

Empreinte moléculaire des communautés bactériennes et hétérogénéité intraspécifique de l'ADNr 16S : est-il raisonnable d'occulter le problème ?

Molecular fingerprint of bacterial communities and 16S rDNA intra-species heterogeneity: a pitfall that should be considered

L. Roudière^{a,*}, S. Lorto^a, E. Tallagrand^a, H. Marchandin^{a,b}, J.-L. Jeannot^a, E. Jumas-Bilak^a

^a Laboratoire de bactériologie, EA 3755, faculté de pharmacie, 15, avenue Charles-Flahault, BP 14491, 34093 Montpellier cedex 05, France

^b Laboratoire de bactériologie, hôpital Arnaud-de-Villeneuve, 371, avenue du Doyen-Gaston-Giraud, 34295 Montpellier cedex 05, France

Reçu le 2 juillet 2007 ; accepté le 11 juillet 2007

Résumé

Les techniques d'empreinte moléculaire sont des méthodes indépendantes de la culture utilisées dans l'étude des communautés microbiennes. Leur utilisation pour l'identification est envisagée avec le développement de techniques rapides semi-automatisées. Le marqueur le plus utilisé, l'ADN ribosomal 16S (ADNr 16S), permet d'obtenir une image assez exhaustive des communautés et d'identifier leurs membres. Cependant, le polymorphisme de l'ADNr 16S au sein d'une espèce (intraspécifique) est un écueil important, souvent négligé, de ce type d'approche.

But du travail. – Nous proposons d'évaluer la variabilité intraspécifique de l'ADNr 16S de trois espèces d'intérêt médical.

Matériels et méthodes. – L'ADN total est extrait à partir de cultures pures d'isolats cliniques de *Pseudomonas aeruginosa* ($n = 20$), *Clostridium difficile* ($n = 20$) et *Enterobacter cloacae* ($n = 14$). Les produits d'amplification d'une *polymerase chain reaction* (PCR) consensuelle ciblée sur les régions variables V3 et V6-V7-V8 de l'ADNr 16S ont été séparés par *temporal temperature gradient gel electrophoresis* (TTGE). Les bandes d'intérêt ont été séquencées et analysées.

Résultats. – Tous les isolats testés de *P. aeruginosa* et de *C. difficile* présentent une bande unique dont la distance de migration est constante en TTGE. Aucune variabilité intraspécifique n'a donc été observée chez ces deux espèces. En revanche, les isolats d'*E. cloacae* présentent des profils complexes composés de bandes multiples (polymorphisme intragénomique) ayant des distances de migration différentes (polymorphisme entre souches).

Conclusion. – Cette variabilité de l'ADNr 16S au sein d'une espèce et/ou d'un génome est connue mais rend indispensable la réalisation d'un travail de description exhaustif qui seul permettra l'interprétation raisonnée des techniques d'identification par empreinte moléculaire.

© 2007 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Abstract

Molecular fingerprinting methods are currently used to study microbial communities by culture independent approaches. They are proposed as identification tool owing to the availability of rapid automated methods. The 16S rRNA gene (16S rDNA) is an efficient marker for bacterial identification and microbial communities analysis. However, the 16S rDNA polymorphism among strains of the same species is an underestimated pitfall of the fingerprinting approaches.

Aim of the study. – We studied the 16S rDNA variability among strains of three bacterial species of medical interest.

Material and methods. – Total DNA was extracted from clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* ($N = 20$), *Clostridium difficile* ($N = 20$) and *Enterobacter cloacae* ($N = 14$). The Polymerase Chain Reaction (PCR) products obtained with consensus primers flanking the 16S rDNA variable regions V3 and V6-V7-V8 were separated by Temporal Temperature Gradient gel Electrophoresis (TTGE). DNA extracted from TTGE bands were sequenced and analysed.

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : roudiere.laurent@voila.fr (L. Roudière).

Results. – All the isolates of *P. aeruginosa* and of *C. difficile* displayed one single TTGE band with constant migration distances suggesting that there was no 16S rDNA polymorphism among strains in these two species. Oppositely, the isolates of *E. cloacae* gave complex TTGE patterns formed by multiple bands with variable migration distances. These patterns corresponded to 16S rRNA genes variable in a single genome as well as among strains of the species.

Conclusion. – Intra-species and/or intragenomic variability of 16S rDNA should be taken into account for pertinent interpretation of molecular fingerprint. For this purpose, a comprehensive description of the polymorphism of this marker is necessary.

© 2007 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Mots clés : ADNr 16S ; Empreinte moléculaire ; Communautés microbiennes ; Hétérogénéité ; Espèce bactérienne

Keywords: ADNr 16S; Molecular fingerprint; Bacterial communities; Polymorphism; Bacterial species

1. Introduction

Les techniques d'empreinte moléculaire sont des méthodes indépendantes de la culture utilisées dans l'étude des communautés microbiennes. Elles permettent d'obtenir une image de la diversité génétique des communautés bactériennes présentes dans un écosystème. Ces techniques sont nombreuses et nous pouvons citer parmi les plus utilisées :

- *denaturing gradient electrophoresis* (DGE) [1,2] ;
- *single strand conformation polymorphism* (SSCP) [3] ;
- *terminal-restriction fragment length polymorphism* (T-RFLP) [4] ;
- *ribosomal intergenic spacer amplification* (RISA) [5] ;
- *denaturing-high performance liquid chromatography* (D-HPLC) [6] ;
- *constant denaturing capillary electrophoresis* (CDCE) [7].

