

MARC-CHRISTIAN DOMINGO

**CARACTÉRISATION DES GÈNES DE RÉSISTANCE AUX GLYCOPEPTIDES
CHEZ LES BACTÉRIES DE LA FLORE INTESTINALE AUTRES QUE LES
ENTÉROCOQUES**

Thèse présentée
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval
dans le cadre du programme de doctorat en Microbiologie et Immunologie
pour l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.)

FACULTÉ DE MÉDECINE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

Août 2007

©Marc-Christian Domingo, 2007

Résumé

De 1956 à 1986, l'utilisation des glycopeptides en thérapeutique infectieuse a été marquée par de francs succès dans le traitement des infections graves dues à des bactéries à Gram positif. La vancomycine et la téicoplanine sont des antibiotiques de grande importance thérapeutique utilisés à travers le monde pour traiter les infections graves dues aux staphylocoques, aux entérocoques, aux streptocoques et à *Clostridium difficile* à cause de la résistance de ces bactéries à d'autres antibiotiques. Malheureusement, depuis 1986, on a assisté à l'émergence et la dissémination de la résistance aux glycopeptides chez un grand nombre d'espèces pathogènes telles que les entérocoques et plus récemment *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline. Dans ce contexte de dissémination de la résistance aux glycopeptides, mon projet de doctorat fournit d'importantes données grâce à la mise en évidence d'un réservoir des gènes *vanB*, *vanD* et *vanG* dans la flore intestinale humaine. Nous avons caractérisé pour la première fois plusieurs allèles du gène *vanG* dans la flore humaine. Puis, nous avons isolé et caractérisé deux nouvelles espèces bactériennes anaérobies résistantes aux glycopeptides. Les analyses phylogénétiques ont montré que ces nouvelles espèces appartiennent au groupe phylogénétique XIVa des *Clostridium*. La première espèce a été nommée *Clostridium lavalense* sp. nov. CCRI-9842^T. Cette souche est résistante à la vancomycine du fait de la présence du locus *vanB2* porté par le transposon Tn5382. La deuxième espèce isolée a été nommée *Ruminococcus gauvreaui* sp. nov. CCRI-16110^T. Cette souche est résistante à la vancomycine et à la téicoplanine et contient le locus *vanD* qui confère la résistance aux glycopeptides ainsi qu'un locus apparenté au locus *vanG* décrit chez les ERG. Il s'agit de la première description du locus *vanD* de résistance aux glycopeptides dans une espèce autre que les entérocoques habituellement connus comme réservoir de ce locus de résistance. De plus, un nouvel allèle du gène *vanG* a été caractérisé dans la souche *R. gauvreaui* CCRI-16110^T. Ainsi les résultats de nos travaux ont permis de montrer que le tube digestif humain représente un important réservoir des gènes de résistance aux glycopeptides qui sont parfois présents dans des espèces bactériennes encore inconnues du tube digestif. Ces nouvelles données vont permettre de mieux adapter les outils de contrôle des infections dues à des bactéries résistantes aux glycopeptides.

Abstract

From 1956 to 1986, glycopeptide use in infectious disease therapy was marked by astounding success for the treatment of serious Gram-positive bacterial infections. Vancomycin and teicoplanin are considered as the last resort glycopeptide antibiotics presently in use for the treatment of serious *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Streptococcus* spp. and *Clostridium difficile* drug-resistant infections. Unfortunately, the last twenty years have seen the emergence and dissemination of glycopeptide-resistant pathogenic strains such as methicillin-resistant *Enterococcus* spp. and, more recently, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. In this context of glycopeptide resistance dissemination, my thesis serves as an important contribution through the identification of *vanB*, *vanD* and *vanG* reservoir genes in the human intestinal flora. We have, for the first time, characterized several alleles of the *vanG* gene in the human flora and have isolated and characterized two new anaerobic glycopeptide-resistant bacterial strains. Phylogenetic analyses have shown that these new strains belong to the *Clostridium* XIVa phylogenetic group. The first strain was named *Clostridium lavalense* sp. nov. CCRI-9842^T. This strain is resistant to vancomycin, due to the presence of the *vanB2* locus carried by Tn5382/1549 transposon. The second strain was named *Ruminococcus gauvreaui* sp. nov. CCRI-16110^T and is resistant to vancomycin and teicoplanin. *Ruminococcus gauvreaui* CCRI-16110^T contains the *vanD* locus, which confers glycopeptide resistance in enterococci, along with a *vanG*-like locus described for vancomycin-resistant *Enterococcus*. This is the first description of a glycopeptide resistance *vanD* locus in a non-*Enterococcus* strain, the usual *vanD* locus reservoir. In addition, a new allele of the *vanG* gene was characterized in the *R. gauvreaui* CCRI-16110^T strain. Therefore, our results demonstrate that the human digestive tract represents an important reservoir of glycopeptide resistance genes, present in yet-to-be-described intestinal bacterial strains. These data will allow the fine tuning of infection control tools against glycopeptide-resistant bacteria.

Avant-propos

J'adresse mes sincères remerciements au Dr. Bergeron, directeur de cette thèse, qui m'a accueilli dans son équipe et m'a guidé tout au long de ce travail. Je le remercie de m'avoir fait confiance pour ce travail et d'avoir activement participé à ma formation scientifique.

J'exprime également toute ma reconnaissance au Dre Ann Huletsky, co-directrice de cette thèse, qui a étroitement participé à la réussite de ce travail. Je la remercie pour son encadrement, tous ses conseils et sa gentillesse.

Mes chaleureux remerciements vont également à tous les membres de l'équipe de diagnostic moléculaire avec qui j'ai entretenu d'excellentes relations amicales durant ces années de travail. Je vous remercie pour vos précieux conseils.

J'adresse mes remerciements aux Instituts de Recherche en Santé du Canada (IRSC), à Bayer Healthcare, ainsi qu'à l'Association pour la Microbiologie Médicale et l'Infectiologie (AMMI Canada) pour leur appui financier durant mes études.

Je voudrais également adresser mes vifs remerciements aux Drs Patrice Courvalin (Institut Pasteur de Paris), Didier Pittet (Hôpitaux Universitaires de Genève) et Paul Roy (Centre de Recherche en Infectiologie, Québec) qui ont accepté d'évaluer ce travail de thèse.

Ma profonde gratitude va à mes filles Ima, Simbi et Doriane ainsi qu'à mon épouse Marie-Sylvie pour leurs constantes marques d'amour et d'affection à mon égard.

Table des matières

CHAPITRE I. LES GLYCOPEPTIDES	3
<i>SOMMAIRE DU CHAPITRE.....</i>	<i>3</i>
1.1 DÉCOUVERTE DES GLYCOPEPTIDES	5
1.1.1 <i>La vancomycine.....</i>	<i>6</i>
1.1.2 <i>La téicoplanine.....</i>	<i>7</i>
1.2 PROPRIÉTÉS ET STRUCTURES CHIMIQUES DES GLYCOPEPTIDES	7
1.2.1 <i>La vancomycine.....</i>	<i>8</i>
1.2.2 <i>La téicoplanine.....</i>	<i>10</i>
1.3 PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES DES GLYCOPEPTIDES.....	11
1.3.1 <i>Pharmacocinétique et pharmacodynamie des glycopeptides</i>	<i>11</i>
1.3.2 <i>Activité antibactérienne des glycopeptides</i>	<i>13</i>
1.4 TOXICITÉ ET EFFETS SECONDAIRES DES GLYCOPEPTIDES.....	14
CHAPITRE II. SYNTHÈSE DU PEPTIDOGLYCANE ET MODE D’ACTION DES GLYCOPEPTIDES	17
<i>SOMMAIRE DU CHAPITRE.....</i>	<i>17</i>
2.1 ÉTAPE CYTOPLASMIQUE DE LA SYNTHÈSE DU PEPTIDOGLYCANE.....	17
2.2 ÉTAPE MEMBRANAIRE DE LA SYNTHÈSE DU PEPTIDOGLYCANE	20
2.3 ÉTAPE PÉRIPLASMIQUE DE LA SYNTHÈSE DU PEPTIDOGLYCANE.....	20
2.4 MÉCANISME D’ACTION DES GLYCOPEPTIDES.....	22
CHAPITRE III. RÉSISTANCE AUX GLYCOPEPTIDES.....	26
<i>SOMMAIRE DU CHAPITRE.....</i>	<i>26</i>
3.1 DÉFINITION DE LA RÉSISTANCE À LA VANCOMYCINE	26
3.2 ÉPIDÉMIOLOGIE DE LA RÉSISTANCE AUX GLYCOPEPTIDES	29
3.2.1 <i>Épidémiologie des ERG</i>	<i>29</i>
3.2.2 <i>Épidémiologie des souches VISA et VRSA</i>	<i>31</i>
3.2.3 <i>Épidémiologie des gènes de résistance aux glycopeptides.....</i>	<i>32</i>
3.3 PHÉNOTYPE DE LA RÉSISTANCE ACQUISE AUX GLYCOPEPTIDES	33
3.3.1 <i>Phénotypes VanA, VanB et VanD résultant de la synthèse du dipeptide terminal D-Ala-D-Lac..</i>	<i>33</i>
3.3.1.1 <i>Phénotype VanA.....</i>	<i>33</i>
3.3.1.2 <i>Phénotype VanB.....</i>	<i>35</i>
3.3.1.3 <i>Phénotype VanD.....</i>	<i>35</i>
3.3.2 <i>Phénotypes VanE et VanG résultant de la synthèse du dipeptide terminal D-Ala-D-Ser</i>	<i>36</i>
3.3.2.1 <i>Phénotype VanE.....</i>	<i>36</i>
3.3.2.2 <i>Phénotype VanG.....</i>	<i>36</i>
3.4 GÉNÉTIQUE DE LA RÉSISTANCE ACQUISE AUX GLYCOPEPTIDES.....	37
3.4.1 <i>Locus de résistance impliqués dans la synthèse du dipeptide terminal D-Ala-D-Lac des précurseurs du peptidoglycane</i>	<i>37</i>
3.4.1.1 <i>Locus vanA.....</i>	<i>39</i>
3.4.1.2 <i>Locus vanB.....</i>	<i>41</i>
3.4.1.3 <i>Locus vanD.....</i>	<i>44</i>

3.4.2	<i>Locus de résistance impliqués dans la synthèse du dipeptide terminal D-Ala-D-Ser des précurseurs du peptidoglycane</i>	45
3.4.2.1	<i>Locus vanE</i>	45
3.4.2.2	<i>Locus vanG</i>	45
3.5	MÉCANISMES BIOCHIMIQUES DE LA RÉSISTANCE ACQUISE AUX GLYCOPEPTIDES PAR SYNTHÈSE DU D-ALA-D-LAC OU DU D-ALA-D-SER	46
3.5.1	<i>Synthèse du dipeptide D-Ala-D-Lac des précurseurs du peptidoglycane</i>	46
3.5.1.1	<i>Régulation de la résistance aux glycopeptides</i>	48
3.5.1.2	<i>Particularité de la régulation de la résistance de type VanD</i>	49
3.5.2	<i>Synthèse du dipeptide D-Ala-D-Ser des précurseurs du peptidoglycane</i>	51
3.6	RÉSISTANCE AUX GLYCOPEPTIDES PAR ÉPAISSISSEMENT DE LA PAROI BACTÉRIENNE CHEZ LES STAPHYLOCOQUES	51
3.7	RÉSISTANCE INTRINSÈQUE AUX GLYCOPEPTIDES CHEZ <i>Enterococcus casseliflavus/flavescens</i> ET <i>Enterococcus gallinarum</i>	53
3.8	RÉSISTANCE INTRINSÈQUE AUX GLYCOPEPTIDES CHEZ LES BACTÉRIES LACTIQUES ET AUTRES BACTÉRIES	54
3.9	RÉSISTANCE INTRINSÈQUE AUX GLYCOPEPTIDES CHEZ LES BACTÉRIES PRODUCTRICES DE GLYCOPEPTIDES	56
3.10	ORIGINE DES GÈNES DE RÉSISTANCE AUX GLYCOPEPTIDES	58
3.10.1	<i>Origine des gènes responsables de la synthèse de D-Ala-D-Lac</i>	58
3.10.2	<i>Origine des gènes responsables de la synthèse de D-Ala-D-Ser</i>	60
	CHAPITRE IV. LA FLORE DIGESTIVE HUMAINE: UN MILIEU D'ÉCHANGE DES GÈNES DE RÉSISTANCE	61
	CHAPITRE V. HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS DE RECHERCHE	64
5.1	HYPOTHÈSE DE RECHERCHE	64
5.2	OBJECTIFS DE RECHERCHE	64
5.3	APERÇU DES RÉSULTATS ET CONTRIBUTIONS SCIENTIFIQUES	66
	CHAPITRE VI. EPIDÉMIOLOGIE DES GÈNES DE RÉSISTANCE AUX GLYCOPEPTIDES DANS LES SPÉCIMENS DE SELLES	68
6.1	RÉSUMÉ	68
6.2	ARTICLE	69
	CHAPITRE VII. CARACTÉRISATION DE LA NOUVELLE ESPÈCE <i>Clostridium lavalense</i> sp. nov., RÉSISTANTE À LA VANCOMYCINE	78
7.1	RÉSUMÉ	78
7.2	ARTICLE	79
	CHAPITRE VIII. CARACTÉRISATION DE LA NOUVELLE ESPÈCE <i>Ruminococcus gauvreaui</i> sp. nov., RÉSISTANTE À LA VANCOMYCINE	100
8.1	RÉSUMÉ	100
8.2	ARTICLE	101
	CHAPITRE IX. CARACTÉRISATION DU LOCUS <i>vanB</i> CHEZ LA SOUCHE DE <i>Clostridium lavalense</i> sp. nov.	123
9.1	RÉSUMÉ	123
9.2	ARTICLE	124

CHAPITRE X. CARACTÉRISATION DES LOCUS <i>vanD</i> ET <i>vanG</i>-LIKE CHEZ LA SOUCHE DE <i>Ruminococcus gauvreaui</i> sp. nov.	161
10.1 RÉSUMÉ	161
10.2 ARTICLE	162
CHAPITRE XI. DISCUSSION GÉNÉRALE	194
11.1 LE TUBE DIGESTIF EST UN RÉSERVOIR DE GÈNES DE RÉSISTANCE AUX GLYCOPEPTIDES	195
11.2 CARACTÉRISATION DE DEUX NOUVELLES ESPÈCES BACTÉRIENNES ANAÉROBIES À GRAM POSITIF DE LA FLORE DIGESTIVE HUMAINE CONTENANT LES GÈNES <i>vanB</i> , <i>vanD</i> ET DE TYPE <i>vanG</i>	196
11.3 UN ÉLÉMENT GÉNÉTIQUE MOBILE APPARENTÉ AU TRANSPOSON Tn5382/Tn1549 EST PRÉSENT DANS LA SOUCHE DE <i>Clostridium lavalense</i> CCRI-9842	199
11.4 LE LOCUS <i>vanD1</i> AINSI QU'UN NOUVEL ALLÈLE DU GÈNE <i>vanG</i> SONT PRÉSENTS DANS LA SOUCHE DE <i>Ruminococcus gauvreaui</i> CCRI-16110	200
11.5 LE TRANSFERT HORIZONTAL DE LA RÉSISTANCE DE TYPE VanB ET VanD À PARTIR DES SOUCHES DE <i>Clostridium lavalense</i> ET DE <i>Ruminococcus gauvreaui</i>	202
11.6 PERSPECTIVES	203
CHAPITRE XII. CONCLUSION GÉNÉRALE	208
BIBLIOGRAPHIE.....	210

Liste des tableaux

Tableau 1.	Les glycopeptides et leur utilisation	4
Tableau 2.	Classification des glycopeptides	5
Tableau 3.	Activité <i>in vitro</i> de la vancomycine et de la téicoplanine.....	14
Tableau 4.	Activité <i>in vitro</i> de la vancomycine et de la téicoplanine.....	16
Tableau 5.	Concentration minimale inhibitrice de la vancomycine et de la téicoplanine sur les souches d'entérocoque et de staphylocoque selon le CLSI.....	28
Tableau 6.	Niveaux de résistance aux glycopeptides chez les entérocoques	34
Tableau 7.	Gènes de résistances aux antibiotiques retrouvés à la fois chez les bactéries à Gram positif et à Gram négatif.....	62
Tableau 8.	Distribution des gènes <i>van</i> dans les espèces bactériennes.....	204

Liste des figures

Figure 1.	Structure chimique de la molécule de vancomycine	9
Figure 2.	Structure chimique de la téicoplanine.....	10
Figure 3.	Synthèse du peptidoglycane chez <i>S. aureus</i>	19
Figure 4.	Réaction de transpeptidation durant la synthèse du peptidoglycane	21
Figure 5.	Mode d'action des glycopeptides	23
Figure 6.	Liaison de la vancomycine au dipeptide D-Ala-D-Ala des précurseurs du peptidoglycane	25
Figure 7.	Schéma comparatif des différents locus de résistance aux glycopeptides....	38
Figure 8.	Structure du transposon Tn/546.....	39
Figure 9.	Structure du transposon Tn/547.....	42
Figure 10.	Structure du transposon Tn/549.....	43
Figure 11.	Régulation de la résistance aux glycopeptides	47
Figure 12.	Structure du locus <i>vanF</i> chez <i>P. popilliae</i> ATCC 14706	55
Figure 13.	Gènes de synthèse et de résistance aux glycopeptides chez <i>S. toyocaensis</i> NRRL 15009	57
Figure 14.	Phylogénie des ligases D-Ala-D-Ala et des enzymes apparentés.....	59

Liste des abréviations

aa	Acide aminé
ATP	Ester triphosphate de l'adénine
BSAC	de l'anglais British Society for Antimicrobial Chemotherapy
CLSI	de l'anglais Clinical and Laboratory Standards Institute
CMI	Concentration minimale inhibitrice
Da	Dalton
D-Ala-D-Ala	Dipeptide D-alanyl-D-alanine
D-Ala-D-Lac	Dipeptide D-alanyl-D-lactate
D-Ala-D-Ser	Dipeptide D-alanyl-D-sérine
D-iGlu	acide D-isoglutamique
ERG	Entérocoque résistant aux glycopeptides
Gly	Glycine
hVISA	<i>Staphylococcus aureus</i> possédant une résistance intermédiaire hétérogène à la vancomycine
IS	Séquence d'insertion (de l'anglais Insertion Sequence)
L-Lys	L-lysine
L-Ala	L-alanine
Mg	Magnésium
µg	Microgramme
ml	Millilitre
nt	nucléotide
pb	Paire de base
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
PLP	Protéine liant la pénicilline
SAIV	<i>Staphylococcus aureus</i> de résistance intermédiaire à la vancomycine (de l'anglais vancomycin-intermediate <i>S. aureus</i> ou VISA)
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méticilline
SARG	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant aux glycopeptides (de l'anglais vancomycin-resistant <i>S. aureus</i> ou VRSA)
SASM	<i>Staphylococcus aureus</i> sensible à la méticilline

SCN	Staphylocoque à coagulase négative
SERM	<i>Staphylococcus epidermidis</i> résistant à la méticilline
SESM	<i>Staphylococcus epidermidis</i> sensible à la méticilline
SFM	Société Française de Microbiologie
SRGA	de l'anglais Swedish Reference Group for Antibiotics
UDP-GlcNAc	Uracil diphosphate-N-acétylglucosamine
UDP-MurNAc	Uracil diphosphate-N-acétylmuramique
UMP	Uracil monophosphate
USI	Unité de soins intensifs
VRSA	de l'anglais vancomycin-resistant <i>S. aureus</i>
VISA	de l'anglais vancomycin-intermediate <i>S. aureus</i>

MOT D'INTRODUCTION

Le 20^e siècle a été l'âge d'or de la découverte d'une multitude de substances appelées antibiotiques, capables d'inhiber à de très faibles doses la croissance des bactéries. L'engouement scientifique de l'époque a conduit à la découverte de nombreux antibiotiques utiles et efficaces dans le traitement des infections, aussi bien en médecine humaine que vétérinaire. Cependant, l'efficacité de nombreux antibiotiques a progressivement diminué à cause du développement par les bactéries d'une multitude de stratégies pour résister à l'action de ces substances anti-infectieuses. En effet, la découverte et l'utilisation thérapeutique d'un agent anti-infectieux sont généralement suivies plus ou moins rapidement du développement de différents mécanismes de résistance, d'une dissémination des gènes de résistance et d'une augmentation du nombre des espèces bactériennes résistantes à cet antibiotique. Ainsi, l'époque pré-antibiotique où les populations succombaient aux infections les plus banales, a été suivie d'une époque faste des antibiotiques caractérisée par de francs succès dans le traitement des maladies infectieuses. Actuellement, nous vivons une époque intermédiaire avec des infections sévères, difficiles ou quasi intraitables et des infections heureusement maîtrisables par l'utilisation des antibiotiques. Dans ce contexte thérapeutique où les choix des antibiotiques ne sont plus aussi simples pour les médecins, il est important d'adopter une attitude prudente vis-à-vis de l'utilisation de ces drogues si importantes pour notre santé. Le processus de la résistance aux antibiotiques chez les bactéries est un processus évolutif naturel et inéluctable. Cette résistance des bactéries aux antibiotiques est due soit à une résistance naturelle (ou intrinsèque) soit à une résistance acquise. La résistance naturelle est un caractère d'espèce qui est présent de façon intrinsèque chez toutes les souches d'une même espèce bactérienne. La résistance acquise a soit une origine endogène lors de la survenue d'une mutation dans le génome, soit une origine exogène lors de l'acquisition de matériels génétiques étrangers tels que les plasmides et les éléments génétiques transposables. L'acquisition de matériels génétiques étrangers par une bactérie se déroule au cours de trois processus indépendants que sont la conjugaison, la transduction et la transformation. Une fois que la résistance a été acquise, sa dissémination se fait soit par prolifération des souches bactériennes résistantes, soit par propagation des gènes de

résistance au sein de la même espèce et au sein de genres phylogénétiquement éloignés. L'exemple de la résistance acquise à la vancomycine illustre assez bien l'ampleur de la dissémination intra-espèce (entre entérocoques) et inter-genre (*Staphylocoque aureus* et bactéries anaérobies du tube digestif) dont a été témoin la communauté scientifique durant ces 20 dernières années. Certains écosystèmes bactériens tels que le tube digestif humain sont d'excellentes niches où cohabite une flore abondante et variée de bactéries commensales qui, de toute évidence, peuvent constituer des réservoirs de gènes de résistance (237-239).

Ce projet de doctorat a été entrepris pour permettre de comprendre le rôle que pourrait jouer la flore digestive dans la dissémination des gènes de résistances aux glycopeptides. Dans ce travail, nous décrivons pour la première fois une fréquence élevée de gènes de résistance aux glycopeptides dans des spécimens fécaux humains et caractérisons deux nouvelles espèces bactériennes du tube digestif humain, résistantes aux glycopeptides, ainsi que les éléments génétiques porteurs de cette résistance.

Dans le premier chapitre, nous faisons un rappel historique sur les glycopeptides, de leur découverte à la détermination de leur mode d'action sur les bactéries à Gram positif. Puis, le deuxième chapitre décrit la synthèse du peptidoglycane (chez *S. aureus*) composant essentiel de la paroi des bactéries à Gram positif et cible des glycopeptides. Dans le troisième chapitre, nous abordons le problème de la résistance aux glycopeptides en donnant un aperçu des données épidémiologiques ainsi que les mécanismes de résistance développés par les entérocoques. Le quatrième chapitre donne un bref aperçu sur la flore digestive et son potentiel à favoriser les transferts génétiques entre bactéries. Les objectifs de recherche sont énoncés dans le cinquième chapitre. Puis, les chapitres 6 à 10 décrivent les résultats obtenus durant ce travail de recherche dont deux ont fait l'objet de publications scientifiques tandis que les trois autres sont soumis pour publication. Dans un premier volet, nous décrivons la fréquence des gènes de résistance *vanB*, *vanD* et *vanG* dans des spécimens de selles humaines. Dans les volets suivants, nous caractérisons deux nouvelles espèces de bactéries anaérobies à Gram positif résistantes aux glycopeptides, *Clostridium lavalense* sp. nov. CCRI-9842^T et *Ruminococcus gauvreaui* sp. nov. CCRI-16110^T. Puis, nous caractérisons le locus de résistance *vanB* dans la souche *Clostridium lavalense* CCRI-9842^T ainsi que les locus *vanD* et de type *vanG* présents dans la souche *Ruminococcus*

gauvreau CCRI-16110^T. Dans le onzième chapitre, j'ai fait une discussion générale de tous les résultats en mettant pour la première fois en perspective le lien entre la fréquence élevée des gènes *vanB*, *vanD* et *vanG* non associés à la présence d'ERG et la caractérisation de deux nouvelles espèces anaérobies à partir de spécimens fécaux humains qui contenaient ces gènes de résistance aux glycopeptides. Nous avons par conséquent abordé le rôle des bactéries de la flore intestinale, particulièrement des bactéries anaérobies, dans la dissémination de la résistance aux glycopeptides, puis énoncé quelques perspectives de recherche qui découlent de nos travaux. Enfin, une conclusion générale dans le chapitre douze résume brièvement les grandes lignes de ce travail de recherche.

CHAPITRE I. LES GLYCOPEPTIDES

Sommaire du chapitre

Les antibiotiques de la famille des glycopeptides sont des substances naturelles isolées de bactéries environnementales de la famille des actinomycètes (Tableau 1) (28). La vancomycine et la téicoplanine représentent les principaux glycopeptides utilisés en thérapeutique humaine. La vancomycine a été découverte en 1956 tandis que la téicoplanine l'a été en 1975. Ils sont bactéricides par inhibition de la synthèse de la paroi des bactéries à Gram positif. Ces deux glycopeptides ont été approuvés pour leur utilisation en thérapeutique infectieuse dans plusieurs pays. Cependant, au Canada et aux États-Unis, seule la vancomycine est approuvée pour son usage en médecine humaine. On distingue également d'autres glycopeptides comme la ristocétine utilisée pour le diagnostic de la maladie de von Willebrand, l'avoparcine, l'actaplanine et le composé A35512 qui étaient utilisés comme promoteurs de croissance animale (28). Ce chapitre est surtout consacré à la vancomycine et à la téicoplanine et fait un rappel historique de leur découverte, leur mode d'action sur la paroi des bactéries à Gram positif et leur utilisation en thérapeutique infectieuse.

Tableau 1. Les glycopeptides et leur utilisation Adapté de (28)

Antibiotiques	Organismes producteurs	Utilisations
Vancomycine	<i>Amycolaptosis orientalis</i>	Infections sévères à Gram positif
Téicoplanine	<i>Actinoplanes teichomyceticus</i>	Infections sévères à Gram positif
Ristocétine (ristomycine)	<i>Amycolaptosis orientalis</i> subsp. <i>lurida</i>	Diagnostic de la maladie de von Willebrand
Avoparcine (LL-AV290)	<i>Streptomyces candidus</i>	Anciennement utilisé comme promoteur de croissance à usage vétérinaire
Actaplanine (A-4696)	<i>Actinoplanes missouriensis</i>	Anciennement utilisé comme promoteur de croissance à usage vétérinaire
A35512	<i>Streptomyces candidus</i>	Anciennement utilisé comme promoteur de croissance à usage vétérinaire

1.1 DÉCOUVERTE DES GLYCOPEPTIDES

Les glycopeptides représentent un groupe d'antibiotiques ayant une structure chimique semblable et une activité anti-infectieuse contre les bactéries à Gram positif. Cependant, leur utilisation diffère selon le glycopeptide (Tableau 1). Cette famille d'antibiotiques est subdivisée en quatre groupes selon leur structure chimique (Tableau 2) (51). Parmi ces glycopeptides, on peut citer entre autres, la vancomycine, la téicoplanine, la ristocétine, l'avoparcine et l'actaplanine (28, 50, 51).

Tableau 2. Classification des glycopeptides. Adapté de (50, 51).

Groupe	Antibiotiques	Acide aminé en position 1	Acide aminé en position 3	Sucres
I	Vancomycine , Oritavancine, Chloroorienticine, Orienticine, Décaplanine, Erémomycine, N-désméthylvancomycine, A-82846, UK-72051	Leucine	Asparagine	Glucose, vancosamine, 4-épivancosamine
II	Avoparcine , Actinodine, Chloropolysporine, Galacardine, Helvecardine, Synmonicine	<i>Para</i> -hydroxyphényl-glycine	<i>Para</i> -hydroxyphényl-glycine	Acosamine, actinosamine, ristosamine, mannose, rhamnose
III	Ristocétine , Actaplanine	β -hydroxyphényl-glycine	<i>Méta</i> -hydroxyphényl-glycine	Ristosamine
IV	Téicoplanine , Dalbavancine, Télévancine, Ardacine, Kibdéline, Parvocidine	<i>p</i> -hydroxyphényl-glycines	3,5-dihydroxyphényl-glycine	Glucosamine, mannose

La vancomycine et la téicoplanine sont les deux glycopeptides utilisés pour leur propriété anti-infectieuse en médecine humaine à travers le monde (Tableau 1). Cependant, la vancomycine est le seul glycopeptide utilisé en thérapeutique anti-infectieuse au Canada et aux États-Unis. En dehors de la vancomycine et de la téicoplanine, on peut citer la ristocétine, utilisée pour le diagnostic de la maladie de von Willebrand à cause de ses propriétés d'agrégation plaquettaire, l'avoparcine et l'actaplanine qui étaient utilisés comme promoteur de croissance animale (28). En 1997, l'utilisation de l'avoparcine comme promoteur de croissance animale a été interdite en Europe à cause de la survenue et de la dissémination des souches d'entérocoques résistantes à la vancomycine.

Dans les sections suivantes, nous avons concentré notre propos sur la vancomycine et la téicoplanine à cause de leur importance en thérapeutique anti-infectieuse humaine.

1.1.1 La vancomycine

Au début des années 1950, le traitement des infections causées par *S. aureus* commençait à se compliquer à cause de l'apparition de souches résistantes aux antibiotiques fréquemment utilisés à cette époque. Ainsi, plusieurs souches de *S. aureus* résistantes à la pénicilline par production de pénicillinase avaient été observées chez des patients hospitalisés (130, 131). Face à l'inefficacité des antibiotiques antistaphylococciques contre les souches résistantes, il apparaissait donc urgent de trouver de nouvelles molécules ayant une activité spécifique sur *S. aureus*. L'une des solutions face à ce problème thérapeutique viendra de la compagnie Eli Lilly et Co qui entreprit un vaste programme de recherche sur de nouveaux antibiotiques en s'inspirant du concept d'antibiose très à la mode à cette époque pour la découverte des antibiotiques. Il s'agit d'un concept basé sur l'idée que les microorganismes dans l'environnement produisent des substances antibiotiques favorisant leur survie au cours de la compétition avec les autres espèces microbiennes. Utilisant ce concept d'antibiose, la compagnie Eli Lilly et Co commença à prélever et analyser des échantillons de sol provenant des quatre coins du monde et à cribler ces échantillons à la recherche de microorganismes produisant des antibiotiques actifs contre *S. aureus* (130, 131). C'est dans ce cadre que le Dr E. C. Kornfeld, chimiste dans la compagnie Eli Lilly, reçut un échantillon de boue provenant de la jungle de Bornéo (130, 131). Il y isola un nouveau

microorganisme qui sera nommé par la suite *Amycolaptosis orientalis* (encore connu sous le nom de *Nocardia orientalis* et *Streptomyces orientalis*). Les filtrats des bouillons de culture de *Amycolaptosis orientalis* se sont montrés hautement bactéricides contre les souches de *S. aureus* testées (130, 131). Le composé actif extrait du filtrat de ces bouillons a été désigné composé 05865 (130, 131). Ce composé 05865 encore appelé la «boue du Mississippi» à cause de son apparence initiale, prit ensuite le nom de vancomycine qui est un nom dérivé du terme américain *vanquish* (qui veut dire «vaincre quelque chose») (130). La production à grande échelle de la vancomycine et sa purification a alors débuté.

1.1.2 La téicoplanine

Comme la vancomycine, la téicoplanine a été caractérisée en 1977 à partir d'une souche tellurique *Actinoplanes teichomyceticus* ATCC 31121 isolée d'échantillons de sol provenant du village Nimodi en Inde (27, 204). Deux composés de téichomycine ayant des propriétés antibiotiques ont été extraits d'*A. teichomyceticus* (27). Il s'agit du composé A1 qui est plus proche de la famille des phosphoglycolipides comme la moénomycine et du composé A2 qui se rattache à la famille des glycopeptides comme la vancomycine (27). La téicoplanine est dérivée du composé A2 et fera l'objet de notre propos dans les sections suivantes.

1.2 PROPRIÉTÉS ET STRUCTURES CHIMIQUES DES GLYCOPEPTIDES

Les glycopeptides possèdent des structures chimiques semblables. Ils possèdent en général un noyau central de sept acides aminés (28, 50, 51). Ce noyau peptidique est responsable de la rigidité des molécules de glycopeptides et leur confère une structure tridimensionnelle en forme de poche dans laquelle s'effectue la liaison au dipeptide terminal D-alanyl-D-alanine (D-Ala-D-Ala) des précurseurs du peptidoglycane (28, 50, 51, 178). Sur ces peptides viennent se greffer des sucres responsables des propriétés pharmacocinétiques des glycopeptides tels que le D-glucose et la L-vancosamine pour la vancomycine (Figure 1)

ainsi que le D-mannose et la D-glucosamine dans le cas de la téicoplanine (Figure 2) (28, 50, 51, 178).

1.2.1 La vancomycine

Plusieurs années se sont écoulées après la découverte de la vancomycine avant que sa structure chimique n'ait pu être caractérisée par des études de diffraction aux rayons X en 1978 (28, 160). Cette structure a été élucidée grâce à plusieurs travaux dont ceux-ci sont résumés par Barna *et al.* (28). La structure de base de la vancomycine est formée d'un noyau central peptidique de sept acides aminés qui sont le N-méthyl-D-leucine, β -hydroxy-m-chlorotyrosine, acide β -aspartique, p-hydroxyphényl-glycocolle, p-hydroxyphényl-glycocolle, β -hydroxy-m-chlorotyrosine et di-m-hydroxyphényl-glycocolle (Figure 1) (28, 50, 51, 160, 178, 191, 270). Les acides aminés 1 et 3 qui servent à différencier la vancomycine des autres glycopeptides sont respectivement la leucine et l'asparagine. La vancomycine est une grosse molécule complexe de 1450 Da, dont la formule chimique est $C_{66}H_{75}Cl_2N_9O_{24}$. Les résidus phénols permettent la formation d'une structure tricyclique. L'unité disaccharide composé du D-glucose et de la L-vancosamine est branchée sur le groupe phénol de l'acide aminé 4 (Figure 1).

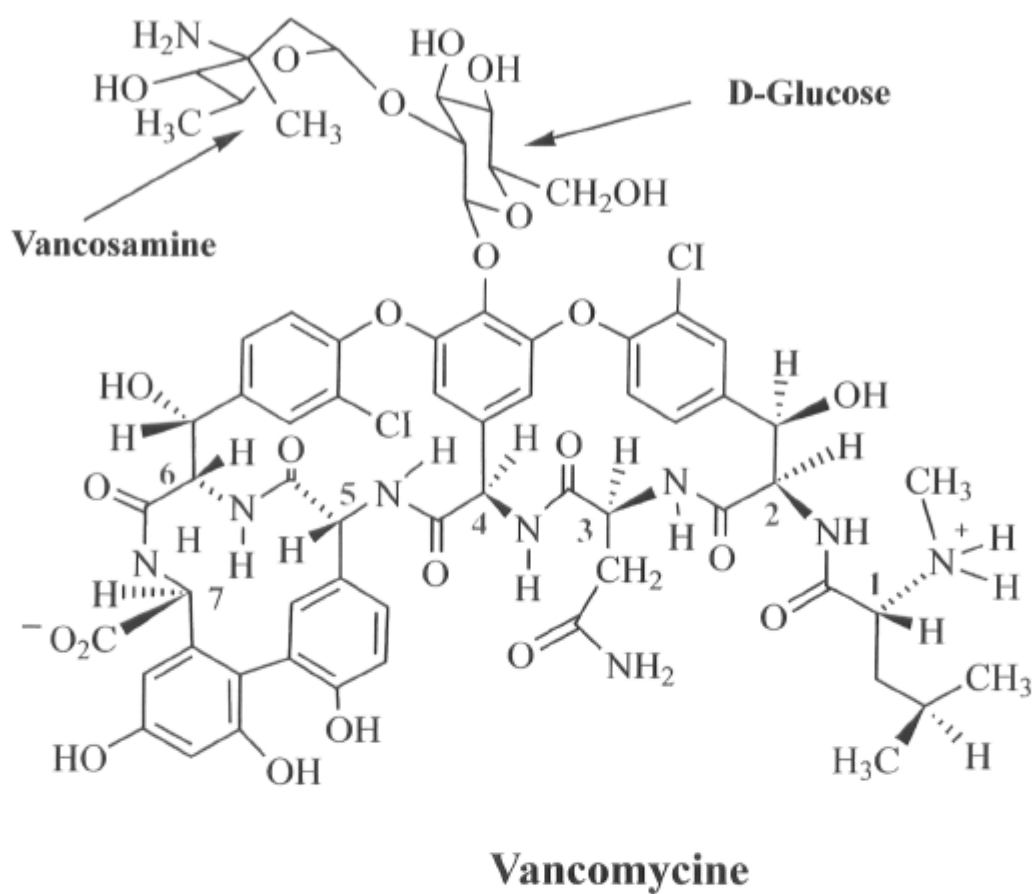


Figure 1. Structure chimique de la molécule de vancomycine. Adaptée de (178)

1.2.2 La téicoplanine

La téicoplanine commercialisée est formée d'un mélange de cinq composants du groupe A2 (T-A2-1, 2, 3, 4 et 5) comportant chacun trois résidus osidiques (acyl- β -D-glucosamine, acétyl- α -D-glucosamine et D-mannose) et d'un composant T-A3-1 dérivé du composé A2 comportant seulement deux résidus osidiques (N-acétyl-D-glucosamine et D-mannose) (Figure 2) (50, 51, 173, 178). La formule chimique de la téicoplanine est $C_{89}H_{108}N_9O_{35}Cl_2$ (50, 51, 173). La téicoplanine est également une grosse molécule ayant un poids moléculaire de 1933 Da (50, 51, 173, 178). Les acides aminés 1 et 3 sont deux hydroxyphényl-glycines pour la téicoplanine (Figure 2). Les résidus phénols permettent la formation d'une structure tétracyclique de la téicoplanine (160).

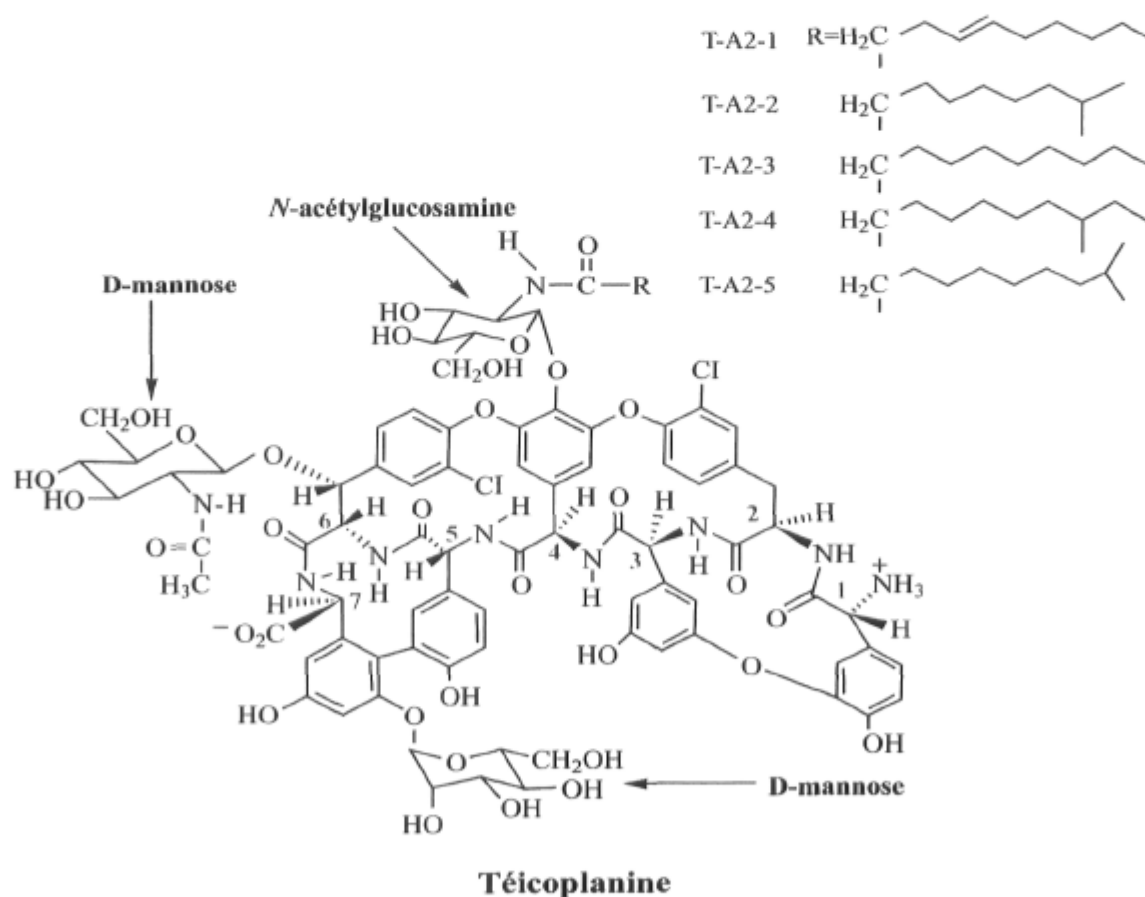


Figure 2. Structure chimique de la téicoplanine. Adaptée de (178)

1.3 PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES DES GLYCOPEPTIDES

La sensibilité ou la résistance aux glycopeptides est définie par l'interprétation des valeurs de CMI obtenues suivant les méthodes standards de mesure. Plusieurs institutions nationales ont publié des valeurs de CMI variant d'un pays à l'autre, pour lesquelles un microorganisme est considéré comme sensible, de sensibilité intermédiaire ou résistant aux glycopeptides

1. 3. 1 Pharmacocinétique et pharmacodynamie des glycopeptides

La meilleure voie d'administration de la vancomycine est la voie intraveineuse (51). Son administration en perfusion intraveineuse lente après dilution dans une solution glucosée ou saline isotonique est recommandée. Cette administration lente permet d'éviter une réaction anaphylactique contrairement à une injection en bolus. La dose thérapeutique recommandée chez l'adulte ayant une fonction rénale normale est de 30 mg/kg de poids corporel par jour. Ce qui correspond à une posologie de 1 g de vancomycine en perfusion intraveineuse pendant 2 heures, deux fois par 24 heures (51). Une telle administration discontinue donne une pharmacocinétique en dent de scie avec des valeurs résiduelles de 5 à 10 µg/ml et des pics sériques à 30-40 µg/ml (234).

L'administration intramusculaire de vancomycine est abandonnée chez l'homme car elle est responsable de douleurs et de nécroses (51).

Du fait de la mauvaise absorption digestive de vancomycine, la voie d'administration orale est réservée pour le traitement des colites pseudomembraneuses à *C. difficile* et pour la décontamination digestive chez les patients des services d'hématologie-oncologie (51).

Les voies d'administration de la téicoplanine sont similaires à ceux de la vancomycine. La voie intraveineuse peut être utilisée en bolus de 1 à 5 minutes de durée ou en courtes perfusions de 30 minutes. La dose thérapeutique recommandée en cas d'infections sévères est une injection intraveineuse de 6 mg/kg de téicoplanine toutes les 12 heures pendant 1 à 5 jours. Ce mode d'administration permet d'obtenir des concentrations sériques résiduelles de 10 à 20 µg/ml (51).

Comme pour la vancomycine, l'administration orale de téicoplanine est destinée au traitement des infections à *C. difficile*. La téicoplanine peut également être administrée par voie intra-musculaire avec une tolérance locale satisfaisante et une biodisponibilité de 90 %. Cette voie d'administration est appropriée pour traiter les infections chez les patients qui ont des veines collabées comme cela s'observe chez les utilisateurs de drogues intraveineuses, les patients avec une infection osseuse chronique et dans les cas d'altérations de l'état général (51).

La vancomycine atteint une concentration sérique d'environ 30 µg/ml à la fin d'une heure d'administration intraveineuse de 500 mg. Une administration intraveineuse de 1 g de vancomycine en 1 heure aboutit à une concentration sérique d'environ 50 à 70 µg/ml. Lorsque l'administration intraveineuse de 1 g de vancomycine s'étend sur 2 heures, la concentration sérique atteint environ 40 µg/ml (51). La concentration résiduelle sérique est le paramètre le mieux corrélé à une efficacité thérapeutique (51). Ainsi, une concentration résiduelle comprise 10 et 20 µg/ml a une efficacité thérapeutique satisfaisante selon la sévérité de l'état infectieux (51, 288). Toutefois, il est important que l'administration intraveineuse soit lente et continue à raison de 30 mg/kg/24 heures pour aboutir à une concentration sérique de 20 µg/ml (51). Selon certaines conditions cliniques comme l'âge, l'état des fonctions rénales et certains états pathologiques, il existe de grandes variations dans la cinétique de la vancomycine. Ces variations nécessitent donc une adaptation des posologies pour chaque situation clinique (51). La pharmacocinétique de la vancomycine a été décrite sur la base d'un modèle mathématique à deux ou à trois compartiments. Son volume de distribution apparent est compris entre 0,4 et 0,9 litre/ kg. Sa demie-vie sérique est de 6 à 8 heures. La vancomycine est une molécule qui se lie préférentiellement à l'albumine (51). En effet, pour une concentration sérique de vancomycine comprise entre 10 et 100 µg/ml, environ 30 à 60 % sont liés à l'albumine (51). La diffusion tissulaire de vancomycine dans la plèvre, les liquides d'ascite, péricardique et synovial est relativement bonne (51). Les concentrations tissulaires obtenues sont en moyenne entre 40 à 70 % de la concentration sérique (51). Son élimination se fait essentiellement par filtration glomérulaire dans sa forme active non métabolisée et environ 80-90 % de la dose

administrée sont retrouvés dans la diurèse des 24 heures. L'élimination hépatobiliaire est très faible

Sur le plan pharmacodynamique, la vancomycine est un antibiotique bactéricide temps-dépendant. Ce qui veut dire que son activité est liée au temps pendant lequel sa concentration sérique est supérieure à sa CMI. Ce temps est directement proportionnel à sa demie-vie sérique et la concentration sérique efficace de vancomycine est évaluée à quatre fois la CMI (51).

1.3.2 Activité antibactérienne des glycopeptides

En général, le spectre antibactérien des glycopeptides couvre les bactéries à Gram positif aérobie et anaérobie. Les glycopeptides sont lentement bactéricides sur les bactéries à Gram positif tels que les espèces du genre staphylocoque à savoir les souches de *S. aureus* y compris celles résistantes à la méticilline (SARM) et *S. epidermidis*, les espèces du genre streptocoque telles que *S. pyogenes*, *S. agalactiae* (groupe B), *S. pneumoniae* et les streptocoques du groupe viridans. L'activité des glycopeptides s'exerce également sur les espèces du genre entérocoque dont les plus fréquentes sont *E. faecalis* et *E. faecium*, les espèces du genre corynébactérie telles que *Corynebacterium diphtheriae*, *C. jeikeium*, les espèces du genre *Listeria* et *Bacillus*, les bactéries à Gram positif anaérobies y compris les espèces du genre *Clostridium* (50, 51, 121, 178).

L'activité antibactérienne *in vitro* des glycopeptides est déterminée selon l'interprétation des valeurs de CMI obtenues suivant les méthodes standards de mesure. Plusieurs institutions nationales telles que le BSAC en Angleterre, le CLSI aux États-Unis, la SFM en France et le SRGA en Suède publient des valeurs de CMI concernant l'activité de plusieurs antibiotiques dont les glycopeptides. Ainsi, une souche d'entérocoque est considérée comme sensible à la vancomycine et à la téicoplanine lorsqu'on obtient une valeur de CMI ≤ 4 $\mu\text{g/ml}$ et 8 $\mu\text{g/ml}$, respectivement. Elle présentera une résistance intermédiaire pour une valeur comprise entre 8-16 $\mu\text{g/ml}$ et une résistance pour une valeur de CMI ≥ 32 $\mu\text{g/ml}$.

Les tableaux 3 et 4 résument l'activité bactérienne *in vitro* de la vancomycine et de la téicoplanine sur certaines bactéries à Gram positif et à Gram négatif (50, 51, 70-72). Du fait de leur grand poids moléculaire, les glycopeptides ne sont pas actifs contre les bactéries à Gram négatif aérobies et anaérobies, car ils ne peuvent emprunter les porines de la membrane externe de ces bactéries (270).

Tableau 3. Activité *in vitro* de la vancomycine et de la téicoplanine. Adapté de (50)

Antibiotiques	CMI µg/ml					
	SASM	<i>S. epidermidis</i> ATCC 1228	<i>S. pyogenes</i> C203	<i>E. faecalis</i> ATCC 7080	<i>C. perfringens</i> ISS 30543	<i>N. gonorrhoeae</i> ISM 681126
Vancomycine	0,25	0,5	0,18	0,5	0,13	32
Téicoplanine	0,13	0,13	0,06	0,13	0,003	32

1.4 TOXICITÉ ET EFFETS SECONDAIRES DES GLYCOPEPTIDES

L'amélioration des procédés de purification de la vancomycine ainsi que son mode d'administration en perfusion lente ont permis d'améliorer sa tolérance. L'effet secondaire le plus important est le syndrome de l'homme rouge communément appelé en anglais «Red Man Syndrom» due à une libération excessive d'histamine après administration accélérée de vancomycine. Cette libération d'histamine est due à une activation directe des mastocytes et des basophiles. Lors de l'administration intraveineuse de 1 g de vancomycine pendant 1 heure, cette réaction anaphylactique s'observe dans 20% des cas chez les patients infectés et environ 80% chez les volontaires sains (51). Il s'agit d'une réaction qui se manifeste par un prurit et une éruption érythémateuse du visage, du cou et du thorax (51). Dans les formes cliniques sévères, ce syndrome peut s'accompagner d'un angioedème, de troubles digestifs et d'un collapsus. Ces manifestations cliniques seraient dues à une grande vitesse d'administration du produit.

