BMR (2/2)	
<i>Brevundimonas diminuta</i>	12 / 11	Peau et tissus mous (6/5) , tractus génital (2 / 2, prélèvement vaginaux), respiratoire (1/1, mucoviscidose, néonatalogie SI), digestif (1/1, liquide de dialyse péritonéale), bucco-dentaire (1/1) et hémodculture (1/1)	
<i>Brevundimonas</i> sp.	1	Hémodculture	
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	7/6	Expectoration (mucoviscidose) (4/4) , hémodcultures (3/2)	
<i>Sphingomonas parapaucimobilis</i>	1	Expectoration (mucoviscidose)	
<i>Sphingomonas</i> sp.	2/2	Expectoration (mucoviscidose), plaie du cou	
<i>Paracoccus yeei</i>	8/7	Hémodculture (4/4) , ORL (2/1), méat urinaire (1), cornée (1)	
<i>Chryseobacterium indologenes</i>	5 / 5	Expectoration (mucoviscidose)	
<i>Chryseobacterium gleum</i>	1	Lentille cornéenne	
<i>Chryseobacterium</i> sp.	1	Expectoration (mucoviscidose)	
<i>Oligella urethralis</i>	5 / 5	Tractus urogénital (5/5) : urines (3/3), écouvillonnage vaginal (1), liquide gastrique nouveau-né (1)	
<i>Oligella</i> sp.	2	Urines et conduit auditif externe	
<i>Myroides odoratimimus</i>	4/4	Peau et tissus mous (4 / 4) : ulcère de jambe, plaie (pied et orteil), mal perforant plantaire	
<i>Myroides odoratus</i>	2/2	Ulcère et mal perforant plantaire	
<i>Comamonas</i> sp.	4 / 4	ORL (3/3) : parotide (1), gorge (2/2); sperme (1)	
<i>Comamonas kerstersii</i>	1	Abcès polymicrobien (chirurgie digestive)	
<i>Comamonas aquatica</i>	1	Ecouvillonnage rectal (dépistage portage BMR)	
<i>Roseomonas mucosa</i>	3/3	Hémodcultures (2/2 dont 1 sur voie veineuse centrale) , chambre implantable (1)	
<i>Roseomonas aestuarii</i>	1	Expectoration (mucoviscidose)	
<i>Roseomonas</i> sp.	1	Hémodculture	
<i>Shewanella putrefaciens</i>	4/2	Plaie (3/1), abcès (1)	
<i>Sphingobacterium thalophilum</i>	2/1	Fragment de tissu musculaire (muscle gastrocnémien)	
<i>Sphingobacterium multivorum</i>	1	Expectoration	
<i>Sphingobacterium daejeonense</i>	1	Hémodculture	
<i>Elizabethkingia miricola</i>	2	Tractus respiratoire : expectoration (mucoviscidose), aspiration bronchique (réanimation)	
<i>Elizabethkingia meningoseptica</i>	1	Liquide de lavage broncho-alvéolaire (réanimation)	
<i>Bergeyella zoohelcum</i>	1	Plaie par morsure de chat	
<i>Massilia timonae</i>	1	Ecouvillonnage rectal (dépistage portage BMR)	
<i>Psychrobacter</i> sp.	1	Hémodculture	
<i>Weeksella virosa</i>	1	Ecouvillonnage vaginal	
<i>Wohlfahrtiimonas chitiniclastica</i>	1	Escarre du talon	

* Seuls les BGN-NF traités dans ce chapitre et identifiés au cours de la période de ce bilan (01/01/2014-30/06/2015) sont présentés, et ce par ordre décroissant du nombre d'isolats identifiés dans un genre bactérien. Certaines caractéristiques associées à quelques isolats sont présentées (mucoviscidose, réanimation, ...).

A l'exception de rares identifications réalisées par séquençage de l'ADNr 16S ou de galerie API 20 NE, les identifications présentées dans ce tableau ont été obtenues en utilisant le spectromètre de masse MALDI-TOF Microflex™ (Bruker Daltonics).

LBA : liquide de lavage broncho-alvéolaire, BMR : bactéries multirésistantes.

Tableau 5. Représentation des genres et espèces de bacilles à Gram négatif non fermentants isolés chez l'homme et abordés dans ce chapitre dans les bases de données des spectromètres de masse

	Mobilité	b-hémolyse	Pigmentation jaune vif	Culture sur MacConkey	Culture à 42 °C	Utilisation du glucose par voie oxydative	Hydrolyse de l'esculine	Gélatinase	Urécase	Réduction des nitrates	ONPG	Sensibilité à la colistine
<i>Balneatrix alpica</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
<i>Bergeyella zoohelcum</i>	-	-	-	-	-	**	-	+	+	-	-	-
<i>Weeksella virosa</i>	-	-	-	-	-	**	-	+	-	-	-	+
<i>Chryseobacterium anthropi</i>	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
<i>Chryseobacterium gleum</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	(+)	(+)	-	-
<i>Chryseobacterium hominis</i>	-	-	-	-	-	+	+	+	-	(+)	-	(-)
<i>Chryseobacterium indologenes</i>	-	+	(+)	(+)	-	+	+	+	-	(-)	-	-
<i>Elizabethkingia meningoseptica</i>	-	-	-	(+)	V	+	+	-	*	-	+	-
<i>Empedobacter brevis</i>	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-
<i>Empedobacter falsenii</i>	-	-	-	+	-	+	V	V	+	-	(-)	-

* *Elizabethkingia miricola* possède une urécase (Kim *et al.*, 2005).

** aglucidolytique (mannitol, xylose, L-arabinose, maltose, sucrose non métabolisés par voie oxydative).

+, caractère présenté par toutes les souches; (+), caractère présenté par plus de deux tiers des souches; V, caractère présenté par environ la moitié des souches; (-), caractère présenté par moins d'un tiers des souches; -, caractère non présenté par toutes les souches.

Les deux espèces du genre *Chryseobacterium* les plus fréquemment isolées chez l'homme sont notées en gras.

Les cases grisées indiquent les caractères utiles pour différencier deux espèces proches d'un même genre ou de genres différents.

ONPG, Ortho-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside ou β-galactosidase.

chez ces espèces. Contrairement à *E. meningoseptica*, aucune épidémie à *Chryseobacterium* spp. n'a, à ce jour, été décrite.

Chryseobacterium spp. présentent une multirésistance naturelle à divers antibiotiques dont les β-lactamines, les aminosides et la colistine, attribuée à la production de divers enzymes incluant une métallo-β-lactamase chromosomique de classe B (IND-1 à IND-4 pour *C. indologenes* et CGB-1 pour *C. gleum*) mais aussi une β-lactamase à spectre étendu de classe A (CIA-1 pour *C. indologenes* et CGA-1 pour *C. gleum*) (Bellais *et al.*, 2000 ; Bellais *et al.*, 2002a ; Matsumoto *et al.*, 2012).

Des taux variables de sensibilité sont décrits selon l'étude et l'espèce considérée compliquant le choix d'une thérapeutique appropriée mais de manière générale, le triméthoprime-sulfaméthoxazole semble constituer la meilleure solution thérapeutique (Lin *et al.*, 2010b).

Pour *C. indologenes*, les pourcentages de sensibilité observés sont les suivants : 95% pour gatifloxacine et garénofloxacine, 62,5-100% pour la lévofloxacine, 44-85% pour la ciprofloxacine, 75-95% pour le triméthoprime-sulfaméthoxazole, 85% pour la pipéracilline, la rifampicine et la ceftazidime, 12,5-85% pour le céfépime, 50-90% pour la pipéracilline-tazobactam et 0-35% pour la ceftriaxone (Lin *et al.*, 2010b ; Kirby *et al.*, 2004 ; Chang *et al.*, 2014a). Des pourcentages de sensibilité compris entre 0 et 15% sont observés dans ces mêmes études pour la ticarcilline-acide clavulanique, le chloramphénicol, la gentamicine, la tobramycine, l'amikacine, l'imipénème et le méropénème.

Une sensibilité paradoxale aux antibiotiques actifs contre les bactéries à Gram positif a été évoquée ; celle-ci n'est pas

confirmée, linézolide et glycopeptides présentant de 0 à 5% de sensibilité dans l'étude de Kirby et collaborateurs (Kirby *et al.*, 2004).

Toutefois, des isolats présentant une résistance plus importante sont décrits comme un isolat de *C. indologenes* uniquement sensible au triméthoprime-sulfaméthoxazole et de sensibilité intermédiaire à la ciprofloxacine (McKew, 2014). De plus, le niveau de résistance semble être en augmentation, notamment à la pipéracilline-tazobactam, à la ceftazidime, au céfépime, et aux fluoroquinolones (Chen *et al.*, 2013).

Pour *C. gleum*, les isolats décrits par Lo & Chang étaient seulement sensibles à la minocycline (100% des isolats) et au triméthoprime-sulfaméthoxazole (93%) (Lo & Chang, 2014).

Du fait de leur phénotype multirésistant, la sélection de ces microorganismes par l'augmentation de la pression antibiotique dans les établissements de santé et/ou des antibiothérapies préalables, notamment à large spectre, chez les patients a été suggérée (Chou *et al.*, 2011 ; Chen *et al.*, 2013). Chen et collaborateurs étudiant une série de 215 isolats ont ainsi pu corréliser le nombre de patients présentant une pneumopathie ou une bactériémie à *C. indologenes* à des consommations accrues de colistine ou de tigécycline (Chen *et al.*, 2013).

Elizabethkingia

Le genre a été créé en 2005 pour reclasser des bactéries du genre *Chryseobacterium* (Kim *et al.*, 2005). Il comprend quatre espèces présentes dans l'environnement dont trois ont été isolées chez l'homme : *Elizabethkingia anophelis*, récemment décrite à partir de l'intestin des moustiques, est un pathogène décrit dans

Tableau 6. Caractères orientant l'identification des principaux BGN-NF non pigmentés en rose, possédant une oxydase et non producteurs d'indole

	Mobilité	Pigmentation jaune vif	Culture sur MacConkey	Utilisation du glucose par voie oxydative	Production d'H ₂ S	Hydrolyse esculine	Gélatinase	Uréase	Réduction des nitrates	β-galactosidase	Sensibilité à la colistine
<i>Alcaligenes faecalis</i>	+	-	+	V	-	-	-	-	V	-	+
<i>Achromobacter</i> spp.	+	-	+	V	-	-	-	-	V	-	+
<i>Acidovorax delafieldii</i> / <i>temperans</i>	+	-	+	-	-	-	(-)/(+)	Variable	+	-	+
<i>Alishewanella fetalis</i>	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+
<i>Brevundimonas vesicularis</i> / <i>diminuta</i>	+	(-)/(+)	(-)/(+)	(+/-)	-	(+)/(+)	-	-	(-)	-	-
<i>Comamonas testosteroni</i>	+	-	+		-	-	-	+	-	+	+
<i>Delftia acidovorans</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+
<i>Dyella japonica</i>	+	+		+	-	- ou f	- ou f	-	+	- ou f	
<i>Haematobacter massiliensis</i>	-	-	(+)	-*	+	-	-	+	-	-	
<i>Herbaspirillum</i>	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-
<i>Ignatzschineria</i> et <i>Wohlfahrtiimonas</i>	-	-	+	+	+/-	-	-	+/-	-	+	+
<i>Kerstersia gyiorum</i> / <i>similis</i>	(+)/(+)	-	+	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Laribacter hongkongensis</i>	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	
<i>Massilia timonae</i>	+*	-	+	-	-	+	+	-			+
<i>Myroides odoratimimus</i>	-	+	+	-*	-	-	+	+	-	-	-
<i>Myroides odoratus</i>	-	+	(+)	-*	-	-	+	+	-	-	-
<i>Ochrobactrum anthropi</i> / <i>intermedium</i>	+	-	+	+	-	(-)	-	+/-	(+)	-	+/-
<i>Oligella ureolytica</i>	(+)	-	-	-*	-	-	-	+	+	-	
<i>Oligella urethralis</i>	-	-	V	-*	-	-	-	+	-	-	
<i>Paracoccus yeei</i>	-	-	+	+	-	-	-	+	+		
<i>Psychrobacter faecalis</i>	-	-	+	+	-		-	-	+		+
<i>Psychrobacter immobilis</i>	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+
<i>Psychrobacter phenylpyruvicus</i>	-	-	+	0	-		-	+	(-)		+
<i>Psychrobacter pulmonis</i>	-	-	(-)	0	-		-	-	+		+
<i>Rhizobium pusense</i>	+	-	+	+	-	+	-	(+)	(+)	+	(+)
<i>Shewanella algae</i>	+	-	+	-**	+	-	+	-	+	-	(+)
<i>Shewanella putrefaciens</i>	+	-	+	V	+	-	+	-	+	-	(+)
<i>Sphingobacterium multivorum</i>	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-
<i>Sphingobacterium spiritivorum</i>	-	-	V	+	-	+	-	+	-	(+)	-
<i>Sphingobacterium thalophilum</i>	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	f	+	-	+	-	+	-	-	(-)	(+)	(-)
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+

* caractéristique observée pour des cultures jeunes; ** mannitol et xylose ne sont pas métabolisés par voie oxydative.

+, caractère présenté par toutes les souches; (+), caractère présenté par plus de deux tiers des souches; V, caractère présenté par environ la moitié des souches; (-), caractère présenté par moins d'un tiers des souches; -, caractère non présenté par toutes les souches; f : réaction faiblement positive.

Les trois espèces les plus fréquemment isolées chez l'homme sont notées en gras.

Les cases gris clair indiquent les caractères utiles pour différencier deux espèces proches d'un même genre ou de genres différents.

Les cases gris foncé indiquent des caractéristiques non rapportées ou discordantes selon la source consultée.

ONPG, Ortho-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside ou β-galactosidase.

des cas de méningite néonatale et des épidémies d'infections associées aux soins (Lau *et al.*, 2015) ; *Elizabethkingia miricola*, initialement découverte dans de l'eau de condensation de la station Mir, a été impliquée dans un cas de sepsis (Green *et al.*, 2008) et *Elizabethkingia meningoseptica* (anciennement *Chryseobacterium meningosepticum* (Jean *et al.*, 2014), nommée ainsi du fait de son implication à la fois dans des cas de méningite et de sepsis qui est l'espèce la plus isolée en pratique clinique.

De manière plus large, *E. meningoseptica* est un pathogène opportuniste causant des méningites chez les prématurés et les nouveau-nés, des pneumopathies, des bactériémies post-opératoires et des méningites chez l'adulte, généralement chez des patients présentant des pathologies sous-jacentes sévères (Lin *et al.*, 2004). De manière plus rare, sont décrits des cas d'endocardite, de kératite, d'endophtalmie, de cellulite, des infections de plaie ou de brûlure, des infections du site opératoire, des périto-

nites chez des patients dialysés et des abcès intra-abdominaux. La plupart des infections survenant chez l'adulte est associée aux soins et survient chez des patients immunocompromis ; les facteurs prédisposants sont cancers, neutropénie, diabète, dénutrition, dialyse, corticothérapie et présence d'une voie veineuse centrale (Ghafur *et al.*, 2013). La multirésistance aux antibiotiques d'*E. meningoseptica* et sa capacité d'adaptation à divers environnements en font un pathogène responsable d'infections associées aux soins. Elle est considérée comme un pathogène émergent, l'incidence des bactériémies due à cette bactérie ayant augmenté durant la dernière décennie (Hsu *et al.*, 2011). Les patients à haut risque d'infection sont les prématurés, les patients immunodéprimés et ceux particulièrement exposés aux antibiotiques dans les services de soins intensifs. Enfin, la sévérité des infections engendrées est importante, un taux de mortalité pouvant atteindre 57% ou la survenue de séquelles post-infec-

ieuses importantes (hydrocéphalie, surdité, retard de développement) sont rapportés en cas de méningite néonatale (Kirby *et al.*, 2004). Pour les bactériémies, le taux de mortalité à 14 jours a été estimé à 23% dans l'étude de Hsu et collaborateurs (Hsu *et al.*, 2011). Les facteurs significativement associés à la survenue du décès sont les suivants : avoir développé la bactériémie dans une unité de soins intensifs, la présence d'un cathéter à demeure, le fait que la souche impliquée produise du biofilm et avoir reçu un traitement approprié uniquement après réception des résultats microbiologiques (Hsu *et al.*, 2011). *E. meningoseptica* a été isolée de robinets et lavabos, de solutions antiseptiques, de respirateurs, de biberons, de seringues conservées dans une glaciere, de solutions de rinçage pour cathéters et de collyre au nitrate d'argent utilisé pour nettoyer les yeux des nouveau-nés (Wang *et al.*, 2009 ; Jiang *et al.*, 2012 ; Jean *et al.*, 2014). Toutefois, la source des infections n'a pas été identifiée dans la plupart des épidémies décrites en milieu hospitalier.

Bien que sérotypage et ribotypage ont été utilisés pour caractériser des isolats d'*E. meningoseptica* (Quilici & Bizet, 1996), les études épidémiologiques les plus récemment conduites ont utilisé l'électrophorèse en champ pulsé, notamment après macrorestriction de l'ADN par l'endonucléase *XhoI* (Kirby *et al.*, 2004 ; Chang *et al.*, 2014b).

Ce sont des bacilles à Gram négatif immobiles et non sporulés. La culture est obtenue sur gélose Trypticase-Soja ou gélose au sang. La capacité à cultiver sur gélose MacConkey est variable selon la souche. Les colonies obtenues sont blanc-jaunâtre. Catalase, oxydase et b-galactosidase (test Ortho-nitrophenyl-à-D-galactopyranoside (ONPG) positif) sont détectées. La bactérie hydrolyse la gélatine et l'esculine, produit de l'indole et ne produit pas d'H₂S. Leur identification peut poser problème, 85% des isolats n'ayant pas été identifiés de manière satisfaisante par la carte Vitek 2 GN (bioMérieux) dans l'étude de Chang et collaborateurs (Chang *et al.*, 2014b).

La bactérie possède trois gène *bla* codant pour une à-lactamase à spectre étendu de type CME (classe D) et deux métallo-b-lactamases indépendantes, BlaB et GOB (González *et al.*, 2012). Il s'agit d'ailleurs de la seule espèce bactérienne connue à ce jour qui produit deux métallo-b-lactamase chromosomiques (González *et al.*, 2012). Ceci rend compte de l'antibiotype particulier de l'espèce, *E. meningoseptica* est résistante aux antibiotiques utilisés pour traiter une infection à bacille à Gram négatif dont les céphalosporines de troisième génération (ceftazidime, ceftriaxone), les carbapénèmes (imipenème, m ropen me) et les aminosides (amikacine, tobramycine, gentamicine), ainsi qu'à la ticarcilline-acide clavulanique, à la colistine et au chloramphénicol (0 à <10% de sensibilité).   l'inverse, elle est généralement sensible à la minocycline, la gatifloxacine et la gar nofloxacine tandis que des sensibilités variables sont observées pour la lévofloxacine (96%), la rifampicine (87,5%), le triméthoprime-sulfaméthoxazole (74-80 % selon l'étude), la pipéracilline seule (62%) ou associée au tazobactam (71%), la ciprofloxacine (71 ou 36% selon l'étude) et le céfépime (5 ou 38% selon l'étude) (Kirby *et al.*, 2004 ; Hsu *et al.*, 2011 ; Chang *et al.*, 2014b ; Jean *et al.*, 2014).

Empedobacter

Le genre décrit en 1994 (Vandamme *et al.*, 1994) comprend deux espèces validement publiées, *Empedobacter brevis* (anciennement *Flavobacterium breve*) et *Empedobacter falsenii*

(anciennement *Wautersiella falsenii*, sa reclassification faisant qu'il n'y a, à ce jour, plus d'espèce validement publiée dans le genre *Wautersiella*) (Zhang *et al.*, 2014). Largement distribuées dans le sol et l'eau, les bactéries du genre *Empedobacter* ont également été identifiées dans les plantes, la viande crue et l'environnement hospitalier ; ce sont également des parasites de protistes. Des infections chez les animaux (méningite chez un chien, lésions cutanées chez des poissons) sont décrites.

Chez l'homme, *E. brevis* a été impliqué dans une épidémie d'endophtalmies faisant suite à des opérations de cataracte (Jankecht *et al.*, 2002), dans un cas de bactériémie (Raman *et al.*, 2012) et dans un cas de purpura anaphylactoide (Nishio, 2010). Des isolats de sécrétions bronchiques, d'écouvillonnage rectal et d'urines sont aussi rapportés.

L'espèce *E. falsenii*, comprenant deux g nomovars, a été décrite en 2006. Elle a été identifiée dans divers échantillons biologiques chez l'homme : sang, plaies, abcès cervical, pus, sécrétions du tractus respiratoire, écoulement auriculaire, écouvillonnage vaginal et liquide pleural (Kämpfer *et al.*, 2006b ; Traglia *et al.*, 2015). En 2012, le premier isolat urinaire est décrit chez un enfant présentant une pyélonéphrite (van der Velden *et al.*, 2012).

Les bactéries du genre *Empedobacter* sont phénotypiquement proches de celles du genre *Chryseobacterium*, ce sont des bacilles à Gram négatif courts, immobiles, aérobie stricts. *E. brevis*, ainsi que certaines souches d'*E. falsenii*, forment des colonies jaunes claires sur milieu gélosé. Pour *E. brevis*, le pigment est de type flexirubine alors qu'il ne l'est pas pour *E. falsenii*. La culture est obtenue à 30  C mais est décrite comme variable selon la souche à 37  C pour *E. brevis*. Elles cultivent sur gélose MacConkey. Elles possèdent une oxydase, une catalase, réduisent l'indole mais pas les nitrates. *E. falsenii* possède une uréase à la différence de *E. brevis* (Tableau 5). L'identification par méthodes biochimiques est incertaine et, à l'inverse, d'autres espèces peuvent faussement être identifiées comme *E. brevis*, comme cela a été décrit pour une souche de *Burkholderia gladioli* isolée de divers échantillons chez un patient atteint de mucoviscidose transplanté pulmonaire (Brizendine *et al.*, 2012). La spectrométrie de masse MALDI-TOF permet, quant à elle, une identification fiable d'*E. falsenii* (van der Velden *et al.*, 2012 ; Traglia *et al.*, 2015).

La souche d'*E. falsenii* Wf282 dont le génome a été totalement séquencé est résistante à l'ampicilline, à l'ampicilline-sulbactam, à la céfalotine, au m ropen me et à la colistine ; présente une sensibilité intermédiaire à la pipéracilline-tazobactam, au céfotaxime, à la ceftazidime, à l'imipenème et à la ciprofloxacine ; est sensible au céfépime, à l'amikacine, la gentamicine et au triméthoprime-sulfaméthoxazole (Traglia *et al.*, 2015 ; Belais *et al.*, 2002b). Le phénotype de résistance d'*E. brevis* est peu décrit mais les données obtenues pour quelques isolats suggèrent que cette espèce serait moins résistante aux b-lactamines que les autres *Flavobacteriaceae*. La souche type est sensible à l'ampicilline, au céfuroxime, à la kanamycine et au triméthoprime-sulfaméthoxazole. Ce phénotype de résistance est toutefois variable dans l'espèce puisqu'un autre isolat est de sensibilité intermédiaire ou résiste aux amino- et ur ido-penicillines et aux céphalosporines à spectre étroit (céfalotine, céfuroxime), est sensible aux céphalosporines à large spectre (céfépime, c fpirome) et résistant au m ropen me. Des concentrations minimales inhibitrices similaires sont observées en présence d'acide

clavulanique. Ce profil est attribué à la métallo- β -lactamase de classe B, ERB-1, seule β -lactamase identifiée chez *E. brevis* (Bellais *et al.*, 2002b).

Myroides

Le genre *Myroides* comprend des espèces saprophytes dont deux sont d'intérêt médical, *Myroides odoratus* (anciennement *Flavobacterium odoratum*) et *Myroides odoratimimus*. Toutefois, deux autres espèces ont été isolées d'échantillons humains, *Myroides injenensis* à partir d'urines et *Myroides phaeus* à partir de la salive (Kim *et al.*, 2012 ; Yan *et al.*, 2012 ; Paek *et al.*, 2015).

M. odoratus et *M. odoratimimus* ne font pas partie des microbiotes humains et les infections causées chez l'homme sont le plus souvent attribuées à un contact avec de l'eau contaminée. Ce sont des pathogènes opportunistes pouvant causer des infections chez des patients immunodéprimés et/ou présentant des pathologies sous-jacentes (insuffisance rénale terminale, cirrhose, broncho-pneumopathie chronique obstructive, néoplasie, pathologie cardiaque et diabète) ou des facteurs favorisants (corticothérapie au long cours, plaie ouverte). Les infections chez les patients immunocompétents sont rarissimes (Maraki *et al.*, 2012).

Myroides spp. représentent moins de 1% des isolats cliniques de BGN-NF (Hugo *et al.*, 2006). Les infections causées par *M. odoratus* et *M. odoratimimus* sont également très rares et la virulence de ces bactéries est considérée comme faible (Crum-Cianflone *et al.*, 2014). Toutefois, l'issue de ces infections peut être fatale. Le séquençage total de génomes de *Myroides* sp. a montré que ces bactéries sont bien équipées pour l'infection et la persistance chez les mammifères (Burghartz *et al.*, 2015). De manière générale, les infections décrites sont des infections des tissus mous (cellulites, fasciites nécrosantes), des bactériémies, sepsis et infections osseuses dont la porte d'entrée est le plus souvent cutanée mais aussi des infections du tractus urinaire, des méningites, des pneumopathies, des endocardites et des ventriculites. L'espèce *M. odoratimimus* est plus rarement impliquée que *M. odoratus* dans ces infections, causant bactériémies et choc septique, cellulites et pneumopathies (Bachmeyer *et al.*, 2008 ; Benedetti *et al.*, 2011 ; Maraki *et al.*, 2012 ; Endicott-Yazdani *et al.*, 2015). *M. odoratimimus* a également été identifiée au cours d'épidémies d'infections associées aux soins (infections du tractus urinaire et bactériémies liées aux cathéters) (Douce *et al.*, 2008 ; Ktari *et al.*, 2012).

L'identification de ces bactéries est importante car elles sont multirésistantes aux antibiotiques limitant le choix thérapeutique. Le genre *Myroides* comprend des BGN-NF aérobies stricts, immobiles, pour la majorité cultivant sur gélose MacConkey. Ils présentent une pigmentation jaune et une odeur fruitée, et sont capables d'hydrolyser l'urée et la gélatine (Tableau 5). Les deux espèces *M. odoratus* et *M. odoratimimus* ne peuvent être différenciées phénotypiquement mais le genre est correctement identifié par Vitek2 et les espèces sont correctement identifiées par MALDI-TOF (Schröttner *et al.*, 2014).

Le typage par électrophorèse en champ pulsé peut être réalisé dans le cadre de l'investigation d'épidémies d'infections associées aux soins (Ktari *et al.*, 2012).

La plupart des souches est résistante aux β -lactamines, monobactams et carbapénèmes compris, par production de métallo-

β -lactamases chromosomiques (TUS-1 et MUS-1) (Mammeri *et al.*, 2002) et aux aminosides. Les isolats cliniques sont le plus souvent sensibles aux fluoroquinolones et au triméthoprim-sulfaméthoxazole, molécules ayant été utilisées avec succès pour traiter des cas d'infections à *Myroides* sp. Cependant, l'antibiogramme reste indispensable, des isolats résistants à la ciprofloxacine ayant été décrits (Fraser & Jorgensen, 1997).

Weeksella

Weeksella virosa (Holmes *et al.*, 1986) est la seule espèce du genre. Chez l'homme, c'est une espèce commensale du tractus uro-génital féminin et plus de $\frac{3}{4}$ des isolats proviennent d'échantillons urinaires ou cervico-vaginaux. Les isolats sont donc plus fréquents chez la femme mais aussi chez des patients présentant des comorbidités telles que pathologie rénale ou hépatique, obésité et diabète. Environ 2% des femmes sont porteuses de *W. virosa* au niveau de la muqueuse vaginale (Mardy & Holmes, 1988). Les autres sites d'isolement de *W. virosa* sont le sang, l'ombilic, le rectum, les oreilles, les yeux, la mastoïde, le tractus respiratoire (expectorations), le tractus digestif (liquide péritonéal) et le système nerveux central (liquide céphalo-rachidien) (Holmes *et al.*, 1986). *W. virosa* est rarement identifiée lors d'infections et ces dernières sont des pneumopathies, des bactériémies, des péritonites et des infections du tractus urinaire (Boixeda *et al.*, 1998 ; Slenker *et al.* 2012).

Il s'agit d'un BGN-NF, aérobie, immobile, non sporulé, métaboliquement inerte à l'exception des activités cytochrome oxydase, catalase et gélatinase, et de la production d'indole. La culture est obtenue sur gélose au sang ou gélose chocolat après 48 h d'incubation tandis que la culture sur gélose MacConkey est négative. Les colonies sont le plus souvent de couleur crème, lisses, brillantes et mucoïdes mais la production d'un pigment jaune non diffusible a été décrite (Reina *et al.*, 1990).

Proche de *Bergeyella zoohelcum*, principalement isolée d'infections après morsures animales, *W. virosa* ne doit pas être confondue avec cette dernière, les deux caractères différentiels étant l'absence d'uréase et la sensibilité à la colistine de *W. virosa* (Tableau 5).

La majorité des isolats de *W. virosa* est sensible aux β -lactamines, aux aminosides, aux fluoroquinolones et au chloramphénicol, et résiste aux aminosides et à la nitrofurantoïne. Une sensibilité variable selon l'isolat est observée à l'acide nalidixique, au triméthoprim-sulfaméthoxazole et à la tétracycline. Toutefois, certains isolats résistants à la ciprofloxacine et à la ceftazidime ont récemment été décrits (Fass *et al.*, 1996 ; Slenker *et al.* 2012).

Bergeyella

Bergeyella zoohelcum (anciennement *Weeksella zoohelcum*), seule espèce validement publiée du genre, est considérée comme phénotypiquement très proche de *W. virosa* et peut être confondue avec cette dernière par les méthodes d'identification phénotypique traditionnelles. C'est une bactérie essentiellement présente dans les microbiotes dentaires des hommes et des animaux à sang chaud mais aussi dans le microbiote digestif. L'habitat bucco-dentaire rend compte du type d'infections principalement décrit chez l'homme, à savoir des infections de plaies et des abcès après morsures animales ou humaines. De manière plus rare sont décrits des cas de méningite, pneumopathie, ténosynovite, cellulite et des bactériémies chez des patients avec ou sans

facteurs de risque mais ayant eu des contacts avec des animaux, principalement chats ou chiens (Montejo *et al.*, 2001 ; Shukla *et al.*, 2004 ; Beltran *et al.*, 2006 ; Lin *et al.*, 2007). Cette espèce a également été mise en évidence dans le liquide amniotique (Han *et al.*, 2006) et a été isolée de plaies chez des patients victimes de tsunami.

B. zoohelcum est un BGN-NF cultivant sur gélose au sang, la plupart des souches ne cultivent pas ou très mal sur gélose MacConkey et en bouillon. Les colonies sont non pigmentées et non hémolytiques, bien qu'un verdissement de la gélose au sang puisse être observé autour des colonies. Les colonies sont circulaires, entières, lisses, brillantes et mucoïdes les rendant difficiles à prélever sur gélose. Les tests positifs sont : oxydase, catalase, production d'indole et d'uréase, ce dernier caractère différenciant *B. zoohelcum* de *W. virosa* (Tableau 5). La présence de cette espèce dans les bases de données des spectromètres de masse facilite grandement son identification.

Une seconde espèce a été proposée récemment dans le genre bien que non encore validée, *Bergeyella cardium*, impliquées dans deux cas d'endocardite infectieuse (Sohn *et al.*, 2015c).

Ces bactéries sont sensibles aux b-lactamines, fluoroquinolones et au chloramphénicol tandis qu'une sensibilité variable selon la souche est décrite pour le triméthoprime-sulfaméthoxazole et les cyclines (Montejo *et al.*, 2001 ; Goldstein *et al.*, 2000 a et b ; Sohn *et al.*, 2015c).

Bacteroidetes/Chlorobi group; Bacteroidetes; Spingobacteria; Spingobacteriales; Spingobacteriaceae

Spingobacterium

Créé en 1983 par Yabuuchi *et al.*, le genre *Spingobacterium* regroupe des bactéries dont la particularité est de contenir une quantité importante de sphingophospholipides dans leur membrane (Yabuuchi *et al.*, 1983). Le genre comprend actuellement une trentaine d'espèces ubiquitaires, présentes dans les sols, les eaux et les plantes. Parmi celles-ci, deux ont été impliquées dans des cas d'infections chez l'homme : *Spingobacterium multivorum* et *Spingobacterium spiritivorum* (anciennement classées dans le genre *Flavobacterium*). L'espèce *Spingobacterium daejeonense* a également été identifiée par séquençage de l'ADN Nr 16S, à partir d'une hémoculture chez une enfant de 9 ans présentant des comorbidités (données personnelles).

Chez l'homme, les cas d'infections sont rares. *S. multivorum* et *S. spiritivorum* sont principalement isolées du sang et d'expectorations et ont été impliquées dans des cas de bactériémies, sepsis et péritonites (Koh *et al.*, 2013). De rares cas d'infections nécrosantes (fasciite nécrosante à *S. multivorum*) et non nécrosantes (cellulite) de la peau et des tissus mous sont également décrits (Grimaldi *et al.*, 2012). Ces infections surviennent le plus souvent chez des patients avec des pathologies sous-jacentes (leucémie, diabète, mucoviscidose, ...) ou des conditions favorisantes (corticothérapie au long cours, ...). Enfin, des cas d'infections associées aux soins sont également décrits, par exemple suite à l'inoculation lors de biopsies transrectales de la prostate sous contrôle échographique (Nielsen *et al.*, 2014).

La sévérité des cas est très variable pouvant aller jusqu'au décès par choc septique (Koh *et al.*, 2013). A l'inverse, chez les patients atteints de mucoviscidose, l'isolement de bactéries du

genre *Spingobacterium* n'a pas été relié à une détérioration de la fonction respiratoire et le rôle exact de ces bactéries demeure inconnu (Lambiase *et al.*, 2009).

Ce sont des BGN-NF non sporulés, immobiles et aérobies stricts. Leur culture est possible sur gélose au sang (colonies non hémolytiques), chocolat, de Mueller-Hinton, Sabouraud et sur les milieux sélectifs pour *Burkholderia cepacia* (BCSA). La culture sur gélose MacConkey est variable selon la souche. Elle est observée après incubation à 37 °C mais pas à 42 °C après plusieurs jours d'incubation (de un à trois jours). Les colonies observées sont rondes, convexes, lisses, opaques et présentent une pigmentation jaune pâle. Les réactions suivantes sont positives : catalase, oxydase, uréase, désoxyribonucléase extracellulaire (DNase), phosphatase alcaline et phosphatase acide. Ces bactéries ne produisent ni indole ni gélatinase (Tableau 5).

L'identification de genre est possible grâce aux systèmes commercialisés de type galerie API 20 NE (bioMérieux) et à la spectrométrie de masse mais l'identification d'espèce n'est pas toujours fiable, dépendant de la richesse de la base de données utilisées (Clark *et al.*, 2013) et une identification moléculaire est recommandée pour identifier les isolats impliqués dans des infections monomicrobiennes sévères. L'électrophorèse en champ pulsé après macrorestriction de l'ADN par l'endonucléase *Apal* peut être utilisée pour conduire des études épidémiologiques (Lambiase *et al.*, 2009).

Seuls étant rapportés les antibiogrammes d'isolats de cas cliniques individuels ou de séries d'isolats provenant d'une situation particulière (patients atteints de mucoviscidose), il est difficile de définir un profil type de résistance aux antibiotiques pour les espèces de ce genre. Toutefois, la sensibilité aux antibiotiques semble variable selon l'espèce et la souche. Les bactéries du genre *Spingobacterium* sont généralement résistantes aux aminosides et à la colistine et sensibles aux fluoroquinolones (lévofloxacine et ciprofloxacine) et au triméthoprime-sulfaméthoxazole. La sensibilité aux b-lactamines est variable et *S. multivorum* présente une résistance plus élevée que *S. spiritivorum* attribuée à la production d'une métallo- β -lactamase non inhibée par l'acide clavulanique, hydrolysant les carbapénèmes ainsi que les céphalosporines de troisième et quatrième générations (Blahová *et al.*, 1997). Ainsi, *S. multivorum* est multi-résistant aux antibiotiques, résistant aux b-lactamines dont les carbapénèmes, et aux aminosides. *S. spiritivorum* est sensible à la pipéracilline, à la ceftazidime et au méropénème (Lambiase *et al.*, 2009).

Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Caulobacterales; Caulobacteraceae

Brevundimonas

Le genre *Brevundimonas* a été créé en 1994 pour reclasser deux espèces du genre *Pseudomonas* devenant *Brevundimonas diminuta* et *Brevundimonas vesicularis* (Segers *et al.*, 1994). Il comprend actuellement 25 espèces validement publiées, ubiquitaires dans l'environnement, dont 4 ont été impliquées dans des cas d'infections humaines, *B. vesicularis* étant l'espèce majoritairement identifiée dans ces cas à côté de *B. diminuta*, *B. nasdae* et *B. vancanneytii* quand des méthodes d'identification génotypique sont mises en œuvre.

Ces cas d'infections humaines demeurent rares et peuvent être d'origine communautaire ou associés aux soins. *B. vesicularis* a été isolé lors de bactériémies, plus rarement lors de cas de méningite post-opératoire, d'infection cutanée, de péritonite, d'arthrite septique, d'abcès du foie, d'infection du tractus urinaire et de méningite (Karadag *et al.*, 2012 ; Yoo *et al.*, 2012 ; Zhang *et al.*, 2012 ; Gupta *et al.*, 2014). *B. diminuta* cause également majoritairement des bactériémies mais infections du tractus urinaire, emphysème, abcès post-traumatique et kératite liée au port de lentilles de contact sont décrits (Almuzara *et al.*, 2012a ; Pandit, 2012 ; Mahapatra *et al.*, 2014). L'isolement de *B. diminuta* à partir des sécrétions du tractus respiratoire a été rapporté chez un patient atteint de mucoviscidose (Menuet *et al.*, 2008). L'espèce *B. vancanneytii* a été impliquée dans un cas d'endocardite (Estrela & Agraaham, 2010). *B. nasdae* a été identifiée chez l'homme lors de la caractérisation moléculaire d'isolats sanguins du genre *Brevundimonas*. Les taux de mortalité à 30 jours d'une bactériémie à *Brevundimonas* sont compris entre 4,5 et 17% (Lee *et al.*, 2011b ; Zhang *et al.*, 2012).

Les facteurs de virulence de ces espèces demeurent méconnus, ces bactéries pouvant causer des infections chez des sujets immunodéprimés (insuffisance rénale, lupus érythémateux, corticothérapie au long cours, neutropénie, leucémie, ...) mais aussi immunocompétents (Shang *et al.*, 2012). La persistance de *Brevundimonas* spp. dans les solutions de désinfectants, leur isolement de sangsues médicinales et de l'environnement hospitalier, ainsi que leur résistance aux antibiotiques, en font des agents d'infections associées aux soins.

Les bactéries du genre *Brevundimonas* sont aérobies strictes, non sporulées et mobiles. Elles possèdent une oxydase et le plus souvent une catalase, et ne produisent pas d'indole. *B. vesicularis* forme des colonies pouvant être pigmentées en jaune ou orange sur gélose au sang et gélose chocolat après 48 h d'incubation. Seuls environ 25% des souches de *B. vesicularis* cultivent sur gélose MacConkey bien que certains auteurs suggèrent qu'une incubation prolongée pourrait permettre cette culture. À l'inverse, la plupart des souches de *B. diminuta* cultivent sur gélose MacConkey. Les colonies sont blanches. L'hydrolyse de l'esculine positive pour la plupart des souches de *B. vesicularis* et rarement positive pour *B. diminuta* et permet d'orienter l'identification d'espèce. Toutefois, l'identification par les méthodes phénotypiques n'est pas considérée comme fiable ni pour l'identification d'espèce. Ces méthodes peuvent également fournir des identifications de genre erronées (Yoo *et al.*, 2012 ; Lin & Chen, 2013).