La communauté bactérienne est représentée sous la forme d'un profil dans lequel chaque bande (gel) ou chaque pic (chromatogramme) représente en théorie une population bactérienne homogène pouvant correspondre à une espèce. Dans la majorité des cas, ces techniques utilisent comme marqueur le gène de l'ARN ribosomal 16S (ADNr 16S). En effet, ce gène très conservé est présent chez tous les procaryotes et permet ainsi une étude globale du domaine bactérien. Cependant, l'ADNr 16S est variable au sein des espèces et cette variabilité dépend des groupes bactériens étudiés même si un seuil de 98,7 % d'identité est aujourd'hui proposé pour délimiter une espèce [8]. Le polymorphisme de l'ADNr 16S au sein de l'espèce (intraspécifique) est un écueil important, souvent mal évalué, des techniques d'empreinte. Une évaluation de cette hétérogénéité semble pourtant indispensable alors que les techniques d'empreinte sont en passe de devenir des outils de diagnostic [9–11]. Le développement de techniques semi-automatisées pourrait fournir des outils moléculaires d'identification rapide utilisables lors d'infections polymicrobiennes et pour les analyses de flores. Dans cette étude, nous avons évalué l'hétérogénéité intraspécifique de l'ADNr 16S chez trois espèces d'intérêt médical par une technique de DGE. Nous avons utilisé la *temporal temperature gradient gel electrophoresis* (TTGE) qui permet de séparer des brins d'ADN double brin de tailles identiques, mais dont la composition en nucléotides est différente grâce à l'application d'un gradient de température lors de la migration électrophorétique.

2. Matériel et méthode

2.1. Souches bactériennes

Les souches étudiées ont été isolées d'échantillons cliniques et identifiées selon le *Guide de bonne exécution des analyses de biologie médicale* (GBEA) du laboratoire de bactériologie du CHU de Montpellier. Elles ont été sélectionnées en considérant l'identité du patient, le site infectieux et le service clinique, afin de minimiser le risque de sélection de deux clones identiques. Les souches d'*Enterobacter cloacae* ont été identifiées par API20E (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France) ou par l'automate Vitek II (bioMérieux) avec la carte ID-GNB. Les souches ont été congelées sur cryobilles à –20 °C afin d'être analysées ultérieurement. Nous avons retenu pour l'étude 20 souches de *Pseudomonas aeruginosa* (PA1 à PA20), 20 souches de *Clostridium difficile* (CD1 à CD20) et 14 souches d'*E. cloacae* (EC1 à EC14). Une souche de la collection de l'Institut Pasteur (CIP), *E. cloacae* CIP 103550 (EC15) a aussi été analysée.

2.2. Culture

Après décongélation, les souches de *P. aeruginosa* et d'*E. cloacae* ont été incubées 24 heures à 37 °C en aérobie sur gélose trypticase-soja et les souches de *C. difficile* 48 heures en anaérobiose sur gélose Columbia au sang. Pour s'assurer de la clonalité des souches, une colonie isolée de chaque souche a été repiquée et mise en culture dans les conditions précédemment décrites.

2.3. Extraction de l'ADN

Après culture, les bactéries sont lavées dans 1 ml d'eau pour préparation injectable (EPI). Les culots bactériens obtenus après trois minutes de centrifugation à 14 000 g sont utilisés pour extraire l'ADN. L'ADN des souches de *P. aeruginosa* et d'*E. cloacae* a été extrait et purifié par le kit « Aquapure Genomic DNA » (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) et celui des souches de *C. difficile* par le kit « MasterPure Gram positive DNA purification » (Epicentre, Madison, États-Unis) selon les recommandations données par les fabricants. L'ADN en solution a été dosé à 260 nm par un biophotomètre (Eppendorf, Hamburg, Allemagne).