Comme effets secondaires des glycopeptides, on peut citer une neurotoxicité parfois irréversible du nerf auditif (8 ième paire crânienne) responsable d'acouphènes, d'hypoacusies et de surdité. Avec l'amélioration des préparations pharmacologiques, la néphrotoxicité due aux glycopeptides est devenu peu fréquente. Cependant, certaines

conditions cliniques comme les états septicémiques, hypovolémiques, les troubles hémodynamiques, l'âge avancé, ainsi qu'une concentration résiduelle sérique excessive ($> 30 \mu\text{g/ml}$) peuvent potentialiser la néphrotoxicité des glycopeptides. Dans ces cas, il s'agit d'une néphrite tubulaire réversible (51). On observe également une potentialisation de la toxicité rénale des aminoglycosides, de l'amphotéricine B et de la cyclosporine lorsque ces antibiotiques sont utilisés en association avec un glycopeptide (51). Les réactions d'hypersensibilité comme la fièvre médicamenteuse, les réactions cutanées allergiques (macule, papule, rash), l'hyperéosinophilie et la neutropénie sont rares (121). Les thrombophlébites dues à l'action caustique des glycopeptides durant les injections locales deviennent également rares à cause de l'amélioration des préparations pharmacologiques, d'une meilleure dilution du produit avant l'emploi et de l'absence d'association avec plusieurs produits incompatibles(51).

Tableau 4. Activité *in vitro* de la vancomycine et de la téicoplanine Adapté de (51)

Microorganismes	CMI ($\mu\text{g/ml}$) ^a				
	n	Téicoplanine		Vancomycine	
		50%	90%	50%	90%
SASM	31	0,5	2	1	2
SARM	50	2	2	1	2
SESM	28	0,5	2	1	2
SERM	46	2	64	2	2
<i>S. pneumoniae</i> Pen ^S	19	$\leq 0,01$	$\leq 0,01$	0,25	0,25
<i>S. pneumoniae</i> pen ^I	27	$\leq 0,01$	$\leq 0,01$	0,25	0,25
<i>S. pneumoniae</i> Pen ^R	45	$\leq 0,01$	$\leq 0,01$	0,25	0,5
<i>S. pyogenes</i>	34	$\leq 0,01$	0,25	0,25	0,25
<i>S. agalactiae</i>	18	$\leq 0,01$	0,12	0,5	1
Streptocoque du groupe C, F et G	104	0,06	0,125	0,5	1
<i>Streptococcus anginosus</i>	7	0,06		1	
<i>Streptococcus bovis</i>	13	0,12	0,12	0,5	0,5
<i>Streptococcus mitis</i>	27	0,06	0,6	0,75	1,5
<i>Streptococcus oralis</i>	6	0,06		1	
<i>Streptococcus salivarius</i>	4	0,03		1	
<i>Streptococcus sanguinis</i>	16	0,03		1	
<i>Listeria</i> spp.	35	0,25	0,5	1	1
<i>Rhodococcus equi</i>	16	0,25	0,25	0,5	8
<i>E. rhusiopathiae</i>	6	16		2	
<i>C. urealyticum</i>	27	0,25	0,5	0,5	0,5
<i>C. jeikeium</i>	34	1	1	0,5	0,5
<i>C. striatum</i>	25	0,25	0,25	0,25	0,25
<i>Arcanobacterium haemolyticus</i>	25	0,06	1	1	2
<i>E. faecalis</i>	27	0,25	0,5	0,5	2
<i>E. faecium</i>	51	$\leq 0,25$	0,5	2	2
<i>E. casseliflavus</i>	67	$\leq 0,25$	0,5	2	2
<i>E. gallinarum</i>	29		32		8
<i>S. haemolyticus</i>	11		1		1
<i>Staphylococcus simulans</i>	8	4		2	
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	21		4		2
Autres SCN ^b	12	32		8	
<i>C. difficile</i>	18	0,5	0,5	1	1
<i>C. perfringens</i>	11	$\leq 0,06$	0,125	0,5	0,5
<i>Pasteurella multocida</i>	30	> 32	> 32	> 32	> 32
<i>Actinobacillus</i> spp.	4	4		8	
<i>M. catarrhalis</i>	11	8	8	4	32
<i>Neisseria</i> spp.	10	8	16	4	32
<i>Eikenella corrodens</i>	20	32	32	32	32
<i>Bacteroides</i> spp.	17	64	128	64	128
<i>Fusobacterium</i> spp.	15	> 256	> 256	> 256	> 256
<i>Peptostreptococcus</i> spp.	13	0,125	0,25	0,5	1
<i>Porphyromonas</i> spp.	10	≤ 1	2	2	4
<i>Prevotella</i> spp.	12	0,5	4	> 16	> 16

^a50% et 90%, CMI pour laquelle 50 et 90 % des souches testées sont inhibées

^b*S. cohnii* (n = 6), *S. hominis* (n = 5), *S. xylosus* (n=4), *S. capitis* (n=12), *S. sciuri* (n=2) et *S. warneri* (n=2)

CHAPITRE II. SYNTHÈSE DU PEPTIDOGLYCANE ET MODE D'ACTION DES GLYCOPEPTIDES

Sommaire du chapitre

*Le peptidoglycane est un constituant essentiel de la paroi bactérienne. Étant donné que les glycopeptides sont des inhibiteurs de la synthèse du peptidoglycane, il est donc important de connaître les différentes étapes de sa formation. Les voies métaboliques de synthèse du peptidoglycane chez les bactéries à Gram positif sont à quelques différences près semblables à celles de *S. aureus* (193). Pour illustrer la synthèse du peptidoglycane, nous avons pris comme exemple descriptif le déroulement de la synthèse du peptidoglycane chez *S. aureus*. La synthèse du peptidoglycane chez les bactéries à Gram positif est un processus complexe qui se déroule dans trois compartiments respectifs. Elle débute dans le compartiment cytoplasmique, puis se poursuit à travers la membrane cytoplasmique et s'achève enfin à l'extérieur de la cellule dans le compartiment périplasmique (193). Cette synthèse aboutit à la formation de précurseurs qui vont polymériser à la surface de la cellule et former la grande majorité des constituants de la paroi bactérienne. Nous décrivons ensuite le mode d'action des glycopeptides au niveau des précurseurs du peptidoglycane.*

2.1 ÉTAPE CYTOPLASMIQUE DE LA SYNTHÈSE DU PEPTIDOGLYCANE

Dans le cytoplasme, le premier précurseur de la voie métabolique de synthèse du peptidoglycane est l'uracil diphosphate-N-acétylglucosamine (UDP-GlcNac). À partir de l'UDP-GlcNac se produit la synthèse de l'UDP-N-acétylmuramyl (UDP-MurNac), puis de l'UDP-MurNac pentapeptide par additions successives de L-alanine (L-Ala), d'acide D-isoglutamique (D-isoGlu), de L-lysine (L-Lys) et du dipeptide terminal D-alanyl-D-alanine (D-Ala-D-Ala) (Figure 3) (193). La synthèse du dipeptide terminal D-Ala-D-Ala nécessite successivement l'action de la D-alanine racémase qui convertit la L-alanine en D-alanine, puis de la D-Ala-DAIa ligase (encore appelée Ddl chromosomique) qui crée un pont

peptidique entre deux résidus D-Ala (193, 270). Enfin l'enzyme MurF catalyse l'addition du dipeptide D-Ala-D-Ala au disaccharide tripeptide en présence d'ions Mg^{++} et d'ATP. Ainsi, à la fin de l'étape cytoplasmique de la synthèse du peptidoglycane, on obtient la formation des précurseurs constitués d'UDP-MurNac-L-Ala-D-isoGlu-L-Lys-D-Ala-D-Ala (encore appelé UDP-MurNac-pentapeptide, ou nucléotide de Park) (Figure 3) (193).

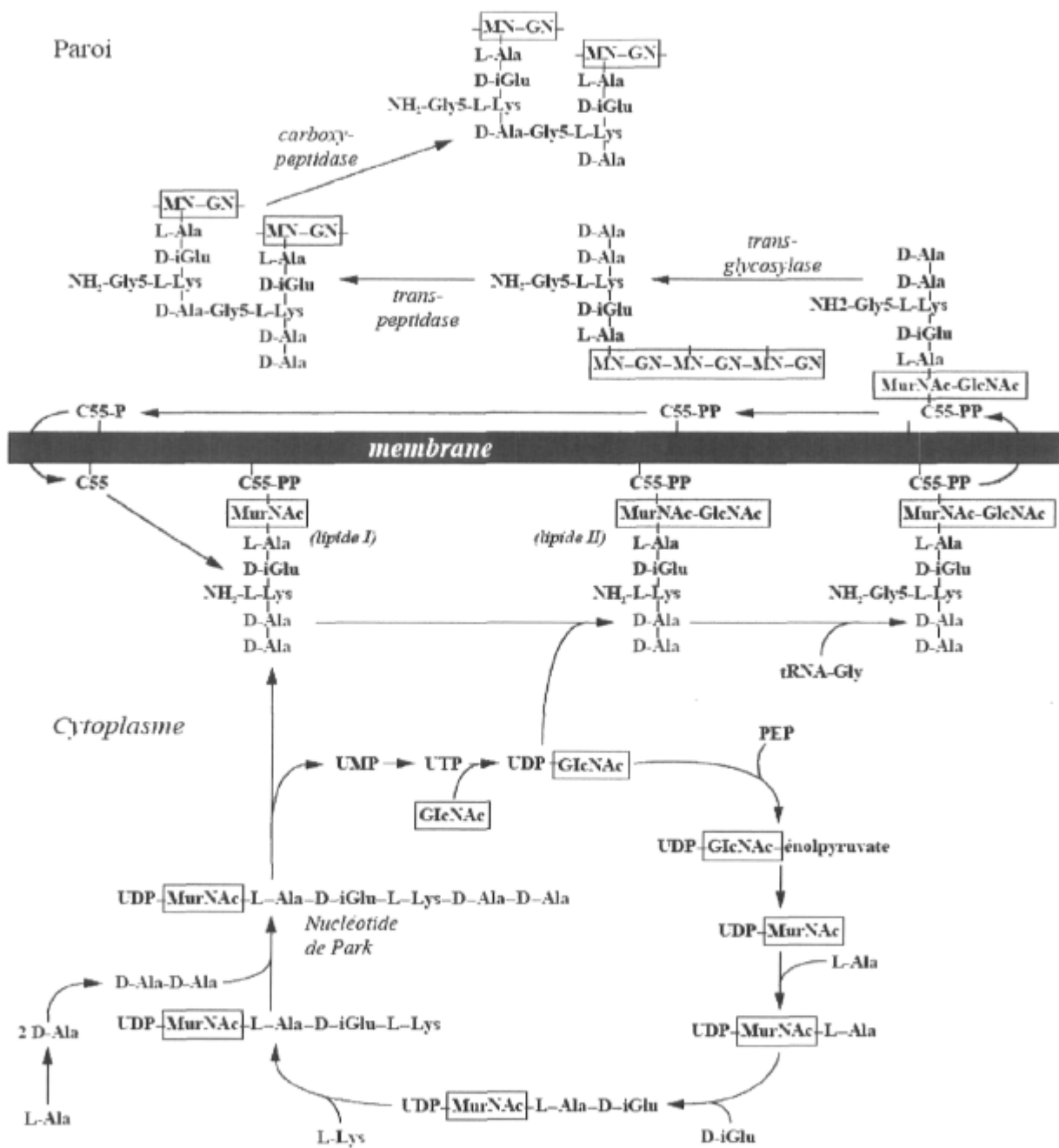


Figure 3. Synthèse du peptidoglycane chez *S. aureus*. Adaptée de (270)

2.2 ÉTAPE MEMBRANAIRE DE LA SYNTHÈSE DU PEPTIDOGLYCANE

Durant l'étape membranaire, l'UDP-MurNac-pentapeptide est transféré à son transporteur membranaire l'undécaprenyl-pyrophosphate (C55) avec formation d'une liaison phosphodiester et libération de l'UMP. Cette réaction conduit à la formation de l'undécaprenyl pyrophosphate-MurNac-L-Ala-D-isoGlu-L-Lys-D-Ala-D-Ala ou lipide I (C55-PP-MurNac-L-Ala-D-isoGlu-L-Lys-D-Ala-D-Ala). Puis, l'étape membranaire se poursuit avec la formation du lipide II qui résulte de l'addition d'un UDP-GlcNac d'origine cytoplasmique au lipide I. Le lipide II, encore appelé disaccharide-pentapeptide ou encore C55-PP-MurNac(-L-Ala-D-isoGlu-L-Lys-D-Ala-D-Ala)- β 1-4-GlcNac, sera ensuite modifié par addition de cinq résidus de glycine sur la L-Lys pour former les unités élémentaires du peptidoglycane [C55-PP-MurNac(-L-Ala-D-isoGlu-L-Lys(Gly₅)-D-Ala-D-Ala)- β 1-4-GlcNac]. Ce sont ces unités élémentaires (ou lipide II modifié) qui seront transloquées à l'extérieur de la cellule et serviront de substrats aux réactions de polymérisation du peptidoglycane (Figure 3) (193).

2.3 ÉTAPE PÉRIPLASMIQUE DE LA SYNTHÈSE DU PEPTIDOGLYCANE

À la surface du peptidoglycane, l'assemblage et la polymérisation des unités élémentaires du peptidoglycane [C55-PP-MurNac(-L-Ala-D-isoGlu-L-Lys(Gly₅)-D-Ala-D-Ala)- β 1-4-GlcNac] s'effectuent au cours des réactions de transglycosylation et de transpeptidation. La transglycosylation catalysée par les transglycosylases conduit à la formation de chaînes glycaniques par additions successives de MurNac(-L-Ala-D-isoGlu-L-Lys(Gly₅)-D-Ala-D-Ala)- β 1-4-GlcNac au C55-PP-MurNac(-L-Ala-D-isoGlu-L-Lys(Gly₅)-D-Ala-D-Ala)- β 1-4-GlcNac. On obtient ainsi une polymérisation des unités disaccharidiques MurNac-GlcNac-MurNac-GlcNac. Ces chaînes glycaniques nouvellement synthétisées seront par la suite incorporées au peptidoglycane préexistant par les transpeptidases. La transpeptidation entraîne successivement l'élimination du dernier D-Ala en position C-terminale du pentapeptide de l'unité élémentaire du peptidoglycane et la formation d'une liaison amide entre l'avant-dernier D-Ala (position 4 du pentapeptide) et le dernier résidu glycine du pont

pentaglycine (Figure 4) (193). Les réactions de transglycosylation et de transpeptidation sont catalysées par des enzymes appelées PLP ou protéines liant la pénicilline.

Ainsi, l'enchaînement des réactions de transglycosylation et de transpeptidation par les PLP va assurer le degré de réticulation du peptidoglycane et permettre à la bactérie de croître et de résister à la pression osmotique.

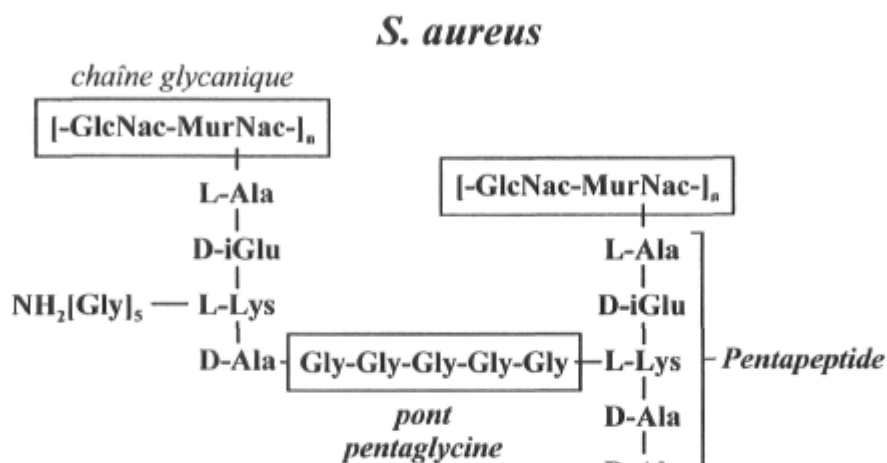


Figure 4. Réaction de transpeptidation durant la synthèse du peptidoglycane.
Adaptée de (270)

2.4 MÉCANISME D'ACTION DES GLYCOPEPTIDES

Les glycopeptides sont des inhibiteurs de la synthèse du peptidoglycane. Leur activité s'exerce sur des cellules en division et se déroule à l'extérieur de la membrane cytoplasmique. Ainsi, ils agissent à la dernière étape de formation du peptidoglycane en formant des liaisons hydrogènes avec l'extrémité peptidyl-D-alanyl-D-alanine terminal (D-Ala-D-Ala) du disaccharide pentapeptide lorsque celui-ci émerge de la membrane cytoplasmique (Figures 5 et 6) (28, 191, 218, 225).

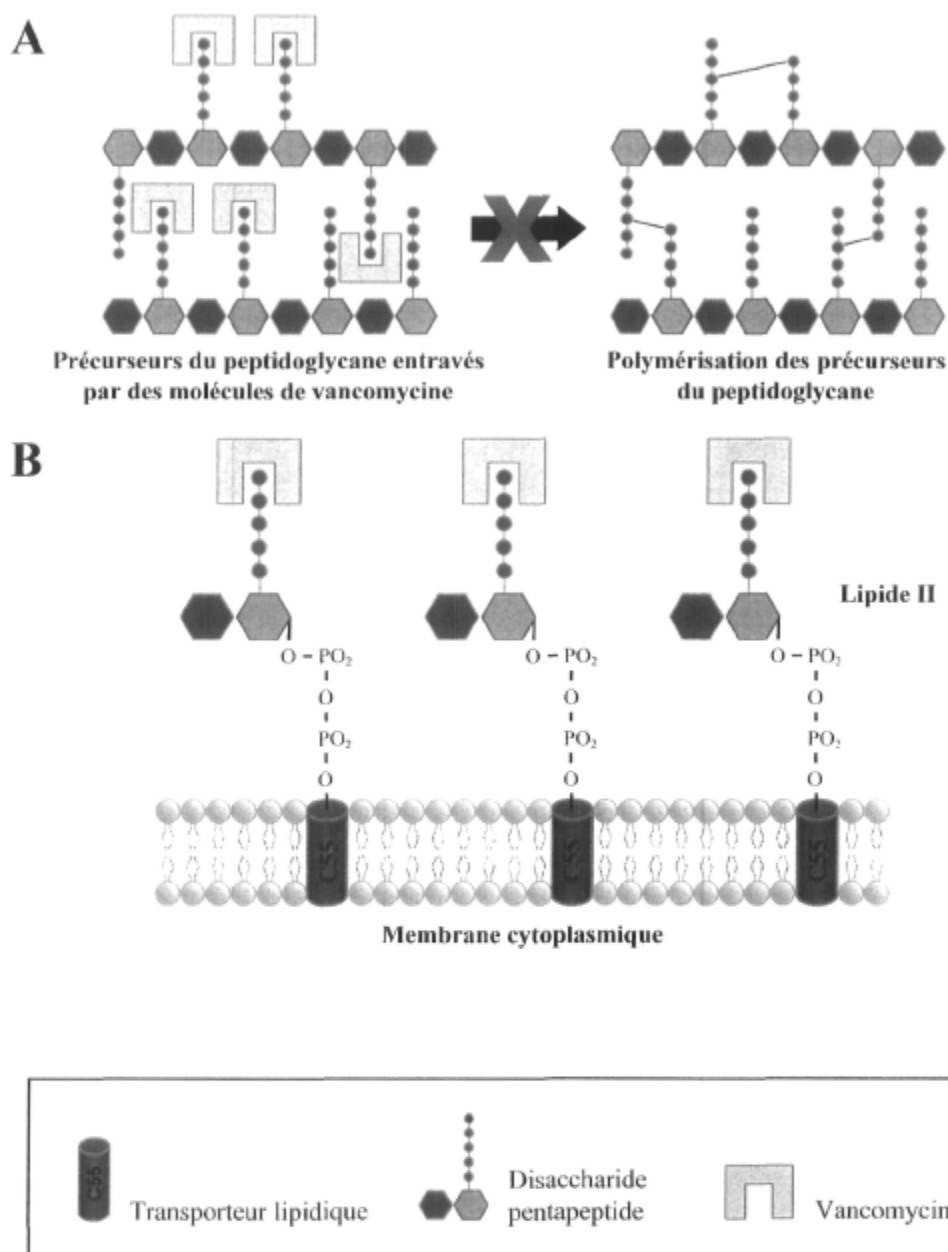


Figure 5. Mode d'action des glycopeptides. Adaptée de (270). (A) Extrémités D-Ala-D-Ala liées aux molécules de glycopeptides; (B) le lipide II entravé par les glycopeptides avant sa polymérisation au sein du peptidoglycane.

En raison de la grande taille des glycopeptides, leur liaison au D-Ala-D-Ala terminal va d'une part bloquer le positionnement des transglycosylases et d'autre part masquer le site N-acyl-D-Ala-D-Ala qui représente le site de liaison des transpeptidases (28, 191, 218, 225). Ainsi, les glycopeptides n'inhibent pas directement les transglycosylases et les transpeptidases, mais empêchent leur action par une séquestration de leur substrat, en l'occurrence le disaccharide pentapeptide ayant une extrémité D-Ala-D-Ala (Figures 3 et 4) (28, 191, 225). Le complexe vancomycine-précurseur du peptidoglycane a été caractérisé par résonance magnétique nucléaire et par diffraction aux rayons X et implique la reconnaissance par la molécule de vancomycine des extrémités D-Ala-D-Ala libres puis sa fixation par l'intermédiaire de 5 liaisons hydrogène (Figure 6) (28, 178, 191, 218, 271). Ce blocage stérique s'exerce sur deux types de précurseurs du peptidoglycane: le lipide II présent dans l'espace périplasmique à la surface de la cellule et les précurseurs ayant des extrémités D-Ala-D-Ala libres (Figure 3).

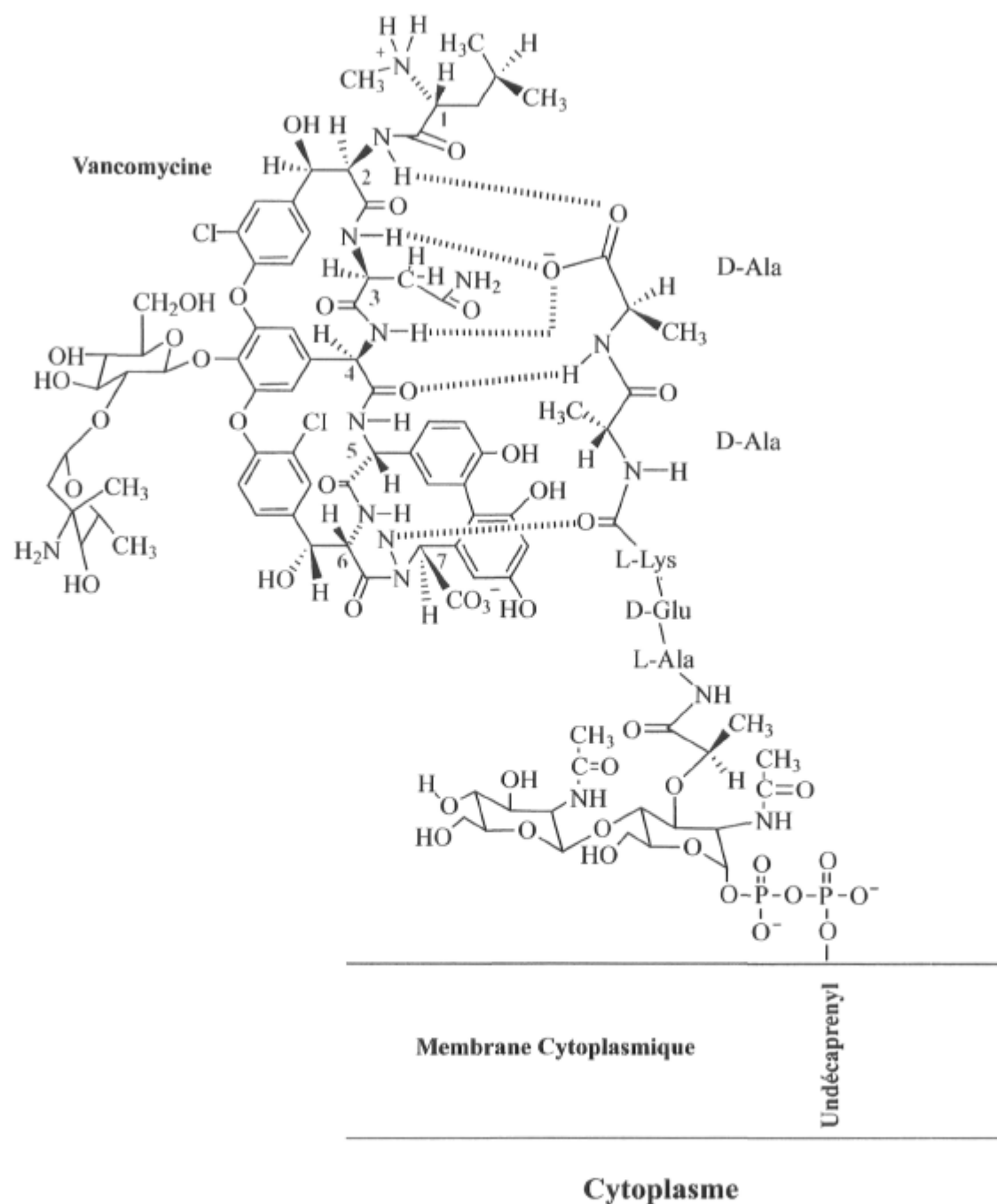


Figure 6. Liaison de la vancomycine au dipeptide D-Ala-D-Ala des précurseurs du peptidoglycane. Adaptée de (178)

CHAPITRE III. RÉSISTANCE AUX GLYCOPEPTIDES

Sommaire du chapitre

*La résistance aux glycopeptides s'est cliniquement manifestée pour la première fois dans des souches d'entérocoques en Europe et aux États-Unis dans les années 1986-1987. La résistance des bactéries à la vancomycine résulte soit d'une résistance naturelle, soit d'une résistance acquise. La résistance naturelle ou intrinsèque est un caractère présent chez les espèces productrices de glycopeptides, chez des espèces comme les lactobacilles, *Leuconostoc*, *Erysipelothrix* et chez *Enterococcus casseliflavus*, *E. flavescens* et *E. gallinarum*. Cette résistance intrinsèque a pour support génétique le chromosome bactérien et résulte de la synthèse par une ligase chromosomique de précurseurs ayant une extrémité D-Ala-D-Lac ou D-Ala-D-Ser. Par contre, la résistance acquise chez les entérocoques résulte d'une modification du patrimoine génétique par acquisition d'un des opérons de résistance *vanA*, *vanB*, *vanD*, *vanE* et *vanG*. Elle se traduit sur le plan biochimique par la synthèse des précurseurs du peptidoglycane ayant soit une extrémité D-Ala-D-Lac soit une extrémité D-Ala-D-Ser. La résistance acquise chez *S. aureus* résulte soit de l'acquisition de l'opéron *vanA* suivi de la synthèse des précurseurs du peptidoglycane ayant une extrémité D-Ala-D-Lac, soit d'un mécanisme génétique encore mal élucidé qui entraîne un épaississement de la paroi et un piégeage des molécules de glycopeptides dans cette paroi. Ce chapitre décrit l'épidémiologie de la résistance à travers le monde, les mécanismes génétiques et biochimiques de la résistance naturelle et de la résistance acquise aux glycopeptides chez les bactéries à Gram positif.*

3.1 DÉFINITION DE LA RÉSISTANCE À LA VANCOMYCINE

Sur le plan génotypique, la résistance acquise à la vancomycine est définie par la détection d'un des gènes de résistance *vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanD*, *vanE* et *vanG* (78). La présence d'un de ces gènes est associée à un phénotype de résistance aux glycopeptides (78). Du fait de

l'importance épidémiologique de la résistance aux glycopeptides chez les souches d'entérocoques et de staphylocoques, il existe pour ces deux espèces des valeurs de CMI des glycopeptides standardisés. Ainsi, selon le Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), une souche d'entérocoque est considérée comme sensible à la vancomycine et à la téicoplanine si les valeurs de la CMI sont respectivement inférieures à 4 et à 8 µg/ml, tandis que la résistance sera dite intermédiaire lorsque la CMI de la vancomycine est comprise entre 8 et 16 µg/ml et celle de la téicoplanine est égale à 16 µg/ml (Tableau 5). Enfin, une souche d'entérocoque sera considérée comme résistante aux glycopeptides si les CMI de la vancomycine et de la téicoplanine sont respectivement supérieures à 32 µg/ml (Tableau 5).

En ce qui concerne les souches de staphylocoques, selon le CLSI, une souche présentant une CMI de vancomycine et de téicoplanine \leq à 2 et à 4 µg/ml, respectivement, est considérée comme une souche sensible, tandis qu'une souche possédant une CMI de vancomycine comprise entre 4 et 8 µg/ml et de téicoplanine comprise entre 8 et 16 µg/ml est considérée comme intermédiaire et enfin une souche ayant une CMI de vancomycine \geq 16 µg/ml et de téicoplanine \geq 32 µg/ml est considérée comme une souche résistante (70, 71). Cependant, cette définition ne fait pas l'unanimité dans tous les pays. En effet, cette absence de consensus est due au fait que la valeur seuil de la CMI de la vancomycine et les méthodologies utilisées pour sa mesure chez les souches de staphylocoque sont différentes d'un pays à l'autre (248). Ainsi, le Japon considère qu'une souche de staphylocoque est résistante à la vancomycine à partir de 8 µg/ml (248, 272). Ce qui implique que des souches intermédiaires aux États-Unis sont considérées comme résistantes au Japon (248).

On observe également chez les souches de *S. aureus* et les souches de staphylocoques à coagulase négative (SCN), une hétéro-résistance à la vancomycine. Ce qui signifie qu'au sein d'une population de staphylocoques majoritairement sensible à la vancomycine, il existe une sous-population minoritaire de bactéries qui ont un phénotype de résistance à la vancomycine (272).

Tableau 5. Concentration minimale inhibitrice de la vancomycine et de la téicoplanine sur les souches d'entérocoque et de staphylocoque selon le CLSI. Adapté de (71, 72)

Glycopeptides	Concentration minimale inhibitrice					
	<i>Enterococcus</i> spp.			<i>Staphylococcus</i> spp.		
	Sensible	Intermédiaire	Résistant	Sensible	Intermédiaire	Résistant
Vancomycine	≤ 4	8-16	≥ 32	≤ 2	4-8	≥ 16
Téicoplanine	≤ 8	16	≥ 32	≤ 4	8-16	≥ 32

3.2 ÉPIDÉMIOLOGIE DE LA RÉSISTANCE AUX GLYCOPEPTIDES

3.2.1 Épidémiologie des ERG

Vingt années se sont écoulées depuis la première apparition de la résistance à la vancomycine en Angleterre et en France. En effet, cette résistance est apparue en 1986 chez des souches d'entérocoques (161, 266) et n'a cessé d'augmenter au cours des dernières années (64, 108, 116, 119, 170, 189, 279, 280, 282). L'émergence de cette résistance a coïncidé avec l'augmentation de l'utilisation des glycopeptides pour le traitement des infections à SARM et à SCN et des diarrhées dues à *Clostridium difficile* (81, 144, 154). Plusieurs études ont montré le lien qui existait entre la sélection et la dissémination des ERG et l'usage des glycopeptides en thérapeutique humaine (36, 46, 75, 96, 97, 106, 141, 171, 187). À l'inverse, on a montré que la diminution de l'utilisation des glycopeptides en thérapeutique humaine, entraînait une baisse simultanée de l'incidence des ERG. Le rôle que pourrait jouer la réduction de l'utilisation des glycopeptides dans la sélection et la dissémination des ERG a été démontré lors d'une étude épidémiologique effectuée dans 50 unités de soins intensifs (USI) aux États-Unis (118). Cette étude a montré une baisse statistiquement significative d'ERG de 7.5% dans les USI qui ont réduit leur consommation de vancomycine comparée à une augmentation de 5.7% dans les USI qui n'ont adopté aucune mesure de réduction de cet antibiotique (118). Cependant, il faut remarquer qu'une métaanalyse regroupant plusieurs études n'a pas confirmé que l'utilisation des glycopeptides constitue l'unique facteur d'acquisition et de dissémination des ERG (55, 56, 75). En effet, la durée d'hospitalisation, l'usage de plusieurs antibiotiques tels que les céphalosporines et les fluoroquinolones seraient autant de facteurs de risques impliqués dans la sélection des ERG et leur dissémination interhumaine (75, 122, 141, 260, 261). Les principaux moyens de propagations interhumaines des ERG dans les services hospitaliers sont les mains et les matériels médicaux contaminés (39, 75, 246).

La dissémination de la résistance de type VanA et VanB au sein des entérocoques est facilitée par la localisation des gènes *vanA* et *vanB* sur des éléments génétiques mobiles (279). Cette dissémination survient dans des contextes cliniques où l'usage des

glycopeptides est abondant. Ces situations cliniques sont retrouvées en particulier dans des services d'hémo-oncologie, de transplantation hépatique et rénale et dans des unités de soins intensifs (46, 47, 75, 106, 138, 143, 169, 267, 279). L'organisme américain de contrôle et de prévention des infections (CDC) avait rapporté une augmentation de la prévalence des ERG variant de 0,4 à 7,2% entre 1989 et 1997 (75, 177). Cette augmentation du taux de prévalence dans un intervalle de huit années peut s'expliquer par une combinaison de facteurs de risques d'acquisition des ERG (75, 177). Parmi ces facteurs de risques, on peut mentionner l'association qui existe entre une antibiothérapie par les glycopeptides et le traitement des pathologies graves (36, 39, 75, 152). Il faut également mentionner comme facteur important de dissémination des ERG dans les services hospitaliers, les infections croisées qui surviennent entre les patients hospitalisés (36, 75, 138, 169, 186, 210, 246). Le portage humains des ERG favorise également la dissémination des gènes de résistance aux glycopeptides (111, 187, 274).

La résistance bactérienne aux glycopeptides pose un problème important pour le traitement des patients infectés par les agents pathogènes résistants. Aux États-Unis, elles évoluent depuis lors sur un mode endémo-épidémiques dans les hôpitaux avec une fréquence de souches d'entérocoques résistantes aux glycopeptides (ERG) égale à 28 % en 2003 (59, 198). La prévalence des ERG en Amérique du Nord était estimée à 13% en 1999 (170). La prévalence des ERG au Canada est faible par rapport à celle qui est observée aux États-Unis et a été évaluée à 0,5% en 2000 (74). Les entérocoques font partie de la flore microbienne normale du tube digestif des hommes et des animaux. En pathologie humaine, ce sont des bactéries responsables d'infections nosocomiales importantes. En effet, les entérocoques, principalement *E. faecalis* et *E. faecium*, sont des agents pathogènes opportunistes impliqués dans des infections sévères comme les endocardites, les méningites et les septicémies (189, 205). Les infections à ERG sont responsables d'une morbidité et d'une mortalité élevées puisque ces souches sont souvent résistantes à plusieurs familles d'antibiotiques telles que les glycopeptides, les β -lactamines et les aminosides (129, 189, 205).

Dans plusieurs pays européens, la colonisation des ERG chez les personnes saines évolue sur un mode endémique avec quelques fois l'apparition de pics épidémiques (125). Les épidémies surviennent le plus souvent dans les services de néphrologie, d'hématologie et moins fréquemment dans les USI (125, 127). En Europe, les ERG avaient été également retrouvés dans le tube digestif d'animaux dont l'alimentation avait été complétée avec de l'avoparcine, un glycopeptide qui était utilisé comme promoteur de croissance avant son interdiction en 1997. Par conséquent, les souches d'ERG d'origine animale peuvent être responsables d'une colonisation humaine dont le point de départ se situe au niveau de la chaîne alimentaire (278). Puis, les souches d'entérocoques d'origine animale pourraient transférer les gènes de résistance aux glycopeptides aux souches commensales du tube digestif humain par l'intermédiaire des transposons qui portent ces gènes, comme c'est le cas pour les gènes *vanA* et *vanB* (29, 75, 275). L'utilisation de l'avoparcine comme promoteur de croissance est actuellement interdite en Europe depuis 1997. Suite à cette interdiction, on a observé dans certains pays européens comme l'Allemagne et le Danemark une baisse de l'incidence des ERG (1, 155, 269). Il est cependant important de noter que l'usage de l'avoparcine comme promoteur de croissance animale n'est pas une pratique habituelle aux Etats-Unis qui ont pourtant enregistré les taux de prévalence des infections dues aux ERG les plus élevés par rapport à ceux des pays d'Europe (75, 76, 126).

3.2.2 Épidémiologie des souches VISA et VRSA

En 1996, soit environ dix ans après la survenue des ERG, la première souche de *S. aureus* (Mu 50) ayant une résistance intermédiaire à la vancomycine (SAIV ou VISA en anglais) a été isolée au Japon (147). Cette souche a été isolée chez un patient ayant reçu une antibiothérapie de longue durée à base de vancomycine (147). La CMI de la vancomycine chez les souches VISA est de 8 µg/ml et aucun gène acquis de résistance à la vancomycine n'a été associé à ce type de résistance chez les staphylocoques (98, 257). Les souches VISA sont rares malgré leur détection dans plusieurs pays à travers le monde (98, 235, 257, 272). *S. aureus* est un agent pathogène redoutable responsable d'infections hospitalières et communautaires. Les patients les plus souvent infectés par les souches VISA ont comme caractéristiques communes un état de santé déficitaire tel qu'une insuffisance rénale

chronique, un terrain diabétique et une affection maligne sous-jacente nécessitant un traitement prolongé par la vancomycine (272).

En 2002, les premières souches de *S. aureus* présentant de hauts niveaux de résistance à la aux glycopeptides (SARG, de l'anglais VRSA) ont été décrites aux Etats-Unis (60, 62). Actuellement, sept souches VRSA résistantes à la méticilline ont été rapportées dans les états du Michigan, de Pennsylvanie et de New-York aux Etats-Unis (60-62, 192). Pour l'instant, la présence du gène *vanA* n'est confirmée que pour cinq souches VRSA (192).

3.2.3 Épidémiologie des gènes de résistance aux glycopeptides

Il existe plusieurs gènes de résistance aux glycopeptides qui ont été décrits chez les entérocoques (77, 78). Il s'agit des gènes *vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanD*, *vanE* et *vanG* (77, 78). Les gènes les plus fréquemment retrouvés sont *vanA* et *vanB* et les espèces porteuses les plus fréquemment isolées sont *E. faecalis* et *E. faecium* (9, 64, 108, 116, 161, 170, 189, 196, 245, 266, 279, 280, 282).

Le gène *vanA* a été retrouvé chez d'autres espèces d'entérocoques comme *E. avium*, *E. durans*, *E. mundtii*, *E. casseliflavus* et *E. gallinarum* (9, 63, 102, 162, 163, 233, 262, 276) et également dans d'autres genres bactériens comme *Streptococcus gallolyticus*, *Cellulomonas turbata*, *Arcanobacterium haemolyticum*, *Bacillus circulans*, et *Staphylococcus aureus* (62, 65, 124, 168, 183, 220). Le gène *vanA* a été localisé aussi bien dans le chromosome bactérien que sur un plasmide (78). Le gène *vanA* a été expérimentalement transféré chez *S. aureus* (199), *Streptococcus sanguis*, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus pyogenes* et *Listeria monocytogenes* (30).

Le gène *vanB* est fréquent chez *E. faecium* et *E. faecalis*. Il a également été décrit chez d'autres genres bactériens comme *Streptococcus bovis*, *Eggerthella* et *Clostridium* (150, 183, 221, 250). Ce gène a été également localisé dans le chromosome bactérien et sur un plasmide (78).

Le gène *vanC*, dont on distingue trois sous-types (*vanC1*, *vanC2* et *vanC3*), est un gène intrinsèque à localisation chromosomique associé à des espèces de la flore intestinale comme *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* et *E. flavescens* (32, 194).

Le gène *vanD* a été décrit chez des souches de *E. faecium*, de *E. faecalis*, de *E. gallinarum* et récemment de *E. raffinosus*. Ce gène comprend les sous-types *vanD1*, *vanD2*, *vanD3*, *vanD4* et *vanD5* et a été décrit dans le chromosome bactérien (41, 57, 87, 201, 211, 213, 255).

Les gènes *vanE* et *vanG* ont été décrits dans le chromosome bactérien chez *E. faecalis* (112, 181, 268).

Le gène *vanF* n'a jamais été isolé chez des souches cliniques. Il a été décrit chez *Paenibacillus popilliae*, un biopesticide infectant les larves de coccinelle *Popillia japonica* Newman (206, 232).

3.3 PHÉNOTYPE DE LA RÉSISTANCE ACQUISE AUX GLYCOPEPTIDES

En clinique, on décrit six phénotypes de résistance aux glycopeptides. Ces phénotypes sont basés sur les valeurs des CMI de la vancomycine et de la téicoplanine chez les souches résistantes. Les phénotypes VanA, VanB et VanD résultent de la synthèse pariétale de précurseurs du peptidoglycane ayant une extrémité D-Ala-D-Lac, tandis que les phénotypes VanC, VanE et VanG résultent de la synthèse pariétale de précurseurs du peptidoglycane ayant une extrémité D-Ala-D-Ser.

3.3.1 Phénotypes VanA, VanB et VanD résultant de la synthèse du dipeptide terminal D-Ala-D-Lac

3.3.1.1 Phénotype VanA

Le phénotype VanA est le plus fréquemment décrit chez les souches d'entérocoques et pour l'instant, le seul à être décrit dans des souches de *S. aureus* (60-62). Ce phénotype de résistance a également été décrit chez *Arcanobacterium haemolyticum*, *Cellulomonas turbata* et *Bacillus circulans* (114, 220). Ce phénotype de résistance est induit par la présence de vancomycine et de téicoplanine dans le milieu extérieur. Ainsi, il se caractérise par un haut niveau de résistance à la vancomycine et à la téicoplanine avec des

concentrations minimales inhibitrices atteignant parfois 1000 µg/ml pour la vancomycine et 512 µg/ml pour la téicoplanine (Tableau 6) (16, 20, 32, 77, 78).

Tableau 6. Niveaux de résistance aux glycopeptides chez les entérocoques. Adapté de (78)

Caractéristique des souches	Résistance acquise, type					Résistance intrinsèque faible niveau type VanC1/C2/C3
	Élevée VanA	Variable VanB	Modérée VanD	Faible		
				VanG	VanE	
CMI, mg/L						
Vancomycine	64-1000	4-1000	64-128	16	8-32	2-32
Téicoplanine	16-512	0.5-1	4-64	0.5	0.5	0.5-1
Conjugaison	Positive	Positive	Négative	Positive	Négative	Négative
Élément mobile	Tn1546	Tn1547 ou Tn1549	***	***	***	***
Expression	Inductible	Inductible	Constitutive	Inductible	Inductible	Constitutive, Inductible
Localisation	Plasmide chromosome	Plasmide chromosome	Chromosome	Chromosome	Chromosome	Chromosome
Cible modifiée	D-Ala-D-Lac	D-Ala-D-Lac	D-Ala-D-Lac	D-Ala-D-Ser	D-Ala-D-Ser	D-Ala-D-Ser

NOTE. D-Ala-D-Lac, D-alanine-D-lactate; D-Ala-D-Ser, D-alanine-D-sérine
CMI = Concentration minimale inhibitrice

3.3.1.2. Phénotype VanB

Le phénotype VanB est le deuxième en importance chez les souches d'entérocoques. Il est le seul à avoir été décrit dans des bactéries anaérobies telles que *Clostridium bolteae*, *C. hathewayi*, *C. symbiosum*, *C. innocuum*, *Eggerthella lenta* et *Ruminococcus lactaris* (24, 25, 250). Ce phénotype est transférable *in vitro* entre des souches d'entérocoques résistantes et sensibles aux glycopeptides (86, 221, 224, 231). Le transfert de ce phénotype a été également décrit *in vivo* entre *C. symbiosum* et des souches d'entérocoques (159). La résistance de type VanB est également une résistance inductible. Cependant, ce phénotype de résistance est induit uniquement par la présence de vancomycine tandis que la téicoplanine n'est pas inductrice dans ce type de résistance (14, 224). Le phénotype VanB se caractérise par des niveaux variables de résistance à la vancomycine (CMI comprise entre 16-1000 µg/ml) tandis que la téicoplanine conserve généralement son activité (Tableau 6) (9, 110, 153, 224).

3.3.1.3 Phénotype VanD

Le phénotype VanD a été décrit jusqu'à ce jour uniquement dans des souches d'entérocoques. Ce phénotype est exprimé de manière constitutive et les souches d'entérocoques présentent une résistance modérée à la vancomycine (CMI variant entre 64 et 128 µg/ml) et à la téicoplanine (CMI variant entre 4–64 µg/ml) (Tableau 6) (77, 78, 213). Aucun transfert de cette résistance n'a été obtenu *in vitro* lors d'expériences de conjugaison (93).

3.3.2 Phénotypes VanE et VanG résultant de la synthèse du dipeptide terminal D-Ala-D-Ser

Deux phénotypes acquis de résistance aux glycopeptides résultant de la synthèse pariétale de précurseurs du peptidoglycane ayant une extrémité D-Ala-D-Ser ont été décrits. Il s'agit des phénotypes VanE et VanG (Tableau 6).

3.3.2.1 Phénotype VanE

Le phénotype VanE se caractérise par une faible résistance à la vancomycine (CMI = 8-32 µg/ml) et une sensibilité à la téicoplanine (CMI = 0.5 µg/ml) (Tableau 6) (40, 78, 112). Ce phénotype de résistance est induit par la présence de vancomycine dans le milieu extérieur. Le phénotype VanE n'est pas très fréquemment observé et il a été décrit chez quelques souches de *E. faecalis* (2, 3, 40, 78, 112).

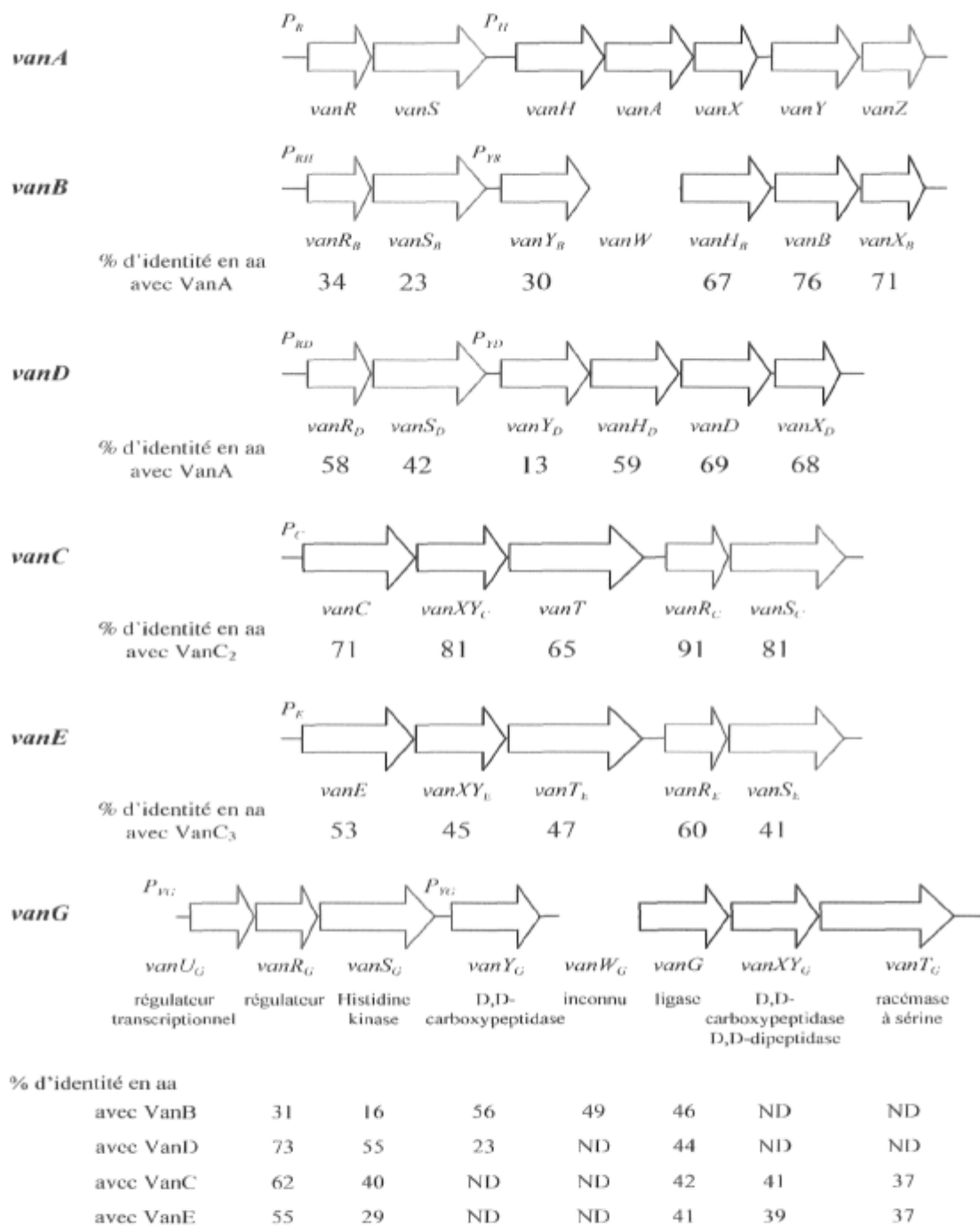
3.3.2.2 Phénotype VanG

Le phénotype VanG est caractérisé par un faible niveau de résistance à la vancomycine (CMI = 16 µg/ml) et une sensibilité à la téicoplanine (CMI = 0.5 µg/ml) (Tableau 6) (181). Il s'agit également d'un phénotype inductible par la présence de vancomycine et a été décrit chez des souches de *E. faecalis* (42, 89, 181).

3.4 GÉNÉTIQUE DE LA RÉSISTANCE ACQUISE AUX GLYCOPEPTIDES

3.4.1 Locus de résistance impliqués dans la synthèse du dipeptide terminal D-Ala-D-Lac des précurseurs du peptidoglycane

On distingue trois locus de résistance, *vanA*, *vanB* et *vanD* (Figure 7), qui correspondent respectivement aux trois phénotypes de résistance VanA, VanB et VanD mentionnés dans le chapitre précédent.



NOTE. ND = Non disponible

Figure 7. Schéma comparatif des différents locus de résistance aux glycopeptides.

Les gènes marqués 'Non disponible' sont absents des locus. Adaptée de (94)

3.4.1.1 Locus *vanA*

Le locus *vanA* comporte sept gènes de résistance que sont *vanR*, *vanS*, *vanH*, *vanA*, *vanX*, *vanY* et *vanZ* (Figure 7). Ce locus est porté par le transposon Tn1546 (Figure 8) (9, 19, 97). Le transposon Tn1546 est un transposon non conjugatif (qui n'est pas autotransférable) et qui appartient à la famille des transposons de type Tn3. Il a été décrit pour la première fois sur un plasmide de type conjugatif dans une souche de *E. faecium* (19, 77). Le transposon Tn1546 contient également deux cadres de lecture ouvert (*orf1* et *orf2*) juxtaposés au locus *vanA*, qui codent pour une transposase (*orf1*) et une résolvasse (*orf2*) responsables de sa transposition et de sa réplication (19, 77). Ce transposon a une grande importance dans la dissémination du locus *vanA* au sein des entérocoques (279). Chaque mouvement d'excision et d'insertion du transposon Tn1546 s'accompagne d'une duplication des gènes de résistance et par conséquent de leur croissance exponentielle à chaque transfert du transposon (77). Cette transposition replicative constitue un des moyens de dissémination des gènes de résistance à la vancomycine (77).