De manière globale, les isolats de *Brevundimonas* sont sensibles à la pipéracilline-tazobactam et à l'amikacine. La tigécycline et le doripénème possèdent également des activités antibactériennes importantes sur ces bactéries. Elles sont résistantes à la ciprofloxacine et à la colistine (Lee *et al.*, 2011b). Une étude conduite sur des souches de *B. vesicularis* isolées lors de bactériémies montre que 91% des isolats sont sensibles au ceftiprome, à l'imipénème et à la pipéracilline-tazobactam et 86% à la gentamicine, à l'amikacine et à la ciprofloxacine. Toutefois, seuls 64% des isolats sont sensibles à la ceftazidime et 59% au triméthoprime-sulfaméthoxazole (Zhang *et al.*, 2012). *B. diminuta* est décrit comme habituellement résistant aux fluoroquinolones et au céfépime et sensible à l'amikacine, à l'imipénème et à la ticarcilline-acide clavulanique. Toutefois, un isolat de *B. diminuta* multirésistant produisant la métallo-b-lactamase VIM-

2 a été mis en évidence à partir de biopsies tissulaires, seules la minocycline et la tigécycline demeuraient actives sur cet isolat (Almuzara *et al.*, 2012a).

Caulobacter

Seuls trois isolats humains indépendants appartenant au genre *Caulobacter* sont décrits dans la littérature. Pour l'un d'entre eux, aucune donnée clinique n'est disponible (Drancourt *et al.*, 2000), les deux autres isolats ont respectivement été impliqués dans un cas de péritonite chez un patient en dialyse péritonéale pour insuffisance rénale chronique (Justesen *et al.*, 2007) et dans un cas probable de méningite post-chirurgicale chez un enfant (Bridger *et al.*, 2012).

Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales

Aureimonas / famille Aurantimonadaceae

Le genre *Aureimonas* a été créé en 2011. Dans ce genre ont été reclassées plusieurs espèces du genre *Aurantimonas* dont une isolée chez l'homme, *Aureimonas altamirensis* (anciennement *Aurantimonas altamirensis*) (Rathsack *et al.*, 2011). Cette espèce a initialement été décrite à partir des murs de la grotte paléolithique d'Altamira en Espagne (Jurado *et al.*, 2006). Bien que sa pathogénicité reste incertaine, elle a depuis été isolée dans les circonstances ou échantillons suivants : sang, liquide pleural, raclage cornéen, lentille de contact et solution de lavage de lentilles de contact chez un patient présentant une kératite, expectorations de patients atteints de mucoviscidose (Luong *et al.*, 2008 ; Mendes *et al.*, 2009 ; Téllez-Castillo *et al.*, 2010).

Ce BGN-NF (bacilles courts ou formes coccobacillaires) donne des colonies jaunes, mucoïdes, convexes et lisses, d'environ 1 mm de diamètre après 5 jours d'incubation sur géloses au sang et MacConkey. Il possède une catalase, une oxydase et une uréase ; il ne produit pas d'indole, ne réduit pas les nitrates et n'hydrolyse ni la gélatine, ni l'esculine (Jurado *et al.*, 2006). Les méthodes d'identification biochimique ne permettent pas l'identification d'*A. altamirensis* et aucune identification correcte par spectrométrie de masse n'est actuellement décrite dans la littérature malgré la présence de cette espèce dans les bases de données des spectromètres de masse ; à ce jour, une identification précise nécessite donc la réalisation de méthodes moléculaires (Téllez-Castillo *et al.*, 2010).

Le phénotype de résistance aux antibiotiques comprend une sensibilité aux b-lactamines et aux aminosides, une sensibilité variable à la ciprofloxacine, au triméthoprime-sulfaméthoxazole et à la nitrofurantoïne (Luong *et al.*, 2008 ; Mendes *et al.*, 2009).

Ochrobactrum / famille Brucellaceae

Le genre *Ochrobactrum* a été créé en 1988 par Holmes *et al.* et regroupe des bactéries anciennement nommées *Achromobacter* groupes A, C et D ou groupe Vd (biotypes 1 et 2) du CDC (Holmes *et al.*, 1988). Le genre *Ochrobactrum* comprend des espèces très versatiles, capables de coloniser de nombreuses niches, depuis des environnements hostiles comme les sols pollués jusqu'à divers animaux (nématodes, insectes, mammifères) et l'homme. Elles ont ainsi été principalement isolées du sol, de la rhizosphère, de la rhizoplane, de plantes et de l'eau ; ce sont aussi des symbiotes de plusieurs hôtes eucaryotes dont certains nématodes. Ce genre est notamment étudié pour ses applications

potentielles en bioremédiation des sols et pour son rôle stimulant de la croissance de certaines plantes. La complexité du génome de ces bactéries, ainsi que sa fluidité, peuvent expliquer leurs capacités d'adaptation à des habitats très divers (Aujoulat *et al.*, 2012 a et b). Cinq espèces, *O. anthropi*, *O. intermedium*, *O. pseudintermedium*, *O. haematophilum* et *O. pseudogrignonense*, ont été identifiées à partir d'échantillons biologiques humains (Kämpfer *et al.*, 2007b ; Teyssier *et al.*, 2007). *O. anthropi* et *O. intermedium* sont les deux espèces les plus fréquemment isolées au laboratoire (Teyssier *et al.*, 2007).

Les infections décrites sont majoritairement des infections associées aux soins, principalement des bactériémies post-dialyses, post-opératoires ou liées aux cathéters veineux centraux, survenant chez des patients immunocompromis présentant une pathologie sous-jacente (Alnor *et al.*, 1994 ; Kämpfer *et al.*, 2007a ; Teyssier *et al.*, 2005 ; Teyssier *et al.*, 2007 ; Hagiya *et al.*, 2013). Toutefois, les bactéries du genre ont également été impliquées dans les diverses infections suivantes : endocardite (Shivaprakasha *et al.*, 2011), abcès pancréatique, abcès hépatique et abcès pelvien, infection osseuse (Saveli *et al.*, 2010), endophtalmie, infection du tractus urinaire, pneumopathie (Naik *et al.*, 2013), méningite, et empyème cérébral (Mrozek *et al.*, 2014). Plusieurs cas d'infections invasives (bactériémies, sepsis, pneumopathie) ont été décrits récemment chez les nouveaux-nés prématurés (Kumar *et al.*, 2013 ; Mudshingkar *et al.*, 2013 ; Qasimyar *et al.*, 2014 ; Menezes *et al.*, 2014). Enfin, les bactéries du genre *Ochrobactrum* ont été isolées chez des patients atteints de mucoviscidose où leur présence dans les sécrétions respiratoires pourrait être liée à leur résistance aux antibiotiques couramment utilisés en aérosolthérapie chez ces patients (Menuet *et al.*, 2008 ; Marchandin *et al.*, 2012). D'autres implications de ces bactéries en pathologie pourraient être sous-estimées et le séquençage total du génome d'une souche d'*O. intermedium* isolée en association à *Helicobacter pylori* dans des biopsies gastriques a montré des similarités fonctionnelles de gènes de virulence chez ces deux espèces productrices d'uréase.

La capacité de persistance dans l'environnement mais aussi de résistance à diverses molécules (antibiotiques, métaux lourds, ...) de ces espèces favorise également leur implication dans diverses épidémies d'infections associées aux soins (Mattos *et al.*, 2013). Même si le séquençage complet de génomes de plusieurs souches d'*Ochrobactrum* sp. a montré la présence de gènes de virulence bien connus dont l'opéron *virB*, la virulence de ces pathogènes opportunistes est considérée comme modérée comme en témoigne une évolution favorable de certains cas d'infections chez des patients immunocompétents mais aussi immunodéprimés en l'absence d'antibiothérapie ou d'antibiothérapie efficace (Hagiya *et al.*, 2013).

Les caractéristiques bactériologiques de ces BGN-NF sont : aérobies stricts, mobiles, présence d'une oxydase et absence de production d'indole. Ils cultivent sur gélose MacConkey. Leur multirésistance naturelle aux antibiotiques explique qu'ils soient également isolés sur les milieux sélectifs utilisés pour le dépistage du portage rectal des bactéries multirésistantes contenant de la ceftazidime ou du céfotaxime. Les systèmes commercialisés pour l'identification phénotypique de routine ne sont pas à même de permettre une identification fiable des cinq espèces isolées chez l'homme mais peuvent permettre l'identification du genre. L'identification des deux espèces majoritaires, *O. anthropi* et *O. intermedium*, présentant de très nombreuses caractéris-

tiques similaires (Kämpfer *et al.*, 2007a ; Thoma *et al.*, 2009), peut être orientée par les caractéristiques suivantes : l'aspect des colonies sur géloses Trypticase-Soja et MacConkey, la capacité de culture à 45 °C sur gélose Trypticase-Soja, la présence d'une uréase, la résistance à la nétilmicine, la tobramycine et la colistine pour les isolats présentant l'antibiotype multirésistant majoritairement décrit dans ce genre (Tableau 7, Figure 2).

Les performances de l'identification par spectrométrie de masse dépendront de l'automate utilisé, *O. intermedium* n'étant pas représenté dans toutes les bases de données (Tableau 3). De plus, certains isolats peuvent ne pas être identifiés au niveau de l'espèce par ces systèmes, la base MALDI Biotyper® DB-5627 MSP list (Bruker Daltonics) comprenant 2 souches d'*Ochrobactrum* sp.

Tout isolat présentant des caractéristiques phénotypiques atypiques ou impliqué dans une infection invasive devra donc faire l'objet d'une identification moléculaire. Dans ce cas, il est recommandé d'utiliser l'amplification et le séquençage du gène *recA* qui est actuellement reconnu comme le marqueur le plus fiable pour l'identification des espèces d'*Ochrobactrum* (Kämpfer *et al.*, 2007a). En effet, si le séquençage de l'ARN ribosomique 16S pourra confirmer ou permettre l'identification de genre, il ne permettra pas l'identification de l'espèce en cause compte tenu de l'importante similarité de séquences des espèces d'*Ochrobactrum*.

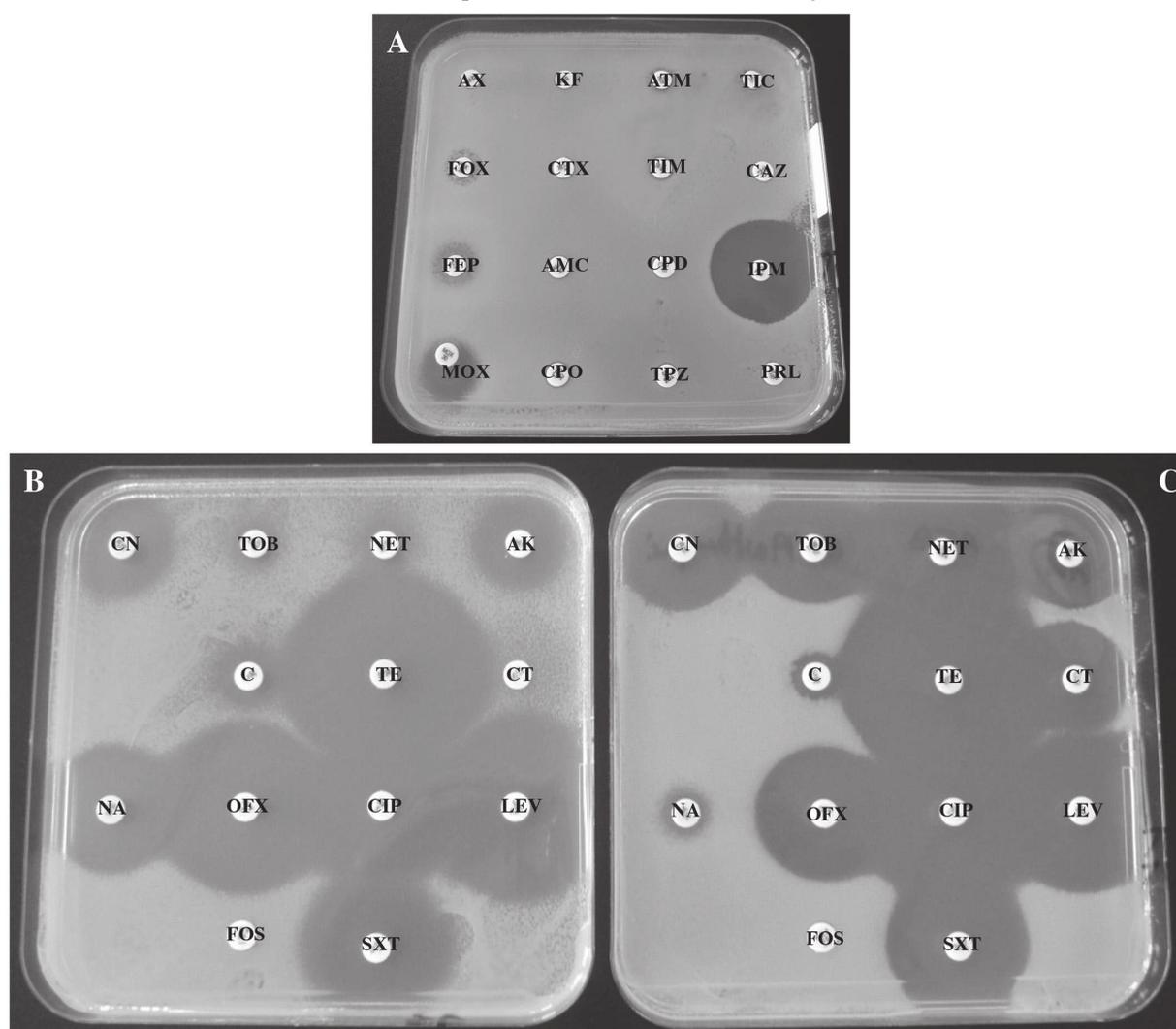
Le typage épidémiologique, notamment nécessaire pour confirmer ou infirmer la survenue d'une épidémie et/ou tracer la source d'une l'infection (Labarca *et al.*, 2007), pourra reposer sur plusieurs méthodes incluant la PCR sur séquences répétées bactériennes automatisée ou non, l'AFLP (amplified fragment length polymorphism) (Leal-Klevezas *et al.*, 2005), l'analyse des spectres de masse (Quirino *et al.*, 2014), l'électrophorèse en champ pulsé et le multilocus sequence typing (MLST) (Quirino *et al.*, 2014). Les approches MLST ont également permis de structurer les populations d'*Ochrobactrum* et ont permis de montrer qu'une sous-population d'*O. anthropi* était spécifiquement associée à l'homme (Romano *et al.*, 2009 ; Aujoulat, 2012 a et b).

L'antibiotype des espèces majoritaires d'*Ochrobactrum* est caractéristique associant une résistance à l'ensemble des b-lactamines sauf les carbapénèmes et le latamoxef (Figure 2) (illustration également disponible à l'adresse : <http://www.microbes-edu.org/mecanisme/pheno2/anthropi.html>). Les isolats sont le plus souvent sensibles à la gentamicine, aux fluoroquinolones, au triméthoprime-sulfaméthoxazole et à la colistine (Thoma *et al.*, 2009) mais des résistances acquises à la gentamicine, la ciprofloxacine, la lévofloxacine et le triméthoprime-sulfaméthoxazole ont été décrites (Hagiya *et al.*, 2003). Pour *O. anthropi*, le support génétique de cette résistance a été caractérisé, les souches produisent une β -lactamase chromosomique AmpC de classe 1, appelée OCH-1, qui est inductible et résistante aux inhibiteurs de β -lactamase. Les souches d'*O. intermedium* étudiées présentent un profil de résistance aux β -lactamines identique à celui observé chez *O. anthropi*, suggérant l'existence d'un mécanisme de résistance similaire. De plus, la résistance à la tobramycine et à la colistine d'*O. intermedium* est à souligner étant donné que ces deux antibiotiques sont souvent utilisés en association lors des décontaminations digestives. Un cas d'abcès du foie à *O. intermedium* après décontamination digestive par ces antibiotiques a été décrit et la souche en cause a également été isolée des selles du patient.

Tableau 7. Caractéristiques phénotypiques permettant d’orienter l’identification des deux espèces d’*Ochrobactrum* les plus fréquemment isolées chez l’homme

Caractéristique	<i>O. anthropi</i>	<i>O. intermedium</i>
Mucoïdie des colonies	- / +	++
Uréase	+	-
Sensibilité à la nétilmicine et à la tobramycine	S	R
Présence d’une zone d’inhibition autour d’un disque de colistine	+	-

Figure 2. Phénotype de résistance aux antibiotiques des deux espèces d’*Ochrobactrum* les plus fréquemment isolées chez l’homme par méthode de diffusion en milieu gélosé.



A. b-lactamines : phénotype multirésistant, identique pour *O. anthropi* et *O. intermedium* : seule une sensibilité à l’imipénème (et parfois au moxalactam) est observée.

B et C. Autres familles d’antibiotiques :

B. Phénotype résistant à la tobramycine (TOB), la nétilmicine (NET) et la colistine (CT) d’*O. intermedium*.

C. Sensibilité à ces mêmes antibiotiques observée pour *O. anthropi*.

À noter la description en 2006 d'un genre proche d'*Ochrobactrum*, le genre *Pseudochrobactrum* avec l'espèce *Pseudochrobactrum asaccharolyticum* isolée d'un liquide articulaire de genou chez un patient de 66 ans. Bien que présentant certaines caractéristiques phénotypiques distinctives par rapport aux espèces du genre *Ochrobactrum*, celles-ci ne pouvant être aisément déterminées dans le cadre de l'identification de routine, l'identification de cette espèce est basée sur le séquençage du gène *recA* (Kämpfer *et al.*, 2006a).

Methylobacterium* / famille *Methylobacteriaceae

Le genre *Methylobacterium*, décrit par Patt et collaborateurs en 1976 (Patt *et al.*, 1976), comprend une cinquantaine d'espèces largement distribuées dans l'environnement (sols, eaux usées, feuillages, ...). Rarement identifiées à partir d'échantillons humains, l'isolement de ces bactéries doit toujours faire discuter la possibilité d'une contamination d'origine environnementale. Les infections chez l'homme sont rares et touchent des patients immunodéprimés ; néoplasie, transplantation, infection par le VIH, défaillance rénale et alcoolisme ont été décrits comme pathologies sous-jacentes. Ce sont majoritairement des infections associées aux soins à type de bactériémies associées à des endoscopes contaminés ou à l'hémodialyse (Engler & Norton, 2001 ; Kressel & Kidd, 2001 ; Imbert *et al.*, 2005 ; Kovaleva *et al.*, 2014). La capacité des espèces de *Methylobacterium* à former du biofilm, à résister à des températures élevées, à une sécheresse importante et aux agents désinfectants, ainsi que leur survie dans les amibes, pourraient expliquer leur persistance dans l'environnement hospitalier (Thomas *et al.*, 2006 ; Furu-hata *et al.*, 2011 ; Kovaleva *et al.*, 2014). Bien que la source de l'infection reste le plus souvent méconnue, le liquide de prélèvement/conservation de moelle osseuse ou l'eau du robinet ont été incriminés dans certains cas d'infection (cas d'infection après irrigation orale pour mucite chez un patient ayant une greffe de moelle osseuse, péritonite récurrente chez un patient en dialyse péritonéale continue ambulatoire) (Brown *et al.*, 1996 ; Sanders *et al.*, 2000). Dans les cas pour lesquels l'origine de l'infection n'est pas identifiée, l'exposition environnementale est retenue comme hypothèse principale ; ainsi, le jardinage et les bains en rivières ont été suspectés d'être à l'origine de contaminations par des bactéries du genre *Methylobacterium*. L'évolution de ces infections est en général favorable sous traitement antibiotique adapté (Sanders *et al.* 2000).

L'espèce *Methylobacterium mesophilicum* (anciennement *Pseudomonas mesophila*) est considérée comme la plus fréquemment responsable d'infections humaines et a été isolée de divers échantillons cliniques dont sang, moelle osseuse, ganglion lymphatique, échantillons cutanés, expectorations, liquide de ponction pleurale, synovie, dialysat et liquide péritonéal, liquide d'ascite et liquide céphalo-rachidien (Brown *et al.*, 1992 ; Flournoy *et al.*, 1992 ; Sanders *et al.*, 2000 ; Zinchuk *et al.*, 2015). Toutefois, dans certains cas cliniques, l'espèce en cause n'a pas été identifiée par méthode moléculaire laissant planer un doute sur la précision de l'identification d'espèce publiée et limitant la connaissance précise de l'importance relative des différentes espèces de *Methylobacterium* impliquées dans les cas d'infection humaine. Ainsi, parmi six cas de bactériémies associées aux soins dus à *Methylobacterium* sp., Lai et collaborateurs ont identifié par séquençage du gène codant l'ARNr 16S les espèces suivantes : *Methylobacterium radiotolerans* (n

= 2), *Methylobacterium thiocyanatum* (n = 2), *Methylobacterium aminovorans* (n = 1) et *Methylobacterium lusitanum* (n = 1) (Lai *et al.*, 2011). Les espèces *M. radiotolerans* et *M. thiocyanatum* ont été identifiées d'autres cas d'infections invasives, surtout liées aux cathéters (García-Lozano *et al.*, 2012 ; Li *et al.*, 2015). Les autres espèces identifiées chez l'homme sont *Methylobacterium extorquens* (Kaye *et al.*, 1992), *Methylobacterium fujisawaense* (Fanci *et al.*, 2010) et *Methylobacterium zatmanii* (Hornei *et al.*, 1999) isolées au cours de bactériémies liées aux cathéters et *Methylobacterium podarium* isolée au niveau du pied et de l'œil (Anesti *et al.*, 2004 ; Borsali *et al.*, 2011).

Les bactéries du genre *Methylobacterium* sont des bacilles à Gram négatif mobiles dont la morphologie après coloration de Gram est caractéristique montrant des bacilles peu colorés ou à coloration variable avec une vacuole interne non colorée (l'aspect après coloration de Gram est visible dans Vaneechoutte *et al.*, 2011). Elles cultivent très difficilement sur les milieux de culture usuels, voire pas du tout, et certaines souches ne peuvent cultiver que sur les milieux destinés à la culture des légionelles comme le milieu BCYE (buffered charcoal yeast extract) (Li *et al.*, 2015). Pour les souches cultivant sur gélose au sang, la croissance est lente (2-3 jours minimum) et la culture peut être inhibée par celle de bactéries associées (Lee *et al.*, 2004). Aucune culture n'est obtenue sur gélose MacConkey. La température optimale de croissance est de 25-30 °C. Du fait de ces caractéristiques culturales, il a été suggéré que la présence des bactéries du genre *Methylobacterium* pourrait être sous-estimée non seulement dans les échantillons cliniques mais aussi dans l'environnement hospitalier (Kovaleva *et al.*, 2014). Les colonies obtenues sont sèches et pigmentées en rose ou de couleur corail expliquant la confusion possible avec les genres *Roseomonas* ou *Rhodococcus*. La détection de l'oxydase est positive. Catalase et uréase sont également détectées et les nitrates réduits. L'identification des différentes espèces doit être réalisée par biologie moléculaire, les bases de données des spectromètres de masse étant encore incomplètes.

À de rares exceptions près, et bien que des études incluant peu d'isolats semblent montrer des différences selon l'espèce considérée (Lai *et al.*, 2011), les isolats de *Methylobacterium* sp. sont résistants aux b-lactamines à l'exception de la ceftriaxone et du ceftozoxime et sensibles aux aminosides (gentamicine, amikacine), aux fluoroquinolones (ciprofloxacine) et au triméthoprime-sulfaméthoxazole. Une b-lactamase est produite par 60% des isolats étudiés par Brown et collaborateurs (Brown *et al.*, 1992).

Rhizobium* / famille *Rhizobiaceae

Le genre *Rhizobium* comprend des espèces appartenant précédemment au genre *Agrobacterium*. Présentes au sein de niches écologiques très variées (sols, eaux, plantes, animaux, homme, champignons), ces espèces présentent différents modes de vie (libres, membres de la rhizosphère, colonisateurs d'invertébrés ou pathogènes opportunistes de l'homme). La taxonomie et la nomenclature de ces bactéries sont particulièrement confuses du fait de nombreuses controverses et remaniements successifs ; ainsi, les quatre dénominations *Agrobacterium tumefaciens*, *Agrobacterium radiobacter*, *Rhizobium tumefaciens* et *Rhizobium radiobacter* sont synonymes mais les souches phytopathogènes sont désignées par le synonyme *Rhizobium (Agrobacterium) tumefaciens* alors que les isolats d'origine humaine ont été

appelés *Rhizobium (Agrobacterium) radiobacter*. Plus récemment, il a été montré que les isolats humains de *R. radiobacter* forment une sous-population individualisée au sein de l'espèce et qu'ils appartiennent en fait à une espèce distincte, *Rhizobium (Agrobacterium) pusense* (Aujoulat *et al.*, 2011 ; Aujoulat *et al.*, 2015).

Les espèces de ce genre ont longtemps été considérées comme des pathogènes des plantes uniquement (Escobar & Dandekar, 2003) et les premiers isolements chez l'homme en 1967 ont tout d'abord considérés comme des contaminants (Lautrop, 1967). L'intérêt médical de *R. radiobacter* a secondairement été reconnu du fait de son implication dans un cas d'endocardite sur prothèse valvulaire en 1980 (Plotkin, 1980) suivi de la description d'autres cas d'infections humaines (Alnor *et al.*, 1994). *R. radiobacter* est actuellement considéré comme un pathogène opportuniste émergent (Mantadakis *et al.*, 2010; Sood *et al.*, 2010). Les infections les plus fréquemment décrites sont des infections associées aux soins, particulièrement des bactériémies survenant chez des patients dont le système immunitaire est compromis et/ou ayant du matériel transcutané ou implanté (cathéter, valve, ...) (Kato *et al.*, 2009). Les autres types d'infections sont des endophtalmies post-chirurgicales, des péritonites notamment lors de dialyse péritonéale continue ambulatoire, des infections urinaires, des endocardites, des pneumopathies, des infections de plaies, d'ulcères chroniques et des abcès du cerveau (Edmond *et al.*, 1993 ; Hulse *et al.*, 1993 ; Mastroianni *et al.*, 1996 ; Miller *et al.*, 1996 ; Pierre-Filho *et al.*, 2003 ; Dhatariya *et al.*, 2012 ; Egeman *et al.*, 2012 ; Rojas *et al.*, 2012 ; Guerra *et al.*, 2013). Des souches sont également isolées des expectorations de patients atteints de mucoviscidose (Coenye *et al.*, 2002 ; Marchandin *et al.*, 2012). Dans certains cas, l'infection a pu être reliée à une source environnementale (bronchoscope, appareillage d'air conditionné ou solutions médicamenteuses contaminées) (Edmond *et al.*, 1993 ; Peiris *et al.*, 2006). Le typage épidémiologique moléculaire peut être basé sur l'AFLP, la PCR sur séquences répétées (rep-PCR), l'électrophorèse en champ pulsé après macrorestriction de l'ADN génomique par l'endonucléase *SwaI* ou une approche MLSA (Multilocus Sequence Analysis) basée sur les gènes *atpD*, *zwf*, *trpE*, *groEL*, *dnaK*, *glnA*, et *rpoB* (Aujoulat *et al.*, 2011).

Une virulence faible est habituellement attribuée à ces microorganismes ; toutefois, les mécanismes et facteurs de virulence à l'origine de infections humaines, différents de ceux impliqués dans la pathogénicité pour les plantes, demeurent inconnus (Christakis *et al.*, 2006 ; Mantadakis *et al.*, 2010 ; Sood *et al.*, 2010). D'autres espèces peuvent, plus rarement, être isolées du sang : *Rhizobium (Agrobacterium) vitis* (Giammanco *et al.*, 2004) et *Rhizobium (Agrobacterium) larrymoorei* (données personnelles) et représenteraient donc d'autres pathogènes opportunistes humains dans le genre *Rhizobium* ; leur reconnaissance ne peut être basée que sur des méthodes d'identification moléculaire.

Les souches de *R. pusense* sont des BGN-NF, aérobies, non sporulés et mobiles par une ciliature péritriche. Plusieurs biovars sont décrits dans l'espèce, la plupart des souches humaines appartiennent au biovar 1 qui présente la propriété d'oxyder le lactose en 3-cétolactose. *R. pusense* peut être isolé sur gélose MacConkey ou gélose au sang après 2 à 3 jours d'incubation. Les colonies sont mucosides. Il peut cultiver à 42 °C. La recherche de l'oxydase est positive. De même, uréase, phény-

lalanine désaminase, hydrolyse de l'esculine et b-galactosidase sont positives. La production d'indole est négative (Tableau 6). Les méthodes d'identification actuellement utilisées en microbiologie médicale (galerie API 20NE, VITEK et MALDI-TOF MS) permettent l'identification de *R. radiobacter* mais ne permettent ni l'identification de *R. pusense*, ni celle d'autres espèces proches qui seront donc faussement identifiées comme *R. radiobacter* du fait de la proximité des espèces et de bases de données incomplètes. Le séquençage de l'ADNr 16S n'est pas non plus suffisamment discriminant et il a été montré l'utilité de séquencer le gène *recA* pour différencier les espèces proches (Costechareyre *et al.*, 2010 ; Shams *et al.*, 2013) ou le gène *atpD* pour reconnaître *R. pusense* (Aujoulat *et al.*, 2015).

La sensibilité aux antibiotiques est variable mais *R. pusense* présente une résistance globale relativement élevée aux antibiotiques, le traitement doit donc être guidé par l'antibiogramme (Edmond *et al.*, 1993). La plupart des isolats est sensible au céfépime, aux carbapénèmes, à la pipéracilline-tazobactam, aux fluoroquinolones, à la tétracycline et à la tigécycline. Elle résiste à la tobramycine et à la ceftazidime et des sensibilités variables sont observées à l'amikacine, à la gentamicine et au céfotaxime (Lai *et al.*, 2004 ; Aujoulat, 2012a ; Moreau-Gaudry *et al.*, 2012).

La majorité des patients va évoluer favorablement sous traitement antibiotique adapté. De plus, le retrait du matériel implanté contaminé peut s'avérer nécessaire (Lai *et al.*, 2004) bien que celui-ci ne soit pas indispensable, notamment dans les cas de péritonite (Tsai, 2013).

Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhodobacterales; Rhodobacteraceae

Haematobacter

Le genre créé en 2007 comprend deux espèces et une genomospécies. Les deux espèces validement publiées, *Haematobacter missouriensis* et *Haematobacter massiliensis* (anciennement *Rhodobacter massiliensis*) ont été isolées d'échantillons humains (Greub & Raoult, 2003 ; Helsen *et al.*, 2007). Toutefois, bien qu'initialement décrite comme un BGN-NF, *H. missouriensis* a secondairement été classée parmi les BGN glucidolytiques (Wauters & Vanechoutte, 2011) et donc seule *H. massiliensis* est actuellement à considérer comme un BGN-NF dans ce genre.

H. massiliensis a été caractérisée à partir d'une souche isolée en co-culture amibienne de sécrétions nasales chez un patient présentant une pneumopathie d'inhalation ; depuis, elle a majoritairement été isolée du sang mais aussi d'une plaie traumatique (Greub & Raoult, 2003 ; Helsen *et al.*, 2007). Un isolat atypique qualifié d'*Haematobacter*-like a également été impliqué dans un cas d'endocardite (Buscher *et al.*, 2010).

Ce BGN-NF immobile et aérobic strict, présente des caractéristiques phénotypiques proches de celles de *Psychrobacter phenylpyruvicus* mais en diffère notamment par l'absence de nitrate réductase. Catalase, oxydase, uréase, phénylalanine désaminase, arginine dihydrolase et H₂S sont produits. Il ne produit pas d'indole, ne réduit pas les nitrates, ni les nitrites et n'hydrolyse ni la gélatine, ni l'esculine. Les colonies ne sont pas pigmentées et, pour la plupart des souches, un halo verdâtre est observé autour des colonies sur gélose au sang. Toutes les souches ne sont pas capables de cultiver sur gélose MacConkey

et aucune ne cultive sur gélose *Salmonella-Shigella* ou gélose cétrimide (Tableau 6).

Les souches d'*Haematobacter* ont des concentrations minimales inhibitrices (CMI) d'amoxicilline, de fluoroquinolones, d'aminosides et de carbapénèmes basses tandis que celles des céphalosporines, des monobactams et de la pipéracilline sont variables.

Paracoccus

Le genre *Paracoccus* comprend une quarantaine d'espèces isolées de diverses sources environnementales (sols, boues, eaux, air) ; parmi celles-ci, l'espèce *Paracoccus yeei* (nom corrigé de *P. yeeii* et anciennement CDC Group Eugonic Oxider (EO)-2) a été la seule espèce isolée d'échantillons cliniques humains pendant plus d'une décennie. Les échantillons ou sites d'isolement sont les suivants : sang, plaie ou lésion des membres inférieurs, liquide céphalo-rachidien, œil, oreille, bile, dialysat péritonéal (Daneshvar *et al.*, 2003). Les infections décrites sont des bactériémies, des infections de la peau et des tissus mous (Funke *et al.*, 2004), des péritonites en contexte de dialyse péritonéale ambulatoire (Wallet *et al.*, 2010 ; Palamuthusingam & Tan, 2014), des infections oculaires (uvéites, kératites pouvant aboutir à un rejet de greffon cornéen) (Drancourt *et al.*, 2008 ; Kanis *et al.*, 2010 ; Courjaret *et al.*, 2014), une arthrite (Coiffier *et al.*, 2013) et une myocardite post-transplantation (Schweiger *et al.*, 2011). Très récemment, une nouvelle espèce de *Paracoccus*, *Paracoccus sanguinis* a été décrite à partir d'isolats sanguins (McGinnis *et al.*, 2015). Des séquences d'ADNr 16S 100% identiques à celle de *Paracoccus marcusii* ont également été détectées dans des ganglions lymphatiques intestinaux (Chiba *et al.*, 2000).

Les bactéries du genre *Paracoccus* sont des bactéries immobiles, à coloration de Gram négative, de morphologie coccoïde ou coccobacillaire, le plus souvent disposées par paires. Les cellules peuvent présenter une coloration périphérique du fait d'une vacuole non colorée interne bien que ce ne soit pas le cas pour tous les isolats décrits (Funke *et al.*, 2004 ; Kanis *et al.*, 2010). Sur gélose au sang, les colonies obtenues sont non pigmentées, de couleur gris-blanc, mucosides à très mucosides après 48 h d'incubation. *P. yeei* est décrit comme cultivant sur gélose MacConkey ; cependant, des isolats récemment rapportés n'ont montré qu'une culture très faible après 72 h d'incubation sur ce milieu (Funke *et al.*, 2004). Oxydase, catalase et uréase sont détectées. *P. yeei* ne produit pas d'indole et n'hydrolyse ni la gélatine, ni l'esculine. Ces bactéries utilisent le glucose par voie oxydative mais ne sont pas capables de le fermenter. Les galeries API (NH ou 20 NE) fournissent des identifications erronées (Funke *et al.*, 2004) tandis que des identifications de *P. yeei* obtenues par la carte VITEK 2 GN (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France) ou spectrométrie de masse ont été confirmées par séquençage de l'ADNr 16S (Wallet *et al.*, 2010 ; données personnelles).

P. yeei est sensible aux b-lactamines (ampicilline, ampicilline-sulbactam, amoxicilline-acide clavulanique, pipéracilline-tazobactam, céfazoline, céfuroxime, céfépime, ceftazidime, céfator, imipénème et méropénème), aux aminosides (gentamicine, amikacine, tobramycine), à la doxycycline et aux fluoroquinolones (ciprofloxacine et ofloxacine) (Funke *et al.*, 2004). Toutefois, les valeurs de CMI des C3G sont plus élevées que celles des aminopénicillines et des carbapénèmes (Wallet *et al.*, 2010).

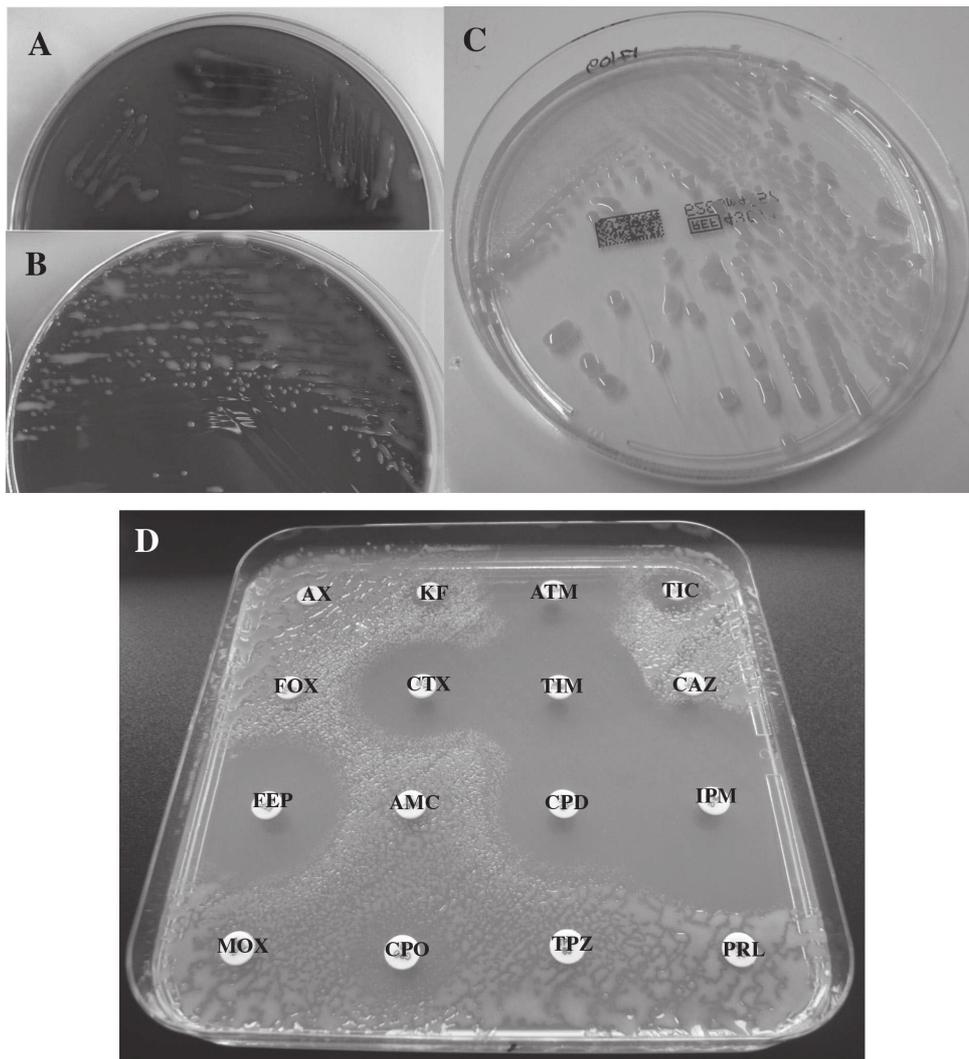
Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhodospirillales; Acetobacteraceae

Roseomonas

Le genre *Roseomonas* a été décrit en 1993. Parmi la vingtaine d'espèces décrites dans ce genre, cinq ont actuellement été impliquées dans des cas d'infections chez l'homme : *Roseomonas cervicalis*, *Roseomonas gilardii*, *Roseomonas mucosa*, *Roseomonas ludipueritiae* et *Roseomonas rosea*, les deux espèces les plus souvent impliquées étant *R. mucosa* (60 à 90% des isolats identifiés par méthode moléculaire selon les études) puis *R. gilardii*. L'habitat de ces espèces est l'environnement, principalement hydrique et tellurique, certaines espèces étant également associées aux plantes. L'origine endogène de certaines infections dues à des bactéries du genre *Roseomonas* qui feraient partie des microbiotes humains a également été suggérée (Struthers *et al.*, 1996). *R. mucosa* pourrait ainsi faire partie du microbiote cutané (données personnelles). À l'inverse, plusieurs isolats de *Roseomonas* sp. ont été identifiés par méthode moléculaire dans les sécrétions respiratoires de patients atteints de mucoviscidose et la proximité observée entre les séquences de ces souches et celles d'espèces environnementales suggère l'origine exogène de la colonisation respiratoire chez ces patients (données personnelles).