2.4. Amplification de l'ADNr 16S

L'ADN total des souches bactériennes a servi de matrice à deux réactions de polymérisation en chaîne (PCR) ancrées sur deux domaines distincts de l'ADNr 16S. La région variable V3 (numérotation d'*Escherichia coli*) a été amplifiée par le couple d'amorces HDA1-GC-HDA2 [10] et les régions variables V6-V7-V8 par le couple d'amorces 968F-GC-1381R (968F: 5'-AACGCGAAGAACCTTAC-3', 1381R: 5'-GGCCCGGGGAACGTATTACC-3'). Une queue GC de 40 bases [10] a été ajoutée en 5' des amorces sens. Le mélange de PCR pour un volume final de 50 µl contenait 10 ng d'ADN, 10 pmol de chaque amorce (Sigma Genosys), 2,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de chaque désoxynucléotide triphosphate (Fermentas, Leon-Rot, Allemagne) et 2,5 U de *Taq* polymérase (Promega, Charbonnière-les-Bains, France) dans un tampon adapté. Les cycles de PCR comprenaient une étape de dénaturation initiale de deux minutes à 94 °C, une série de 35 cycles d'une minute de dénaturation à 94 °C, 30 secondes d'hybridation à 62 °C, une minute d'élongation à 72 °C et enfin une extension finale de dix minutes à 72 °C. La qualité des produits de PCR a été vérifiée sous lumière UV après migration sur gel d'agarose à 1,5 % dans un tampon tris-borate-EDTA (TBE) 0,5X et coloration au bromure d'éthidium (BET). Les PCR ont été effectuées en double lors de deux expériences indépendantes pour les 15 souches d'*E. cloacae*.

2.5. TTGE

Les produits d'amplification ont été séparés sur un gel de polyacrylamide (acrylamide-bisacrylamide 37,5:1) à 8 % pour la région V3 et à 6 % pour la région V6-V7-V8, contenant

7 M d'urée dans un tampon tris-acétate-EDTA (TAE) 1X. La migration a été réalisée en 16 heures sur l'appareil D-code (Bio-Rad) avec une température initiale de 63 °C, une température finale de 70 °C, un gradient de température de 0,4 °C/h sous une tension de 46 V.

Après la migration, les gels ont été colorés 15 minutes dans un bain de TAE 1X contenant 0,5 µg/ml de BET. Après 45 minutes de rinçage sous agitation dans du TAE 1X, les gels ont été visualisés sur une table de transillumination UV et photographiés.

2.6. Séquençage

Les bandes d'intérêt ont été découpées, rincées par trois lavages successifs dans 300 µl d'EPPI et incubées une nuit dans 50 µl de tampon EB (Qiagen) à 37 °C. Une PCR a ensuite été réalisée sur 1 µl de surnageant dans les conditions décrites précédemment en utilisant les mêmes amorces que pour l'amplification initiale mais dépourvues de queue GC. Un séquençage unidirectionnel à l'aide des amorces sens a été réalisé par la société Genome Express (Meylan, France). Les séquences ont été alignées et analysées avec le logiciel BioEdit [12].

3. Résultats

Nous avons étudié l'hétérogénéité de deux régions variables de l'ADNr 16S pour 55 souches appartenant aux espèces *P. aeruginosa*, *C. difficile* et *E. cloacae* par PCR-TTGE.

Pour les deux régions amplifiées, *P. aeruginosa* (Fig. 1) et *C. difficile* (Fig. 2) présentent une bande unique en gel d'agarose non dénaturant (données non montrées). En TTGE, cette bande est aussi unique et présente une distance de migra-

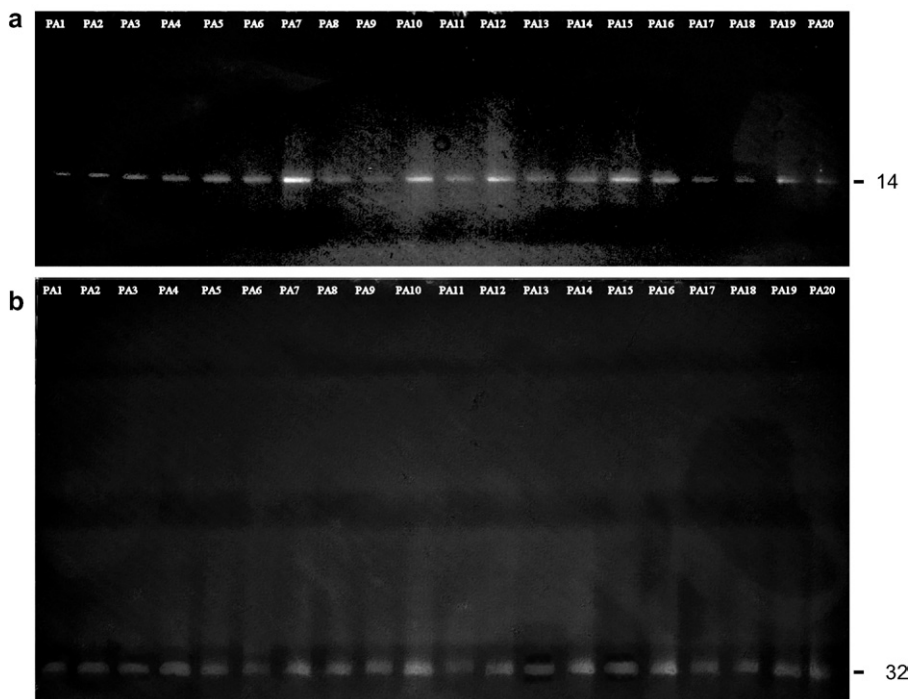


Fig. 1. Profils de migration de 20 individus appartenant à l'espèce *P. aeruginosa* pour les régions V3 (a) et V6-V7-V8 (b). La distance de migration des bandes en millimètre est notée en marge.