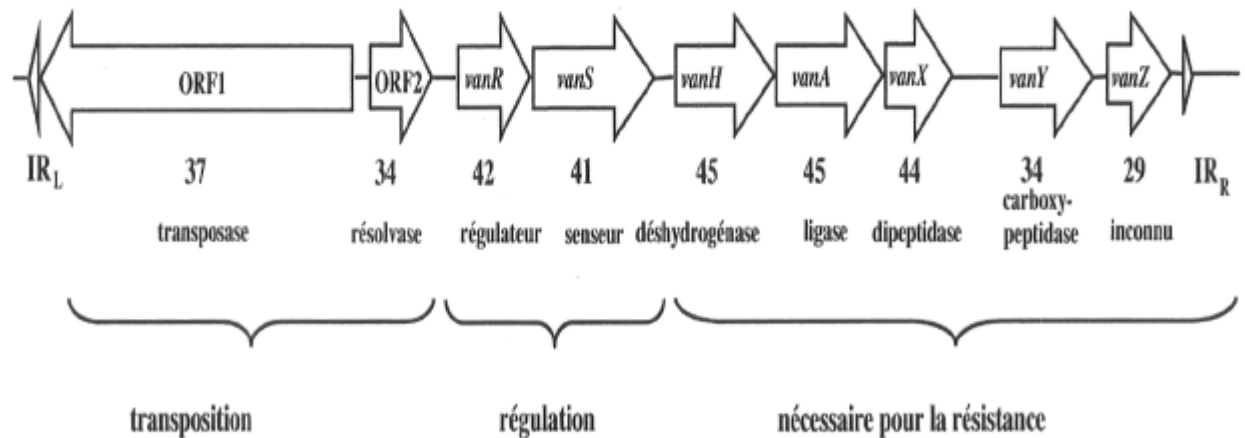


Figure 8. Structure du transposon Tn1546 (10851 pb) contenant le locus *vanA*. Les chiffres représentent les pourcentages en G + C. Adaptée de (77)

La caractérisation des souches de SARG isolées dans les états du Michigan et de Pennsylvanie a montré la présence du transposon Tn1546 contenant le locus *vanA* (259, 273). Dans la souche SARG isolée en Pennsylvanie, la résistance est liée à l'acquisition d'un plasmide de 120 kb qui est normalement décrit chez les entérocoques et qui contenait le transposon Tn1546 (259). Dans la première souche SARG isolée au Michigan, il a été montré que le transposon Tn1546 provenait d'une souche d'ERG du même patient et était porté par un plasmide conjugatif de 57.9 kb nommé pLW1043 (60, 273). L'ancêtre du plasmide pLW1043 qui est le plasmide pAM829 d'environ 47 kb (sans le transposon Tn1546) est un plasmide conjugatif normalement présent chez les staphylocoques et qui contient également des gènes de résistance comme le gène *dfrA* codant pour la résistance au triméthoprim, le gène *blaZ* codant pour la résistance aux pénicillines, le gène *aacA-aphD* codant pour la résistance aux aminoglycosides (résistance à la gentamycine, la kanamycine et la tobramycine) et le gène *qacC* codant pour la résistance par efflux aux ammoniums quaternaires (273). Ainsi, le plasmide pLW1043 apparaît comme un plasmide composite présentant des homologies avec les plasmides de staphylocoques, notamment la famille des plasmides de type pSK1 (particulièrement pSK4) et la famille des plasmides conjugatifs de type pSK41/pGO1 codant pour les résistances multiples aux drogues (273). Dans le plasmide pLW1043 de la souche SARG isolée au Michigan, le transposon Tn1546 est inséré dans une région située entre les gènes *aac-aphD* et *blaZ* (273).

Étant donné la gravité et l'impact clinique que représente la dissémination du locus *vanA* chez des souches de *S. aureus*, plusieurs travaux se sont penchés sur l'analyse des mécanismes ayant conduit au transfert de la résistance aux glycopeptides entre une souche d'ERG et une souche de SARG (77, 113, 212, 258, 259, 273). En effet, deux étapes successives ont été proposées pour expliquer l'intégration du transposon Tn1546 dans un plasmide conjugatif résident de *S. aureus* (77). La première étape comprend une conjugaison entre une souche d'ERG donatrice et une souche de *S. aureus* réceptrice sensible à la vancomycine durant laquelle se produit le transfert du transposon Tn1546, par l'intermédiaire d'un plasmide conjugatif d'entérocoque, le plasmide pAM830 (77, 78, 113). La deuxième étape consiste à l'intégration du transposon Tn1546 dans un plasmide résident de *S. aureus*, en l'occurrence le plasmide pAM829 conduisant à la formation du plasmide

pLW1043 et à la stabilité de la résistance aux glycopeptides dans la souche réceptrice (77, 273). L'intégration du transposon Tn1546 dans un plasmide résident de *S. aureus* (plasmide pAM829) et la formation du plasmide pLW1043 peut expliquer la stabilité de la résistance à la vancomycine décrite dans la souche de SARG provenant du Michigan (212). Par contre, il apparaît que la résistance à la vancomycine est instable durant des repiquages successifs dans le cas de la souche de SARG isolée en Pennsylvanie et ayant acquis un plasmide d'entérocoque contenant le transposon Tn1546 (212).

Plusieurs transposons identiques ou apparentés au transposon Tn1546 ont également été décrits sur des plasmides autotransférables dans des souches d'entérocoques (135, 161, 162, 245), mais également dans le chromosome bactérien des entérocoques (97, 139). De plus, différentes séquences d'insertion ont été décrites sur ces transposons apparentés au transposon Tn1546 (202, 245, 275, 281). Il s'agit de l'IS1216V-IS3 inséré dans *l'orf1*, de l'IS1251 inséré dans la région intergénique entre *vanS-vanH*, de l'IS1216V inséré dans la région intergénique entre *vanX-vanY* (275) et de l'IS1542 inséré entre *l'orf2* et le gène *vanR* (281).

Ainsi, la résistance aux glycopeptides de type VanA conférée par la présence du locus *vanA* dans des souches résistantes est un caractère hautement transférable du fait de sa localisation sur des éléments génétiques mobiles, ce qui assure leur dissémination dans des bactéries sensibles aux glycopeptides.

3.4.1.2 Locus *vanB*

Le locus *vanB* comporte également sept gènes de résistance que sont *vanR_B*, *vanS_B*, *vanY_B*, *vanW*, *vanH_B*, *vanB*, *vanX_B* (Figure 7). Sur la base des identités en acides nucléiques du gène *vanB*, trois sous-types du gène *vanB* (*vanB1*, *vanB2* et *vanB3*) ont été décrits (85, 208).

Le locus *vanB1* est porté par un transposon composite de 64 kb, le transposon Tn1547, dont les extrémités sont délimitées par les séquences d'insertion IS16 et IS256 chez *E. faecalis*

BM4281 (Figure 9) (222). Le transposon Tn1547 a été décrit sur un élément génétique mobile de 64 kb. Cet élément génétique mobile est transférable d'un chromosome d'entérocoque vers un autre mais également d'un chromosome d'entérocoque vers un plasmide codant pour une hémolysine (plasmide pIP964) et vice-versa lors d'expériences de conjugaison *in vitro* (222, 223)..

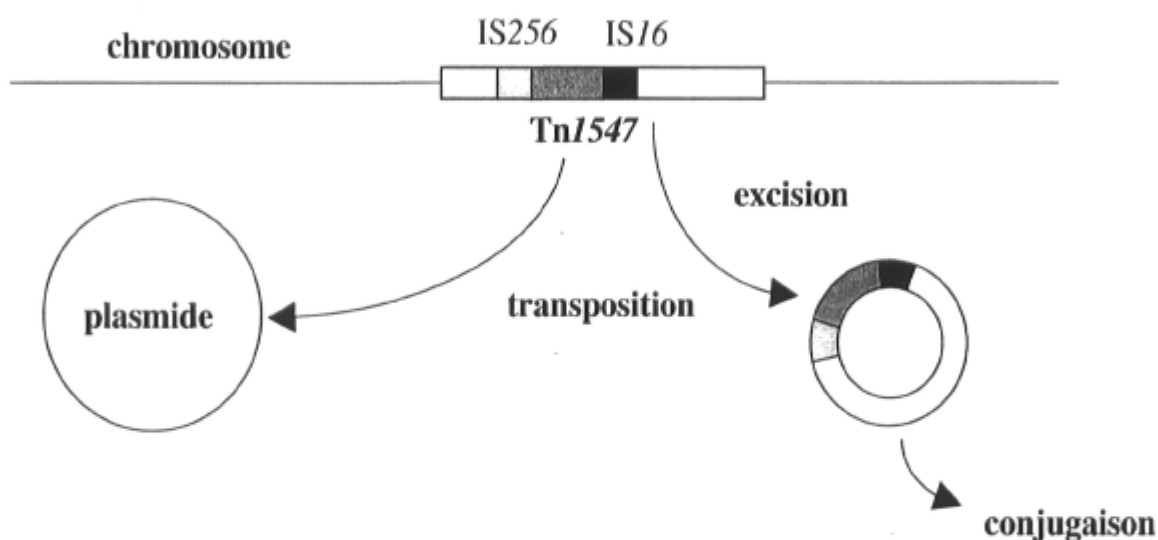
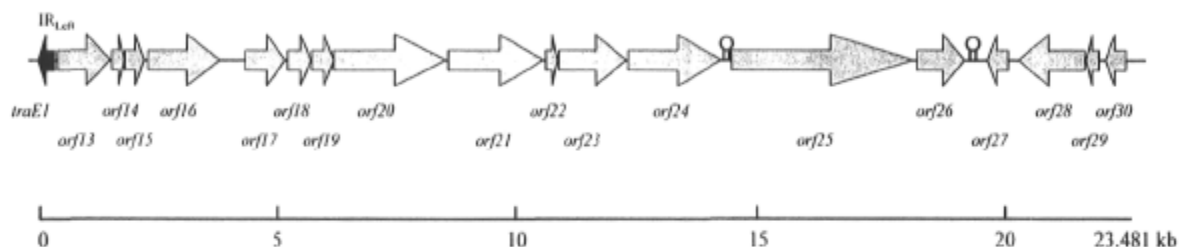


Figure 9. Structure du transposon Tn1547 (64 kb) contenant le locus *vanB1* délimité par les séquences d'insertion IS16 et IS256. Mouvement intracellulaire et intercellulaire du locus *vanB*. Adaptée de (77).

Le locus *vanB1* a également été associé à un transposon apparenté au transposon Tn1549 (Figure 10) dans la souche de *E. faecalis* V583 dont le génome a été entièrement séquencé (209). Enfin, le locus *vanB1* a été décrit sur des plasmides présents dans des souches d'entérocoques (231, 283).

Le locus *vanB2* a été décrit sur le transposon conjugatif Tn5382 de 27 kb, dans la souche *E. faecium* C68 (54) ainsi que sur le transposon conjugatif Tn1549 de 34 kb dans les souches *E. faecalis* 93/268 et *E. faecium* 654 (Figure 10) (120).

(a)



(b)

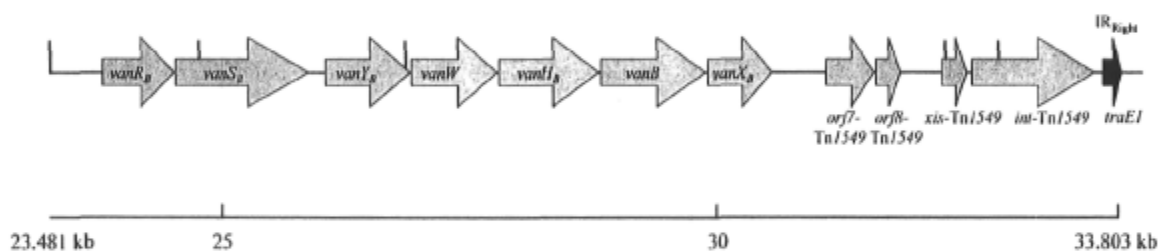


Figure 10. Structure du transposon Tn1549 (33803 nt) contenant le locus *vanB2*.
Adaptée de (120)

Les transposons Tn5382 et Tn1549 sont deux transposons semblables appartenant à la famille des transposons de type Tn916 (120). L'insertion de ces transposons se produit aussi bien dans le chromosome bactérien que sur un plasmide. En effet, plusieurs études ont décrit l'insertion du transposon Tn5382 en aval du gène de la *pbp5* dans des souches de *E. faecium* isolées aux États-Unis (54, 140). Par contre, pour les souches *E. faecalis* 93/268 et *E. faecium* 654 isolées au Royaume-Uni, l'insertion du transposon Tn1549 a été décrit sur un plasmide de type pAD1 au sein du gène *traE1* codant pour la synthèse d'une protéine régulatrice impliquée dans le transfert du plasmide pAD1 et le gène *uvrB* codant pour la

résistance aux ultra-violet (120, 284). La famille des plasmides pAD1 subit un transfert conjugatif d'une cellule donatrice à une cellule réceptrice sous l'influence de phéromones sexuelles bactériennes cAD1 (216, 217). Ces phéromones sexuelles sont des signaux d'appariement émis par la cellule réceptrice qui favoriserait le contact intime entre les cellules donatrices et réceptrices (69, 101). Enfin, plusieurs séquences d'insertion ont été caractérisées dans le transposon Tn5382 contenant le locus *vanB2* de différentes souches d'entérocoques (83, 92, 166). Il s'agit de la séquence d'insertion ISEnfa110 localisée à l'extrémité gauche du transposon Tn5382 et semblable à la famille des transposases de type IS110, de la séquence d'insertion ISEnfa200 localisée dans la région intergénique entre *vanS_B* – *vanY_B* et semblable à la famille des transposases de type IS200 (83), de la séquence d'insertion ISEnfa3 localisée dans l'*orfC* du transposon Tn5382 et semblable à la famille des transposases de type IS3 (166) et d'une séquence d'insertion apparentée à l'*orfB* de l'IS150 chez *Escherichia coli* (92).

Concernant le sous-type *vanB3*, aucune étude n'a caractérisé l'élément génétique porteur de cet opéron.

Ainsi, à l'instar de la résistance de type VanA, on constate également que la résistance aux glycopeptides de type VanB est un caractère transférable d'une souche résistante vers une souche sensible à cause de la localisation du locus *vanB* sur des transposons et des plasmides conjugatifs.

3.4.1.3 Locus *vanD*

Le locus *vanD* comporte six gènes de résistance que sont *vanR_D*, *vanS_D*, *vanY_D*, *vanH_D*, *vanD* et *vanX_D* (Figure 7). Ce locus a été retrouvé uniquement dans le chromosome et n'a été associé à aucun élément génétique mobile jusqu'à maintenant (87, 93, 95, 201). De plus, aucun transfert par conjugaison *in vitro* n'a pu être démontré chez les souches étudiées (44, 93, 95). Sur la base de la variabilité des séquences en acides nucléiques du gène *vanD*, on distingue cinq sous-types dont l'ordre croissant de numérotation est basé sur la chronologie de leur caractérisation. Il s'agit *vanD1*, *vanD2*, *vanD3*, *vanD4* et *vanD5* (41,

43, 57, 87, 95, 201). Rappelons que le locus *vanD* est décrit fréquemment chez les souches de *E. faecium*, mais également chez quelques souches de *E. faecalis* (41, 43, 57, 87, 95, 201). Il a été décrit chez une souche de *E. gallinarum* (44) et, récemment, chez une souche de *E. raffinosus* (255).

On constate donc qu'à l'inverse des résistances VanA et VanB, aucune évidence expérimentale n'a réussi à démontrer le transfert de la résistance de type VanD entre une souche d'ERG et une souche d'entérocoque sensible. Cependant, un transfert *in vivo* de ce locus n'est pas exclu. Ces éléments pourraient expliquer la faible fréquence des ERG contenant le locus *vanD*.

3.4.2 Locus de résistance impliqués dans la synthèse du dipeptide terminal D-Ala-D-Ser des précurseurs du peptidoglycane

3.4.2.1 Locus *vanE*

Le locus *vanE* comporte cinq gènes de résistance que sont *vanE*, *vanXY_E*, *vanT_E*, *vanR_E*, et *vanS_E* (Figure 7). Il faut noter que les deux gènes de régulation *vanR_E* et *vanS_E* sont localisés en aval des gènes *vanE*, *vanXY_E* et *vanT_E*, contrairement à ceux des locus *vanA*, *vanB*, *vanD* et *vanG* (Figure 7) (77, 78). Le locus *vanE* a été décrit dans le chromosome des souches de *E. faecalis* (3, 40, 112, 268, 279). Les gènes *vanE* sont des gènes acquis, mais non transférables au cours d'expériences de conjugaison *in vitro* (3, 40, 112, 268, 279). Ce qui pourrait constituer l'un des arguments pour expliquer la limitation du locus *vanE* à l'espèce *E. faecalis* ainsi que le faible taux d'isolement des souches d'ERG présentant ce locus.

3.4.2.2 Locus *vanG*

Le locus *vanG* comporte huit gènes de résistance que sont *vanU_G*, *vanR_G*, *vanS_G*, *vanY_G*, *vanW_G*, *vanG*, *vanXY_G* et *vanT_G* (Figure 7). Le locus *vanG* a été décrit dans le chromosome

bactérien de *E. faecalis* (42, 89). Cependant, la résistance est transférable *in vitro* à une faible fréquence entre une souche d'entérocoque résistante et une souche d'entérocoque sensible lors d'expérience de conjugaison *in vitro* (89). Ce transfert *in vitro* a été associé au mouvement d'un élément génétique d'environ 240 kb contenant également le gène *ermB* codant pour la résistance à l'érythromycine (89). Sur la base de la variabilité des séquences en acides nucléiques du gène *vanG*, un nouveau sous-type *vanG*₂ a été caractérisé dans une souche de *E. faecalis* au Canada (42).

Ainsi, comme la résistance de type VanE, la résistance de type VanG est peu fréquente et est pour l'instant limitée aux souches de *E. faecalis*. Le transfert expérimental de ce caractère de résistance, même avec un faible taux de transfert, permet de présager une dissémination du locus *vanG* au sein d'autres bactéries à Gram positif.

3.5 MÉCANISMES BIOCHIMIQUES DE LA RÉSISTANCE ACQUISE AUX GLYCOPEPTIDES PAR SYNTHÈSE DU D-ALA-D-LAC OU DU D-ALA-D-SER

3.5.1 Synthèse du dipeptide D-Ala-D-Lac des précurseurs du peptidoglycane

De façon générale, les mécanismes biochimiques de la résistance aux glycopeptides sont semblables pour les souches possédant les gènes *vanA*, *vanB* et *vanD*. Ces mécanismes conduisent à la synthèse de précurseurs du peptidoglycane avec un dipeptide terminal D-Ala-D-Lac de faible affinité pour les glycopeptides suivie de l'élimination simultanée de la synthèse des précurseurs avec une extrémité D-Ala-D-Ala de haute affinité pour les glycopeptides (Figure 11) (4, 16, 32, 94, 136, 182, 230). Ainsi, le remplacement du dipeptide D-Ala-D-Ala par le depsipeptide D-Ala-D-Lac durant la synthèse des précurseurs du peptidoglycane aboutit à la résistance aux glycopeptides des bactéries à Gram positif (77, 94).

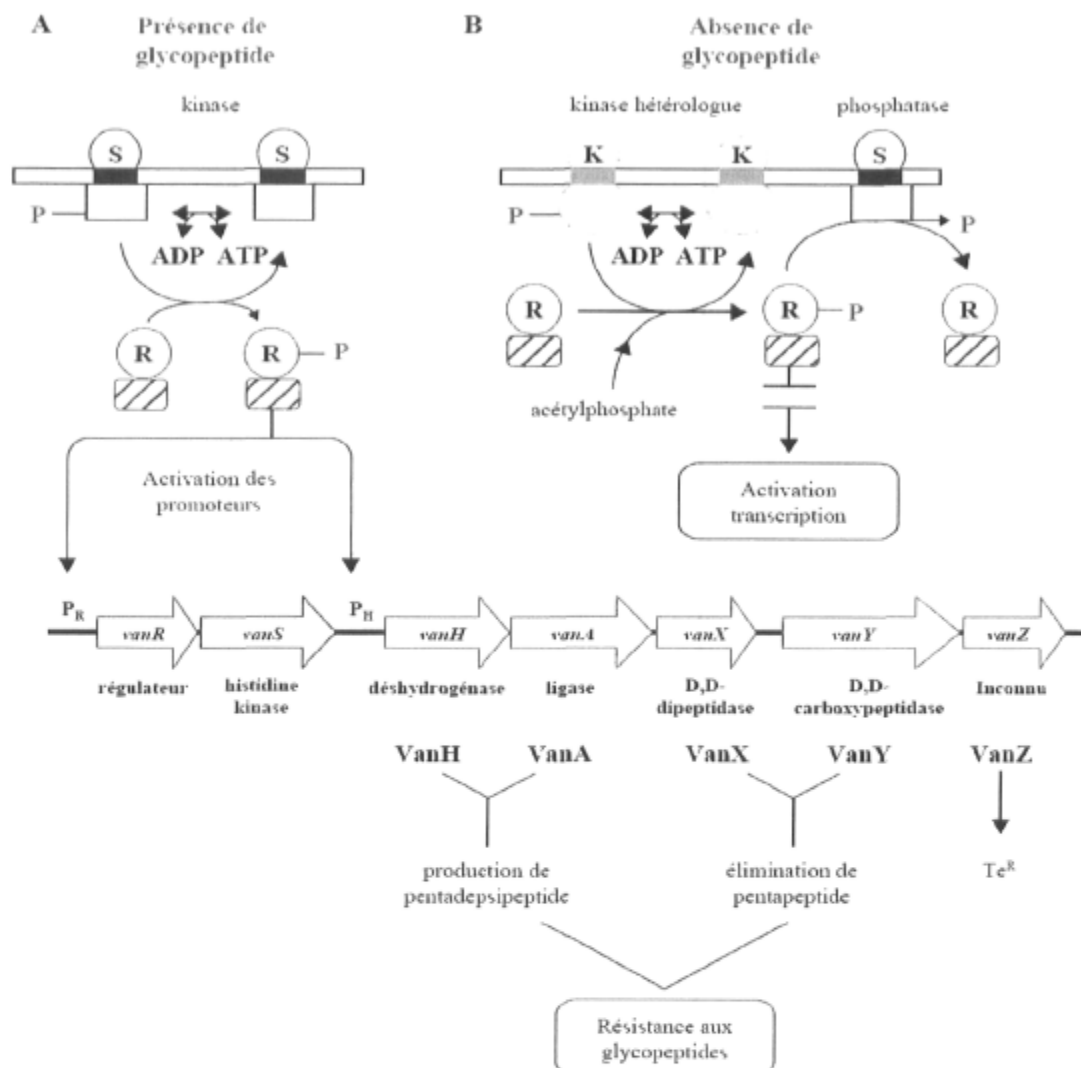


Figure 11. Régulation de la résistance aux glycopeptides. Modèle de la phosphorylation (A) et de la déphosphorylation (B) de la protéine de régulation VanR (R) par la protéine VanS (S) et représentation schématique de la régulation de l'expression des gènes du locus *vanA*. K: kinase hétérologue; R: Régulateur; S: Senseur.

○ = domaine senseur de S; ■ = domaine transmembranaire de S; □ = domaine de la phosphokinase de S. ○ = domaine récepteur; ▨ = domaine effecteur. Adaptée de (94)

3.5.1.1 Régulation de la résistance aux glycopeptides

L'élément activateur de la cascade des gènes de résistance présents sur les locus *vanA* et *vanB* est la présence de glycopeptides dans le milieu extérieur des bactéries à Gram positif. Cette présence de glycopeptides dans le milieu extérieur de la bactérie déclenche l'activation du système de gènes de régulation à deux composants *vanR-vanS* et *vanR_B-vanS_B* (11, 18, 21, 109, 285). Ainsi, l'expression des résistances de type VanA et VanB est sous le contrôle d'un système de régulation à deux composants constitués d'une protéine membranaire (VanS et VanS_B) et d'une protéine cytoplasmique régulatrice (VanR et VanR_B) qui agit comme un activateur transcriptionnel (18, 57, 93, 95, 109).

Concernant les résistances VanA et VanB, les produits des gènes *vanS* et *vanS_B* sont des protéines membranaires, qui contiennent dans leur domaine cytoplasmique un résidu histidine (position 164 pour VanS et 233 pour VanS_B) qui est autophosphorylé par la présence des glycopeptides dans le milieu extérieur (Figure 11) (11, 18, 94, 285). Les protéines cytoplasmiques VanR et VanR_B sont ensuite phosphorylées suite au transfert du groupement phosphate des protéines VanS et VanS_B sur le résidu aspartate de VanR et VanR_B (position 53 sur les deux protéines) (11, 18, 94, 285). Les protéines cytoplasmiques VanR et VanR_B activées vont ensuite activer simultanément les promoteurs respectifs P_R et P_{RB} des gènes *vanRS* et *vanR_BS_B* et P_H et P_{HB} des gènes *vanHAXYZ* (locus *vanA*) et *vanY_BWH_BBX_B* (locus *vanB*). Cette cascade d'activation aboutit à la transcription des gènes des locus *vanA* et *vanB* (Figure 11) (12, 16-18, 21, 22, 26, 32, 91, 92, 94, 103, 136, 163, 194, 286).

Le gène *vanH* code pour une déshydrogénase qui synthétise du D-lactate à partir du pyruvate. Le D-lactate constitue le substrat pour la ligase VanA qui synthétise le dipeptide terminal D-Ala-D-Lac des précurseurs du peptidoglycane (9, 19, 32, 52, 53). Le produit du gène *vanX* est une D,D-dipeptidase qui va hydrolyser le dipeptide D-Ala-D-Ala synthétisé par la ligase chromosomique (10, 12, 15, 194, 229, 287). Le gène *vanY* code pour une D,D-carboxypeptidase. Cet enzyme clive le D-Ala terminal des précurseurs pentapeptides du peptidoglycane qui ont échappé à l'hydrolyse des D,D-dipeptidases (15). Le mécanisme

d'action des gènes *vanZ* et *vanW_B*, demeure encore inconnue. Cependant, le gène *vanZ* serait impliqué dans la résistance à la téicoplanine (13).

3.5.1.2 Particularité de la régulation de la résistance de type VanD

Il existe quelques particularités dans la régulation des gènes du locus *vanD*. En effet, les gènes *vanR_D*-*vanS_D* contrôlent de façon constitutive l'expression de la résistance de type VanD et ne dépendent pas de la présence de glycopeptides dans le milieu extérieur (58, 93, 95). Il a été montré que dans les souches d'entérocoques contenant les gènes *vanA* et *vanB*, les protéines membranaires VanS et VanS_B possèdent une double activité: 1) une activité histidine kinase en présence d'inducteur, comme les glycopeptides, déclenchant l'activation de la cascade des gènes de résistance *vanA* et *vanB* et 2) une activité phosphatase en l'absence d'inducteur aboutissant à un rétrocontrôle négatif de l'expression des gènes de résistance (11, 12, 92, 149).

Dans le cas de l'expression du phénotype de résistance VanD, plusieurs types de mutations (délétion ou insertion) ont été décrites dans les gènes *vanS_D* et *vanR_D* des souches d'entérocoques contenant le locus *vanD*, causant une perte de l'activité phosphatase et une conservation de l'activité histidine kinase aboutissant à une expression constitutive de la résistance aux glycopeptides (58, 78, 93, 95). Ainsi, l'expression constitutive de la résistance de type VanD est due à une mutation dans le gène *vanS_D* qui a été décrite: 1) dans la souche de *E. faecium* BM4339 par une mutation (P₁₇₃S) dans la protéine VanS_D à proximité du site d'autophosphorylation de l'histidine kinase (95), 2), dans la souche de *E. faecium* N97-330 par une délétion d'un nucléotide dans le gène *vanS_D* conduisant à la synthèse d'une protéine tronquée (41) et 3) dans la souche *E. faecium* 10/96A par l'insertion dans le gène *vanS_D* d'une séquence d'insertion *ISEfa4* appartenant à la famille des *IS605* (95). L'expression constitutive de la résistance de type VanD due à une mutation dans le gène *vanR_D* a été caractérisée dans la souche de *E. faecium* BM4538 par une mutation (G₁₄₀E) dans la protéine VanR_D à proximité du feuillet β2 de la région effectrice de la protéine régulatrice VanR_D (93).

Comme dans la résistance VanA et VanB, la déshydrogénase VanH_D va synthétiser du D-lactate à partir du pyruvate, la ligase VanD va synthétiser du D-Ala-D-Lac, la dipeptidase VanX_D va hydrolyser le D-Ala-D-Ala synthétisé et la carboxypeptidase VanY_D va hydrolyser le D-Ala terminal du pentapeptide avant sa translocation à l'extérieur du cytoplasme (57, 58, 93, 95, 211, 226). Cependant, il faut noter que dans les souches d'entérocoques contenant le gène *vanD*, l'activité de la D,D-dipeptidase VanX_D et de la D,D-carboxypeptidase VanY_D est négligeable (57, 58, 93, 95, 211, 226). En effet, dans les souches d'entérocoques contenant le locus *vanD*, la ligase chromosomique Ddl permettant la synthèse d'un dipeptide terminal D-Ala-D-Ala n'est pas fonctionnelle à cause de mutations dans le gène *ddl* (41, 43, 44, 57, 93, 95, 211).

Ces mutations dans le gène *ddl* peuvent être dues soit à l'insertion d'un fragment d'ADN de 5 ou 7 bp comme cela a été décrit respectivement dans la souche *E. faecium* BM4339 et les souches *E. faecalis* BM4539 et BM4540 (57, 93), soit à l'insertion des séquences d'insertion *IS19* et *ISEfm1* chez les souches *E. faecium* BM4416 (211) et *E. faecium* N97-330 (41), respectivement, soit à des mutations ponctuelles d'un acide aminé par exemple E(13)G ou S(319)N dans la ligase Ddl de *E. faecium* A902 et de *E. faecium* BM4538 (93). Toutes ces mutations aboutissent à la synthèse d'une protéine Ddl tronquée, non fonctionnelle pour synthétiser le D-Ala-D-Ala des précurseurs du peptidoglycane (93). Ainsi, dans les souches d'entérocoques exprimant le phénotype VanD, l'absence de synthèse du dipeptide D-Ala-D-Ala, substrat essentiel pour la dipeptidase VanX_D et la carboxypeptidase VanY_D se traduit par une faible activité de ces enzymes (93).

Cette faible activité de VanX_D et de VanY_D décelée dans ces souches serait liée à une légère activité D-Ala-D-Ala que semble avoir la ligase VanD (57). Par ailleurs, la carboxypeptidase VanY_D se comporte comme une protéine liant la pénicilline (PLP) sensible à la pénicilline (57, 58, 213, 226), à la différence des carboxypeptidases VanY et VanY_B qui ne sont pas des PLP et sont donc insensibles à la pénicilline (10).

Ainsi, on peut remarquer que dans les souches d'entérocoque exprimant le phénotype VanD de résistance aux glycopeptides, malgré l'absence d'une ligase fonctionnelle

nécessaire à la synthèse de dipeptides D-Ala-D-Ala, la croissance des souches n'est pas dépendante de l'effet inducteur des glycopeptides. En effet, on observe simultanément dans ces souches, des mutations dans le système de régulation à deux composants VanRS dont l'activité supplée de façon constitutive à la synthèse du depsipeptide D-Ala-D-Lac et par conséquent à la synthèse du peptidoglycane (77, 93).

3.5.2 Synthèse du dipeptide D-Ala-D-Ser des précurseurs du peptidoglycane

Les mécanismes biochimiques de la résistance aux glycopeptides pour les souches possédant les gènes *vanE* et *vanG* conduisent à la synthèse du dipeptide terminal D-Ala-D-Ser des précurseurs du peptidoglycane ayant une faible affinité pour les glycopeptides (89). Les gènes *vanR_E-vanS_E* (locus *vanE*) et *vanU_G-vanR_G-vanS_G* (locus *vanG*) codent pour la synthèse des protéines de régulation (Figure 7) (15, 89, 181, 230). Les gènes *vanT_E* et *vanT_G* codent pour des racémases à sérine qui vont synthétiser la D-sérine (3, 6, 89). Les gènes *vanE* et *vanG* codent pour des ligases qui permettent la synthèse du D-Ala-D-Ser. Les gènes *vanXY_E* et *vanXY_G* codent pour une enzyme bifonctionnelle ayant à la fois une activité dipeptidase qui élimine le dipeptide D-Ala-D-Ala synthétisé par la ligase chromosomique Ddl et une activité carboxypeptidase conduisant à l'élimination du D-Ala terminal du pentapeptide formé avant sa translocation par le lipide II à l'extérieur de la cellule (3, 89, 104, 227). Le gène *vanY_G* code pour une deuxième carboxypeptidase (89, 181).

3.6 RÉSISTANCE AUX GLYCOPEPTIDES PAR ÉPAISSISSEMENT DE LA PAROI BACTÉRIENNE CHEZ LES STAPHYLOCOQUES

La résistance acquise aux glycopeptides due à un épaissement du peptidoglycane a été décrite notamment chez des souches de *S. aureus* et de SCN après exposition aux glycopeptides (180, 244). Il s'agit d'une résistance acquise à la vancomycine qui est cependant différente de celle observée chez *S. aureus* à la suite de l'acquisition du gène *vanA*. En effet, dans le cas des souches de *S. aureus* ayant acquis le gène *vanA*, ces souches

expriment de hauts niveaux de résistance à la vancomycine (235), tandis que les souches de *S. aureus* ayant acquis une résistance par épaissement du peptidoglycane possèdent un phénotype de résistance intermédiaire à la vancomycine et à la téicoplanine selon les concentrations établies par le CLSI (71). Ce phénotype de résistance intermédiaire peut être présent de façon homogène au sein d'une population bactérienne, dans ce cas on parle de souches de *S. aureus* de résistance intermédiaire à la vancomycine (SAIV), ou présent de façon hétérogène au sein d'une fraction de la population et dans ce cas on parle de souches hétéro-VISA (hVISA).

Les premières souches cliniques de staphylocoques présentant une CMI de la téicoplanine supérieure à 4 µg/ml ont commencé à être observées entre 1980 et 1990 chez plusieurs souches de SCN et principalement chez *S. haemolyticus* et *S. epidermidis* (8, 123, 203, 240, 248, 277). Le mécanisme biochimique de la résistance à la vancomycine chez les souches de SCN n'est pas bien connu. Toutefois, on a retrouvé chez des souches de *S. haemolyticus* ayant un phénotype intermédiaire de résistance à la vancomycine, un très faible taux (évalué à 1.7%) de précurseurs du peptidoglycane possédant une extrémité D-Ala-D-Lac (31). Il a été conclu que ce faible taux de D-Ala-D-Lac ne pourrait pas jouer un rôle dans la résistance à la vancomycine chez ces souches (31).

La première souche clinique VISA isolée en 1996 au Japon a été rapportée en 1997 (147). Il s'agissait de la souche *S. aureus* Mu50 qui avait une CMI de la vancomycine égale à 8 µg/ml (147). Plusieurs souches VISA ont par la suite été rapportées aux États-Unis (117, 247, 248). La souche *S. aureus* Mu3 présentant une résistance hétérogène à la vancomycine (hVISA) a été rapportée également au Japon en 1997 (146).

Sur le plan biochimique, la résistance aux glycopeptides chez les souches VISA s'explique par un épaissement de la paroi bactérienne (145). Cet épaissement se caractérise par une augmentation des couches de peptidoglycane pouvant atteindre 30 à 40 couches par rapport à 20 couches de peptidoglycane dans les souches de *S. aureus* sensibles (145). L'augmentation des couches de peptidoglycane a pour conséquence une augmentation de cibles D-Ala-D-Ala dans les couches superficielles de la paroi. Ce sont ces cibles D-Ala-D-

Ala localisées à la superficie de la paroi cellulaire qui vont d'une part, séquestrer les molécules de glycopeptides et d'autre part, entraver leur diffusion à l'intérieur des couches profondes du peptidoglycane où se trouvent les précurseurs pentapeptides impliqués dans la synthèse du peptidoglycane (79, 80, 145).

Le support génétique de la résistance par épaissement de la paroi chez les souches VISA et hVISA n'est pas bien connu. Cependant, l'expression de la résistance à la vancomycine chez les souches VISA ou hVISA par épaissement de la paroi bactérienne serait liée à une dérégulation de plusieurs gènes régulateurs. On peut citer parmi ces gènes, le gène *tcaA* qui code pour une protéine transmembranaire chez *S. aureus* (172), les gènes *agr* qui sont des gènes accessoires de régulation codant pour des protéines de régulation de plusieurs facteurs de virulence (236), le gène *pbp2* qui code pour une PLP (242), les gènes *sig* qui codent également pour différentes protéines régulatrices de plusieurs gènes bactériens (34, 134), le gène *ddh* qui code pour une D-Lac déshydrogénase (45, 184) et le gène *vraSR* qui code pour un système de régulation à deux composants dans l'expression de la résistance hétérogène à la vancomycine dans les souches de *S. aureus* Mu3 et Mu50 (157, 158). Cependant, il n'est pas définitivement établi que la dérégulation de ces gènes pourrait être spécifiquement responsable de la résistance aux glycopeptides chez les souches VISA (79).

3.7 RÉSISTANCE INTRINSÈQUE AUX GLYCOPEPTIDES CHEZ *Enterococcus casseliflavus/flavescens* et *Enterococcus gallinarum*

Trois espèces d'entérocoques sont connues pour exprimer une résistance intrinsèque aux glycopeptides dénommée résistance de type VanC (77, 78). Cette résistance est présente chez toutes les souches appartenant aux espèces *Enterococcus casseliflavus*, *E. flavescens* et *E. gallinarum* (164, 194). La résistance de type VanC se caractérise par une résistance de bas niveau à la vancomycine (CMI 2-32 µg/ml) et une sensibilité à la téicoplanine (CMI 0.5 à 1 µg/ml).

Sur la base de la variabilité en acides nucléiques du gène *vanC*, on distingue trois sous-types (5, 64, 68, 77, 228). Le sous-type *vanC1* est décrit chez *E. gallinarum*, le sous-type

vanC2 chez *E. casseliflavus* et le sous-type *vanC3* chez *E. flavescens* (103, 228). Le locus *vanC* est localisé dans le chromosome et non transférable.

L'interaction de cinq gènes concourt à la résistance de type VanC (5-7, 227, 230). Il s'agit des gènes de régulation *vanR_C* et *vanS_C* qui, comme dans les autres opérons *van*, régulent l'expression des gènes *vanC*, *vanXY_C* et *vanT* (Figure 7) (5-7, 227). Le gène *vanT* code pour une racémase à sérine produisant du D-sérine à partir de L-sérine (6, 7). Le gène *vanC* quant à lui code pour une ligase permettant la synthèse du D-Ala-D-Ser (230). Enfin, le gène *vanXY_C* code pour une enzyme possédant une double fonction D,D-dipeptidase et D,D-carboxypeptidase permettant l'hydrolyse du dipeptide D-Ala-D-Ala cytoplasmique et l'élimination du dernier D-Ala du pentapeptide (227).

3.8 RÉSISTANCE INTRINSÈQUE AUX GLYCOPEPTIDES CHEZ LES BACTÉRIES LACTIQUES ET AUTRES BACTÉRIES

Plusieurs espèces bactériennes sont intrinsèquement résistantes aux glycopeptides. Dans ce cas, le phénotype de résistance de ces souches se caractérise par de très hauts niveaux de résistance à la vancomycine (CMI \geq à 1000 $\mu\text{g/ml}$) et à la téicoplanine (CMI \geq 256 $\mu\text{g/ml}$). Il s'agit d'espèces appartenant aux groupes des bactéries lactiques telles que *Lactobacillus casei*, *L. rhamnosus*, *L. curvatus*, *L. plantarum*, *L. coryneformis*, *L. brevis*, *L. fermentum*, *Lactococcus*, *Leuconostoc lactis*, *L. mesenteroides*, *Pediococcus pentosaceus* et *P. acidilactici* (33, 137, 195, 264). Cette résistance intrinsèque chez les *Lactobacillus*, *Leuconostoc* et *Pediococcus* a été décrite comme une résistance intrinsèque non inductible et non transférable (195, 200, 253, 264). Le mécanisme biochimique de la résistance aux glycopeptides chez *L. mesenteroides* VR1 et *L. rhamnosus* ATCC 7469 est dû à la synthèse de précurseurs du peptidoglycane possédant exclusivement une extrémité D-Ala-D-Lac (33, 137). *Erysipelothrix rhusiopathiae* est aussi naturellement résistant à la vancomycine (CMI \geq 64 $\mu\text{g/ml}$), mais le mécanisme de résistance chez cette souche est encore inconnu.

Les espèces *Paenibacillus popilliae*, *P. thiaminolyticus* et *P. apiarius* utilisées comme pesticide biologique sont également résistants à la vancomycine par production de

précurseurs du peptidoglycane avec une extrémité D-Ala-D-Lac (133, 206). La CMI de la vancomycine pour la souche *P. popilliae* ATCC 14706 est de 800 µg/ml (232), tandis que celle de *P. thiaminolyticus* et *P. apiarius* est supérieure à 256 µg/ml pour la vancomycine et ≥ 32 µg/ml pour la téicoplanine (133). Un opéron de résistance constitué des gènes *vanY_F*, *vanZ_F*, *vanH_F*, *vanF* et *vanX_F* a été retrouvé chez *P. popilliae* (Figure 12) (207).



Figure 12. Structure du locus *vanF* chez *P. popilliae* ATCC 14706. Adaptée de (207)

L'opéron de résistance *vanA_{PT}* décrit chez la souche *P. thiaminolyticus* PT-2B1 est constitué des gènes *vanR*, *vanS*, *vanH*, *vanA*, *vanX*, *vanY* et *vanZ* qui ont la même organisation génétique que l'opéron *vanA* décrit chez les ERG (132, 133). L'opéron de résistance *vanA_{PA}* décrit chez la souche *P. apiarius* PA-B2B contient les gènes apparentés aux gènes *vanR*, *vanS*, *vanW*, *vanH*, *vanA*, *vanX*, *vanY* et *vanZ* (132, 133). Cependant, cet opéron *vanA_{PA}* a une organisation génétique semblable aux gènes du locus *vanB* à cause de la présence du gène *vanW* en amont des gènes *vanHAX* (132, 133). Tous les gènes des opérons de résistance aux glycopeptides chez les souches de *P. thiaminolyticus* et *P. apiarius* présentent une forte identité avec les gènes du locus *vanA* décrits chez les ERG. En effet, les pourcentages d'identité des séquences en acides nucléiques des gènes du locus *vanA_{PT}* de la souche *P. thiaminolyticus* PT-2B1, comparés à ceux des gènes *vanR*, *vanS*, *vanH*, *vanA*, *vanX*, *vanY* et *vanZ* du locus *vanA* des ERG sont respectivement de 94, 91%, 92%, 92%, 94%, 83%, et 40%. Les pourcentages d'identité des séquences en acides nucléiques des gènes du locus *vanA_{PA}* de la souche *P. apiarius* PA-B2B sont respectivement de 94, 90, 79, 87, 84, 79 et 41% lorsqu'ils sont comparés aux gènes du locus *vanA* des ERG (132, 133).

3.9 RÉSISTANCE INTRINSÈQUE AUX GLYCOPEPTIDES CHEZ LES BACTÉRIES PRODUCTRICES DE GLYCOPEPTIDES

La production de la vancomycine par *Amycolaptosis orientalis* et de la téicoplanine par *S. toyocaensis* implique que ces micro-organismes possèdent un mécanisme de résistance pour les antibiotiques qu'elles secrètent. L'hypothèse selon laquelle ces bactéries qui sont à la fois productrices de glycopeptides et en même temps résistantes à ces antibiotiques pourraient constituer un réservoir potentiel des gènes de résistance *van* a conduit les scientifiques à caractériser les gènes conférant la résistance à la vancomycine chez ces deux espèces (174-176, 219).

Ainsi, chez les souches *A. orientalis* C329.2 produisant la vancomycine et *S. toyocaensis* NRRL 15009 produisant la téicoplanine, on a retrouvé des gènes semblables aux gènes *vanH*, *vanA* et *vanX* du locus *vanA* des ERG (77, 174-176, 219). Les gènes *vanH_{st}*, *ddlM* et *vanX_{st}* (*S. toyocaensis* NRRL 15009) et les gènes *vanH_{aoV}*, *ddlN* et *vanX_{aoV}* (*A. orientalis* C329.2) ont la même organisation génétique que les gènes *vanHAX* du locus *vanA* des ERG (175). La comparaison des séquences en acides aminés montre que les déshydrogénases VanH_{st} et VanH_{aoV} ont 51 à 61% d'identité avec la protéine VanH retrouvée dans le locus *vanA* des ERG. Les ligases DdlM (*S. toyocaensis* NRRL 15009) et DdlN (*A. orientalis* C329.2) ont 59 à 69% d'identité avec la ligase VanA des ERG. De plus, les protéines DdlM et DdlN ont une activité D-Ala-D-Lac synthétase *in vitro* (174, 176). Enfin, les dipeptidases VanX_{st} (*S. toyocaensis* NRRL 15009) et VanX_{aoV} (*A. orientalis* C329.2) ont 61 à 64% d'identité avec la dipeptidase VanX retrouvé sur le locus *vanA* des ERG (175).

Chez la souche *S. toyocaensis* NRRL 15009, les gènes de résistance aux glycopeptides et les gènes de biosynthèse de la téicoplanine (composé A47934) sont situés sur le même locus (Figure 13) (219). Ce locus de 68 kb contient 34 cadres de lecture ouverts dont les cadres de lecture ouverts 1, 2 et 3, correspondent aux gènes *vanX_{st}*, *ddlM* et *vanH_{st}*. Ces derniers sont séparés des cadres de lecture ouverts 18 et 19 qui correspondent à *vanS_{st}* et *vanR_{st}* par 20 kb (219).

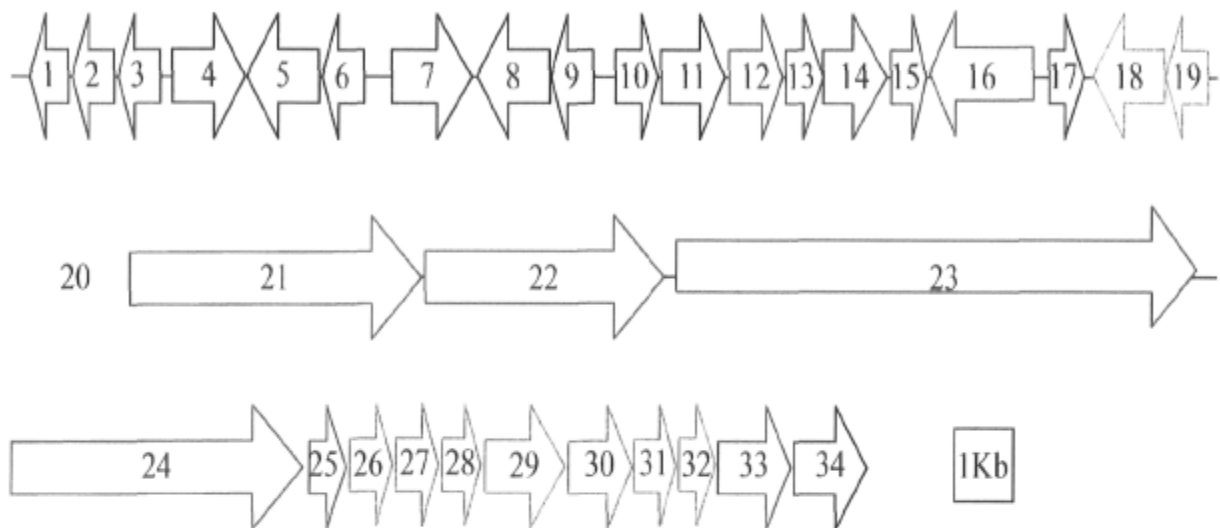


Figure 13. Gènes de synthèse et de résistance aux glycopeptides chez *S. toyocaensis* NRRL 15009. Les cadres de lecture ouvert 1 (*vanX_{st}*), 2 (*ddlM*), 3 (*vanH_{st}*), 18 (*vanS_{st}*) et 19 (*vanR_{st}*) correspondent aux gènes qui confèrent la résistance à la vancomycine chez cette souche. Adaptée de (219)

3.10 ORIGINE DES GÈNES DE RÉSISTANCE AUX GLYCOPEPTIDES

3.10.1 Origine des gènes responsables de la synthèse de D-Ala-D-Lac

Afin d'expliquer l'origine des gènes de résistance aux glycopeptides, plusieurs hypothèses ont été émises. L'hypothèse qui semble être la plus évidente est que l'origine des gènes de résistance pourrait se retrouver au sein d'organismes producteurs de glycopeptides comme *A. orientalis* et *S. toyocaensis*. En effet, ces organismes possèdent plusieurs gènes homologues à ceux retrouvés chez les entérocoques tels que *vanR*, *vanS*, *vanH*, *vanA* et *vanX* (219). Cependant, le pourcentage en guanine plus cytosine (G + C) qui est de 65 et 66 moles %, respectivement, pour les gènes *ddlM* de *S. toyocaensis* et *ddlN* de *A. orientalis*, est plus élevé que le pourcentage en G + C des gènes *vanA* (45 moles %), *vanB* (48 moles %) et *vanD* (47 moles %) retrouvé chez les entérocoques (77, 174-176, 206, 219). Ces différences suggèrent que l'acquisition des gènes de résistance aux glycopeptides par les entérocoques est probablement un événement ancien (77).

L'hypothèse d'une provenance des gènes de résistance aux glycopeptides à partir de souches d'entérocoques a aussi été écartée (77). Cette hypothèse a été écartée sur la base des différences observées lors de la comparaison du contenu en guanine et cytosine des gènes du locus *vanA* et *vanB* (Figure 7) (77). En effet, les locus de résistance *vanA* (G + C: 45 moles %) et *vanB* (G + C: 48 moles %) possèdent des pourcentages en G + C plus élevés que ceux des chromosomes de *E. faecium* (G + C: 39 moles %) et *E. faecalis* (G + C: 38 moles %) (77). Cette variabilité des contenus en guanine et cytosine des gènes composant les locus *vanA* et *vanB* suggère une évolution de ces gènes dans un autre organisme puis leur transfert récent chez les entérocoques.

Les gènes de résistance aux glycopeptides pourraient trouver leur origine chez les espèces intrinsèquement résistantes aux glycopeptides comme les lactobacilles, *Pediococcus* et *Leuconostoc* (33, 137, 264). Cependant, la combinaison des analyses comparatives des séquences en acides aminés des D-Ala-D-Lac ligases chez ces bactéries intrinsèquement

résistantes et des D-Ala-D-Lac ligases VanA, VanB et VanD décrites chez les ERG, ainsi que les études de phylogénie, montrent que toutes ces ligases ont d'une part une faible identité (26 à 35 %) entre elles et d'autre part, sont phylogénétiquement assez distantes les unes des autres (Figure 14) (77, 107).