Les bactéries du genre *Roseomonas* sont des pathogènes opportunistes rarement décrits dans des cas d'infections humaines mais le nombre de descriptions est en augmentation ces dernières années. Ces bactéries sont généralement considérées comme peu virulentes bien que des infections sévères ont été décrites chez des patients immunodéprimés. Les bactériémies liées aux cathéters sont les infections les plus fréquemment rapportées (Dé *et al.*, 2004 ; Michon *et al.*, 2014), les infections plus rares étant des péritonites, ostéomyélites et arthrites, endophtalmies, cellulites, ventriculites, kératites et infections de la peau et des tissus mous dont un cas d'abcès post-opératoire (Wang *et al.*, 2012 ; Ece *et al.*, 2013). Ces infections sont de présentation clinique et de sévérité variables et surviennent principalement chez des adultes ou des enfants immunocompromis et/ou ayant des affections sous-jacentes chroniques (leucémie aiguë, cancer, arthrite rhumatoïde, ...) et/ou du matériel implanté ; elles sont majoritairement associées aux soins. Cependant, environ un tiers des infections ne sont pas décrites dans ces contextes. L'évolution des infections est le plus souvent favorable malgré une antibiothérapie inefficace dans certains cas et le retrait d'un cathéter infecté permet parfois, à lui seul, la résolution de l'infection.

Les bactéries du genre *Roseomonas* sont des coccobacilles à Gram négatif non fermentants dont la culture est lente (2-3 jours minimum), donnant des colonies pigmentées en rose. La culture peut être obtenue sur géloses au sang ou gélose chocolat, sur gélose BCYE, trypticase soja et presque toujours (91%) sur gélose MacConkey ; les colonies sont le plus souvent mucosides sur gélose au sang et gélose chocolat (Figure 3). Les tests de recherche de l'oxydase peuvent être faiblement positifs ou négatifs, catalase et uréase sont produites par les isolats. L'identification de l'espèce nécessitera d'utiliser des méthodes de biologie moléculaire (séquençage de l'ARNr 16S), les méthodes phénotypiques ne permettant au mieux qu'une identification du genre. Dans certains cas, elles sont toutefois prises en défaut pour l'identification de genre également (affiliation erronée au genre *Methylobacterium* le plus souvent) (Fanella *et al.*, 2009 ; Dien Bard *et al.*, 2010).

Figure 3. Aspect des bactéries du genre *Roseomonas* en culture sur différents milieux et profil de résistance aux b-lactamines.

A, B et C. Colonies pigmentées en rose et mucoides de *Roseomonas* sur gélose au sang (A), gélose chocolat (B) et gélose Mueller Hinton (C).
D. Phénotype de résistance aux b-lactamines.

Le profil de résistance aux antibiotiques est variable selon l'espèce considérée et *R. mucosa* est l'espèce présentant la résistance la plus importante aux antibiotiques (Han *et al.*, 2003 ; Wang *et al.*, 2012 ; Michon *et al.*, 2014). *R. mucosa* est résistant à l'ampicilline, à la pipéracilline-tazobactam, à la plupart des céphalosporines (ceftazidime, céfépime) et à la colistine et fréquemment résistant à la ceftriaxone (68% des isolats) et au triméthoprim-sulfaméthoxazole (77% des isolats). L'espèce est sensible aux aminosides (amikacine, gentamicine) et aux fluoroquinolones (lévofloxacine, ciprofloxacine) et fréquemment sensible à la ticarcilline-acide clavulanique (77% des isolats) et à l'imipénème (95% des isolats).

**Proteobacteria; Alphaproteobacteria;
 Sphingomonadales; Sphingomonadaceae**

Sphingomonas

Le genre *Sphingomonas*, décrit en 1990 (Yabuuchi *et al.*, 1990), comprend plus de trente espèces présentes dans le sol

et différents types d'eau incluant celle des piscines et de l'environnement hospitalier. L'espèce la plus connue mais aussi la plus fréquemment isolée au laboratoire est *Sphingomonas paucimobilis* (anciennement *Pseudomonas paucimobilis*), dont la nomenclature vient du flagelle unique qui confère à cette espèce une faible mobilité. Parmi les autres espèces du genre, *Sphingomonas parapaucimobilis* a été isolée d'expectorations, d'urines et d'échantillons vaginaux, *Sphingomonas mucosissima* a été impliquée dans un cas de bactériémie chez un patient drépanocytaire (Angelakis *et al.*, 2009) et *Sphingomonas koreensis*, décrite en 2001, a très récemment été impliquée dans un cas de méningite (Marbjerg *et al.*, 2015).

En ce qui concerne *S. paucimobilis*, les isolats sont, le plus souvent, à considérer comme des colonisateurs ou des contaminants ; quand ils sont impliqués dans une infection, leur virulence est considérée comme faible, aucun cas d'infection entraînant le décès des patients n'ayant été décrit dans la littérature. Ces infections sont principalement associées aux soins, survenant chez des patients immunodéprimés et les cas d'infections

communautaires et/ou touchant des patients immunocompétents sont rares (Souto *et al.*, 2012 ; Pascale *et al.*, 2013 ; Gil-Diaz *et al.*, 2014). Ces infections incluent des péritonites survenant chez des patients dialysés, des bactériémies et sepsis, des méningites, des infections ostéo-articulaires, des endophtalmies, des ulcères de jambe, des empyèmes et des abcès hépatique et du cerveau (Al-Said *et al.*, 2013 ; Del Borgo *et al.*, 2013). Des épidémies d'infections ou de colonisations associées aux soins dues à *S. paucimobilis* ont également été documentées chez des patients immunodéprimés hospitalisés dans des services d'hématologie-oncologie ou de réanimation, y compris néo-natale ; il s'agit essentiellement de bactériémies et de sepsis causés par de l'eau ou des solutions contaminées (réseau d'eau hospitalier, eau distillée, solution d'hémodialyse, solutions médicamenteuses stériles comme des immunoglobulines humaines) (Lemaitre *et al.*, 1996 ; Perola *et al.*, 2002 ; Kilic *et al.*, 2007 ; Meric *et al.*, 2009 ; Ryan & Adley, 2010 ; Mutlu *et al.*, 2011). Les méthodes de typage utilisées pour les investigations sont l'AP-PCR (Lemaitre *et al.*, 1996), la RAPD (Perola *et al.*, 2002) et l'électrophorèse en champ pulsé (Kilic *et al.*, 2007 ; Meric *et al.*, 2009 ; Mutlu *et al.*, 2011).

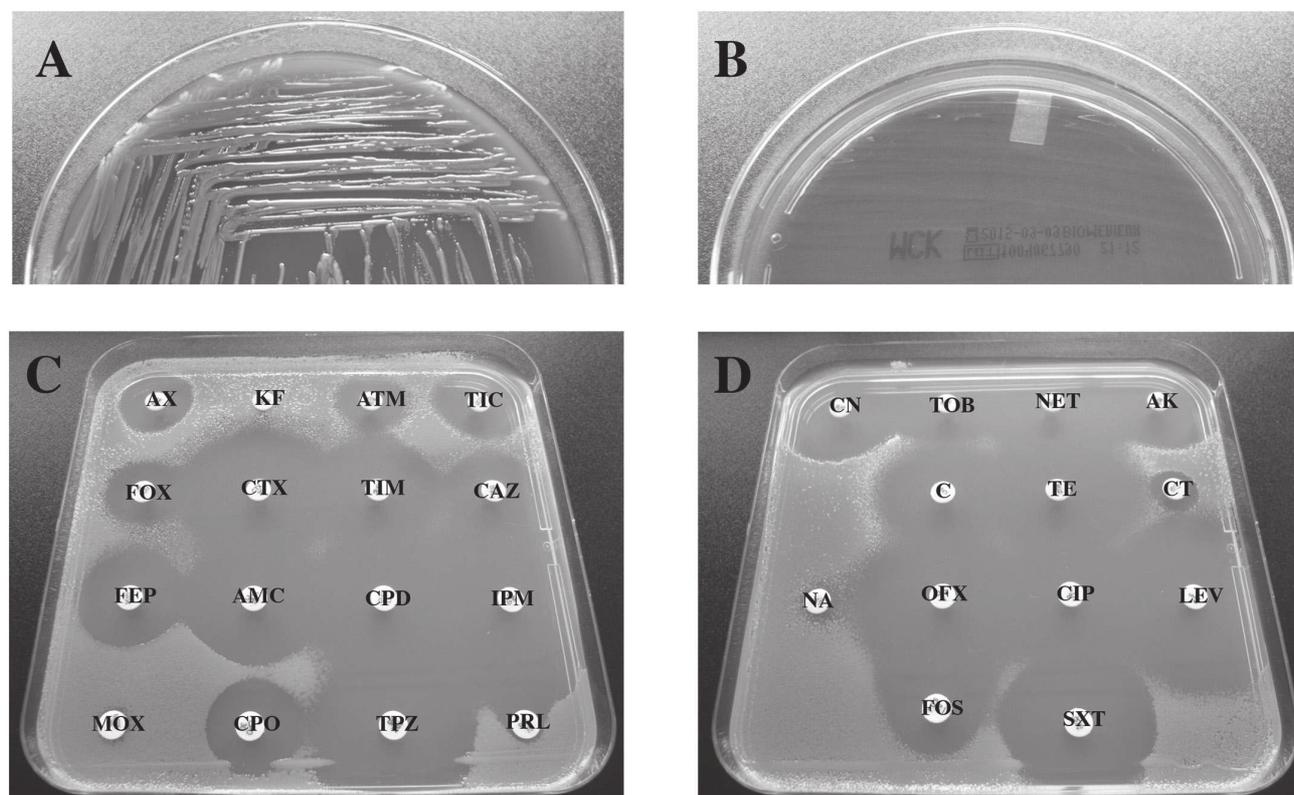
Les bactéries du genre *Sphingomonas* présentent de nombreux facteurs de virulence communs avec celles des genres *Pseudomonas*, *Legionella*, *Brucella* et *Bordetella*, tels que des facteurs d'adhésion, des sidérophores, des protéases, des facteurs anti-phagocytaires et de quorum sensing. Ces facteurs, probablement acquis par transfert latéral, font de *Sphingomonas* un pathogène opportuniste potentiellement virulent (Saeb *et al.*,

2014). La membrane externe de cette bactérie est atypique, ne comprenant pas de lipopolysaccharide (LPS), et il a été suggéré que ceci pourrait expliquer la faible virulence de la bactérie ; toutefois, des chocs septiques sont décrits (Lin *et al.*, 2010a) et les glycosphingolipides présents semblent avoir une fonction similaire à celle du LPS des autres bactéries à Gram négatif (Kawasaki *et al.*, 2014).

S. paucimobilis est un BGN-NF strictement aérobie, non sporulé, mobile de 18 à 22 °C mais immobile à 37 °C. La majorité des souches (90%) ne cultive pas sur gélose MacConkey. Les colonies obtenues sur gélose au sang sont pigmentées en jaune (Figure 4). La température optimale de croissance est de 30 °C et, à 37 °C, la culture n'est le plus souvent obtenue qu'après 48 h d'incubation. La recherche de l'oxydase est le plus souvent positive (90-94% des isolats) même si le test peut être faiblement positif. La bactérie possède une catalase et hydrolyse l'esculine. Elle ne possède pas d'uréase et ne produit pas d'indole. Si certains isolats de *S. paucimobilis* peuvent être correctement identifiés par API 20 NE et Vitek 2, les méthodes biochimiques d'identification peuvent également conduire à des identifications erronées de *S. paucimobilis* pour d'autres bactéries (Risch *et al.*, 2010 ; Mohan & Railey, 2015).

Bien qu'il est difficile de comparer des profils de sensibilité de souches n'ayant pas été identifiées par méthode moléculaire ou spectrométrie de masse, des phénotypes de résistance aux antibiotiques variés sont décrits dans la littérature, notamment vis-à-vis des antibiotiques utilisés pour traiter les infections

Figure 4. Caractéristiques culturelles de *Sphingomonas paucimobilis* et profil de résistance aux antibiotiques.



A. Colonies pigmentées en jaune vif sur gélose au sang.
B. Absence de culture sur gélose MacConkey.
C. Phénotype de résistance aux b-lactamines.
D. Phénotype de résistance aux antibiotiques autres que les b-lactamines.

sévères à bacilles à Gram négatif comme les céphalosporines de troisième génération, les aminosides ou les fluoroquinolones. Il convient donc de réaliser un antibiogramme sur les souches isolées lors de processus infectieux (Bayram *et al.*, 2013 ; Pascale *et al.*, 2013). *S. paucimobilis* est sensible à la colistine. Les pourcentages d'isolats sensibles vis-à-vis de divers antibiotiques sont les suivants : imipénème, 81-94,5% ; céphalosporines de troisième génération, 76-80% ; pipéracilline-tazobactam, 73-81% ; aminosides, 75-91% ; fluoroquinolones, 74,5-93% et triméthoprime-sulfaméthoxazole, 84% (Lin *et al.*, 2010a ; Toh *et al.*, 2011 ; Bayram *et al.*, 2013).

Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales

Dans cet ordre, trois familles comprennent des BGN-NF responsables d'infections chez l'homme, les familles *Alcaligenaceae*, *Comamonadaceae* et *Oxalobacteraceae*. Parmi les genres impliqués, *Achromobacter* est le plus fréquemment isolé.

Famille Alcaligenaceae

Achromobacter

Le genre *Achromobacter* a été décrit en 1981 par Yabuuchi et Yano et contenait originellement uniquement l'espèce *Achromobacter xylosoxidans* (anciennement *Alcaligenes xylosoxidans* (Yabuuchi & Yano, 1981)). Les espèces *Alcaligenes piechaudii*, *Alcaligenes ruhlandii* et *Alcaligenes denitrificans* ont par la suite également été reclassées dans le genre *Achromobacter* et ce genre comprend actuellement 15 espèces validement publiées dont plus de la moitié a été décrite au cours des cinq dernières années : *Achromobacter aegrifaciens*, *Achromobacter animicus*, *Achromobacter anxifer*, *Achromobacter denitrificans*, *Achromobacter dolens*, *Achromobacter insolitus*, *Achromobacter insuavis*, *Achromobacter marplatensis*, *Achromobacter mucicolens*, *Achromobacter piechaudii*, *Achromobacter pulmonis*, *Achromobacter ruhlandii*, *Achromobacter spanius*, *Achromobacter spiritinus* et *A. xylosoxidans* (Yabuuchi & Yano, 1981 ; Coenye *et al.*, 2003b ; Vandamme *et al.*, 2013a ; Vandamme *et al.*, 2013b). Des travaux récents suggèrent toutefois que les espèces *A. spiritinus* et *A. marplatensis* pourraient en fait correspondre à une seule espèce (Gomilla *et al.*, 2014).

Bien que décrits dans des sols particulièrement pollués, les eaux et les plantes, l'habitat d'*Achromobacter* spp. n'est pas clairement défini. Au niveau domestique, certaines espèces ont été isolées à partir de l'eau d'une piscine intérieure, ainsi que de tuyaux d'évacuation (Holmes *et al.*, 1977 ; Amoureux *et al.*, 2013b). En milieu hospitalier, *Achromobacter* sp. a notamment été isolé de distributeurs de papiers désinfectants, de diverses solutions désinfectantes, d'eau distillée et d'eau de fauteuils de centres de soins dentaires (Holmes *et al.*, 1977 ; Vu-Thien *et al.*, 1998 ; Molina-Cabrillana *et al.*, 2007 ; Liaqat & Sabri, 2009 ; Kampf *et al.*, 2014 ; Abdouchakour *et al.*, 2015). Des isolats humains appartenant aux quinze espèces d'*Achromobacter* sont décrits dans la littérature. Au sein des espèces décrites récemment, les espèces *A. animicus*, *A. mucicolens*, *A. spiritinus* et *A. dolens* n'ont d'ailleurs été isolées que d'échantillons humains à ce jour. Quatorze des espèces du genre *Achromobacter* ont été identifiées dans les sécrétions respiratoires de patients atteints de mucoviscidose. *A. marplatensis* n'a été isolé que chez des pa-

tients atteints de mucoviscidose et, à l'inverse, *A. piechaudii* n'a été identifié que chez des patients non atteints de mucoviscidose.

Le genre *Achromobacter* comprend des pathogènes opportunistes impliqués dans divers cas d'infections humaines. Ce sont communément des cas d'infections associées aux soins faisant généralement suite à une chirurgie ou ayant un matériel comme porte d'entrée : bactériémie sur cathéter, endocardite sur valve prothétique, péritonite chez des patients en dialyse péritonéale, ... (Aisenberg *et al.*, 2004 ; Melgosa *et al.*, 2004 ; Tena *et al.*, 2005 ; Ahmed *et al.*, 2009 ; Cankaya *et al.*, 2014 ; Hugon *et al.*, 2015). Certaines épidémies ont été décrites, ayant des liquides de soins ou de diagnostic comme sources de contamination (solutions désinfectantes, gel pour échographie, ...) (Hugon *et al.*, 2015 ; Molina-Cabrillana *et al.*, 2007 ; Olshtain-Pops *et al.*, 2011). Ainsi, ont récemment été décrites deux épidémies de bactériémies chez des patients immunocompromis, l'une en unité néonatale de soins intensifs (Turel *et al.*, 2013), l'autre en service d'oncologie-hématologie pédiatrique impliquant une souche ayant une capacité de survie accrue dans les solutions désinfectantes (Hugon *et al.*, 2015). Les cas d'infections impliquent majoritairement l'espèce *A. xylosoxidans* devant *A. denitrificans* (péritonite chez dialysés péritonéaux, abcès rénal) (Sgrella *et al.*, 2012 ; Tsai *et al.*, 2012 ; Cankaya *et al.*, 2014) et *A. piechaudii* isolée lors de bactériémies (Kay *et al.*, 2001 ; Krause *et al.*, 2012) ainsi que d'échantillons pharyngés et de plaies. Toutefois, l'identification n'a pas toujours été conduite à l'aide de méthodes moléculaires adaptées permettant de reconnaître les espèces du genre autres qu'*A. xylosoxidans*.

Le genre *Achromobacter* est considéré comme émergent chez les patients à haut risque infectieux : affections malignes, neutropéniques, brûlés, ... (Gómez-Cerezo *et al.*, 2003 ; Ng *et al.*, 2014 ; Tena *et al.*, 2014) mais aussi chez patients atteints de mucoviscidose qu'il colonise de manière chronique (Mahenthiralingam, 2014) et chez lesquels sa prévalence a augmenté ces dernières années (augmentation de 8,5 à 16% de patients colonisés dans un centre italien entre 2005 et 2010 (Trancassini *et al.*, 2014)). Plusieurs études décrivent des acquisitions sporadiques suggérant une origine domestique environnementale de la bactérie ; certains cas de contaminations croisées entre patients atteints de mucoviscidose ont également été décrits (Ridderberg *et al.* 2011 ; Amoureux *et al.* 2013a ; Hansen *et al.*, 2013).

Le taux de mortalité en cas de bactériémie varie de 13,6 à 48% (Shie *et al.*, 2005 ; Turel *et al.*, 2013), la sévérité des infections étant le plus souvent attribuée au terrain débilisé de l'hôte plus qu'à la virulence de la souche, les bactéries du genre *Achromobacter* ayant pendant longtemps été considérées comme peu virulentes. Elles ont toutefois assez fréquemment la capacité à former du biofilm ; certains clones ont également associés à un déclin plus important de la fonction respiratoire que d'autres chez les patients atteints de mucoviscidose. La comparaison d'isolats environnementaux et d'échantillons respiratoires de patients atteints de mucoviscidose a permis de mettre en évidence, chez les souches cliniques, des caractéristiques génomiques particulières permettant l'adaptation à un style de vie pathogène (présence d'un système de sécrétion de type III, de toxines, ainsi qu'un « ilot polysaccharidique » pour la synthèse de capsule) (Li *et al.*, 2013). Enfin, un niveau d'inflammation similaire à celui généré par *P. aeruginosa* a été démontré chez des patients atteints de mucoviscidose et colonisés au long cours par *Achromobacter* (Hansen *et al.*, 2010).

Les bactéries du genre *Achromobacter* sont des BGN-NF droits, non sporulés, aérobies strict, mobiles grâce à une ciliature péritriche (Holmes *et al.*, 1977) mais celle-ci peut être dégénérée ne laissant subsister qu'un ou deux flagelles latéraux ou polaires. Non exigeants, ils cultivent sur différents types de milieux comme des milieux pauvres et la gélose MacConkey mais seules certaines espèces sont capables de pousser sur gélose cétrimide. Les colonies ne sont pas pigmentées et toutes les espèces sont capables de croître en présence de 1,5% de NaCl. En revanche, toutes les espèces ne cultivent pas en présence de xylose ou de 4,5% de NaCl et toutes n'assimilent pas le glucose (Vandamme *et al.* 2013a ; Vandamme *et al.*, 2013b). La recherche d'une oxydase et d'une activité catalasique sont positives. La spectrométrie de masse et le séquençage de l'ADNr 16S sont des méthodes fiables pour l'identification du genre *Achromobacter* mais trop peu discriminantes pour permettre une identification fiable de l'espèce (Almuzara *et al.*, 2015 ; Rodrigues *et al.*, 2015). Un schéma MLST pour l'identification d'espèce a été proposé en 2012 basé sur le séquençage des gènes domestiques *nrda*, *lepA*, *nusA*, *rpoB*, *nuoL*, *eno* et *gltB* (Spilker *et al.*, 2012). Les mêmes auteurs ont publié plus récemment que le séquençage du gène *nrda* (765bp) permettait, à lui seul, une identification d'espèce fiable au sein du genre *Achromobacter* (Spilker *et al.*, 2013). Cette approche, utilisée pour identifier les espèces isolées chez les patients atteints de mucoviscidose, a permis de préciser leur implication relative (notamment celle d'*A. insuavis* et d'*A. dolens* comparativement à *A. xylosoxidans*) dans différents pays et a révélé plusieurs espèces encore non décrites dans le genre (Coward *et al.*, 2015). Certaines approches basées sur l'amplification et le séquençage des gènes *bla*_{OXA} codant des b-lactamases de classe D considérées comme spécifiques d'espèce (*bla*_{OXA-258} et *A. ruhlandii* ; *bla*_{OXA-114} et *bla*_{OXA-114}-like et *A. xylosoxidans*) ont également été proposées pour l'identification de certaines espèces du genre (Turton *et al.*, 2011 ; Papalia *et al.*, 2013).

Le typage moléculaire d'*Achromobacter* sp. peut être effectué en utilisant le MLST, la rep-PCR ou l'électrophorèse en champ pulsé (Spilker *et al.*, 2012 ; Amoureux *et al.*, 2013a ; Dupont *et al.*, 2015). Deux études ont démontré que les résultats de typage par électrophorèse en champ pulsé étaient identiques que l'on utilise l'enzyme *SpeI* ou *XbaI* mais que les résultats obtenus étaient d'interprétation plus aisée avec *SpeI*, les profils présentant un nombre de fragments d'ADN plus faible (Dupont *et al.*, 2015 ; Ridderberg *et al.*, 2011). Une approche de multiplex-rep PCR combinant les amorces permettant d'amplifier les séquences répétées ERIC, REP et BOX est également discriminante pour comparer des isolats cliniques (Dupont *et al.*, 2015).

A. xylosoxidans et *A. denitrificans* sont naturellement résistants à de nombreuses céphalosporines (céfalotine, céfoxitine, céfuroxime, céfotaxime, ceftriaxone, céfépime), à l'aztréonam, aux aminosides, au triméthoprime, à la fosfomycine, ainsi qu'à certaines quinolones (Philippon, 2006). Ainsi, le phénotype sauvage de ces espèces d'*Achromobacter* vis-à-vis des b-lactamines se caractérise par une sensibilité aux pénicillines (ticarcilline et pipéracilline notamment), à la ceftazidime, au moxalactam et à l'imipénème, et une résistance aux céphalosporines citées ci-dessus, un phénotype relativement rare, également observé pour *Bordetella bronchiseptica*. La b-lactamase de classe D OXA-114 produite par *A. xylosoxidans* ne semble pas jouer un rôle majeur dans la résistance naturelle de cette espèce aux b-lactamines (Doi *et al.*, 2008). Une sensibilité naturelle à la cipro-

floxaciné et à l'association triméthoprime-sulfaméthoxazole est également notée.

La résistance acquise est largement rapportée chez *Achromobacter* par production de différentes b-lactamases plasmidiques ou transposables (CARB, PSE, ...) mais aussi par hyperproduction de la b-lactamase naturelle. Des isolats multirésistants présentant une résistance à la ceftazidime et à l'imipénème sont aussi décrits, notamment chez les patients atteints de mucoviscidose, compliquant encore les options thérapeutiques (Yamamoto *et al.*, 2012 ; El Salabi *et al.*, 2012). Ainsi, une souche isolée d'un patient atteint de mucoviscidose possédant une b-lactamase à spectre étendu (BLSE) transférable de type VEB-1, ainsi que des souches produisant des métallo-β-lactamases transférable de classe B, comme IMP-1, IMP-2, IMP-10 ou VIM-1, déjà identifiées chez *P. aeruginosa*, ont été décrites (Riccio *et al.*, 2001 ; Iyobe *et al.*, 2002 ; Sofianou *et al.*, 2005). Les mécanismes de résistance naturelle et acquise aux autres familles d'antibiotiques, ainsi que ceux présentés par les autres espèces du genre sont encore peu explorés.

Les agents considérés comme les plus actifs sur *Achromobacter* spp. sont la pipéracilline-tazobactam, le mérépénème et le triméthoprime-sulfaméthoxazole. Concernant les céphalosporines, la ceftazidime est plus active que le céfépime mais plusieurs études rapportent des résistances élevées d'*A. xylosoxidans* à la ceftazidime chez les patients atteints de mucoviscidose et il est probable que l'exposition fréquente de ces patients à cette molécule prescrite contre *P. aeruginosa* soit à l'origine de ces résistances (Saiman *et al.*, 2001 ; Barrado *et al.*, 2013). Les aminosides, les fluoroquinolones, la fosfomycine et l'aztréonam ont tous une activité médiocre sur ce genre. Les tétracyclines ont une activité variable mais sont vulnérables aux pompes à efflux et, au sein de cette classe, la tigécycline a très peu d'effet (Abbott & Peleg, 2015).

Il n'y a pas de thérapie optimale pour traiter les infections à *Achromobacter* sp. Les infections pulmonaires sont difficiles à traiter ; néanmoins, les souches répondent généralement bien aux pénicillines à spectre étendu comme la ticarcilline et la pipéracilline, ainsi qu'aux céphalosporines (Swenson & Sadikot, 2015). Au vu de toutes les résistances possiblement acquises venant se surajouter aux résistances naturelles, la réalisation d'un antibiogramme pour déterminer ou ajuster le traitement d'une infection à *Achromobacter* sp. est nécessaire. Une association d'antibiotiques est recommandée pour le traitement des exacerbations pulmonaires à *Achromobacter* sp. chez les patients atteints de mucoviscidose (Gibson *et al.*, 2003) et l'utilisation simultanée d'antibiotiques inhalés, comme la colistine, peut également être envisagée (Biswas *et al.*, 2013).

Alcaligenes

La taxonomie du genre *Alcaligenes* s'entrecroise avec celle du genre *Achromobacter*, plusieurs espèces d'*Alcaligenes* ayant été reclassées dans le genre *Achromobacter* (Yabuuchi *et al.*, 1983). Le genre *Alcaligenes* comprenait initialement une quinzaine d'espèces, il est actuellement restreint à deux : *Alcaligenes aquatilis* et *Alcaligenes faecalis* (*A. faecalis* subsp. *faecalis*, *A. faecalis* subsp. *parafaecalis* et *A. faecalis* subsp. *phenolicus*). *A. faecalis* est la seule espèce isolée d'échantillons d'origine humaine. Elle est présente dans l'eau et le sol et est isolée au cours de nombreuses situations cliniques. Les infections sont principa-

lement opportunistes, généralement acquises à partir d'éléments humides comme des nébuliseurs, des respirateurs et des liquides de lavage mais *A. faecalis* a également été isolé au cours de rares cas d'infections de la peau et des tissus mous, d'endophtalmies, d'infections de cathéters et de bactériémies (Tena *et al.*, 2015 ; Pal *et al.* 2013 ; Alkindi *et al.* 2012 ; Aisenberg *et al.*, 2004). Récemment décrit comme un pathogène nosocomial émergent (Asaad *et al.*, 2013), il est aussi souvent isolé au cours de co-infections comme des ulcères du pied diabétique mais son implication clinique est difficile à déterminer dans ces situations.

Ce sont des bacilles droits, à Gram négatif, aérobies stricts, non sporulés et mobiles. Non exigeants, ils poussent aisément sur gélose MacConkey en formant des colonies non pigmentées avec un bord mince et irrégulier. Ils possèdent une oxydase et une catalase. La caractéristique biochimique clé de *A. faecalis* subsp. *faecalis* est sa capacité à réduire les nitrites et non les nitrates. *A. faecalis* subsp. *faecalis* est subdivisée en deux types coloniaux, l'un correspondant à l'ancien « *Alcaligenes odorans* » ayant une odeur fruitée et provoquant un verdissement de la gélose au sang, et l'autre, à *A. faecalis* de type II n'ayant pas ces propriétés. *A. faecalis* subsp. *parafoecalis* se différencie de *A. faecalis* subsp. *faecalis* par l'absence de réduction des nitrites et la production d'une gélatinase à 37 °C (Schroll *et al.*, 2001).

Les bactéries du genre *Alcaligenes* sont résistantes à de nombreux antibiotiques ; parmi les bêta-lactamines, ils sont généralement résistants à l'amoxicilline, la ticarcilline, l'aztréonam, et parmi les fluoroquinolones, ils ne sont sensibles qu'à la ciprofloxacine. Actuellement, les carbapénèmes, les pénicillines antipycyaniques et le triméthoprime-sulfaméthoxazole sont considérés comme les molécules de choix pour le traitement des infections à *A. faecalis* (Aisenberg *et al.*, 2004 ; Tena *et al.*, 2015).

Kerstersia

Le genre *Kerstersia* a été créé en 2003 et regroupe des espèces proches phénotypiquement d'autres *Alcaligenaceae* comme *Alcaligenes faecalis*. Le genre comprend à ce jour deux espèces, *Kerstersia gyiorum* et *Kerstersia similis*, toutes deux isolées d'échantillons cliniques humains (Coenye *et al.*, 2003a ; Vandamme *et al.*, 2012). *K. gyiorum* a été isolée de selles, de diverses plaies (jambe, hanche), du tractus respiratoire (expectorations et liquides de lavage broncho-alvéolaire), d'otites chroniques et de mastoïdite (Coenye *et al.*, 2003a ; Almuzara *et al.*, 2012b ; Pence *et al.*, 2013 ; Mwalutende *et al.*, 2014). Récemment, un cas de bactériémie due à *K. gyiorum* a été rapporté chez une patiente avec des ulcères de jambe importants (Bostwick *et al.*, 2015). *Kerstersia similis* a été isolée de plaies de jambe et d'un abcès cervical (Coenye *et al.*, 2003a ; Vandamme *et al.*, 2012). Bien que leur rôle pathogène est suspecté dans certains cas cliniques, elles ne sont le plus souvent pas isolées en culture monomicrobienne.

De sont des coccobacilles à Gram négatif non fermentants, isolés ou disposés en paires ou courtes chaînettes. La mobilité est variable selon la souche considérée. La culture est positive sur divers milieux nutritifs et sur gélose MacConkey. Sur gélose au sang, les colonies sont plates ou légèrement convexes, opaques, de couleur blanche, grise ou marron clair à bord irrégulier. Sur gélose MacConkey, des colonies ne fermentant pas le lactose, pouvant être de couleur lavande, sont observées. Des

illustrations de coloration de Gram et des colonies obtenues sur diverses géloses sont disponibles dans les articles de Pence et collaborateurs (Pence *et al.*, 2013) et de Deutscher et collaborateurs (Deutscher *et al.*, 2014). A l'exception de la catalase, la plupart des tests d'identification sont négatifs : oxydase, lysine et ornithine décarboxylases, arginine dihydrolase, b-galactosidase, gélatinase, uréase, DNase, réduction des nitrates et hydrolyse de l'esculine. La culture est obtenue après 24 h d'incubation à une température de 28 à 42 °C.

Les caractères phénotypiques de *Kerstersia* spp. sont très proches de ceux d'*Alcaligenes faecalis* mais cette dernière espèce possède une oxydase et peut présenter une odeur fruitée contrairement à *Kerstersia* spp. *K. similis*, nommée ainsi sur la base de similarités importantes avec *K. gyiorum*, ne peut en être distinguée par des caractéristiques biochimiques (Vandamme *et al.*, 2012). La distinction avec d'autres membres de la famille *Alcaligenaceae*, *Alcaligenes*, *Bordetella* et *Achromobacter*, est également difficile (Almuzara *et al.*, 2012b). Les systèmes biochimiques d'identification ont fourni des identifications erronées dans les différents cas cliniques décrits, les bactéries du genre *Kerstersia* ne faisant pas partie des bases de données de ces systèmes. En ce qui concerne la spectrométrie de masse, seule une base de donnée comprend l'espèce *K. gyiorum* tandis que *K. similis* n'est présente dans aucune des bases de données. Il est donc, à ce jour, impossible de connaître la fiabilité d'une identification de *K. gyiorum* par MALDI-TOF. Le séquençage de l'ARNr 16S, bien qu'utilisé dans certains cas cliniques pour l'identification de la souche en cause, n'est pas non plus décrit comme permettant la distinction des deux espèces du genre qui doit faire appel au séquençage du gène *gyrB* (Vandamme *et al.*, 2012).

La majorité des isolats de *Kerstersia* sp. est sensible à la plupart des antibiotiques (b-lactamines, aminosides, triméthoprime-sulfaméthoxazole, minocycline), profil aidant à leur différenciation des autres *Alcaligenaceae*, notamment du genre *Achromobacter*. Une sensibilité variable selon l'isolat est décrite à la pénicilline G et à la ciprofloxacine (Coenye *et al.*, 2003a ; Pence *et al.*, 2013 ; Deutscher *et al.*, 2014). Toutefois, le seul isolat sanguin présente un profil atypique par rapport à l'ensemble des autres isolats décrits à ce jour, avec une résistance à la pipéracilline-tazobactam, à la ceftazidime et au céfépime, et une sensibilité intermédiaire au céfotaxime (Bostwick *et al.*, 2015).

Oligella

Créé en 1987, le genre *Oligella* contient deux espèces, *Oligella urethralis* (anciennement *Moraxella urethralis*) et *Oligella ureolytica* (anciennement CDC group IVe), toutes deux isolées chez l'homme (Rossau *et al.*, 1987) chez lequel elles sont commensales du tractus urogénital.

Les infections par ces bactéries sont rares (Baqi & Mazzulli, 1996). *O. urethralis* a été impliquée dans des cas de bactériémie à porte d'entrée urinaire, d'arthrite septique mimant une arthrite gonococcique et de péritonite chez des patients en dialyse péritonéale ambulatoire (Graham *et al.*, 1990 ; Mesnard *et al.*, 1992 ; Pugliese *et al.*, 1993 ; Riley *et al.*, 1996). *O. ureolytica* est, quant à elle, préférentiellement isolée d'infections du tractus urinaire, le plus souvent chez des patients appareillés (cathéter de Foley, ...) (Welch *et al.*, 1983). Ces patients ont tendance à développer des calculs urinaires en lien avec la capacité de la bactérie à

hydrolyser l'urée et à alcaliniser les urines entraînant la précipitation des phosphates. Un cas d'adénopathie cervicale (Baqi & Mazzulli, 1996) et des isolats auriculaires, respiratoires, sanguins et de plaies ont été décrits (Klinger & Thomassen, 1985 ; Demir & Celenk, 2014). Ces pathogènes opportunistes causent des infections majoritairement chez des patients adultes et présentant des comorbidités (cancer, infection par le VIH, obstruction sur les voies urinaires, ...) bien qu'un cas de bactériémie néonatale est décrit (Demir & Celenk, 2014). L'évolution des infections à *Oligella* spp. décrites à ce jour est favorable (Baqi & Mazzulli, 1996).

Ce sont des coccobacilles de petite taille, aérobies stricts et non glucidolytiques. *O. urethralis* est immobile alors que la plupart des souches d'*O. ureolytica* sont mobiles par des flagelles péritriches. Elles cultivent sur gélose MacConkey. Des colonies non hémolytiques de petite taille sont obtenues sur gélose au sang. Ces bactéries possèdent une oxydase, une catalase et une phénylalanine désaminase. La rapidité de la détection de l'activité uréasique (5 min), ainsi que la capacité à réduire les nitrates, permettent de distinguer *O. ureolytica* d'*O. urethralis*. La plupart des autres réactions biochimiques est négative.

Il est probable que ces pathogènes soient sous-estimés. En effet, le délai de culture de certains isolats (pouvant atteindre 4 jours d'incubation) est incompatible avec une détection par les méthodes actuelles de mise en culture des échantillons urinaires par exemple. De plus, la confusion entre *Oligella* sp. et des espèces phénotypiquement très proches comme *Bordetella bronchiseptica* ou *Achromobacter* sp. est possible par les méthodes biochimiques ayant été utilisées pour identifier les isolats dans les cas cliniques les plus anciens, ceci n'est plus le cas avec les nouvelles méthodes d'identification et une identification correcte est par exemple décrite avec le Vitek2 (Simmons *et al.*, 2015). De même, les deux espèces d'*Oligella* sont présentes dans les bases de données des spectromètres de masse (Tableau 3).

Le phénotype de résistance des isolats varie selon l'espèce et le cas considéré. *O. urethralis* est généralement sensible aux b-lactamines y compris à la pénicilline G, bien que certaines souches produisent une b-lactamase chromosomique de classe C (ADC-7 ou ABA-1) dérivée d'*Acinetobacter baumannii* (Mammeri *et al.*, 2003). Certaines souches d'*O. urethralis* sont également résistantes à la ciprofloxacine. *O. ureolytica* est résistante à la pénicilline G, l'ampicilline, la pipéracilline et la tétracycline ; elle est sensible à l'amoxicilline-acide clavulanique, à la ceftazidime, aux carbapénèmes, aux aminosides et aux fluoroquinolones. Enfin, la sensibilité varie selon l'isolat pour la ceftriaxone, le chloramphénicol et le triméthoprime-sulfaméthoxazole (Simmons *et al.*, 2015). Les infections dues aux bactéries du genre *Oligella* sont d'évolution favorable après instauration d'une antibiothérapie éventuellement complétée par des mesures supplémentaires en cas d'obstruction des voies urinaires. Toutefois, le rôle du traitement antibiotique dans cette évolution favorable est questionnable, l'infection de certains patients ayant répondu positivement à un traitement non actif *in vitro* tandis que d'autres ont développé une bactériémie sous traitement actif *in vitro* contre l'isolat d'*Oligella* (Baqi & Mazzulli, 1996).

Famille Comamonadaceae

Dans la famille des *Comamonadaceae*, les genres *Comamonas* et *Delftia* sont les genres majoritairement isolés au labora-

toire. Les infections chez l'homme sont toutefois rares. A côté des cas d'infections systémiques, survenant majoritairement chez des patients immunodéprimés, les deux espèces principales dans cette famille, *Comamonas testosteroni* et *Delftia acidovorans* ont également été impliquées dans des cas d'infections oculaires (kératites, ulcère de la cornée, ...) chez des patients porteurs ou non de lentilles de contact (Chotikanatis *et al.*, 2011). La contamination environnementale, la translocation digestive et les cathéters veineux centraux ou à demeure à demeure sont les sources d'infection principalement identifiées chez les patients.