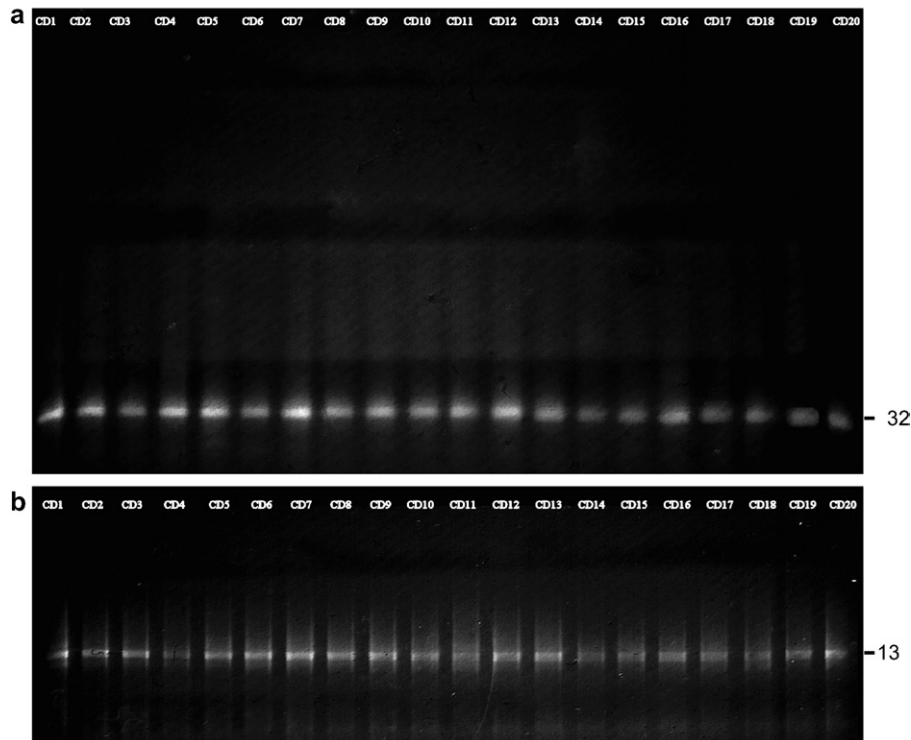


Fig. 2. Profils de migration de 20 individus appartenant à l'espèce *C. difficile* pour les régions V3 (a) et V6-V7-V8 (b). La distance de migration des bandes en millimètre est notée en marge.

tion caractéristique d'espèce et constante chez toutes les souches d'une espèce. Aucune différence entre les séquences d'ADNr des deux régions étudiées n'a pu être mise en évidence chez les souches de ces deux espèces.

Chez *E. cloacae*, toutes les réactions de PCR ont produit un fragment d'ADN de taille attendue en gel d'agarose non dénaturant à l'exception de l'amplification de la région V3 de la souche EC10 qui produisait un fragment de haut poids moléculaire en plus du fragment attendu (données non montrées). Ce produit de PCR non désiré forme une bande « artéfactuelle » intense (10,2 mm) sur le profil de TTGE (Fig. 3a). Aucune souche n'a un profil composé d'une bande unique pour les deux régions étudiées (Fig. 3). Des profils de deux à quatre bandes sont observés chez 12 individus pour la région V3 (Fig. 3a) et chez dix individus pour la région V6-V7-V8 (Fig. 3b). De plus, les distances de migration des bandes en TTGE sont variables selon les individus au sein de l'espèce *E. cloacae* (Fig. 3). La similarité des profils et des distances de migration nous ont permis de regrouper les 14 isolats et la souche CIP en quatre groupes pour la région V3 (A à D) (Fig. 3a) et en quatre groupes différents pour la région V6-V7-V8 (1 à 4) (Fig. 3b). Les bandes multiples sont le signe que des copies d'ADNr différentes sont présentes au sein d'un même isolat et sont donc le reflet d'une hétérogénéité intragénomique de l'ADNr 16S.

Des bandes de faible intensité, visibles en haut du gel de la région V3 pour les souches EC2, EC9, EC5 et EC1 (Fig. 3a) évoquent des bandes artéfactuelles. Des doubles bandes (bandes 30 et 30,6 mm) présentes sur le profil de la région V6-V7-V8 chez huit des neuf souches du groupe 4 peuvent aussi évoquer un

type d'artéfact fréquemment retrouvé en DGE [13]. Dans ce cas, la persistance des doubles bandes après augmentation du temps d'élongation terminale de PCR à 30 ou 60 minutes (données non montrées) ainsi que les résultats de séquençage (voir ci-après) ont démontré que ces bandes n'étaient pas des artéfacts.