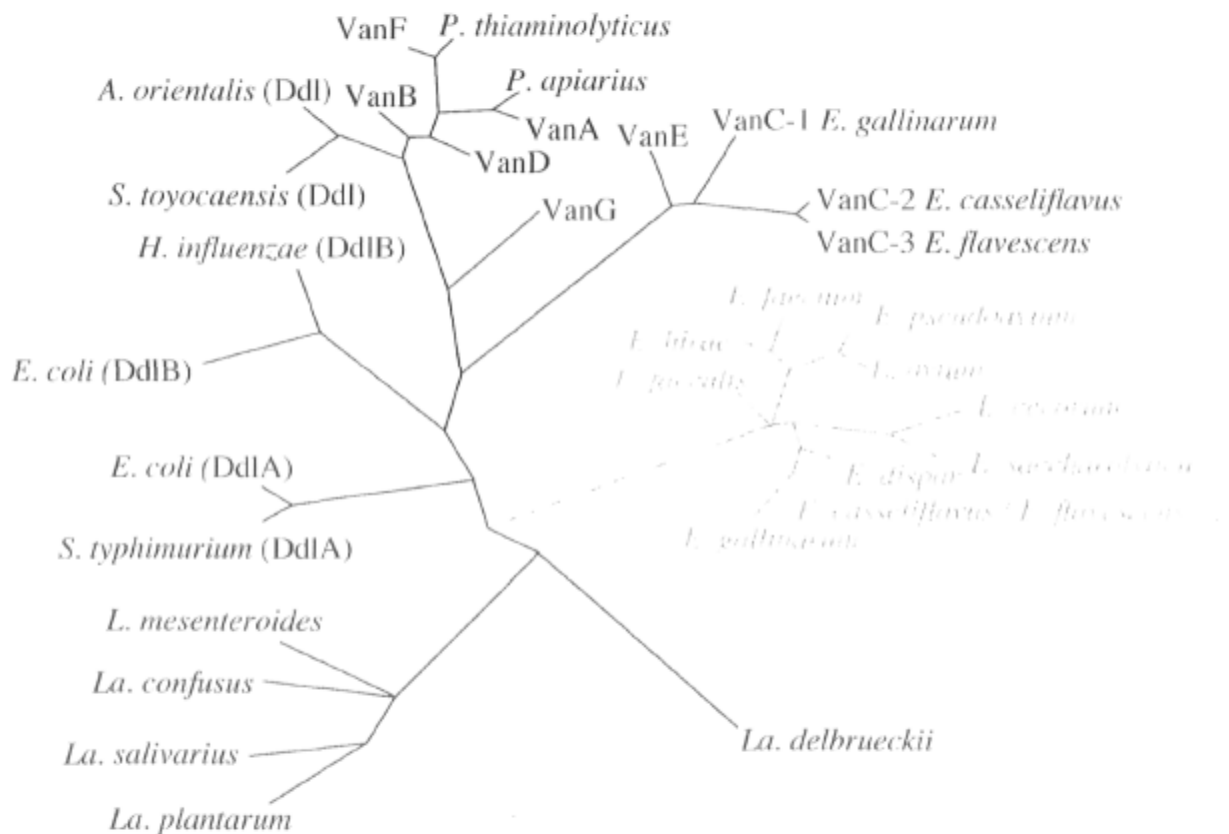


Figure 14. Phylogénie des ligases D-Ala-D-Ala et des enzymes apparentés. Adaptée de (77)

Les gènes de résistance aux glycopeptides retrouvés chez les espèces bactériennes utilisées comme pesticide biologique telles que *Paenibacillus popilliae* (207), *P. apiarius*, *P. thiaminolyticus* (132, 133) pourraient expliquer l'origine des gènes de résistance aux glycopeptides chez les ERG (77). En effet, ces gènes ont une forte identité en acides nucléiques (87 à 92% d'identité) et un pourcentage en G + C (46 à 48 moles %) semblables à ceux du gène *vanA* des ERG dont le pourcentage en G + C est de 45 moles % (77). Ainsi, les gènes de résistance chez ces espèces pourraient soit avoir un ancêtre phylogénétique commun avec ceux du locus *vanA* des ERG, soit être leur ancêtre (77). L'hypothèse selon laquelle le genre *Paenibacillus* pourrait être un hôte intermédiaire de ces gènes de résistance aux glycopeptides a également été évoquée (77).

3.10.2 Origine des gènes responsables de la synthèse de D-Ala-D-Ser

L'origine des gènes de résistance responsables de la synthèse du dipeptide D-Ala-D-Ser est également inconnue. Pour l'instant, il n'existe aucune bactérie capable de synthétiser à la fois les glycopeptides et des précurseurs du peptidoglycane avec une extrémité D-Ala-D-Ser. Ce qui permet de soulever l'hypothèse d'une autre origine des gènes de résistance *vanC*, *vanE* et *vanG* que celle évoquée pour *vanA*, *vanB* et *vanD* (77). Les gènes du locus *vanE* pourraient provenir des gènes du locus *vanC* de *E. gallinarum* ou *E. casseliflavus/flavescens* à cause des forts degrés d'identité en acides nucléiques (41 à 60%) de leurs gènes (3, 77). Par contre, les gènes du locus *vanG* sont constitués de gènes d'origines diverses (77, 89). En effet, l'élément génétique porteur du locus *vanG* comprend une partie centrale de 7.9 kb constituée du locus *vanG* dont le pourcentage en G + C des gènes varie entre 36 et 43% (77, 89). La comparaison du pourcentage en G + C du chromosome de *E. faecalis* (38%) et de ces trois parties fonctionnelles de l'élément génétique porteur du locus *vanG* suggèrent un recrutement de gènes d'origines diverses pour constituer l'opéron de résistance *vanG* (77, 89).

Ainsi, malgré toutes les hypothèses, l'origine des gènes de résistance à la vancomycine demeure toujours un mystère.

CHAPITRE IV. LA FLORE DIGESTIVE HUMAINE: UN MILIEU D'ÉCHANGE DES GÈNES DE RÉSTANCE

Le tube digestif humain est un écosystème où cohabite une flore microbienne dense et variée constituée en grande majorité de bactéries commensales mais également de bactéries pathogènes. Les espèces bactériennes présentes dans cette flore microbienne sont quantitativement différentes. Ainsi, la majorité de la population bactérienne dominante du tube digestif est constituée de bactéries anaérobies appartenant aux genres *Bacteroides*, ainsi qu'aux groupes *Clostridium coccoïdes* (groupe phylogénétique XIVa) et *Clostridium leptum* (groupe phylogénétique IV) (73, 105, 115, 148, 179, 185, 252). Le genre *Clostridium* a été subdivisé en 19 groupes sur la base de l'analyse phylogénétique des séquences du gène de l'ARNr 16S (73). Le groupe phylogénétique XIVa représente un des plus importants groupes composé d'un mélange hétérogène de divers genres à savoir les genres *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Eubacterium*, *Acetitomaculum*, *Roseburia* et *Coprococcus* (73). Plusieurs travaux sur l'exploration de la diversité de la flore microbienne du tube digestif montrent qu'il existe encore plusieurs espèces inconnues (105, 252).

La flore microbienne du tube digestif humain semble être un des microcosmes les plus favorables pour le transfert de gènes par conjugaison grâce à son énorme densité bactérienne qui favorise les contacts intimes nécessaires à ces modes de transfert (237-239). L'hypothèse d'une flore digestive humaine servant de réservoir de gènes de résistance est supportée par plusieurs travaux (23, 156, 237-239, 243, 263). En effet, le rôle de cette flore bactérienne intestinale dans l'acquisition, le stockage et le transfert des gènes de résistance a été décrit pour les gènes *ermB*, *ermF* et *ermG* conférant la résistance aux macrolides et les gènes *tetM* et *tetQ* conférant la résistance à la tétracycline (Tableau 7) (237).

Tableau 7. Gènes de résistances aux antibiotiques retrouvés à la fois chez les bactéries à Gram positif et à Gram négatif. Adapté de (237).

Gram positif	Gènes	Gram-négatif
<i>Bacillus</i> spp. <i>Clostridium</i> spp. <i>Staphylococcus</i> spp.	<i>ermG</i>	<i>Bacteroides</i> spp.
<i>Enterococcus</i> spp. <i>Staphylococcus</i> spp. <i>Streptococcus</i> spp. <i>Clostridia</i> spp.	<i>ermB</i>	<i>Bacteroides</i> spp
<i>Enterococcus</i> <i>Staphylococcus</i> spp. <i>Streptococcus</i> spp. <i>Actinomyces</i> spp <i>Bifidobacterium</i> spp. <i>Clostridia</i> spp.	<i>tetM</i>	<i>Campylobacter</i> spp <i>Fusobacterium nucleatum</i> <i>Gardnerella vaginalis</i> <i>Haemophilus</i> spp. <i>Neisseria</i> spp. <i>Veillonella</i> spp.
<i>Firmicute</i>	<i>ermF</i>	<i>Bacteroides</i> spp. <i>Prevotella</i> spp.
<i>Eubacterium</i>	<i>tetQ</i>	<i>Porphyromonas</i> spp.

Deux approches ont été proposées par Salyers *et al.* (237) pour évaluer l'impact réel du transfert des gènes de résistance aux antibiotiques entre les bactéries du tube digestif humain. La première approche consisterait à compléter l'alimentation de sujets sains avec des bactéries résistantes d'origine animale puis à analyser de manière séquentielle leurs selles à la recherche d'un transfert des gènes de résistance vers les bactéries résidentes du tube digestif humain (237). Cette approche pose des problèmes éthiques et de coûts financiers liés à la méconnaissance de la période de temps nécessaire pendant laquelle les prélèvements de selles devront être faits pour détecter un éventuel transfert de gènes de résistance (237). Cependant, une telle approche est envisageable dans des modèles animaux. Mais il faudrait considérer dans l'interprétation des résultats que la flore bactérienne des animaux de laboratoire est différente ou peu diversifiée lorsqu'elle est comparée à celle du tube digestif humain (237). Cette approche basée sur des modèles animaux a été utilisée pour répondre à la question originale de savoir s'il peut exister des

transferts de gènes de résistance aux glycopeptides entre des bactéries de la flore digestive humaine et animale. Des travaux sur le transfert *in vivo* des gènes *vanA* et *vanB* ont tenté de répondre à cette question en utilisant un modèle expérimental de souris gnotoxéniques inoculées par voie orale avec une flore d'origine humaine ou animale composée de bactéries résistantes et des bactéries sensibles aux glycopeptides (38, 159, 188). Ces travaux ont démontré l'existence de transfert *in vivo* du gène *vanA* entre deux souches d'entérocoques ainsi que du gène *vanB* entre *Clostridium symbiosum* et des souches de *E. faecalis* et de *E. faecium* (38, 159).

Une deuxième approche, cette fois ci indirecte, est basée sur l'analyse comparative des séquences de gènes de résistance identifiées chez différents microorganismes. Ainsi, on peut considérer qu'un gène a subi un transfert horizontal d'une espèce à une autre et vice versa lorsque deux séquences d'un gène de résistance provenant de deux espèces bactériennes différentes ont une identité d'au moins 95% (237). Cette valeur seuil de 95 % bien qu'arbitraire, élimine la possibilité d'une évolution convergente de ce gène dans les deux espèces (237). Cette approche indirecte a permis d'obtenir des évidences scientifiques sur le transfert des gènes de résistance aux antibiotiques tels que *ermB*, *ermF*, *ermG*, *tetM* et *tetQ* entre bactéries à Gram positif et bactéries à Gram négatif (Tableau 7) (237). Les gènes *erm* retrouvés dans ces bactéries avaient des séquences en acides nucléiques dont les identités étaient supérieures ou égales à 99% (237).

Toutefois, les stratégies se basant sur l'analyse comparative des séquences de gènes de résistance retrouvés dans des espèces ou des genres bactériens différents présentent des limites. En effet, le sens du transfert du gène de résistance d'une bactérie à une autre ne peut être précisé de manière formelle. De plus, le nombre et le rôle des bactéries du tube digestif ou de l'environnement servant d'hôtes intermédiaires dans ces échanges de gène ne peuvent être déterminés avec certitude (237).

Cependant, les résultats obtenus par ces différentes approches suggèrent fortement que le tube digestif humain constitue un milieu favorable aux transferts génétiques entre les bactéries.

CHAPITRE V. HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS DE RECHERCHE

5.1 HYPOTHÈSE DE RECHERCHE

Depuis 1986 date de l'apparition des premières souches d'ERG, la résistance aux glycopeptides n'a cessé d'augmenter. L'origine des gènes de résistance aux glycopeptides est encore inconnue malgré l'hypothèse d'un transfert à partir des organismes producteurs de glycopeptides (175, 176). Au cours des dernières années, de nouvelles espèces autres que les entérocoques, porteuses des gènes de résistance à la vancomycine ont été décrites. Récemment, des souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méticilline sont devenues résistantes à la vancomycine par acquisition du gène *vanA* lors d'un transfert horizontal à partir de souches d'ERG (60-62).

Ce projet a été motivé à l'origine par la mise en évidence par notre groupe de recherche au cours d'un programme de dépistage des ERG dans les hôpitaux de Québec et de Boston, de la présence du gène *vanB* dans plusieurs spécimens fécaux qui étaient négatifs pour les ERG par la culture. Il avait été montré qu'un de ces échantillons contenait une bactérie anaérobie résistante à la vancomycine porteuse du gène *vanB2*. Parallèlement, un autre groupe en Australie avait également montré la présence de diverses bactéries anaérobies porteuses du gène *vanB* dans la flore intestinale (250).

Ces résultats avaient permis de suggérer l'hypothèse d'un réservoir digestif des gènes de résistance aux glycopeptides chez des bactéries autres que les entérocoques. L'étude de la flore intestinale résistante aux glycopeptides n'a pas fait l'objet d'une recherche systématique. Cette flore digestive pourrait constituer un réservoir potentiel des gènes de résistance aux glycopeptides. Dans ce contexte de dissémination des gènes de résistance chez des espèces préalablement sensibles, il est important d'approfondir nos connaissances sur les espèces résistantes aux glycopeptides de la flore digestive.

5.2 OBJECTIFS DE RECHERCHE

Objectif général: Comprendre le rôle de la flore intestinale en tant que réservoir de gènes de résistance aux glycopeptides et sa participation dans la dissémination de cette résistance.

Objectif 1: Déterminer la fréquence des gènes de résistance aux glycopeptides dans la flore intestinale.

Objectif 2: Isoler et caractériser les différentes espèces bactériennes résistantes aux glycopeptides porteuses des gènes *vanA*, *vanB*, *vanD*, *vanE* et *vanG*, à l'exception des entérocoques.

Objectif 3: Caractériser de nouveaux gènes de résistance aux glycopeptides potentiellement présents dans la flore intestinale.

Objectif 4: Caractériser les éléments génétiques porteurs de la résistance aux glycopeptides chez les bactéries identifiées et déterminer le potentiel de transfert de cette résistance.

5.3 APERCU DES RÉSULTATS ET CONTRIBUTIONS SCIENTIFIQUES

Nos premiers travaux décrits dans le chapitre VI ont permis de montrer pour la première fois une fréquence élevée des gènes *vanB*, *vanD* et *vanG* dans des spécimens cliniques de selles qui ont fait l'objet d'un criblage par PCR avec des amorces spécifiques aux gènes *vanA*, *vanB*, *vanD*, *vanE* et *vanG*. La fréquence élevée de ces gènes de résistance aux glycopeptides n'était pas associée à la présence d'ERG dans ces échantillons. La découverte de cet important réservoir de gènes *van* non associés aux entérocoques dans la flore digestive humaine aura un impact majeur dans les stratégies de contrôle de la dissémination des gènes de résistance aux glycopeptides. L'étude clinique a été conçue par mes directeurs de recherche. J'ai réalisé le criblage des gènes de résistance à la vancomycine, l'analyse et la compilation des résultats ainsi que la rédaction scientifique.

La deuxième partie du travail a permis d'isoler à partir de deux échantillons de selles, deux nouvelles espèces bactériennes à Gram positif anaérobies résistantes à la vancomycine. La première souche isolée, CCRI-9842^T, contenait le gène *vanB* tandis que la deuxième souche, CCRI-16110, contenait le gène *vanD* ainsi qu'un gène apparenté au gène *vanG*. Ces deux souches ont été caractérisées et classées dans le groupe phylogénétique XIVa des *Clostridium*. La souche CCRI-9842^T a été désignée *Clostridium lavalense* avec comme souche type CCRI-9842^T (CCUG 54291^T). La souche CCRI-16110^T a été désignée *Ruminococcus gauthreui* avec comme souche type CCRI-16110^T (CCUG 54292^T). Ces résultats montrent que les bactéries anaérobies du tube digestif humain constituent un réservoir de gènes de résistance aux glycopeptides et peuvent jouer un rôle dans leur dissémination. Les résultats de la caractérisation de ces nouvelles espèces sont présentés dans les chapitre VII et VIII. La souche *C. lavalense* CCRI-9842^T a été isolée par Alba Bernal. J'ai isolé la souche *R. gauthreui* CCRI-16110^T et réalisé la caractérisation phénotypique et génotypique des deux nouvelles espèces. L'analyse des acides gras volatils a été réalisée par Kathryn A. Bernard. Enfin, j'ai réalisé l'analyse et la compilation des résultats ainsi que la rédaction des manuscrits.

La troisième partie du projet a consisté à caractériser les éléments génétiques porteurs de la résistance à la vancomycine chez *Clostridium lavalense* CCRI-9842^T et *Ruminococcus gauvreaui* CCRI-16110^T. *Clostridium lavalense* CCRI-9842^T possède un haut niveau de résistance à la vancomycine, mais demeure sensible à la téicoplanine. Ce phénotype VanB est dû à la présence du locus *vanB2* porté par le transposon Tn5382/1549. *Ruminococcus gauvreaui* CCRI-16110 possède un haut niveau de résistance à la vancomycine et à la téicoplanine. Nous avons montré la présence d'un locus *vanD* ayant une très forte homologie avec les locus *vanD* des entérocoques dans cette souche. Suite à la recherche du gène *ddl*, codant pour une ligase habituellement tronquée dans les souches d'entérocoques contenant le gène *vanD*, nous avons détecté et caractérisé chez *R. gauvreaui* un nouvel allèle du gène *vanG* qui présente 65% d'identité avec le gène *vanG* conférant la résistance à la vancomycine chez les souches d'entérocoques. La résistance à la vancomycine et à la téicoplanine chez *R. gauvreaui* CCRI-16110 pourrait être due à la présence simultanée des locus *vanD* et apparenté à *vanG*. Ainsi, nous caractérisons pour la première fois le locus *vanB* et le locus *vanD* dans deux nouvelles espèces bactériennes. Étant donné que le locus *vanD* n'a jamais été décrit ailleurs que chez les entérocoques, ce nouveau résultat montre une dissémination de ce locus entre genres bactériens. Le gène *vanG* décrit dans la nouvelle espèce *R. gauvreaui* a un ancêtre commun avec celui des ERG et peut se retrouver dans plusieurs genres bactériens. Les résultats de ces travaux sont présentés dans les chapitres IX et X. J'ai réalisé la conception de ce projet, la partie technique, l'analyse et la compilation des résultats, ainsi que la rédaction des manuscrits pour fin de publication.

CHAPITRE VI. EPIDÉMIOLOGIE DES GÈNES DE RÉSISTANCE AUX GLYCOPEPTIDES DANS LES SPÉCIMENS DE SELLES

Ce chapitre a fait l'objet d'une publication dans la revue *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (2005) 49:4784-4786 et est constitué de la version finale telle que publiée.

6.1 RÉSUMÉ

Sur la base de l'hypothèse selon laquelle le tube digestif pourrait constituer un réservoir des gènes de résistance aux glycopeptides, nous avons exploré la fréquence de ces gènes dans des échantillons cliniques de selles lors d'un programme de surveillance des porteurs d'ERG. Les échantillons de selles provenant de deux hôpitaux ont été criblés à la recherche des gènes *vanA*, *vanB*, *vanD*, *vanE* et *vanG*. Tous les gènes *vanA* détectés étaient associés aux ERG. Par contre, nous avons mis en évidence dans les deux hôpitaux, une fréquence élevée des gènes *vanB* (6.2 et 2.3%), *vanD* (43.8 et 26.7%) et *vanG* (10.5 et 6.9%) qui n'étaient pas associés aux ERG dans les échantillons de selles. Ces résultats viennent confirmer notre hypothèse de départ selon laquelle le tube digestif représente un réservoir de gènes *van*.

6.2 ARTICLE

High prevalence of glycopeptide resistance genes *vanB*, *vanD*, and *vanG* not associated with enterococci in human fecal flora.

M.-C. Domingo^{1,2}, A. Huletsky^{1,2}, R. Giroux¹, K. Boissinot^{1,2}, F.J. Picard^{1,2}, P. Lebel³, ⁴M.J. Ferraro, M.G. Bergeron^{1,2*}

¹Centre de Recherche en Infectiologie de l'Université Laval, CHUQ, Pavillon CHUL, Sainte-Foy, Québec, Canada, G1V 4G2

²Division de Microbiologie, Faculté de Médecine, Université Laval, Sainte-Foy, Québec, Canada

³Département de Microbiologie, Hôpital Général de Montréal, McGill University Health Center, Montréal, Québec, Canada

⁴Department of Clinical Microbiology, Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School, Boston, USA.

***Author for correspondence:** Centre de Recherche en Infectiologie de l'Université Laval, CHUQ (Pavillon CHUL), 2705 boul. Laurier, Sainte-Foy, Québec, G1V 4G2, Canada. Tel: (418) 654-2705. Fax: (418)-654-2715. E-mail: michel.g.bergeron@crchul.ulaval.ca

Running title: *van* Genes Prevalence in Human Fecal Flora

Abstract

The presence of enterococcal-associated vancomycin resistance *vanA*, *vanB*, *vanD*, *vanE*, and *vanG* genes in rectal swabs was investigated in two hospitals using PCR. All *vanA* genes detected were associated with vancomycin-resistant enterococci (VRE) whereas *vanB*-VRE were detected in only one hospital (4.7%). However, in both hospitals, a high prevalence of *vanB* (6.2 and 2.3%), *vanD* (43.8 and 26.7%), and *vanG* (10.5 and 6.9%) genes not associated with enterococci was found.

Text

Since their first appearance in 1988, vancomycin-resistant enterococci (VRE) have emerged worldwide and have become an increasing problem in clinical settings (5). Acquired glycopeptide resistance in *Enterococcus* species is due to the acquisition of *vanA*, *vanB*, *vanD*, *vanE*, and *vanG* genes resulting in the production of peptidoglycan precursors with reduced affinity to glycopeptide antibiotics (7). The origin of these *van* genes is still unknown but recent studies indicated that *vanB* resistance in enterococci might arise from gene transfer from the human bowel flora (1-3, 6). In this study, we investigated the presence of enterococcal-associated *vanA*, *vanB*, *vanD*, *vanE*, and *vanG* genes in human rectal swabs.

Two rectal swabs obtained from each of 162 patients at the Hôpital Général de Montréal (HGM, Montreal, Québec, Canada) and one rectal swab obtained from each of 86 patients at the Massachusetts General Hospital (MGH, Boston, USA) were used to detect *van*-associated enterococci. One of the two swabs from HGM and each swab from MGH were suspended in 1 mL of buffer and 50 µL of this suspension was used for DNA extraction as previously described (4). Conventional PCR amplifications were performed with crude

DNA extracts prepared from each rectal swab using primer pairs specific to *vanA*, *vanB*, *vanD*, *vanE*, or *vanG* genes (*vanA* primers: forward-AATAGCGCGGACGAATTGGAC, reverse-AACGCGGCACTGTTTCCCAA; *vanB* primers: forward-CTTAACGCTGCG ATAGAAGC, reverse-CTGATGGATGCGGAAGATAC; *vanD* primers: forward-TTTGTAAAGCCTGCCCCGTTT, reverse-CCAAGTAYCCGGTAAATCTTC; *vanE* primers: forward-AAATAATGCTCCATCAATTTGCTGA, reverse-ATAGTCGAAAA AGCCATCCACAAG; and *vanG* primers: forward-TTGGAGGCAATTCAACAGAGT, reverse-TCGCAGCCAACAACAGGTATT). The PCR conditions were as previously described (4), except for the annealing temperatures which varied from 58° C to 60° C depending on the *van*-specific primers used. Coamplification of a 250-bp fragment of plasmid M13pSL3 served as an internal control in all PCR reactions (4). Strict precautions to prevent carryover of amplified DNA and appropriate control reactions were used (4). The detection limit for each primer pair was approximately 5 genome copies per PCR reaction.

To recover *van*-associated enterococcal isolates from rectal swabs, a 300 µL aliquot of the swab suspension was used to inoculate 10 mL of Enterococcosel broth (Becton Dickinson, Cockeysville, MD, USA) containing 6 mg/L vancomycin and 60 mg/L aztreonam (EBVA), which was incubated aerobically for 24 h at 35°C. The other swab from HGM was directly placed into 10 mL of EBVA and incubated 24 h at 35°C. An aliquot of all EBVA cultures was plated onto both Enterococcosel agar containing 6 mg/L vancomycin (EAV) and blood agar plates which were incubated aerobically for 72 h at 35°C. Species identification and antibiotic (vancomycin and teicoplanin) susceptibility testing of all colonies resembling enterococci by phenotypic characteristic were performed using standard methods. All

enterococcal isolates recovered from a *van*-positive rectal swab were tested with PCR primers targeting the *van* gene(s) detected from this specimen.

PCR was positive for *vanA* for 23 out of 248 (9.3%) rectal swabs which were all shown to contain vancomycin-resistant *E. faecium* (n = 22) or *E. faecalis* (n = 1) harbouring *vanA*. PCR was positive for *vanB* for 16 out of 248 (6.5%) rectal swabs, from which 4 (1.6%) were shown to contain vancomycin-resistant *E. faecium* (n = 2) and *E. faecalis* (n = 2) harbouring *vanB* whereas twelve specimens (4.8%) did not contain any *vanB*-positive enterococci. Ninety-four out of 248 (37.9%) and 23 out of 248 (9.3%) specimens were positive for *vanD* and *vanG*, respectively, whereas no *vanD*- and *vanG*-positive enterococcal isolates were identified from these specimens (Table 1). No rectal swabs were PCR-positive for *vanE*. Among the *van*-positive specimens, several contained more than one *van* gene: two specimens contained both *vanA* and *vanB*, four specimens contained both *vanA* and *vanD*, four specimens contained both *vanD* and *vanG*, five specimens contained both *vanB* and *vanD*, two specimens contained both *vanB* and *vanG*, 13 specimens contained both *vanD* and *vanG*, one specimen contained *vanB*, *vanD*, and *vanG*, and one specimen contained *vanA*, *vanB*, *vanD*, and *vanG*. There was no significant PCR inhibition by any of the rectal swabs tested and all control reactions to which no target DNA was added confirmed the absence of DNA carryover.

We sequenced 13 *vanD* and 9 *vanG* PCR products from HGM as well as 15 *vanD* and 5 *vanG* PCR products from MGH. Sequence analysis of the *vanD* PCR products revealed that one *vanD* was most similar (98% identity) to both *vanD1* and *vanD3* (from Accession numbers AF130997 and AF175293, respectively), 5 were most similar (98.7 to 100% identity) to *vanD1*, 4 were most similar (98.4 to 100% identity) to *vanD3*, and 18 were

most similar (95.7 to 100% identity) to *vanD4* (from Accession number AF277571). The 14 *vanG* PCR products exhibited variable identities ranging from 77.4 to 100% with the *vanG* gene of *E. faecalis* BM4518 (from Accession number AY271782).

We recently isolated and characterized a *Clostridium* species carrying *vanB2* (3), from one of the *vanB*-positive rectal swabs of HGM described in the present study. This specimen was shown to contain both *vanB2* and *vanD1*, but *vanD1* was not carried by this *Clostridium* strain (data not shown). To isolate the bacteria harbouring *vanD* and *vanG*, a 300 μ L aliquot of the swab suspension from 10 *vanD*- and 7 *vanG*-positive rectal swabs of HGM was incubated anaerobically for 24 h at 35°C in Brain Heart Infusion broth supplemented with 0.001mg/mL vitamin K and 0.005 mg/mL haemin (eBHIB), and incubated aerobically for 24 h in BHI broth (BHIB). A PCR signal for *vanD* was detected using *vanD*-specific primers, in one eBHIB that had been incubated anaerobically whereas no PCR signal for *vanG* was detected in both aerobic and anaerobic broth cultures using *vanG*-specific primers. The PCR signal for *vanD* could be maintained following sequential passaging in eBHIB containing 32 mg/L vancomycin, 50mg/L aztreonam, or 1mg/L colistin. The PCR signal became negative in eBHIB with 8 mg/L metronidazole suggesting that the *vanD* gene was carried by an anaerobe. The eBHIB was subcultured onto eBHI agar containing 32 mg/L vancomycin (eBHIA) and incubated anaerobically for three days. From the several colony types that grew, only one was PCR positive for *vanD*. Gram staining of this colony showed the presence of both gram-positive and gram-negative cocci and bacilli with different shapes. This *vanD*-positive colony was subcultured onto eBHIA and blood agar, but it was not possible to isolate a pure *vanD*-positive bacteria. This suggests that the growth of this *vanD*-positive bacteria depends on a bacterial consortium.

Work is in progress to identify the factor(s) required for growth and isolation of the *vanD*- and *vanG*-containing bacteria in rectal swabs.

This study reports a high prevalence of *vanB*, *vanD*, and *vanG*-like genes not associated with enterococci in human rectal swabs. An anaerobic bacterial reservoir for *vanB* genes in human bowel was previously described in Australia and Québec (1-3, 6). Recent studies showed that the genetic elements carrying *vanB* in these anaerobes were similar to that found in enterococci (2, 3). The *vanD* and *vanG* genes have so far been found in few clinical isolates of *E. faecium* and *E. faecalis*, respectively, and recently a new allele of *vanG* was described in a *E. faecalis* strain isolated in Canada (D. A. Boyd, S. Tyler, B. Watson, F. Jamieson, S. Brown, and M. R. Mulvey, Abstr. 44th Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother., abstr. C1-948, 2004). The presence of anaerobic bacteria containing *vanB*, and probably *vanD* and *vanG*-like genes suggests that the intestinal flora, represents an important reservoir of several glycopeptide resistance genes. The recent emergence of clinical *Staphylococcus aureus* isolates containing *vanA*, emphasize the transfer potential of the glycopeptide resistance *van* genes in pathogenic species. Hospital infection control of VRE is presently based on the isolation of VRE carriers. The presence of human reservoirs, most likely anaerobic bacteria, carrying multiple vancomycin resistance genes, may seriously threaten the control of VRE dissemination.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by grant PA-15586 from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR), by grant 2201-181 from the Valorisation Recherche Québec (VRQ), and by Infectio Diagnostic (I.D.I.) Inc. (Sainte-Foy, Québec, Canada). M.-C. Domingo is a fellowship from the Bayer Healthcare/CIHR/AMMI Canada/CFID.

REFERENCES

1. **Ballard, S. A., E. A. Grabsch, P. D. Johnson, and M. L. Grayson.** 2005. Comparison of three PCR primer sets for identification of *vanB* gene carriage in feces and correlation with carriage of vancomycin-resistant enterococci: interference by *vanB*-containing anaerobic bacilli. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:77-81.
2. **Ballard, S. A., K. K. Pertile, M. Lim, P. D. Johnson, and M. L. Grayson.** 2005. Molecular characterization of *vanB* elements in naturally occurring gut anaerobes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:1688-1694.
3. **Domingo, M. C., A. Huletsky, A. Bernal, R. Giroux, D. K. Boudreau, F. J. Picard, and M. G. Bergeron.** 2005. Characterization of a *Tn5382*-like transposon containing the *vanB2* gene cluster in a *Clostridium* strain isolated from human faeces. *J. Antimicrob. Chemother.* **55**:466-474.
4. **Ke, D., C. Ménard, F. J. Picard, M. Boissinot, M. Ouellette, P. H. Roy, and M. G. Bergeron.** 2000. Development of conventional and real-time PCR assays for the rapid detection of group B streptococci. *Clin. Chem.* **46**:324-331.
5. **Patel, R.** 2003. Clinical impact of vancomycin-resistant enterococci. *J. Antimicrob. Chemother.* **51 Suppl 3**:13-21.
6. **Stinear, T. P., D. C. Olden, P. D. Johnson, J. K. Davies, and M. L. Grayson.** 2001. Enterococcal *vanB* resistance locus in anaerobic bacteria in human faeces. *Lancet* **357**:855-856.
7. **Woodford, N.** 2001. Epidemiology of the genetic elements responsible for acquired glycopeptide resistance in enterococci. *Microb. Drug Resist.* **7**:229-236.

Table 1. Prevalence of vancomycin resistance genes in human rectal swabs

<i>van</i> gene	<i>van</i> -positive specimens					
	<i>van</i> genes NOT associated with enterococci			<i>van</i> genes associated with enterococci		
	Number of positive specimens (%)		Total	Number of positive specimens (%)		Total
	HGM ^a	MGH ^b	Both hospitals	HGM ^a	MGH ^b	Both hospitals
<i>vanA</i>	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	7 (4.3%)	16 (18.6%)	23 (9.3%)
<i>vanB</i>	10 (6.2%)	2 (2.3%)	12 (4.8%)	0 (0%)	4 (4.7%)	4 (1.6%)
<i>vanD</i>	71 (43.8%)	23 (26.7%)	94 (37.9%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
<i>vanE</i>	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
<i>vanG</i>	17 (10.5%)	6 (6.9%)	23 (9.3%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Total specimens tested	162	86	248	162	86	248

^aHGM, Hôpital Général de Montréal

^bMGH, Massachusetts General Hospital

CHAPITRE VII. CARACTÉRISATION DE LA NOUVELLE ESPÈCE *Clostridium lavalense* sp. nov., RÉSISTANTE À LA VANCOMYCINE

Ce chapitre est la version finale du manuscrit qui sera soumis pour publication dans la revue *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*.

7.1 RÉSUMÉ

Deux bacilles à Gram positif, anaérobies strictes, ont été isolés de spécimens cliniques de selles humaines provenant du Québec (souche CCRI-9842) et d'Australie (souche CCRI-9929). Ces deux souches sont résistantes à la vancomycine et contiennent le gène *vanB2*. Elles ont été caractérisées sur les plans phénotypiques et génotypiques. Les analyses génétiques ont montré qu'il s'agissait de deux souches génétiquement proches dont les séquences des gènes de l'ARNr 16S possèdent entre elles 99.8 % d'identité. La construction d'un arbre phylogénétique a montré que ces deux souches appartiennent au groupe phylogénétique XIVa des *Clostridium* et forment au sein de ce groupe une branche bien distincte. Les espèces les plus proches des souches CCRI-9842 et 9929 sont *Clostridium asparagiforme*, et *Clostridium bolteae*. Cependant, les souches CCRI-9842 et CCRI-9929 se distinguent sur le plan morphologique, biochimique et phylogénétique de *Clostridium asparagiforme* et *Clostridium bolteae*. Par conséquent, nous avons conclu que les souches CCRI-9842 et CCRI-9929 représentent une nouvelle espèce et avons suggéré comme nom d'espèce *Clostridium lavalense*. La souche de référence de *Clostridium lavalense* est CCRI-9842^T (=CCUG 54291^T= CIP 109511^T).

7.2 ARTICLE

***Clostridium lavalense* sp. nov., a Glycopeptide-Resistant *Clostridium* Isolated from Human faeces.**

M.-C. Domingo^{1,2}, A. Huletsky^{1,2}, M. Boissinot^{1,2}, A. Bernal³, K. A. Bernard^{4,5}, S. Ballard⁶, F. J. Picard^{1,2}, M.G. Bergeron^{1,2*}

¹Centre de Recherche en Infectiologie de l'Université Laval, CHUQ, Pavillon CHUL, 2705 boul Laurier, Québec, Québec, Canada, G1V 4G2

²Division de Microbiologie, Faculté de Médecine, Université Laval, Sainte-Foy, Québec, Canada

³BD-GeneOhm Inc., 2050 boul. René Levesque O., 4e étage, Sainte-Foy, Québec, Canada G1V 2K8

⁴National Microbiology Laboratory, Health Canada H5040-1015 Arlington St., Winnipeg, Manitoba, Canada

⁵Department of Medical Microbiology, University of Manitoba, Winnipeg, Canada

⁶Infectious Diseases Department, Austin Health, Department of Medicine, Melbourne, Australia

***Author for correspondence:** Centre de Recherche en Infectiologie de l'Université Laval, CHUQ (Pavillon CHUL), 2705 boul. Laurier, Québec, Québec, G1V 4G2, Canada.

Tel: (418) 654-2705. Fax: (418)-654-2715. E-mail: michel.g.bergeron@crchul.ulaval.ca

Running title: *Clostridium lavalense* sp. nov.

Key words: *Clostridium lavalense*, vancomycin resistance, *vanB* gene cluster

The subject category for the content list: New taxon (Subsection Gram-positive Bacteria)

Footnote: The GenBank/EMBL/DDBJ accession number for the 16S rRNA gene sequences of *Clostridium lavalense* CCUG-54291^T (= CIP 109511) and CCRI-9929 are EF564277 and EF564278, respectively.

SUMMARY

Two vancomycin-resistant strictly anaerobic Gram-positive, rod-shaped, spore-forming organisms (strain CCRI-9842 and CCRI-9929), isolated from human faecal specimens concomitantly in Québec and Australia were characterized using phenotypic, biochemical, and molecular taxonomic methods. Pairwise analysis of 16S rRNA sequences showed that both strains were genetically highly related to each other (displaying 99.8 % sequence identity) and represented a previously unknown sub-line within the *Clostridium coccoides* rRNA group of organisms (rRNA cluster XIVa of *Clostridium*). Strains CCRI-9842 and CCRI-9929 used carbohydrates as fermentable substrates, producing acetic acid as the major products of glucose metabolism. The described species most closely related to these strains corresponded to *Clostridium asparagiforme*, *Clostridium bolteae*, and *Clostridium clostridioforme*. However, morphological, biochemical, and phylogenetic studies demonstrated that these two strains represent a previously unidentified species. Cellular fatty acids composition confirmed the uniqueness of the unknown species. Therefore, based on polyphasic taxonomy evidence, it is proposed that these two strains be named as *Clostridium lavalense* sp. nov. The type strain of *Clostridium lavalense* is CCRI-9842^T (CCUG 54291^T, = CIP 109511^T).

INTRODUCTION

Accurate analysis of the microbial ecosystem in human digestive tract is always a challenging topic for microbiologists because of the interactions between complex bacterial communities, host cells, and their implications in human health (Backhed *et al.*, 2005; Hooper *et al.*, 2002; Zoetendal *et al.*, 2006). Human gut microbiota consists of more than 400 different species (Eckburg *et al.*, 2005). The majority of these species described so far consists of obligate anaerobes which can be assigned to *Bacteroides* group, *Clostridium coccooides* group (rRNA cluster XIVa), and *Clostridium leptum* group (rRNA cluster IV) (Collins *et al.*, 1994; Eckburg *et al.*, 2005; Franks *et al.*, 1998; Hold *et al.*, 2002; Maukonen *et al.*, 2006; Suau *et al.*, 1999). The genus *Clostridium* has been delimited by 16S rRNA gene sequence analysis into 19 phylogenetic clusters (Collins *et al.*, 1994). The cluster XIVa represents one of the most important clostridial clusters which contain a combination of intermixing *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Eubacterium*, *Acetitomaculum*, *Roseburia*, and *Coprococcus* genera. Although the human gut microbiota has been investigated extensively by several groups, using both traditional culture methods and molecular techniques, it is well recognized that this flora contains a large number of unknown species belonging to the *Clostridium* groups (Eckburg *et al.*, 2005; Suau *et al.*, 1999).

Two strains, CCRI-9842 (= NML 03-A-015) and CCRI-9929 (= NML 03-A-014, = MLG245), both harbouring the *vanB2* vancomycin resistance locus have been previously isolated from human faecal specimens in Québec (Canada) and Melbourne (Australia), while screening human faecal specimens to detect carriers of vancomycin-resistant enterococci (VRE) (Domingo *et al.*, 2005; Stinear *et al.*, 2001). In this study we characterized the phenotypic profile and phylogenetic relationships of these strains.

Polyphasic taxonomic analysis presented here revealed that the two strains belong to a new species, *Clostridium lavalense* sp. nov., that we describe here.

MATERIALS AND METHODS

Clinical isolates and phenotypic identification. During a screening program to detect vancomycin-resistant enterococci (VRE) in clinical settings in Québec (Canada) and Melbourne (Australia), two anaerobic bacterial strains, CCRI-9842 (= NML 03-A-015) and CCRI-9929 (= NML 03-A-014 = MLG245), were isolated in 2001 from faecal specimens of patients tested for VRE colonisation (Domingo *et al.*, 2005; Stinear *et al.*, 2001). No further information was collected from these patients. The isolates were stored at -80° C in 20% glycerol. These strains were subcultured twice on BHI blood agar containing 0.005 mg haemin ml⁻¹ and 0.001 mg vitamin K ml⁻¹. Phenotypic identification tests were performed as described in the Wadsworth and VPI anaerobic manuals (Holdeman *et al.*, 1977; Jousimies-Somer *et al.*, 2002) at the Centre de Recherche en Infectiologie (CRI) of l'Université Laval (Québec, Canada) and at the National Microbiology Laboratory, (Winnipeg, Canada). Morphology was observed by optical (Leitz light Wetzlar, Germany) and transmission electron microscopy (JEOL 1200EX, Tokyo, Japan). Degree of growth was observed in Peptone-Yeast (PY) broth enriched with dextrose (PYD) with or without bile (PYD + bile), serum (PYD + serum), tween (PYD + tween) or formate fumarate (PYD + FF). Fermentation tests of different sugars including adonitol, amygdalin, D-arabinose, D-cellobiose, erythritol, D-fructose, D-galactose, D-glucose, glycerol, glycogen, inositol, inulin, D-lactose, α -D-melibiose, α -D-melezitose, D-maltose, D-mannitol, D-mannose, α -D-raffinose, L-rhamnose, D-ribose, D-salicin, D-sorbitol, sucrose, D-trehalose, L-xylose, and starch were performed using pre-reduced, anaerobically sterilized PY sugars broth tubes purchased from Med-Ox Diagnostics Inc., (Ottawa, Canada). Other tests such as catalase, aesculin, indole, lecithinase, lipase, nitrate, oxidase were done as previously

described (Jousimies-Somer *et al.*, 2002). The isolates were examined with preformed enzyme tests including the Rapid ID 32A and API ZYM systems from bioMérieux (Montréal, Canada) as well as the Rapid ANA II from Remel (Oxoid, Ottawa, Canada) according to the manufacturer's instructions. Gas-liquid chromatography analysis of metabolic end-products of fermentation was done as previously described (Bernard *et al.*, 2002) except that the Anaerobe system broth was acquired from Med-Ox Diagnostics Inc. (Ottawa, On). Cellular fatty acid composition and library generation analyses were performed using the MIDI, Sherlock system and LGS software (MIDI, Newark, USA) as previously described (Bernard *et al.*, 2002).

Resistance profile. The special-potency disks identification of colistin (10 µg), kanamycin (1000 µg), vancomycin (5 µg), and metronidazole (5 µg), all from (Oxoid, Ottawa, Canada) were used as recommended in the Wadsworth manual (Jousimies-Somer *et al.*, 2002). Minimal inhibitory concentrations (MICs) of vancomycin and metronidazole were determined by the agar dilution method for anaerobes according to the Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) (NCCLS, 2004), whereas MIC for teicoplanin was determined by the Etest method (AB Biodisk, Sweden). The media used for antimicrobial susceptibility testing was Brucella agar (Difco, Detroit, USA) supplemented with laked sheep blood, 1 µg vitamin K ml⁻¹, and 5 µg haemin ml⁻¹.

Genotypic identification. Total DNA from strains CCRI-9842 and CCRI-9929 were purified with the GNOME DNA kit (Qbiogene Inc., Carlsbad, USA.) according to the manufacturer's instructions. PCR reactions to amplify a 1466-bp region of the 16S rRNA genes (Paradis *et al.*, 2005) were performed using purified genomic DNA as previously

described (Ke *et al.*, 1999). Sequencing of the specific amplification products was also performed as previously described (Domingo *et al.*, 2005).

Phylogenetic analysis. To identify the taxonomic neighbours of strains CCRI-9842 and CCRI-9929, 16S rRNA gene sequences were used for an initial BLAST search against the GenBank database. Subsequently, bacterial species closely related to strains CCRI-9842 and CCRI-9929 were used for phylogenetic analysis. Multiple sequence alignments were performed using CLUSTALW from the GCG package (Wisconsin Package Version 10.3, Accelrys Inc., San Diego, USA). Phylogenetic analysis was carried out by the neighbour-joining method (Saitou and Nei, 1987) using MEGA version 3.1 (Kumar *et al.*, 2004). Evolutionary distance matrices were generated according to the Kimura II parameter for nucleotide sequences (Kimura, 1980). Bootstrap values were calculated from 1000 resamplings to test the robustness of the data. The final 16S rRNA phylogenetic tree was rooted with *Fusobacterium nucleatum* and *Propionigenium modestum* (cluster XIX) as outgroup. Bootstrap values were displayed as percentages.

RESULTS AND DISCUSSION

The strains CCRI-9842 and CCRI-9929 isolated from human faecal specimens were found to be strictly anaerobic Gram-positive rod-shaped organisms with tapered ends. Cells were 0.8-1.5 μm wide by 2.5-6 μm long and sub-terminal spores were observed (Fig.1). The isolates grew well anaerobically, but no growth occurred following subculture in an atmosphere of 5% O_2 . Growth was enhanced in the presence of glucose and formate-fumarate for both strains as well as in the presence of bile and serum for strain CCRI-9929 (Table 1). Neither strain was inhibited by tween. After 48 h incubation on blood agar at 37 $^\circ\text{C}$ under anaerobic atmosphere, colonies of both strains were 2-3 mm in diameter, greyish-white in color with irregular edges. The centre of the colonies was slightly raised and no zone of hemolysis was observed on blood agar. The colonies of strain CCRI-9842 were strongly adherent on blood agar whereas strain CCRI-9929 formed non adherent colonies on blood agar medium. This adherence of strain CCRI-9842 disappeared progressively after several subcultures on agar medium. Cells of both isolates were motile. Both strains were susceptible to 1000 μg kanamycin and 5 μg metronidazole while they were resistant to 10 μg colistin and 5 μg vancomycin identification disks. Agar dilution susceptibility test showed that both strains were resistant to vancomycin ($\text{MIC} > 256 \mu\text{g/ml}$), and susceptible to teicoplanin ($\text{MIC} < 1.5 \mu\text{g/ml}$) and metronidazole ($\text{MIC} = 0.064 \mu\text{g/ml}$).

Both isolates were indole-positive and catalase-negative. Nitrate was reduced in strain CCRI-9842 but not in strain CCRI-9929. Both isolates utilized a wide range of saccharides including D-glucose, D-galactose, D-fructose, D-lactose, D-maltose, D-mannose, D-trehalose, sucrose and D-salicin when grown in carbohydrate broths, but failed to produce acid from adonitol, amygdalin, glycerol, glycogen, inositol, erythritol, inulin, D-mannitol,

α -D-melezitose, L-rhamnose and starch. The utilization of D-arabinose, D-cellobiose, D-ribose, α -D-melibiose, α -D-raffinose, D-sorbitol and L-xylose were either weak, negative, or different in both strains (Table 1). No liquefaction of gelatin or peptonisation of milk occurred in either strain. Neither were able to hydrolyse urea and starch. Hydrolysis of aesculin was weak for strain CCRI-9929 and negative for strain CCRI-9842. Neither isolate produced catalase, oxidase, lecithinase, lipase, or H₂S. The major end product of glucose metabolism for both isolates is acetic acid. The enzymatic profile using Rapid ID 32A and API ZYM is summarized in Table 1. Both strains belong to the genus *Clostridium* as they are obligatory anaerobic, endospore-forming, Gram-positive bacilli. Based on the cultural, biochemical characteristics, and glycopeptide susceptibility profile, it is evident that these isolates recovered from human faecal specimen in Québec and Australia closely resembled each other and likely belong to the same species.

To determine the phylogenetic relationships of these *Clostridium* species, comparative 16S rRNA gene sequence analysis was performed. The two isolates (CCRI-9842^T and CCRI-9929) were found to be genetically very closely related to each other, displaying 99.2% 16S rRNA gene sequence identity. Searches in the sequence database revealed that the unidentified isolates were closely related to members of cluster XIVa of *Clostridium* (Collins *et al.*, 1994). Based on sequence identity of 16S rRNA genes, the closest relatives of the unidentified isolates were *Clostridium asparagiforme* (< 97.4%), *Clostridium boltei* (< 96.8%), and *Clostridium clostridioforme* (< 94.8%). A tree providing the phylogenetic relationships of the unknown isolates, constructed by using the neighbour-joining method, is shown in Fig. 2. This phylogenetic tree based on 16S rRNA demonstrates that these two isolates represent a hitherto unknown subline within the cluster XIVa of *Clostridium*.

These unknown bacteria fit in the *Clostridium coccooides* rRNA complex (cluster XIVa of *Clostridium*) (Collins *et al.*, 1994) in which it is clustered within a distinct subgroup including *Clostridium asparagiforme*, *Clostridium bolteae*, *Clostridium clostridioforme*, *Clostridium citroniae*, and *Clostridium aldenense*. Pairwise comparison of 16S rRNA gene sequences revealed a divergence of 2.6% with *Clostridium asparagiforme*, 3.2% with *Clostridium bolteae*, and 5.2% with *Clostridium clostridioforme*. It is generally accepted that organisms displaying values close to 3% or more when comparing 16S rRNA gene sequences do not belong to the same species (Stackebrandt and Goebel, 1994). However, since the observed genetic difference between the unknown bacterium and *Clostridium asparagiforme* is slightly less than this guideline, several characteristics including geographic site of isolation, morphology, biochemical profile, 16S rRNA tree topology that are useful to distinguish them were considered. Strains CCRI-9842 and CCRI-9929 of the unknown bacterium isolated from human faecal specimen in Québec and Australia, respectively, are resistant to vancomycin and harbour the *vanB* gene cluster. The morphology of these strains is different from the asparagus shape observed in *C. asparagiforme* (Fig.1). These new isolates also differed from *C. asparagiforme* by production of acid from arabinose, mannose, and xylose (Table 1). Enzymatic activities for the unknown bacteria differed from *C. asparagiforme* by showing negative reactions for α -glucosidase, α -fucosidase, α -galactosidase, β -galactosidase, and α -glucosidase. Acetic acid was the major end product with minor yields of lactate and succinate from glucose metabolism by the unknown bacteria whereas acetic acid, lactate, and ethanol were major products for *C. asparagiforme*. Long-chain cellular fatty acids profile showed that strains CCRI-9842 and CCRI-9929 differ from *C. asparagiforme* in several aspects (Table 2). Moreover, the branching pattern in the 16S rRNA tree shows clearly that the unidentified

bacteria represents a separate species within cluster XIVa of *Clostridium*. The polyphasic taxonomy data presented here support convincingly that, despite close relationships with *C. asparagiforme*, the unidentified bacteria warrant classification as a novel species. Therefore, we proposed that the unknown bacteria isolated from humans be designated as a new species named *Clostridium lavalense* sp. nov.