Acidovorax

Créé en 1990 pour reclasser des espèces anciennement placées dans le genre *Pseudomonas*, (Willems *et al.*, 1990), le genre *Acidovorax* comprend actuellement une quinzaine d'espèces présentes dans l'environnement (sols, eaux) et, pour certaines, considérées comme des pathogènes des plantes. Lors de la création du genre, les espèces *Acidovorax delafieldii* et *Acidovorax temperans* ont été isolées d'échantillons urinaires, du nasopharynx et d'expectorations, de cathéters veineux centraux et d'écoulement de plaies (Willems *et al.*, 1990). Plus récemment, les espèces *Acidovorax oryzae* et *Acidovorax avenae* ont été impliquées dans de rares cas indépendants de bactériémies survenant tous chez des patients ayant des pathologies sous-jacentes et/ou des facteurs favorisants (sarcoïdose, lymphome, corticothérapie et/ou présence d'un cathéter au long cours) (Shetty *et al.*, 2005 ; Osborne *et al.*, 2014). Des évolutions cliniques favorables ont été observées sous traitement par ciprofloxacine ou gentamicine. Ce sont des bacilles à Gram négatif droits ou légèrement incurvés, mobiles, aérobies et possédant une oxydase dont l'identification doit être basée sur des méthodes moléculaires. Enfin, l'espèce *A. wautersii* a été décrite en 2013 à partir d'isolats cliniques mais sa pathogénicité n'est pas établie (Vanechoutte *et al.*, 2013).

Comamonas

Le genre *Comamonas* a été créé en 1985. Les espèces décrites sont ubiquitaires dans l'environnement et capables à survivre durant des périodes de temps prolongées sur diverses surfaces et de contaminer les cathéters intraveineux et les respirateurs en milieu hospitalier par exemple.

Malgré ces caractéristiques, elles sont rarement identifiées au cours d'infections humaines et leur virulence est généralement considérée comme faible, l'évolution étant le plus souvent favorable sous traitement. Toutefois, des cas d'infections invasives sévères sont décrits, la majorité d'entre eux étant attribués à *Comamonas testosteroni* (anciennement *Pseudomonas testosteroni*). Pour exemple, parmi les 32 patients de l'hôpital de Lausanne pour lesquels une bactérie du genre *Comamonas* a été identifiée entre 1997 et 2013, la distribution d'espèce était la suivante : 20 *C. testosteroni*, 2 *C. kerstersii*, 1 *C. aquatica* et 8 *Comamonas* sp. (Opota *et al.*, 2014). Les infections décrites sont des bactériémies incluant des bactériémies sur cathéter chez des patients avec des pathologies sous-jacentes, des endocardites, des péritonites majoritairement d'origine appendiculaire et des infections oculaires, du tractus uro-génital et du système nerveux central (Reddy *et al.*, 2009 ; Nseir *et al.*, 2011 ; Farshad

et al., 2012). Les bactériémies et les infections intra-abdominales sont les infections prédominantes dans une série de 35 cas d'infection à *C. testosteroni* (Farshad et al., 2012). Les cas d'infections chez des patients immunocompétents sont plus rares. L'espèce *Comamonas kerstersii* a plus récemment été décrite dans plusieurs cas d'infections intra-abdominales faisant suite à une perforation digestive (Almuzara et al., 2013 ; Opota et al., 2014). L'isolement de cette espèce d'échantillons de selles suggère un portage digestif de ces bactéries environnementales, à partir duquel pourraient se développer les infections (Biswas et al., 2014). Ainsi, le statut diabétique et le fait d'avoir bu de l'eau de rivière sont les deux cofacteurs significatifs retenus pour expliquer la survenue d'une bactériémie impliquant *C. kerstersii* dans un contexte d'infection intestinale (Opota et al., 2014). De même, un autre cas de bactériémie a été associé à une exposition à de l'eau potentiellement contaminée d'un aquarium (Smith & Gradon, 2003).

Il convient de noter que les méthodes phénotypiques usuelles ne permettant pas l'identification de ces espèces, il a été suggéré que certains cas plus anciens attribués à *C. testosteroni* pourraient en fait avoir impliqué *C. kerstersii*, cette dernière espèce n'étant pas présente dans les bases de données des systèmes d'identification utilisés. À l'inverse, la spectrométrie de masse semble performante pour l'identification des espèces de *Comamonas*, *C. kerstersii* ayant été identifié par MALDI-TOF directement à partir d'un flacon d'hémoculture positive (Opota et al., 2014).

Les *Comamonas* sont des BGN-NF, droits ou légèrement incurvés (voir morphologie après coloration de Gram dans Opota et al., 2014), mobiles par plusieurs flagelles polaires, non sporulés, aérobies stricts, donnant des colonies non pigmentées sur milieux usuels et pour lesquels oxydase et catalase sont détectées. Ils sont généralement sensibles aux antibiotiques (Higgins et al., 2001), notamment pipéracilline, céfoxitine, céfotaxime, imipénème et ciprofloxacine (Fass & Barnishan, 1980).

Delftia

Créé en 1999 (Wen et al., 1999), le genre *Delftia* comprend quatre espèces validement publiées dont trois ont été isolées en contexte infectieux chez l'homme, *Delftia acidovorans* (anciennement *Comamonas acidovorans* et *Pseudomonas acidovorans*), *Delftia tsuruhatensis* et *Delftia lacustris*. Ce sont des pathogènes opportunistes responsables de rares cas d'infections chez des patients immunodéprimés mais aussi immunocompétents, dont l'évolution peut être fatale (Khan et al., 2012).

Dans l'étude conduite à l'hôpital de Lausanne (1997 et 2013), des bactéries du genre *Delftia* toutes identifiées comme *D. acidovorans* ont été isolées chez 38 patients, majoritairement dans des échantillons provenant du tractus ORL et respiratoire ou urogénital mais aussi d'échantillons d'origine cutanée et du sang (Opota et al., 2014). En ce qui concerne le tractus respiratoire, *D. acidovorans* a été isolée de produits d'aspiration trachéale chez des patients hospitalisés en réanimation en culture pure et à des inocula > 10⁶ Unités Formant Colonies/ml (Camargo et al., 2014). *D. acidovorans* a également été isolée de sites oculaires, du tractus urinaire, de cathéters veineux centraux ou à demeure et d'un pus d'otite aiguë. Enfin, *D. acidovorans* a été impliquée dans un cas d'endocardite chez un patient toxicomane par voie intraveineuse (Mahmood et al., 2012). L'origine suspectée de

la contamination dans ce cas était l'eau du robinet du fait des pratiques du patient mais aussi de la capacité de persistance en biofilm de *D. acidovorans* dans les tuyaux. De manière générale, les patients toxicomanes doivent être considérés comme à risque de développer des bactériémies impliquant les pathogènes d'origine environnementale du fait de la possible contamination du matériel d'injection et/ou de la drogue injectée par les bactéries telluriques et/ou hydriques.

Delftia tsuruhatensis, espèce décrite en 2003 (Shigematsu et al., 2003) a été impliquée dans des bactériémies sur cathéter (Preiswerk et al., 2011 ; Tabak et al., 2013). *Delftia lacustris* n'a, à ce jour, été rapportée que dans six cas d'infections dont un cas d'infection oculaire et un sepsis de description très récente (Shin et al., 2012 ; Sohn et al., 2015 a et b).

L'électrophorèse en champ pulsé peut être utilisée pour le typage épidémiologique des isolats. Des souches reliées ont déjà été identifiées chez différents patients d'un même service de réanimation suggérant le caractère associé aux soins de certaines contaminations ; toutefois, la source environnementale de l'infection n'est, le plus souvent, pas identifiée (Camargo et al., 2014).

Ces sont des bacilles droits ou légèrement incurvés (voir morphologie après coloration de Gram dans Opota et al., 2014), non sporulés, mobiles par des flagelles polaires ou bipolaires, aérobies stricts. La culture peut être obtenue sur gélose MacConkey. Les colonies obtenues sur gélose nutritive ne sont pas pigmentées. Les activités oxydasique et catalasique sont toutes deux positives, ainsi que la réduction des nitrates. Ils ne produisent pas d'uréase. Les bactéries du genre *Delftia* et du genre *Comamonas* sont phénotypiquement très semblables et les méthodes biochimiques d'identification sont souvent prises en défaut. De plus, *D. tsuruhatensis* est absente des bases de données des spectromètres de masse. De fausses identifications de *C. testosteroni* sont décrites pour des bactéries du genre *Delftia* (Tabak et al., 2013) ; de même *D. tsuruhatensis* a été faussement identifiée comme *D. acidovorans* par des méthodes biochimiques d'identification (Preiswerk et al., 2011). Ainsi, certains cas d'infection attribués à *D. acidovorans* pour lesquels l'identification moléculaire de la bactérie en cause n'a pas été réalisée pourraient en fait avoir impliqué *D. tsuruhatensis*. Or, l'identification précise de la bactérie impliquée est importante pour guider le traitement, notamment car les bactéries du genre *Delftia* présentent une résistance aux antibiotiques supérieure aux bactéries du genre *Comamonas* étant notamment résistantes aux aminosides et à la colistine. La sensibilité aux fluoroquinolones et au triméthoprime-sulfaméthoxazole est variable selon les souches. Les souches sont habituellement sensibles aux β-lactamines (urédopénicillines, céphalosporines à large spectre) (Camargo et al., 2014) ; des souches résistantes sont toutefois décrites, la résistance impliquant un mécanisme enzymatique par production d'une β-lactamase inductible associé à une imperméabilité par altération de protéines de la membrane externe (Ravaoarinoro & Therrien, 1999).

Famille *Oxalobacteraceae*

Herbaspirillum

Les espèces du genre *Herbaspirillum* sont présentes dans diverses niches environnementales et ont un mode de vie libre

ou endophytique, vivant en association avec des graminées ou des légumineuses principalement. Certaines espèces ont un rôle bénéfique favorisant la croissance des plantes notamment grâce à la fixation de l'azote. Toutefois, certaines espèces comme *Herbaspirillum rubrisubalbicans* et *Herbaspirillum seropedicae* sont phytopathogènes.

Les premiers isolats (anciennement CDC groupe EF-1 ou *Herbaspirillum* species 3) ont été décrits dans les années 1980 dans des échantillons cliniques d'origines diverses (Baldani *et al.*, 1996). Rarement responsables d'infections chez l'homme, ces bactéries ont été identifiées lors de bactériémies et sepsis chez des patients atteints de mucoviscidose, de divers cancers (tumeurs solides, leucémies, lymphomes) ou de cellulite et ont également été isolées d'expectorations chez des patients atteints de mucoviscidose ou de pneumopathies (Tan & Oehler, 2005 ; Spilker *et al.*, 2008 ; Ziga *et al.*, 2010 ; Chen *et al.*, 2011). L'issue de ces infections peut être fatale (Suwantararat *et al.*, 2015). Bien que la majorité des cas survient chez des patients dont le système immunitaire est affaibli, un cas de pneumopathie a été décrit récemment chez un patient immunocompétent (Regunath *et al.*, 2015). Les infections peuvent être associées aux soins ou communautaires (Chemaly *et al.*, 2015). Les espèces impliquées, *Herbaspirillum seropedicae*, *Herbaspirillum aquaticum/huttiense* et *Herbaspirillum frisingense* sont uniquement identifiées par méthodes moléculaires, le séquençage de l'ARNr 16S devant parfois être complété pour une meilleure discrimination des espèces par l'analyse de gènes domestiques comme *gyrB* ou *rpoB* (Coenye *et al.*, 2002 ; Tayeb *et al.*, 2008).

En effet, tous ces isolats ont été soit non identifiés, soit incorrectement identifiés comme appartenant au genre *Ralstonia*, au complexe *Burkholderia cepacia* ou aux espèces *Cupriavidus pauculus* et *Ochrobactrum anthropi* par les méthodes phénotypiques traditionnellement utilisées. Ce défaut de reconnaissance des bactéries du genre *Herbaspirillum* laisse à penser que leur implication pourrait être sous-estimée (Ziga *et al.*, 2010). Ainsi, certaines souches ont été rétrospectivement reconnues comme appartenant au genre *Herbaspirillum* lorsque des méthodes d'identification moléculaire ont été appliquées à des isolats identifiés phénotypiquement comme *Burkholderia cepacia* mais présentant un antibiotype sensible à tous les antibiotiques testés incompatible avec cette identification (Chemaly *et al.*, 2015).

Ce sont des BGN-NF droits, incurvés ou hélicoïdaux (morphologie après coloration de Gram visible dans Chen *et al.*, 2011), mobiles. Ils cultivent sur gélose MacConkey. Les colonies ne sont pas pigmentées et sur gélose au sang, elles ne sont pas hémolytiques. Ils ne peuvent, par contre, pas cultiver sur gélose SS ou cétrimide, ni en bouillon nutritif contenant 4,4 ou 6% de NaCl. Les tests suivants sont positifs : catalase, oxydase et hydrolyse de l'urée. Les tests suivants sont négatifs : production d'indole, production d'H₂S, hydrolyse de esculine, hydrolyse de la gélatine. Ces bactéries ne possèdent ni lysine décarboxylase, ni ornithine décarboxylase (Marques *et al.*, 2015).

Le typage moléculaire peut être réalisé par électrophorèse en champ pulsé (Chemaly *et al.*, 2015).

Les bactéries du genre *Herbaspirillum* sont résistantes à la colistine. Une sensibilité est observée vis-à-vis des b-lactamines suivantes : pipéracilline, pipéracilline-tazobactam, ticarcilline-acide clavulanique, céphalosporines de troisième génération,

céfépime, imipénème et méropénème tandis que des isolats résistants à ampicilline et aztréonam sont décrits. Elles sont sensibles à la ciprofloxacine, au triméthoprim-sulfaméthoxazole et à l'amikacine, des sensibilités variables étant décrites vis-à-vis des autres aminosides (gentamicine et tobramycine) (Ziga *et al.*, 2010 ; Chen *et al.*, 2011).

Massilia

Le genre *Massilia* caractérisé en 1998 et principalement isolé du sol, de l'air et de l'eau, comprend différentes espèces impliquées en pathologie humaine. *Massilia timonae*, première espèce reconnue dans le genre, a été isolée au cours de bactériémies (La Scola *et al.*, 1998 ; Lindquist *et al.*, 2003 ; Van Craenenbroeck *et al.*, 2011), de lymphadénopathie (Van Craenenbroeck *et al.*, 2011), d'infection de plaie chirurgicale et d'ostéomyélite (Lindquist *et al.*, 2003). Un isolat sanguin de *Massilia consociata* (Kämpfer *et al.*, 2011) et un isolat de *Massilia oculi* chez un patient atteint d'endophtalmie (Kämpfer *et al.*, 2012) ont également été rapportés. Enfin, des bactéries appartenant au genre *Massilia* ont également été identifiées dans un cas d'otite moyenne (Park & Shin, 2013) et isolées du liquide céphalo-rachidien dans un cas de pseudotumeur cérébrale (Lindquist *et al.*, 2003).

Ces BGN-NF possèdent catalase et oxydase, hydrolysent l'esculine mais ne produisent pas d'indole et n'hydrolysent pas l'urée.

Ils sont sensibles à la pipéracilline-tazobactam, la ceftazidime, l'amikacine, la ciprofloxacine, la colistine et le triméthoprim-sulfaméthoxazole. Des isolats résistants à l'ampicilline, à l'amoxicilline-acide clavulanique et au céfuroxime sont décrits (Van Craenenbroeck *et al.*, 2011).

Proteobacteria; Betaproteobacteria; Neisseriales; Chromobacteriaceae

Laribacter

Le genre comprend une seule espèce *Laribacter hongkongensis*, une bactérie environnementale identifiée dans l'eau, chez les poissons et les grenouilles. Chez l'homme, c'est une bactérie responsable de bactériémies, notamment chez des patients cirrhotiques (Tse *et al.*, 2014) mais aussi de gastroentérites communautaires et de diarrhées du voyageur (Beilfuss *et al.*, 2015). Les gastro-entérites à *L. hongkongensis* sont le plus souvent d'évolution favorable sans traitement et seul un cas fatal de bactériémie est décrit actuellement. La bactérie possède des gènes codant des facteurs de résistance aux conditions acides et aux sels biliaires, des facteurs de colonisation de la muqueuse intestinale, d'échappement aux défenses de l'hôte, de cytotoxicité et d'invasion, certains connus chez les entéropathovars d'*Escherichia coli* (gènes *eeae*, *bfpA* et *int*).

C'est un BGN-NF, aéro-anaérobie facultatif, incurvé, mobile et cultivant sur gélose MacConkey. Les colonies obtenues sur gélose au sang ne sont pas hémolytiques. La bactérie possède catalase, oxydase, uréase et arginine dihydrolase et ne réduit pas les nitrates.

L'espèce n'est pas identifiable par les méthodes phénotypiques traditionnelles.

Les méthodes de typage actuellement disponibles sont l'enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence (ERIC)-PCR, l'électrophorèse en champ pulsé et le MLST. Ces deux dernières méthodes ont permis de montrer que les populations animales et humaines sont distinctes suggérant que certains clones de *L. hongkongensis* pourraient être particulièrement virulents ou adaptés à l'homme (Teng *et al.*, 2005 ; Feng *et al.*, 2013 ; Tse *et al.*, 2014).

Les gènes de résistance et de multirésistance aux antibiotiques identifiés chez *L. hongkongensis* incluent une b-lactamase de classe C, des intégrons de type 1 et des gènes codant des b-lactamases à spectre étendu de type CTX-M (CTX-M-9) (Lau *et al.*, 2005 ; Feng *et al.*, 2011 ; Lau *et al.*, 2011 ; Raja & Ghosh, 2014). La majorité des isolats de *L. hongkongensis* décrite à ce jour est résistante à l'ampicilline et aux céphalosporines et sensible à l'amoxicilline-acide clavulanique, aux carbapénèmes, aux aminosides et aux fluoroquinolones. Certains isolats plus sensibles ont été décrits (Lau *et al.*, 2009 ; Kim *et al.*, 2011) ; toutefois, la méthode utilisée pour déterminer le profil de sensibilité des isolats pourrait être en cause, les méthodes de diffusion en gélose (disques et Etest) pouvant sous-estimer la résistance aux b-lactamines de *L. hongkongensis* (Lau *et al.*, 2009).

Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Alteromonadales

***Alishewanella* / famille Alteromonadaceae**

Le genre *Alishewanella* a été créé en 2000 ; *Alishewanella fetalis* est la seule espèce décrite à ce jour chez l'homme. Sa description est basée sur une souche isolée d'un fœtus humain sans que son rôle dans un éventuel processus infectieux soit connu (Fonnesbech Vogel *et al.*, 2000).

C'est un BGN-NF immobile qui cultive sur gélose MacConkey. La culture est obtenue de 25 à 42 °C avec un optimum à 37 °C, la bactérie peut tolérer jusqu'à 8% de NaCl mais pas 10% ce qui la différencie de *Shewanella algae* qui peut cultiver en présence de 10% de NaCl. Une autre caractéristique différentielle importante avec les bactéries du genre *Shewanella* est l'absence de production d'H₂S. Oxydase, uréase et gélatinase sont détectés tandis que la bactérie n'hydrolyse pas l'esculine et ne produit pas d'indole ; elle est également sensible à la colistine (Fonnesbech Vogel *et al.*, 2000 ; Vaneechoutte *et al.*, 2011). Une identification incorrecte de *Shewanella putrefaciens* a été obtenue par les méthodes biochimiques, l'identification d'*A. fetalis* nécessite donc des méthodes d'identification moléculaire basées sur le séquençage de l'ADNr 16S ou du gène *gyrB* (Fonnesbech Vogel *et al.*, 2000).

***Shewanella* / famille Shewanellaceae**

Le genre *Shewanella* comprend plus d'une soixantaine d'espèces présentes dans les écosystèmes marins. Plusieurs espèces auraient un rôle dans les processus de remédiation d'éléments toxiques et des métaux lourds dans l'environnement et sont utilisées dans les biopiles. En parallèle, certaines espèces sont impliquées dans des infections humaines chez des patients exposés aux niches environnementales de *Shewanella* sp. via leurs activités professionnelles ou leurs loisirs (Diaz, 2014). Les isolats humains sont peu fréquents, trouvés dans des échantillons cliniques d'origines variées. Leur rôle pathogène est parfois

difficile à établir et les isolats d'abcès, d'ulcères traumatiques, le plus souvent identifiés en cultures polymicrobiennes, sont probablement colonisants plutôt qu'infectants. *S. putrefaciens* et *S. algae* sont les deux espèces isolées d'échantillons cliniques humains et la majorité des infections humaines est causée par *S. algae*, espèce des environnements salés. *S. putrefaciens* représente, quant à elle, la majorité des isolats non humains, principalement isolée des poissons, volailles et autres viandes, et des eaux douces et marines (Khashe & Janda, 1998 ; Janda & Abbott, 2014). La survenue des infections à *Shewanella* sp. est corrélée à la température et à la salinité de l'eau de mer, les cas d'infections surviennent donc majoritairement dans les pays à climat chaud ou durant les périodes estivales particulièrement chaudes dans les pays tempérés. Les infections les plus souvent décrites siègent au niveau des oreilles et de la peau et des tissus mous (infections de plaies, infections après morsure de serpent, fasciite nécrosante, ...) ; elles sont associées ou non à des bactériémies, principalement mais pas uniquement chez des patients immunocompromis. Les autres infections décrites sont des infections oculaires, des arthrites et ostéomyélites, des péritonites, des empyèmes, des infections intra-craniennes post-opératoires, des endocardites, des pneumopathies sous ventilation et des infections du tractus biliaire, de liquide d'ascite et autres infections digestives (dysenterie) (Holt *et al.*, 2005 ; Diaz, 2014 ; Charles *et al.*, 2015 ; Srinivas *et al.*, 2015). Les facteurs de risque des infections à *Shewanella* sont les pathologies hépatobiliaires, les cancers, la pathologie veineuse périphérique (ulcère de jambe), une mauvaise hygiène et un faible statut socio-économique (Holt *et al.*, 2005 ; Sharma & Kalawat, 2010). Certains cas d'infections peuvent aboutir au décès du patient (Vignier *et al.*, 2013).

Les bactéries du genre *Shewanella* sont des BGN, courts, longs ou filamenteux, mobiles, dont la caractéristique la plus importante est la production d'H₂S, un caractère différentiel important parmi les BGN-NF d'importance médicale. Elles cultivent sur les géloses conventionnelles incluant la gélose MacConkey donnant des colonies brun-jaunâtre de 1-2 mm de diamètre après 18-24 h d'incubation (photographie visible dans Charles *et al.*, 2015). Elles possèdent également oxydase, catalase, ornithine décarboxylase, gélatinase, DNase, phosphatase alcaline et pyrrolidonyl aminopeptidase, et réduisent les nitrates. A l'inverse, elles ne produisent pas d'indole et ne possèdent ni uréase, ni arginine dihydrolase, ni lysine décarboxylase. *S. algae* présente les caractéristiques différentielles suivantes par rapport à *S. putrefaciens* : elle réduit les nitrites, est capable de croître à 42 °C et en présence de 6 % de NaCl, les colonies sont mucoïdes et une b-hémolyse faible est observée après 48 h d'incubation, elle résiste à la colistine. Il faut noter que les systèmes d'identification traditionnels (API 20E, API 20NE, API ID 32 GN et Vitek) ne permettent pas de distinguer les deux espèces.

Les isolats du genre *Shewanella* sont généralement sensibles à la plupart des antibiotiques actifs sur les bacilles à Gram négatif à l'exception de la pénicilline G et de la céfalotine (Holt *et al.*, 2005). A titre d'exemple, dans l'étude de Vignier et collaborateurs, 95% des isolats sont sensibles au céfotaxime, 98% à la pipéracilline-tazobactam, 99% à la gentamicine et 94% à la ciprofloxacine (Vignier *et al.*, 2013). De rares isolats résistants à la pipéracilline, à la ceftazidime, à la tobramycine, au triméthoprime-sulfaméthoxazole, à l'imipénème et au méropénème sont décrits (Baruah & Grover, 2014).

**Proteobacteria; Gammaproteobacteria;
Oceanospirillales; Oceanospirillaceae****Balneatrix**

Le genre *Balneatrix* a été décrit en 1993 (Dauga *et al.*, 1993). L'espèce type *Balneatrix alpica*, seule espèce du genre, a été impliquée dans d'une épidémie de pneumopathies et de méningites dans un centre spa en 1987, mais aucune nouvelle publication concernant ce genre n'est parue depuis sa description.

C'est un bacille incurvé ou droit, mobile par flagelle polaire, ne cultivant pas sur gélose MacConkey et donnant des colonies jaune pâle devenant brunes avec le temps sur gélose au sang. Les caractères positifs sont : oxydase, production d'indole, réduction des nitrates, gélatinase et lécithinase. *B. alpica* est sensible aux b-lactamines, aminosides, acide nalidixique, fluoroquinolones, tétracycline et triméthoprime-sulfaméthoxazole (Dauga *et al.*, 1993 ; Vanechoutte *et al.*, 2011).

**Proteobacteria; Gammaproteobacteria;
Pseudomonadales; Moraxellaceae****Psychrobacter**

Dans ce genre, créé en 1986 par Juni et Heym (Juni & Heym, 1986), la plupart des espèces ont été isolées d'environnements salins froids (glaciers, permafrost, ...). Elles ont cependant un habitat environnemental très large, isolées de nombreuses sources (eau de mer, sol, air, poisson, volaille, lait, fromage, ...) (Juni, 2005). Le plus souvent, les isolats humains ne sont pas identifiés en situations pathologiques ; dans certains cas plus rares, ils sont considérés comme des pathogènes opportunistes de l'homme. Les bactéries du genre *Psychrobacter* ont principalement été isolées des sites ou échantillons suivants : sang, liquide céphalorachidien, tissu cérébral, urine, oreille, œil, vulve et plaie. *Psychrobacter phenylpyruvicus* (anciennement *Moraxella phenylpyruvica*) a été impliqué dans des cas de bactériémie, d'endocardite, d'arthrite septique, d'abcès et d'infections de plaies opératoire (Juni, 2005, Leung *et al.*, 2006). L'espèce *Psychrobacter immobilis* est décrite dans des cas de bactériémie, d'infection oculaire associée aux soins et de méningite (Gini, 1990 ; Lloyd-Puryear *et al.*, 1991 ; Lozano *et al.*, 1994 ; Sriaroon *et al.*, 2014). Toutefois, au regard de travaux plus récents et en l'absence d'identification moléculaire de l'isolat dans les publications citées ci-dessus, l'identification de *P. immobilis* comme espèce pathogène opportuniste de l'homme ne peut être retenue avec certitude. En effet, sur la base de l'analyse des séquences d'ADNr 16S, il a été démontré que la plupart des isolats humains autres que *P. phenylpyruvicus* appartient à deux espèces récemment décrites : *Psychrobacter faecalis* (Kämpfer *et al.*, 2002) et *Psychrobacter pulmonis* (Vela *et al.*, 2003). De même, de rares isolats humains appartenant aux espèces *Psychrobacter cibarius* (abcès) et *Psychrobacter nivimaris* (drain) ont pu être identifiés (Deschaght *et al.*, 2012). Enfin, deux espèces de description récente incluent des isolats sanguins humains : *Psychrobacter sanguinis* (Wirth *et al.*, 2012) et *Psychrobacter arenosus*, cette dernière ayant été isolée dans un contexte d'accident transfusionnel (Caspar *et al.*, 2013). L'évolution des infections à *Psychrobacter* sp. est le plus souvent favorable (Leung *et al.*, 2006) bien que de rares cas d'infections létales ont été reportés (Caspar *et al.*, 2013).

Ce sont des bacilles ou coccobacilles à Gram négatif pouvant apparaître à Gram variable du fait d'une résistance à la décoloration. Ils sont aérobies, immobiles et non sporulés. La plupart des souches sont psychrophiles cultivant à de 4 °C à 37 °C. Ces bactéries sont osmotolérantes (Wirth *et al.*, 2012). Certaines ont également des propriétés anti-microbiennes vis-à-vis du complexe *Burkholderia cepacia* (Fondi *et al.*, 2014). La culture est obtenue sur gélose au sang, donnant des colonies non pigmentées et non hémolytiques tandis que la culture sur gélose MacConkey est variable selon l'espèce ou la souche considérée. Le genre comprend des espèces glucidolytiques et des espèces n'ayant pas la capacité de fermenter le glucose parmi lesquelles sont trouvées la plupart des espèces identifiées chez l'homme. La détection de la catalase et de l'oxydase est positive. La majorité des souches réduit les nitrates en nitrites. *Psychrobacter* spp. sont sensibles à la colistine. Bien que certaines réactions comme l'uréase peuvent orienter l'identification (Tableau 6), la reconnaissance des différentes espèces mais aussi la confirmation du genre doit faire appel aux méthodes d'identification moléculaire.

La sensibilité de *Psychrobacter* spp. aux antibiotiques est élevée et seules de très rares souches présentant une résistance à la pénicilline, l'ampicilline, l'aztréonam, la gentamicine et/ou à la tobramycine sont décrites. La plupart des infections humaines a été traitée avec succès par des céphalosporines de troisième génération (Caspar *et al.*, 2013).

Des informations plus détaillées sur ce genre sont disponibles dans les UK Standards for Microbiology Investigations. Identification of *Moraxella* species and Morphologically Similar Organisms (<https://www.gov.uk/government/publications/smi-id-11-identification-of-moraxella-species-and-morphologically-similar-organisms>).

**Proteobacteria; Gammaproteobacteria;
Xanthomonadales; Xanthomonadaceae****Dyella**

Les bactéries du genre *Dyella* sont des bactéries telluriques n'ayant jusqu'en 2007 jamais été identifiée chez l'homme. Un premier cas de bactériémie à *Dyella japonica* a été décrit en 2007 chez un patient dialysé ayant un cathéter à demeure (Kiratisin *et al.*, 2007). Un second isolat humain a été décrit chez un patient atteint de mucoviscidose colonisé chroniquement par une nouvelle espèce potentielle du genre ayant cultivé sur le milieu sélectif pour *Burkholderia cepacia* (Duus *et al.*, 2013).

Il s'agit de bacilles à Gram négatif donnant des colonies d'un jaune soutenu sur gélose au sang et possédant une oxydase. Leur identification nécessite des méthodes moléculaires puisque les deux isolats humains ont été faussement identifiés comme *Myroides* sp. ou *Elizabethkingia meningoseptica* par les méthodes biochimiques (Kiratisin *et al.*, 2007 ; Duus *et al.*, 2013).

Ignatzschineria et Wohlfahrtiimonas, agents d'infections associées aux myiases

Trois espèces ont été décrites dans le genre *Ignatzschineria* (anciennement *Schineria*) (Tóth *et al.*, 2007), *Ignatzschineria larvae*, *Ignatzschineria indica* et *Ignatzschineria ureiclastica* (Gupta *et al.*, 2011) isolées des stades larvaires ou de diptères adultes responsables de myiases. De rares cas d'infection humaine sont décrits dont quatre cas dus à *I. larvae* incluant trois

bactériémies et une infection du tractus urinaire (Maurin *et al.*, 2007 ; Barker *et al.*, 2014). De plus, des isolats d'*Ignatzschinella* sp. ont été rapportés d'un cas de bactériémie dont la porte d'entrée était une infection de pied chez un patient souffrant de myiase (Roudiere *et al.*, 2007). Dans la majorité des cas, la présence d'asticots a été notée au niveau de diverses plaies chez les patients.

Ce sont des bacilles à Gram négatif, réguliers, aérobies, non sporulés et immobiles, cultivant sur les géloses MacConkey et *Salmonella-Shigella*. Les colonies obtenues sont de petites taille et non hémolytiques sur gélose au sang. Catalase, oxydase et uréase sont détectées, il n'y a pas de production d'indole, l'hydrolyse de l'esculine et la réduction des nitrates sont négatives. L'identification ne peut se faire que par mise en œuvre de méthodes de biologie moléculaire comme le séquençage de l'ARNr 16S, les isolats ayant tous été incorrectement identifiées comme appartenant à diverses autres espèces de BGN-NF dans tous les cas décrits à ce jour.

Les isolats décrits présentent une sensibilité globale aux b-lactamines, aminosides, chloramphénicol, triméthoprime-sulfaméthoxazole, fluoroquinolones et colistine et une résistance à l'acide nalidixique et à la fosfomycine. Un isolat de sensibilité intermédiaire à la ciprofloxacine et un de sensibilité intermédiaire à la pipéracilline-tazobactam ont été décrits (Barker *et al.*, 2014).

Une autre bactérie responsable d'infection en cas de myiase est *Wohlfahrtiimonas chitiniclastica*. Cette espèce, décrite en 2008 (Tóth *et al.*, 2008), a été impliquée dans plusieurs cas de bactériémies (Rebaudet *et al.*, 2009 ; Almuzara *et al.*, 2011 ; Campisi *et al.*, 2015) et plus récemment, dans des cas d'infections des tissus mous et osseuses (Köljalg *et al.*, 2015 ; Suryalatha *et al.*, 2015). Asticots ou larves d'insectes sont le plus souvent mis en évidence au niveau de plaies, portes d'entrée potentielles de *W. chitiniclastica*.

Ce sont des bacilles à Gram négatif, immobiles, possédant une oxydase mais pas d'uréase. L'hydrolyse de l'esculine et la réduction des nitrates sont négatives. Bien que non identifiable par les méthodes biochimiques, cette espèce est correctement identifiée par spectrométrie de masse (Campisi *et al.*, 2015).

Une sensibilité aux b-lactamines, aminosides, triméthoprime-sulfaméthoxazole, fluoroquinolones et cyclines est décrite (Almuzara *et al.*, 2011).

Stenotrophomonas

Le genre *Stenotrophomonas* représente le troisième BGN-NF le plus fréquemment isolé en laboratoire de bactériologie clinique après *P. aeruginosa* et les bactéries du genre *Acinetobacter* (Chawla *et al.*, 2013). Initialement décrit en 1961 comme *Pseudomonas maltophilia* (Hugh & Ryschenkow, 1961), il a été transféré en 1983 dans le genre *Xanthomonas* (Swings *et al.*, 1983). Néanmoins, les différences avec les *Xanthomonas* se sont révélées plus importantes que les similitudes : contrairement aux autres espèces de *Xanthomonas*, *X. maltophilia* possède une ciliature polaire lophotriche, ne produit pas de pigment jaune ni de slime et n'est pas phytopathogène (van Zyl & Steyn, 1992). Ainsi, la création d'un nouveau genre, *Stenotrophomonas* (qui se nourrit d'un faible nombre de substrats), fut proposée comprenant *S. maltophilia* comme seule espèce (Palleroni & Bradbury, 1993). L'hétérogénéité génomique de *S. maltophilia* a été

soulignée (Berg *et al.*, 1999 ; Hauben *et al.*, 1999 ; Valdezate *et al.*, 2004) et dix groupes génomiques peuvent être délimités par AFLP ; une grande diversité existe également entre souches environnementales et cliniques. Des études d'électrophorèse en champ pulsé, de ribotypage et de RAPD confirment cette remarquable diversité suggérant que *S. maltophilia* pourrait représenter un complexe d'espèces (Denton *et al.*, 1998 ; Brooke, 2012 ; Abbott & Peleg, 2015). L'espèce *Stenotrophomonas africana* a été décrite sur la base du séquençage du gène codant l'AR-Nr 16S et de l'hybridation ADN-ADN d'une souche isolée du LCR d'un réfugié rwandais infecté par le VIH (Drancourt *et al.*, 1997). Cette espèce est en fait considérée comme un synonyme hétérotypique de *S. maltophilia* (Coenye *et al.*, 2004a ; Kaiser *et al.*, 2009). Douze autres espèces environnementales ont été décrites mais aucune n'a encore été isolée chez l'homme: *S. acidaminiphila*, *S. nitritireducens*, *S. koreensis*, *S. rhizophila*, *S. pavanii*, *S. daejeonensis*, *S. ginsengisoli*, *S. panacihumi*, *S. chelatiphaga*, *S. terrae*, *S. humi* et *S. dokdonensis* (Assih *et al.*, 2002 ; Finkmann *et al.*, 2000 ; Yang *et al.*, 2006 ; Wolf *et al.*, 2002 ; Ramos *et al.*, 2011 ; Lee *et al.*, 2011a ; Kim *et al.*, 2010 ; Yi *et al.*, 2010 ; Kaparullina *et al.*, 2009 ; Heylen *et al.*, 2007 ; Yoon *et al.*, 2006).

Bactérie ubiquiste, *S. maltophilia* est largement répandue dans l'environnement. Elle a aussi été isolée de plantes et d'aliments (légumes, bananes, lait) qui représentent des sources de contamination potentielles pour les malades immunocompromis. C'est aussi une bactérie commensale présente dans le microbiote intestinal de l'homme et de nombreux animaux. Sa capacité à survivre en milieu hydrique en fait une bactérie responsable d'infections associées aux soins, elle est également capable de survivre plusieurs jours sur un support inerte. Dans l'environnement hospitalier, *S. maltophilia* a été isolé de diverses sources incluant des robinets et lavabos, des tubes de système d'aspiration de fauteuils de soins dentaires, des endoscopes contaminés ainsi que de l'eau de consommation (Sakhnini, *et al.*, 2002 ; O'Donnell *et al.*, 2005 ; Marzuillo *et al.*, 2009 ; Kovaleva *et al.*, 2010).

Sous l'effet de la pression de sélection en antibiotiques auxquels il est habituellement résistant, *S. maltophilia* est devenu un agent d'infection associée aux soins d'importance majeure avec des taux bruts de mortalité allant de 14 à 69% chez les patients présentant une bactériémie (Brooke, 2012). Par ordre d'importance d'isolement dans les infections associées aux soins, c'est le deuxième BGN-NF après *P. aeruginosa* (Marshall *et al.*, 1989). La ventilation assistée, l'antibiothérapie à large spectre, les chimiothérapies immunosuppressives et les cathéters centraux sont les facteurs de risque de colonisation et d'infection des patients. La plupart des infections systémiques a pour origine l'introduction de *S. maltophilia* par voie exogène, par le biais de cathéters, d'aiguilles ou d'appareillages contaminés (Martino *et al.*, 1996). Les infections dues à *S. maltophilia* sont plus communément des infections respiratoires (pneumopathies et exacerbations de bronchopneumopathie chronique obstructive), des bactériémies, des sepsis d'origine biliaire, des infections osseuses, des infections ophtalmiques, des endocardites et des méningites (Brooke, 2012). C'est un pathogène significatif chez les patients atteints de cancer, particulièrement en cas de cancer pulmonaire obstructif (Safdar & Rolston, 2007). Enfin, il est particulièrement décrit dans les voies respiratoires de patients atteints de mucoviscidose qu'il peut coloniser de manière

chronique (Surette, 2014 ; Hansen, 2012). En effet, c'est le 5^{ème} pathogène le plus prévalent dans cette pathologie (13,4% des patients) et une étude récente décrit une prévalence de cette espèce en augmentation (Surette, 2014 ; Hansen, 2012 ; Salsgiver *et al.*, 2015). Au cours de la mucoviscidose, la colonisation par *S. maltophilia* est décrite comme un facteur de risque de déclin plus rapide de la fonction respiratoire. Bien que longtemps considéré comme un pathogène infectant les patients âgés, une étude récente montre que le jeune âge est en fait un facteur de risque d'acquisition de *S. maltophilia* dans cette population (Cogen *et al.*, 2015 ; Stanojevic *et al.*, 2013).

S. maltophilia a la capacité de former du biofilm sur diverses surfaces y compris le Téflon, le verre, des matières plastiques et les tissus de l'hôte (de Oliveira-Garcia *et al.*, 2003). Il s'agit d'une caractéristique particulièrement importante, la capacité à former du biofilm ayant été estimée reliée à 65% des infections acquises à l'hôpital (Potera, 1999). Outre sa capacité à former du biofilm sur les épithéliums bronchiques, *S. maltophilia* est également capable d'envahir les cellules humaines (De Vidipó *et al.*, 2001 ; Pompilio *et al.*, 2010b). En ce qui concerne les autres facteurs de virulence, le génome de *S. maltophilia* code pour des enzymes extracellulaires incluant des protéases, lipases, estérases, DNase, RNase et fibrolysines (Crossman *et al.*, 2008) qui contribuent à son implantation et à sa diffusion dans les sites colonisés (plaies, cathéters, tractus respiratoire). Les endotoxines de *S. maltophilia* peuvent également être directement transmises à des patients hémodialysés par le biais de machines de dialyse contaminées (Wang *et al.*, 1999). Une activité cytotoxique a été décrite pour des isolats cliniques et les surnageants de certains isolats du foie et de trachée présentent des activités hémolytiques (Figueirêdo *et al.*, 2006). Enfin, *S. maltophilia* peut aussi présenter un facteur de résistance au pouvoir bactéricide du sérum.