Afin d'identifier les mutations responsables de l'hétérogénéité des profils chez *E. cloacae*, 35 bandes marquées par des flèches sur la Fig. 3a et b ont été séquencées (Tableau 1), 22 pour la région V3 et 13 pour la région V6-V7-V8. Vingt-neuf séquences ont été exploitables, 17 pour la région V3 et 12 pour la région V6-V7-V8. Les séquences non interprétables proviennent des bandes de faible intensité, le chromatogramme montrant des doubles pics, probablement en raison d'une contamination par les bandes plus intenses (Fig. 3). Ces séquences ont permis d'identifier 13 sites variables sur la région V3 et neuf sur la région V6-V7-V8 (Tableau 1). Les sites en gras sur le Tableau 1 (six dans la région V3 et trois dans la région V6-V7-V8) peuvent être variables au sein d'une même souche et déterminent une variabilité dite intragénomique. Dans le cas des souches EC10 et EC13, les positions 476 et 1260 (numérotation *E. coli*) sont variables au sein du génome, mais conservées entre les autres souches étudiées.

Le Tableau 1 permet d'apprécier la distance de migration relative des bandes en fonction de la nature, du nombre et du site des mutations dans les séquences correspondantes. Des doubles pics matérialisés par les nucléotides dégénérés Y et M sont présents en position 1136 et 1137 sur la région V6-V7-V8 des souches des groupes 2 et 3 (Tableau 1b) alors que des bandes uniques migrant respectivement à 25,4 et 26,3 mm sont visibles sur le gel (Fig. 3b). Ces bandes sont certainement formées de

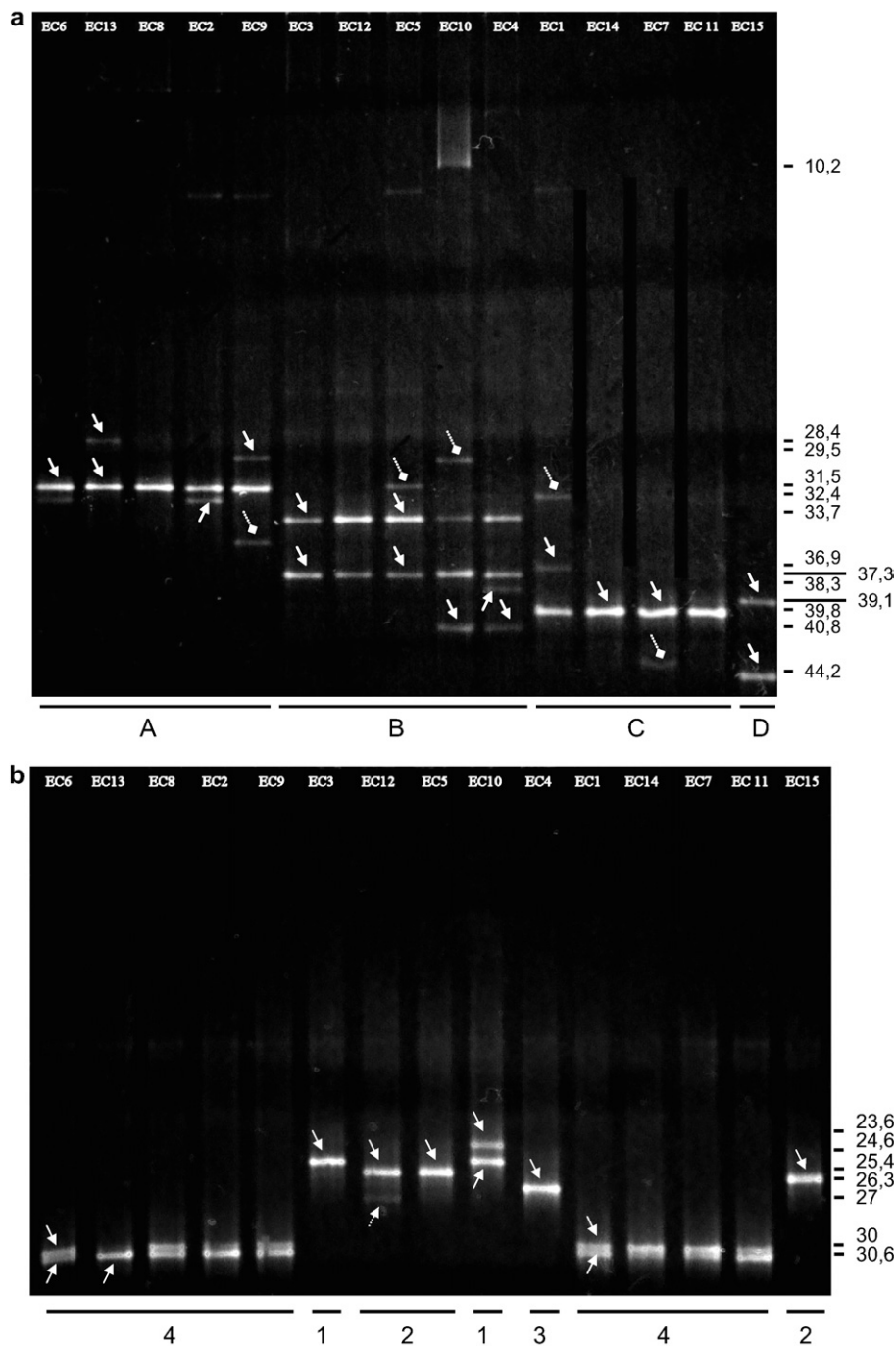


Fig. 3. Profils de migration de 15 individus appartenant à l'espèce *E. cloacae* pour les régions V3 (a) et V6-V7-V8 (b). La distance de migration des bandes en millimètre est notée en marge. Les flèches pointent les bandes qui ont été découpées et séquencées, les flèches en pointillé (⇆) signalent un échec du séquençage.