DESCRIPTION OF *Clostridium lavalense* sp. nov. CCRI-9842

Clostridium lavalense (la.va.len'se. N.L. neut. adj. lavalense pertaining to our institution, Université Laval, Québec, Canada.) cells are strictly anaerobic, Gram-positive rod (0.8-1.5 μm wide by 2.5-6 μm long) with tapered ends. This bacterium was able to form subterminal spores (Figure 1). On this basis, strain CCRI-9842 was designated *Clostridium*. Growth of this strain occurred under anaerobic conditions at 35-37°C but no growth occurred following subculture under a 5% O₂ atmosphere. After 48h of incubation under anaerobic conditions, the colonies were approximately 2 mm in diameter and greyish-white in color. The centre of the colonies was slightly raised and their edges were rough. Zones of hemolysis were absent. Strain CCRI-9842 was strongly adherent to agar media. Chemotaxonomic data showed that this strain produced acetic acid as the major product of fermentation. Acid is produced from D-glucose, D-galactose, D-fructose, D-lactose, D-maltose, D-mannose, D-trehalose, sucrose and D-salicin. Acid is not produced from adonitol, amygdalin, glycerol, glycogen, inositol, erythritol, inulin, D-mannitol, α -D-melezitose, L-rhamnose, and starch. Aesculin, gelatine, and urea are not hydrolysed. Lecithinase and lipase are negative. Indole is produced. The predominant cellular fatty acids detected are C16:0, C18: cis9, C18: cis11 DMA, and C14:0. Strain CCRI-9842 is

susceptible to kanamycin (1000 µg) and to metronidazole (5 µg), but resistant to colistin (10 µg) and to vancomycin (MIC > 256 µg ml⁻¹) due to the presence of the glycopeptide resistance gene *vanB*. This strain has been isolated from human faecal material. Extent of habitat is not known, but is probably the mammalian gastrointestinal tract. The type strain of *Clostridium lavalense* (CCRI-9842^T) has been deposited in the CCUG as CCUG 54291^T and in the CIP as CIP 109511^T.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Emma Ongansoy for technical assistance. We are grateful to Prof. Hans G. Trüper for his advice in naming the novel species. We also thank Dr. Pierre Lebel from the Montreal General Hospital for providing faecal specimens. This study was supported by grant PA-15586 from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) and by grant 2201-181 from the Valorisation Recherche Québec (VRQ). M.-C. Domingo is a research fellow of from BayerHealthcare/CIHR/Association of Medical Microbiology and Infectious Disease Canada/Canadian Foundation for Infectious Diseases.

REFERENCES

- Backhed, F., Ley, R. E., Sonnenburg, J. L., Peterson, D. A., & Gordon, J. I. (2005). Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* **307**, 1915-1920.
- Bernard, K. A., Shuttleworth, L., Munro, C., Forbes-Faulkner, J. C., Pitt, D., Norton, J. H., & Thomas, A. D. (2002). *Propionibacterium australiense* sp.nov. Derived from Granulomatous Bovine Lesions. *Anaerobe* **8**, 41-47.
- Collins, M. D., Lawson, P. A., Willems, A., Cordoba, J. J., Fernandez-Garayzabal, J., Garcia, P., Cai, J., Hippe, H., & Farrow, J. A. (1994). The phylogeny of the genus *Clostridium*: proposal of five new genera and eleven new species combinations. *Int J Syst Bacteriol* **44**, 812-826.
- Domingo, M. C., Huletsky, A., Bernal, A., Giroux, R., Boudreau, D. K., Picard, F. J., & Bergeron, M. G. (2005). Characterization of a Tn5382-like transposon containing the *vanB2* gene cluster in a *Clostridium* strain isolated from human faeces. *J Antimicrob Chemother* **55**, 466-474.
- Drancourt, M., & Raoult, D. (2005). Sequence-based identification of new bacteria: a proposition for creation of an orphan bacterium repository. *J Clin Microbiol* **43**, 4311-4315.
- Eckburg, P. B., Bik, E. M., Bernstein, C. N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S. R., Nelson, K. E., & Relman, D. A. (2005). Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* **308**, 1635-1638.
- Franks, A. H., Harmsen, H. J., Raangs, G. C., Jansen, G. J., Schut, F., & Welling, G. W. (1998). Variations of bacterial populations in human feces measured by fluorescent *in situ* hybridization with group-specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Appl Environ Microbiol* **64**, 3336-3345.
- Hold, G. L., Pryde, S. E., Russell, V. J., Furrie, E., & Flint, H. J. (2002). Assessment of microbial diversity in human colonic samples by 16S rDNA sequence analysis. *FEMS Microbiol Ecol* **39**, 33-39.
- Holdeman, L. V., Cato, E. P., & Moore, W. E. C. (1977). *Anaerobe Laboratory Manual*. 4th ed. Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, VA.
- Hooper, L. V., Midtvedt, T., & Gordon, J. I. (2002). How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annu Rev Nutr* **22**, 283-307.
- Jones, D. T., Taylor, W. R., & Thornton, J. M. (1992). The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Comput Appl Biosci* **8**, 275-282.

- Jousimies-Somer, H. R., Summanen, P., Citron, D. M., Baron, E. J., Wexler, H. M., & Finegold, S. M. (2002).** Wadsworth Anaerobic Bacteriology Manual. 6th edn. Belmont, CA: Star Publishing.
- Ke, D., Boissinot, M., Huletsky, A., Picard, F. J., Frenette, J., Ouellette, M., Roy, P. H., & Bergeron, M. G. (2000).** Evidence for horizontal gene transfer in evolution of elongation factor Tu in enterococci. *J Bacteriol* **182**, 6913-6920.
- Ke, D., Picard, F. J., Martineau, F., Ménard, C., Roy, P. H., Ouellette, M., & Bergeron, M. G. (1999).** Development of a PCR assay for rapid detection of enterococci. *J Clin Microbiol* **37**, 3497-3503.
- Kimura, M. (1980).** A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* **16**, 111-120.
- Kumar, S., Tamura, K., & Nei, M. (2004).** MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform* **5**, 150-163.
- Maukonen, J., Satokari, R., Matto, J., Soderlund, H., Mattila-Sandholm, T., & Saarela, M. (2006).** Prevalence and temporal stability of selected clostridial groups in irritable bowel syndrome in relation to predominant faecal bacteria. *J Med Microbiol* **55**, 625-633.
- Mohan, R., Namsolleck, P., Lawson, P. A., Osterhoff, M., Collins, M. D., Alpert, C. A., & Blaut, M. (2006).** *Clostridium asparagiforme* sp. nov., isolated from a human faecal sample. *Syst Appl Microbiol* **29**, 292-299.
- NCCLS. (2004).** Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria; Approved Standard - Sixth Edition. **M11-A6; 24.**
- Paradis, S., Boissinot, M., Paquette, N., Bélanger, S. D., Martel, E. A., Boudreau, D. K., Picard, F. J., Ouellette, M., Roy, P. H., & Bergeron, M. G. (2005).** Phylogeny of the *Enterobacteriaceae* based on genes encoding elongation factor Tu and F-ATPase beta-subunit. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**, 2013-2025.
- Saitou, N., & Nei, M. (1987).** The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**, 406-425.
- Song, Y., Liu, C., Molitoris, D. R., Tomzynski, T. J., Lawson, P. A., Collins, M. D., & Finegold, S. M. (2003).** *Clostridium bolteae* sp. nov., isolated from human sources. *Syst Appl Microbiol* **26**, 84-89.
- Stackebrandt, E., & Goebel, B. M. (1994).** Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J Syst Bacteriol* **44**, 846-849.

Stackebrandt, E., Kramer, I., Swiderski, J., & Hippe, H. (1999). Phylogenetic basis for a taxonomic dissection of the genus *Clostridium*. *FEMS Immunol Med Microbiol* **24**, 253-258.

Stinear, T. P., Olden, D. C., Johnson, P. D., Davies, J. K., & Grayson, M. L. (2001). Enterococcal *vanB* resistance locus in anaerobic bacteria in human faeces. *Lancet* **357**, 855-856.

Suau, A., Bonnet, R., Sutren, M., Godon, J. J., Gibson, G. R., Collins, M. D., & Dore, J. (1999). Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Appl Environ Microbiol* **65**, 4799-4807.

Zoetendal, E. G., Vaughan, E. E., & de Vos, W. M. (2006). A microbial world within us. *Mol Microbiol* **59**, 1639-1650.

Table 1. Characteristics useful for differentiating *C. lavalense* from *C. clostridioforme*, *C. bolteae*, and *C. asparagiforme*.

Substrates	<i>C. lavalense</i>		<i>C. clostridioforme</i> ^a	<i>C. bolteae</i> ^a	<i>C. asparagiforme</i> ^a
	CCRI-9842	CCRI-9929			
Indole production	+	+	-	-	+
<i>Acid from:</i>					
D-Arabinose	w	w	+	+	-
D-Cellobiose	-	w	NA	NA	NA
D-Mannose	+	+	+	+	-
α-D-Mélibiose					
α-D-Raffinose	-	+	+	NA	-
D-ribose	w	w	+	-	NA
D-Sorbitol	w	-	-	+	NA
L-Xylose	W	+	+	+	-
<i>Enzyme activity:</i>					
α-galactosidase	-	w	NA	NA	+
β-galactosidase	+	+	-	+	+
α-glucosidase	-	-	+	-	+
α-fucosidase	-	-	NA	NA	+
NaphtolAS-BI	+	+	NA	NA	-
phosphohydrolase					
β-glucuronidase	-	w	NA	NA	-
<i>End product of</i>	A, l, s	A, l, s	A, L, E	A, L	A, L, E, h, f
<i>glucose metabolism</i> ^b					

^a Data from Song *et al.*, 2003 and Mohan *et al.*, 2006

^b End products of glucose metabolism are A, acetic acid; E, ethanol; f, formate; h, hydrogen; L or l, lactate; s succinic. Minor products are indicated by lower-case letters. w, weak reaction; NA, data not available

Table 2. Amounts of cellular fatty acids expressed in percentage differentiating *C. lavalense* from *C. asparagiforme*, *C. bolteae*, and *C. clostridioforme*.

Fatty acids	<i>C. lavalense</i>		<i>C. asparagiforme</i> ^a	<i>C. bolteae</i> ^a	<i>C. clostridioforme</i> ^a
	CCRI-9842	CCRI-9929			
16:0	27.96	25.34	14.84	12.6	25.16
18:1 cis9	10.32	6.17	5.77	6.1	4.41
18:1 cis11 DMA	8.80	9.18	NA	NA	NA
14:0	8.07	12.49	5.84	11.67	9.42
16:1 cis9	7.59	7.57	3.04	16.03	7.5
16:0 DMA	5.80	5.73	8.14	1.38	6.08
16:1 cis9 DMA	5.42	9.48	13.76	12.6	7.83
18:0	2.94	1.03	0.43	—	—
18:1 cis9 DMA	1.29	1.94	5.42	6.07	4.2
16:1 cis7	1.14	0.79	NA	NA	NA
16:0 aldehyde	1.09	1.25	NA	NA	NA
12:0	0.63	0.67	0.33	0.64	0.43
18:0 12OH	0.55	0.33	NA	NA	NA
14:0 DMA	0.49	1.22	1.29	0.67	2.2
18:0 DMA	0.47	0.40	0.54	0.26	0.9
16:1 cis11	0.29	0.31	NA	NA	NA
14:1 cis7 DMA	0.23	0.50	0.73	0.71	0.49
10:0	0.21	0.14	NA	NA	NA
18:0 aldehyde	0.18	—	0.41	1.39	0.47
20:1 cis 11	0.17	0.16	NA	NA	NA
11:0 DMA	0.13	0.26	0.33	NA	0.22
14:1 cis9	0.13	—	NA	NA	NA

^a Data from Mohan *et al.*, 2006

NA, data not available

-, data are absent

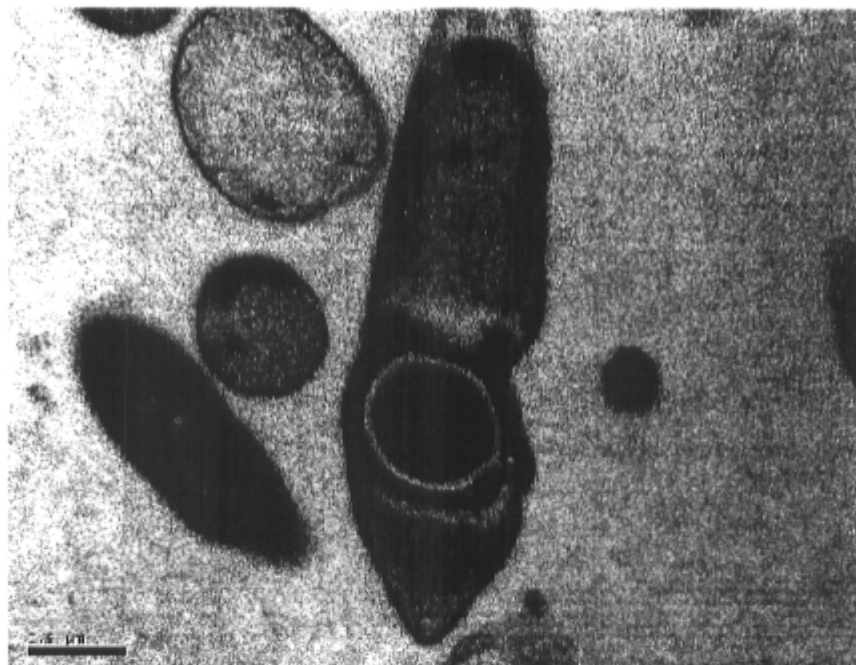


Fig. 1. Transmission electron micrograph of thin-sectioned cells of *Clostridium lavalense*

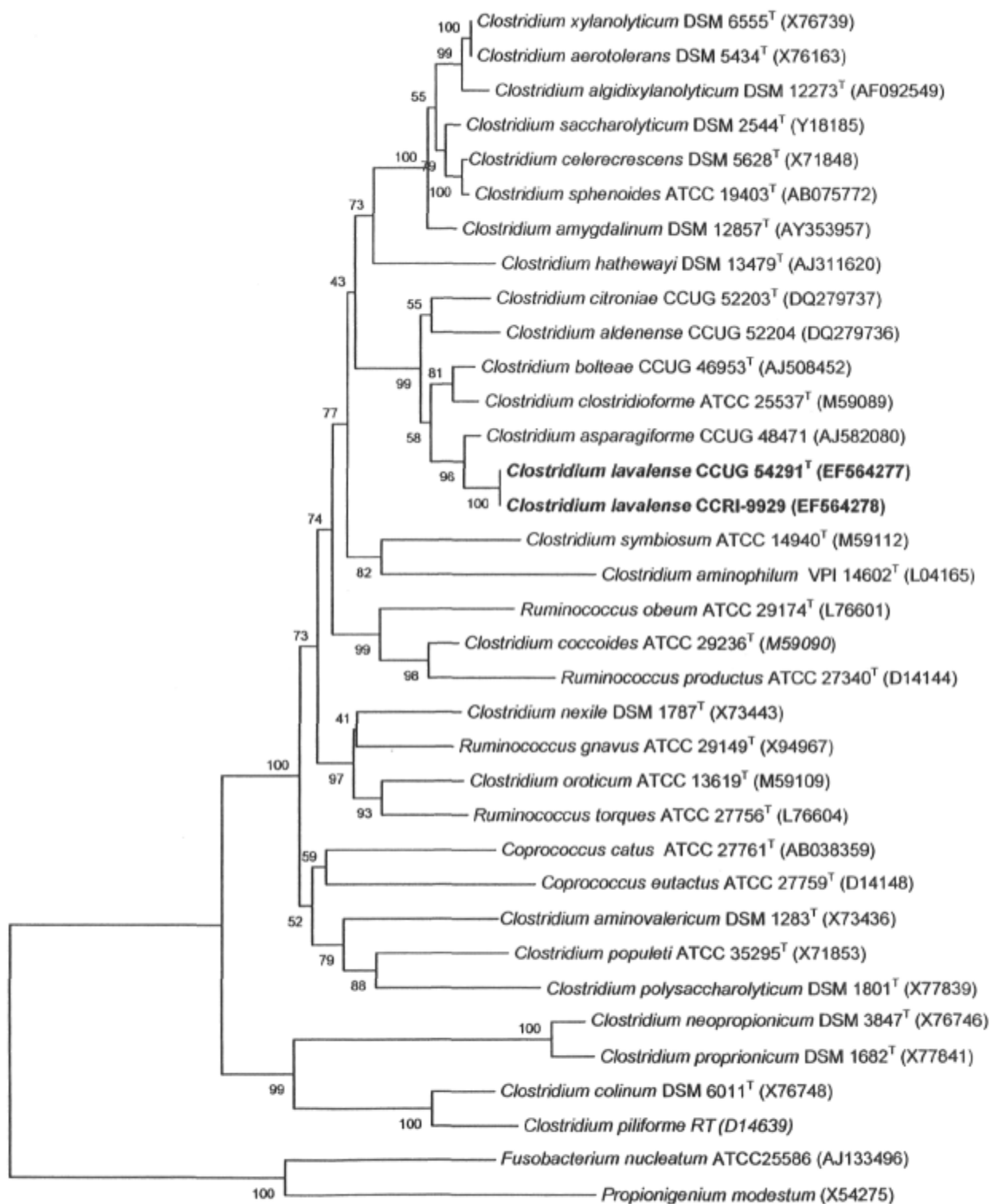


Fig. 2. Phylogenetic tree based on 16S rDNA showing the relationships of *Clostridium lavalense* sp. nov within the cluster XIVa of *Clostridium*. *Fusobacterium nucleatum* and *Propionigenium modestum* (Cluster XIX of *Clostridium*) were used as outgroup. The tree constructed using the neighbour-joining method based on a comparison of 1009 nucleotides of 16S rRNA genes. Bootstrap values, expressed as a percentage of 1000 replications, are given at each branching point. GenBank accession numbers for each selected sequence are given in parentheses.

CHAPITRE VIII. CARACTÉRISATION DE LA NOUVELLE ESPÈCE *Ruminococcus gauvreaui* sp. nov., RÉSISTANTE À LA VANCOMYCINE

Ce chapitre est la version finale du manuscrit en cours de révision dans la revue *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*.

8.1 RÉSUMÉ

Une souche anaérobie stricte résistante à la vancomycine a été isolée à partir d'un échantillon clinique de selles. Une réaction d'amplification PCR avec des amorces ciblant le gène *vanD* s'est révélé positive. Cette bactérie a été phénotypiquement et génotypiquement caractérisée dans ce chapitre. À la coloration de Gram, on pouvait observer des cocci à Gram positif isolés ou disposés en chaînette. Cette bactérie anaérobie stricte était incapable d'hydrolyser l'esculine et de métaboliser certains sucres comme le D-cellobiose, le D-lactose et le D-raffinose. L'acide acétique représente le seul produit de fermentation du glucose chez cette souche. La construction d'un arbre phylogénétique à partir des séquences des gènes de l'ARNr 16S et *tuf* a montré que cette souche était proche des espèces du genre *Ruminococcus* et *Clostridium* et appartenait au groupe phylogénétique XIVa des *Clostridium*. Sur la base des caractéristiques phénotypiques, génotypiques et taxonomiques, nous avons conclu qu'il s'agissait d'une nouvelle espèce anaérobie à laquelle nous avons assigné le nom *Ruminococcus gauvreaui*. La souche de référence de cette nouvelle espèce est CCRI-16110^T (= CCUG 54292^T).

8.2 ARTICLE

***Ruminococcus gauvreaui* sp. nov., Isolated from a Human Faecal Specimen and Resistant to Glycopeptides.**

M.-C. Domingo^{1,2}, A. Huletsky^{1,2}, M. Boissinot^{1,2}, K. A. Bernard^{3,4}, F. J. Picard^{1,2}, M. G. Bergeron^{1,2*}

¹Centre de Recherche en Infectiologie de l'Université Laval, CHUQ, Pavillon CHUL, 2705 boul Laurier, Québec, Québec, Canada, G1V 4G2

²Division de Microbiologie, Faculté de Médecine, Université Laval, Québec, Québec, Canada

³National Microbiology Laboratory, Health Canada H5040-1015 Arlington St., Winnipeg, Manitoba, Canada

⁴Department of Medical Microbiology, University of Manitoba, Winnipeg, Canada

***Author for correspondence:** Centre de Recherche en Infectiologie de l'Université Laval, CHUQ (Pavillon CHUL), 2705 boul. Laurier, Québec, Québec, G1V 4G2, Canada.
Tel: (418) 654-2705. Fax: (418)-654-2715. E-mail: michel.g.bergeron@crchul.ulaval.ca

Running title: *Ruminococcus gauvreaui* sp. nov.

Key words: *Ruminococcus gauvreaui*, glycopeptide resistance, *vanD* gene cluster

The subject category for the contents list: New taxon (Subsection Gram-positive Bacteria)

Footnote: The GenBank/EMBL/DDBJ accession number for the 16S rRNA and *tuf* gene sequences of *Ruminococcus gauvreaui* CCUG-54292^T are EF529620 and EF529615, respectively.

SUMMARY

A new strictly anaerobic, vancomycin-resistant Gram-positive coccus (CCRI-16110^T) was isolated from a human faecal specimen. This strain was characterized using morphological, biochemical, and molecular taxonomic methods. The organism cannot hydrolyse aesculin and failed to produce acid from D-cellobiose, D-lactose, and α -D-raffinose. Acetic acid was the sole product of glucose fermentation by the organism. On the basis of 16S rRNA and *tuf* genes sequence comparison, strain CCRI-16110^T was most closely related to *Ruminococcus* spp. and *Clostridium* spp. organisms, and formed a hitherto unknown sublineage within the *Clostridium coccoides* rRNA cluster of organisms (cluster XIVa). Based on phenotypic and phylogenetic evidence, a new species for which the name *Ruminococcus gauvreaui* sp. nov. is proposed, with the type strain *Ruminococcus gauvreaui* is CCRI-16110^T (= CCUG 54292^T = CIP 109512).

INTRODUCTION

Human gut microbiota comprises more than 400 different species (Eckburg *et al.*, 2005). The majority of the species described so far consists of obligate anaerobes which can be assigned to *Bacteroides* group, *Clostridium coccoides* group (cluster XIVa), and *Clostridium leptum* group (cluster IV) (Collins *et al.*, 1994; Eckburg *et al.*, 2005; Franks *et al.*, 1998; Hold *et al.*, 2002; Maukonen *et al.*, 2006; Suau *et al.*, 1999). The genus *Clostridium* has been delimited by 16S rRNA gene sequence analysis into 19 gene clusters (Collins *et al.*, 1994). Cluster XIVa represents one of the most important clostridial clusters which contain a combination of intermixed genera including *Clostridium*, *Ruminococcus*,

Eubacterium, *Acetitomaculum*, *Roseburia*, and *Coprococcus* (Collins *et al.*, 1994). Glycopeptide antibiotics, used to treat serious infections caused by Gram-positive bacteria, are generally active against *Clostridium* and *Ruminococcus* species, except for *Clostridium innocuum* which is intrinsically resistant to low level of vancomycin (David *et al.*, 2004). Acquired glycopeptide resistance occurs most of the time in enterococcal strains and only scarcely in other genera (Courvalin, 2006). Vancomycin-resistance in enterococci results from the acquisition of one of the six sets of operons that direct the synthesis of peptidoglycan precursors ending in D-Alanyl-D-Lactate (*vanA*, *vanB*, and *vanD* operons) or D-Alanyl-D-Serine (*vanC*, *vanE*, and *vanG* operons). The replacement of the usual dipeptide D-Alanyl-D-Alanine by these new peptidoglycan precursors reduced affinity to glycopeptides (Courvalin, 2006). The origin of *van* gene operons is still unknown. Recent studies reported high level resistance to vancomycin in some *Clostridium* isolates (Ballard *et al.*, 2005; Domingo *et al.*, 2005a) suggesting that some Gram-positive anaerobes from intestinal flora may constitute the reservoir of vancomycin resistance genes. The *vanD* gene operon has been only described so far in strains of *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. gallinarum*, and *E. raffinosus* (Boyd *et al.*, 2000; Boyd *et al.*, 2004; Boyd *et al.*, 2006; Dalla Costa *et al.*, 2000; Depardieu *et al.*, 2004; Tanimoto *et al.*, 2006) and does not appear transferable to other enterococci by conjugation (Boyd *et al.*, 2004; Boyd *et al.*, 2006; Dalla Costa *et al.*, 2000; Depardieu *et al.*, 2003). During a surveillance program to detect vancomycin-resistant enterococci (VRE) carriers using a PCR primer pair specific for *vanD*, we found a high prevalence of *vanD*-positive faecal specimens containing no VRE (Domingo *et al.*, 2005b). While systematically looking for species harbouring the *vanD* gene from these *vanD*-positive fecal specimens using anaerobic culture-based approaches, we isolated a previously unknown Gram-positive anaerobe resistant to glycopeptides and harbouring the

vanD cluster. Morphological and biochemical characteristics used in combination with 16S rRNA and *tuf* gene sequence analysis represent a powerful approach for discriminating bacteria at the species level (Lawson *et al.*, 2004). Based on this approach, we describe a novel species *Ruminococcus gauvreaui* sp. nov. that is resistant to glycopeptides and harbours the *vanD* operon.

MATERIALS AND METHODS

Media and isolation procedure of strain CCRI-16110 (= NML 060141). Rectal swab ERV-110 positive for the *vanD* gene by PCR was obtained from a patient of the Montreal General Hospital (Montreal, Québec, Canada) in 2001 and screened during a surveillance program to detect VRE carriers. No further information is obtained from this patient. The initial processing and isolation procedure of specimen ERV-110 was previously reported, in addition with other *vanD*-positive rectal swabs collected during the screening program (Domingo *et al.*, 2005b). Briefly, a 300 μ l aliquot of a rectal swab suspension was cultured in brain heart infusion (BHI) broth supplemented with 1 μ g vitamin K ml^{-1} and 5 μ g haemin ml^{-1} (eBHI), and incubated at 35 °C in anaerobic atmosphere for 3 days. The eBHI culture was subcultured onto eBHI agar (eBHIA) containing 32 μ g vancomycin ml^{-1} and incubated anaerobically for 3 days. A colony positive for *vanD* by PCR was recovered and appeared impure as depicted by the presence of different cell morphologies upon Gram staining (Domingo *et al.*, 2005b). This *vanD*-positive microbial cell consortium was repeatedly subcultured on eBHIA but the *vanD*-positive bacteria could not be isolated in pure culture from this cell consortium at that time (Domingo *et al.*, 2005b). The new

approach presented here led to the isolation of a pure *vanD*-positive anaerobic bacterium. To favour the growth of the *vanD*-positive bacterium against the other members of the consortium, a new enriched medium containing BHI broth supplemented with 1 µg vitamin K ml⁻¹, 5 µg haemin ml⁻¹, 0.5 mg L-cystine ml⁻¹, 10 mM sodium salt lactate, 10 mM sodium salt pyruvate, 10 µg vancomycin ml⁻¹, and 100 µg aztreonam ml⁻¹ (eBHILPVA broth) was used. Up to eleven subcultures in eBHILPVA broth separated by 3 to 7 days of incubation were performed at 35-37°C inside an anaerobic chamber containing a gas mixture of 5% H₂, 10 % CO₂, and 85% N₂. Growth of the *vanD*-positive bacterium was monitored by the intensity of the PCR signal between the subcultures using the specific *vanD* primers previously described by our group (Domingo *et al.*, 2005b).

Resistance profile. The special-potency disks identification of colistin (10 µg), kanamycin (1000 µg), vancomycin (5 µg), sodium polyanethol sulfonate 5%, metronidazole (5 µg), all from Oxoid (Ottawa, Ontario, Canada) were used as recommended in the Wadsworth manual (Jousimies-Somer *et al.*, 2002). Minimal inhibitory concentrations (MICs) of vancomycin and metronidazole were determined by the agar dilution method for anaerobe according to the Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) (NCCLS, 2004), whereas MIC for teicoplanin was determined by the Etest method (AB Biodisk, Sweden). The media used for antimicrobial susceptibility testing was Brucella agar (Difco, Detroit, Mich.) supplemented with laked sheep blood, 1 µg vitamin K ml⁻¹, and 5 µg haemin ml⁻¹.

Phenotypic characterization. Phenotypic identification tests were performed as described in the Wadsworth and VPI anaerobic manuals (Holdeman *et al.*, 1977; Jousimies-Somer *et al.*, 2002) at the Centre de Recherche en Infectiologie (CRI) de l'Université Laval (Québec,

Canada) and at the National Microbiology Laboratory (Winnipeg, Canada). Morphology was observed using an optical Leitz light microscope (Wetzlar, Germany) and transmission electron microscopy (JEOL 1200EX, Tokyo, Japan). Degree of growth was observed in Peptone-Yeast (PY) broth enriched with dextrose (PYD) with or without bile (PYD + bile), serum (PYD + serum), tween (PYD + tween), or formate fumarate (PYD + FF). Fermentation tests of different sugars including adonitol, amygdalin, D-arabinose, D-cellobiose, erythritol, D-fructose, D-galactose, D-glucose, glycerol, glycogen, inositol, inulin, D-lactose, α -D-melibiose, α -D-melezitose, D-maltose, D-mannitol, D-mannose, α -D-raffinose, L-rhamnose, D-ribose, D-salicin, D-sorbitol, sucrose, D-trehalose, L-xylose, and starch were performed using pre-reduced, anaerobically sterilized PY sugars broth tubes from Med-Ox Diagnostics Inc. (Ottawa, Ontario, Canada). Other tests such as catalase, esculin, indol, lecithinase, lipase, nitrate, oxidase were done as previously described (Jousimies-Somer *et al.*, 2002). The isolate was examined with preformed enzyme tests including the Rapid ID 32A and API ZYM systems from bioMérieux (Montréal, Québec) as well as the Rapid ANA II from Remel (Oxoid, Ottawa, Ontario) according to the manufacturer's instructions. Gas-liquid chromatography analysis of metabolic end-products of fermentation was done as described (Bernard *et al.*, 2002), except that the Anaerobe system broth was acquired from Med-Ox Diagnostics Inc. (Ottawa, On). Cellular fatty acid composition and library generation analysis were performed using the MIDI Sherlock system and LGS software (MIDI, Newark, USA) as previously described (Bernard *et al.*, 2002).

Sequencing of partial 16S rRNA and *tuf* gene sequences. Total DNA from strain CCRI-16110 was purified with the GNOME DNA kit (Qbiogene Inc., Carlsbad, Calif.) according

to the manufacturer's instructions. PCR reactions to amplify a 884-bp region of the bacterial *tuf* gene (Ke *et al.*, 2000) or a 1466-bp region of the 16S rRNA gene (Paradis *et al.*, 2005) were performed using purified genomic DNA as previously described (Ke *et al.*, 1999). Sequencing of the specific amplification products was also performed as previously described (Domingo *et al.*, 2005a).

Phylogenetic analysis. To identify the taxonomic neighbours of strain CCRI-16110, 16S rRNA gene sequences were used for an initial BLAST search against the GenBank database. Subsequently, bacterial species closely related to strain CCRI-16110 were used for phylogenetic analysis. Multiple sequence alignments were performed using CLUSTAL W from the GCG package (Wisconsin Package Version 10.3, Accelrys Inc., San Diego, CA). Phylogenetic analysis was carried out by the neighbour-joining method (Saitou and Nei, 1987) using MEGA version 3.1 (Kumar *et al.*, 2004). Evolutionary distance matrices were generated according to Kimura II parameter for nucleotide sequences (Kimura, 1980) and Jones-Taylor-Thornton matrix for amino acid sequences (Jones *et al.*, 1992). Bootstrap values were calculated from 1000 resamplings to test the robustness of the data. The final 16S rRNA phylogenetic tree was rooted with *Fusobacterium nucleatum* and *Propionigenium modestum* (cluster XIX) as outgroup, and bootstrap values were displayed as percentages.

RESULTS AND DISCUSSION

Phenotypic characterization of strain CCRI-16110

The eleventh subculture in eBHILPVA broth incubated for 4 days was plated on eBHILPVA agar. This plate led to the isolation of a single colony after incubation under anaerobic conditions for 7 days. This colony was shown to be positive for *vanD* by PCR. This isolate was picked and streaked out twice to ascertain purity. A pure isolate was further processed for identification using the conventional methods and media for anaerobic bacteria as described in the Wadsworth and VPI anaerobic manuals (Holdeman *et al.*, 1977; Jousimies-Somer *et al.*, 2002). An obligatory anaerobic Gram-positive cocci organism, resistant to glycopeptides, and harbouring the *vanD* gene (strain CCRI-16110) was isolated from this human faecal specimen. Cells of strain CCRI-16110 were organized as single cocci (0.5-1 μm) or in chains (Fig. 1). Some elongated oval cells could also be observed (Fig. 1). The isolate grew well anaerobically, but no growth occurred following subculture to 5% O₂, 5% CO₂, or ambient air. The organism growth appeared to be enhanced by a fermentable carbohydrate (PYD) as well as with tween, FF, bile, but grew less well in presence of serum. After 3 days of incubation at 37 °C under anaerobic atmosphere, colonies were 0.5-1 mm in diameter, convex, and white in color. No zone of hemolysis was observed on blood agar. Cells were not motile. Special-potency disks identification show that the isolate was resistant to 1000 μg kanamycin, 10 μg colistin, 5 μg vancomycin, and 5% sodium polyanethol sulfonate identification disks. Agar dilution susceptibility tests showed that the isolate was resistant to vancomycin (MIC > 256 $\mu\text{g/ml}$), teicoplanin (MIC > 256 $\mu\text{g/ml}$) and susceptible to metronidazole (MIC < 0.125 $\mu\text{g/ml}$).

The isolate did not produce indole, catalase, oxidase, lecithinase, lipase, and H₂S. Nitrate was not reduced. The isolate produced acid from D-glucose, D-galactose, D-fructose, D-ribose, D-sorbitol, D-mannitol, inositol, and sucrose. The organism failed to produce acid from D-lactose, D-maltose, D-mannose, D-trehalose, D-arabinose, D-cellobiose, α -D-melibiose, α -D-raffinose, L-xylose, D-salicin, adonitol, amygdalin, glycerol, glycogen, erythritol, inulin, α -D-melezitose, L-rhamnose, and starch. No liquefaction of gelatin and peptonisation of milk occurred. No hydrolysis of aesculin, urea, and starch was observed. Biochemical tests using Rapid ID 32A and Rapid ANA II systems remained negative for all substrates tested with these two systems. Based on testing with the API ZYM system, the isolate produced only phosphatase acid and naphthol-AS-BI-phosphohydrolase. The major end product of glucose metabolism is acetic acid. The long-chain cellular fatty acids of the unknown coccus-shaped organism consisted primarily of C16:0 (16.94%), C14:0 (16.91%), C18:1 cis9 dimethyl acetyl (DMA) (13.53%), C18:1 cis11 DMA (9.94%), C18:1 cis9 (8.41%) as well as other minor components of DMA forms including, C14:0 DMA (5.96%), C16:0 DMA (4.03%), C16:1 cis9 DMA (3.95%), and C18:0 DMA (2.64%).

Genotypic characterization

Comparative 16S rRNA and *tuf* gene sequence analysis was performed to determine the evolutionary relationships of the new Gram-positive strictly anaerobic coccus. Searches in the sequence database revealed that this unidentified isolate was closely related to members of cluster XIVa of *Clostridium* (Collins *et al.*, 1994). Based on nucleotide sequence identity of 16S rRNA genes, the closest relatives of the isolate were *Clostridium bolteae* (93.8%), *Ruminococcus productus* (<93%), *Clostridium indolis* (<93%), *Clostridium asparagiforme* (<93%), *Clostridium saccharolyticum* (<93%), and *Ruminococcus hansenii* (92.8%). A tree

showing the phylogenetic relationships of the unknown isolate, constructed by using the neighbour-joining method is shown in Fig. 2. This phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences showed that the unknown anaerobic Gram-positive coccus is a member of cluster XIVa of *Clostridium* (Collins *et al.*, 1994) and formed a distinct sublineage within this cluster comprising both rod- and coccus-shaped cells (Fig. 2). Branches illustrating clear distinction between clusters XIVa, XIVb, and IV are supported by significant bootstrap values. As depicted on the phylogenetic dendrogram, the *Ruminococcus* genus is polyphyletic and distributed in both clusters XIVa and IV. Although the new strain CCRI-16110 is clearly part of cluster XIVa, bootstrap analysis of 16S rRNA phylogenetic tree does not support a close association of this strain with specific sub-branches of rod-shaped or cocci organisms found within this cluster. To ascertain the phylogenetic position of the unknown bacterium within the cluster XIVa of *Clostridium*, a phylogenetic study based on *tuf* gene sequencing was conducted using some representative organisms of this cluster. The phylogenetic tree based on deduced amino acid of *tuf* gene sequences showed that the unknown anaerobic Gram-positive coccus is most closely related to *Ruminococcus productus* and *Ruminococcus obeum* (Fig. 3). It is now well recognized that the genus *Ruminococcus* is heterogenous and needs revision (Rainey and Janssen, 1995; Rieu-Lesme *et al.*, 1996; Simmering *et al.*, 2002; Willems and Collins, 1995). However, strain CCRI-16110 falls within the current definition of *Ruminococcus* based on both cellular morphology and phylogenetic relationship (Bryant, 1986).

The Gram-positive coccus-shaped organism clearly represents a hitherto unknown bacterium from human faeces which fits into the cluster XIVa of *Clostridium* (Collins *et al.*, 1994). This novel bacterium described here displays at least 6% sequence divergence at

the nucleotide level for 16S rRNA genes when compared with other members of cluster XIVa of *Clostridium*. This cluster is one of the most predominant clade in human faeces and groups organisms having diverse morphological, phenotypical, and biochemical features (Collins *et al.*, 1994; Hayashi *et al.*, 2006; Stackebrandt *et al.*, 1999; Suau *et al.*, 1999). Based on phylogenetic analysis of both 16S rRNA and *tuf* gene sequences, the unidentified bacterium is most closely related to *Ruminococcus* species belonging to cluster XIVa of *Clostridium*. Species in the genus *Ruminococcus* as found here with CCRI-16110^T, have coccoidal, Gram positive forms arranged as chains, singles or diplococci. They use carbohydrates as fermentable substrates yielding acetic, or other metabolic products such as succinic or lactic acid. Broth growth is stimulated by presence of carbohydrate. They are catabolically fermentative, indole, catalase, and oxidase are negative and nitrates are not reduced and most frequently isolated from rumen, bowel including from human faeces or caecum (Bryant, 1986). This isolate is phenotypically similar to but may be discerned from *R. productus* and *R. hansenii* by lactose and raffinose reactions (Bryant, 1986). Moreover, strain CCRI-16110 presents an important sequence divergence for 16S rRNA gene sequences (> 6%) with the other known *Ruminococcus* species. However, the branching pattern in the *tuf* phylogenetic tree suggests an evolutionary link with *R. obeum* and *R. productus* (Fig. 3). Although it has been recommended that the geographic, phenotypic, and genotypic diversity of at least five isolates should be used to describe a new taxon (Christensen *et al.*, 2001), new species containing a single strain can be validly named if their phenotype and genotype have been thoroughly and adequately characterized (Vandamme *et al.*, 1996). Since no additional fastidious anaerobic bacterium identical to strain CCRI-16110 was isolated from faecal specimen, polyphasic taxonomy remains the best method to differentiate bacteria at the species level (Vandamme *et al.*, 1996). In

conclusion, we propose that this isolate be designated as a new species named *Ruminococcus gauvreaui* sp. nov based on the findings presented here.

DESCRIPTION OF *Ruminococcus gauvreaui* sp. nov.

Ruminococcus gauvreaui (gau.vreau'i. N.L. masc. gen. n. *gauvreaui* of Gauvreau, named after Léo Gauvreau (MD, FRCPC) a microbiologist Emeritus Professor, former Director of the Department of Microbiology of Université Laval in Quebec City (Québec, Canada) known as an excellent teacher for his contribution to clinical diagnostic microbiology especially as it relates to botulism, an infection often observed in aboriginal people from Northern Canada.

Strictly anaerobic Gram-positive cocci (0.5-1 µm). Cells are not motile. Colonies on Brucella blood agar are small white and convex. Growth of *Ruminococcus* CCRI-16110 occurs at 35-37°C under anaerobic conditions. The strain is resistant to vancomycin and teicoplanin and harbors the acquired *vanD* gene cluster. Cells are catalase negative. Indole, oxidase, lecithinase, lipase, and urease are not produced. Nitrate is not reduced to nitrite. Aesculin, gelatin, and starch are not hydrolysed. Acid is produced from fructose, galactose, glucose, inositol, mannitol, ribose, sorbitol, and sucrose but adonitol, amygdaline, arabinose, cellobiose, erythritol, glycerol, glycogene, inulin lactose, maltose, mannose, melezitose, melibiose, raffinose, rhamnose, salicin, trehalose, and xylose are not utilized. Only acetic acid is produced as end product in peptone-yeast extract medium. The type strain of *Ruminococcus gauvreaui* (CCRI-16110^T) has been deposited in the CCUG as

CCUG 54292^T and in the CIP as CIP 109512^T. This strain has been isolated from human faecal specimen. Extent of habitat is not known, but is probably the mammalian gastrointestinal tract.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Emma Ongsansoy for technical assistance and Jean-Pierre Carlier for his advices on media supplements. We are grateful to Prof. Hans G. Trüper for his advice in naming the novel species and to Dr. Pierre Lebel from the Montreal General Hospital for providing faecal specimens. This study was supported by grant PA-15586 from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR), and by grant 2201-181 from Valorisation Recherche Québec (VRQ). M.-C. Domingo is a research fellow of Bayer Healthcare/CIHR/Association of Medical Microbiology and Infectious disease Canada/Canadian Foundation for Infectious Diseases.

REFERENCES

- Ballard, S. A., Pertile, K. K., Lim, M., Johnson, P. D., & Grayson, M. L. (2005). Molecular Characterization of *vanB* Elements in Naturally Occurring Gut Anaerobes. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 1688-1694.
- Bernard, K. A., Shuttleworth, L., Munro, C., Forbes-Faulkner, J. C., Pitt, D., Norton, J. H., & Thomas, A. D. (2002). *Propionibacterium australiense* sp.nov. Derived from Granulomatous Bovine Lesions. *Anaerobe* **8**, 41-47.
- Boyd, D. A., Conly, J., Dedier, H., Peters, G., Robertson, L., Slater, E., & Mulvey, M. R. (2000). Molecular characterization of the *vanD* gene cluster and a novel insertion element in a vancomycin-resistant enterococcus isolated in Canada. *J Clin Microbiol* **38**, 2392-2394.
- Boyd, D. A., Kibsey, P., Roscoe, D., & Mulvey, M. R. (2004). *Enterococcus faecium* N03-0072 carries a new VanD-type vancomycin resistance determinant: characterization of the VanD5 operon. *J Antimicrob Chemother* **54**, 680-683.
- Boyd, D. A., Miller, M. A., & Mulvey, M. R. (2006). *Enterococcus gallinarum* N04-0414 harbors a VanD-type vancomycin resistance operon and does not contain a D-alanine:D-alanine 2 (*ddl2*) gene. *Antimicrob Agents Chemother* **50**, 1067-1070.
- Bryant, M. P. (1986). Genus *Ruminococcus* In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol 2 pp.1093-1097. Edited by P. H. A. Sneath. Williams & Wilkins. Baltimore.
- Christensen, H., Bisgaard, M., Frederiksen, W., Mutters, R., Kuhnert, P., & Olsen, J. E. (2001). Is characterization of a single isolate sufficient for valid publication of a new genus or species? Proposal to modify recommendation 30b of the Bacteriological Code (1990 Revision). *Int J Syst Evol Microbiol* **51**, 2221-2225.
- Collins, M. D., Lawson, P. A., Willems, A., Cordoba, J. J., Fernandez-Garayzabal, J., Garcia, P., Cai, J., Hippe, H., & Farrow, J. A. (1994). The phylogeny of the genus *Clostridium*: proposal of five new genera and eleven new species combinations. *Int J Syst Bacteriol* **44**, 812-826.
- Courvalin, P. (2006). Vancomycin resistance in gram-positive cocci. *Clin Infect Dis* **42** Suppl 1, S25-34.
- Dalla Costa, L. M., Reynolds, P. E., Souza, H. A., Souza, D. C., Palepou, M. F., & Woodford, N. (2000). Characterization of a divergent *vanD*-type resistance element from the first glycopeptide-resistant strain of *Enterococcus faecium* isolated in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* **44**, 3444-3446.
- David, V., Bozdogan, B., Mainardi, J. L., Legrand, R., Gutmann, L., & Leclercq, R. (2004). Mechanism of intrinsic resistance to vancomycin in *Clostridium innocuum* NCIB 10674. *J Bacteriol* **186**, 3415-3422.

- Depardieu, F., Kolbert, M., Pruul, H., Bell, J., & Courvalin, P. (2004).** VanD-type vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother* **48**, 3892-3904.
- Depardieu, F., Reynolds, P. E., & Courvalin, P. (2003).** VanD-type vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* 10/96A. *Antimicrob Agents Chemother* **47**, 7-18.
- Domingo, M. C., Huletsky, A., Bernal, A., Giroux, R., Boudreau, D. K., Picard, F. J., & Bergeron, M. G. (2005a).** Characterization of a Tn5382-like transposon containing the *vanB2* gene cluster in a *Clostridium* strain isolated from human faeces. *J Antimicrob Chemother* **55**, 466-474.
- Domingo, M. C., Huletsky, A., Giroux, R., Boissinot, K., Picard, F. J., Lebel, P., Ferraro, M. J., & Bergeron, M. G. (2005b).** High prevalence of glycopeptide resistance genes *vanB*, *vanD*, and *vanG* not associated with enterococci in human fecal flora. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 4784-4786.
- Eckburg, P. B., Bik, E. M., Bernstein, C. N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S. R., Nelson, K. E., & Relman, D. A. (2005).** Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* **308**, 1635-1638.
- Franks, A. H., Harmsen, H. J., Raangs, G. C., Jansen, G. J., Schut, F., & Welling, G. W. (1998).** Variations of bacterial populations in human feces measured by fluorescent *in situ* hybridization with group-specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Appl Environ Microbiol* **64**, 3336-3345.
- Hayashi, H., Sakamoto, M., Kitahara, M., & Benno, Y. (2006).** Diversity of the *Clostridium coccoides* group in human fecal microbiota as determined by 16S rRNA gene library. *FEMS Microbiol Lett* **257**, 202-207.
- Hold, G. L., Pryde, S. E., Russell, V. J., Furrie, E., & Flint, H. J. (2002).** Assessment of microbial diversity in human colonic samples by 16S rDNA sequence analysis. *FEMS Microbiol Ecol* **39**, 33-39.
- Holdeman, L. V., Cato, E. P., & Moore, W. E. C. (1977).** *Anaerobe Laboratory Manual*. 4th edn. Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, VA.
- Jones, D. T., Taylor, W. R., & Thornton, J. M. (1992).** The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Comput Appl Biosci* **8**, 275-282.
- Jousimies-Somer, H. R., Summanen, P., Citron, D. M., Baron, E. J., Wexler, H. M., & Finegold, S. M. (2002).** *Wadsworth Anaerobic Bacteriology Manual*. 6th edn. Belmont, CA: Star Publishing.
- Ke, D., Boissinot, M., Huletsky, A., Picard, F. J., Frenette, J., Ouellette, M., Roy, P. H., & Bergeron, M. G. (2000).** Evidence for horizontal gene transfer in evolution of elongation factor Tu in enterococci. *J Bacteriol* **182**, 6913-6920.

- Ke, D., Picard, F. J., Martineau, F., Ménard, C., Roy, P. H., Ouellette, M., & Bergeron, M. G. (1999). Development of a PCR assay for rapid detection of enterococci. *J Clin Microbiol* 37, 3497-3503.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 16, 111-120.
- Kumar, S., Tamura, K., & Nei, M. (2004). MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform* 5, 150-163.
- Lawson, P. A., Song, Y., Liu, C., Molitoris, D. R., Vaisanen, M. L., Collins, M. D., & Finegold, S. M. (2004). *Anaerotruncus colihominis* gen. nov., sp. nov., from human faeces. *Int J Syst Evol Microbiol* 54, 413-417.
- Maukonen, J., Satokari, R., Matto, J., Soderlund, H., Mattila-Sandholm, T., & Saarela, M. (2006). Prevalence and temporal stability of selected clostridial groups in irritable bowel syndrome in relation to predominant faecal bacteria. *J Med Microbiol* 55, 625-633.
- NCCLS. (2004). *Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria*; Approved Standard - Sixth Edition. M11-A6, 24.
- Paradis, S., Boissinot, M., Paquette, N., Belanger, S. D., Martel, E. A., Boudreau, D. K., Picard, F. J., Ouellette, M., Roy, P. H., & Bergeron, M. G. (2005). Phylogeny of the *Enterobacteriaceae* based on genes encoding elongation factor Tu and F-ATPase beta-subunit. *Int J Syst Evol Microbiol* 55, 2013-2025.
- Rainey, F. A., & Janssen, P. H. (1995). Phylogenetic analysis by 16S ribosomal DNA sequence comparison reveals two unrelated groups of species within the genus *Ruminococcus*. *FEMS Microbiol Lett* 129, 69-73.
- Rieu-Lesme, F., Morvan, B., Collins, M. D., Fonty, G., & Willems, A. (1996). A new H₂/CO₂-using acetogenic bacterium from the rumen: description of *Ruminococcus schinkii* sp. nov. *FEMS Microbiol Lett* 140, 281-286.
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4, 406-425.
- Simmering, R., Taras, D., Schwiertz, A., Le Blay, G., Gruhl, B., Lawson, P. A., Collins, M. D., & Blaut, M. (2002). *Ruminococcus luti* sp. nov., isolated from a human faecal sample. *Syst Appl Microbiol* 25, 189-193.
- Song, Y., Liu, C., Molitoris, D. R., Tomzynski, T. J., Lawson, P. A., Collins, M. D., & Finegold, S. M. (2003). *Clostridium bolteae* sp. nov., isolated from human sources. *Syst Appl Microbiol* 26, 84-89.

Stackebrandt, E., Kramer, I., Swiderski, J., & Hippe, H. (1999). Phylogenetic basis for a taxonomic dissection of the genus *Clostridium*. *FEMS Immunol Med Microbiol* **24**, 253-258.

Suau, A., Bonnet, R., Sutren, M., Godon, J. J., Gibson, G. R., Collins, M. D., & Dore, J. (1999). Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Appl Environ Microbiol* **65**, 4799-4807.

Tanimoto, K., Nomura, T., Maruyama, H., Tomita, H., Shibata, N., Arakawa, Y., & Ike, Y. (2006). First VanD-Type vancomycin-resistant *Enterococcus raffinosus* isolate. *Antimicrob Agents Chemother* **50**, 3966-3967.

Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., de Vos, P., Kersters, K., & Swings, J. (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol Rev* **60**, 407-438.