BGN-NF, aérobic strict, *S. maltophilia* ne possède pas d'oxydase ce qui est un caractère notable au sein du groupe. C'est un bacille droit, légèrement incurvé, mobile grâce à une ciliature polaire multitrèche à trois flagelles ou plus. La croissance de *S. maltophilia* est obtenue sur tous les types de milieux, bien que l'espèce soit exigeante en méthionine et en d'autres acides aminés soufrés comme la cystéine (environ 4 % des souches ne présentent pas cette caractéristique). Sur gélose trypticase soja, les colonies sont rondes, à contour régulier, généralement mates avec une zone claire périphérique, non pigmentées ou pigmentées en jaune pâle ; elles mesurent de 1,5 à 2 mm de diamètre après 48 h d'incubation à 30-37 °C et ont généralement une odeur ammoniacquée après 3 à 4 jours d'incubation. Sur gélose au sang, une décoloration verdâtre du milieu peut être observée. Un milieu sélectif simple pour l'isolement de *S. maltophilia* a été proposé, en particulier pour les échantillons d'origine environnementale, utilisant la résistance à l'imipénème et l'exigence en méthionine de la bactérie (Bollet *et al.*, 1995). Afin d'augmenter la sélectivité de l'isolement, particulièrement à partir des expectorations de patients atteints de mucoviscidose, le milieu sélectif VIA contenant vancomycine, imipénème et amphotéricine B ainsi que du bleu de bromothymol a été développé (Denton *et al.*, 2000). Enfin, un autre milieu sélectif (SM2i) a été développé récemment, il contient les mêmes composants que le milieu VIA ainsi que du maltose et de la DL-méthionine (Adjidé *et al.*, 2010). Les caractères morphologiques et biochimiques des souches de *S. maltophilia* sont remarquablement homogènes. La bactérie possède une lysine décarboxylase et hydrolyse l'escu-

line et la gélatine. Cette bactérie ne produit pas d'indole, d'acétoïne et ne possède pas d'uréase. *S. maltophilia* utilise certains sucres (glucose, lactose et maltose) par voie oxydative. Une très bonne identification de l'espèce est obtenue par spectrométrie de masse (Almuzara *et al.*, 2015).

Le typage épidémiologique moléculaire de *S. maltophilia* peut faire appel à différentes techniques. L'utilité de la rep-PCR automatisée (système DiversiLab®, bioMérieux) a été montrée (Wu *et al.*, 2011). L'électrophorèse en champ pulsé peut également être utilisée (Denton *et al.*, 1998 ; Marzuillo *et al.*, 2009) et un schéma simplifié et rapide (21 h de migration après macro-restriction de l'ADN par l'endonucléase *Xba*I) a été proposé (Shueh *et al.*, 2013).

Certaines méthodes ont également été utilisées pour structurer des populations de *S. maltophilia* d'origines diverses suggérant que certaines souches infectant l'homme pourraient appartenir à des lignées spécifiques dans l'espèce : i) l'analyse des séquences d'ADN 16S a révélé trois groupes distinguant les isolats cliniques et environnementaux (Minkwitz & Berg, 2001) ; ii) un schéma MLST a montré une diversité génétique importante dans l'espèce (54 types de séquences (STs) différents ayant été identifiés pour 70 souches étudiées) et la prédominance de souches d'origine clinique ou la présence exclusive de souches environnementales dans certains génogroupes (Kaiser *et al.*, 2009) ; iii) une étude utilisant l'AFLP a trouvé dix génogroupes différents de *S. maltophilia* avec deux clusters contenant uniquement des isolats cliniques et deux clusters uniquement des isolats environnementaux (Hauben *et al.*, 1999) ; iv) une étude de RFLP (restriction fragment length polymorphism) du gène *gyrB* a permis de regrouper la grande majorité des isolats provenant de patients atteints de mucoviscidose en deux groupes distincts (Coenye *et al.*, 2004b).

Comme indiqué dans la partie « Considérations générales » en début de chapitre, la réalisation et l'interprétation d'un antibiogramme de *S. maltophilia* fait l'objet de recommandations CA-SFM-EUCAST (recommandations du CA-SFM-EUCAST, communiqué 2015 V2.0, www.sfm-microbiologie.org). Parmi celles-ci, tenant compte de la multirésistance naturelle de *S. maltophilia*, la liste minimale des antibiotiques à tester comprend le cotrimoxazole, la ticarcilline-acide clavulanique, la ceftazidime, la lévofloxacine et la minocycline.

La multirésistance naturelle de *S. maltophilia* à de nombreux antibiotiques dont les aminosides et les β -lactamines incluant la ticarcilline, les céphalosporines de première et seconde génération ou encore le céfotaxime et l'imipénème est une des raisons de l'émergence de cette bactérie. La panoplie de gènes codant la résistance aux antibiotiques, la présence d'éléments génétiques mobiles et de pompes à efflux révélées par le séquençage total du génome de *S. maltophilia* en font une bactérie remarquablement équipée pour la résistance aux antibiotiques et aux métaux lourds mais aussi un réservoir de déterminants génétiques de la résistance (Crossman *et al.*, 2008). Certains systèmes d'efflux, comme la pompe SmeDEF, sont des systèmes de multirésistance largement présents dans les isolats de *S. maltophilia* et leur hyperexpression conduit à des niveaux de résistance encore supérieurs (Alonso & Martinez, 2001).

S. maltophilia possède deux β -lactamases chromosomiques inductibles L1 et L2 (Walsh *et al.*, 1994 ; Walsh *et al.*, 1997). La β -lactamase L1 (aussi nommée BlaS) est une zinc-enzyme à

large spectre, de classe B (métallo-enzyme), qui est donc insensible à l'acide clavulanique. Elle induit une résistance à de nombreux antibiotiques incluant les pénicillines, les céphalosporines de 3^{ème} génération et l'imipénème. La β -lactamase L2 est une β -lactamase à spectre étendu (BLSE) de classe A produite par 99% des souches, sensible à l'acide clavulanique, qui inactive les pénicillines, les céphalosporines de 3^{ème} génération et l'aztréonam. Outre cette résistance à diverses β -lactamines, l'image en forme de losange sur l'antibiogramme autour du disque de l'association ticarcilline-acide clavulanique est caractéristique, d'une part d'une synergie entre la ticarcilline et l'acide clavulanique (TCC) et d'autre part d'un antagonisme entre céfuroxime et TCC (induction) (Philippon, 2006).

Plusieurs phénotypes de résistance aux β -lactamines sont décrits selon le niveau d'expression de ces deux β -lactamases chromosomiques inductibles, probablement le fruit de mutations, ajouté à plusieurs mécanismes d'imperméabilité ou d'efflux :

- Le phénotype très sensible qui est rare (5 à 10 % des souches), lié à une faible production de l'enzyme L2 ; les souches sont sensibles à la ticarcilline, au céfotaxime, à la ceftazidime et à l'aztréonam. Aucune synergie n'est observée entre la ticarcilline et l'acide clavulanique. Le céfépime et la ceftriaxone ont une activité variable (Pangon *et al.*, 1998).

- Le phénotype sensible (60 à 80 % des souches) qui se caractérise par une grande sensibilité à l'association ticarcilline-acide clavulanique ainsi qu'au latamoxef. Deux sous-types (CAZ-S et CAZ-R) sont individualisés en fonction de la sensibilité ou de la résistance vis-à-vis de la ceftazidime (CAZ), corrélée à la quantité de l'enzyme L2 produite. Pour de nombreuses souches résistantes à l'aztréonam (CMI₅₀ > 128 mg/l), le retour à la sensibilité en présence d'acide clavulanique (CMI₅₀ = 2 mg/l) peut être obtenu. Pour les souches fortement productrices de L2, la sensibilité est restaurée par l'acide clavulanique mais non par le tazobactam ou le sulbactam (Muñoz Bellido *et al.* 1997). L'hyperproduction de L2 comparée à L1 explique les images de synergie observées entre la ceftazidime, le céfotaxime ou l'aztréonam et l'acide clavulanique qui ne signent donc pas l'existence d'une BLSE acquise.

- Le phénotype sensible à l'imipénème est exceptionnel (production faible ou absence de L1) et, dans ce cas, la souche est sensible à l'association amoxicilline- ou ticarcilline-acide clavulanique.

- D'autres phénotypes de résistance sont observés (15-20 % des souches) liés à une perméabilité modifiée ainsi qu'à des expressions relatives de L1 et L2 variables. Une diminution de l'activité de l'association ticarcilline-acide clavulanique mais aussi du latamoxef est alors observée. Sous la pression des β -lactamines, l'émergence de la résistance à la ticarcilline-acide clavulanique est rapide (Barbier-Frebour *et al.*, 2000). Cette résistance n'est pas obligatoirement croisée avec les fluoroquinolones.

Concernant les mécanismes de résistance acquise, des β -lactamases de type TEM-1, TEM-2 ainsi que des BLSE de type CTX-M-15 ont été décrites (Avison *et al.*, 2000 ; al Naiemi *et al.*, 2006 ; Lavigne *et al.*, 2008). Dans certains isolats cliniques, les systèmes d'efflux SmeABC et SmeDEF ont été identifiés conférant une résistance au méropénème et à la ciprofloxacine (Chang *et al.*, 2004).

La résistance naturelle aux aminosides implique les enzymes modificatrices AAC(6')-Iz et APH(3')-IIc, ainsi que les pompes à efflux de type RND, SmeE et SmeJ et SmeK. (Lambert *et al.*, 1999 ; Crossman *et al.*, 2008). Il s'agit le plus souvent d'une résistance de bas niveau et une fausse sensibilité peut être observée par l'usage d'une méthode rapide, elle est notamment influencée par la température (souches résistantes à 30 °C et sensibles à 37 °C). Ainsi, un résultat catégorisé « Sensible » après incubation à 37 °C, doit être interprété « Intermédiaire » selon les recommandations CA-SFM-EUCAST (recommandations du CA-SFM-EUCAST, communiqué 2015 V2.0, www.sfm-microbiologie.org).

Les fluoroquinolones sont de manière générale peu actives. Le niveau d'expression de la résistance aux fluoroquinolones peut varier selon la molécule. Ainsi, la gatifloxacine et la lévofloxacine présentent une meilleure activité que la ciprofloxacine (Biedenbach *et al.*, 1999 ; Schmitz *et al.*, 1999). La résistance acquise peut être liée à des modifications de la membrane externe (modifications de porines voire des protéines liant les pénicillines ou du LPS) dont le support est chromosomique et/ou à des systèmes d'efflux ; elle est observée pour 50% des souches (Lecso-Bornet *et al.*, 1992 ; Alonso & Martinez, 1997 ; Zhang *et al.*, 2000). Concernant les mutations de l'ADN gyrase, plusieurs études ont montré des modifications de séquences mais celles-ci n'ont pas été associées à une augmentation de la résistance aux fluoroquinolones de *S. maltophilia* (Valdezate *et al.*, 2002).

Concernant les autres antibiotiques, la fréquence de résistance aux sulfamides ou au triméthoprime est encore faible (de l'ordre de 15 à 20 % des souches) mais est en cours d'émergence. Des mécanismes comme des systèmes d'efflux, la présence d'un intégron de classe I contenant le gène *sulI* et d'un élément ISCR (insertion element common region) contenant le gène *sul2* ont été impliqués dans la résistance au triméthoprime-sulfaméthoxazole (Toleman *et al.*, 2007). Il faut toutefois noter qu'il est important de suivre des instructions de lecture spécifiques nécessaires à une interprétation correcte de la diffusion en milieu gélosé et ne pas tenir compte des zones fantômes autour du disque de triméthoprime-sulfaméthoxazole afin d'éviter de fausses catégorisations « Résistant » (recommandations du CA-SFM-EUCAST, communiqué 2015 V2.0, www.sfm-microbiologie.org). Le cotrimoxazole montre une bonne activité *in vitro* mais son efficacité *in vivo* peut être décevante, il ne présente qu'une activité bactériostatique sur la majorité des isolats.

La résistance aux polymyxines est hétérogène et fréquente. Il y a dissociation de résistance entre la tétracycline et la doxycycline voire la minocycline (résistance à la tétracycline et sensibilité à la doxycycline) due à un mécanisme d'efflux touchant la tétracycline.

Enfin, un groupe de gènes pouvant être issus de bactéries à Gram positif confère une résistance aux macrolides (macrolide phosphotransférase : mphBM) et aux métaux lourds dont le cadmium (gène *cadA* codant une pompe à efflux) (Alonso *et al.*, 2000).

Le triméthoprime-sulfaméthoxazole (cotrimoxazole) reste le traitement de première ligne pour les infections à *S. maltophilia*. Sur la base d'études pharmacodynamiques et de l'action bactériostatique de cette molécule, il est recommandé d'utiliser la dose la plus élevée (15 mg par kg et par jour) (Brown, 2014). En cas de résistance au cotrimoxazole, des traitements de seconde

ligne comme la lévofloxacine, la ticarcilline-acide clavulanique, la tigécycline ou la colistine sont envisageables et sont souvent utilisés en association (Falagas *et al.*, 2008). La résistance naturelle de *S. maltophilia* aux carbapénèmes conduit souvent à la sélection de ce pathogène en cas d'utilisation de cette classe d'antibiotique, notamment chez les patients qui sont fortement immunodéprimés. L'inclusion d'un agent actif de façon spécifique sur le biofilm comme la moxifloxacine a montré des bénéfices, particulièrement pour les patients atteints de mucoviscidose ; néanmoins, la prudence est de mise en cas d'utilisation en monothérapie en raison du risque d'induction rapide de résistance (Pompilio *et al.*, 2010a ; Cho *et al.*, 2014). La preuve d'efficacité des associations de molécules vient souvent de données d'essais de tests de synergies *in vitro* et souligne la nécessité de poursuivre les recherches pour une thérapie optimale contre ce pathogène multirésistant (Abbott & Peleg, 2015). Les associations les plus souvent rapportées combinent généralement deux molécules parmi cotrimoxazole, ticarcilline-acide clavulanique, moxifloxacine, lévofloxacine, aztréonam, ceftazidime, colistine, rifampicine, tigécycline et minocycline (Falagas *et al.*, 2008 ; Church *et al.*, 2013).

Xanthomonas

Les espèces du genre *Xanthomonas* sont des pathogènes de plantes bien connus mais n'ont pas été isolées chez l'homme. Toutefois, un isolat de *Xanthomonas* sp. appartenant au cluster *Xanthomonas campestris* (Hauben *et al.*, 1997) a été identifié par Coenye et collaborateurs dans les sécrétions respiratoires d'un patient atteint de mucoviscidose (Coenye *et al.*, 2002).

Références

- Abbott, I.J., and A.Y. Peleg. 2015. *Stenotrophomonas*, *Achromobacter*, and nonmelioid *Burkholderia* species: antimicrobial resistance and therapeutic strategies. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* **36**: 99-110.
- Abdouchakour, F., C. Dupont, D. Grau, F. Aujoulat, P. Mournetas, H. Marchandin, S. Parer, P. Gibert, J. Valcarcel, and E. Jumas-Bilak. 2015. Clonal selections of *Pseudomonas aeruginosa* and *Achromobacter* sp. lead to successive colonization waves of water contamination in dental care units. *Appl. Environ. Microbiol.* Sous presse.
- Adjidé, C.C., A. De Meyer, M. Weyer, O. Obin, F. Lamory, C. Lesueur, L. Trouillet, M. Biendo, O. Ganry, and F. Eb. 2010. A sensitive, specific and predictive isolation medium developed for *Stenotrophomonas maltophilia* study in healthcare settings. *Pathol. Biol.* **58**: 11-17.
- Afshar, M., E. Nobakht, and S.Q. Lew. 2013. *Chryseobacterium indologenes* peritonitis in peritoneal dialysis. *BMJ Case Rep.* doi: 10.1136/bcr-2013-009410.
- Ahmed, M.S., C. Nistal, R. Jayan, M. Kuduvalli, and H.K.I. Anijeet. 2009. *Achromobacter xylosoxidans*, an emerging pathogen in catheter-related infection in dialysis population causing prosthetic valve endocarditis: a case report and review of literature. *Clin. Nephrol.* **71**: 350-354.
- Aisenberg, G., K.V. Rolston, and A. Safdar. 2004. Bacteremia caused by *Achromobacter* and *Alcaligenes* species in 46 patients with cancer (1989-2003). *Cancer.* **101**: 2134-2140.
- Alkindi, S., S. Matwani, A. Al-Maawali, B. Al-Maskari, and A. Pathare. 2012. Complications of PORT-A-CATH® in patients with sickle cell disease. *J. Infect. Public Health.* **5**: 57-62.
- Almuzara, M.N., S. Palombarani, A. Tuduri, S. Figueroa, A. Gianecini, L. Sabater, M.S. Ramirez, and C.A. Vay. 2011. First case of fulminant sepsis due to *Wohlfahrtiimonas chitiniclastica*. *J. Clin. Microbiol.* **49**: 2333-2335.
- Almuzara, M.N., C.M. Barberis, C.H. Rodríguez, A.M. Famiglietti, M.S. Ramirez, and C.A. Vay. 2012a. First report of an extensively drug-resistant VIM-2 metallo- β -lactamase-producing *Brevundimonas diminuta* clinical isolate. *J. Clin. Microbiol.* **50**: 2830-2832.
- Almuzara, M.N., C.M. Barberis, G.M. Traglia, A.M. Ordoñez, A.M. Famiglietti, M.S. Ramirez, and C.A. Vay. 2012b. Isolation of *Kerstesia gyiorum* from a patient with cholesteatomatous chronic otitis media. *J. Clin. Microbiol.* **50**: 3809-3811.
- Almuzara, M.N., R. Cittadini, C. Vera Ocampo, R. Bakai, G. Traglia, M.S. Ramirez, M. del Castillo, and C.A. Vay. 2013. Intra-abdominal infections due to *Comamonas kerstersii*. *J. Clin. Microbiol.* **51**: 1998-2000.
- Almuzara, M., C. Barberis, G. Traglia, A. Famiglietti, M.S. Ramirez, and C. Vay. 2015. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry for species identification of nonfermenting Gram-negative bacilli. *J. Microbiol. Methods.* **112**: 24-27. Al Naiemi, N., B. Duim, and A. Bart. 2006. A CTX-M extended-spectrum beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia*. *J. Med. Microbiol.* **55**: 1607-1608.
- Alnor, D., N. Frimodt-Moller, F. Espersen, and W. Frederiksen. 1994. Infections with the unusual human pathogens *Agrobacterium* species and *Ochrobactrum anthropi*. *Clin. Infect. Dis.* **18**: 914-920.
- Alonso, A., and J.L. Martínez. 1997. Multiple antibiotic resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**: 1140-1142.
- Alonso, A., P. Sanchez, and J.L. Martínez. 2000. *Stenotrophomonas maltophilia* D457R contains a cluster of genes from gram-positive bacteria involved in antibiotic and heavy metal resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**: 1778-1782.
- Alonso, A., and J.L. Martínez. 2001. Expression of multidrug efflux pump SmeDEF by clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**: 1879-1881.
- Al-Said, J., A. Pagaduan, and S. Murdeshwar. 2013. Successful elimination of hemodialysis-related bacteremia and vascular access infection. *Saudi J. Kidney Dis. Transpl.* **24**: 1228-1232.
- Amoureux, L., J. Bador, S. Fardeheb, C. Mabile, C. Couchot, C. Massip, A.-L. Salignon, G. Berlie, V. Varin, and C. Neuwirth. 2013a. Detection of *Achromobacter xylosoxidans* in hospital, domestic, and outdoor environmental samples and comparison with human clinical isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**: 7142-7149.
- Amoureux, L., J. Bador, E. Siebor, N. Taillefumier, A. Fanton, and C. Neuwirth. 2013b. Epidemiology and resistance of *Achromobacter xylosoxidans* from cystic fibrosis patients in Dijon, Burgundy: First French data. *J. Cyst. Fibros.* **12**: 170-176.
- Anesti, V., J. Vohra, S. Goonetilleka, I.R. McDonald, B. Sträubler, E. Stackebrandt, D.P. Kelly, and A.P. Wood. 2004. Molecular detection and isolation of facultatively methylotrophic bacteria, including *Methylobacterium podarium* sp. nov., from the human foot microflora. *Environ. Microbiol.* **6**: 820-830.
- Angelakis, E., V. Roux, and D. Raoult. 2009. *Sphingomonas mucosissima* bacteremia in patient with sickle cell disease. *Emerg. Infect. Dis.* **15**: 133-134.
- Asaad, A.M., M.S.Z. Al-Ayed, and M.A. Qureshi. 2013. Emergence of unusual nonfermenting Gram-negative nosocomial pathogens in a Saudi hospital. *Jpn. J. Infect. Dis.* **66**: 507-511.

- Assih, E.A., A.S. Ouattara, S. Thierry, J.L. Cayol, M. Labat, and H. Macarie. 2002. *Stenotrophomonas acidaminiphila* sp. nov., a strictly aerobic bacterium isolated from an upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**: 559-568.
- Aujoulat, F., E. Jumas-Bilak, A. Masnou, F. Sallé, D. Faure, C. Segonds, H. Marchandin, and C. Teyssier. 2011. Multilocus sequence-based analysis delineates a clonal population of *Agrobacterium (Rhizobium) radiobacter (Agrobacterium tumefaciens)* of human origin. *J. Bacteriol.* **193**: 2608-2618.
- Aujoulat, F. 2012a. Adaptation et spécialisation des bactéries environnementales à l'infection humaine : étude des genres *Ochrobactrum* et *Agrobacterium*. Thèse de Doctorat, Université Montpellier 1.
- Aujoulat, F., F. Roger, A. Bourdier, A. Lotthé, B. Lamy, H. Marchandin, and E. Jumas-Bilak. 2012b. From environment to man: genome evolution and adaptation of human opportunistic bacterial pathogens. *Genes (Basel)*. **3**: 191-232.
- Aujoulat, F., H. Marchandin, I. Zorngiotti, A. Masnou, and E. Jumas-Bilak. 2015. *Rhizobium pusense* is the main human pathogen in the genus *Agrobacterium/Rhizobium*. *Clin. Microbiol. Infect.* **21**: 472.e1-5.
- Avison, M.B., C.J. von Heldreich, C.S. Higgins, P.M. Bennett, and T.R. Walsh. 2000. A TEM-2beta-lactamase encoded on an active Tn1-like transposon in the genome of a clinical isolate of *Stenotrophomonas maltophilia*. *J. Antimicrob. Chemother.* **46**: 879-884.
- Bachmeyer, C., H. Entressengle, K. Khosrotehrani, G. Goldman, F. Delisle, G. Arlet, and G. Grateau. 2008. Cellulitis due to *Myroides odoratimimus* in a patient with alcoholic cirrhosis. *Clin. Exp. Dermatol.* **33**: 97-98.
- Baldani, J.I., V.L.D. Baldani, L. Seldin, and J. Döbereiner. 1986. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **36**: 86-93.
- Baldani, J.I., B. Pot, G. Kirchhof, E. Falsen, V. L. Baldani, F.L. Olivares, B. Hoste, K. Kersters, A. Hartmann, M. Gillis, and J. Döbereiner. 1996. Emended description of *Herbaspirillum*; inclusion of [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*, a milk plant pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. nov.; and classification of a group of clinical isolates (EF group 1) as *Herbaspirillum species 3*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**: 802-810.
- Baqi, M., and T. Mazzulli. 1996. *Oligella* infections: Case report and review of the literature. *Can. J. Infect. Dis.* **7**: 377-379.
- Barbier-Frebour, N., I. Boutiba-Boubake, M. Nouvello, and J. Lemelan. 2000. Molecular investigation of *Stenotrophomonas maltophilia* isolates exhibiting rapid emergence of ticarcillin-clavulanate resistance. *J. Hosp. Infect.* **45**: 35-41.
- Barker, H.S., J.W. Snyder, A.B. Hicks, S.P. Yanoviak, P. Southern, B.K. Dhakal, G.R. Ghimire, and M.R. Couturier. 2014. First case reports of *Ignatzschineria (Schineria) indica* associated with myiasis. *J. Clin. Microbiol.* **52**: 4432-4434.
- Barrado, L., P. Brañas, M.A. Orellana, M.T. Martínez, G. García, J.R. Otero, and F. Chaves. 2013. Molecular characterization of *Achromobacter* isolates from cystic fibrosis and non-cystic fibrosis patients in Madrid, Spain. *J. Clin. Microbiol.* **51**: 1927-1930.
- Baruah, F.K., and R.K. Grover. 2014. Case report and literature review of carbapenem resistant *Shewanella putrefaciens* isolated from ascitic fluid. *J. Clin. Diagn. Res.* **8**: DD01-2.
- Bayram, N., I. Devrim, H. Apa, G. Gülfidan, H.N. Türkyılmaz, and I. Günay. 2013. *Sphingomonas paucimobilis* infections in children: 24 case reports. *Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis.* **5**: e2013040.
- Beifuss, H.A., D. Quig, M. A. Block, and P.C. Schreckenberger. 2015. Definitive identification of *Laribacter hongkongensis* acquired in the United States. *J. Clin. Microbiol.* **53**: 2385-8.
- Bellais, S., L. Poirel, S. Leotard, T. Naas, and P. Nordmann. 2000. Genetic diversity of carbapenem-hydrolyzing metallo-beta-lactamases from *Chryseobacterium (Flavobacterium) indologenes*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**: 3028-3034.
- Bellais, S., T. Naas, and P. Nordmann. 2002a. Molecular and biochemical characterization of Ambler class A extended-spectrum beta-lactamase CGA-1 from *Chryseobacterium gleum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**: 966-970.
- Bellais, S., D. Girlich, A. Karim, and P. Nordmann. 2002b. EBR-1, a novel Ambler subclass B1 beta-lactamase from *Empedobacter brevis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**: 3223-3227.
- Beltran, A., S. Bdiwi, J. Jani, R.A. Recco, E.E. Go, and M.M. Zaman. 2006. A case of *Bergeyella zoohelcum* bacteremia after ingestion of a dish prepared with goat blood. *Clin. Infect. Dis.* **42**: 891-892.
- Benedetti, P., M. Rassa, G. Pavan, A. Sefton, and G. Pellizzer. 2011. Septic shock, pneumonia, and soft tissue infection due to *Myroides odoratimimus*: report of a case and review of *Myroides* infections. *Infection.* **39**: 161-165.
- Berg, G., N. Roskot, and K. Smalla. 1999. Genotypic and phenotypic relationships between clinical and environmental isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. *J. Clin. Microbiol.* **37**: 3594-3600.
- Bergey, D.H., F.C. Harrison, R.S. Breed, B.W. Hammer, and F.M. Huntoon (editors): *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 1st ed., The Williams & Wilkins Co, Baltimore, 1923, pp. 1-442.
- Biedenbach, D.J., M.A. Croco, T.J. Barrett, and R.N. Jones. 1999. Comparative in vitro activity of gatifloxacin against *Stenotrophomonas maltophilia* and *Burkholderia* species isolates including evaluation of disk diffusion and E test methods. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **18**: 428-431.
- Biswas, S., J.-C. Dubus, M. Reynaud-Gaubert, N. Stremmer, and J.-M. Rolain. 2013. Evaluation of colistin susceptibility in multidrug-resistant clinical isolates from cystic fibrosis, France. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **32**: 1461-1464.
- Biswas, J.S., J. Fitchett, and G. O'Hara. 2014. *Comamonas kerstersii* and the perforated appendix. *J. Clin. Microbiol.* **52**: 3134.
- Blahová, J., K. Králiková, V. Sr Krcméry, and K. Kubonová. 1997. Hydrolysis of imipenem, meropenem, ceftazidime, and cefepime by multiresistant nosocomial strains of *Sphingobacterium multivorum*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **16**: 178-180.
- Boixeda, D., D.A. de Luis, M.A. Meseguer, R. Aller, C. Martin de Argila, and A. Lopez Sanroman. 1998. A case of spontaneous peritonitis caused by *Weeksella virosa*. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **10**: 897-898.
- Bollet, C., A. Davin-Regli, and P. De Micco. 1995. A simple method for selective isolation of *Stenotrophomonas maltophilia* from environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 1653-1654.
- Borsali, E., I. Rossignol, L. Batellier, P. Legrand, P. Goldschmidt, A. Le Bouter, K. Mokhtari, and C. Chaumeil. 2011. *Methylobacterium podarium* isolated in the course of intraocular inflammation. *Med. Mal. Infect.* **41**: 665-666.
- Bostwick, A.D., C. Zhang, K. Manninen, J. Touchberry, S.R. Greene, and T.L. Holland. 2015. Bacteremia caused by *Kerstersia gyiorum*. *J. Clin. Microbiol.* **53**: 1965-1967.
- Bridger, N., A. Walkty, M. Crockett, S. Fanella, K. Nichol, and J.A. Karlowsky. 2012. *Caulobacter* species as a cause of postneurosurgical bacterial meningitis in a pediatric patient. *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.* **23**: e10-2.

- Brizendine, K.D., J.W. Baddley, P.G. Pappas, K.J. Leon, and J.M. Rodriguez.** 2012. Fatal *Burkholderia gladioli* infection misidentified as *Empedobacter brevis* in a lung transplant recipient with cystic fibrosis. *Transpl. Infect. Dis.* **14**: E13-8.
- Brooke, J.S.** 2012. *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging global opportunistic pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* **25**: 2-41.
- Brown, W.J., R.L. Sautter, and A.E. Jr Crist.** 1992. Susceptibility testing of clinical isolates of *Methylobacterium* species. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36**: 1635-1638.
- Brown, M.A., J.N. Greene, R.L. Sandin, J.W. Hiemenz, and J.T. Sinnott.** 1996. *Methylobacterium* bacteremia after infusion of contaminated autologous bone marrow. *Clin. Infect. Dis.* **23**: 1191-1192.
- Brown, G.R.** 2014. Cotrimoxazole - optimal dosing in the critically ill. *Ann. Intensive Care.* **4**: 13. **Burghartz, M., B. Bunk, C. Spröer, S. Voget, R. Daniel, J. Overmann, and M. Jahn.** 2015. Complete Genome sequence of the urethral catheter isolate *Myroides* sp. A21. *Genome Announc.* **3**: e00068-15.
- Buscher, A., L. Li, X.Y. Han, and B.W. Trautner.** 2010. Aortic valve endocarditis possibly caused by a *Haemobacter*-like species. *J. Clin. Microbiol.* **48**: 3791-3793.
- Camargo, C.H., A.M. Ferreira, E. Javaroni, B.A. Reis, M.F. Bueno, G.R. Francisco, J.F. Gallo, and D. de Oliveira Garcia.** 2014. Microbiological characterization of *Delftia acidovorans* clinical isolates from patients in an intensive care unit in Brazil. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **80**: 330-333.
- Campisi, L., N. Mahobia, and J.J. Clayton.** 2015. *Wohlfahrtiimonas chitiniclastica* bacteremia associated with myiasis, United Kingdom. *Emerg. Infect. Dis.* **21**: 1068-1069.
- Cankaya, E., M. Keles, E. Gulcan, A. Uyanik, and H. Uyanik.** 2014. A rare cause of peritoneal dialysis-related peritonitis: *Achromobacter denitrificans*. *Perit. Dial. Int. J.* **34**: 135-137.
- Caspar, Y., C. Recule, P. Pouzol, B. Lafeuillade, M.R. Mallaret, M. Maurin, and J. Croize.** 2013. *Psychrobacter arenosus* bacteremia after blood transfusion, France. *Emerg. Infect. Dis.* **19**: 1118-1120.
- Castellani, A., and A.J. Chalmers** (editors): *Manual of Tropical Medicine*, 3rd ed., Williams Wood and Co., New York, 1919.
- Chang, L.L., H.F. Chen, C.Y. Chang, T.M. Lee, and W.J. Wu.** 2004. Contribution of integrons, and SmeABC and SmeDEF efflux pumps to multidrug resistance in clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. *J. Antimicrob. Chemother.* **53**: 518-521.
- Chang, Y.C., H.H. Lo, H.Y. Hsieh, and S.M. Chang.** 2014a. Identification, epidemiological relatedness, and biofilm formation of clinical *Chryseobacterium indologenes* isolates from central Taiwan. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* doi:10.1016/j.jmii.2014.04.004.
- Chang, Y.C., H.H. Lo, H.Y. Hsieh, and S.M. Chang.** 2014b. Identification and epidemiological relatedness of clinical *Elizabethkingia meningoseptica* isolates from central Taiwan. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* **47**: 318-323.
- Charles, M.V., S. Srirangaraj, and A. Kali.** 2015. Neonatal sepsis caused by *Shewanella algae*: A case report. *Australas. Med. J.* **8**: 64-66.
- Chawla, K., S. Vishwanath, and F.C. Munim.** 2013. Nonfermenting gram-negative bacilli other than *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. causing respiratory tract infections in a tertiary care center. *J. Glob. Infect. Dis.* **5**: 144-148.
- Chemaly, R.F., R. Dantes, D.P. Shah, P.K. Shah, N. Pascoe, E. Ariza-Heredia, C. Perego, D.B. Nguyen, K. Nguyen, F. Modarai, H. Moulton-Meissner, J. Noble-Wang, J.J. Tarrand, J.J. LiPuma, A.Y. Guh, T. MacCannell, I. Raad, and V. Mulanovich.** 2015. Cluster and sporadic cases of *Herbaspirillum* species infections in patients with cancer. *Clin. Infect. Dis.* **60**: 48-54.
- Chen, J., Z. Su, Y. Liu, S. Sandoghchian, D. Zheng, S. Wang, and H. Xu.** 2011. *Herbaspirillum* species: a potential pathogenic bacteria isolated from acute lymphoblastic leukemia patient. *Curr. Microbiol.* **62**: 331-333.
- Chen, F.L., G.C. Wang, S.O. Teng, T.Y. Ou, F.L. Yu, and W.S. Lee.** 2013. Clinical and epidemiological features of *Chryseobacterium indologenes* infections: analysis of 215 cases. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* **46**: 425-432.
- Chen, Z., H. Fang, L. Wang, F. Sun, Y. Wang, Z. Yin, H. Yang, W. Yang, J. Wang, P. Xia, D. Zhou, and C. Liu.** 2014. IMP-1 encoded by a novel Tn402-like class 1 integron in clinical *Achromobacter xylosoxidans*, China. *Sci. Rep.* **4**: 7212.
- Chiba, M., M. Kono, S. Hoshina, M. Komatsu, Y. Kitagawa, M. Iizuka, and S. Watanabe.** 2000. Presence of bacterial 16S ribosomal RNA gene segments in human intestinal lymph follicles. *Scand. J. Gastroenterol.* **35**: 824-831.
- Cho, S.Y., C.I. Kang, J. Kim, Y.E. Ha, D.R. Chung, N.Y. Lee, K.R. Peck, and J.H. Song.** 2014. Can levofloxacin be a useful alternative to trimethoprim-sulfamethoxazole for treating *Stenotrophomonas maltophilia* bacteremia? *Antimicrob. Agents Chemother.* **58**: 581-583.
- Chotikanatis, K., M. Bäcker, G. Rosas-Garcia, and M.R. Hammerschlag.** 2011. Recurrent intravascular-catheter-related bacteremia caused by *Delftia acidovorans* in a hemodialysis patient. *J. Clin. Microbiol.* **49**: 3418-3421.
- Chou, D.W., S.L. Wu, C.T. Lee, F.T. Tai, and W.L. Yu.** 2011. Clinical characteristics, antimicrobial susceptibilities, and outcomes of patients with *Chryseobacterium indologenes* bacteremia in an intensive care unit. *Jpn. J. Infect. Dis.* **64**: 520-524.
- Christakis, G.B., P. Alexaki, A.S. Alivizatos, I. Chalkiopolou, A.E. Athanasiou, and I.K. Zarkadis.** 2006. Primary bacteraemia caused by *Rhizobium radiobacter* in a patient with solid tumours. *J. Med. Microbiol.* **55**: 1453-1456.
- Church, D., T. Lloyd, G. Peirano, and J. Pitout.** 2013. Antimicrobial susceptibility and combination testing of invasive *Stenotrophomonas maltophilia* isolates. *Scand. J. Infect. Dis.* **45**: 265-270.
- Clark, A.E., E.J. Kaleta, A. Arora, and D.M. Wolk.** 2013. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. *Clin. Microbiol. Rev.* **26**: 547-603.
- Coenye, T., J. Goris, T. Spilker, P. Vandamme, and J.J. LiPuma.** 2002. Characterization of unusual bacteria isolated from respiratory secretions of cystic fibrosis patients and description of *Inquilinus limosus* gen. nov., sp. nov. *J. Clin. Microbiol.* **40**: 2062-2069.
- Coenye, T., M. Vancanneyt, M.C. Cnockaert, E. Falsen, J. Swings, and P. Vandamme.** 2003a. *Kerstesia gyiorum* gen. nov., sp. nov., a novel *Alcaligenes faecalis*-like organism isolated from human clinical samples, and reclassification of *Alcaligenes denitrificans* Rüger and Tan 1983 as *Achromobacter denitrificans* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**: 1825-1831.
- Coenye, T., M. Vancanneyt, E. Falsen, J. Swings, and P. Vandamme.** 2003b. *Achromobacter insolitus* sp nov and *Achromobacter spanius* sp nov., from human clinical samples. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**: 1819-1824.
- Coenye, T., E. Vanlaere, E. Falsen, and P. Vandamme.** 2004a. *Stenotrophomonas africana* Drancourt et al. 1997 is a later synonym of *Stenotrophomonas maltophilia* (Hugh 1981) Palleroni and Bradbury 1993. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**: 1235-1237.
- Coenye, T., E. Vanlaere, J.J. LiPuma, and P. Vandamme.** 2004b. Identification of genomic groups in the genus *Stenotrophomonas* using *gyrB* RFLP analysis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **40**: 181-185.