deux bandes comigrantes non séparées dans les conditions de l'expérience. Une optimisation des conditions de migration serait nécessaire pour détecter sur le gel la double population.

Les bandes comigrantes (Fig. 3a) chez des individus de groupes différents comme EC9 et EC10 (bande 29,5 mm) ou EC8 et EC5 (bande 31,5 mm) sont probablement formées par des séquences d'ADN différentes mais ayant des propriétés de dénaturation comparables. L'échec du séquençage des bandes de faible intensité de EC10 et EC5 ne permet cependant pas de le démontrer.

4. Discussion

Nous avons étudié l'hétérogénéité intraspécifique de deux régions de l'ADNr 16S de trois espèces d'intérêt médical par PCR-TTGE.

Chez *P. aeruginosa* et *C. difficile* aucune hétérogénéité n'a pu être mise en évidence sur les 20 individus de chaque espèce testés. Ainsi, les profils moléculaires obtenus lors d'études des communautés ne seront pas perturbés par la variabilité intraspécifique de l'ADNr 16S de ces deux bactéries dans les condi-

Tableau 1

Sites variables des régions V3 (a) et V6-V7-V8 (b) de l'ADNr 16S au sein du complexe *E. cloacae*

Souche	Distance de migration (mm)	Groupe	a													
			Positions nucléotidiques selon deux numérotations : * (ligne du haut) et ** (ligne du bas)													
			138 434	159 455	161 457	162 458	163 459	164 460	175 471	176 472	177 473	178 474	179 475	180 476	181 477	
EC13	28,4	A	T	C	A	T	A	A	C	T	T	G	T	T	G	
EC9	29,5	A	T	C	A	T	A	A	T	T	T	G	T	C	G	
EC6	31,5	A	T	C	A	T	A	A	C	T	T	G	T	C	G	
EC13	31,5	A	T	C	A	T	A	A	C	T	T	G	T	C	G	
EC3	33,7	B	T	T	T	T	G	T	C	A	C	A	G	C	A	
EC5	33,7	B	T	T	T	T	G	T	C	A	C	A	G	C	A	
EC3	37,3	B	T	T	T	T	G	T	C	G	C	A	G	C	A	
EC5	37,3	B	T	T	T	T	G	T	C	G	C	A	G	C	A	
EC4	38,3	B	T	T	T	T	G	C	C	A	C	A	G	C	A	
EC10	40,8	B	T	T	T	T	G	C	C	G	C	A	G	C	A	
EC4	40,8	B	T	T	T	T	G	C	C	G	C	A	G	C	A	
EC1	36,9	C	T	C	A	C	A	G	T	C	T	G	T	C	G	
EC7	39,8	C	T	C	A	C	A	G	C	C	T	G	T	C	G	
EC14	39,8	C	T	C	A	C	A	G	C	C	T	G	T	C	G	
EC7	43,3	C	T	C	A	C	A	G	C	C	T	G	C	C	G	
EC15	39,1	D	C	C	G	T	A	A	C	T	T	A	C	C	G	
EC15	43,3	D	C	C	G	T	A	A	C	T	T	G	C	C	G	

Souche	Distance de migration (mm)	Groupe	b									
			Positions nucléotidiques selon deux numérotations : * (ligne du haut) et ** (ligne du bas)									
			121 1039	209 1136	210 1137	290 1217	291 1218	333 1260	335 1262	428 1355	440 1367	
EC10	23,6	I	C	C	C	G	T	A	A	A	T	
EC3	24,6	1	C	C	C	G	T	G	A	A	T	
EC10	24,6	1	C	C	C	G	T	G	A	A	T	
EC5	25,4	2	C	Y	M	G	T	G	C	A	T	
EC12	25,4	2	C	Y	M	G	T	G	C	A	T	
EC15	25,4	2	C	Y	M	G	T	G	C	A	T	
EC4	26,3	3	G	Y	M	C	C	G	C	A	T	
EC1	30	4	C	T	A	G	T	G	C	G	C	
EC6	30	4	C	T	A	G	T	G	C	G	C	
EC1	30,6	4	C	C	C	G	T	G	C	G	C	
EC6	30,6	4	C	C	C	G	T	G	C	G	C	
EC13	30,6	4	C	C	C	G	T	G	C	G	C	

Deux numérotations des positions nucléotidiques sont utilisées : (*) origine en 5' du produit d'amplification avec la queue GC, (**) origine au début du gène de l'ADNr 16S d'*E. coli*. Les bandes notées en italique sont des bandes secondaires reflétant une variabilité au sein de la souche. Les nucléotides en gras indiquent un site variable au sein de la souche. Nucléotides dégénérés : Y = C + T ; M = A + C.

tions expérimentales de cette étude. Cependant, nous n'avons pas étudié l'ensemble de l'ADNr 16S et certaines mutations dans les régions étudiées peuvent ne pas être détectées [14]. De plus, l'étude de 20 individus ne peut exclure la présence d'une telle variabilité au sein de l'espèce.