Willems, A., & Collins, M. D. (1995). Phylogenetic analysis of *Ruminococcus flavefaciens*, the type species of the genus *Ruminococcus*, does not support the reclassification of *Streptococcus hansenii* and *Peptostreptococcus productus* as ruminococci. *Int J Syst Bacteriol* **45**, 572-575.

Table 1. Characteristics that are useful for distinguishing *Ruminococcus gauvreaui* from anaerobic Gram-positive cocci closely related within the cluster XIVa.

Characteristics	1	2	3	4	5	6
Morphology	Cocci	Cocci	Cocci	Cocci	Cocci	Cocci
Hydrolysis of:						
Aesculin	-	+	-	v	d	NA
Acid from:						
Cellobiose	-	+	-	-	+	+
Lactose	-	+	+	+	d	+
Raffinose	-	+	+	+	-	+
End products of glucose metabolism^a	A	A, l, s	E	L, a, s	S, l	A, S, H, l

Taxa: 1, *Ruminococcus gauvreaui* sp. nov.; 2, *R. productus*; 3, *R. obeum*; 4, *R. hansenii*; 5, *R. flavefaciens*, 6, *R. luti*. Data from (Jousimies-Somer *et al.*, 2002, Simmering *et al.*, 2002, Song *et al.*, 2003, and Bryant, 1986).

^aEnd products of glucose metabolism are: A or a, Acetic acid; E, ethanol; H, hydrogen; L or l, lactic acid; S or s, succinic acid. Minor products are indicated by lower-case letters.

d, 11-89% of strains are positive; NA, data not available; v, variable

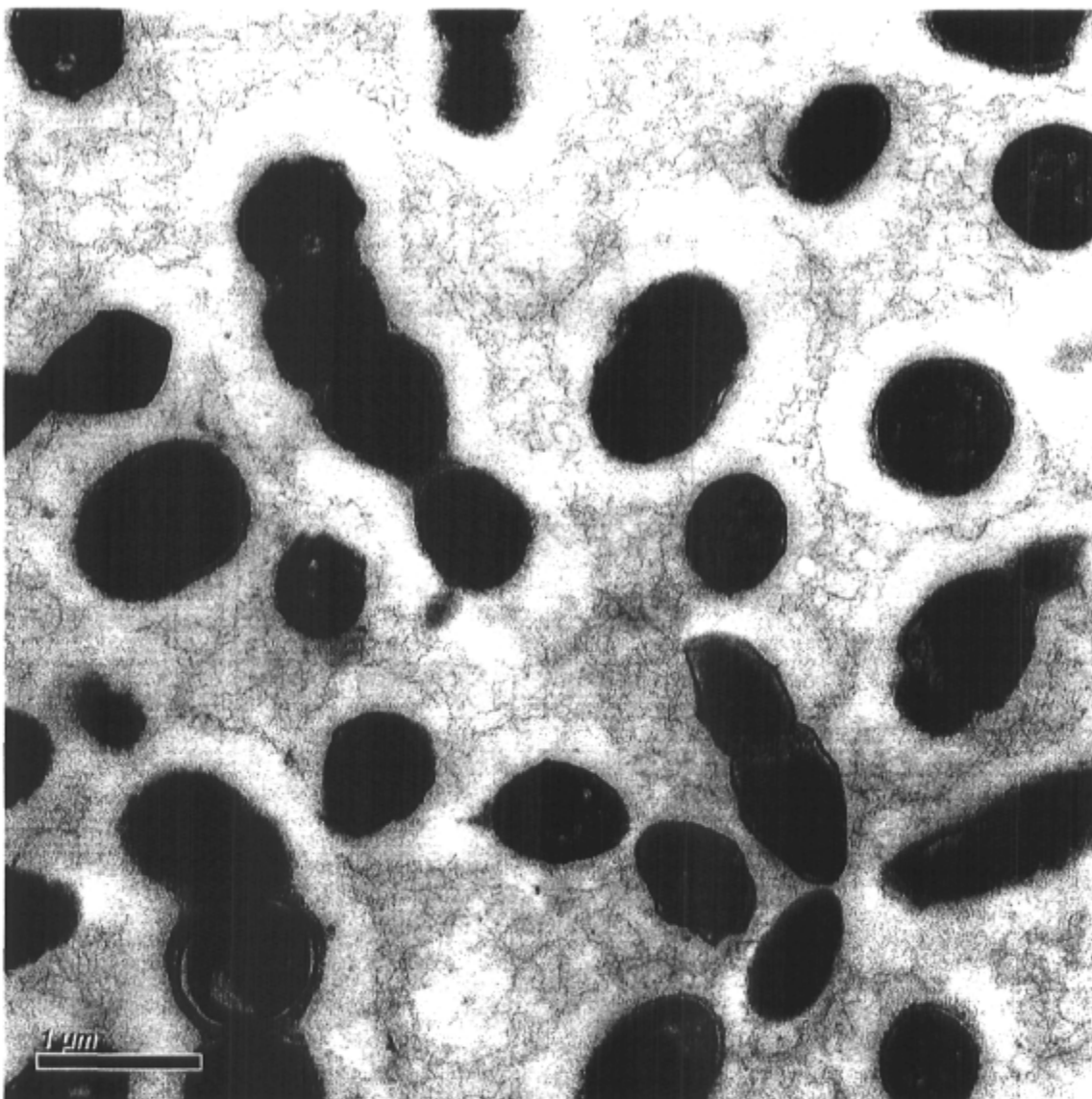
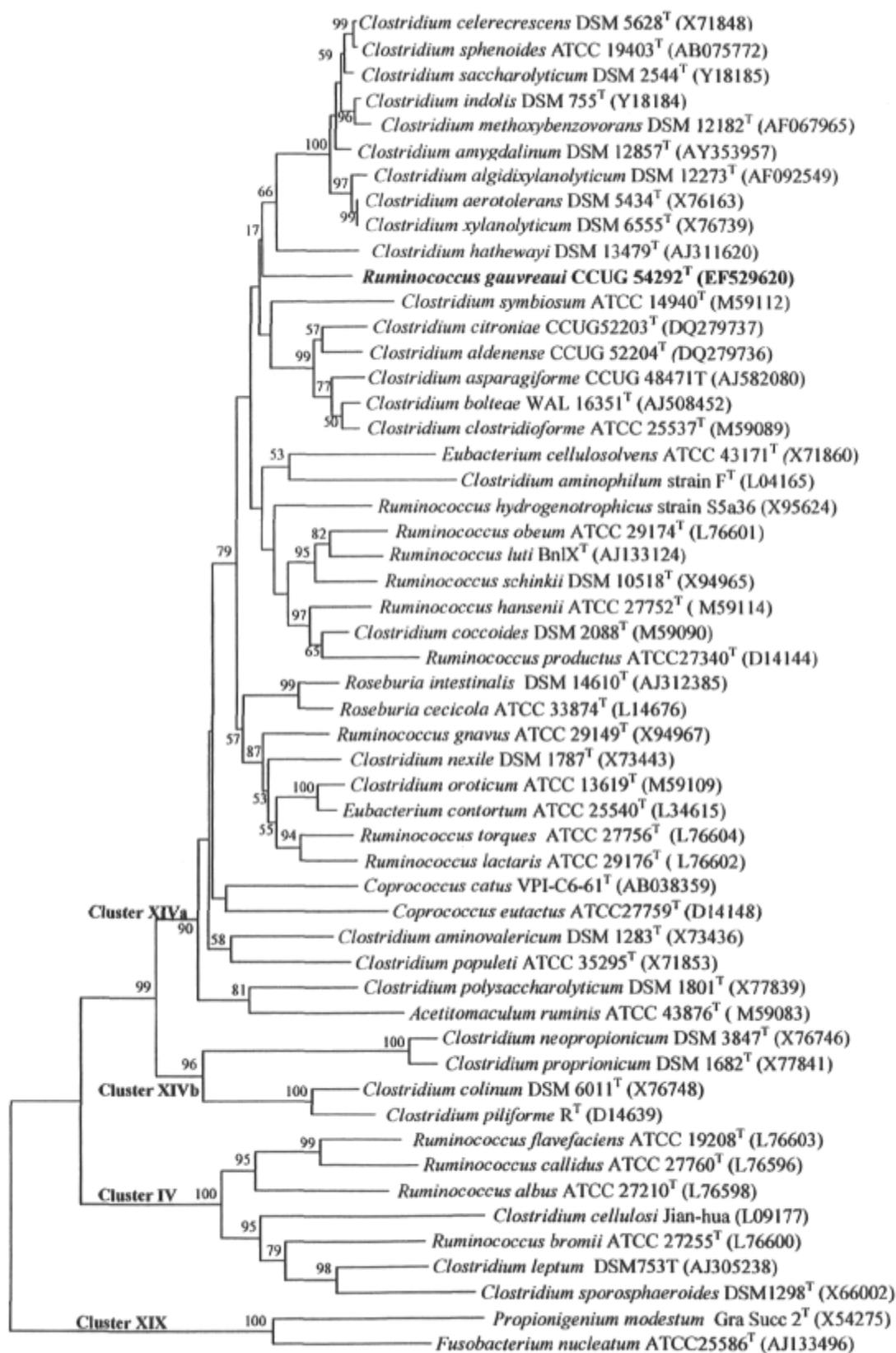


Fig. 1. Transmission electron micrograph of thin-sectioned cells of *Ruminococcus gauvreaui* sp. nov.



0,02

Fig. 2. Phylogenetic tree based on nucleotide sequences of 16S rRNA genes showing the relationships of *Ruminococcus gausvreaui* sp. nov. within the cluster XIVa. *Fusobacterium nucleatum* and *Propionigenium modestum* (Cluster XIX of *Clostridium*) were used as outgroup. The tree was constructed using the neighbour-joining method based on a comparison of approximately 1009 nucleotides. Bootstrap values, expressed as a percentage of 1000 replications, are given at each branching point. GenBank accession numbers are given in parentheses for each rRNA gene sequence.

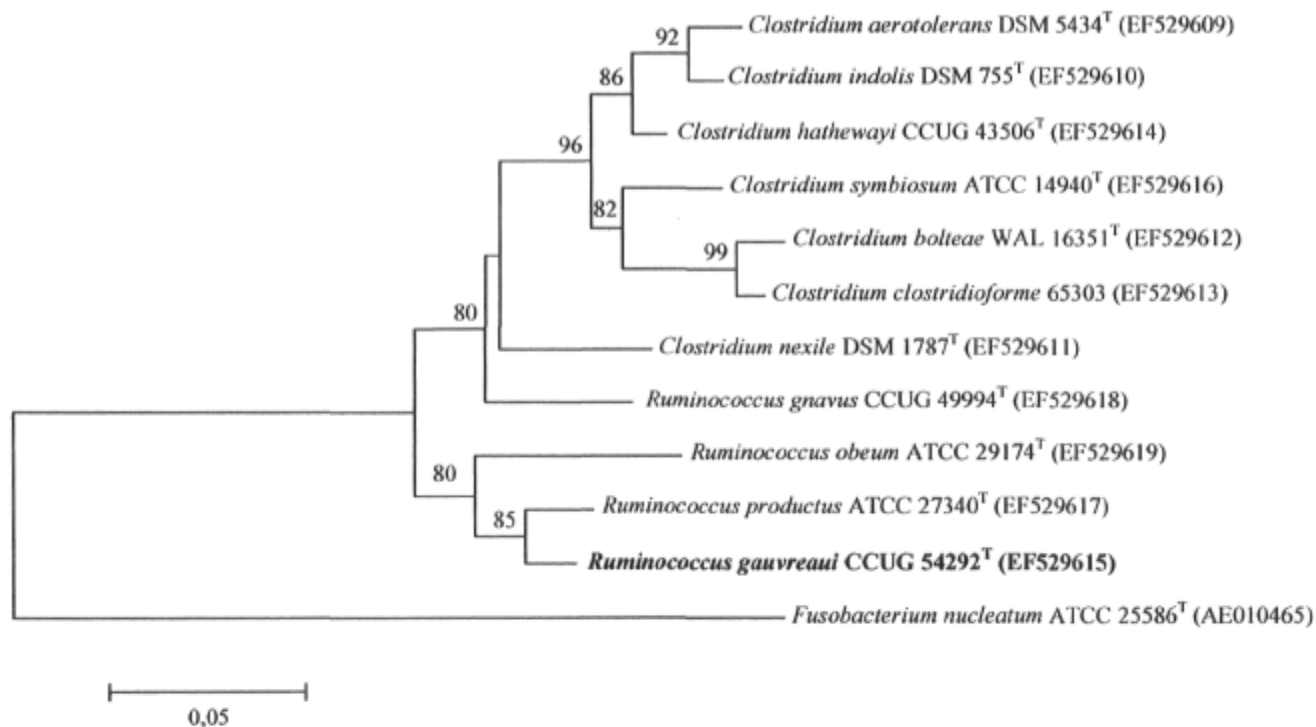


Fig. 3. Phylogenetic tree based on the deduced amino acid sequences of *tuf* gene of *Ruminococcus gauvreaui* sp. nov. and some representative members of cluster XIVa of *Clostridium*. *Fusobacterium nucleatum* (cluster XIX of *Clostridium* based on 16S rRNA gene) was used as outgroup. The tree was constructed using the neighbour-joining method based on a comparison of 270 amino acid positions. Bootstrap values, expressed as a percentage of 1000 replications, are given at each branching point. GenBank accession numbers are given in parentheses for each *tuf* gene sequence.

CHAPITRE IX. CARACTÉRISATION DU LOCUS *vanB* CHEZ LA SOUCHE DE *Clostridium lavalense* sp. nov.

Ce chapitre a fait l'objet d'une publication dans la revue *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (2005) 55:466-474 et est constitué de la version finale telle que publiée.

9.1 RÉSUMÉ

Nous avons caractérisé dans le chapitre 7 une nouvelle espèce nommée *Clostridium lavalense* dont la souche de référence est CCRI-9842^T. Dans ce chapitre nous faisons une identification sommaire de cette souche et nous caractérisons son phénotype de résistance aux glycopeptides ainsi que le support génétique de cette résistance. Ainsi, cette souche est génétiquement apparentée au genre *Clostridium* sur la base de l'analyse de la séquence du gène de l'ARNr 16S. Le phénotype de résistance aux glycopeptides exprimé par cette souche est de type VanB avec une CMI de la vancomycine supérieure à 256 mg/l et une sensibilité à la téicoplanine. La résistance à la vancomycine chez *Clostridium lavalense* est due à la présence du locus *vanB*. Les sept gènes composant le locus *vanB* ont été caractérisés dans cette souche. Ce locus, très proche du sous type *vanB2* des entérocoques avec 99,1% d'identité, est porté par un transposon apparenté au transposon Tn5382/1549. Le phénotype de résistance chez cette souche n'est pas transférable aux entérocoques. Cependant, la présence du transposon Tn5382/1549 dans une nouvelle espèce anaérobie suggère le caractère transférable de cette résistance.

9.2 ARTICLE

Characterization of a Tn5382-like Transposon Containing the *vanB2* Gene Cluster in a *Clostridium* Strain Isolated from Human Faeces.

M.-C. Domingo^{1,2}, A. Huletsky^{1,2}, A. Bernal³, R. Giroux¹, D.K. Boudreau¹, F.J. Picard^{1,2},
M.G. Bergeron^{1,2*}

¹Centre de Recherche en Infectiologie de l'Université Laval, CHUQ, Pavillon CHUL,
2705 boul Laurier, Sainte-Foy, Québec, Canada, G1V 4G2

²Division de Microbiologie, Faculté de Médecine, Université Laval, Sainte-Foy, Québec, Canada

³Infectio Diagnostic (I.D.I.) Inc., 2050 boul. René Levesque O., 4e étage, Sainte-Foy,
Québec, Canada G1V 2K8

***Corresponding author:** Centre de Recherche en Infectiologie de l'Université Laval,
CHUQ (Pavillon CHUL), 2705 boul. Laurier, Sainte-Foy, Québec, G1V 4G2, Canada.
Tel: (418) 654-2705. Fax: (418)-654-2715. E-mail: michel.g.bergeron@crchul.ulaval.ca

Running title: Tn5382-like transposon carrying *vanB2* in *Clostridium*

Keywords: vancomycin resistance, anaerobes, intestinal flora.

Abstract

Objectives: During a hospital surveillance programme to detect VRE carriers, an anaerobic vancomycin-resistant bacterial strain CCRI-9842 containing a *vanB* gene was isolated from a human faecal specimen. In this study, we have characterized this strain and its *vanB*-containing element.

Methods: Strain CCRI-9842 was characterized by 16S rDNA sequencing and susceptibility testing. PCR mapping and sequencing of the *vanB*-containing element as well as plasmid extraction and mating experiments were carried out to investigate the genetic basis of vancomycin resistance in this strain.

Results: Strain CCRI-9842 was identified as a *Clostridium* species closely related to *Clostridium bolteae* (96.8 % 16S rDNA identity). This strain was resistant to high level of vancomycin (MIC of 256 mg/L), but was susceptible to teicoplanin and ampicillin. The complete sequence of the CCRI-9842 *vanB* gene cluster exhibited 99.1% identity with that of *vanB2*. PCR mapping and sequencing showed that the genetic element carrying *vanB2* was similar to transposon Tn5382/Tn1549. This Tn5382-like transposon forms circular intermediates and is flanked at the left and right ends by repeat sequences of at least 700-bp in opposite direction. No plasmid was detected in this strain suggesting that the Tn5382-like transposon was integrated into the chromosome. The vancomycin resistance was not transferable to enterococci.

Conclusions: Our report shows for the first time the presence of a Tn5382-like transposon carrying *vanB2* in a *Clostridium* species of the human intestinal flora. This suggests that the *vanB2* Tn5382-like transposon is an important vector for the spread of vancomycin resistance in several bacterial species.

Introduction

The glycopeptide antibiotics (vancomycin and teicoplanin) are predominantly used to treat severe infections caused by Gram-positive bacteria. The glycopeptides interfere with cell wall synthesis by binding to the terminal dipeptide D-alanyl-D-alanine region of the pentapeptide precursors of peptidoglycan side chains.¹⁻³ This interaction inhibits subsequent steps in the polymerization and stability of these cell wall polymers into a large peptidoglycan matrix and induces cellular death. Resistance to glycopeptide antibiotics acquired a clinical importance with occurrence of vancomycin-resistant enterococci (VRE), especially *Enterococcus faecalis* and *E. faecium*, which first emerged in 1986 and has now spread worldwide.⁴⁻⁸ Six different gene clusters (*vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanD*, *vanE*, and *vanG*) have been shown to confer glycopeptide resistance in enterococci. The VanB-type resistance is mediated by the *vanR_B*, *vanS_B*, *vanY_B*, *vanW_B*, *vanH_B*, *vanB*, and *vanX_B* gene cluster which directs synthesis of peptidoglycan precursors terminating in D-alanyl-D-lactate.⁹⁻¹¹ The *vanB* gene cluster is usually carried by large conjugative elements which are transferable between bacteria of the genus *Enterococcus*.^{12,13} Analysis of the variability in *vanB* led to the identification of three subtypes designated *vanB1*, *vanB2*, and *vanB3*.^{14,15} The *vanB1* gene cluster has been shown to be part of a 64-kb composite transposon, designated Tn1547, which has insertion sequence elements IS16 and IS256-like in *E. faecalis* BM4281.¹⁶ In *E. faecium* C68, a 27-kb putative conjugative transposon designated Tn5382 contains the *vanB2* gene cluster.¹⁷ Integration of Tn5382 into the chromosome of *E. faecium* C68 has occurred in the region downstream of the *pbp5* gene. In *E. faecalis* 93/268 and 654, a 34-kb transposon designated Tn1549 has been shown to contain the

vanB2 gene cluster carried by conjugative plasmids pIP834 and pIP835, respectively. Sequence comparison of Tn1549 and Tn5382 revealed that these transposons are highly similar.¹⁸

The origin of *vanB* genes is still unknown and beside enterococci, the glycopeptide-resistance *vanB* genes have also been described in a *Streptococcus mitis* strain isolated from blood¹⁹ as well as in a *Streptococcus bovis* isolate,²⁰ in an *Eggerthella lenta*-related strain, and in three unidentified *Clostridium* species,²¹ all of which were obtained from human faecal samples. The *vanB* gene has also been identified in three faecal veal calf isolates, two *Streptococcus gallolyticus* and one *Streptococcus lutetiensis*.^{22,23} These observations suggest that the intestinal flora may serve as a reservoir for glycopeptide resistance genes which seems to represent a favourable environment for horizontal gene transfer between different genera as already described for other antibiotic resistance genes.^{24,25}

A surveillance programme of vancomycin-resistant enterococci (VRE) carriers at the Montreal General Hospital (Montréal, Québec, Canada) using PCR detection of *vanA* and *vanB* genes from faecal samples was undertaken in 2001. During this surveillance programme, several *vanB*-positive faecal samples were detected in the absence of culturable VRE. One sample was shown to contain a *Clostridium* isolate carrying the *vanB* gene. In this study, we report the genetic characterization of the *vanB*-containing genetic element from this *Clostridium* species.

Materials and methods

Bacterial strains and plasmids

The origin and characteristics of the strains used in this study are described in Table 1. The anaerobic strain CCRI-9842 containing the *vanB* gene was isolated in 2001 from a faecal specimen obtained during a hospital surveillance of patient suspected of VRE colonization at the Montreal General Hospital (Montréal, Québec, Canada) using PCR detection of *vanA* and *vanB* genes. Identification of the strain CCRI-9842 was performed by methods previously described²⁶ and with the rapid ID32A test kit (Bio Mérieux, Marcy l'Etoile, France). Partial sequencing of the gene encoding 16S rRNA was performed with primers SSU27 (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) and SSU1492 (TACGGYTACCTTGTTACGACTT).²⁷ The strains used as positive controls for mapping and sequencing the CCRI-9842 *vanB2* gene cluster were *E. faecium* C68 [*vanB2*-containing transposon Tn5382] (kindly provided by L. B. Rice, Louis Stokes Cleveland VA Medical Center, Cleveland, Ohio) and *E. faecalis* 268-10 [*vanB2*-containing transposon Tn1549] (kindly provided by N. Woodford, Health Protection Agency, Collindale, London, United Kingdom). *E. faecalis* 268-10 which contains plasmid pIP834 (~ 80-90 kb) was also used as a control to verify the efficiency of the method for isolation of large plasmids. *E. faecium* CCRI-1453 (resistant to gentamicin) and *E. faecalis* JH2-2 (resistant to fusidic acid and rifampicin)²⁸ were obtained from L. Jetté (Laboratoire de Santé Publique du Québec, Sainte-Anne de Bellevue, Québec, Canada) and from N. Woodford, respectively. Both strains were used as recipients in conjugation experiments. *Escherichia coli* TOP10 (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada) was used as a host for recombinant plasmids.

PCR products were cloned in the vector pCR[®]2.1 using the TOPO TA Cloning[®] kit (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada).

Resistance studies

Brain heart infusion (BHI) broth (Difco, Detroit, Mich.) supplemented with vitamin K (0.001 mg/mL), haemin (0.005 mg/mL), and L-cystine (0.5 mg/mL) and named enriched BHI (eBHI) was used for cultures. Minimal inhibitory concentrations (MICs) were determined by using the Etest[®] method (AB Biodisk, Sweden) using blood agar supplemented with vitamin K (0.001 mg/mL), haemin (0.005 mg/mL), and L-cystine (0.5 mg/mL) which was named enriched blood agar (eBA).

Mapping and sequencing of the vanB gene cluster

The PCR primers used in this study to map and sequence the *vanB* gene cluster from *Clostridium* sp. CCRI-9842 are listed in Table 2. PCR reactions were performed with standard conditions using purified genomic DNA and the *Taq* DNA polymerase (Promega, Mississauga, Ontario, Canada) as previously described.²⁹ Genomic DNA was purified with the Gnome kit (Qbiogene Inc., Carlsbad, Calif.) according to the manufacturer's instructions. Purification of the amplification products and sequencing reactions were performed as previously described.²⁹ Comparison with known sequences was carried out using the programs from the GCG package (version 10.3; Accelrys, San Diego, Calif.).

The Tn5382-like transposon flanking regions

The DNA sequence flanking the Tn5382-like transposon from *Clostridium* sp. CCRI-9842 located upstream from *orf13* and downstream from the *int* gene was determined by using the DNA Walking SpeedUp™ kit (Bio/Can Scientific, Mississauga, Canada). PCR reactions were carried out using *orf13*-specific primers (P527, P476, and P317) and *int*-specific primers (P33228 and P33386) (Table 2) in combination with universal primers provided by the manufacturer. The PCR conditions recommended by the manufacturer were modified by using 2.5 mM MgCl₂ in the PCR mix and by increasing the length of the extension step to 180 s. Both strands of the PCR products obtained from the left and right ends of the transposon were sequenced as previously described.²⁹

Circular form of the vanB-containing genetic element

To find out if the *vanB*-containing genetic element produces a circular form, PCR was performed by using purified genomic DNA as a template and primers *orf13*Tn1549-476 and *int*Tn1549-1239 directed outward of *orf13* and *int* gene of transposon Tn1549,¹⁸ respectively (Table 2). PCR products were cloned into vector pCR®2.1 using the TOPO TA Cloning® kit following the manufacturer's instructions. Plasmid DNA extraction from fifteen clones were performed using the QIAGEN Plasmid Mini kit (QIAGEN, Mississauga, Ontario). The inserts from these recombinant plasmids were sequenced using the M13 forward and M13 reverse primers.

Filter mating

To study the transfer of the *vanB2* operon, mating on filters was performed as described previously.³⁰ *E. faecalis* JH2-2 and *E. faecium* CCRI-1453 recipient cells as well as *Clostridium* sp. CCRI-9842 donor cells were grown on eBA plates. Colonies from an 18 hours old pure culture were grown in eBHI for recipient cells, and eBHI supplemented with vancomycin (64 mg/L) for donor cells. Donor cells were grown overnight at 37 °C under anaerobic conditions (SHELLAB Bactron Anaerobic/Environmental chamber, Sheldon Manufacturing Inc., Cornelius, Ore.) whereas both strains of recipient cells were grown for 4 hours under aerobic conditions. An aliquot of 100 µL of each culture was preleved and washed with 1 mL of eBHI. Cultures of donor and recipient were mixed in 50 µL of eBHI and spread onto nitrocellulose 0.45-µm-pore-size filters placed onto the surface of a blood agar plate. The bacterial counts were 1×10^9 CFU/mL for the donor CCRI-9842, 3×10^7 CFU/mL for the recipient JH2-2, and 6×10^6 CFU/mL for the recipient CCRI-1453. The filter-containing blood agar plates were incubated 18 h at 37°C under anaerobic conditions. After the mating period, the filters were removed from the agar plates and placed in 15-mL bottles containing 1 mL of eBHI broth and vortexed for 10 to 20 s. An aliquot of 250 µL was then plated onto selective blood agar plates containing vancomycin (20 mg/L), rifampicin (20 mg/L), and fusidic acid (10 mg/L) for mating experiments with JH2-2 and vancomycin (16 mg/L) alone for mating experiments with CCRI-1453. The plates were incubated for 5 days at 37 °C under aerobic conditions and examined each day for appearance of colonies.

Plasmid extraction from Clostridium sp. CCRI-9842

To find out if the Tn5382-like transposon of the *Clostridium* sp. CCRI-9842 strain was located on a plasmid, the modified plasmid extraction alkaline lysis method previously reported was used.³¹

Nucleotide sequence accession number

The GenBank accession numbers of the *vanB2* cluster sequence of *Clostridium* sp. CCRI-9842 and the left and right ends of the Tn5382-like transposon are AY772783, AY772782, AY772784, respectively.

Results

Isolation and identification of Clostridium sp. CCRI-9842 containing vanB

The anaerobic bacterial strain CCRI-9842 containing the *vanB* gene which was isolated from a human faecal specimen was identified as *Clostridium* sp. by phenotypic identification methods. Analysis of the partial sequence of its 16S rDNA revealed that this *Clostridium* strain was most similar (98.8% identity) to an uncultured bacterium HuCC34 of human colonic flora (GenBank accession number AJ315486),³² to an uncultured *Clostridium* strain N6 (97.3% identity) from human faeces (GenBank accession number AJ582080), to an uncultured *Clostridium* strain DR6A (96.7% identity) from the rumen of red deer (GenBank accession number Y10028), and to *Clostridium bolteae* (96.8% identity) isolated from human faeces (GenBank accession number AJ508452).³³ *Clostridium* sp. CCRI-9842 was resistant to vancomycin (MIC of 256 mg/L) and susceptible to teicoplanin (MIC of 1.5 mg/L) and ampicillin (MIC of 0.38 mg/L).

Characterization of the vanB operon from Clostridium sp. CCRI-9842

The *vanB* gene cluster from *Clostridium* sp. CCRI-9842 was characterized to determine its genetic organization. Mapping with primers specific to both the *vanB1* operon of *E. faecalis* V583¹⁰ and *vanB2* operon of *E. faecalis* 268-10¹⁸ showed that the order of the *vanB* gene cluster from *Clostridium* sp. CCRI-9842 was similar to those of known *vanB* gene clusters (Figure 1). The complete DNA sequence of the *Clostridium* *vanB* operon (from *vanR_B* to *vanX_B*, 6431 bp) exhibited 95.2% identity with that of *vanB1* and 98.9% identity with that of *vanB2*. The nucleotide and deduced amino acid sequences of each gene

of the *vanB* operon from *Clostridium* sp. CCRI-9842 was compared with those of the *vanB1* and *vanB2* operons (Table 3). The deduced amino acid sequences of VanR_B, VanS_B, VanY_B, VanW_B, VanH_B, VanB, and VanX_B exhibited the highest identities (96 to 100%) with those of the *vanB2* operon.

Characterization of the genetic element containing the vanB operon

To characterize the genetic element carrying the *vanB* operon in CCRI-9842, the presence of the two conjugative elements Tn1547 and Tn5382/Tn1549, which usually carry *vanB* gene clusters, was studied. No PCR product was obtained when the primers used to amplify the region upstream from *vanR_B* or downstream from *vanX_B* were specific to the corresponding regions of the *vanB1* gene cluster from *E. faecalis* V583.¹⁰ Also, no PCR product was generated with primers specific to the IS16 and IS256-like insertion sequences from *E. faecalis* BM4281 containing Tn1547.¹⁶ PCR amplification using several primers specific to the Tn1549 transposon targeting the region starting from the left inverted repeat (IR_L) to *vanR_B* as well as the region located downstream of *vanX_B* and extending to the *int* gene showed that the genetic element carrying *vanB* in CCRI-9842 was similar to Tn1549 and contained homologous *orfs* (Figure 1). Analysis of the complete DNA sequences of *orf13*, *orf14*, and *orf15* and the partial sequences of *orf16* and *orf30* from CCRI-9842 located at the left of the *vanB2* gene cluster showed that they each exhibited 100% identities with their counterparts in Tn1549. The complete DNA sequences of *orf7*, *orf8*, and *int* and the partial sequence of the *xis* gene from the CCRI-9842 transposon located at the right of the *vanB2* gene cluster exhibited 99%, 99.1%, 99.8%, and 100% identities with their counterparts in Tn1549, respectively.

Location of the vanB-containing genetic element

To determine the chromosomal or plasmid location of the *vanB*-containing genetic element, plasmid extraction was performed from *Clostridium* sp. CCRI-9842. No plasmid DNA could be detected from this strain whereas plasmid extraction was efficient for the control strain 268-10 carrying the large pIP834 plasmid (data not shown).

The right and left ends and flanking regions of the Tn5382-like transposon

By using a DNA PCR walking method, the left and right ends as well as the DNA flanking the Tn5382-like transposon from *Clostridium* sp. CCRI-9842 was amplified and sequenced. By using primers targeting the *orf13* in combination with universal primers, a ~1400-bp amplification product corresponding to the left extremity of the Tn5382-like transposon and flanking region was produced. The 1024-bp sequence of this PCR product suitable for DNA analysis showed that the first 32 nucleotides starting from the *orf13* primer correspond to the 3' end of *orf13*. The next 251 nucleotides located upstream from *orf13* exhibited 100% identity with the left ends of Tn1549. The left end of the Tn5382-like transposon from CCRI-9842 comprised an (11 bp) imperfect IR sequence which is 100% identical to that of Tn5382/Tn1549 (Figure 2). The DNA sequence flanking the right end of the Tn5382-like transposon from CCRI-9842 was also determined using primers specific to the *int* gene in combination with universal primers. Sequence analysis of 1091 nucleotides of the ~ 1400-bp amplification product corresponding to the right extremity of the Tn5382-like transposon and flanking region showed that the first 176 bp starting from the *int* primer correspond to the 5' end of *int*. The next 174 bp located downstream of *int* exhibited 100% identity with the right ends of Tn5382/Tn1549. The right end of the Tn5382-like

transposon from CCRI-9842 comprised an (11 bp) imperfect IR sequence which is 100% identical with that of Tn5382/Tn1549 (Figure 2).

The flanking regions of the Tn5382-like transposon from CCRI-9842 (741-bp) located beside the left and right imperfect IR sequences, exhibited 100% identity with each other (Figure 3). The G + C content of this 741-nucleotide sequence was 56 mol% which is much higher than the G + C content normally found in *Clostridium* (i.e. ~ 30 mol%). This sequence was compared to the sequences available from public databases using BLAST, however this did not show any significant homology with any published sequence.

Circular form of the Tn5382-like transposon from Clostridium sp. CCRI-9842

To verify if the Tn5382-like transposon from *Clostridium* sp. CCRI-9842 could form circular intermediates, a PCR amplification using primers specific to *orf13* and to the *int* gene and directed outward from the ends of the Tn5382-like transposon was performed. The ~ 900-bp PCR product obtained was cloned and sequenced. Sequence analysis of fifteen different recombinant plasmids revealed PCR product inserts that exhibited 100% nucleotide sequence identity among the fifteen recombinants except for the joint region. The two termini of the Tn5382-like transposon were found in an orientation consistent with the formation of a circular molecule for the fifteen recombinants (Figure 4). The two ends of the transposon were separated by: i) a 5-nucleotide GCTAT sequence in seven recombinants, ii) a 5-nucleotide ATAGC sequence in one recombinant, iii) and a 6-nucleotide CCGGGG sequence in seven recombinants (Figure 4). These sequences represented the point at which the two ends of the transposon are joined. The joint sequences of the distinct circular forms of the Tn5382-like transposon from *Clostridium* sp.

CCRI-9842 are different from those of transposon Tn5382 from *E. faecium* C68¹⁷ (data not shown).

Transfer of the Tn5382-like transposon from Clostridium sp. CCRI-9842.

We performed mating experiments between *Clostridium* sp. CCRI-9842 and strains *E. faecalis* JH2-2 and *E. faecium* CCRI-1453 to determine whether the Tn5382-like transposon identified in *Clostridium* sp. CCRI-9842 was conjugative. No transfer to either enterococcal strains was observed in several mating experiments.

Discussion

During a surveillance programme to detect VRE carriers using PCR detection of *vanA* and *vanB* genes, several faecal specimens were positive for the *vanB* gene while showing no culturable VRE. A strain of *Clostridium* (CCRI-9842) carrying a *vanB* gene was isolated from one of these human faecal specimens. This strain exhibits a high level of vancomycin resistance although clostridia are generally considered susceptible to vancomycin (MICs of 0.5 to 2 mg/L).³⁴ Preliminary studies indicated that strain CCRI-9842 is closely related to *C. bolteae*, and is a member of the phylogenetic cluster XIVa of *Clostridium*, but seems to be a potentially new species of *Clostridium*. Work is in progress to further characterize this potentially new *Clostridium* species.

Genetic analysis revealed that strain CCRI-9842 carries a *vanB* gene cluster closely related to the *vanB2* gene cluster of enterococci. Mapping and sequencing of the region upstream and downstream from *vanRB* and *vanXB*, respectively, showed that the CCRI-9842 *vanB2* gene cluster was carried by a genetic element similar to transposons Tn5382 and Tn1549,^{17,18} and hence, was designated Tn5382-like.

The Tn5382-like transposon from strain CCRI-9842 seems to be integrated into the chromosome since no plasmid was detected in this strain. Chromosomal location of transposon Tn5382 harbouring the *vanB2* gene cluster was described in *E. faecium* C68¹⁷ whereas the similar transposon Tn1549 (Tn5382-like) also harbouring the *vanB2* gene cluster was found on plasmid pIP834 in *E. faecalis* 268-10.¹⁸ The Tn5382-like transposon of CCRI-9842 is flanked by 741-nucleotide sequences which are identical and oriented in opposite direction. These flanking sequences differ from that of *E. faecium* C68 and *E.*

faecalis 268-10.^{17,18} Indeed, in *E. faecium* C68, transposon Tn5382 is integrated into the bacterial chromosome in the region downstream of the *pbp5* gene whereas the similar transposon Tn/549 is integrated into two different sites of the pAD1 plasmid in *E. faecalis* 268-10 and 654-6.¹⁸ This may be explained by the ability of Tn5382 to insert into different sites in different hosts as well as in different sites in the same host.^{17,18,23} The DNA G + C content of the identical sequences flanking the Tn5382-like transposon was higher (56 mol%) than those of the clostridia (~ 30 mol %) and enterococci (~ 40 mol %) genomes suggesting another origin for these sequences. These identical sequences could represent insertion sequences (IS) present at both ends of this transposon. Indeed, IS sequences were previously described within the *vanB2* gene cluster as well as within the Tn5382 transposon of several enterococcal isolates.^{35,36} However, the sequences flanking both ends of the Tn5382-like transposon did not show any significant homology with any known IS sequence or transposase. Such non-coding regions surrounding the *C. perfringens* enterotoxin gene (*cpe*) were previously described in several *C. perfringens* strains^{37,38} but the role of these non-coding regions remains unclear.

Circular intermediates harbouring three different joint sequences represented either by nucleotides ATAGC, GCTAT, or CCGGGG were found in the Tn5382-like transposon from *Clostridium* sp. CCRI-9842. These circular intermediates were detected in a purified genomic DNA preparation which had been stored at 4°C, indicating that these intermediates were stable. Variable nucleotide sequences connecting the two ends of circular intermediates were previously reported in different strains for transposons Tn916, Tn5381, and Tn5382.^{39,40} The 5 or 6 nucleotides joint sequences found in the circular intermediates of the Tn5382-like transposon from CCRI-9842 differ from those found in

Tn5382 from *E. faecium* C68 represented by either TTTGT and TTTGTA.¹⁷ In Tn5382 from *E. faecium* C68 as well as in the Tn5381 and Tn916 transposons, the joint nucleotide sequences of the circular intermediates are found at the left or right end of the target junction sequence of these transposons.^{17,39,40} However, the joint nucleotide sequences of the circular intermediates of the CCRI-9842 transposon were not found at the left or right end of the transposon's target junction. The meaning of this observation is not clear, but it suggests a more complex mechanism of transposon excision and integration in CCRI-9842 as compared to previously described conjugative transposons.⁴¹⁻⁴³ Nevertheless, these results provided evidence that the products of the transposon-encoded *int* and *xis* genes had retained the ability to excise the Tn5382-like transposon as a circular molecule and are therefore functional in this *Clostridium* strain. The formation of circular and stable forms of the Tn5382-like transposon has important implications in the possible movement and transfer of the *vanB2* gene cluster among human bowel bacteria by any gene transfer mechanism. In the related conjugative transposons Tn916 and Tn5382, circular forms were shown to be the transposition intermediates.^{17,39,40} However, transfer of the *vanB2* gene cluster from *Clostridium* sp. CCRI-9842 to *E. faecalis* JH2-2 and *E. faecium* CCRI-1453 recipients was not detected. Several reasons can explain the failure of vancomycin resistance transfer in these experiments. It is possible that the *E. faecalis* and *E. faecium* strains are inefficient recipients in mating with the genus *Clostridium* or that the conditions of mating were not appropriate. It may also be explained by the absence of natural systems for transfer or expression in *Clostridium*. It is also possible that the transfer functions of the Tn5382-like transposon are not expressed in *Clostridium* or that a mechanism other than conjugative transposition was responsible for the resistance transfer. Another possibility is that the transfer of the Tn5382-like transposon from CCRI-9842 falls below the limit of

detection under the used experimental conditions as reported for *Streptococcus gallolyticus*.²³

The *vanB2* gene cluster is predominant in enterococci, especially in *E. faecium*, and is responsible for high-level vancomycin resistance in the hospital settings.^{35,44-47} Non-enterococcal bacteria containing *vanB2* genes isolated from human and veal calves faecal specimens have been described. These reports identified *S. bovis*, *S. gallolyticus*, *S. lutetiensis*, *Eggerthella lenta*-related strain, and *Clostridium* species as *vanB2* gene carriers.^{20,21,23} For some of these bacterial species, the genetic element carrying *vanB2* has been studied and shown to be related to Tn5382.^{23,48} Although the presence of *vanB2* genes in *Clostridium* species has been previously reported,²¹ our report is the first descriptive study of a conjugative Tn5382-like transposon in the genus *Clostridium*. The *Clostridium* strain described in this study belongs to the phylogenetic cluster XIVa of *Clostridium*. *Clostridium* species belonging to this cluster have been shown to be one of the major constituents of human faecal flora based on 16S rDNA sequence analysis.^{32,49,50} On this basis, it may not be surprising to find a *Clostridium* species belonging to this cluster carrying a *vanB2* Tn5382-like transposon in the human faecal flora. The high density of *Clostridium* species in human colon would most likely favour horizontal vancomycin gene transfer events. Tn5382-like transposons have been shown to undergo conjugal transfer among enterococci and streptococci.^{17,18,23,35} The results of this study suggest that Tn5382, which is a member of the Tn916 class of conjugative transposon, has the potential to transfer to many different Gram-positive bacterial species of the bowel flora which may serve as a reservoir of vancomycin resistance genes. This has important clinical implications because conjugative transposons are one of the major vectors involved in the spread of antibiotic resistance among bacterial pathogens.^{42,43}

In conclusion, we have shown that a *Clostridium* strain of the human faecal flora carries a chromosomally integrated Tn5382-like transposon containing the *vanB2* gene cluster. This transposon produces circular intermediate molecules which were not transferable to *E. faecalis* and *E. faecium*. The failure of vancomycin resistance transfer from *Clostridium* sp. CCRI-9842 to enterococci suggests that the level of transposition in natural systems would be low.

Acknowledgments

We thank Pierre Lebel for providing faecal specimens as well as Amélie Cartier and Carolyne Laplante for their helpful technical assistance. We also thank Neil Woodford, Louis B. Rice, and Louise Jetté for providing strains. This study was supported by grant PA-15586 from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR), by grant 2201-181 from the Valorisation Recherche Québec (VRQ), and by Infectio Diagnostic (I.D.I.) Inc. (Sainte-Foy, Québec, Canada). M.-C. Domingo is a research scholar from the Bayer/CIHR/AMMI Canada/FCMI and from the CIHR Strategic Training Program in Microbial Resistance (grant STP-53924).

(This study was presented in part at the 102nd General Meeting of the American Society of Microbiology, Salt Lake City, Utah, 19-23 May 2002).

References

1. Barna, J. C. J. & Williams, D. H. (1984). The structure and mode of action of glycopeptide antibiotics. *Annual Review of Microbiology* **38**, 339-57.
2. Reynolds, P. E. (1989). Structure, biochemistry and mechanism of action of glycopeptide antibiotics. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **8**, 943-50.
3. Nagarajan, R. (1991). Antibacterial activities and modes of action of vancomycin and related glycopeptides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **35**, 605-9.
4. Uttley, A. H., Collins, C. H., Naidoo, J. et al. (1988). Vancomycin-resistant enterococci. *Lancet* **1**, 57-8.
5. Leclercq, R., Derlot, E., Duval, J. et al. (1988). Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. *New England Journal of Medicine* **319**, 157-61.
6. Cetinkaya, Y., Falk, P. & Mayhall, C. G. (2000). Vancomycin-resistant enterococci. *Clinical Microbiology Reviews* **13**, 686-707.
7. McKessar, S. J., Berry, A. M., Bell, J. M. et al. (2000). Genetic characterization of *vanG*, a novel vancomycin resistance locus of *Enterococcus faecalis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **44**, 3224-8.

8. DeLisle, S. & Perl, T. M. (2003). Vancomycin-resistant enterococci: a road map on how to prevent the emergence and transmission of antimicrobial resistance. *Chest* **123**, 504S-18S.
9. Evers, S., Reynolds, P. E. & Courvalin, P. (1994). Sequence of the *vanB* and *ddl* genes encoding D-alanine:D-lactate and D-alanine:D-alanine ligases in vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* V583. *Gene* **140**, 97-102.
10. Evers, S. & Courvalin, P. (1996). Regulation of VanB-type vancomycin resistance gene expression by the VanS(B)-VanR (B) two-component regulatory system in *Enterococcus faecalis* V583. *Journal of Bacteriology* **178**, 1302-9.
11. Billot-Klein, D., Gutmann, L., Sable, S. et al. (1994). Modification of peptidoglycan precursors is a common feature of the low-level vancomycin-resistant VANB-type *Enterococcus* D366 and of the naturally glycopeptide-resistant species *Lactobacillus casei*, *Pediococcus pentosaceus*, *Leuconostoc mesenteroides*, and *Enterococcus gallinarum*. *Journal of Bacteriology* **176**, 2398-405.
12. Quintiliani, R. J. & Courvalin, P. (1994). Conjugal transfer of the vancomycin resistance determinant *vanB* between enterococci involves the movement of large genetic elements from chromosome to chromosome. *FEMS Microbiology Letters* **119**, 359-63.
13. Woodford, N., Jones, B. L., Baccus, Z. et al. (1995). Linkage of vancomycin and high-level gentamicin resistance genes on the same plasmid in a clinical isolate of *Enterococcus faecalis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **35**, 179-84.

14. Patel, R., Uhl, J. R., Kohner, P. et al. (1998). DNA sequence variation within *vanA*, *vanB*, *vanC-1*, and *vanC-2/3* genes of clinical *Enterococcus* isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **42**, 202-5.
15. Gold, H. S., Unal, S., Cercenado, E. et al. (1993). A gene conferring resistance to vancomycin but not teicoplanin in isolates of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* demonstrates homology with *vanB*, *vanA*, and *vanC* genes of enterococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **37**, 1604-9.
16. Quintiliani, R., Jr. & Courvalin, P. (1996). Characterization of Tn1547, a composite transposon flanked by the IS16 and IS256-like elements, that confers vancomycin resistance in *Enterococcus faecalis* BM4281. *Gene* **172**, 1-8.
17. Carias, L. L., Rudin, S. D., Donskey, C. J. et al. (1998). Genetic linkage and cotransfer of a novel, *vanB*-containing transposon (Tn5382) and a low-affinity penicillin-binding protein 5 gene in a clinical vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolate. *Journal of Bacteriology* **180**, 4426-34.
18. Garnier, F., Taourit, S., Glaser, P. et al. (2000). Characterization of transposon Tn1549, conferring VanB-type resistance in *Enterococcus* spp. *Microbiology* **146**, 1481-9.
19. Krcmery, V., Jr., Spanik, S. & Trupl, J. (1996). First report of vancomycin-resistant *Streptococcus mitis* bacteremia in a leukemic patient after prophylaxis with quinolones and during treatment with vancomycin. *Journal of Chemotherapy* **8**, 325-6.

20. Poyart, C., Pierre, C., Quesne, G. et al. (1997). Emergence of vancomycin resistance in the genus *Streptococcus*: characterization of a *vanB* transferable determinant in *Streptococcus bovis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **41**, 24-9.
21. Stinear, T. P., Olden, D. C., Johnson, P. D. et al. (2001). Enterococcal *vanB* resistance locus in anaerobic bacteria in human faeces. *Lancet* **357**, 855-6.
22. Mevius, D., Devriese, L., Butaye, P. et al. (1998). Isolation of glycopeptide resistant *Streptococcus gallolyticus* strains with *vanA*, *vanB*, and both *vanA* and *vanB* genotypes from faecal samples of veal calves in The Netherlands. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **42**, 275-6.
23. Dahl, K. H., Rokenes, T. P., Lundblad, E. W. et al. (2003). Nonconjugative transposition of the *vanB*-containing Tn5382-like element in *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **47**, 786-9.
24. Shoemaker, N. B., Vlamakis, H., Hayes, K. et al. (2001). Evidence for extensive resistance gene transfer among *Bacteroides* spp. and among *Bacteroides* and other genera in the human colon. *Applied Environmental Microbiology* **67**, 561-8.
25. Salyers, A. A., Gupta, A. & Wang, Y. (2004). Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotic resistance genes. *Trends in Microbiology* **12**, 412-6.
26. Engelkirk, P. G., Duben-Engelkirk, J. & Dowell, J. V. R. (1992). Laboratory procedures. In *Principles and Practice of Clinical Anaerobic Bacteriology*, (Hoffman, S., Ed.), pp. 331-57. Star Publishing Company, Belmont, California, USA.

27. Lane, J. D. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. In *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, (Stackbrandt, E. & Goodfellow, M., Eds), pp. 115-203, Wiley & Sons, New York, USA.
28. Jacob, A. E. & Hobbs, S. J. (1974). Conjugal transfer of plasmid-borne multiple antibiotic resistance in *Streptococcus faecalis* var. *zymogenes*. *Journal of Bacteriology* **117**, 360-72.
29. Ke, D., Picard, F. J., Martineau, F. et al. (1999). Development of a PCR assay for rapid detection of enterococci. *Journal of Clinical Microbiology* **37**, 3497-503.
30. Christie, P. J., Korman, R. Z., Zahler, S. A. et al. (1987). Two conjugation systems associated with *Streptococcus faecalis* plasmid pCF10: identification of a conjugative transposon that transfers between *S. faecalis* and *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* **169**, 2529-36.
31. Lee, S. Y. & Rasheed, S. (1990). A simple procedure for maximum yield of high-quality plasmid DNA. *Biotechniques* **9**, 676-9.
32. Hold, G. L., Pryde, S. E., Russell, V. J. et al. (2002). Assessment of microbial diversity in human colonic samples by 16S rDNA sequence analysis. *FEMS Microbiology Ecology* **39**, 33-9.
33. Song, Y., Liu, C., Molitoris, D. R. et al. (2003). *Clostridium bolteae* sp. nov., isolated from human sources. *Systematic and Applied Microbiology* **26**, 84-9.

34. Citron, D. M., Merriam, C. V., Tyrrell, K. L. et al. (2003). *In vitro* activities of ramoplanin, teicoplanin, vancomycin, linezolid, bacitracin, and four other antimicrobials against intestinal anaerobic bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **47**, 2334-8.
35. Dahl, K. H., Lundblad, E. W., Rokenes, T. P. et al. (2000). Genetic linkage of the *vanB2* gene cluster to Tn5382 in vancomycin-resistant enterococci and characterization of two novel insertion sequences. *Microbiology* **146**, 1469-79.
36. Lee, W. G. & Kim, W. (2003). Identification of a novel insertion sequence in *vanB2*-containing *Enterococcus faecium*. *Letters in Applied Microbiology* **36**, 186-90.
37. Brynestad, S., Synstad, B. & Granum, P. E. (1997). The *Clostridium perfringens* enterotoxin gene is on a transposable element in type A human food poisoning strains. *Microbiology* **143**, 2109-15.
38. Brynestad, S. & Granum, P. E. (1999). Evidence that Tn5565, which includes the enterotoxin gene in *Clostridium perfringens*, can have a circular form which may be a transposition intermediate. *FEMS Microbiology Letters* **170**, 281-6.
39. Rice, L. B. & Carias, L. L. (1994). Studies on excision of conjugative transposons in enterococci: evidence for joint sequences composed of strands with unequal numbers of nucleotides. *Plasmid* **31**, 312-6.
40. Scott, J. R., Bringel, F., Marra, D. et al. (1994). Conjugative transposition of Tn916: preferred targets and evidence for conjugative transfer of a single strand and for a double-stranded circular intermediate. *Molecular Microbiology* **11**, 1099-108.