- Cogen, J., J. Emerson, D.B. Sanders, C. Ren, M.S. Schechter, R.L. Gibson, W. Morgan, M. Rosenfeld, for the EPIC Study Group. 2015. Risk factors for lung function decline in a large cohort of young cystic fibrosis patients. *Pediatr. Pulmonol.* **50**: 763-770.
- Coiffier, G., A. Gougeon, J.D. Albert, and H. Le Bars. 2013. Arthritis due to *Paracoccus yeei*. *Med. Mal. Infect.* **43**: 254-255.
- Costechareyre, D., A. Rhouma, C. Lavire, P. Portier, D. Chapulliot, F. Bertolla, A. Boubaker, Y. Dessaux, and X. Nesme. 2010. Rapid and efficient identification of *Agrobacterium* species by *recA* allele analysis: *Agrobacterium recA* diversity. *Microb. Ecol.* **60**: 862-872.
- Courjaret, J.C., M. Drancourt, and L. Hoffart. 2014. *Paracoccus yeei* keratitis in a contact lens wearer. *Eye Contact Lens.* **40**: e21-22.
- Coward, A., D.T. Kenna, C. Perry, K. Martin, M. Doumith, and J.F. Turton. 2015. Use of *nrdA* gene sequence clustering to estimate the prevalence of different *Achromobacter* species among Cystic Fibrosis patients in the UK. *J. Cyst. Fibros.* doi: 10.1016/j.jcf.2015.09.005.
- Courvalin, P., R. Leclercq, and E. Bingen (éditeurs). *Antibiogramme, 2^{ème} édition, 2006*, ESKA.
- Crossman, L.C., V.C. Gould, J.M. Dow, et al. 2008. The complete genome, comparative and functional analysis of *Stenotrophomonas maltophilia* reveals an organism heavily shielded by drug resistance determinants. *Genome Biol.* **9**: R74.
- Crum-Cianflone, N.F., R.W. Matson, and G. Ballon-Landa. 2014. Fatal case of necrotizing fasciitis due to *Myroides odoratus*. *Infection.* **42**: 931-935.
- Daneshvar, M.I., D. G. Hollis, R.S. Weyant, A.G. Steigerwalt, A.M. Whitney, M.P. Douglas, J.P. Macgregor, J.G. Jordan, L.W. Mayer, S.M. Rassouli, W. Barchet, C. Munro, L. Shuttleworth, and K. Bernard. 2003. *Paracoccus yeeii* sp. nov. (formerly CDC group EO-2), a novel bacterial species associated with human infection. *J. Clin. Microbiol.* **41**: 1289-1294.
- Dauga, C., M. Gillis, P. Vandamme, E. Ageron, F. Grimont, K. Kersters, C. de Mahenge, Y. Peloux, and P.A. Grimont. 1993. *Balneatrix alpica* gen. nov., sp. nov., a bacterium associated with pneumonia and meningitis in a spa therapy center. *Res. Microbiol.* **144**: 35-46.
- Davis, D.H., M. Doudoroff, R.Y. Stanier, and M. Mandel. 1969. Proposal to reject the genus *Hydrogenomonas*: taxonomic implications. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **19**: 375-390.
- Dé, I., K.V. Rolston, and X.Y. Han. 2004. Clinical significance of *Roseomonas* species isolated from catheter and blood samples: analysis of 36 cases in patients with cancer. *Clin. Infect. Dis.* **38**: 1579-1584.
- Del Borgo, C., F. Maneschi, V. Belvisi, F. Morelli, A. Vetica, R. Marocco, T. Tieghi, M. Lichtner, and C.M. Mastroianni. 2013. Postpartum fever in the presence of a fibroid: *Sphingomonas paucimobilis* sepsis associated with pyomyoma. *BMC Infect. Dis.* **13**: 574.
- Demir, T., and N. Celenk. 2014. Bloodstream infection with *Oligella ureolytica* in a newborn infant: a case report and review of the literature. *J. Infect. Dev. Ctries.* **8**: 793-795.
- Denton, M., N.J. Todd, K.G. Kerr, P.M. Hawkey, and J.M. Littlewood. 1998. Molecular epidemiology of *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from clinical specimens from patients with Cystic Fibrosis and associated environmental samples. *J. Clin. Microbiol.* **36**: 1953-1958.
- Denton, M., M.J. Hall, N.J. Todd, K.G. Kerr, and J.M. Littlewood. 2000. Improved isolation of *Stenotrophomonas maltophilia* from the sputa of patients with cystic fibrosis using a selective medium. *Clin. Microbiol. Infect.* **6**: 397-398.
- De Oliveira-Garcia, D., M. Dall'Agnol, M. Rosales, A.C. Azzuz, N. Alcántara, M.B. Martínez, and J.A. Girón. 2003. Fimbriae and adherence of *Stenotrophomonas maltophilia* to epithelial cells and to abiotic surfaces. *Cell. Microbiol.* **5**: 625-636.
- Deschaght, P., M. Janssens, M. Vanechoutte, and G. Wauters. 2012. *Psychrobacter* isolates of human origin, other than *Psychrobacter phenylpyruvicus*, are predominantly *Psychrobacter faecalis* and *Psychrobacter pulmonis*, with emended description of *P. faecalis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **62**: 671-674.
- Deutscher, M., J. Severing, and J.M. Balada-Llasat. 2014. *Kerstersia gyiorum* isolated from a bronchoalveolar lavage in a patient with a chronic tracheostomy. *Case Rep. Infect. Dis.* **2014**: 479581.
- De Vidipó, L.A., E.A. De Marques, E. Puchelle, and M.C. Plotkowski. 2001. *Stenotrophomonas maltophilia* interaction with human epithelial respiratory cells in vitro. *Microbiol. Immunol.* **45**: 563-569.
- De Vos, P., K. Kersters, E. Falsen, B. Pot, M. Gillis, P. Segers, and J. De Ley. 1985. *Comamonas* Davis and Park 1962, gen. nov., nom. rev. emend., and *Comamonas terrigena* Hugh 1962, sp. nov., nom. rev. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **35**: 443-453.
- Dhatriya, K., C. Gooday, D. Morrow, R. Murchison, J. Turner, R. Hutchinson, and H. Williams. 2012. *Rhizobium radiobacter* wound infection in a patient with diabetes—fact, factitious or just plain unlucky? *QJM.* **105**: 365-368.
- Diaz, J.H. 2014. Emerging causes of superficial and invasive infections following marine injuries and exposures. *J. La State Med. Soc.* **166**: 103-108.
- Dien Bard, J., J.G. Deville, P.H. Summanen, and M.A. Lewinski. 2010. *Roseomonas mucosa* isolated from bloodstream of pediatric patient. *J. Clin. Microbiol.* **48**: 3027-3029.
- Doi, Y., L. Poirel, D.L. Paterson, and P. Nordmann. 2008. Characterization of a naturally occurring class D beta-lactamase from *Achromobacter xylosoxidans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**: 1952-1956.
- Douce, R.W., J. Zurita, O. Sanchez, and P. Cardenas Aldaz. 2008. Investigation of an outbreak of central venous catheter-associated bloodstream infection due to contaminated water. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **29**: 364-366.
- Dowson, W.J. 1939. On the systematic position and generic names of the gram negative bacterial plant pathogens. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. Abteilung II.* **100**: 177-193.
- Drancourt, M., C. Bollet, and D. Raoult. 1997. *Stenotrophomonas africana* sp. nov., an opportunistic human pathogen in Africa. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**: 160-163.
- Drancourt, M., C. Bollet, A. Carliz, R. Martelin, J.P. Gayral, and D. Raoult. 2000. 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. *J. Clin. Microbiol.* **38**: 3623-3630.
- Drancourt, M., P. Berger, C. Terrada, B. Bodaghi, J. Conrath, D. Raoult, and P. LeHoang. 2008. High prevalence of fastidious bacteria in 1520 cases of uveitis of unknown etiology. *Medicine (Baltimore).* **87**: 167-176.
- Dupont, C., A.-L. Michon, E. Jumas-Bilak, N. Nørskov-Lauritsen, R. Chiron, and H. Marchandin. 2015. Intrapatient diversity of *Achromobacter* spp. involved in chronic colonization of Cystic Fibrosis airways. *Infect. Genet. Evol.* **32**: 214-223.
- Duus, L.M., N. Høiby, M. Wang, O. Schiøtz, and N. Nørskov-Lauritsen. 2013. Bacteria of the genus *Dyella* can chronically colonise the airways of patients with cystic fibrosis and elicit a pronounced antibody response. *Int. J. Med. Microbiol.* **303**: 267-269.

- Ece, G., M. Ruksen, and A. Akay. 2013. Case report: cranioplasty infection due to *Roseomonas gilardii* at a university hospital in Turkey. *Pan. Afr. Med. J.* **14**: 162.
- Edmond, M.B., S.A. Riddler, C.M. Baxter, B.M. Wicklund, and A.W. Pasculle. 1993. *Agrobacterium radiobacter*: a recently recognized opportunistic pathogen. *Clin. Infect. Dis.* **16**: 388-391.
- Egemen, O., O. Ozkaya, D. Bingol, and M. Akan. 2012. *Rhizobium radiobacter*: an unusual pathogen isolated on an active chronic ulcerous inflammation. *J. Plast. Reconstr. Aesthet. Surg.* **65**: e233-235.
- El Salabi, A., P.S. Borra, M.A. Toleman, Ø Samuelsen, and T.R. Walsh. 2012. Genetic and biochemical characterization of a novel metallo- β -lactamase, TMB-1, from an *Achromobacter xylosoxidans* strain isolated in Tripoli, Libya. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**: 2241-2245.
- Endicott-Yazdani, T.R., N. Dhiman, R. Benavides, and C.W. Spak. 2015. *Myroides odoratimimus* bacteremia in a diabetic patient. *Proc. (Bayl. Univ. Med. Cent.)* **28**: 342-343.
- Engelkrik, P.G., and J. Duben-Engelkrik. Chapter 13: Gram-negative bacilli: non fermenters. In: *Laboratory diagnosis of infectious diseases - Essentials of diagnostic microbiology*, 2008, Lippincott Williams & Wilkins, p. 319-334.
- Engler, C., and R. Norton. 2001. Recurrent *Methylobacterium mesophilicum* sepsis associated with haemodialysis. *Pathology* **33**: 536-537.
- Escobar, M.A., and A.M. Dandekar. 2003. *Agrobacterium tumefaciens* as an agent of disease. *Trends Plant. Sci.* **8**: 380-386.
- Estrela, A.B., and W.R. Abraham. 2010. *Brevundimonas vancouverensis* sp. nov., isolated from blood of a patient with endocarditis. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **60**: 2129-2134.
- Falagas, M.E., P.E. Valkimadi, Y.T. Huang, D.K. Matthaiou, and P.R. Hsueh. 2008. Therapeutic options for *Stenotrophomonas maltophilia* infections beyond co-trimoxazole: a systematic review. *J. Antimicrob. Chemother.* **62**: 889-894.
- Fanci, R., G. Corti, A. Bartoloni, E. Tortoli, A. Mariottini, and P. Pecile. 2010. Unusual *Methylobacterium fujisawaense* infection in a patient with acute leukaemia undergoing hematopoietic stem cell transplantation: First Case Report. *Case Rep. Med.* **2010**: 313514.
- Fanella, S., D. Schantz, J. Karlowsky, and E. Rubinstein. 2009. Septic arthritis due to *Roseomonas gilardii* in an immunocompetent adolescent. *J. Med. Microbiol.* **58**: 1514-1516.
- Farshad, S., F. Norouzi, M. Aminshahidi, B. Heidari, and A. Alborzi. 2012. Two cases of bacteremia due to an unusual pathogen, *Comamonas testosteroni* in Iran and a review literature. *J. Infect. Dev. Ctries.* **6**: 521-525.
- Fass, R.J., and J. Barnishan. 1980. In vitro susceptibilities of nonfermentative gram-negative bacilli other than *Pseudomonas aeruginosa* to 32 antimicrobial agents. *Rev. Infect. Dis.* **2**: 841-853.
- Fass, R.J., J. Barnishan, M.C. Solomon, and L.W. Ayers. 1996. In vitro activities of quinolones, beta-lactams, tobramycin, and trimethoprim-sulfamethoxazole against nonfermentative gram-negative bacilli. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**: 1412-1418.
- Feng, J.L., H. Yan, N. Chowdhury, S.B. Neogi, S. Yamasaki, L. Shi, J. Hu, and Q. Chen. 2011. Identification and characterization of integrin-associated antibiotic resistant *Laribacter hongkongensis* isolated from aquatic products in China. *Int. J. Food Microbiol.* **144**: 337-341.
- Feng, J.L., J.Y. Lin, X.B. Jiang, O. Zhang, J.F. Zhu, J. Hu, L. Shi, and Q. Chen. 2013. Development of an ERIC sequence typing scheme for *Laribacter hongkongensis*, an emerging pathogen associated with community-acquired gastroenteritis and travellers' diarrhoea. *J. Med. Microbiol.* **62**: 701-707.
- Fernández-Olmos, A., M. García-Castillo, M.I. Morosini, A. Lamas, L. Máiz, and R. Cantón. 2012. MALDI-TOF MS improves routine identification of non-fermenting Gram negative isolates from cystic fibrosis patients. *J. Cyst. Fibros.* **11**: 59-62.
- Figueirêdo, P.M., M.T. Furumura, A.M. Santos, A.C. Sousa, D.J. Kota, C.E. Levy, and T. Yano. 2006. Cytotoxic activity of clinical *Stenotrophomonas maltophilia*. *Lett. Appl. Microbiol.* **43**: 443-449.
- Finkmann, W., K. Altendorf, E. Stackebrandt, and A. Lipski. 2000. Characterization of N₂O-producing *Xanthomonas*-like isolates from biofilters as *Stenotrophomonas nitritireducens* sp. nov., *Luteimonas mephitis* gen. nov., sp. nov. and *Pseudoxanthomonas broegbernensis* gen. nov., sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**: 273-282.
- Flournoy, D.J., R.L. Petrone, and D.W. Voth. 1992. A pseudo-outbreak of *Methylobacterium mesophilicum* isolated from patients undergoing bronchoscopy. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **11**: 240-243.
- Fondi, M., V. Orlandini, E. Perrin, I. Maida, E. Bosi, M.C. Papaleo, L. Michaud, A. Lo Giudice, D. de Pascale, M.L. Tutino, P. Liò, and R. Fani. 2014. Draft genomes of three Antarctic *Psychrobacter* strains producing antimicrobial compounds against *Burkholderia cepacia* complex, opportunistic human pathogens. *Mar. Genomics.* **13**: 37-38.
- Fonnesbech Vogel, B.F., K. Venkateswaran, H. Christensen, E. Falsen, G. Christiansen, L. Gram. 2000. Polyphasic taxonomic approach in the description of *Alishewanella fetalis* gen. nov., sp. nov., isolated from a human foetus. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**: 1133-1142.
- Frank, B. 1889. Über die Pilzsymbiose der Leguminosen. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft.* **7**: 332-346.
- Fraser, S.L., and J.H. Jorgensen. 1997. Reappraisal of the antimicrobial susceptibilities of *Chryseobacterium* and *Flavobacterium* species and methods for reliable susceptibility testing. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**: 2738-2741.
- Funke, G., R. Frodl, and H. Sommer. 2004. First comprehensively documented case of *Paracoccus yeei* infection in a human. *J. Clin. Microbiol.* **42**: 3366-3368.
- Furuhata, K., A.U. Banzai, Y. Kawakami, N. Ishizaki, Y. Yoshida, K. Goto, and M. Fukuyama. 2011. Genotyping and chlorine-resistance of *Methylobacterium aquaticum* isolated from water samples in Japan. *Biocontrol. Sci.* **16**: 103-107.
- García-Lozano, T., P. Lorente Alegre, J.L. Juan Bañón, and E. Aznar Oroval. 2012. First case in Spain of bacteremia by *Methylobacterium thiocyanatum* from Hickmann catheter in an immunosuppressed patient with Hodgkin's lymphoma. *Med. Clin. (Barc.)* **139**: 602-603.
- Garg, S., S.B. Appannanavar, B. Mohan, and N. Taneja. 2015. Pyonephrosis due to *Chryseobacterium gleum*: a first case report. *Indian J. Med. Microbiol.* **33**: 311-313.
- Garrity, G., D.J. Brenner, N.R., Krieg, and J.T. Staley (editors). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Springer, 2005.
- Ghafur, A., P.R. Vidyakshmi, K. Priyadarshini, J.M. Easow, R. Raj, and T. Raja. 2013. *Elizabethkingia meningoseptica* bacteremia in immunocompromised hosts: The first case series from India. *South Asian J. Cancer.* **2**: 211-215.
- Giammanco, G.M., S. Pignato, C. Santangelo, P.A. Grimont, F. Grimont, and G. Giammanco. 2004. Molecular typing of *Agrobacterium* species isolates from catheter-related bloodstream infections. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **25**: 885-887.
- Gibson, R.L., J.L. Burns, and B.W. Ramsey. 2003. Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **168**: 918-951.

- Gil-Díaz, A., R. Estevez-Dominguez, R. Daryanani-Daryanani, J. Gil-Reyes, and C. Monzon-Moreno.** 2014. Fever of unknown origin in a young man. *Ir. J. Med. Sci.* **183**: 461-462.
- Gini, G.A.** 1990. Ocular infection caused by *Psychrobacter immobilis* acquired in the hospital. *J. Clin. Microbiol.* **28**: 400-401.
- Goldstein, E.J., D.M. Citron, C.V. Merriam, Y. Warren, and K. Tyrrell.** 2000a. Comparative in vitro activities of ABT-773 against aerobic and anaerobic pathogens isolated from skin and soft-tissue animal and human bite wound infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**: 2525-2529.
- Goldstein, E.J., D.M. Citron, C.V. Merriam, Y. Warren, and K. Tyrrell.** 2000b. Comparative in vitro activities of GAR-936 against aerobic and anaerobic animal and human bite wound pathogens. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**: 2747-2751.
- Gómez-Cerezo, J., I. Suárez, J.J. Ríos, P. Peña, M.J. García de Miguel, M. de José, O. Monteagudo, P. Linares, A. Barbado-Cano, and J.J. Vázquez.** 2003. *Achromobacter xylosoxidans* bacteremia: a 10-year analysis of 54 cases. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **22**: 360-363.
- Gomila, M., C. Prince-Manzano, L. Svensson-Stadler, A. Busquets, M. Erhard, D.L. Martínez, J. Lalucat, and E.R. Moore.** 2014. Genotypic and phenotypic applications for the differentiation and species-level identification of *Achromobacter* for clinical diagnoses. *PLoS One.* **9**: e114356.
- González, L.J., and A.J. Vila.** 2012. Carbapenem resistance in *Elizabethkingia meningoseptica* is mediated by metallo- β -lactamase BlaB. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**: 1686-1692.
- Graham, D.R., J.D. Band, C. Thornsberry, D.G. Hollis, and R.E. Weaver.** 1990. Infections caused by *Moraxella*, *Moraxella urethralis*, *Moraxella*-like groups M-5 and M-6, and *Kingella kingae* in the United States, 1953-1980. *Rev. Infect. Dis.* **12**: 423-431.
- Green, O., P. Murray, and J.C. Gea-Banacloche.** 2008. Sepsis caused by *Elizabethkingia miricola* successfully treated with tigecycline and levofloxacin. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **62**: 430-432.
- Greub, G., and D. Raoult.** 2003. *Rhodobacter massiliensis* sp. nov., a new amoebae-resistant species isolated from the nose of a patient. *Res. Microbiol.* **154**: 631-635.
- Grimaldi, D., A. Doloy, J. Fichet, E. Bourgeois, B. Zuber, A. Wajsfisz, J.P. Mira, C. Poyart, and F. Pène.** 2012. Necrotizing fasciitis and septic shock related to the uncommon gram-negative pathogen *Sphingobacterium multivorum*. *J. Clin. Microbiol.* **50**: 202-203.
- Guerra, N.C., A. Nobre, and J. Cravino.** 2013. Native mitral valve endocarditis due to *Rhizobium radiobacter* - first case report. *Rev. Port. Cir. Cardiorac. Vasc.* **20**: 203-205.
- Gupta, A.K., M.S. Dharne, A.Y. Rangrez, P. Verma, H.V. Ghate, M. Rohde, M.S. Patole, and Y.S. Shouche.** 2011. *Ignatzschineria indica* sp. nov. and *Ignatzschineria ureiclastica* sp. nov., isolated from adult flesh flies (*Diptera: Sarcophagidae*). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **61**: 1360-1369.
- Gupta, P.K., S.B. Appannanavar, H. Kaur, V. Gupta, B. Mohan, and N. Taneja.** 2014. Hospital acquired urinary tract infection by multidrug-resistant *Brevundimonas vesicularis*. *Indian J. Pathol. Microbiol.* **57**: 486-488.
- Hagiya, H., K. Ohnishi, M. Maki, N. Watanabe, and T. Murase.** 2013. Clinical characteristics of *Ochrobactrum anthropi* bacteremia. *J. Clin. Microbiol.* **51**: 1330-1333.
- Han, X.Y., A.S. Pham, J.J. Tarrand, K.V. Rolston, L.O. Helsel, and P.N. Levett.** 2003. Bacteriologic characterization of 36 strains of *Roseomonas* species and proposal of *Roseomonas mucosa* sp. nov. and *Roseomonas gilardii* subsp. *rosea* subsp. nov. *Am. J. Clin. Pathol.* **120**: 256-264.
- Han, Y.W., A. Ikegami, N.F. Bissada, M. Herbst, R.W. Redline, and G.G. Ashmead.** 2006. Transmission of an uncultivated *Bergeyella* strain from the oral cavity to amniotic fluid in a case of preterm birth. *J. Clin. Microbiol.* **44**: 1475-1483.
- Hansen, C.R., T. Pressler, K.G. Nielsen, P.Ø. Jensen, T. Bjarnsholt, and N. Høiby.** 2010. Inflammation in *Achromobacter xylosoxidans* infected cystic fibrosis patients. *J. Cyst. Fibros.* **9**: 51-58.
- Hansen, C.R.** 2012. *Stenotrophomonas maltophilia*: to be or not to be a cystic fibrosis pathogen. *Curr. Opin. Pulm. Med.* **18**: 628-631.
- Hansen, C.R., T. Pressler, W. Ridderberg, H.K. Johansen, and M. Skov.** 2013. *Achromobacter* species in cystic fibrosis: cross-infection caused by indirect patient-to-patient contact. *J. Cyst. Fibros.* **12**: 609-615.
- Hauben, L., L. Vauterin, J. Swings, and E.R. Moore.** 1997. Comparison of 16S ribosomal DNA sequences of all *Xanthomonas* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**: 328-335.
- Hauben, L., L. Vauterin, E.R. Moore, B. Hoste, and J. Swings.** 1999. Genomic diversity of the genus *Stenotrophomonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**: 1749-1760.
- Helsel, L.O., D. Hollis, A.G. Steigerwalt, R.E. Morey, J. Jordan, T. Aye, J. Radosevic, D. Jannat-Khah, D. Thiry, D.R. Lonsway, J.B. Patel, M.I. Daneshvar, and P.N. Levett.** 2007. Identification of *Haematobacter*, a new genus of aerobic Gram-negative rods isolated from clinical specimens, and reclassification of *Rhodobacter massiliensis* as *Haematobacter massiliensis* comb. nov. *J. Clin. Microbiol.* **45**: 1238-1243.
- Henrici, A.T., and D. Johnson.** 1935. Studies of Fresh water Bacteria. II. Stalked Bacteria, a new order of *Schizomycetes*. *J. Bacteriol.* **30**: 61-92.
- Heylen, K., B. Vanparys, F. Peirsegaale, L. Lebbe, and P. De Vos.** 2007. *Stenotrophomonas terrae* sp. nov. and *Stenotrophomonas humi* sp. nov., two nitrate-reducing bacteria isolated from soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**: 2056-2061.
- Higgins, C.S., S.M. Murtough, E. Williamson, S.J. Hiom, D.J. Payne, A.D. Russell, and T.R. Walsh.** 2001. Resistance to antibiotics and biocides among non-fermenting Gram-negative bacteria. *Clin. Microbiol. Infect.* **7**: 308-315.
- Holmes, B., J.J. Snell, and S.P. Lapage.** 1977. Strains of *Achromobacter xylosoxidans* from clinical material. *J. Clin. Pathol.* **30**: 595-601.
- Holmes, B., A.G. Steigerwalt, R.E. Weaver, and D.J. Brenner.** 1986. *Weeksella virosa* gen. nov., sp. nov. (formerly group IIF) found in human clinical specimens. *Syst. Appl. Microbiol.* **8**: 185-190.
- Holmes, B., M. Popoff, M. Kiredjian, and K. Kersters.** 1988. *Ochrobactrum anthropi* gen. nov., sp. nov. from human clinical specimens and previously known as group Vd. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **38**: 406-416.
- Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley, and S.T. Williams.** 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, ninth edition, 1994, Williams & Wilkins, Baltimore.
- Holt, H.M., B. Gahrn-Hansen, and B. Bruun.** 2005. *Shewanella algae* and *Shewanella putrefaciens*: clinical and microbiological characteristics. *Clin. Microbiol. Infect.* **11**: 347-352.
- Homem de Mello de Souza, H.A., L.M. Dalla-Costa, F.J. Vicenzi, D. Camargo de Souza, C.A. Riedi, N.A. Filho, and M. Pilonetto.** 2014. MALDI-TOF: a useful tool for laboratory identification of uncommon glucose non-fermenting Gram-negative bacteria associated with cystic fibrosis. *J. Med. Microbiol.* **63**: 1148-1153.
- Hornei, B., E. Lüneberg, H. Schmidt-Rotte, M. Maass, K. Weber, F. Heits, M. Frosch, and W. Solbach.** 1999. Systemic infection of an immunocompromised patient with *Methylobacterium zatmanii*. *J. Clin. Microbiol.* **37**: 248-250.

- Hsu, M.S., C.H. Liao, Y.T. Huang, C.Y. Liu, C.J. Yang, K.L. Kao, and P.R. Hsueh. 2011. Clinical features, antimicrobial susceptibilities, and outcomes of *Elizabethkingia meningoseptica* (*Chryseobacterium meningosepticum*) bacteremia at a medical center in Taiwan, 1999-2006. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **30**: 1271-1278.
- Hugh, R., and E. Ryschenkow. 1961. *Pseudomonas maltophilia*, an *alcaligenes*-like species. *J. Gen. Microbiol.* **26**: 123-132.
- Hugo, C.J., B. Bruun, and P.J. Jooste. 2006. The genera *Empedobacter* and *Myroides*. In: Dworkin, M., S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, and E. Stackebrandt (eds.). *The Prokaryotes*, 3rd edn., vol. 7, Springer, New York, pp. 630-637.
- Hugon, E., H. Marchandin, M. Poirée, T. Fosse, and N. Sirvent. 2015. *Achromobacter* bacteraemia outbreak in a paediatric oncology department related to strain with high surviving ability in contaminated disinfectant atomizers. *J. Hosp. Infect.* **89**: 116-122.
- Hulse, M., S. Johnson, and P. Ferrieri. 1993. *Agrobacterium* infections in humans: experience at one hospital and review. *Clin. Infect. Dis.* **16**: 112-117.
- Imbert, G., Y. Seccia, and B. La Scola. 2005. *Methylobacterium* sp. bacteraemia due to a contaminated endoscope. *J. Hosp. Infect.* **61**: 268-270.
- Iyobe, S., H. Kusadokoro, A. Takahashi, S. Yomoda, T. Okubo, A. Nakamura, and K. O'Hara. 2002. Detection of a variant metallo- β -lactamase, IMP-10, from two unrelated strains of *Pseudomonas aeruginosa* and an *Alcaligenes xylooxidans* strain. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**: 2014-2016.
- Janda, J.M., and S.L. Abbott. 2014. The genus *Shewanella*: from the briny depths below to human pathogen. *Crit. Rev. Microbiol.* **40**: 293-312.
- Janknecht, P., C.M. Schneider, and T. Ness. 2002. Outbreak of *Empedobacter brevis* endophthalmitis after cataract extraction. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **240**: 291-295.
- Jean, S.S., W.S. Lee, F.L. Chen, T.Y. Ou, and P.R. Hsueh. 2014. *Elizabethkingia meningoseptica*: an important emerging pathogen causing healthcare-associated infections. *J. Hosp. Infect.* **86**: 244-249.
- Jiang, X., D. Wang, Y. Wang, H. Yan, L. Shi, and L. Zhou. 2012. Occurrence of antimicrobial resistance genes *sul* and *dhfrA12* in hospital environmental isolates of *Elizabethkingia meningoseptica*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **28**: 3097-3102.
- Juni, E., and G.A. Heym. 1986. *Psychrobacter immobilis* gen. nov., sp. nov.: genospecies composed of gram-negative, aerobic, oxidase-positive coccobacilli. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **36**: 388-391.
- Juni, E. 2005. *Psychrobacter*. In: Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, editors. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 2nd ed. Vol. 2. New York: Springer; 2005. p. 437-41.
- Jurado, V., J.M. Gonzalez, L. Laiz, and C. Saiz-Jimenez. 2006. *Aurantimonas altamirensis* sp. nov., a member of the order *Rhizobiales* isolated from Altamira Cave. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**: 2583-2585.
- Justesen, U.S., H.M. Holt, H.C. Thiesson, J. Blom, X.C. Nielsen, R. Dargis, M. Kemp, and J.J. Christensen. 2007. Report of the first human case of *Caulobacter* sp. infection. *J. Clin. Microbiol.* **45**: 1366-1369.
- Kaiser, S., K. Biehler, and D. Jonas. 2009. A *Stenotrophomonas maltophilia* multilocus sequence typing scheme for inferring population structure. *J. Bacteriol.* **191**: 2934-2943.
- Kampf, G., S. Degenhardt, S. Lackner, K. Jesse, H. von Baum, and C. Ostermeyer. 2014. Poorly processed reusable surface disinfection tissue dispensers may be a source of infection. *BMC Infect. Dis.* **14**: 37.
- Kämpfer, P., A. Albrecht, S. Buczolits, and H.J. Busse. 2002. *Psychrobacter faecalis* sp. nov., a new species from a bioaerosol originating from pigeon faeces. *Syst. Appl. Microbiol.* **25**: 31-36.
- Kämpfer, P., R. Rosselló-Mora, H.C. Scholz, C. Welinder-Olsson, E. Falsen, and H.J. Busse. 2006a. Description of *Pseudochrobacterium* gen. nov., with the two species *Pseudochrobacterium asaccharolyticum* sp. nov. and *Pseudochrobacterium saccharolyticum* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**: 1823-1829.
- Kämpfer, P., V. Avesani, M. Janssens, J. Charlier, T. De Baere, and M. Vanechoutte. 2006b. Description of *Wautersiella falsenii* gen. nov., sp. nov., to accommodate clinical isolates phenotypically resembling members of the genera *Chryseobacterium* and *Empedobacter*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**: 2323-2329.
- Kämpfer, P., D.M. Citron, E.J. Goldstein, and H.C. Scholz. 2007a. Difficulty in the identification and differentiation of clinically relevant *Ochrobactrum* species. *J. Med. Microbiol.* **56**: 1571-1573.
- Kämpfer, P., H.C. Scholz, B. Huber, E. Falsen, and H.J. Busse. 2007b. *Ochrobactrum haematophilum* sp. nov. and *Ochrobactrum pseudogrignonense* sp. nov., isolated from human clinical specimens. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**: 2513-2518.
- Kämpfer, P., M. Vanechoutte, N. Lodders, T. De Baere, V. Avesani, M. Janssens, H.J. Busse, and G. Wauters. 2009. Description of *Chryseobacterium anthropi* sp. nov. to accommodate clinical isolates biochemically similar to *Kaistella koreensis* and *Chryseobacterium haifense*, proposal to reclassify *Kaistella koreensis* as *Chryseobacterium koreense* comb. nov. and emended description of the genus *Chryseobacterium*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **59**: 2421-2428.
- Kämpfer, P., N. Lodders, K. Martin, and E. Falsen. 2011. Revision of the genus *Massilia* La Scola et al. 2000, with an emended description of the genus and inclusion of all species of the genus *Naxibacter* as new combinations, and proposal of *Massilia consociata* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **61**: 1528-1533.
- Kämpfer, P., N. Lodders, K. Martin, and E. Falsen. 2012. *Massilia oculi* sp. nov., isolated from a human clinical specimen. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **62**: 364-369.
- Kanis, M.J., J.J. Oosterheert, S. Lin, C.H. Boel, and M.B. Ekkelenkamp. 2010. Corneal graft rejection complicated by *Paracoccus yeei* infection in a patient who had undergone a penetrating keratoplasty. *J. Clin. Microbiol.* **48**: 323-325.
- Kaparullina, E., N. Doronina, T. Chistyakova, and Y. Trotsenko. 2009. *Stenotrophomonas chelatiphaga* sp. nov., a new aerobic EDTA-degrading bacterium. *Syst. Appl. Microbiol.* **32**: 157-162.
- Karadag, N., B.S. Karagol, A. Dursun, N. Okumus, G. Tanir, and A. Zenciroglu. 2012. A premature neonate with early-onset neonatal sepsis owing to *Brevundimonas vesicularis* complicated by persistent meningitis and lymphadenopathy. *Paediatr. Int. Child Health.* **32**: 239-241.
- Kato, J., T. Mori, K. Sugita, Y. Aisa, Y. Ikeda, and S. Okamoto. 2009. Central line-associated bacteremia caused by *Rhizobium radiobacter* after allogeneic bone marrow transplantation. *Transpl. Infect. Dis.* **11**: 380-381.
- Kawasaki, S., R. Moriguchi, K. Sekiya, T. Nakai, E. Ono, K. Kume, and K.T. Kawahara. 1994. The cell envelope structure of the lipopolysaccharide-lacking gram-negative bacterium *Sphingomonas paucimobilis*. *J. Bacteriol.* **176**: 284-290.
- Kay, S.E., R.A. Clark, K.L. White, and M.M. Peel. 2001. Recurrent *Achromobacter piechaudii* bacteremia in a patient with hematological malignancy. *J. Clin. Microbiol.* **39**: 808-810.
- Kaye, K.M., A. Macone, and P.H. Kazanjian. 1992. Catheter infection caused by *Methylobacterium* in immunocompromised hosts: report of three cases and review of the literature. *Clin. Infect. Dis.* **14**: 1010-1014.

- Khan, S., S. Sistla, R. Dhodapkar, and S.C. Parija.** 2012. Fatal *Delftia acidovorans* infection in an immunocompetent patient with empyema. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* **2**: 923-924.
- Khashe, S., and J.M. Janda.** 1998. Biochemical and pathogenic properties of *Shewanella* alga and *Shewanella putrefaciens*. *J. Clin. Microbiol.* **36**: 783-787.
- Kilic, A., Z. Senses, A.E. Kurekci, H. Aydogan, K. Sener, E. Kismet, and A.C. Basustaoglu.** 2007. Nosocomial outbreak of *Sphingomonas paucimobilis* bacteremia in a hemato/oncology unit. *Jpn J. Infect. Dis.* **60**: 394-396.
- Kim, K.K., M.K. Kim, J.H. Lim, H.Y. Park, and S.T. Lee.** 2005. Transfer of *Chryseobacterium meningosepticum* and *Chryseobacterium miricola* to *Elizabethkingia* gen. nov. as *Elizabethkingia meningoseptica* comb. nov. and *Elizabethkingia miricola* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**: 1287-1293.
- Kim, H.B., S. Srinivasan, G. Sathiyaraj, L.H. Quan, S.H. Kim, T.P. Bui, Z.Q. Liang, Y.J. Kim, and D.C. Yang.** 2010. *Stenotrophomonas ginsengisoli* sp. nov., isolated from a ginseng field. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **60**: 1522-1526.
- Kim, D.S., Y.M. Wi, J.Y. Choi, K.R. Peck, J.H. Song, and K.S. Ko.** 2011. Bacteremia caused by *Laribacter hongkongensis* misidentified as *Acinetobacter lwoffii*: report of the first case in Korea. *J. Korean Med. Sci.* **26**: 679-681.
- Kim, D.S., J. Paek, J.H. Shin, D.W. Kim, M.Y. Jung, R.N. Kim, Y. Sin, J.K. Kook, S.H. Nam, A. Kim, A. Kang, H.S. Park, S.H. Choi, and Y.H. Chang.** 2012. Genome sequence of *Myroides injenensis* M09-0166(T), isolated from clinical specimens. *J. Bacteriol.* **194**: 2748-2749.
- Kiratisin, P., P. Kowwigkai, S. Pattanachaiwit, A. Apisarnthanarak, and A. Leelaporn.** 2007. *Dyella japonica* bacteremia in hemodialysis patient. *Emerg. Infect. Dis.* **13**: 1266-1267.
- Kirby, J.T., H.S. Sader, T.R. Walsh, and R.N. Jones.** 2004. Antimicrobial susceptibility and epidemiology of a worldwide collection of *Chryseobacterium* spp.: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program (1997-2001). *J. Clin. Microbiol.* **42**: 445-448.
- Klinger, J.D., and M.J. Thomassen.** 1985. Occurrence and antimicrobial susceptibility of gram-negative nonfermentative bacilli in cystic fibrosis patients. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **3**: 149-158.
- Koh, Y.R., S.Y. Kim, C.L. Chang, H.J. Shin, K.H. Kim, and J. Yi.** 2013. The first Korean case of *Sphingobacterium spiritivorum* bacteremia in a patient with acute myeloid leukemia. *Ann. Lab. Med.* **33**: 283-287.
- Köljal, S., K. Telling, K. Huik, M. Murruste, V. Saarevet, M. Pauskar, and I. Lutsar.** 2015. First report of *Wohlfahrtiimonas chitiniclastica* from soft tissue and bone infection at an unusually high northern latitude. *Folia Microbiol. (Praha)*. **60**: 155-158.
- Kovaleva, J., J.E. Degener, and H.C. van der Mei.** 2010. Mimicking disinfection and drying of biofilms in contaminated endoscopes. *J. Hosp. Infect.* **76**: 345-350.
- Kovaleva, J., J.E. Degener, and H.C. van der Mei.** 2014. *Methylobacterium* and its role in health care-associated infection. *J. Clin. Microbiol.* **52**: 1317-1321.
- Krause, M.L., M.R. Sohail, R. Patel, and C.M. Wittich.** 2012. *Achromobacter piechaudii* bloodstream infection in an immunocompetent host. *Am. J. Case Rep.* **13**: 265-267.
- Kressel, A.B., and F. Kidd.** 2001. Pseudo-outbreak of *Mycobacterium chelonae* and *Methylobacterium mesophilicum* caused by contamination of an automated endoscopy washer. *Infect Control Hosp Epidemiol.* **22**: 414-418.
- Ktari, S., B. Mnif, M. Koubaa, F. Mahjoubi, M. Ben Jemaa, M.N. Mhiri, and A. Hammami.** 2012. Nosocomial outbreak of *Myroides odoratimimus* urinary tract infection in a Tunisian hospital. *J. Hosp. Infect.* **80**: 77-81.
- Kumar, S., S. Kapoor, S. Chadha, and S.R. Saigal.** 2013. *Ochrobactrum anthropi* septicemia and pneumonia in a preterm, small for gestational age infant with multiple congenital anomalies. *Indian J. Pathol. Microbiol.* **56**: 317-318.
- Labarca, J.A., P. Garcia, M.E. Balcells, G. de la Cerda, A.M. Salinas, J.C. Roman, A.M. Guzman, and C.M. Perez.** 2007. Pseudo-outbreak of *Ochrobactrum anthropi* bacteremia related to cross-contamination from erythrocyte sedimentation tubes. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **28**: 763-765.
- Lai, C.C., L.J. Teng, P.R. Hsueh, A. Yuan, K.C. Tsai, J.L. Tang, and H.F. Tien.** 2004. Clinical and microbiological characteristics of *Rhizobium radiobacter* infections. *Clin. Infect. Dis.* **38**: 149-153.
- Lai, C.C., A. Cheng, W.L. Liu, C.K. Tan, Y.T. Huang, K.P. Chung, M.R. Lee, and P.R. Hsueh.** 2011. Infections caused by unusual *Methylobacterium* species. *J. Clin. Microbiol.* **49**: 3329-3331.
- Lambert, T., M.C. Ploy, F. Denis, and P. Courvalin.** 1999. Characterization of the chromosomal *aac(6')-Iz* gene of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**: 2366-2371.
- Lambiase, A., M. Del Pezzo, V. Raia, A. Sepe, P. Ferri, and F. Rossano.** 2007. *Chryseobacterium* respiratory tract infections in patients with cystic fibrosis. *J. Infect.* **55**: 518-523.
- Lambiase, A., F. Rossano, M. Del Pezzo, V. Raia, A. Sepe, F. de Gregorio, and M.R. Catania.** 2009. *Sphingobacterium* respiratory tract infection in patients with cystic fibrosis. *BMC Res Notes.* **2**: 262.
- La Scola, B., R.J. Birtles, M.N. Mallet, and D. Raoult.** 1998. *Massilia timonae* gen. nov., sp. nov., isolated from blood of an immunocompromised patient with cerebellar lesions. *J. Clin. Microbiol.* **36**: 2847-2852.
- Lau, S.K., P.L. Ho, M.W. Li, H.W. Tsoi, R.W. Yung, P.C. Woo, and K.Y. Yuen.** 2005. Cloning and characterization of a chromosomal class C beta-lactamase and its regulatory gene in *Laribacter hongkongensis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**: 1957-1964.
- Lau, S.K., G.K. Wong, R.W. Poon, L.C. Lee, K.W. Leung, C.W. Tse, P.L. Ho, T.L. Que, P.C. Woo, and K.Y. Yuen.** 2009. Susceptibility patterns of clinical and fish isolates of *Laribacter hongkongensis*: comparison of the Etest, disc diffusion and broth microdilution methods. *J. Antimicrob. Chemother.* **63**: 704-708.
- Lau, S.K., G.K. Wong, A.K. Tsang, J.L. Teng, R.Y. Fan, H. Tse, K.Y. Yuen, and P.C. Woo.** 2011. Virulence determinants, drug resistance and mobile genetic elements of *Laribacter hongkongensis*: a genome-wide analysis. *Cell. Biosci.* **1**: 17.
- Lau, S.K., A.K. Wu, J.L. Teng, H. Tse, S.O. Curreem, S.K. Tsui, Y. Huang, J.H. Chen, R.A. Lee, K.Y. Yuen, and P.C. Woo.** 2015. Evidence for *Elizabethkingia anophelis* transmission from mother to infant, Hong Kong. *Emerg. Infect. Dis.* **21**: 232-241.
- Lautrop, H.** 1967. *Agrobacterium* spp. isolated from clinical specimens. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Suppl.* **187**: 63-64.
- Lavigne, J.P., J.B. Gaillard, G. Bourg, C. Tichit, E. Lecaillon, and A. Sotto.** 2008. Extended-spectrum beta-lactamases-producing *Stenotrophomonas maltophilia* strains: CTX-M enzymes detection and virulence study. *Pathol. Biol. (Paris)*. **56**: 447-453.
- Leal-Klevezas, D.S., O. Martínez-de-la-Vega, E.J. Ramírez-Barba, B. Osterman, J.P. Martínez-Soriano, and J. Simpson.** 2005. Genotyping of *Ochrobactrum* spp. by AFLP analysis. *J. Bacteriol.* **187**: 2537-2539.
- Lecso-Bornet, M., J. Pierre, D. Sarkis-Karam, S. Lubera, and E. Bergogne-Berezin.** 1992. Susceptibility of *Xanthomonas maltophilia* to six quinolones and study of outer membrane proteins in resistant mutants selected in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36**: 669-671.