Chez *E. cloacae*, nous avons mis en évidence des hétérogénéités de l'ADNr 16S entre souches mais aussi au niveau intragénomique. Ces hétérogénéités sont respectivement objectivées sur les profils de TTGE par des bandes à distances de migration variables et par des bandes multiples.

L'hétérogénéité génétique au sein du nomenspecies *E. cloacae* est bien connue [15] et l'hétérogénéité intraspécifique retrouvée dans cette étude n'est pas surprenante. Le complexe *E. cloacae* regroupe les deux sous-espèces *Enterobacter cloacae subsp. cloacae* et *Enterobacter cloacae subsp. dissolvens* [16] ainsi que cinq espèces phénotypiquement proches : *Enterobacter asburiae*, *Enterobacter cancerogenus*, *Enterobacter hormaechei*, *Enterobacter kobei* et *Enterobacter nimipressuralis* [15]. Hoffmann et Roggenkamp ont étudié

la diversité génétique de 206 souches phénotypiquement identifiées comme *E. cloacae*. Sur la base de l'étude de quatre gènes (*hsp60*, *rpoB*, *hemB* et *ampC*), ces auteurs ont défini 12 clusters génétiques parmi lesquels se trouvent les souches de référence ou les souches types des espèces du complexe *E. cloacae*. Le séquençage du gène *hsp60* de nos souches permettrait d'étudier la correspondance entre les groupes définis par Hoffmann et Roggenkamp et ceux observés dans notre étude afin d'utiliser la PCR–TTGE comme technique d'identification au sein du complexe. Les groupes formés d'après les profils des régions V3 (A à D) et V6-V7-V8 (1 à 4) ne sont pas juxtaposables et suggèrent soit une évolution différente de ces deux régions de l'ADNr 16S, soit des phénomènes d'échanges et de conversions géniques au sein du complexe d'espèces.

L'hétérogénéité intragénomique de l'ADNr 16S est un problème reconnu des techniques d'analyse des communautés microbiennes [17]. En effet, le nombre de copies de ce gène dans le génome est différent selon les espèces (1 à 15) et les séquences de ces copies peuvent être différentes (0 à 11,6 %

de divergence) [18], pouvant de plus poser des problèmes de taxonomie [19]. Les techniques d'empreinte ont été utilisées dans l'étude de l'hétérogénéité intragénomique [20]. Nous retrouvons une hétérogénéité intragénomique chez toutes les souches d'*E. cloacae* testées avec au maximum quatre copies d'ADNr 16S différant d'un à deux nucléotides ; ce phénomène semble fréquent chez les entérobactéries [18]. Ces résultats montrent clairement que l'hétérogénéité des copies de l'ADNr 16S peut entraîner une surestimation des espèces bactériennes d'une communauté. Il est donc crucial d'identifier par séquençage les membres de la communauté si l'on souhaite estimer la diversité bactérienne par les méthodes d'empreinte. De plus, cette hétérogénéité pourrait en partie expliquer l'échec des tentatives de classification par l'ADNr 16S au sein du complexe *E. cloacae* [15]. En effet, la présence de ces sites hypervariables et la forte similarité des séquences au sein du complexe pourraient être à l'origine d'une homoplasie qui brouille l'information phylogénétique contenue dans les séquences. Ce phénomène pourrait être limité en utilisant un modèle d'évolution des séquences qui tienne compte de l'hétérogénéité des taux de substitution entre les sites lors de la construction d'arbres phylogénétiques.

Enfin, notre travail confirme la validité des méthodes d'empreinte comme outil d'exploration de la variabilité intraspécifique ou intragénomique de l'ADNr 16S. Nous confirmons la capacité de la technique à détecter les mutations à une base près [21]. Cependant, ces méthodes génèrent de nombreux artefacts et doivent être interprétées avec prudence [2]. La qualité de la réaction de PCR est essentielle et celle-ci doit être systématiquement vérifiée. Même si le produit de PCR est spécifique, des artefacts sont formés au cours de la PCR [22]. Dans notre étude, l'amplification par PCR et la TTGE ont été testées deux fois avec des résultats identiques, ce qui rend peu probable la présence de bandes artefactuelles liées à des mutations ou des chimères. La présence de bandes hétéroduplex est possible sur les profils qui contiennent plus de deux bandes, les hétéroduplex moins stables ayant une distance de migration plus courte que celle des homoduplex. Nous avons remarqué que leur formation était reproductible pour un mélange d'ADN matrice donné. Or, les profils qui comportent plus de deux bandes ne possèdent pas de bandes communes qui pourraient évoquer un hétéroduplex. Cependant, il est impossible d'exclure totalement leur présence lorsque les bandes n'ont pas été séquencées.