41. Scott, J. R. & Churchward, G. G. (1995). Conjugative transposition. *Annual Review of Microbiology* **49**, 367-97.
42. Salyers, A. A., Shoemaker, N. B., Stevens, A. M. et al. (1995). Conjugative transposons: an unusual and diverse set of integrated gene transfer elements. *Microbiological Reviews* **59**, 579-90.
43. Burrus, V., Pavlovic, G., Decaris, B. et al. (2002). Conjugative transposons: the tip of the iceberg. *Molecular Microbiology* **46**, 601-10.
44. Clark, N. C., Cooksey, R. C., Hill, B. C. et al. (1993). Characterization of glycopeptide-resistant enterococci from U.S. hospitals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **37**, 2311-7.
45. Dahl, K. H., Simonsen, G. S., Olsvik, O. et al. (1999). Heterogeneity in the *vanB* gene cluster of genomically diverse clinical strains of vancomycin-resistant enterococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **43**, 1105-10.
46. McGregor, K. F. & Young, H. K. (2000). Identification and characterization of *vanB2* glycopeptide resistance elements in enterococci isolated in Scotland. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **44**, 2341-8.
47. Lu, J. J., Perng, C. L., Ho, M. F. et al. (2001). High prevalence of VanB2 vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in Taiwan. *Journal of Clinical Microbiology* **39**, 2140-5.

48. Dahl, K. H. & Sundsfjord, A. (2003). Transferable *vanB2* Tn5382-containing elements in fecal streptococcal strains from veal calves. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **47**, 2579-83.
49. Suau, A., Bonnet, R., Sutren, M. et al. (1999). Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Applied and Environmental Microbiology* **65**, 4799-807.
50. Franks, A. H., Harmsen, H. J., Raangs, G. C. et al. (1998). Variations of bacterial populations in human feces measured by fluorescent in situ hybridization with group-specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Applied and Environmental Microbiology* **64**, 3336-45.

Captions to figures

Figure 1. Organization of the Tn5382-like transposon from *Clostridium* sp. CCRI-9842 and localization of the PCR amplification primers used to map and sequence the transposon that contains the *vanB* gene cluster and flanking regions. Shaded arrows represent ORFs. The primers used for amplification are indicated by thin half-arrows. Primers P317, P476, P527, P33228, and P33386 were used to sequence the left and right flanking regions of the transposon. All the primers shown generated PCR products with DNA from the *Clostridium* strain. The primers are described in Table 2. Adapted from Garnier *et al.*¹⁸

Figure 2. Sequences of the Tn5382-like transposon termini from *Clostridium* sp. CCRI-9842 and comparison with the left and right ends of Tn5382 and Tn1549 from *E. faecium* C68 and *E. faecalis* 268-10 (BM4382), respectively. Identical nucleotides are indicated by vertical lines. (A) DNA sequence of the left end of the Tn5382-like transposon from CCRI-9842. The first 50 bp is compared with those of transposon Tn5382 and Tn1549 from *E. faecium* C68 and *E. faecalis* 268-10 (BM4382), respectively. (B) DNA sequence of the right end of the Tn5382-like transposon from CCRI-9842. The last 230 bp is shown. The boxed sequences represent the stop codon of *int* gene and the boldface underlined sequences represent the 11-bp imperfect inverted repeats which are identical in the Tn5382-like transposon from CCRI-9842 and in transposons Tn5382 and Tn1549.

Figure 3. Schematic representation of the Tn5382-like transposon and its imperfect IR_{Left} (IR_L) and IR_{Right} (IR_R) sequences as well as its left and right flanking sequences.

Figure 4. Sequences of the circular intermediates of the Tn5382-like transposon from *Clostridium* sp. CCRI-9842. Circular intermediate (CI) 1 was found in 7 clones, CI 2 was found in 1 clone, and CI 3 was found in 7 clones. The underlined boldface sequences represented the junction sequences. Adjacent sequences are the left and right imperfect IR sequences from the Tn5382-like transposon.

Table 1. Bacterial strains used in this study

Strain	Relevant characteristics	Source or reference
<i>Clostridium</i> sp. CCRI-9842	VAN ^R TEC ^S AMP ^S	This work
<i>E. faecalis</i> JH2-2	FUS ^R RIF ^R	28
<i>E. faecalis</i> 268-10 ^a	VAN ^R TEC ^S GEN ^R	13
<i>E. faecium</i> C68	VAN ^R TEC ^S AMP ^R	17
<i>E. faecium</i> CCRI-1453 ^b	GEN ^R VAN ^S	LSPQ ^c

^a*E. faecalis* 268-10 carries plasmid pIP834.

^bMIC of gentamicin: > 2048 mg/L, MIC of vancomycin: 1.5 mg/L.

^cLaboratoire de Santé Publique du Québec

AMP^R, ampicillin resistant; AMP^S, ampicillin susceptible; FUS^R, fusidic acid resistant; GEN^R, gentamicin resistant; RIF^R, rifampicin resistant; TEC^S, teicoplanin susceptible; VAN^R, vancomycin resistant.

Table 2. Oligonucleotide primers used in this study to map and sequence the Tn5382-like transposon and flanking regions from CCRI-9842

<i>Primer</i>	<i>Oligonucleotide sequence (5'→3')</i>	<i>Nucleotide position</i>
P8	TAGGTTATCGCTGAAAGC	8 ^a
P2961	GGAGGATTTTGGGTGAAG	2961 ^a
P5979	TCGGCGTCCCCTTATATTTTC	5979 ^a
P8959	CCGGATTTACAGCCCTA	8959 ^a
P12033	GATTTGGGCGAGTATGATTTT	12033 ^a
P15264	AACAGGTGGCAGGATGAAT	15264 ^a
P18375	GGCATTGACAAAGACATTATCAGG	18375 ^a
P21137	CTTGATACGCTCTTTGAT	21137 ^a
P24088	CTGYAATACAGTAAGGSGTTT	24088 ^a
P24956	AAGATAAAGAGGGAAGCGTACT	24956 ^a
P25786	GTACGGATATGGAGTGAGC	25786 ^a
P27121	TTATGCGGGAATGAGATTTGAC	27121 ^a
P27949	TTTCATATTATCCCTACGCTGA	27949 ^a
P28870	TTGCTCGGAGGAACATGATG	28870 ^a
P30420	CTATAAGTTGATTGATGAGCCATAC	30420 ^a
P31165	CGCCGCCGTGACCGTGAAGT	31165 ^a
P317	TCCGCCCCGCCGCCGTCGTAGTGA	317 ^a
P476	CGGAAAACAGCCATAGCGTTGTTT	476 ^a
P527	TCCGCAGGTGGTGA'TTGACATC	527 ^a
P3048	TTCCAGCAGCGTTGAGAAG	3047 ^a
P6100	TGCATAATCACCACCTCAAGG	6101 ^a
P9050	GTCAAAGACGTTTCCCTTGA	9050 ^a
P12118	TCGTCTCTCTGTTCACTCA	12116 ^a
P15338	TCCATCTGCTGCTTAAACCTTGAAC	15341 ^a
P18503	ATTTCATGTGTTGACTGTGCGG	18505 ^a
P21242	AGGGCTATGAGATCAAGC	21240 ^a
P24086	ACSCCCTTACTGTATTRCAGAT	24087 ^a
P25456	TGTAGTCACCGATA'TTTTCAAG	25457 ^a
P26336	TCTCCACCCCAAAAACAGC	26334 ^a
P27677	GCCRTTIGYAA'TTTTGTATAATGC	27680 ^a
P29063	TCTTTCTTTTCATGACAAGCAG	29063 ^a
P30447	ACGGCAAAATTAATAAGGTATCG	30450 ^a
P31504	GCCCTTGTAGTTCCGGTCTT	31504 ^a
P33228	AAAGCGGCGTCAGAAAAATCCCCA	33228 ^a
P33386	GGCGGATGTTTGGCAGGCTT	33386 ^a
P14	TTTCGGAAGAACTGTGGAAACG	14 ^b
P217	ACSCCCTTACTGTATTRCAGAT	217 ^b
P6556	CTATAAGTTGATTGATGAGCCATAC	6556 ^b
P6919	GATTCACAATGCTTCGTTTTC	6919 ^b
T1 ^c	GAYRTKCTATTTGGGA	32157 ^a
T2 ^c	TAATAGTTCAGCGTCATGG	33552 ^a
IS16Efm43 ^d	GCCATTGATCTCAGTTAGGAG	43 ^e
IS16Efm1205 ^d	AAAGTGTTCCAATTA'TCCGAG	1205 ^e
IS256Efm76 ^d	AAAAACATACCCAGGAGGAC	76 ^e
IS256Efm1170 ^d	GGCTGATGTTTATTGGGGA	1170 ^e

^aNucleotide positions are those of the Tn1549 transposon from GenBank accession number AF192329.¹⁸

^bNucleotide positions are those of the *vanB1* gene cluster as well as upstream and downstream regions from GenBank accession number U35369.¹⁰

^cPrimers T1 and T2 are from Garnier *et al.*¹⁸

^dPrimers IS16Efm43, IS16Efm1205, IS256Efm76, and IS256Efm1170 are from Dahl *et al.*³⁵

^eNucleotide positions are those of the IS256-like sequence.¹⁶

Table 3. Comparison of nucleic acid and amino acid sequences of the *vanB* gene cluster from *Clostridium* sp. CCRI-9842 with those of *vanB1* and *vanB2*.

Gene	Nucleotide/Amino acid identity %	
	<i>vanB1</i> ^a	<i>vanB2</i> ^b
<i>vanR_B</i>	94.4/95.9	99.2/99
<i>vanS_B</i>	96.2/95.9	99.7/99.7
<i>vanY_B</i>	94.1/92.9	100/100
<i>vanW_B</i>	95.5/92.7	97.5/96.0
<i>vanH_B</i>	95.0/94.4	99.4/98.7
<i>vanB</i>	95.7/95.9	99.1/99.1
<i>vanX_B</i>	95.3/95.8	96.7/97.0

^aSequences are from GenBank accession no. EFU35369

^bSequences are from GenBank accession no. AF192329

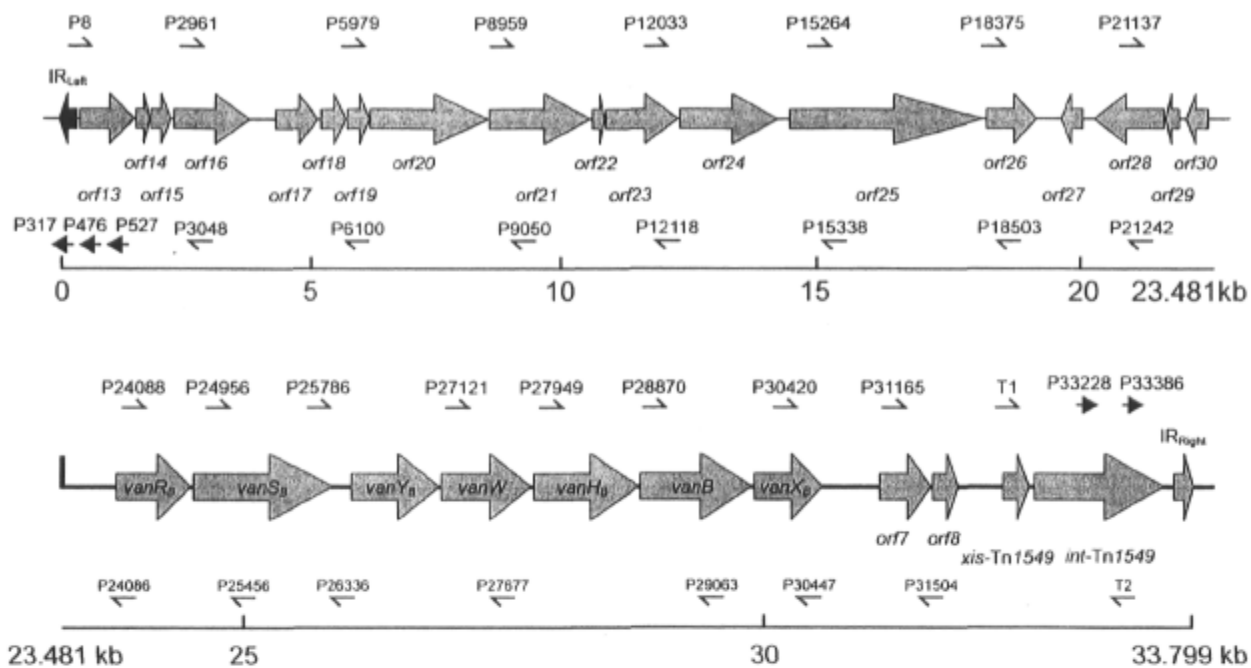


Figure 1

A

Tn5382-like: AAAATTTTAGGTTATCGCTGAAAGCCCCGAAATACGGGCATTTTCGCAGG 50
 |||
 Tn5382: AAAATTTTAGGTTATCGCTGAAAGCCCCGAAATACGGGCATTTTCGCAGG 50
 |||
 Tn1549: AAAATTTTAGGTTATCGCTGAAAGCCCCGAAATACGGGCATTTTCGCAGG 50

B

Tn5382-like: ATGCACACGCCACATTCGATTCCGCAAGGGCAGAAATGGAACGGCTGGCAGCCTGACACA
 |||
 Tn5382: 3347 ATGCACACGCCACATTCGATTCCGCAAGGGCAGAAATGGAACGGCTGGCAGCCTGACACA 3406
 |||
 Tn1549: 33570 ATGCACACGCCACATTCGATTCCGCAAGGGCAGAAATGGAACGGCTGGCAGCCTGACACA 33629
 |||
 Tn5382-like: AGGCCGGTTTTACTACTCCATTTACTACTTTTGAGGGGGAAATGGTGAGAGGTAATAAGA
 |||
 Tn5382: 3407 AGGCCGGTTTTACTACTCCATTTACTACTTTTGAGGGGGAAATGGTGAGAGGTAATAAGA 3466
 |||
 Tn1549: 33630 AGGCCGGTTTTACTACTCCATTTACTACTTTTGAGGGGGAAATGGTGAGAGGTAATAAGA 33689
 |||
 Tn5382-like: ACATTTGTAAGTATCTAACAATATCAAAAATGCCGGAAAAGCCCCGAAACACGGGCTATA
 |||
 Tn5382: 3467 ACATTTGTAAGTATCTAACAATATCAAAAATGCCGGAAAAGCCCCGAAACACGGGCTATA 3526
 |||
 Tn1549: 33690 ACATTTGTAAGTATCTAACAATATCAAAAATGCCGGAAAAGCCCCGAAACACGGGCTATA 33749
 |||
 Tn5382-like: CCGACATTCAAGAACTTCTAAAAAGATAATCTAAAATCCCATATAATTTT
 |||
 Tn5382: 3527 CCGACATTCAAGAACTTCTAAAAAGATAATCTAAAATCCCATATAATTTT 3576
 |||
 Tn1549: 33750 CCGACATTCAAGAACTTCTAAAAAGATAATCTAAAATCCCATATAATTTT 33799

Figure 2

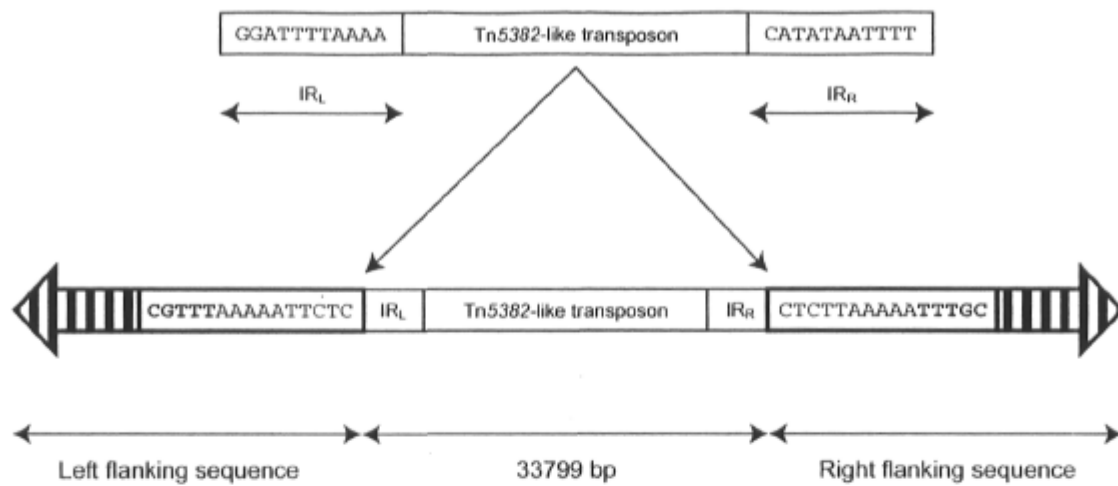


Figure 3

CI 1	CATATAATTTT	<u>GCTAT</u>	AAAATTTTAGG
CI 2	CATATAATTTT	<u>ATAGC</u>	AAAATTTTAGG
CI 3	CATATAATTTT	<u>CCGGGG</u>	AAAATTTTAGG

Figure 4

CHAPITRE X. CARACTÉRISATION DES LOCUS *vanD* ET *vanG*-LIKE CHEZ LA SOUCHE DE *Ruminococcus gauvreaui* sp. nov.

Ce chapitre est la version finale du manuscrit qui vient d'être accepté pour publication dans la revue *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.

10.1 RÉSUMÉ

Ce chapitre est une suite du chapitre 8 qui avait décrit la nouvelle espèce *Ruminococcus gauvreaui* (souche CCRI-16110) résistante aux glycopeptides. Dans ce chapitre, nous caractérisons le phénotype de résistance aux glycopeptides de cette souche ainsi que l'élément génétique qui le porte. *Ruminococcus gauvreaui* CCRI-16110 exprime un haut niveau de résistance à la vancomycine et à la téicoplanine avec des CMI des deux antibiotiques qui sont supérieures à 256 mg/l. Les six gènes constituant le locus *vanD* ainsi que le gène de l'intégrase *intD* sont présents chez cette souche. Le locus *vanD* et le gène *intD* sont fortement homologues à ceux du locus *vanD1* des entérocoques. Il s'agit de la première description du locus *vanD* et de l'intégrase *intD* dans une espèce autre que les entérocoques. Nous avons également identifié pour la première fois dans la souche CCRI-16110 un locus dont les gènes sont apparentés aux gènes *vanS_G*, *vanG* et *vanT_G* habituellement décrits dans les locus *vanG* des ERG. La résistance de cette souche aux glycopeptides pourrait être due à la présence des gènes *vanD* et apparenté à *vanG*. Ces résultats suggèrent encore une fois le caractère transférable des gènes acquis de résistance aux glycopeptides et montre que le tube digestif constitue un réservoir de gènes *van*.

10.2 ARTICLE

Characterization of the *vanD* and *vanG*-like Gene Clusters in a *Ruminococcus* Species isolated from the Human Bowel Flora

M.-C. Domingo^{1,2}, A. Huletsky^{1,2}, R. Giroux¹, F.J. Picard^{1,2}, M.G. Bergeron^{1,2*}

¹Centre de Recherche en Infectiologie de l'Université Laval, CHUQ, Pavillon CHUL, 2705 boul Laurier, Sainte-Foy, Québec, Canada, G1V 4G2

²Division de Microbiologie, Faculté de Médecine, Université Laval, Québec, Québec, Canada

***Author for correspondence:** Centre de Recherche en Infectiologie de l'Université Laval, CHUQ (Pavillon CHUL), 2705 boul. Laurier, Québec, Québec, G1V 4G2, Canada.
Tel: (418) 654-2705. Fax: (418)-654-2715. E-mail: michel.g.bergeron@crchul.ulaval.ca

Running title: *Ruminococcus* Species Harboring *vanD* and *vanG*-like Gene Clusters

ABSTRACT

A vancomycin-resistant anaerobic gram-positive coccus containing the *vanD* locus and *vanG*-like genes (strain CCRI-16110) was isolated from a human fecal specimen during a hospital surveillance program to detect VRE carriers. Comparison of the 16S rRNA gene sequence of strain CCRI-16110 with databases revealed a potentially novel *Ruminococcus* species that was most similar (< 93% identity) to *Clostridium bolteae*, *Ruminococcus productus*, and *Clostridium indolis*. Strain CCRI-16110 was highly resistant to vancomycin and teicoplanin (MICs > 256 µg/ml). The complete DNA sequence of the *vanD* cluster was most similar (98.2% identity) to that of *E. faecium* BM4339 containing the *vanD1* allele. An *intD* gene with 99% identity to that of this *E. faecium* strain was found to be associated with the *vanD* gene cluster of this novel anaerobic bacterium. Strain CCRI-16110 also harbors genes encoding putative VanS_G, VanG, and VanT_G proteins displaying respectively 56, 73.6, and 55 % amino acid sequence identities as compared to the corresponding proteins encoded by the *vanG1* and *vanG2* operons of *E. faecalis* BM4518 and N03-0233. This study reports for the first time an anaerobic bacterium containing the *vanD* gene cluster. This strain also harbors a partial *vanG*-like gene cluster. The presence of *vanD*- and *vanG*-containing anaerobic bacteria in the human bowel flora suggests that these bacteria may serve as a reservoir for vancomycin resistance *vanD* and *vanG* genes.

INTRODUCTION

The glycopeptide antibiotics vancomycin and teicoplanin interfere with cell wall synthesis in gram-positive bacteria by binding to the terminal dipeptide D-alanyl-D-alanine (D-Ala-D-Ala) region of the pentapeptide precursors of peptidoglycan side chains (5). The use of vancomycin for treatment of gram-positive bacterial infections started soon after its discovery in 1956 (33). Thirty years later, resistance to glycopeptide antibiotics was first described in enterococci (32, 47) and has now spread worldwide causing great public health concern in clinical settings. Six different genes (*vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanD*, *vanE*, and *vanG*) have been shown to confer glycopeptide resistance in enterococci (16).

The VanD-type resistance is constitutively expressed in enterococci (17, 20) and is characterized by moderate MICs to vancomycin (64-128 $\mu\text{g/ml}$) and teicoplanin (4-64 $\mu\text{g/ml}$). This VanD-type resistance results from the acquisition of the *vanR_D*, *vanS_D*, *vanY_D*, *vanH_D*, *vanD*, and *vanX_D* cluster of genes which directs synthesis of peptidoglycan precursors terminating in D-alanyl-D-lactate (20). Analysis of the variability in *vanD* led to the identification of five subtypes designated *vanD1*, *vanD2*, *vanD3*, *vanD4*, and *vanD5* (6, 8, 17, 20, 35). The *vanD* gene cluster is located on the chromosome and is not transferable to other enterococci by conjugation *in vitro* (20). Another specific characteristic of VanD-type enterococci is the presence of an impaired D-Ala-D-Ala ligase due to mutations in the chromosomal ligase-encoding gene *ddl* (8, 16). Although the Ddl ligase is inactive, the VanD-type enterococci are able to grow even in the absence of glycopeptide because the *vanD* cluster is expressed constitutively as a result of mutations in the VanS_D sensor or in the VanR_D regulator (19).

The VanG-type resistance in enterococci is characterized by low level resistance to vancomycin (MIC = 16 µg/ml) and susceptibility to teicoplanin (18). This VanG-type resistance results from the acquisition of the *vanU_G*, *vanR_G*, *vanS_G*, *vanY_G*, *vanW_G*, *vanG*, *vanXY_G*, and *vanT_G* cluster of genes which directs synthesis of peptidoglycan precursors terminating in D-alanyl-D-serine (D-Ala-D-Ser) (18). The *vanG* gene cluster is located on the chromosome and the transfer of VanG-type vancomycin resistance from *E. faecalis* BM4518 to susceptible *E. faecalis* JH2-2 was via a ca.-240-kb chromosomal element (18). Recently, a new *vanG* variant was described and designated *vanG2* (7).

To date, the *vanD* and *vanG* gene clusters have only been described in *Enterococcus*. However, a high prevalence of *vanD* genes (37.9%) and *vanG* genes (9.3%) in fecal specimens which are not associated with vancomycin-resistant enterococci (VRE) was recently described by our group during a VRE surveillance program implemented in two North American hospitals (22). We have previously isolated and characterized an anaerobic bacterium containing the *vanB* gene from a *vanB*-positive fecal specimen (21). In this study, we describe for the first time an anaerobic bacterium resistant to both vancomycin and teicoplanin, which contains a *vanD* gene cluster and a *vanG*-like gene cluster.

(This study was presented in part at the 46th ICAAC, San Francisco, CA, 27 to 30 September 2006).

MATERIALS AND METHODS

Isolation procedure and identification. A *vanD*-positive rectal specimen, ERV-110, collected from a patient of the Montreal General Hospital (Québec, Canada) in 2001 (22), was incubated under anaerobic conditions in brain heart infusion (BHI) broth (Difco, Detroit, Mich.) supplemented with vitamin K (0.001 mg/mL), hemin (0.005 mg/mL), L-cystine (0.5 mg/mL) [named enriched Brain Heart Infusion (eBHI) broth]. This broth culture was conserved at -80°C in 20% glycerol until subculture was ready to perform. The broth culture was subcultured several times in eBHI broth supplemented with sodium salt lactate (10 mM), sodium salt pyruvate (10 mM), vancomycin (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), and aztreonam (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) [named eBHILPVA broth] under anaerobic conditions at $35\text{-}37^{\circ}\text{C}$. A subculture was then plated on eBHILPVA agar and incubated under the same anaerobic conditions for 7 days. Colonies were then screened for the presence of the *vanD* gene by PCR. A colony positive for *vanD* was then further characterized. Identification of the *vanD*-positive colony (strain CCRI-16110) was performed by methods previously described (24) and with the Rapid ID 32A system (bioMérieux, Marcy l'Étoile, France). Partial sequencing of a 1466-bp region of the gene encoding 16S rRNA was performed as previously described (21).

Resistance studies. Minimal inhibitory concentrations (MICs) of vancomycin and metronidazole were determined by the agar dilution method for anaerobe according to the Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) (34), whereas MIC for teicoplanin was determined by the Etest method (AB Biodisk, Sweden). The media used for antimicrobial

susceptibility testing was Brucella agar (Difco, Detroit, Mich.) supplemented with laked sheep blood, vitamin K (0.001 mg/ml), and hemin (0.005 mg/ml).

Bacterial strains and plasmids. The origin and characteristics of the strains used in this study are described in Table 1. *E. faecium* BM4339 (resistant to vancomycin and teicoplanin and containing the *vanD* gene cluster) (11) and *E. faecalis* JH2-2 (resistant to fusidic acid and rifampicin) (27) were obtained from P. Courvalin (Unité des Agents Antibactériens, Institut Pasteur, Paris, France) and from N. Woodford (Health Protection Agency, London, United Kingdom), respectively. *E. faecium* BM4339 was used as a control strain and *E. faecalis* JH2-2 was used as recipient in the conjugation experiments. *Escherichia coli* TOP10 (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada) was used as a host for recombinant plasmids. PCR products were cloned in the vector pCR[®]2.1 using the TOPO TA Cloning[®] kit (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada).

Sequencing of the *vanD* gene cluster. The primers used to characterize the *vanD* cluster are described in Table 2. PCR reactions were performed using standard conditions with purified genomic DNA and the *Taq* DNA polymerase (Promega, Mississauga, Ontario, Canada) as previously described (29). Genomic DNA was purified with the Gnome kit (Qbiogene Inc., Carlsbad, Calif.) according to the manufacturer's instructions. Purification of the amplification products and sequencing reactions were performed as previously described (29). Comparison with known sequences was carried out using the programs from the GCG package (Wisconsin Package Version 10.3, Accelrys Inc., San Diego, Calif.).

Sequencing of the *vanG*-like gene from strain CCRI-16110. PCR amplification using universal primers V1 and V2a (Table 2) which were designed to amplify an internal region of the genes encoding D-Ala-D-Ala ligases and related vancomycin-resistant proteins (23) was performed using genomic DNA purified from strain CCRI-16110. PCR products of the expected size (630 bp) were purified and cloned in the vector pCR[®]2.1 using the TOPO TA Cloning[®] kit according to the manufacturer's instructions. Plasmid DNA extraction from selected clones were performed using the QIAGEN Plasmid Mini kit (QIAGEN, Mississauga, Ontario, Canada). The inserts from these recombinants plasmids were sequenced using the universal M13 forward and M13 reverse primers (Invitrogen). Nucleotide and deduced amino acid sequences from the cloned 630-bp PCR product obtained were analyzed by using the BLASTN, TBLASTN, and BLASTP softwares from the GCG package. Subsequently, the DNA sequence flanking the 630-bp fragment containing the *vanG*-like gene was obtained by using a combination of PCR amplifications with the DNA Walking SpeedUp[™] kit (Bio/Can Scientific, Mississauga, Canada) and cloning techniques. Briefly, PCR and nested PCR reactions were performed using primers specific to the 630-pb fragment containing *vanG*, in combination with universal primers provided by the manufacturer. The PCR products were cloned and sequenced. DNA sequences of the cloned PCR products obtained using the DNA walking SpeedUp[™] kit were confirmed by sequencing PCR products obtained after amplification of total genomic DNA from strain CCRI-16110 using specific primers overlapping the cloned fragments (Table 2). The Artemis software (38) was used to analyse and collate data from the complete sequence.

Phylogenetic analysis of the *vanG*-like gene from strain CCRI-16110. To ascertain the phylogenetic position of the deduced protein sequence of the *vanG*-like ligase gene from strain CCRI-16110, phylogenetic analysis was performed using the deduced amino acid sequences from the Ddl of gram-positive and gram-negative organisms as well as the D-Ala-D-Lac and D-Ala-D-Ser ligases of vancomycin-resistant organisms. Amino acid sequence alignment was performed with CLUSTALW (46). Phylogenetic analysis was carried out by the neighbour-joining method (39) using MEGA version 3.1 (30). Evolutionary distance was generated according to the Jones-Taylor-Thornton matrix for amino acid sequences (28). The tree topology was compared to that obtained by the maximum parsimony method. Bootstrap values were calculated from 1000 resamplings to test the robustness of the data and displayed as percentages.

Filter mating. To study the transfer by conjugation of the glycopeptides-resistance phenotype of strain CCRI-16110, mating on filters was performed as described previously (21). *E. faecalis* JH2-2 was used as recipient cells while strain CCRI-16110 was used as a donor.

Nucleotide sequence accession numbers. The GenBank accession numbers for the *vanD* gene cluster and partial *vanG*-like gene cluster sequences of strain CCRI-16110 are, EF508033 and EF508032, respectively.

RESULTS

Isolation and identification of *Ruminococcus* sp. CCRI-16110 containing *vanD*. A strictly anaerobic gram-positive coccus organism (strain CCRI-16110) was isolated from fecal specimen ERV-110. Cells of strain CCRI-16110 were organized as single cocci or in chains. Rarely, elongated cells could also be observed. This strain was shown to contain the *vanD* gene by PCR. Biochemical tests performed in triplicate using the Rapid ID 32A system remained negative for all substrates tested with this system. Analysis of the partial sequence of its 16S rDNA revealed that strain CCRI-16110 was most similar to *Clostridium bolteae* (93.8% identity), to *Ruminococcus productus* (< 93% identity), to *Clostridium indolis* (< 93% identity), to *Clostridium asparagiforme* (< 93% identity), and to *Ruminococcus hansenii* (92.8% identity). Based on this phenotypic and genotypic analysis, strain CCRI-16110 is a potentially novel *Ruminococcus* species belonging to the *Clostridium coccoides* cluster of organisms (rRNA cluster XIVa) (15). Therefore, this strain was temporarily named *Ruminococcus* sp. CCRI-16110. This strain was resistant to vancomycin and teicoplanin (MICs > 256 µg/ml) as well as susceptible to metronidazole (MIC < 0.125 µg/ml).

Characterization of the *vanD* gene cluster from *Ruminococcus* sp. CCRI-16110. The *vanD* gene cluster from *Ruminococcus* sp. CCRI-16110 was characterized to determine its genetic organization. Nucleotide sequence analysis of the *vanD* gene cluster of this strain showed that the gene order of this cluster was similar to known *vanD* clusters (6, 8, 10, 17, 19, 20, 35) (Fig. 1). The complete DNA sequence of the CCRI-16110 *vanD* operon from *vanR_D* to *vanX_D* (5655 nt), exhibited 98% identity with the *vanD1* operon (accession

number AF130997), 97% identity with the *vanD3* operon (accession number AF175293), 95% identity with the *vanD2* operon (accession number AF153050), 93% identity with the *vanD5* operon (accession number AY489045), and 89% identity with the *vanD4* operon (accession number AY082011). The nucleotide and deduced amino acid sequences of each gene of the *vanD* operon from *Ruminococcus* sp. CCRI-16110 was compared with those of the *vanD1*, *vanD2*, *vanD3*, *vanD4*, and *vanD5* operons (Table 3). The amino acid sequences of VanR_D, VanS_D, VanH_D, and VanX_D of the *vanD* operon from this *Ruminococcus* strain were most similar with those of the *vanD1* operon from *E. faecium* BM4339 while the amino acid sequences of VanY_D and VanD were most similar with those of the *vanD3* operon from *E. faecium* N97-330 (Table 3) (10). The H, N, G1, F, and G2 conserved motifs found in histidine kinase proteins were present in the VanS_D sensor of strain CCRI-16110 (19). Comparison of the sequence of the VanS_D sensor of strain CCRI-16110 with that of BM4339 revealed point mutations in critical regions of these conserved motifs: 1) a V₁₆₅A mutation within the H block beside the putative autophosphorylation site and 2) a Q₃₀₈K mutation beside the G1 ATP binding block. An *intD* gene encoding a putative integrase-like protein, showing 99.2% amino acid sequence identity with that of *E. faecium* BM4339, was found to be associated with the *vanD* gene cluster (Fig. 1).

Characterization of the *vanG*-like operon from *Ruminococcus* sp. CCRI-16110.

Since the *ddl* gene encoding the dipeptide D-Ala-D-Ala ending precursors of peptidoglycan is mutated in enterococci strains harboring the *vanD* gene (6, 8, 9, 11, 19), we searched for a *ddl* gene in strain CCRI-16110 using the universal primers V1 and V2a (Table 2) (23). Similarity search using TBLASTN revealed that the sequence of 630-bp PCR amplification product generated using these primers was most similar (66% amino acid sequence

identity) to known VanG of enterococci and hence, this variant was designated *vanG*-like. From this partial *vanG*-like gene sequence, the successive combination of PCR amplification, cloning, and sequencing allowed characterization of a 3950-bp genomic DNA fragment from strain CCRI-16110 containing this gene. Sequence analysis of this genomic DNA fragment using the Artemis software revealed the presence of three complete ORFs and one partial ORF encompassing the *vanG*-like genes of this strain (Fig. 2). Two complete ORFs displayed the highest amino acid sequence identities with, respectively, the D-Ala-D-Ser ligases VanG (63.6% to 65.3 %) and serine racemases VanT_G (58.6 to 59.6%) of the *vanG* operons of enterococci (Table 4). The partial ORF (which result from the shortened PCR fragment used for sequencing) was most similar to the histidine kinase sensors VanS_G (63.4 to 64.8 % identities). The fourth complete ORF displayed significant amino acid sequence identity with the VanZ protein described in the *vanA* operon of *E. faecium* BM4147 (27.1%) and *vanF* operon of *Paenibacillus popilliae* (27.5%) (Table 4) as well as in the *skin* element of *C. difficile* 630 (28.2%). Therefore, the gene encoding the putative VanZ protein in the *vanG*-like cluster of strain CCRI-16110 was named *vanZ_G*.

Comparison of the organization of the partial *vanG*-like operon from strain CCRI-16110 (the region upstream of *vanS_G*-like has not been characterized) with the *vanG* operons from *E. faecalis* BM4518 (*vanG1*), *E. faecalis* N03-0233 (*vanG2*), and *C. difficile* 630 (*vanG*-like), showed that the genes *vanY_G* encoding the carboxypeptidase, *vanXY_G* encoding the bifunctional dipeptidase and carboxypeptidase enzyme, and *vanW_G* with unknown function, were absent in strain CCRI-16110 (Fig. 2). We cannot come to a conclusion about the presence of *vanR* and *vanU* in strain CCRI-16110 because of incomplete sequencing of the *vanG*-like operon. The *vanZ* gene with unknown function was only present in the *vanG*-like

operon from CCRI-16110. The presence of this gene could explain the high level of teicoplanin resistance in this strain similar to that described for *E. faecium* BM4147. Moreover, the *vanXY_G* gene, *vanU_G* gene encoding a regulatory protein, and the *vanW_G* gene with unknown function described in the *vanG1* operon of *E. faecalis* BM4518 were absent in the *vanG*-like operon of *C. difficile* 630 whereas the gene *vanY_G* was absent in *vanG2* operon of *E. faecalis* N03-0233 (Fig. 2). The DNA G + C content (% GC) of the genes forming the *vanG*-like operon of strain CCRI-16110 was higher than those of the *vanG* operons from enterococci and *C. difficile*.

Phylogenetic studies were carried out using sequences of D-Ala-D-Ser ligases from VRE and *C. innocuum* as well as the deduced amino acid sequences of the *vanG*-like genes from *Ruminococcus* sp. CCRI-16110 and *C. difficile* 630. A tree constructed using the neighbour-joining method, depicting the phylogenetic relationships of the putative D-Ala-D-Ser of strain CCRI-16110, is shown in Fig. 3. The branching pattern of the tree showed that the family of D-Ala-D-Ser ligases is organized in three distinct phylogenetic clades that were supported by significant bootstrap re-sampling values. The VanG-like protein of strain CCRI-16110 was most closely related to the VanG-type D-Ala-D-Ser family of ligases. The two other clades are 1) the VanE and VanC D-Ala-D-Ser ligases and 2) the D-Ala-D-Ser ligases of *C. innocuum*.

Transfer of glycopeptide resistance from *Ruminococcus* sp. CCRI-16110 by conjugation. We performed mating experiments between *Ruminococcus* sp. CCRI-16110 and *E. faecalis* JH2-2 to determine whether glycopeptide of *Ruminococcus* sp. CCRI-16110 was transferable by conjugation. No transfer was observed in several mating experiments.

DISCUSSION

We isolated for the first time a strictly anaerobic gram-positive coccus (strain CCRI-16110) harboring the *vanD* gene. This strain, which was isolated from a human fecal specimen, displayed a high level of resistance to vancomycin and teicoplanin. Preliminary studies indicated that strain CCRI-16110 is closely related to *C. bolteae*, *R. productus*, *C. indolis*, *C. asparagiforme*, and *R. hansenii*. This strain is potentially a novel species of *Ruminococcus* and was temporarily named *Ruminococcus* sp. CCRI-16110. Work is in progress to characterize and assign a taxonomic name for this potentially novel species of *Ruminococcus*.

Genetic analysis revealed that *Ruminococcus* sp. CCRI-16110 carries a *vanD* gene cluster closely related to the *vanD1* gene cluster of enterococci, although its VanD ligase was most similar to that of VanD3. So far, the *vanD* gene cluster has only been described in enterococci including *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, and *E. raffinosus* (9, 19, 45). The present report is the first descriptive study of the *vanD* gene cluster in non-enterococcal species. The *vanD* cluster is generally responsible for moderate levels of resistance to vancomycin (MIC = 64-128 µg/ml) and teicoplanin (4-64 µg/ml) in enterococci (16). However, *Ruminococcus* sp. CCRI-16110 displays a high level of vancomycin and teicoplanin resistance (MICs for both antibiotics > 256 µg/ml) which usually corresponds to the VanA phenotype, although no *vanA* gene was detected in this strain (data not shown).

The *ddl* gene encoding the D-Ala-D-Ala ligase is mutated in enterococci strains harboring the *vanD* gene (6, 8, 9, 11, 19). While searching for a *ddl* gene in *Ruminococcus* sp. CCRI-16110 and potential alteration in this gene, we identified a cluster of four ORFs, of which three displayed high identities to the *vanS_G*, *vanG*, and *vanT_G* genes of *E. faecalis*

BM4518 and N03-0233, while an additional ORF was related to the *vanZ* gene. The *vanZ* gene has been described in various genetic elements including the enterococcal *vanA* operon, the *vanF* operon of *Paenibacillus popilliae*, and the *skin* element of *C. difficile* 630 (16, 43). The *skin* (*sigK* intervening sequence) element of *C. difficile* 630 is a 14.66 kb prophage-like element inserted in the gene *sigK* encoding a sporulation-specific sigma factor (16, 26, 43). The function of the *vanZ* gene identified in the *vanA* and *vanF* operons is unknown but was shown to be involved in low level resistance to teicoplanin in *E. faecium* BM4147 containing the *vanA* operon (1, 2). The presence of a *vanZ*-like gene inside a *vanG*-like cluster of genes is not surprising because as found in *E. faecalis* BM4518, the *vanG* operon is composed of genes recruited from various *van* operons, as depicted by the difference in % GC of each gene of the cluster (Fig. 2) (18). Phylogenetic analysis showed that the VanG-like ligase of strain CCRI-16110 is closely related to the family of VanG-type D-Ala-D-Ser ligases suggesting that these proteins share a common ancestor. However, the organization of the *vanG* operon of this strain differs from the *vanG* operons of enterococci and *C. difficile*. In CCRI-16110, the *vanY_G* and *vanW_G* genes are absent while a *vanZ*-like gene is described for the first time in a *vanG*-like operon. The % GC of the genes forming the *vanG*-like operon of strain CCRI-16110 is higher than those of the *vanG* operons of enterococci and *C. difficile*, suggesting different origins for these genes. The % GC of the *vanG* cluster of genes described in *E. faecalis* and *C. difficile* strains differs greatly from that of chromosomal DNA of *E. faecalis* (37.5%), *C. difficile* (29.1%), and *Ruminococcus* sp. CCRI-16110 (41.5%). Therefore, the origin of *vanG* and *vanG*-like operons could be due to a step-by-step mechanism of gene acquisition from various *van* operons as well as a one-step transfer of the *vanG* cluster of genes due to mobile genetic elements. Such a one-step acquisition of *vanG* genes was described during

the transfer of the *vanG* operon from *E. faecalis* BM4518 to *E. faecalis* JH2-2 and was associated with the movement, from chromosome to chromosome, of genetic elements of c. 240 kb (18). This transfer of *vanG* genes could explain the presence of a *vanG*-like operon in *C. difficile* 630 considering that Sebahia *et al.* (43) demonstrated that this strain has several conjugative transposons potentially involved in antimicrobial resistance (43). These conjugative transposons including CTn2, CTn4, and CTn5 have a conjugation module related to that of Tn1549, a conjugative transposon responsible for VanB-type vancomycin resistance (25). However, *C. difficile* 630 is susceptible to glycopeptides (43). We have previously shown that *vanG*-like genes not associated with VRE are very abundant in fecal specimens and represent a potential reservoir for the dissemination of vancomycin resistance genes (22). Based on these data, we can suggest that the presence of the *vanG* cluster of genes in some anaerobic bacteria such as strain *Ruminococcus* sp. CCRI-16110, is an evolutionary process towards the acquisition of glycopeptide resistance.

The presence of both *vanD* and *vanG*-like operons in *Ruminococcus* sp. CCRI-16110 could be responsible for the high level of resistance to vancomycin and teicoplanin. Moreover, mutations in the VanS_D sensor could be responsible for constitutive expression of vancomycin resistance in CCRI-16110 as described for *E. faecium* BM4339 (19).

However, the role of each operon as well as the role of the mutations in VanS_D in the vancomycin- and teicoplanin-resistance phenotype of this strain remains to be described. In addition, the presence of a *ddl* gene encoding a Ddl ligase in this strain remains to be demonstrated.

Dissemination of vancomycin resistance genes among genera other than *Enterococcus* is an emerging problem which has been described in anaerobic strains from the intestinal flora and in *Staphylococcus aureus* (4, 12-14). The *Ruminococcus* strain CCRI-16110 harboring

a *vanD* gene cluster belongs to the cluster XIVa of *Clostridium* based on rRNA gene sequence analysis. Other anaerobic bacteria such as *Clostridium* species, *Eggerthella lenta*, *Ruminococcus lactaris*-like, belonging to the cluster XIVa have been shown to harbor an acquired *vanB* gene cluster similar to that found in enterococci (3, 4, 21, 44). Therefore, anaerobic bacteria seem to represent a reservoir of acquired *vanB* and *vanD* gene clusters and could be involved in the dissemination of vancomycin resistance genes in other anaerobic or aerobic gram-positive pathogens. The presence of either *vanB*, *vanD*, or *vanG*-like genes or more than one *van* gene in anaerobes from the intestinal flora could be a predictable step for the dissemination of vancomycin resistance in important pathogens such as enterococci, *S. aureus*, streptococci, and *C. difficile*. However, *in vitro* conjugative transfer of the glycopeptides-resistance phenotype from *Ruminococcus* sp. CCRI-16110 to *E. faecalis* JH2-2 could not be demonstrated. No other *vanD* gene cluster has been successfully transferred by conjugation *in vitro* to date (8, 17, 19, 35). The absence of *in vitro* transfer of the *vanD* gene cluster does not rule out the possibility of *in vivo* horizontal transfer mechanism that could occur in the intestinal environment. Indeed, the transfer of the *vanB* gene cluster from *C. symbiosum* to enterococci strains has been demonstrated in the gut of gnotobiotic mice (31). The presence of a *vanD* gene cluster in *Ruminococcus* sp. CCRI-16110 displaying a 98% identity with that of enterococci, and isolated from human fecal flora, provides evidence of horizontal transfer of a *vanD* gene cluster between different genera that could occur in the human digestive tract. The presence of anaerobes containing *vanG*-like genes such as *Ruminococcus* sp. CCRI-16110 in the intestinal flora could explain the high prevalence of *vanG*-like genes in human fecal specimens described by our group (22). Indeed, the human gut represents a natural ecosystem where nutrients,

biofilm, bacteria, antibiotic resistance genes, and exchange of genetic material are abundant (40-42).

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by grant PA-15586 from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) and by grant 2201-181 from the Valorisation Recherche Québec (VRQ). M.-C. Domingo is a research scholar from Bayer Healthcare (Bayer HealthCare/CIHR/Association of Medical Microbiology and Infectious Disease Canada/Canadian Foundation for Infectious Diseases).

REFERENCES

1. **Arthur, M., F. Depardieu, C. Molinas, P. Reynolds, and P. Courvalin.** 1995. The *vanZ* gene of Tn1546 from *Enterococcus faecium* BM4147 confers resistance to teicoplanin. *Gene* **154**:87-92.
2. **Arthur, M., F. Depardieu, P. Reynolds, and P. Courvalin.** 1996. Quantitative analysis of the metabolism of soluble cytoplasmic peptidoglycan precursors of glycopeptide-resistant enterococci. *Mol. Microbiol.* **21**:33-44.
3. **Ballard, S. A., E. A. Grabsch, P. D. Johnson, and M. L. Grayson.** 2005. Comparison of three PCR primer sets for identification of *vanB* gene carriage in feces and correlation with carriage of vancomycin-resistant enterococci: interference by *vanB*-containing anaerobic bacilli. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:77-81.
4. **Ballard, S. A., K. K. Pertile, M. Lim, P. D. Johnson, and M. L. Grayson.** 2005. Molecular characterization of *vanB* elements in naturally occurring gut anaerobes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:1688-94.
5. **Barna, J. C., and D. H. Williams.** 1984. The structure and mode of action of glycopeptide antibiotics of the vancomycin group. *Annu. Rev. Microbiol.* **38**:339-57.
6. **Boyd, D. A., J. Conly, H. Dedier, G. Peters, L. Robertson, E. Slater, and M. R. Mulvey.** 2000. Molecular characterization of the *vanD* gene cluster and a novel insertion element in a vancomycin-resistant *enterococcus* isolated in Canada. *J. Clin. Microbiol.* **38**:2392-4.
7. **Boyd, D. A., T. Du, R. Hizon, B. Kaplen, T. Murphy, S. Tyler, S. Brown, F. Jamieson, K. Weiss, and M. R. Mulvey.** 2006. VanG-type vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* strains isolated in Canada. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**:2217-21.

8. **Boyd, D. A., P. Kibsey, D. Roscoe, and M. R. Mulvey.** 2004. *Enterococcus faecium* N03-0072 carries a new VanD-type vancomycin resistance determinant: characterization of the VanD5 operon. *J. Antimicrob. Chemother.* **54**:680-3.
9. **Boyd, D. A., M. A. Miller, and M. R. Mulvey.** 2006. *Enterococcus gallinarum* N04-0414 harbors a VanD-type vancomycin resistance operon and does not contain a D-alanine:D-alanine 2 (*ddl2*) gene. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**:1067-70.
10. **Casadewall, B., and P. Courvalin.** 1999. Characterization of the *vanD* glycopeptide resistance gene cluster from *Enterococcus faecium* BM4339. *J. Bacteriol.* **181**:3644-8.
11. **Casadewall, B., P. E. Reynolds, and P. Courvalin.** 2001. Regulation of expression of the *vanD* glycopeptide resistance gene cluster from *Enterococcus faecium* BM4339. *J. Bacteriol.* **183**:3436-46.
12. **CDC.** 2002. *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin--United States, 2002. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **51**:565-7.
13. **CDC.** 2004. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*--New York, 2004. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **53**:322-3.
14. **CDC.** 2002. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*--Pennsylvania, 2002. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **51**:902.
15. **Collins, M. D., P. A. Lawson, A. Willems, J. J. Cordoba, J. Fernandez-Garayzabal, P. Garcia, J. Cai, H. Hippe, and J. A. Farrow.** 1994. The phylogeny of the genus *Clostridium*: proposal of five new genera and eleven new species combinations. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**:812-26.
16. **Courvalin, P.** 2006. Vancomycin resistance in gram-positive cocci. *Clin. Infect. Dis.* **42 Suppl 1**:S25-34.
17. **Dalla Costa, L. M., P. E. Reynolds, H. A. Souza, D. C. Souza, M. F. Palepou, and N. Woodford.** 2000. Characterization of a divergent *vanD*-type resistance

- element from the first glycopeptide-resistant strain of *Enterococcus faecium* isolated in Brazil. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:3444-6.
18. **Depardieu, F., M. G. Bonora, P. E. Reynolds, and P. Courvalin.** 2003. The *vanG* glycopeptide resistance operon from *Enterococcus faecalis* revisited. *Mol. Microbiol.* **50**:931-48.
 19. **Depardieu, F., M. Kolbert, H. Pruul, J. Bell, and P. Courvalin.** 2004. VanD-type vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:3892-904.
 20. **Depardieu, F., P. E. Reynolds, and P. Courvalin.** 2003. VanD-type vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* 10/96A. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:7-18.
 21. **Domingo, M. C., A. Huletsky, A. Bernal, R. Giroux, D. K. Boudreau, F. J. Picard, and M. G. Bergeron.** 2005. Characterization of a Tn5382-like transposon containing the *vanB2* gene cluster in a *Clostridium* strain isolated from human faeces. *J. Antimicrob. Chemother.* **55**:466-74.
 22. **Domingo, M. C., A. Huletsky, R. Giroux, K. Boissinot, F. J. Picard, P. Lebel, M. J. Ferraro, and M. G. Bergeron.** 2005. High prevalence of glycopeptide resistance genes *vanB*, *vanD*, and *vanG* not associated with enterococci in human fecal flora. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:4784-6.
 23. **Dutka-Malen, S., C. Molinas, M. Arthur, and P. Courvalin.** 1992. Sequence of the *vanC* gene of *Enterococcus gallinarum* BM4174 encoding a D-alanine:D-alanine ligase-related protein necessary for vancomycin resistance. *Gene* **112**:53-8.
 24. **Engelkirk, P. G., J. Duben-Engelkirk, and J. V. R. Dowell.** 1992. Laboratory procedures. In *Principles and practice of Clinical Anaerobic Bacteriology* (Hoffman, S. Ed):pp 331-357. Stap Publishing Company, Belmont, CA, USA.
 25. **Garnier, F., S. Taourit, P. Glaser, P. Courvalin, and M. Galimand.** 2000. Characterization of transposon Tn1549, conferring VanB-type resistance in *Enterococcus* spp. *Microbiology* **146** (Pt 6):1481-9.