- Lee, C.H., Y.F. Tang, and J.W. Liu. 2004. Underdiagnosis of urinary tract infection caused by *Methylobacterium* species with current standard processing of urine culture and its clinical implications. *J. Med. Microbiol.* **53**: 755-759.
- Lee, M., S.G. Woo, M. Chae, M.C. Shin, H.M. Jung, and L.N. Ten. 2011a. *Stenotrophomonas daejeonensis* sp. nov., isolated from sewage. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **61**: 598-604.
- Lee, M.R., Y.T. Huang, C.H. Liao, T.Y. Chuang, C.K. Lin, S.W. Lee, C.C. Lai, C.J. Yu, and P.R. Hsueh. 2011b. Bacteremia caused by *Brevundimonas* species at a tertiary care hospital in Taiwan, 2000-2010. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **30**: 1185-1191.
- Lemaitre, D., A. Elaichouni, M. Hundhausen, G. Claeys, P. Vanhaesebrouck, M. Vanechoutte, and G. Verschraegen. 1996. Tracheal colonization with *Sphingomonas paucimobilis* in mechanically ventilated neonates due to contaminated ventilator temperature probes. *J. Hosp. Infect.* **32**: 199-206.
- Leung, W.K., V.C. Chow, M.C. Chan, J.M. Ling, and J.J. Sung. 2006. *Psychrobacter* bacteraemia in a cirrhotic patient after the consumption of raw geoduck clam. *J. Infect.* **52**: e169-171.
- Li, X., Y. Hu, J. Gong, L. Zhang, and G. Wang. 2013. Comparative genome characterization of *Achromobacter* members reveals potential genetic determinants facilitating the adaptation to a pathogenic lifestyle. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**: 6413-6425.
- Li, L., J.J. Tarrand, and X.Y. Han. 2015. Microbiological and clinical features of four cases of catheter-related infection by *Methylobacterium radiotolerans*. *J. Clin. Microbiol.* **53**: 1375-1379.
- Liaquat, I., and A.N. Sabri. 2009. Isolation and characterization of biocides resistant bacteria from dental unit water line biofilms. *J. Basic Microbiol.* **49**: 275-284.
- Lin, P.Y., C. Chu, L.H. Su, C.T. Huang, W.Y. Chang, and C.H. Chiu. 2004. Clinical and microbiological analysis of bloodstream infections caused by *Chryseobacterium meningosepticum* in nonneonatal patients. *J. Clin. Microbiol.* **42**: 3353-3355.
- Lin, W.R., Y.S. Chen, and Y.C. Liu. 2007. Cellulitis and bacteremia caused by *Bergeyella zoohelcum*. *J. Formos. Med. Assoc.* **106**: 573-576.
- Lin, J.N., C.H. Lai, Y.H. Chen, H.L. Lin, C.K. Huang, W.F. Chen, J.L. Wang, H.C. Chung, S.H. Liang, and H.H. Lin. 2010a. *Sphingomonas paucimobilis* bacteremia in humans: 16 case reports and a literature review. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* **43**: 35-42.
- Lin, Y.T., Y.Y. Jeng, M.L. Lin, K.W. Yu, F.D. Wang, and C.Y. Liu. 2010b. Clinical and microbiological characteristics of *Chryseobacterium indologenes* bacteremia. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* **43**: 498-505.
- Lin, C.Y., and Y.H. Chen. 2013. Bacteremia due to *Brevundimonas vesicularis*. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* **46**: 143.
- Lindquist, D., D. Murrill, W.P. Burran, G. Winans, J.M. Janda, and W. Probert. 2003. Characteristics of *Massilia timonae* and *Massilia timonae*-like isolates from human patients, with an emended description of the species. *J. Clin. Microbiol.* **41**: 192-196.
- Lloyd-Puryear, M., D. Wallace, T. Baldwin, and D.G. Hollis. 1991. Meningitis caused by *Psychrobacter immobilis* in an infant. *J. Clin. Microbiol.* **29**: 2041-2042.
- Lo, H.H., and S.M. Chang. 2014. Identification, characterization, and biofilm formation of clinical *Chryseobacterium gleum* isolates. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **79**: 298-302.
- Lozano, F., C. Florez, F.J. Recio, F. Gamboa, J.M. Gómez-Mateas, and E. Martín. 1994. Fatal *Psychrobacter immobilis* infection in a patient with AIDS. *AIDS.* **8**: 1189-1190.
- Luong, M.L., S. Békal, D.C. Vinh, D. Lauzon, V. Leung, G.N. Al-Rawahi, B. Ng, T. Burdz, and K. Bernard. 2008. First report of isolation and characterization of *Aurantimonas altamirensis* from clinical samples. *J. Clin. Microbiol.* **46**: 2435-2437.
- MacDonell, M.T., and R.R. Colwell. 1985. Phylogeny of the *Vibrionaceae*, and recommendation for two new genera, *Listonella* and *Shewanella*. *Syst. Appl. Microbiol.* **6**: 171-182.
- Mahapatra, A., D. Pattnaik, S. Majhi, and D. Sahoo. 2014. Post traumatic abscess caused by *Brevundimonas diminuta*: a rare case report. *Indian J. Pathol. Microbiol.* **57**: 354-356.
- Mahenthalingam, E. 2014. Emerging cystic fibrosis pathogens and the microbiome. *Paediatr. Respir. Rev.* **15**: 13-15.
- Mahmood, S., K.E. Taylor, T.L. Overman, and M.I. McCormick. 2012. Acute infective endocarditis caused by *Delftia acidovorans*, a rare pathogen complicating intravenous drug use. *J. Clin. Microbiol.* **50**: 3799-3800.
- Mammeri, H., S. Bellais, and P. Nordmann. 2002. Chromosome-encoded β -lactamases TUS-1 and MUS-1 from *Myroides odoratus* and *Myroides odoratimimus* (formerly *Flavobacterium odoratus*), new members of the lineage of molecular subclass B1 metalloenzymes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**: 3561-3567.
- Mammeri, H., L. Poirel, N. Mangeney, and P. Nordmann. 2003. Chromosomal integration of a cephalosporinase gene from *Acinetobacter baumannii* into *Oligella urethralis* as a source of acquired resistance to beta-lactams. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**: 1536-1542.
- Mantadakis, E., A. Kondi, A. Christidou, and M. Kalmanti. 2010. *Agrobacterium radiobacter* bacteremia in a child with acute lymphoblastic leukemia. *World J. Pediatr.* **6**: 181-184.
- Maraki, S., E. Sarchianaki, and S. Barbagadakakis. 2012. *Myroides odoratimimus* soft tissue infection in an immunocompetent child following a pig bite: case report and literature review. *Braz. J. Infect. Dis.* **16**: 390-392.
- Marbjerg, L.H., S. Gaini, and U.S. Justesen. 2015. First Report of *Sphingomonas koreensis* as a human pathogen in a patient with meningitis. *J. Clin. Microbiol.* **53**: 1028-1030.
- Marchandin, H., A.L. Michon, and E. Jumas-Bilak. 2012. Chapter 10: Atypical Bacteria in the CF Airways: Diversity, Clinical Consequences, Emergence and Adaptation, Cystic Fibrosis. In: *Renewed Hopes Through Research*, Dr. Dinesh Sriramulu (Ed.), 2012, pp. 225-252, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/cystic-fibrosis-renewed-hopes-through-research/atypical-bacteria-in-the-cfairways-diversity-clinical-consequences-emergence-and-adaptation>.
- Mardy, C., and B. Holmes. 1988. Incidence of vaginal *Weeksella virosa* (formerly group If). *J. Clin. Pathol.* **41**: 211-214.
- Marques, A.C., K.S. Paludo, C.B. Dallagassa, M. Surek, F.O. Pedrosa, E.M. Souza, L.M. Cruz, J.J. LiPuma, S.M. Zanata, F.G. Rego, and C.M. Fadel-Picheth. 2015. Biochemical characteristics, adhesion, and cytotoxicity of environmental and clinical isolates of *Herbaspirillum* spp. *J. Clin. Microbiol.* **53**: 302-308.
- Marshall, W.F., M.R. Keating, J.P. Anhalt, and J.M. Steckelberg. 1989. *Xanthomonas maltophilia*: an emerging nosocomial pathogen. *Mayo Clin. Proc.* **64**: 1097-1104.
- Marzuillo, C., M. De Giusti, D. Tufi, A. Giordano, A. Del Cimmuto, S. Quattrucci, C. Mancini, and P. Villari. 2009. Molecular characterization of *Stenotrophomonas maltophilia* isolates from cystic fibrosis patients and the hospital environment. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **30**: 753-758.
- Mastroianni, A., O. Coronado, A. Nanetti, R. Manfredi, and F. Chiodo. 1996. *Agrobacterium radiobacter* pneumonia in a patient with HIV infection. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **15**: 960-963.

- Matsumoto, T., M. Nagata, N. Ishimine, K. Kawasaki, K. Yamauchi, E. Hidaka, E. Kasuga, K. Horiuchi, K. Oana, Y. Kawakami, and T. Honda. 2012. Characterization of CIA-1, an Ambler class A extended-spectrum β -lactamase from *Chryseobacterium indologenes*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**: 588-590.
- Mattos, F.B., F.P. Saraiva, H. Angotti-Neto, and A.F. Passos. 2013. Outbreak of *Ochrobactrum anthropi* endophthalmitis following cataract surgery. *J. Hosp. Infect.* **83**: 337-340.
- Maurin, M., J.N. Delbano, L. Mackaya, H. Colomb, C. Guier, A. Mandjee, C. Recule, and J. Croize. 2007. Human infection with *Schineria tarvae*. *Emerg. Infect. Dis.* **13**: 657-659.
- McGinnis, J.M., J.A. Cole, M.C. Dickinson, L.A. Mingle, P. Lapierre, K.A. Musser, and W.J. Wolfgang. 2015. *Paracoccus sanguinis* sp. nov., isolated from clinical specimens of New York State patients. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **65**: 1877-1882.
- McKew, G. 2014. Severe sepsis due to *Chryseobacterium indologenes* in an immunocompetent adventure traveler. *J. Clin. Microbiol.* **52**: 4100-4101.
- Melgosa, M., O. Espinazo, A. Alonso, A. García Perea, and M. Navarro. 2004. Dialysis-associated *Alcaligenes xylosoxidans* peritonitis: a pediatric case. *Perit. Dial. Int. J.* **24**: 72-75.
- Mendes, R.E., G.A. Denys, T.R. Fritsche, and R.N. Jones. 2009. Case report of *Aurantimonas altamirensis* bloodstream infection. *J. Clin. Microbiol.* **47**: 514-515.
- Menezes, F.G., M.G. Abreu, J.Y. Kawagoe, A.N. Warth, A.D. Deutsch, M.F. Dornaus, M.D. Martino, and L. Correa. 2014. *Ochrobactrum anthropi* bacteremia in a preterm infant with cystic fibrosis. *Braz. J. Microbiol.* **45**: 559-561.
- Menuet, M., F. Bittar, N. Stremler, J.C. Dubus, J. Sarles, D. Raoult, and J.M. Rolain. 2008. First isolation of two colistin-resistant emerging pathogens, *Brevundimonas diminuta* and *Ochrobactrum anthropi*, in a woman with cystic fibrosis: a case report. *J. Med. Case Rep.* **2**: 373.
- Meric, M., A. Willke, F. Kolayli, S. Yavuz, and H. Vahaboglu. 2009. Water-borne *Sphingomonas paucimobilis* epidemic in an intensive care unit. *J. Infect.* **58**: 253-255.
- Mesnard, R., J.M. Sire, P.Y. Donnio, J.Y. Riou, and J.L. Avril. 1992. Septic arthritis due to *Oligella urethralis*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **11**: 195-196.
- Michon, A.L., L. Saumet, A. Bourdier, S. Haouy, N. Sirvent, and H. Marchandin. 2014. Bacteremia due to imipenem-resistant *Roseomonas mucosa* in a child with acute lymphoblastic leukemia. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* **36**: e165-168.
- Miller, J.M., C. Novy, and M. Hiott. 1996. Case of bacterial endophthalmitis caused by an *Agrobacterium radiobacter*-like organism. *J. Clin. Microbiol.* **34**: 3212-3213.
- Minkwitz, A., and G. Berg. 2001. Comparison of antifungal activities and 16S ribosomal DNA sequences of clinical and environmental isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. *J. Clin. Microbiol.* **39**: 139-145.
- Mohan, D., and M. Railey. 2015. *Sphingomonas paucimobilis* peritonitis: A case report and review of the literature. *Saudi J. Kidney Dis. Transpl.* **26**: 567-571.
- Molina-Cabrillana, J., C. Santana-Reyes, A. González-García, A. Bordes-Benítez, and I. Horcajada. 2007. Outbreak of *Achromobacter xylosoxidans* pseudobacteremia in a neonatal care unit related to contaminated chlorhexidine solution. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **26**: 435-437.
- Monteil, H., and C. Harf-Monteil. 2006. Les bacilles à Gram négatif non-fermentants autres que les *Pseudomonas*. Dans : *Précis de Microbiologie clinique*, ESKA, 2006, p. 1149-1166.
- Montejo, M., K. Aguirrebengoa, J. Ugalde, L. Lopez, J.A. Saez Nieto, and J.L. Hernández. 2001. *Bergeyella zoohelcum* bacteremia after a dog bite. *Clin. Infect. Dis.* **33**: 1608-1609.
- Moreau-Gaudry, V., C. Chiquet, S. Boisset, J. Croize, Y. Benito, P.L. Cornut, A. Bron, F. Vandenesch, M. Maurin; French Institutional Endophthalmitis Study (FRIENDS) Group. 2012. Three cases of post-cataract surgery endophthalmitis due to *Rhizobium (Agrobacterium) radiobacter*. *J. Clin. Microbiol.* **50**: 1487-1490.
- Mrozek, S., M. Dupuy, L. Hoarau, J. Lourtet, G. Martin-Blondel, and T. Geeraerts. 2014. Brain empyema due to *Ochrobactrum anthropi*. *Med. Mal. Infect.* **44**: 128-129.
- Mudshingkar, S.S., A.C. Choure, M.S. Palewar, V. B. Dohe, and A.S. Kagal. 2013. *Ochrobactrum anthropi*: an unusual pathogen: are we missing them? *Indian J. Med. Microbiol.* **31**: 306-308.
- Muñoz Bellido, J.L., S. Muñoz Criado, I. García García, M.A. Alonso Manzanares, M.N. Gutiérrez Zufiaurre, and J.A. García-Rodríguez. 1997. In vitro activities of beta-lactam-beta-lactamase inhibitor combinations against *Stenotrophomonas maltophilia*: correlation between methods for testing inhibitory activity, time-kill curves, and bactericidal activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**: 2612-2615.
- Mutlu, M., G. Bayramoglu, G. Yilmaz, B. Saygin, and Y. Aslan. 2011. Outbreak of *Sphingomonas paucimobilis* septicemia in a neonatal intensive care unit. *Indian Pediatr.* **48**: 723-725.
- Mwalutende, A., S.E. Mshana, M.M. Mirambo, M.F. Mushi, P.L. Chalya, J.M. Giliyoma, W. Schneiderhan, O. Zimmermann, and U. Groß. 2014. Two cases of chronic suppurative otitis media caused by *Kersteria giorum* in Tanzania: is it an underappreciated pathogen in chronic otitis media? *Int. J. Infect. Dis.* **29**: 251-253.
- Naik, C., H. Kulkarni, A. Darabi, and N. Bhanot. 2013. *Ochrobactrum anthropi*: a rare cause of pneumonia. *J. Infect. Chemother.* **19**: 162-165.
- Ng, Z.Y., G. Fang, and K.W. Leo. 2014. Resolution of concomitant *Achromobacter xylosoxidans* burn wound infection without adjustment of antimicrobial therapy. *Indian J. Plast. Surg.* **47**: 137-140.
- Nielsen, T.K., M. Pinholt, N. Nørgaard, and K.J. Mikines. 2014. Inoculation of *Sphingobacterium multivorum* in the prostate by prostate biopsy. *Scand. J. Urol.* **48**: 116-118.
- Nishio, E. 2010. A case of anaphylactoid purpura suggested to *Empedobacter (Flavobacterium) brevis* infection concerned. *Arerugi.* **59**: 558-561.
- Nseir, W., J. Khateeb, M. Awawdeh, and M. Ghali. 2011. Catheter-related bacteremia caused by *Comamonas testosteroni* in a hemodialysis patient. *Hemodial. Int.* **15**: 293-296.
- O'Donnell, M.J., C.M. Tuttlebee, F.R. Falkiner, and D.C. Coleman. 2005. Bacterial contamination of dental chair units in a modern dental hospital caused by leakage from suction system hoses containing extensive biofilm. *J. Hosp. Infect.* **59**: 348-360.
- Olbrich, P., M. Rivero-Garvía, M.D. Falcón-Neyra, J.A. Lepe, J.M. Cisneros, J. Marquez-Rivas, and O. Neth. 2014. *Chryseobacterium indologenes* central nervous system infection in infancy: an emergent pathogen? *Infection.* **42**: 179-183.
- Olshain-Pops, K., C. Block, V. Temper, C. Hidalgo-Grass, I. Gross, A.E. Moses, O.N. Gofrit, and S. Benenson. 2011. An outbreak of *achromobacter xylosoxidans* associated with ultrasound gel used during transrectal ultrasound guided prostate biopsy. *J. Urol.* **185**: 144-147.
- Opota, O., B. Ney, G. Zanetti, K. Jatou, G. Greub, and G. Prod'homme. 2014. Bacteremia caused by *Comamonas kerstersii* in a patient with diverticulosis. *J. Clin. Microbiol.* **52**: 1009-1012.

- Orsborne, C., A. Hardy, B. Isalska, S.G. Williams, and E.G. Muldoon. 2014. *Acidovorax oryzae* catheter-associated bloodstream infection. *J. Clin. Microbiol.* **52**: 4421-4424.
- Paek, J., J.H. Shin, Y. Shin, I.S. Park, T.E. Jin, J.K. Kook, S.H. Wie, H.G. Cho, S.J. Park, and Y.H. Chang. 2015. *Myroides injenensis* sp. nov., a new member isolated from human urine. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **107**: 201-207.
- Pal, S.S., P.K. Panigrahi, R. Roy, K. Nandi, and S. Das. 2013. Endophthalmitis caused by *Alcaligenes faecalis*: a case series. *Ocul. Immunol. Inflamm.* **21**: 446-448.
- Palamuthusingam, D., and K.S. Tan. 2014. The first case of *Paracoccus yeeii* species infection in Australia causing peritonitis in an APD patient. *Nephrology (Carlton).* **19**: 116.
- Palleroni, N.J., and J.F. Bradbury. 1993. *Stenotrophomonas*, a new bacterial genus for *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1980) Swings *et al.* 1983. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **43**: 606-609.
- Pandit, R.T. 2012. *Brevundimonas diminuta* keratitis. *Eye Contact Lens.* **38**: 63-65.
- Pangon, B., P. Allouch, and J.C. Ghnassia. 1998. Susceptibility of 146 *Stenotrophomonas maltophilia* strains to 14 antibiotics: a French collaborative study. *Med. Mal. Infect.* **28**: 89-94.
- Papalia, M., M. Almuzara, D. Cejas, G. Traglia, M.S. Ramirez, L. Galanternik, C. Vay, G. Gutkind, and M. Radice. 2013. OXA-258 from *Achromobacter ruhlandii*: a species-specific marker. *J. Clin. Microbiol.* **51**: 1602-1605.
- Park, M.K., and H.B. Shin. 2013. *Massilia* sp. isolated from otitis media. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* **77**: 303-305.
- Pascale, R., E. Russo, I. Esposito, S. Leone, and S. Esposito. 2013. *Sphingomonas paucimobilis* osteomyelitis in an immunocompetent patient. A rare case report and literature review. *New Microbiol.* **36**: 423-426.
- Patt, T.E., G.C. Cole, and R.S. Hanson. 1976. *Methylobacterium*, a new genus of facultatively methylotrophic bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **26**: 226-229.
- Peiris, K., T.M. Gee, and T.C. Boswell. 2006. Bloodstream infection related to heparin infusion caused by *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Hosp. Infect.* **62**: 250-251.
- Pence, M.A., J. Sharon, E. McElvania Tekippe, B.L. Pakalnikis, B.A. Ford, and C.A. Burnham. 2013. Two cases of *Kerstersia gyiorum* isolated from sites of chronic infection. *J. Clin. Microbiol.* **51**: 2001-2004.
- Perola, O., T. Nousiainen, S. Suomalainen, S. Aukee, U.M. Kärkkäinen, J. Kauppinen, T. Ojanen, and M.L. Katila. 2002. Recurrent *Sphingomonas paucimobilis* -bacteraemia associated with a multi-bacterial water-borne epidemic among neutropenic patients. *J. Hosp. Infect.* **50**: 196-201.
- Pierre-Filho, Pde T., A.P. Ribeiro, E.D. Passos, M. Torigoe, and J.P. de Vasconcelos. 2003. Endophthalmitis caused by *Agrobacterium radiobacter*. *Scand. J. Infect. Dis.* **35**: 410-411.
- Philippon, A. 2006. b-lactamines et bacilles à Gram négatif non fermentaires. p. 179-204. In: Courvalin, P., R. Leclercq, and E. Bingen (éditeurs). *Antibiogramme*, 2ème édition, 2006, ESKA, p.179-204.
- Plotkin, G.R. 1980. *Agrobacterium radiobacter* prosthetic valve endocarditis. *Ann. Intern. Med.* **93**: 839-840.
- Pompilio, A., C. Catavittello, C. Picciani, P. Confalone, R. Piccolomini, V. Savini, E. Fiscarelli, D. D'Antonio, and G. Di Bonaventura. 2010a. Subinhibitory concentrations of moxifloxacin decrease adhesion and biofilm formation of *Stenotrophomonas maltophilia* from cystic fibrosis. *J. Med. Microbiol.* **59**: 76-81.
- Pompilio, A., V. Crocetta, P. Confalone, M. Nicoletti, A. Petrucca, S. Guarnieri, E. Fiscarelli, V. Savini, R. Piccolomini, and G. Di Bonaventura. 2010b. Adhesion to and biofilm formation on IB3-1 bronchial cells by *Stenotrophomonas maltophilia* isolates from cystic fibrosis patients. *BMC Microbiol.* **10**: 102.
- Potera, C. 1999. Forging a link between biofilms and disease. *Science.* **283**: 1837-1839.
- Preiswerk, B., S. Ullrich, R. Speich, G.V. Bloemberg, and M. Hombach. 2011. Human infection with *Delftia tsuruhatensis* isolated from a central venous catheter. *J. Med. Microbiol.* **60**: 246-248.
- Pugliese, A., B. Pacris, P.E. Schoch, and B.A. Cunha. 1993. *Oligella urethralis* urosepsis. *Clin. Infect. Dis.* **17**: 1069-1070.
- Qasimyar, H., M.A. Hoffman, and K.A. Simonsen. 2014. Late-onset *Ochrobactrum anthropi* sepsis in a preterm neonate with congenital urinary tract abnormalities. *J. Perinatol.* **34**: 489-491.
- Quilici, M.L., and C. Bizet. 1996. Ribotyping of *Chryseobacterium meningosepticum*: its use as an epidemiological tool and its correlation with serovars. *Res. Microbiol.* **147**: 415-425.
- Quirino, A., G. Pulcrano, L. Rametti, R. Puccio, N. Marascio, M.R. Catania, G. Matera, M.C. Liberto, and A. Focà. 2014. Typing of *Ochrobactrum anthropi* clinical isolates using automated repetitive extragenic palindromic-polymerase chain reaction DNA fingerprinting and matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry. *BMC Microbiol.* **14**: 74.
- Raja, K.M., and A.R. Ghosh. 2014. Molecular insight of putative pathogenicity markers with ESBL genes and lipopolysaccharide in *Laribacter hongkongensis*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **174**: 1935-1944.
- Raman, S., H. Shaaban, J.W. Sensakovic, and G. Perez. 2012. An interesting case of *Empedobacter brevis* bacteremia after right knee cellulitis. *J. Glob. Infect. Dis.* **4**: 136-137.
- Ramos, P.L., S. Van Trappen, F.L. Thompson, R.C. Rocha, H.R. Barbosa, P. De Vos, and C.A. Moreira-Filho. 2011. Screening for endophytic nitrogen-fixing bacteria in Brazilian sugar cane varieties used in organic farming and description of *Stenotrophomonas pavanii* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **61**: 926-931.
- Rathsack, K., J. Reitner, E. Stackebrandt, and B.J. Tindall. 2011. Reclassification of *Aurantimonas altamirensis* (Jurado *et al.* 2006), *Aurantimonas ureilytica* (Weon *et al.* 2007) and *Aurantimonas frigidaquae* (Kim *et al.* 2008) as members of a new genus, *Aureimonas* gen. nov., as *Aureimonas altamirensis* gen. nov., comb. nov., *Aureimonas ureilytica* comb. nov. and *Aureimonas frigidaquae* comb. nov., and emended descriptions of the genera *Aurantimonas* and *Fulvimarina*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **61**: 2722-2728.
- Ravaoarino, M., and C. Therrien. 1999. Beta-lactamases and outer membrane investigations in beta-lactam-resistant *Comamonas acidovorans* strains. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **12**: 27-31.
- Rebaudet, S., S. Genot, A. Renvoise, P.E. Fournier, and A. Stein. 2009. *Wohlfahrtiimonas chitiniclastica* bacteremia in homeless woman. *Emerg. Infect. Dis.* **15**: 985-987.
- Reddy, A.K., S.I. Murthy, S. Jalali, and U. Gopinathan. 2009. Post-operative endophthalmitis due to an unusual pathogen, *Comamonas testosteroni*. *J. Med. Microbiol.* **58**: 374-375.
- Regunath, H., J. Kimball, L.P. Smith, and W. Salzer. 2015. Severe community acquired pneumonia with bacteremia caused by *Herbaspirillum aquaticum/huttiense* in an immune competent adult. *J. Clin. Microbiol.* **53**: 3086-3088.
- Reina, J., J. Gil, F. Salva, J. Gomez, and P. Alomar. 1990. Microbiological characteristics of *Weeksella virosa* (formerly CDC group If) isolated from the human genitourinary tract. *J. Clin. Microbiol.* **28**: 2357-2359.

- Riccio, M.L., L. Pallecchi, R. Fontana, and G.M. Rossolini. 2001. In70 of plasmid pAX22, a *bla*_{VIM-1}-containing integron carrying a new aminoglycoside phosphotransferase gene cassette. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**: 1249-1253.
- Ridderberg, W., K.E. Bendstrup, H.V. Olesen, S. Jensen-Fangel, and N. Nørskov-Lauritsen. 2011. Marked increase in incidence of *Achromobacter xylosoxidans* infections caused by sporadic acquisition from the environment. *J. Cyst. Fibros.* **10**: 466-469.
- Rihs, J.D., D.J. Brenner, R.E. Weaver, A.G. Steigerwalt, D.G. Hollis, and V.L. Yu. 1993. *Roseomonas*, a new genus associated with bacteremia and other human infections. *J. Clin. Microbiol.* **31**: 3275-3283.
- Riley, U.B., G. Bignardi, L. Goldberg, A.P. Johnson, and B. Holmes. 1996. Quinolone resistance in *Oligella urethralis*-associated chronic ambulatory peritoneal dialysis peritonitis. *J. Infect.* **32**: 155-156.
- Risch, M., D. Radjenovic, J.N. Han, M. Wydler, U. Nydegger, and L. Risch. 2010. Comparison of MALDI TOF with conventional identification of clinically relevant bacteria. *Swiss Med. Wkly.* **140**: w13095.
- Rodrigues, E.R., A.G. Ferreira, R.S. Leão, C.C. Leite, A.P. Carvalho-Assef, R.M. Albano, and E.A. Marques. 2015. Characterization of *Achromobacter* species in Cystic Fibrosis patients: comparison of *bla*OXA-114 PCR amplification, MLST and MALDI-ToF-MS. *J. Clin. Microbiol.* pii: JCM.02197-15.
- Rojas, L.O., L.F. Martínez, C.H. Vives, E.A. Lopez, and M. Cifuentes. 2012. Cerebral abscess caused by *Rhizobium radiobacter*: first case report. *AIDS.* **26**: 897-898.
- Romano, S., F. Aujoulat, E. Jumas-Bilak, A. Masnou, J.L. Jeannot, E. Falsen, H. Marchandin, and C. Teyssier. 2009. Multilocus sequence typing supports the hypothesis that *Ochrobactrum anthropi* displays a human-associated subpopulation. *BMC Microbiol.* **9**: 267.
- Rosenberg, E., E. F. DeLong, S. Lory, E. Stackebrandt, and F. Thompson (editors). *The Prokaryotes*, Springer, 2014.
- Rossau, R., K. Kersters, E. Falsen, E. Jantzen, P. Segers, A. Union, L. Nehis, and J. De Ley. 1987. *Oligella*, a new genus including *Oligella urethralis* comb. nov. (formerly *Moraxella urethralis*) and *Oligella ureolytica* sp. nov. (formerly CDC group IVe): relationship to *Taylorella equigenitalis* and related taxa. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **37**: 198-210.
- Roudiere, L., H. Jean-Pierre, C. Comte, I. Zorogniotti, H. Marchandin, and E. Jumas-Bilak. 2007. Isolation of *Schineria* sp. from a man. *Emerg. Infect. Dis.* **13**: 659-661.
- Ryan, M.P., and C.C. Adley. 2010. *Sphingomonas paucimobilis*: a persistent Gram-negative nosocomial infectious organism. *J. Hosp. Infect.* **75**: 153-157.
- Saeb, A.T., S.K. David, and H. Al-Brahim. 2014. In silico detection of virulence gene homologues in the human pathogen *Sphingomonas* spp. *Evol. Bioinform. Online.* **10**: 229-238.
- Safdar, A., and K.V. Rolston. 2007. *Stenotrophomonas maltophilia*: Changing spectrum of a serious bacterial pathogen in patients with cancer. *Clin. Infect. Dis.* **45**: 1602-1609.
- Saiman, L., Y. Chen, S. Tabibi, P. San Gabriel, J. Zhou, Z. Liu, L. Lai, and S. Whittier. 2001. Identification and antimicrobial susceptibility of *Alcaligenes xylosoxidans* isolated from patients with cystic fibrosis. *J. Clin. Microbiol.* **39**: 3942-3945.
- Sakhnini, E., A. Weissmann, and I. Oren. 2002. Fulminant *Stenotrophomonas maltophilia* soft tissue infection in immunocompromised patients: an outbreak transmitted via tap water. *Am. J. Med. Sci.* **323**: 269-272.
- Salsgiver, E.L., A.K. Fink, E.A. Knapp, J.J. LiPuma, K.N. Olivier, B.C. Marshall, and L. Saiman. 2015. Changing epidemiology of the respiratory bacteriology of patients with Cystic Fibrosis. *Chest.* doi:10.1378/chest.15-0676. Sous presse.
- Sanders, J.W., J.W. Martin, M. Hooke, and J. Hooke. 2000. *Methylobacterium mesophilicum* infection: case report and literature review of an unusual opportunistic pathogen. *Clin. Infect. Dis.* **30**: 936-938.
- Saveli, C.C., M. Levi, and J. Koeppel. 2010. *Ochrobactrum anthropi* septic arthritis: case report and implications in orthopedic infections. *Infect. Dis. Rep.* **2**: e2.
- Schmitz, F.J., J. Verhoef, and A.C. Fluit. 1999. Comparative activities of six different fluoroquinolones against 9,682 clinical bacterial isolates from 20 European university hospitals participating in the European SENTRY surveillance programme. The SENTRY participants group. *Int. J. Antimicrob. Agents* **12**: 311-317.
- Schroll, G., H.J. Busse, G. Parrer, S. Rölleke, W. Lubitz, and E.B. Denner. 2001. *Alcaligenes faecalis* subsp. *parafaecalis* subsp. nov., a bacterium accumulating poly- β -hydroxybutyrate from acetone-butanol bioprocess residues. *Syst. Appl. Microbiol.* **24**: 37-43.
- Schröttner, P., W.W. Rudolph, B.R. Eing, S. Bertram, and F. Gunzer. 2014. Comparison of VITEK2, MALDI-TOF MS, and 16S rDNA sequencing for identification of *Myroides odoratus* and *Myroides odoratimimus*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **79**: 155-159.
- Schweiger, M., P. Stiegler, M. Scarpatetti, A. Wasler, M. Sereinigg, G. Prenner, and K. Tscheliessnigg. 2011. Case of *Paracoccus yeei* infection documented in a transplanted heart. *Transpl. Infect. Dis.* **13**: 200-203.
- Segers, P., M. Vancanneyt, B. Pot, U. Torck, B. Hoste, D. Dewettinck, E. Falsen, K. Kersters, and P. De Vos. 1994. Classification of *Pseudomonas diminuta* Leifson and Hugh 1954 and *Pseudomonas vesicularis* Büsing, Döll, and Freytag 1953 in *Brevundimonas* gen. nov. as *Brevundimonas diminuta* comb. nov. and *Brevundimonas vesicularis* comb. nov., respectively. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**: 499-510.
- Sgrella, A., A. Mencacci, M. Fiorio, C. Orlandi, F. Baldelli, and G.V. De Socio. 2012. *Achromobacter denitrificans* renal abscess. *New Microbiol.* **35**: 245-247.
- Shams, M., L. Vial, D. Chapulliot, X. Nesme, and C. Lavire. 2013. Rapid and accurate species and genomic species identification and exhaustive population diversity assessment of *Agrobacterium* spp. using *recA*-based PCR. *Syst. Appl. Microbiol.* **36**: 351-358.
- Shang, S.T., S.K. Chiu, M.C. Chan, N.C. Wang, Y.S. Yang, J.C. Lin, and F.Y. Chang. 2012. Invasive *Brevundimonas vesicularis* bacteremia: two case reports and review of the literature. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* **45**: 468-472.
- Sharma, K.K., and U. Kalawat. 2010. Emerging infections: *Shewanella*—a series of five cases. *J. Lab. Physicians.* **2**: 61-65.
- Sharma, P., S.K. Gupta, S.M. Diene, and J.M. Rolain. 2015. Whole-genome sequence of *Chryseobacterium oranimense*, a colistin-resistant bacterium isolated from a cystic fibrosis patient in France. *Antimicrob. Agents Chemother.* **59**: 1696-1706.
- Shetty, A., R.A. Barnes, B. Healy, and P. Groves. 2005. A case of sepsis caused by *Acidovorax*. *J. Infect.* **51**: e171-172.
- Shie, S.S., C.T. Huang, and H.S. Leu. 2005. Characteristics of *Achromobacter xylosoxidans* bacteremia in northern Taiwan. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* **38**: 277-282.
- Shigematsu, T., K. Yumihara, Y. Ueda, M. Numaguchi, S. Morimura, and K. Kida. 2003. *Delftia tsuruhatensis* sp. nov., a terephthalate-assimilating bacterium isolated from activated sludge. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**: 1479-1483.