5. Conclusion

Cette étude souligne la nécessité d'un travail descriptif exhaustif de la variabilité de l'ADNr 16S au sein d'une espèce ou d'un génome si l'on souhaite raisonnablement utiliser les méthodes d'empreinte comme outil d'identification. Ce travail permettrait, en outre, de mieux évaluer la diversité des communautés microbiennes.

Références

[1] Muyzer G, de Waal EC, Uitterlinden AG. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of poly-

merase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 1993;59:695–700.

[2] Muyzer G. DGGE–TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Curr Opin Microbiol* 1999;2:317–22.

[3] Lee DH, Zo YG, Kim SJ. Non-radioactive method to study genetic profiles of natural bacterial communities by PCR-single-strand-conformation polymorphism. *Appl Environ Microbiol* 1996;62:3112–20.

[4] Kitts CL. Terminal restriction fragment patterns: a tool for comparing microbial communities and assessing community dynamics. *Curr Issues Intest Microbiol* 2001;2:17–25.

[5] Garcia-Martinez J, Acinas SG, Anton AI, Rodriguez-Valera F. Use of the 16S–23S ribosomal genes spacer region in studies of prokaryotic diversity. *J Microbiol Methods* 1999;36:55–64.

[6] Barlaan EA, Sugimori M, Furukawa S, Takeuchi K. Profiling and monitoring of microbial populations by denaturing high-performance liquid chromatography. *J Microbiol Methods* 2005;61:399–412.

[7] Thompson JR, Randa MA, Marcelino LA, Tomita-Mitchell A, Lim E, Polz MF. Diversity and dynamics of a north atlantic coastal *Vibrio* community. *Appl Environ Microbiol* 2004;70:4103–10.

[8] Stackebrandt E, Ebers J. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiology Today* 2006;152–5.

[9] Hurtle W, Shoemaker D, Henchal E, Norwood D. Denaturing HPLC for identifying bacteria. *Biotechniques* 2002;33:386–8 (390–1).

[10] Ogier JC, Son O, Gruss A, Tailliez P, Delacroix-Buchet A. Identification of the bacterial microflora in dairy products by temporal temperature gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* 2002;68:3691–701.

[11] Domann E, Hong G, Imirzalioglu C, Turschner S, Kuhle J, Watzel C, et al. Culture-independent identification of pathogenic bacteria and polymicrobial infections in the genitourinary tract of renal transplant recipients. *J Clin Microbiol* 2003;41:5500–10.

[12] Tippmann HF. Analysis for free: comparing programs for sequence analysis. *Brief Bioinform* 2004;5:82–7.

[13] Janse I, Bok J, Zwart G. A simple remedy against artifactual double bands in denaturing gradient gel electrophoresis. *J Microbiol Methods* 2004;57:279–81.

[14] Wu Y, Hayes VM, Osinga J, Mulder IM, Looman MW, Buys CH, et al. Improvement of fragment and primer selection for mutation detection by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res* 1998;26:5432–40.

[15] Hoffmann H, Roggenkamp A. Population genetics of the nomenclature species *Enterobacter cloacae*. *Appl Environ Microbiol* 2003;69:5306–18.

[16] Hoffmann H, Stindl S, Ludwig W, Stumpf A, Mehlen A, Heesemann J, et al. Reassignment of *Enterobacter dissolvens* to *Enterobacter cloacae* as *Enterobacter cloacae subspecies dissolvens* comb. nov. and emended description of *Enterobacter asburiae* and *Enterobacter kobei*. *Syst Appl Microbiol* 2005;28:196–205.

[17] Crosby LD, Criddle CS. Understanding bias in microbial community analysis techniques due to rrn operon copy number heterogeneity. *Biotechniques* 2003;34:790–4 (796, 798).

[18] Acinas SG, Marcelino LA, Klepac-Ceraj V, Polz MF. Divergence and redundancy of 16S rRNA sequences in genomes with multiple rrn operons. *J Bacteriol* 2004;186:2629–35.

[19] Marchandin H, Teyssier C, Simeon De Buochberg M, Jean-Pierre H, Carrière C, Jumas-Bilak E. Intra-chromosomal heterogeneity between the four 16S rRNA gene copies in the genus *Veillonella*: implications for phylogeny and taxonomy. *Microbiology* 2003;149:1493–501.

[20] Nubel U, Engelen B, Felske A, Snajdr J, Wieshuber A, Amann RI, et al. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *J Bacteriol* 1996;178:5636–43.

[21] Sheffield VC, Cox DR, Lerman LS, Myers RM. Attachment of a 40-base-pair G + C-rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:232–6.

[22] Kanagawa T. Bias and artifacts in multitemplate polymerase chain reactions (PCR). *J Biosci Bioeng* 2003;96:317–23.