- Shin, S.Y., J.Y. Choi, and K.S. Ko.** 2012. Four cases of possible human infections with *Delftia lacustris*. *Infection*. **40**: 709-712.
- Shivaprakasha, S., S. Rajdev, H. Singh, and S. Velivala.** 2011. Prosthetic aortic valve endocarditis due to *Ochrobactrum anthropi*. *Indian J. Med. Sci.* **65**: 69-72.
- Shueh, C.S., V. Neela, S. Hussin, and R.A. Hamat.** 2013. Simple, time saving pulsed-field gel electrophoresis protocol for the typing of *Stenotrophomonas maltophilia*. *J. Microbiol. Methods*. **94**: 141-143.
- Shukla, S.K., D.L. Paustian, P.J. Stockwell, R.E. Morey, J.G. Jordan, P.N. Levett, D.N. Frank, and K.D. Reed.** 2004. Isolation of a fastidious *Bergeyella* species associated with cellulitis after a cat bite and a phylogenetic comparison with *Bergeyella zoohelcum* strains. *J. Clin. Microbiol.* **42**: 290-293.
- Simmons, T., E. Fennelly, and D. Loughran.** 2015. *Oligella ureolytica* bacteremia in elderly woman, United States. *Emerg. Infect. Dis.* **21**: 1271-1273.
- Skerman, V.B.D., V. McGowan, and P.H.A. Sneath.** 1980. Approved lists of bacterial names. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **30**: 225-420.
- Skerman, V.B.D., V. McGowan, and P.H.A. Sneath.** 1989. Approved lists of bacterial names. Amended edition. American Society for Microbiology, Washington, 1989.
- Slenker, A.K., B.D. Hess, D.L. Jungkind, and J.A. DeSimone.** 2012. Fatal case of *Weeksella virosa* sepsis. *J. Clin. Microbiol.* **50**: 4166-4167.
- Smith, M.D., and J.D. Gradon.** 2003. Bacteremia due to *Comamonas* species possibly associated with exposure to tropical fish. *South Med. J.* **96**: 815-817.
- Sofianou, D., A. Markogiannakis, E. Metzidie, S. Pournaras, and A. Tsakris.** 2005. VIM-2 metallo-beta-lactamase in *Achromobacter xylosoxidans* in Europe. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **24**: 854-855.
- Sohn, K.M., J.Y. Baek, S. Cheon, Y.S. Kim, and S.H. Koo.** 2015a. Ocular infection associated with *Delftia lacustris*: first report. *Braz. J. Infect. Dis.* **19**: 449-450.
- Sohn, K.M., and J.Y. Baek.** 2015b. *Delftia lacustris* septicemia in a pheochromocytoma patient: case report and literature review. *Infect. Dis. (Lond)*. **47**: 349-353.
- Sohn, K.M., K. Huh, J.Y. Baek, Y.S. Kim, C.I. Kang, K.R. Peck, N.Y. Lee, J.H. Song, K.S. Ko, and D.R. Chung.** 2015c. A new causative bacteria of infective endocarditis, *Bergeyella cardium* sp. nov. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **81**: 213-216.
- Sood, S., V. Nerurkar, and S. Malvankar.** 2010. Catheter associated bloodstream infection caused by *R. radiobacter*. *Indian J. Med. Microbiol.* **28**: 62-64.
- Souto, A., M. Guinda, A. Mera, and F. Pardo.** 2012. Septic arthritis caused by *Sphingomonas paucimobilis* in an immunocompetent patient. *Reumatol. Clin.* **8**: 378-379.
- Spilker, T., A.Z. Uluer, F.M. Marty, W.W. Yeh, J.H. Levison, P. Vandamme, and J.J. Lipuma.** 2008. Recovery of *Herbaspirillum* species from persons with cystic fibrosis. *J. Clin. Microbiol.* **46**: 2774-2777.
- Spilker, T., P. Vandamme, and J.J. Lipuma.** 2012. A multilocus sequence typing scheme infers population structure and reveals several putative novel *Achromobacter* species. *J. Clin. Microbiol.* **50**: 3010-3015.
- Spilker, T., P. Vandamme, and J.J. Lipuma.** 2013. Identification and distribution of *Achromobacter* species in cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros.* **12**: 298-301.
- Sriaroon, P., A. Elizalde, E.E. Perez, J.W. Leiding, G.M. Aldrovandi, and J.W. Sleasman.** 2014. *Psychrobacter immobilis* septicemia in a boy with X-linked chronic granulomatous disease and fulminant hepatic failure. *J. Clin. Immunol.* **34**: 39-41.
- Srinivas, J., M. Pillai, V. Vinod, and R.K. Dinesh.** 2015. Skin and soft tissue infections due to *Shewanella algae* - An emerging pathogen. *J. Clin. Diagn. Res.* **9**: DC16-20.
- Stanojevic, S., F. Ratjen, D. Stephens, A. Lu, Y. Yau, E. Tullis, and V. Waters.** 2013. Factors influencing the acquisition of *Stenotrophomonas maltophilia* infection in cystic fibrosis patients. *J. Cyst. Fibros.* **12**: 575-583.
- Struthers, M., J. Wong, and J.M. Janda.** 1996. An initial appraisal of the clinical significance of *Roseomonas* species associated with human infections. *Clin. Infect. Dis.* **23**: 729-733.
- Surette, M.G.** 2014. The cystic fibrosis lung microbiome. *Ann. Am. Thorac. Soc.* **11**: S61-65.
- Suryalatha, K., J. John, and S. Thomas.** 2015. *Wohlfahrtiimonas chitiniclastica*-associated osteomyelitis: a rare case report. *Future Microbiol.* **10**: 1107-1109.
- Suwantararat, N., L.L. Adams, M. Romagnoli, and K.C. Carroll.** 2015. Fatal case of *Herbaspirillum seropedicae* bacteremia secondary to pneumonia in an end-stage renal disease patient with multiple myeloma. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **82**: 331-333.
- Swenson, C.E., and R.T. Sadikot.** 2015. *Achromobacter* respiratory infections. *Ann. Am. Thorac. Soc.* **12**: 252-258.
- Swings, J., P. De Vos, M. Van den Mooter, and J. De Ley.** 1983. Transfer of *Pseudomonas maltophilia* Hugh 1981 to the genus *Xanthomonas* as *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1981) comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **33**: 409-413.
- Tabak, O., B. Mete, S. Aydin, N.M. Mandel, B. Otlu, R. Ozaras, and F. Tabak.** 2013. Port-related *Delftia tsuruhatensis* bacteremia in a patient with breast cancer. *New Microbiol.* **36**: 199-201.
- Tan, M.J., and R.L. Oehler.** 2005. Lower extremity cellulitis and bacteremia with *Herbaspirillum seropedicae* associated with aquatic exposure in a patient with cirrhosis. *Infect. Dis. Clin. Pract.* **13**: 277-279.
- Tayeb, L.A., M. Lefevre, V. Passet, L. Diancourt, S. Brisse, and P.A. Grimont.** 2008. Comparative phylogenies of *Burkholderia*, *Ralstonia*, *Comamonas*, *Brevundimonas* and related organisms derived from *rpoB*, *gyrB* and *rrs* gene sequences. *Res. Microbiol.* **159**: 169-177.
- Télez-Castillo, C.J., D. González Granda, M. Bosch Alepuz, V. Jurado Lobo, C. Saiz-Jimenez, J.L. Juan, and J. Millán Soria.** 2010. Isolation of *Aurantimonas altamirensis* from pleural effusions. *J. Med. Microbiol.* **59**: 1126-1129.
- Tena, D., R. Carranza, J.R. Barberá, S. Valdezate, J.M. Garrancho, M. Arranz, and J.A. Sáez-Nieto.** 2005. Outbreak of long-term intravascular catheter-related bacteremia due to *Achromobacter xylosoxidans* subspecies *xylosoxidans* in a hemodialysis unit. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect.* **24**: 727-732.
- Tena, D., N.M. Martínez, C. Losa, and S. Solís.** 2014. Skin and soft tissue infection caused by *Achromobacter xylosoxidans*: report of 14 cases. *Scand. J. Infect. Dis.* **46**: 130-135.
- Tena, D., C. Fernandez, and M.R. Lago.** 2015. *Alcaligenes faecalis*: an unusual cause of skin and soft tissue infection. *Jpn. J. Infect. Dis.* **68**: 128-130.
- Teng, J.L., P.C. Woo, S.S. Ma, T.H. Sit, L.T. Ng, W.T. Hui, S.K. Lau, and K.Y. Yuen.** 2005. Ecoepidemiology of *Laribacter hongkongensis*, a novel bacterium associated with gastroenteritis. *J. Clin. Microbiol.* **43**: 919-922.
- Teysier, C., H. Marchandin, H. Jean-Pierre, I. Diego, H. Darbas, J.J. Jeannot, A. Gouby, and E. Jumas-Bilak.** 2005. Molecular and phenotypic features for identification of the opportunistic pathogens *Ochrobactrum* spp. *J. Med. Microbiol.* **54**: 945-953.

- Teyssier, C., H. Marchandin, H. Jean-Pierre, A. Masnou, G. Dusart, and E. Jumas-Bilak. 2007. *Ochrobactrum pseudintermedium* sp. nov., a novel member of the family *Brucellaceae*, isolated from human clinical samples. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**: 1007-1013.
- Thoma, B., E. Straube, H.C. Scholz, S. Al Dahouk, L. Zöller, M. Pfeffer, H. Neubauer, and H. Tomaso. 2009. Identification and antimicrobial susceptibilities of *Ochrobactrum* spp. *Int. J. Med. Microbiol.* **299**: 209-220.
- Thomas, V., K. Herrera-Rimann, D.S. Blanc, and G. Greub. 2006. Biodiversity of amoebae and amoeba-resisting bacteria in a hospital water network. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 2428-2438.
- Toh, H.S., H.T. Tay, W.K. Kuar, T.C. Weng, H.J. Tang, and C.K. Tan. 2011. Risk factors associated with *Sphingomonas paucimobilis* infection. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* **44**: 289-295.
- Toleman, M.A., P.M. Bennett, D.M. Bennett, R.N. Jones, and T.R. Walsh. 2007. Global emergence of trimethoprim/sulfamethoxazole resistance in *Stenotrophomonas maltophilia* mediated by acquisition of *sul* genes. *Emerg. Infect. Dis.* **13**: 559-565.
- Tóth, E.M., A.K. Borsodi, J.P. Euzéby, B.J. Tindall, and K. Máriaiget. 2007. Proposal to replace the illegitimate genus name *Schineria* Toth et al. 2001 with the genus name *Ignatzschineria* gen. nov. and to replace the illegitimate combination *Schineria larvae* Toth et al. 2001 with *Ignatzschineria larvae* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**: 179-180.
- Tóth, E.M., P. Schumann, A.K. Borsodi, Z. Kéki, A.L. Kovács, and K. Máriaiget. 2008. *Wohlfahrtiimonas chitiniclastica* gen. nov., sp. nov., a new gammaproteobacterium isolated from *Wohlfahrtia magnifica* (Diptera: Sarcophagidae). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **58**: 976-981.
- Traglia, G.M., C. Dixon, K. Chiem, M. Almuzara, C. Barberis, S. Montaña, C. Merino, M.A. Mussi, M.E. Tolmasky, A. Iriarte, C. Vay, and M.S. Ramirez. 2015. Draft genome sequence of *Empedobacter* (formerly *Wautersiella*) *falsenii* comb. nov. Wf282, a strain isolated from a cervical neck abscess. *Genome Announc.* **3**: e00235-15.
- Trancassini, M., V. Iebba, N. Citerà, V. Tuccio, A. Magni, P. Varesi, R.V. De Biase, V. Totino, F. Santangelo, A. Gagliardi, and S. Schippa. 2014. Outbreak of *Achromobacter xylosoxidans* in an Italian Cystic fibrosis center: genome variability, biofilm production, antibiotic resistance, and motility in isolated strains. *Front. Microbiol.* **5**: 138.
- Tsai, M.T., W.C. Yang, and C.C. Lin. 2012. Continuous ambulatory peritoneal dialysis-related exit-site infections caused by *Achromobacter denitrificans* and *A. xylosoxidans*. *Perit. Dial. Int.* **32**: 362-363.
- Tsai, S.F. 2013. *Rhizobium radiobacter* peritonitis revisited: catheter removal is not mandatory. *Perit. Dial. Int.* **33**: 331-332.
- Tse, C.W., S.O. Curreem, I. Cheung, B.S. Tang, K.W. Leung, S.K. Lau, and P.C. Woo. 2014. A novel MLST sequence type discovered in the first fatal case of *Laribacter hongkongensis* bacteremia clusters with the sequence types of other human isolates. *Emerg. Microbes Infect.* **3**: e41.
- Turel, O., S. Kavuncuoglu, E. Hosaf, S. Ozbek, E. Aldemir, T. Uygur, N. Hatipoglu, and R. Siraneci. 2013. Bacteremia due to *Achromobacter xylosoxidans* in neonates: clinical features and outcome. *Braz. J. Infect. Dis.* **17**: 450-454.
- Turton, J.F., N. Mustafa, J. Shah, C.V. Hampton, R. Pike, and D.T. Kenna. 2011. Identification of *Achromobacter xylosoxidans* by detection of the *bla*_{OXA-114}-like gene intrinsic in this species. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **70**: 408-411.
- Valdezate, S., A. Vindel, A. Echeita, F. Baquero, and R. Cantón. 2002. Topoisomerase II and IV quinolone resistance-determining regions in *Stenotrophomonas maltophilia* clinical isolates with different levels of quinolone susceptibility. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**: 665-671.
- Valdezate, S., A. Vindel, P. Martín-Dávila, B.S. Del Saz, F. Baquero, and R. Cantón. 2004. High genetic diversity among *Stenotrophomonas maltophilia* strains despite their originating at a single hospital. *J. Clin. Microbiol.* **42**: 693-699.
- Vancanneyt, M., P. Segers, U. Torck, B. Hoste, J.F. Bernardet, P. Vandamme, and K. Kersters. 1996. Reclassification of *Flavobacterium odoratum* (Stutzer 1929) strains to a new genus, *Myroides*, as *Myroides odoratus* comb. nov. and *Myroides odoratimimus* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**: 926-932.
- Van Craenenbroeck, A.H., K. Camps, P. Zachée, and K.L. Wu. 2011. *Massilia timonae* infection presenting as generalized lymphadenopathy in a man returning to Belgium from Nigeria. *J. Clin. Microbiol.* **49**: 2763-2765.
- Vandamme, P., J.-F. Bernardet, P. Segers, K. Kersters, and B. Holmes. 1994. New perspectives in the classification of the flavobacteria: description of *Chryseobacterium* gen. nov., *Bergeyella* gen. nov., and *Empedobacter* nom. rev. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**: 827-831.
- Vandamme, P., E. De Brandt, K. Houf, and T. De Baere. 2012. *Kerstersia similis* sp. nov., isolated from human clinical samples. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **62**: 2156-2159.
- Vandamme, P., E.R. Moore, M. Cnockaert, E. De Brandt, L. Svensson-Stadler, K. Houf, T. Spilker, and J.J. Lipuma. 2013a. *Achromobacter animicus* sp. nov., *Achromobacter mucicolens* sp. nov., *Achromobacter pulmonis* sp. nov. and *Achromobacter spiritinus* sp. nov., from human clinical samples. *Syst. Appl. Microbiol.* **36**: 1-10.
- Vandamme, P., E.R. Moore, M. Cnockaert, C. Peeters, L. Svensson-Stadler, K. Houf, T. Spilker, and J.J. LiPuma. 2013b. Classification of *Achromobacter* genogroups 2, 5, 7 and 14 as *Achromobacter insuavis* sp. nov., *Achromobacter aegrifaciens* sp. nov., *Achromobacter anxifer* sp. nov. and *Achromobacter dolens* sp. nov., respectively. *Syst. Appl. Microbiol.* **36**: 474-482.
- van der Velden, L.B., A.S. de Jong, H. de Jong, R.P. de Gier, and R.J. Rentenaar. 2012. First report of a *Wautersiella falsenii* isolated from the urine of an infant with pyelonephritis. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **74**: 404-405.
- Vaneechoutte, M., P. Kämpfer, T. De Baere, V. Avesani, M. Janssens, and G. Wauters. 2007. *Chryseobacterium hominis* sp. nov., to accommodate clinical isolates biochemically similar to CDC groups II-h and II-c. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**: 2623-2628.
- Vaneechoutte, M., L. Dijkshoorn, A. Nemeč, P. Kämpfer, and G. Wauters. 2011. *Acinetobacter*, *Chryseobacterium*, *Moraxella*, and other nonfermentative gram-negative rods, p 714-738. In: Versalovic, J., K. Carroll, G. Funke, J. Jorgensen, M. Landry, and D. Warnock (ed), *Manual of Clinical Microbiology*, 10th Edition. ASM Press, Washington, DC. doi:10.1128/97815555816728.ch42.
- Vaneechoutte, M., M. Janssens, V. Avesani, M. Delmée, and P. Deschaght. 2013. Description of *Acidovorax wautersii* sp. nov. to accommodate clinical isolates and an environmental isolate, most closely related to *Acidovorax avenae*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **63**: 2203-2206.
- Van Zyl, E., and P.L. Steyn. 1992. Reinterpretation of the taxonomic position of *Xanthomonas maltophilia* and taxonomic criteria in this genus. Request for an opinion. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **42**: 193-198.
- Vela, A.I., M.D. Collins, M.V. Latre, A. Mateos, M.A. Moreno, R. Hutson, L. Domínguez, and J.F. Fernández-Garayzábal. 2003. *Psychrobacter pulmonis* sp. nov., isolated from the lungs of lambs. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**: 415-419.
- Vignier, N., M. Barreau, C. Olive, E. Baubion, R. Théodose, P. Hochedez, and A. Cabié. 2013. Human infection with *Shewanella putrefaciens* and *S. algae*: report of 16 cases in Martinique and review of the literature. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **89**: 151-156.

- Virok, D.P., M. Ábrók, B. Szél, Z. Tajti, K. Mader, E. Urbán, and G. Tálosi. 2014. *Chryseobacterium gleum* - a novel bacterium species detected in neonatal respiratory tract infections. *J. Matern. Fetal Neonatal Med.* **27**: 1926-1929.
- Vu-Thien, H., J.C. Darbord, D. Moissenet, C. Dulot, J.B. Dufourcq, P. Marsol, and A. Garbarg-Chenon. 1998. Investigation of an outbreak of wound infections due to *Alcaligenes xylosoxidans* transmitted by chlorhexidine in a burns unit. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **17**: 724-726.
- Wallet, F., N. Blondiaux, C.L. Foy, C. Loiez, S. Armand, D. Pagniez, and R.J. Courcol. 2010. *Paracoccus yeei*: a new unusual opportunistic bacterium in ambulatory peritoneal dialysis. *Int. J. Infect. Dis.* **14**: e173-174.
- Walsh, T.R., L. Hall, S.J. Assinder, W.W. Nichols, S.J. Cartwright, A.P. MacGowan, and P.M. Bennett. 1994. Sequence analysis of the L1 metallo-beta-lactamase from *Xanthomonas maltophilia*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1218**: 199-201.
- Walsh, T.R., A.P. MacGowan, and P.M. Bennett. 1997. Sequence analysis and enzyme kinetics of the L2 serine beta-lactamase from *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**: 1460-1464.
- Wang, S.A., R.B. Levine, L.A. Carson, M.J. Arduino, T. Killar, F.G. Grillo, M.L. Pearson, and W.R. Jarvis. 1999. An outbreak of gram-negative bacteremia in hemodialysis patients traced to hemodialysis machine waste drain ports. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **20**: 746-751.
- Wang, J.L., M.L. Chen, Y.E. Lin, S.C. Chang, and Y.C. Chen. 2009. Association between contaminated faucets and colonization or infection by nonfermenting gram-negative bacteria in intensive care units in Taiwan. *J. Clin. Microbiol.* **47**: 3226-3230.
- Wang, C.M., C.C. Lai, C.K. Tan, Y.C. Huang, K.P. Chung, M.R. Lee, K.P. Hwang, and P.R. Hsueh. 2012. Clinical characteristics of infections caused by *Roseomonas* species and antimicrobial susceptibilities of the isolates. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **72**: 199-203.
- Wang, X., Z. Hu, Y. Fan, and H. Wang. 2014. *Chryseobacterium indologenes* catheter-related meningitis in an elderly patient after intracranial aneurysm clipping surgery. *Neurol. Sci.* **35**: 113-115.
- Wauters, G., and M. Vanechoutte. 2011. Approaches to the identification of aerobic gram-negative bacteria, p 539-558. In: Versalovic J, Carroll K, Funke G, Jorgensen J, Landry M, Warnock D (ed), *Manual of Clinical Microbiology*, 10th Edition. ASM Press, Washington, DC. doi: 10.1128/9781555816728.ch31.
- Welch, W.D., R.K. Porschen, and B. Luttrell. 1983. Minimal inhibitory concentrations of 19 antimicrobial agents for 96 clinical isolates of group IVe bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **24**: 432-433.
- Wen, A., M. Fegan, C. Hayward, S. Chakraborty, and L.I. Sly. 1999. Phylogenetic relationships among members of the *Comamonadaceae*, and description of *Delftia acidovorans* (den Dooren de Jong 1926 and Tamaoka *et al.* 1987) gen. nov., comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**: 567-576.
- Willems, A., E. Falsen, B. Pot, E. Jantzen, B. Hoste, P. Vandamme, M. Gillis, K. Kersters, and J. De Ley. 1990. *Acidovorax*, a new genus for *Pseudomonas facilis*, *Pseudomonas delafieldii*, E. Falsen (EF) group 13, EF group 16, and several clinical isolates, with the species *Acidovorax facilis* comb. nov., *Acidovorax delafieldii* comb. nov., and *Acidovorax temperans* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **40**: 384-398.
- Winn, W.C., S. Allen, W.M. Janda, E.W. Koneman, P.C. Schreckenberger, G. Procop, and G.B. Woods. The nonfermentative gram negative bacilli. In: Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 6th ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins; 2006. p. 303-391.
- Wirth, S.E., H.L. Ayala-del-Río, J.A. Cole, D.J. Kohlerschmidt, K.A. Musser, C. Sepúlveda-Torres Ldel, L.M. Thompson, and W.J. Wolfgang. 2012. *Psychrobacter sanguinis* sp. nov., recovered from four clinical specimens over a 4-year period. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **62**: 49-54.
- Wolf, A., A. Fritze, M. Hagemann, and G. Berg. 2002. *Stenotrophomonas rhizophila* sp. nov., a novel plant-associated bacterium with antifungal properties. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**: 1937-1944.
- Wu, Z.B., S.M. Pan, J. Yu, Y. Liu, X.F. Yang, and Q.Q. Chen. 2011. Use of the DiversiLab repetitive sequence-based polymerase chain reaction system for genotyping *Stenotrophomonas maltophilia* isolates in different wards of one hospital. *J. Hosp. Infect.* **79**: 180-182.
- Xie, C.H., and A. Yokota. 2005. *Dyella japonica* gen. nov., sp. nov., a gamma-proteobacterium isolated from soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**: 753-756.
- Yabuuchi, E., and I. Yano. 1981. *Achromobacter* gen. nov. and *Achromobacter xylosoxidans* (ex Yabuuchi and Ohyama 1971) nom. rev. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **31**: 477-478.
- Yabuuchi, E., T. Kaneko, I. Yano, C.W. Moss, and N. Miyoshi. 1983. *Sphingobacterium* gen. nov., *Sphingobacterium spiritivorum* comb. nov., *Sphingobacterium multivorum* comb. nov., *Sphingobacterium mizutae* sp. nov., and *Flavobacterium indologenes* sp. nov.: glucose-nonfermenting gram-negative rods in CDC groups IIK-2 and IIb. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **33**: 580-598.
- Yabuuchi, E., I. Yano, H. Oyaizu, Y. Hashimoto, T. Ezaki, and H. Yamamoto. 1990. Proposals of *Sphingomonas paucimobilis* gen. nov. and comb. nov., *Sphingomonas parapaucimobilis* sp. nov., *Sphingomonas yanoikuyae* sp. nov., *Sphingomonas adhaesiva* sp. nov., *Sphingomonas capsulata* comb. nov., and two genospecies of the genus *Sphingomonas*. *Microbiol. Immunol.* **34**: 99-119.
- Yamamoto, M., M. Nagao, G. Hotta, Y. Matsumura, A. Matsushima, Y. Ito, S. Takakura, and S. Ichiyama. 2012. Molecular characterization of IMP-type metallo-β-lactamases among multidrug-resistant *Achromobacter xylosoxidans*. *J. Antimicrob. Chemother.* **67**: 2110-2113.
- Yan, S., N. Zhao, and X.H. Zhang. 2012. *Myroides phaeus* sp. nov., isolated from human saliva, and emended descriptions of the genus *Myroides* and the species *Myroides profundus* Zhang *et al.* 2009 and *Myroides marinus* Cho *et al.* 2011. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **62**: 770-775.
- Yang, H.C., W.T. Im, M.S. Kang, D.Y. Shin, and S.T. Lee. 2006. *Stenotrophomonas koreensis* sp. nov., isolated from compost in South Korea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**: 81-84.
- Yassin, A.F., H. Hupfer, C. Siering, and H.J. Busse. 2010. *Chryseobacterium treverense* sp. nov., isolated from a human clinical source. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **60**: 1993-1998.
- Yi, H., S. Srinivasan, and M.K. Kim. 2010. *Stenotrophomonas panacihumi* sp. nov., isolated from soil of a ginseng field. *J. Microbiol. Seoul Korea* **48**: 30-35.
- Yoo, S.H., M.J. Kim, K.H. Roh, S.H. Kim, D.W. Park, J.W. Sohn, and Y.K. Yoon. 2012. Liver abscess caused by *Brevundimonas vesicularis* in an immunocompetent patient. *J. Med. Microbiol.* **61**: 1476-1479.
- Yoon, J.H., S.J. Kang, H.W. Oh, and T.K. Oh. 2006. *Stenotrophomonas dokdonensis* sp. nov., isolated from soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**: 1363-1367.
- Yuen, K.Y., P.C. Woo, J.L. Teng, K.W. Leung, M.K. Wong, and S.K. Lau. 2001. *Laribacter hongkongensis* gen. nov., sp. nov., a novel gram-negative bacterium isolated from a cirrhotic patient with bacteremia and empyema. *J. Clin. Microbiol.* **39**: 4227-4232.
- Zhang, L., X.Z. Li, and K. Poole. 2000. Multiple antibiotic resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*: involvement of a multidrug efflux system. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**: 287-293.

- Zhang, C.C., H.J. Hsu, and C.M. Li. 2012. *Brevundimonas vesicularis* bacteremia resistant to trimethoprim-sulfamethoxazole and ceftazidime in a tertiary hospital in southern Taiwan. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* **45**: 448-452.
- Zhang, R.G., X. Tan, Y. Liang, T.Y. Meng, H.Z. Liang, and J. Lv. 2014. Description of *Chishuiella changwenlii* gen. nov., sp. nov., isolated from freshwater, and transfer of *Wautersiella falsenii* to the genus *Empedobacter* as *Empedobacter falsenii* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **64**: 2723-2728.
- Ziga, E.D., T. Druley, and C.A. Burnham. 2010. *Herbaspirillum* species bacteremia in a pediatric oncology patient. *J. Clin. Microbiol.* **48**: 4320-4321.
- Zinchuk, A., O. Zubach, A. Zadorozhnyj, Y. Chudina, and V. Bilavka. 2015. Peculiarities of meningitis due to *Methylobacterium mesophilicum*: a rare case. *Jpn J. Infect. Dis.* **68**: 343-346.

Abréviations (selon l'ordre de dépôt des disques de gauche à droite et de haut en bas sur les boîtes présentées en figures 2 à 4) :

AX : amoxicilline ; KF : céfalotine ; ATM : aztréonam ; TIC : ticarcilline ;

FOX : céfoxitine ; CTX : céfotaxime ; TIM : ticarcilline-acide clavulanique ; CAZ : ceftazidime ;

FEP : céfépime ; AMC : amoxicilline-acide clavulanique ; CPD : cefpodoxime ; IPM : imipénème ;

MOX : moxalactam ; CPO : cefpirome ; TPZ : pipéracilline-tazobactam ; PRL : pipéracilline ;

CN : gentamicine ; TOB : tobramycine ; NET : nétilmicine ; AK : amikacine ;

C : chloramphénicol ; TE : tétracycline ; CT : colistine ;

NA : acide nalidixique ; OFX : ofloxacine ; CIP : ciprofloxacine ; LEV : lévofloxacine ;

FOS : fosfomicine ; SXT : triméthoprime-sulfaméthoxazole.

ANNEXE 2

Annexe 2 Description de la totalité des prélèvements effectués aux domiciles de 3 patients CF colonisés chroniquement par *A. xylosoxidans* et des résultats obtenus. (1) résultats de PCR spécifique. Pour les échantillons positifs en PCR spécifique, les colonies roses sur milieu gélosé spécifique pour *Achromobacter* ont été analysées par MALDI-TOF.

"-" = prélèvements pour lesquels aucun *Achromobacter* ou aucune espèce associée n'a été identifiée; +/- = résultat de PCR spécifique faible; SHA= Solution hydroalcoolique; gen.= genogroupe; MALDI-TOF= Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation - Time Of Flight ; O. = *Ochrobacterium* ; P.=*Pseudomonas* ; A.= *Agrobacterium* ; S.= *Stenotrophomonas* ; Ps.: *Pseudochoobacterium* ; Ac.= *Acinetobacter*

Tableau 1 Description et résultats des prélèvements effectués au domicile du Patient 5

Numéro	Pièce	Origine de l'échantillon	PCR (1)	<i>Achromobacter</i> spp. / gène nrdA (ST)	Bactéries associées / MALDI-TOF
1	Cuisine	Torchon	-	-	-
2		Machine a café 1	-	-	-
3		Machine à café 2	+	-	<i>O. anthropi, Ochrobacterum sp.</i>
4		Savon	-	-	-
5		Eponge	+	-	-
6		Poubelle	-	-	-
7		Brise jet robinet	-	-	-
8		Grille siphon	+	-	<i>P. putida, O. grignonense, Ps. asaccharolyticum, A. radiobacter</i>
9		Surface interne évier	-	-	-
10		Poignée robinet	+	-	<i>P. putida, B. diminuta, A. radiobacter, Ochrobacterum sp.</i>
11		Eau siphon	+	<i>A. marplatensis</i>	<i>Ochrobacterum sp.</i>
12		Evacuation lave vaisselle	-	-	-
13		Plan de travail	+	-	<i>O. grignonense, O. anthropi, Ochrobacterum sp.</i>
14		Sol	+	-	-
15		Table	+	-	<i>O. grignonense, O. anthropi, Ps. asaccharolyticum</i>
16		Poignée réfrigérateur	+	-	-
17		Evacuation réfrigérateur	+	-	-
18		Bac à légumes réfrigérateur	-	-	-
19		Boutons lave vaisselle	-	-	-
20		Eau robinet 1 ^{er} jet	-	-	-
62	Tue-mouche (+mouche)	-	-	-	
21	Toilettes 1	Eau chasse d'eau	+	-	-
22		Eau cuvette	+	-	<i>Agrobacterium sp.</i>
23	Toilettes 2	Cuvette	-	-	-
24		Eau cuvette	+	-	<i>O. grignonense, A. radiobacter, Pseudomonas sp.</i>
25		Eau chasse d'eau	+	-	-
26	Salle de bain 1	Cuvette	+	-	<i>O. grignonense, A. radiobacter</i>
27		Poignée robinet	-	-	-
28		Eau robinet 1 ^{er} jet	-	-	-
29		Eau robinet 2 ^{ème} jet	-	-	-
30		Eau douche 1 ^{er} jet	-	-	-
31		Eau douche 2 ^{ème} jet	-	-	-
32		pommeau de douche	-	-	-
33		Tablette douche	-	-	-
34		Poignée douche	-	-	-
35		Rideau de douche	-	-	-
36		Sol de douche	+	-	<i>O. anthropi</i>
44		Zone humide mur	-	-	-
56		Evacuation lave linge	+	<i>A. mucicolens</i>	<i>Bordetella sp., S. maltophilia, Ochrobacterum sp.</i>
57	Eau lave linge	+	-	<i>O. anthropi</i>	
58	Tapis de bain	+	<i>A. spanius</i>	-	
59	Serviette	-	-	-	
37	Salle de bain 2	Brise-jet bidet	-	-	-
38		Eau bidet 1 ^{er} jet	-	-	-
39		Eau bidet 2 ^{ème} jet	-	-	-
40		Serviette	-	-	-
41		Anti-dérapant baignoire	-	-	-
42		Sol	-	-	-
43		pommeau de douche	-	-	-
45		Grille aération extérieur	-	-	-
46		Trop-plein robinet	+/-	-	-
47		Brise-jet robinet	-	-	-
48	Eau siphon lavabo	+	-	-	

ANNEXE 2

Numéro	Pièce	Origine de l'échantillon	PCR (1)	<i>Achromobacter</i> spp. / gène nrdA (ST)	Bactéries associées / MALDI-TOF
49	Salle de bain 2	Poignée robinet	-	-	
50		Eau robinet 1 ^{er} jet	+	<i>A. xylosoxidans</i>	<i>A. radiobacter</i>
51		Eau robinet 2 ^{ème} jet	+	-	-
52		Surface interne lavabo	-	-	-
53		Eau robinet douche 1 ^{er} jet	-	-	-
54		Eau pommeau de douche 1er jet	-	-	-
55		Eau robinet douche 2 ^{ème} jet	-	-	-
60	Salon	Couverture salon	+	-	<i>Ochrobacterum</i> sp., <i>A. radiobacter</i>
61		Télécommande salon	+/-	-	-
63		Aération fenêtre	+/-	-	-
64	Autre	Eau sèche-linge hublot	+	<i>A. xylosoxidans</i>	-
65		Cumulus zone humide	-	-	-
66		Sac aspirateur	+	-	-
67		Clavier ordinateur	-	-	-
68		Croquettes chat	-	-	-
69		Gueule du chat	-	-	-
70		Eau bol des chats	-	-	<i>P. putida</i> , <i>Ps. asaccharolyticum</i>
71		Eau seau serpillère	+	<i>A. xylosoxidans</i> <i>A. marplatensis</i>	<i>O. anthropi</i> , <i>O. grignonense</i> , <i>Ochrobacterum</i> sp.
72		Ecouvillon serpillère	+	<i>A. xylosoxidans</i>	<i>Ochrobacterum</i> sp.
73		Bois de chauffage	-	-	-
74	Jardin	Terre potager	+	<i>A. mucicolens</i>	-
75		Plantes + racines	+	-	<i>A. radiobacter</i>
76		Terre jardin	+	-	<i>Pseudomonas</i> sp.
77		Eau dans cabane en plastique	+	-	<i>P. putida</i> , <i>A. radiobacter</i>
78		Trèfle + nodules	+	-	-
79		Eau stagnante pompe piscine	-	-	-
80		Eau stagnante porcelaine	-	-	-
Total		7	80	35	8 échantillons positifs 10 souches <i>A. xylosoxidans</i> (n=4) <i>A. mucicolens</i> (n=3) <i>A. marplatensis</i> (n=2) <i>A. spanius</i> (n=1)

ANNEXE 2

Tableau 2 Description et résultats des prélèvements effectués au domicile du Patient 12

Numéro	Pièce	Origine de l'échantillon	PCR (1)	<i>Achromobacter</i> spp. / gène nrdA (ST)	Bactéries associées / MALDI-TOF
1	Cuisine	Grille aération	-	-	-
2		Egoutoire à vaisselle	-	-	-
3		Brise-jet robinet	-	-	-
4		Plan de travail	+	-	<i>A. radiobacter</i> , <i>Ac. ursingii</i>
5		Surface interne évier	-	-	-
6		Trop-plein robinet	+	-	<i>A. radiobacter</i> , <i>P. putida</i>
7		Boutons lave-vaisselle	-	-	-
8		Intérieur de bouilloire	-	-	-
9		Eau siphon	+	-	<i>A. radiobacter</i> , <i>Ac.ursingii</i> , <i>Ochrobactrum</i> sp., <i>P. nitroreducens</i>
10		Torchon + maniques	-	-	-
11		Eponge	+	-	<i>A. radiobacter</i> , <i>Pseudomonas</i> sp.
12		Table	-	-	-
13		Sol	+	-	-
14		Poubelle	-	-	-
15		Poignée réfrigérateur	-	-	-
16		Hotte aspirante	-	-	-
17		Grille siphon	+	-	-
18		Machine à café	-	-	-
19		Evacuation lave-vaisselle	-	-	-
20		Récipient à savon	-	-	-
21		Brosse à vaisselle	-	-	-
22		Evacuation réfrigérateur	-	-	-
23		Bac à légumes réfrigérateur	-	-	-
24		Poignée robinet	-	-	-
25		Micro-onde intérieur	+	-	-
26		Evacuation lave-linge	+	<i>A. aegrifaciens</i>	<i>Bordetella</i> sp., <i>O. anthropi</i> , <i>A. radiobacter</i>
27		Eau lave-linge	+	-	<i>O. anthropi</i> , <i>A. radiobacter</i>
28	Intérieur brise-jet mousseur	-	-	-	
69	Robinet cuisine 1er jet	+	-	<i>A. radiobacter</i>	
70	Robinet cuisine 2ème jet	+	-	-	
29	Autre	Feuilles plante d'intérieur	-	-	-
30		Terre plante verte	+/-	-	-
31		Couverture lit	-	-	-
32		Ecouvillon eau oiseaux	-	-	-
33		Clavier ordinateur	-	-	-
34		Seau serpillère écouvillon	-	-	-
35		Poignée de porte extérieure	-	-	-
36		Serpillère	-	-	-
37		Bol d'eau oiseaux	-	-	-
38		Poignée de porte intérieure	-	-	-
39	Fiente oiseaux	+/-	-	-	
40	Salon	Canapé	+	-	-
41		Canapé appuie-tête	+/-	-	-
42		Télécommande TV	-	-	-
43		Table basse	-	-	-
44		Mur	-	-	-
45	Sol	+	-	<i>Pseudomonas</i> sp.	
46	Toilettes	Sol sous le lino	-	-	-
47		Sol	+	-	-
48		Cuvette	-	-	-
71	Eau WC	+	-	<i>A. radiobacter</i>	
49	Salle de bain	Siphon douche	+	<i>A. mucicolens</i>	<i>P. nitroreducens</i> , <i>Pseudomonas</i> sp., <i>Ochrobactrum</i> sp.
50		Eau siphon lavabo	+	-	<i>P. nitroreducens</i>
51		Ecouvillon seau intérieur douche	-	-	-
52		Bouton lumière	-	-	-
53		Serviette	-	-	-
54		Savon	-	-	-
55		Grille siphon lavabo	+	-	Bactérie du groupe <i>Pseudomonas putida</i>
56		Trop-plein lavabo	-	-	-
57		Grille siphon douche	-	-	-
58		Poignée robinet lavabo	-	-	-
59		Surface interne lavabo	-	-	-
60	Fleur de douche	-	-	-	

ANNEXE 2

Numéro	Pièce	Origine de l'échantillon	PCR (1)	<i>Achromobacter</i> spp. / gène nrdA (ST)	Bactéries associées / MALDI-TOF	
61	Salle de bain	Verre à dent	+	<i>A. mucicolens</i> <i>A. mucicolens</i> <i>A. mucicolens</i>	<i>A. radiobacter</i>	
62		Brise-jet robinet lavabo	-	-	-	
63		Savon	-	-	-	
64		Rideau de douche	-	-	-	
65		Sol de douche	-	-	-	
66		Sol	-	-	-	
67		pommeau de douche	-	-	-	
68		Eau douche 1 ^{er} jet	-	-	-	
72		Eau robinet 1 ^{er} jet	-	-	-	
73		Eau robinet 2 ^{ème} jet	-	-	-	
74		Eau douche 2 ^{ème} jet	-	-	-	
Total		4	74	22	3 échantillons / 5 souches <i>A. mucicolens</i> (n=4) <i>A. aegrifaciens</i> (n=1)	13 échantillons / 5 genres / 24 souches <i>Agrobacterium</i> spp. (n=9) <i>Pseudomonas</i> spp. (n=8) <i>Ochrobactrum</i> spp. (n=4) <i>Acinetobacter</i> spp. (n=2) <i>Bordetella</i> spp. (n=1)

ANNEXE 2

Tableau 3 Description et résultats des prélèvements effectués au domicile du Patient 2

Numéro	Pièce	Origine de l'échantillon	PCR (1)	<i>Achromobacter</i> spp. / gène nrdA (ST)	Bactéries associées / MALDI-TOF
5	Salle de bain	Eau robinet gauche 1 ^{er} jet	-	-	-
6		Eau robinet gauche 2 ^{ème} jet	-	-	-
7		Eau robinet droit 1 ^{er} jet	-	-	-
8		Eau robinet droit 2 ^{ème} jet	-	-	-
9		Eau robinet douche 1 ^{er} jet	-	-	-
10		Eau robinet douche 2 ^{ème} jet	-	-	-
11		Brise-jet lavabo gauche	-	-	-
12		Brise-jet lavabo droit	-	-	-
13		Brise-jet robinet douche	-	-	-
14		Trop-plein lavabo gauche	-	-	-
15		Trop-plein lavabo droit	-	-	-
16		Trop-plein baignoire	+	-	<i>Bordetella</i> sp., <i>Agrobacterium</i> sp.
17		Verre à dent	+	-	-
18		Savon	-	-	-
19		Eau siphon lavabo gauche	+	-	<i>Bordetella</i> sp., <i>A. radiobacter</i>
20		Eau siphon lavabo droit	+	<i>Achromobacter</i> sp. <i>Achromobacter</i> sp.	<i>A. radiobacter</i> , <i>P. nitroreducens</i>
21		Eau siphon douche	+	-	<i>P. putida</i> , <i>Pseudomonas</i> sp.
22		Surface fond de la baignoire	-	-	-
23		Poubelle	-	-	-
24	Surface interne lavabo gauche	-	-	-	
25	Surface interne lavabo droit	-	-	-	
26	Poignée robinet gauche	-	-	-	
27	Poignée robinet droit	-	-	-	
28	Poignée robinet douche	-	-	-	
29	Sol	+	-	-	
30	pommeau de douche	-	-	-	
31	Tapis de bain	+	-	<i>Pseudomonas</i> sp.	
32	Serviette	-	-	-	
33	Anti-dérapant baignoire	-	-	-	
119	Eau pommeau de douche 1er jet	-	-	-	
3	Toilettes	Eau robinet 1 ^{er} jet	-	-	-
4		Eau robinet 2 ^{ème} jet	-	-	-
34		Grille siphon robinet	-	-	-
35		Ecouvillon fond de siphon robinet	+	-	-
36		Brise-jet robinet	-	-	-
37		Savon	-	-	-
38		Cuvette	+	-	<i>Ochrobactrum</i> sp., <i>Agrobacterium</i> sp.
39		Essuie-mains	-	-	-
118		Eau cuvette WC	+	-	<i>Bordetella</i> sp., <i>O. grignonense</i> , <i>A. radiobacter</i>
1		Cuisine	Eau robinet 1 ^{er} jet	-	-
2	Eau robinet 2 ^{ème} jet		-	-	-
40	Sol		-	-	-
41	Boutons lave-vaisselle		-	-	-
42	Intérieur micro-onde		-	-	-
43	Poubelle		-	-	-
44	Hotte aspirante		-	-	-
45	Evacuation lave vaisselle		-	-	-
46	Plan de travail		-	-	-
47	Poignée réfrigérateur		-	-	-
48	Bac à légumes réfrigérateur		-	-	-
49	Evacuation réfrigérateur		-	-	-
50	Brise-jet robinet évier		-	-	-
51	Trop-plein évier		-	-	-
52	Eponge		-	-	-
53	Grille siphon évier		+	-	<i>O. grignonense</i> , <i>Ochrobactrum</i> sp., <i>Agrobacterium</i> sp.
54	Intérieur mousseur évier		-	-	-
55	Surface interne évier		-	-	-
56	Surface du bar		-	-	-
57	Plan de travail n°2		-	-	-
58	Machine à café	-	-	-	
59	Eau bouteille en verre	-	-	-	
60	Eau siphon droit	+	-	<i>S. maltophilia</i> , <i>Bordetella</i> sp.	