26. **Haraldsen, J. D., and A. L. Sonenshein.** 2003. Efficient sporulation in *Clostridium difficile* requires disruption of the sigmaK gene. *Mol. Microbiol.* **48**:811-21.
27. **Jacob, A. E., and S. J. Hobbs.** 1974. Conjugal transfer of plasmid-borne multiple antibiotic resistance in *Streptococcus faecalis* var. zymogenes. *J. Bacteriol.* **117**:360-72.
28. **Jones, D. T., W. R. Taylor, and J. M. Thornton.** 1992. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Comput. Appl. Biosci.* **8**:275-82.
29. **Ke, D., F. J. Picard, F. Martineau, C. Menard, P. H. Roy, M. Ouellette, and M. G. Bergeron.** 1999. Development of a PCR assay for rapid detection of enterococci. *J. Clin. Microbiol.* **37**:3497-503.
30. **Kumar, S., K. Tamura, and M. Nei.** 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief. Bioinform.* **5**:150-63.
31. **Launay, A., S. A. Ballard, P. D. Johnson, M. L. Grayson, and T. Lambert.** 2006. Transfer of vancomycin resistance transposon Tn1549 from *Clostridium symbiosum* to *Enterococcus* spp. in the gut of gnotobiotic mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**:1054-62.
32. **Leclercq, R., E. Derlot, J. Duval, and P. Courvalin.** 1988. Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. *N. Engl. J. Med.* **319**:157-61.
33. **McCormick, M. H., J. M. McGuire, G. E. Pittenger, R. C. Pittenger, and W. M. Stark.** 1955. Vancomycin, a new antibiotic. I. Chemical and biologic properties. *Antibiot Annu* **3**:606-11.
34. **NCCLS.** 2004. Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria; Approved Standard - Sixth Edition. **M11-A6; 24.**

35. **Ostrowsky, B. E., N. C. Clark, C. Thauvin-Eliopoulos, L. Venkataraman, M. H. Samore, F. C. Tenover, G. M. Eliopoulos, R. C. Moellering, Jr., and H. S. Gold.** 1999. A cluster of VanD vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*: molecular characterization and clinical epidemiology. *J. Infect. Dis.* **180**:1177-85.
36. **Périchon, B., B. Casadewall, P. Reynolds, and P. Courvalin.** 2000. Glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* BM4416 is a VanD-type strain with an impaired D-Alanine:D-Alanine ligase. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:1346-8.
37. **Périchon, B., P. Reynolds, and P. Courvalin.** 1997. VanD-type glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* BM4339. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:2016-8.
38. **Rutherford, K., J. Parkhill, J. Crook, T. Horsnell, P. Rice, M. A. Rajandream, and B. Barrell.** 2000. Artemis: sequence visualization and annotation. *Bioinformatics* **16**:944-5.
39. **Saitou, N., and M. Nei.** 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**:406-25.
40. **Salyers, A. A., A. Gupta, and Y. Wang.** 2004. Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotic resistance genes. *Trends. Microbiol.* **12**:412-416.
41. **Salyers, A. A., K. Moon, and M. S. Schlessinger.** 2007. The Human Intestinal Tract-a Hotbed of Resistance Gene Transfer? Part I. *Clin. Microbiol. Newsl.* **29**:17-21.
42. **Salyers, A. A., K. Moon, and M. S. Schlessinger.** 2007. The Human Intestinal Tract-a Hotbed of Resistance Gene Transfer? Part II. *Clin. Microbiol. Newsl.* **29**:25-30.
43. **Sebaihia, M., B. W. Wren, P. Mullany, N. F. Fairweather, N. Minton, R. Stabler, N. R. Thomson, A. P. Roberts, A. M. Cerdeno-Tarraga, H. Wang, M. T. Holden, A. Wright, C. Churcher, M. A. Quail, S. Baker, N. Bason, K.**

- Brooks, T. Chillingworth, A. Cronin, P. Davis, L. Dowd, A. Fraser, T. Feltwell, Z. Hance, S. Holroyd, K. Jagels, S. Moule, K. Mungall, C. Price, E. Rabbinowitsch, S. Sharp, M. Simmonds, K. Stevens, L. Unwin, S. Whithead, B. Dupuy, G. Dougan, B. Barrell, and J. Parkhill.** 2006. The multidrug-resistant human pathogen *Clostridium difficile* has a highly mobile, mosaic genome. *Nat. Genet.* **38**:779-86.
44. **Stinear, T. P., D. C. Olden, P. D. Johnson, J. K. Davies, and M. L. Grayson.** 2001. Enterococcal *vanB* resistance locus in anaerobic bacteria in human faeces. *Lancet* **357**:855-6.
45. **Tanimoto, K., T. Nomura, H. Maruyama, H. Tomita, N. Shibata, Y. Arakawa, and Y. Ike.** 2006. First VanD-Type vancomycin-resistant *Enterococcus raffinosus* isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**:3966-7.
46. **Thompson, J. D., D. G. Higgins, and T. J. Gibson.** 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**:4673-80.
47. **Uttley, A. H., C. H. Collins, J. Naidoo, and R. C. George.** 1988. Vancomycin-resistant enterococci. *Lancet* **1**:57-8.

TABLE 1. Bacterial strains used in this study

Strain	Relevant characteristics ^a	Source or reference
<i>Ruminococcus</i> sp. CCRI-16110	Vm ^R Te ^R	This work
<i>E. faecalis</i> JH2-2	Fus ^R Rif ^R	Jacob and Hobbs (27)
<i>E. faecium</i> BM4339	Vm ^R Te ^R	Périchon et al (37)
<i>Escherichia coli</i> TOP10 (pCR [®] 2.1)	Amp ^R , Kan ^R	Invitrogen

^aAmp^R, ampicillin resistant; Fus^R, fusidic acid resistant; Kan^R, kanamycin resistant; Rif^R, rifampicin resistant; Te^R, teicoplanin resistant; Vm^R, vancomycin resistant.

TABLE 2. PCR primers used in this study to amplify and sequence the *vanD* and *vanG*-like clusters from *Ruminococcus* sp. CCRI-16110

Primer name	Oligonucleotide sequence (5' → 3')	Nucleotide position ^a (ORFs)	Source
<i>vanD</i> cluster			
RD-TSP1	AAAAAACCGTTCACCCATACTG	899 (<i>vanRD</i>)	This study
RD-TSP2	ACGCTCGCACAGATACCAAAG	519 (<i>vanRD</i>)	This study
RD-TSP3	GGCTGCTCTTGCTGATTGTC	443 (<i>vanRD</i>)	This study
RD1	CCGTTTAACCCGCTGGAA	324 (<i>vanRD</i>)	Périchon et al (36)
SD1	CTATCATGATCGGGATG	885 (<i>vanSD</i>)	Périchon et al (36)
SD2	CGAATGGTGGTATTCTC	1576 (<i>vanSD</i>)	Périchon et al (36)
YD1	GATTCGTCAACCGCATG	2453 (<i>vanYD</i>)	Périchon et al (36)
YD3F	GGTCGATGTGTACAC	2059 (<i>vanYD</i>)	This study
YD2	CTCTGGAACGAGGGTA	2214 (<i>vanYD</i>)	Périchon et al (36)
HD1	CGTAAGCCATAAAGCGGA	3224 (<i>vanHD</i>)	Périchon et al (36)
HD3a	AACGAAACATAGTCCGC	3615 (<i>vanHD</i>)	This study
D1	TAAGGCGCTTGCATATAACCG	4425 (<i>vanD</i>)	Périchon et al (37)
D2	TGCAGCCAAGTATCCGGTAA	4866 (<i>vanD</i>)	Périchon et al (37)
XD2	TATGTATCCGGGTATGG	5637 (<i>vanXD</i>)	Périchon et al (36)
ID1	GTAAGGCCAGACAGT	5995 (<i>intD</i>)	Casadewall et al (11)
ID-TSP1	TCAACGCTTTTCTGGAGTTC	6032 (<i>intD</i>)	This study
ID-TSP2	GCGGGAAGTGTCTGAAGCGG	6117 (<i>intD</i>)	This study
ID-TSP3	GGAAAAACCGCACTGTTCTTCT	6292 (<i>intD</i>)	This study
ID2	ATCAAGATCCGCTCGTG	6613 (<i>intD</i>)	Casadewall et al (11)
<i>vanG</i> -like cluster			
V1	GGIGARGAYGGIWSIHTICARGG	1511 (<i>vanG</i> -like)	Dutka-Malen et al (23)
V2a ^b	GTRAAICCGGIADIGTRTT	2120 (<i>vanG</i> -like)	This study
GG1-TSP1	CCTTCCCCGTATATCTTTGC	1760 (<i>vanG</i> -like)	This study
GG1-TSP2	CCACAGCCTTCGGGACAGAT	1639 (<i>vanG</i> -like)	This study
GG1-TSP3	GAGGACGCCGCAGCCGACAA	1560 (<i>vanG</i> -like)	This study
GP20 reverse	GGCAAGTTCAAGTAATCCCT	1530 (<i>vanG</i> -like)	This study
GD1-TSP1	TCCTCACTGTGGGAGAGTC	1887 (<i>vanG</i> -like)	This study
GD1-TSP2	CTGACGGGTGGATTCTTTGA	1919 (<i>vanG</i> -like)	This study
GD1-TSP3	ACAGGAGACGGCAAAGAACA	2017 (<i>vanG</i> -like)	This study
GP788	GGCTGTCAGGCATGATATTA	788 (<i>vanZ_G</i>)	This study
GN2720	AGCGGTATCTTTTCAGTC	2720 (<i>vanT_G</i> -like)	This study
GP1421	CCTGCGGTGCATGGAATACT	1421 (<i>vanG</i> -like)	This study
GN2038	AACATCCCAGCACTTGATAA	2038 (<i>vanG</i> -like)	This study
GG2-TSP1	GCATCGTCTGAAAAATCTC	941 (<i>vanZ_G</i>)	This study
GG2-TSP2	CATTAGCGGCAACCTGTGTA	866 (<i>vanZ_G</i>)	This study
GD2-TSP1	AATGCGGAAAAGCTGGTGAG	2421 (<i>vanT_G</i> -like)	This study
GD2-TSP2	GTTCGGGGACAGTTATTATG	2696 (<i>vanT_G</i> -like)	This study
GP107	CCGATAAAAATGCAGCGTGTAT	107 (<i>vanS_G</i> -like)	This study
GN3916	ATTATGGGGCACTCAAAACAC	3916 (<i>vanT_G</i> -like)	This study
GN3098	TGCCGACTGACTGGTTTACA	3098 (<i>vanT_G</i> -like)	This study

^a Nucleotide positions refer to sequences of the *vanD* cluster (accession number EF508033) or *vanG*-like cluster (accession number EF508032) from *Ruminococcus* sp. CCRI-16110.

^b V2a represents the universal primer derived from Dutka-Malen et al (23) of which nucleotides TG have been replaced at the GT in 5' extremity.

TABLE 3. Comparison of nucleotide and amino acid sequences of the *vanD* gene cluster and *intD* gene from *Ruminococcus* sp. CCRI-16110 with those of the *vanD1*, *vanD2*, *vanD3*, *vanD4*, and *vanD5* gene clusters.

Gene	Nucleotide/Amino acid identity % ^a				
	<i>vanD1</i>	<i>vanD2</i>	<i>vanD3</i>	<i>vanD4</i>	<i>vanD5</i>
<i>vanRD</i>	99.4/100	NA	97.3/98.7	91.3/98.7	97.0/100
<i>vanSD</i>	98.4/98.2	NA	97.0/96.0	90.0/94.0	92.0/96.0
<i>vanYD</i>	98.0/97.5	88.0/71.4	99.0/98.3	82.0/59.7	77.4/39.2
<i>vanHD</i>	98.0/100	96.5/98.1	98.5/100	80.0/88.0	94.0/96.6
<i>vanD</i>	98.1/98.3	97.3/97.1	98.3/99.1	82.6/89.5	85.8/91.0
<i>vanXD</i>	99.0/100	98.0/100	97.4/99.0	86.0/90.0	99.0/97.0
<i>intD</i>	99.3/99.6	NA	NA	NA	NA

^a Sequence accession numbers for the *vanD* gene clusters are as follows: *vanD1*, *E. faecium* BM4339 (AF130997) (10); *vanD2*, *E. faecium* A902 (AF153050) (35); *vanD3*, *E. faecium* N97-330 (AF175293) (6); *vanD4*, *E. faecium* 10/96A (AY082011) (20); *vanD5*, *E. faecium* N03-0072 (AY489045) (8).

NA, data not available.

TABLE 4. Percentage identity for the amino acid sequences from the deduced proteins of the *vanG*-like gene cluster with those from other *van* gene clusters.

VanG-like cluster from CCRI-16110	% of identity with type ^a									
	VanA	VanB	VanD	VanC	VanE	VanF	VanG1	VanG2	VanG-C. difficile	Ddl _{C. innocuum}
VanS _G ^b	44.4	24.8	56.6	41.7	34.5	38.6	64.8^c	63.4	60	NA
VanZ _F	27.1	NA	NA	NA	NA	27.5	NA	NA	NA	NA
VanG	44.7	45.1	43.5	45.1	41.5	44.5	65	63.6	65.3	46.1
VanT _G	NA	NA	NA	37.5	40.4	NA	58.6	59.6	57.8	36.1

^a Sequence accession numbers for the Van type proteins are as follows: VanA, *E. faecium* BM4147 (M97297), VanB, *E. faecalis* V583 (EFU35369); VanD, *E. faecium* BM4339 (AF130997); VanC, *E. gallinarum* BM4174 (162694); VanE, *E. faecalis* N00-410 (AF430807); VanF, *Paenibacillus popilliae* ATCC 14706 (AF155139); VanG1, *E. faecalis* BM4518 (AY272782); VanG2, *E. faecalis* N03-0233 (DQ222944); VanG-like, *C. difficile* 630 (AM180355); Ddl_{C. innocuum} NCIB 10674 (AY479979).

^b Partial deduced sequence of VanS_G (190 amino acids sequence) of CCRI-16110 was used for comparison.

^c The numbers in boldface indicate the highest percentage of identity with VanG-type proteins

NA, not applicable.

CAPTIONS TO FIGURES

FIG. 1. Organization of the *vanD* operon from *Ruminococcus* sp. CCRI-16110. Open arrows represent the ORFs of the *vanD* operon.

FIG. 2. Schematic organization of the *vanG* operon from *E. faecalis* BM4518 (accession number AY271782), *vanG2* operon from *E. faecalis* N03-0233 (accession number DQ222944) as well as the *vanG*-like operons from *C. difficile* 630 (accession number AM180355) and *Ruminococcus* sp. CCRI-16110 (accession number EF508032). Open arrows represent the ORFs. The regions characterized by using the DNA walking method are indicated by two-headed arrows. For all ORFs except *vanZ_G*, the percentages of amino acid sequence identity were obtained by comparison with the *vanG* operon of *E. faecalis* BM4518. For ORF *vanZ_G*, the percentage of amino acid sequence identity was obtained by comparison with *vanZ* of *E. faecium* BM4147 (accession number M97297). The %GC is indicated within each open arrow.

FIG 3. Tree showing the phylogenetic relationships of the deduced amino acid sequences of the *vanG*-like genes from strain CCRI-16110 encoding the Ddl, D-Ala-D-Lac, and D-Ala-D-Ser ligases. The tree was constructed using the neighbour-joining method based on a comparison of 175 amino acid positions. Bootstrap values, expressed as a percentage of 1000 replications, are given at each branching point. GenBank accession numbers are given in parentheses for each amino acid sequence.



FIG. 1.

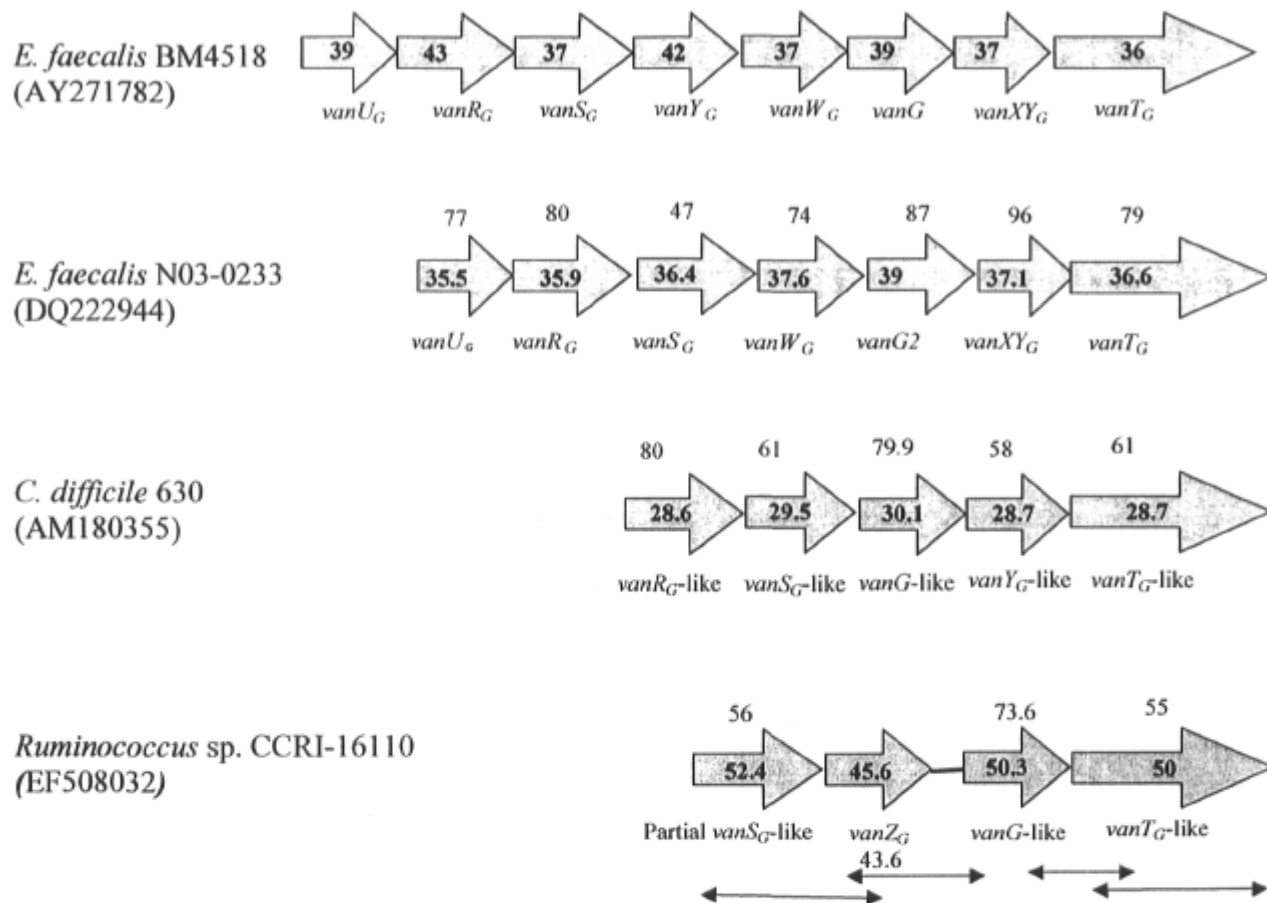


FIG. 2.

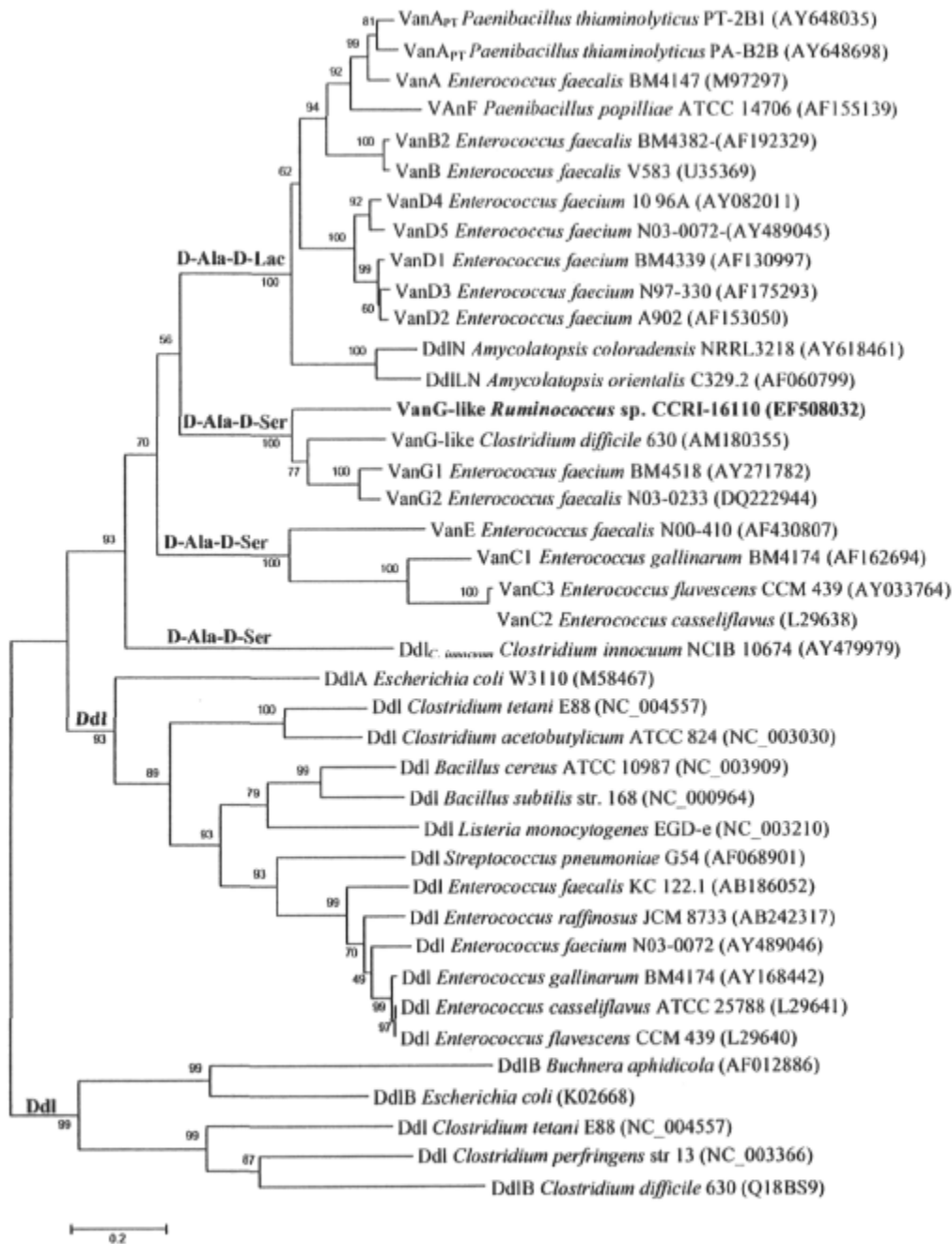


FIG. 3.

CHAPITRE XI. DISCUSSION GÉNÉRALE

Avant l'arrivée récente de nouveaux antibiotiques comme les glycolipopeptides, des lipopeptides et des glycylicyclines, les glycopeptides ont été pendant plusieurs dizaines d'années considérées comme des antibiotiques de derniers recours utilisés pour traiter les infections graves dues à des bactéries à Gram positif sensibles à leur action. Ils ont toujours une grande importance en thérapeutique humaine. En effet, les bactéries à Gram positif aérobies comme les staphylocoques, les streptocoques et les entérocoques ainsi que les bactéries anaérobies comme *Clostridium difficile* sont des pathogènes extrêmement redoutables sur lesquels les glycopeptides comme la vancomycine et la téicoplanine possèdent une action bactéricide (37, 151). De 1956, date de l'entrée des glycopeptides dans l'arsenal thérapeutique humain, à 1988, date de la description des premières souches résistantes, toutes les infections graves dues au *S. aureus* résistant aux β -lactamines ainsi que celles dues aux entérocoques pouvaient être efficacement traitées par les glycopeptides. Malheureusement, l'apparition de la résistance aux glycopeptides est venue compliquer les stratégies thérapeutiques de plusieurs infections graves dues à des bactéries à Gram positif (64, 248, 289).

La résistance aux glycopeptides chez les entérocoques, toutes espèces confondues, est en constante augmentation au vu des études épidémiologiques évaluant la fréquence du phénomène dans les hôpitaux (35, 66, 99, 100, 116, 128, 151, 165, 167, 170, 189, 197, 214, 279). Depuis 5 ans, on assiste aux États-Unis à une augmentation du nombre de souches de VRSA (192). De plus, d'autres espèces à Gram positif impliquées dans des infections humaines sont devenues résistantes aux glycopeptides suite à l'acquisition de l'un des transposons Tn1546 ou Tn1549/ Tn5382 portant les locus *vanA* et *vanB* chez *S. gallolyticus*, *S. lutetiensis*, *Bacillus circulans*, *Oerskoevia turbata*, *Arcanobacterium haemolyticum* et *S. bovis* (86, 168, 183, 220, 221). Récemment, plusieurs souches cliniques de bactéries anaérobies isolées chez l'humain qui n'étaient pas impliquées dans des processus infectieux ont acquis le transposon Tn1549 contenant le locus *vanB* (24, 25, 250). Ainsi, l'acquisition des gènes de résistance aux glycopeptides est une réalité aussi

bien chez les espèces à Gram positif hautement pathogènes ou potentiellement pathogènes. Le nombre et la diversité des espèces bactériennes appartenant aux différents écosystèmes microbiens humains et qui contiennent ces gènes de résistance aux glycopeptides sont inconnus. De même, l'origine des gènes de résistance aux glycopeptides est également inconnue. Du fait de l'importance et de la richesse de l'écosystème microbien du tube digestif ainsi que de la description de bactéries résistantes aux glycopeptides isolées des selles, nous avons exploré dans ce travail la présence des gènes de résistance aux glycopeptides dans des spécimens de selles humaines.

11.1 LE TUBE DIGESTIF EST UN RÉSERVOIR DE GÈNES DE RÉSISTANCE AUX GLYCOPEPTIDES

La détection active par PCR des gènes *vanA*, *vanB*, *vanD*, *vanE* et *vanG* dans des échantillons de selles humaines est venue de l'hypothèse selon laquelle la flore fécale humaine pourrait constituer un important réservoir des gènes de résistance aux glycopeptides. En utilisant des amorces spécifiques aux gènes *vanA*, *vanB*, *vanD*, *vanE* et *vanG*, nous avons criblé par PCR des échantillons de selles prélevés chez des patients de d'un hôpital de Québec et d'un hôpital de Boston. À partir des résultats obtenus au cours de ce travail, on a pu faire deux observations importantes. La première observation mettait en évidence pour la première fois, une forte fréquence des gènes de résistance aux glycopeptides qui n'étaient pas associés aux ERG. En effet, la totalité des gènes *vanA* et une faible proportion des gènes *vanB* retrouvés dans ces échantillons de selles étaient associés à la présence d'ERG tandis qu'une proportion élevée des gènes *vanB* et la totalité des gènes *vanD* et *vanG* détectés n'étaient pas associés à des souches d'ERG. La deuxième observation importante repose sur la première description de différents allèles du gène *vanG* dans les spécimens de selles analysés. En effet, la comparaison des séquences du gène *vanG* obtenus à partir de différents échantillons de selles avec celle du gène *vanG* de la souche *E. faecalis* BM4518 (89) a montré des identités en acide nucléiques dont le pourcentage variait entre 77 et 100 %. Ainsi, ces résultats ont confirmé notre hypothèse selon laquelle le tube digestif pouvait représenter un important réservoir des gènes de résistance aux glycopeptides.

La découverte de cet important réservoir de gènes *van* chez l'homme apporte ainsi un nouvel aperçu de l'ampleur de la diffusion de ces gènes chez les bactéries à Gram positif du tube digestif. Parmi ces bactéries, les entérocoques, en particulier *E. faecalis* et *E. faecium*, représentent actuellement les bactéries résistantes aux glycopeptides les plus fréquemment isolées (64, 190). Cependant, l'importance de la diversité des espèces bactériennes constituant le réservoir des gènes *van* est maintenant évident avec les résultats de nos travaux. L'identification de ce réservoir aura un impact majeur dans les stratégies de contrôle de la dissémination des gènes de résistance aux glycopeptides.

En conclusion, nous avons découvert une fréquence élevée de gènes *vanB*, *vanD* et *vanG* sans que ceux-ci ne soient associés à la présence d'ERG dans des spécimens de selles humaines. L'étape suivante consistait à isoler et à caractériser les espèces bactériennes contenant les gènes *vanB*, *vanD* et *vanG* à partir d'une sélection d'échantillon de selles.

11.2 CARACTÉRISATION DE DEUX NOUVELLES ESPÈCES BACTÉRIENNES ANAÉROBIES À GRAM POSITIF DE LA FLORE DIGESTIVE HUMAINE CONTENANT LES GÈNES *vanB*, *vanD* ET DE TYPE *vanG*

Nous avons sélectionné quelques échantillons de selles positives à la PCR pour les gènes *vanB*, *vanD* et *vanG* dans lesquels la recherche de bactéries susceptibles de contenir ces trois gènes de résistance aux glycopeptides a été réalisée.

Ainsi, à partir d'un échantillon de selles contenant le gène *vanB*, un bacille à Gram positif anaérobie stricte et sporulant a été isolé. Ce bacille à Gram positif exprimait le phénotype VanB de résistance aux glycopeptides à cause de la présence du gène *vanB*. La caractérisation phénotypique et génotypique de ce bacille anaérobie stricte à Gram positif a montré qu'il s'agissait d'une nouvelle espèce bactérienne appartenant au groupe phylogénétique XIVa des *Clostridium* encore appelé groupe *Clostridium coccoides* (73). Cette nouvelle espèce a été nommée *Clostridium lavalense*.

À partir d'un échantillon de selles dans lequel le gène *vanD* avait été détecté par PCR, nous avons isolé un cocci à Gram positif anaérobie stricte. Cette souche exprimait un haut niveau de résistance à la vancomycine et à la téicoplanine, ce qui correspondait normalement au phénotype VanA chez les souches d'ERG (77, 78). Mais cette souche contenait le gène *vanD*, tandis que la PCR avec des amorces spécifiques au gène *vanA* était négative. La caractérisation phénotypique et génotypique de ce cocci à Gram positif anaérobie stricte a montré qu'il s'agissait également d'une nouvelle espèce bactérienne appartenant au groupe phylogénétique XIVa (73) comme *Clostridium lavalense*. Cette nouvelle espèce a été nommée *Ruminococcus gauvreaui*.

Dans cette souche de *R. gauvreaui* contenant le gène *vanD*, nous avons montré la présence d'un gène apparenté aux gènes *vanG* décrit chez les entérocoques (89).

Ainsi, on constate que ces deux nouvelles espèces résistantes à la vancomycine et contenant respectivement les gènes *vanB* et *vanD* et un gène apparenté à *vanG* appartiennent à l'un des plus importants groupes microbiens du tube digestif, le groupe *Clostridium coccoides* (cluster XIVa des *Clostridium*) (73, 115, 148, 252). Un important réservoir d'espèces anaérobies contenant le gène *vanB* avait été décrit en Australie (24, 25, 250). Il s'agissait de *Clostridium bolteae*, *Clostridium hathewayi*, *Clostridium symbiosum*, *Eggerthella lenta* et deux souches apparentées aux espèces *Clostridium innocuum* et à *Ruminococcus lactaris* (24). Ces espèces anaérobies isolées en Australie et contenant le gène *vanB* appartiennent à deux groupes phylogénétiques distincts à savoir: 1) le groupe XIVa (73) pour *Clostridium bolteae*, *Clostridium hathewayi*, *Clostridium symbiosum*, *Ruminococcus lactaris* et *Eggerthella lenta* (24) et 2) le groupe XVI (73) pour *Clostridium innocuum* (24).

Le groupe phylogénétique XIVa est composé d'un mélange hétérogène de bactéries anaérobies appartenant à des genres variés tels que *Acetivomaculum*, *Clostridium*, *Coprococcus*, *Eggerthella* (*Eubacterium*), *Roseburia* et *Ruminococcus* (73, 115, 142, 148, 249, 252). On peut cependant mentionner que le groupe phylogénétique XIVa se distingue par l'absence des pathogènes importants comme *C. botulinum*, *C. perfringens* et *C. tetani* qui appartiennent au groupe I et *C. difficile* qui est quant à lui classé dans le groupe XI (73). Les bactéries à Gram positif anaérobies appartenant au genre *Clostridium* et *Ruminococcus*

sont généralement sensibles aux glycopeptides (37, 67, 82). *Clostridium innocuum* fait exception à cette règle car cette espèce exprime de façon intrinsèque de bas niveaux de résistance à la vancomycine par synthèse de précurseurs du peptidoglycane ayant un dipeptide D-Ala-D-Ser (88).

Ainsi, nous avons démontré que les gènes de résistance aux glycopeptides *vanB*, *vanD* et de type *vanG* non associés aux ERG dans les échantillons de selles humaines sont présents dans de nouvelles espèces anaérobies. Ces résultats démontrent clairement que les bactéries anaérobies strictes à Gram positif qui font partie de la flore normale humaine constituent un réservoir des gènes de résistance aux glycopeptides. Cette flore bactérienne du tube digestif contenant des gènes acquis de résistance aux glycopeptides constitue un danger pour la santé humaine. En effet, les espèces constituant cette flore bactérienne résistante sont capables de transférer des gènes de résistance à des bactéries pathogènes effectuant un passage transitoire dans le tube digestif comme *Staphylococcus aureus* et *Streptococcus pneumoniae* (238, 254, 258).

La connaissance et l'importance de la diversité des espèces bactériennes résistantes aux glycopeptides dans le tube digestif sont sous estimées par le fait que d'une part, la majeure partie de la flore digestive est constituée de bactéries anaérobies difficiles à cultiver et d'autre part, l'attention des thérapeutes est surtout orientée vers les bactéries pathogènes. Ce qui diminue l'intérêt d'une recherche systématique du réservoir de bactéries résistantes aux glycopeptides potentiellement non pathogènes. Les porteurs asymptomatiques de bactéries possédant des gènes acquis de résistance aux glycopeptides pourraient constituer une source importante de transmission de ces bactéries résistantes à d'autres patients dans les services de santé comme le montre l'exemple des porteurs asymptomatiques d'ERG (289).

Ainsi, la découverte de nouvelles espèces anaérobies contenant des gènes de résistance aux glycopeptides et une étude plus approfondie des interactions bactériennes du tube digestif améliorera la connaissance sur le rôle important de la flore digestive comme réservoir de gènes de résistance. Une meilleure connaissance de la variété d'espèces servant de réservoir

aux gènes de résistance aux glycopeptides permettra également d'améliorer la prévention de la dissémination des gènes de résistance aux glycopeptides.

11.3 UN ÉLÉMENT GÉNÉTIQUE MOBILE APPARENTÉ AU TRANSPOSON Tn5382/Tn1549 EST PRÉSENT DANS LA SOUCHE DE *Clostridium lavalense* CCRI-9842

Les analyses génétiques du locus *vanB* présent dans la souche *Clostridium lavalense* CCRI-9842 ont montré que ce locus était similaire au locus *vanB2* décrit dans les souches d'ERG. La caractérisation de l'environnement génétique en amont du gène *vanR_B* et en aval du gène *vanX_B* a montré que le locus *vanB2* de la souche de *Clostridium lavalense* CCRI-9842 est porté par un élément génétique mobile semblable aux transposons Tn5382 et Tn1549 faisant partie de la famille des transposons Tn916 (54, 120). Les transposons Tn5382 et Tn1549 sont très similaires entre eux et sont connus pour porter le locus *vanB2* (54, 120). Par conséquent, dans l'article décrit au chapitre VIII, nous avons désigné par Tn5382-like l'élément génétique mobile portant le locus *vanB2* chez la souche *Clostridium lavalense* CCRI-9842. Cet élément génétique mobile semble s'être inséré dans le chromosome de la souche CCRI-9842 car aucun plasmide n'a été détecté lors de plusieurs tentatives d'extraction plasmidique.

Les transposons Tn5382 et Tn1549 ont été localisés dans le chromosome ainsi que sur un plasmide dans des souches d'ERG (54, 120). En effet, Carias *et al* (54) ont décrit le transposon Tn5382 dans le chromosome de la souche *E. faecium* C68, tandis que Garnier *et al* (120) ont décrit le transposon Tn1549 sur le plasmide pIP834 chez la souche *E. faecalis* 268-10. La caractérisation de l'environnement génétique de part et d'autre du transposon Tn5382-like dans la souche CCRI-9842 a mis en évidence une séquence de 741 pb, identique de part et d'autre du transposon et en orientation opposée. C'est la première fois qu'une telle séquence est observée dans l'environnement génétique d'un transposon de type Tn5382 ou Tn1549. En effet, dans la souche de *E. faecium* C68, l'environnement génétique en amont du transposon Tn5382 est constitué du gène *pbp5* (54), tandis que le transposon

Tn1549 s'est inséré dans les gènes *traE1* et *uvrB* du plasmide de type pAD1 dans les souches *E. faecalis* E-268-10 et 654-6 (120). Ainsi, le transposon Tn5382 a la capacité de s'insérer dans différents sites au sein d'un même hôte ou d'hôtes différents (54, 84, 120, 159). Cette séquence de 741 bp pourrait représenter une séquence d'insertion (IS) surtout que des IS avaient déjà été observés dans le transposon Tn5382 de plusieurs souches d'ERG (83, 166). Mais cette séquence de 741 pb ne présentait aucune homologie significative avec des séquences d'IS ou de transposases connues. Par contre, des séquences non codantes de ce type ont déjà été décrites de par et d'autre du gène *cpe* codant pour l'entérotoxine de plusieurs souches de *C. perfringens* (48, 49).

11.4 LE LOCUS *vanD1* AINSI QU'UN NOUVEL ALLÈLE DU GÈNE *vanG* SONT PRÉSENTS DANS LA SOUCHE DE *Ruminococcus gauvreaui* CCRI-16110

Les analyses génétiques du locus *vanD* de la souche *Ruminococcus gauvreaui* CCRI-16110 ont montré que l'organisation génétique de ce locus était similaire à celui du locus *vanD1* décrit dans la souche *E. faecium* BM4339 (57). Ce locus *vanD1* semble être inséré dans le chromosome de la souche CCRI-16110 car aucun plasmide n'a pu être isolé de cette souche. Le locus *vanD* présent dans les souches d'ERG a été uniquement décrit dans le chromosome jusqu'à maintenant (93, 95). Le gène *intD* codant pour une intégrase qui a été décrite chez la souche VanD *E. faecium* BM4339 (58) a été retrouvé associé au locus *vanD1* de la souche CCRI-16110. Le gène *intD* pourrait représenter l'extrémité d'un élément génétique mobile car la séquence en acides aminés de ce gène décrit chez la souche *E. faecium* BM4339 possède 28% d'identité avec l'intégrase TnpI du transposon Tn4430 de *Bacillus thuringiensis*, 27 % d'identité avec la recombinase XerD de *E. coli* et 23 % d'identité avec l'intégrase XerC de *Haemophilus influenzae* (58). De plus, l'analyse de la séquence en acides aminés de la protéine IntD chez la souche *E. faecium* BM4339 a permis de retrouver les quatre régions conservées R-H-R-Y (Arg137, His224, Arg227, Tyr259) correspondant aux motifs conservés des recombinases spécifiques de site appartenant à la famille des intégrases (58). Les résultats de la présente étude décrivent pour la première fois la présence du locus *vanD* dans une souche appartenant à un autre genre que le genre

Enterococcus. En effet, le locus *vanD* a uniquement été rapporté dans des souches de *E. faecium*, de *E. faecalis* et récemment dans une souche de *E. gallinarum* et de *E. raffinosus* (41, 44, 87, 93, 95, 213). Il s'agit encore là d'un indice qui suggère que le locus *vanD* peut se disséminer au sein d'une espèce bactérienne mais également au sein de genres différents.

Les souches d'entérocoques possédant le locus *vanD* ont comme caractéristique importante d'avoir des mutations dans le gène *ddl* codant pour la ligase permettant la synthèse du dipeptide terminal D-Ala-D-Ala (41, 44, 93, 95). Ces mutations conduisent à la synthèse d'une protéine non fonctionnelle (93, 95). Nous avons voulu caractériser le gène *ddl* dans la souche de *Ruminococcus gauvreaui* CCRI-16110 et vérifier la présence de telles mutations dans ce gène.

À notre grande surprise, nous avons obtenu une séquence qui présentait des similitudes avec le gène *vanG* de la souche *E. faecalis* BM4518 (89). La caractérisation partielle de l'environnement génétique en amont et en aval de ce fragment a permis de démontrer une organisation en opéron composé de 4 cadres de lecture dont 3 présentent des similitudes avec les gènes *vanS_G*, *vanG* et *vanT_G* des souches de *E. faecalis* BM518 et de *Clostridium difficile* 630 (89, 241). La présence d'un gène apparenté au gène *vanG* retrouvé dans des souches anaérobies, telles que la souche de *Ruminococcus gauvreaui* CCRI-16110 et la souche de *Clostridium difficile* 630, pourrait expliquer la forte fréquence ainsi que les différents allèles du gène *vanG* obtenus lors du criblage des échantillons de selles avec les amorces ciblant le gène *vanG* dont nous avons parlé au chapitre 10.1. Le rôle exact que pourrait jouer cet allèle du gène *vanG* dans l'expression de la résistance à la vancomycine chez la souche CCRI-16110 reste à déterminer. On sait cependant que la souche de *C. difficile* 630 est sensible aux glycopeptides même si elle possède des gènes apparentés aux gènes *vanR_G*, *vanS_G*, *vanG*, *vanY_G*, et *vanT_G* (241). Le locus *vanG* dans les souches de *E. faecalis* est composé de huit gènes que sont *vanU_G*, *vanR_G*, *vanS_G*, *vanY_G*, *vanW_G*, *vanG*, *vanXY_G* et *vanT_G* (89) (181). Ces gènes ont des origines diverses et semblent provenir de différents opérons *van* (89, 90). Dans ces conditions, on pourrait raisonnablement émettre l'hypothèse que les gènes apparentés aux gènes *vanG* retrouvés dans la souche de *Ruminococcus gauvreaui* CCRI-16110 et de *C. difficile* 630 (241) seraient à une étape incomplète dans la formation d'un locus fonctionnel de résistance aux glycopeptides. Nous

ne serons donc pas surpris de voir apparaître dans l'avenir des souches de *C. difficile* résistantes aux glycopeptides et contenant un locus de type *vanG*.

11.5 LE TRANSFERT HORIZONTAL DE LA RÉSISTANCE DE TYPE VanB ET VanD À PARTIR DES SOUCHES DE *Clostridium lavalense* ET DE *Ruminococcus gauvreaui*

La description du gène *vanB2* dans des bactéries appartenant à différents genres comme les genres *Clostridium*, *Eggerthella*, *Enterococcus*, *Ruminococcus* et *Streptococcus* (25, 83, 84, 86, 120, 265) suggère qu'il y a eu entre ces différents genres bactériens un transfert horizontal de cet élément génétique mobile. Nous avons effectué des expériences de conjugaison *in vitro* entre la souche de *Clostridium lavalense* CCRI-9842 et des souches d'entérocoques, dans le but de transférer le locus *vanB2*. Aucune souche réceptrice résistante à la vancomycine n'a été détectée lors de ces expériences de conjugaison.

Rappelons que pour obtenir un excellent transfert horizontal de matériel génétique et être capable de le détecter dans les cellules, la séquence d'ADN contenant l'information génétique doit: 1) être transférée de la cellule donatrice à la cellule réceptrice, 2) s'intégrer soit au chromosome, soit sur un plasmide de la cellule réceptrice et 3) les gènes transférés doivent s'exprimer dans la cellule réceptrice. De ce fait, plusieurs raisons pourraient expliquer cet échec de transfert de la résistance de la souche *C. lavalense* CCRI-9842 vers la souche *E. faecalis* JH2-2: 1) soit les conditions expérimentales de conjugaison n'étaient pas adéquates pour une conjugaison entre les genres *Clostridium* et *Enterococcus*, 2) soit les cellules réceptrices utilisées n'étaient pas adaptées pour une conjugaison *in vitro* avec le genre *Clostridium*, 3) soit les fonctions de transposition du transposon Tn5382 dans la souche CCRI-9842 n'étaient pas fonctionnelles. Pourtant, Launay *et al* (159) ont réussi à transférer le transposon Tn1549 portant le locus *vanB2* d'une souche de *C. symbiosum* vers les souches de *E. faecium* 64/3 et de *E. faecalis* JH2-2. Il est cependant important de préciser que ce transfert a été réalisé *in vivo* dans le tube digestif de souris gnotoxéniques dont la flore bactérienne est identifiée (159). Toujours dans les expériences de conjugaison

de Launay *et al* (159), le transfert de la résistance s'est produit *in vitro* avec la souche de *E. faecium* 64/3 et pas avec la souche de *E. faecalis* JH2-2 (159). Ce qui laisse supposer que les conditions expérimentales de conjugaison entre la souche réceptrice *E. faecalis* JH2-2 et les souches donatrices appartenant au genre *Clostridium* ne sont pas adéquates *in vitro* ou que le taux de transfert est si faible que les cellules issues de la conjugaison ne peuvent pas être détectées.

La présence du locus *vanD* dans des souches de *E. faecium*, de *E. faecalis*, de *E. gallinarum* de *E. raffinosus* et dans la souche de *R. gausvreaui* CCRI-16110 plaide en faveur d'un transfert horizontal intergénique. Cependant, les expériences de transfert *in vitro* entre la souche *R. gausvreaui* CCRI-16110 et la souche réceptrice de *E. faecalis* JH2-2 n'ont pas abouti au transfert du phénotype de résistance aux glycopeptides à des cellules d'entérocoques. Ce résultat n'est pas surprenant puisqu'il a été impossible de démontrer jusqu'à maintenant le transfert du locus *vanD* lors d'expériences de conjugaison *in vitro* (95).

11.6 Perspectives

Les résultats de ce travail ont apporté de nouvelles connaissances sur le réservoir des gènes de résistance aux glycopeptides présents dans le tube digestif humain. Deux espèces nouvellement caractérisées, *Clostridium lavalense* et *Ruminococcus gausvreaui*, contenant les gènes *vanB* et *vanD* et un gène apparenté à *vanG* ont été isolées. Ces deux nouvelles espèces viennent s'ajouter à la liste des espèces bactériennes dont certaines souches sont connues pour exprimer des phénotypes de résistance acquise aux glycopeptides.

Mais il reste encore beaucoup à apprendre sur l'importance et la diversité des espèces de la flore digestive humaine qui peuvent servir de réservoir des gènes de résistance aux glycopeptides. Afin d'explorer cette diversité, on pourrait envisager:

- 1- Un criblage systématique d'échantillons de selles avec des amorces spécifiques aux gènes *vanA*, *vanB*, *vanD*, *vanE* et *vanG* en cas d'épidémie d'ERG dans des unités hospitalières. Nous avons débuté un projet du genre en criblant des échantillons de selles provenant de différents hôpitaux de Toronto. Les résultats préliminaires de ce projet ont montré la présence du transposon de type Tn5382/Tn1549 portant le locus *vanB2* dans une souche de *Clostridium hathewayi* CCRI-16370 et une souche de *Ruminococcus gnavus* CCRI-16371. Il est connu que *Clostridium hathewayi* peut acquérir le locus *vanB2* comme cela a été décrit en Australie (24, 25). Par contre c'est la première fois qu'un transposon de type Tn5382/Tn1549 portant le locus *vanB2* a été observé dans une souche de *Ruminococcus gnavus*.

- 2- De cribler les espèces bactériennes appartenant aux groupes phylogénétiques XI, XIVa, et XVI des *Clostridium* avec une amorce universelle ciblant le gène *vanG*. Les espèces *C. innocuum* appartenant au groupe XI d'une part et *C. bolteae*, *C. hathewayi*, *C. lavalense*, *R. gnavus* et *R. lactaris* appartenant au groupe XIVa d'autre part, sont déjà connues pour leur capacité à acquérir des gènes de résistance *vanB2*. Plusieurs espèces appartenant à ces groupes phylogénétiques sont disponibles dans la collection de souches du Centre de Recherche en Infectiologie. Cependant, dans le but de ce projet, d'autres souches seront acquises à partir de collections de souches internationales afin d'avoir une plus grande diversité d'espèces lors du criblage. Le criblage systématique des espèces bactériennes appartenant au groupe XVI et XIVa isolées de spécimens fécaux servira à mieux apprécier la diversité des espèces résistantes aux glycopeptides par acquisition de gènes de résistance aux glycopeptides. Tandis que le criblage systématique des espèces du groupe XI auquel appartient *C. difficile* combiné à la surveillance de leur sensibilité aux glycopeptides serait un bon outil de surveillance de l'apparition de la résistance dans cette espèce.

- 3- Cribler des spécimens de selles avec des amorces universelles ciblant tous les sous-types des gènes *vanB*, *vanD* et *vanG* au sein d'une population d'individus sains dans le but de connaître d'avantage la flore digestive de ceux-ci.
- 4- Améliorer les milieux de culture pour favoriser la croissance de bactéries difficilement cultivables susceptibles de contenir des gènes de résistance aux glycopeptides.

Concernant la résistance aux glycopeptides chez la souche de *Ruminococcus gauvreaui* CCRI-16110, certaines questions spécifiques devraient être élucidées, à savoir:

- 1- Identifier et caractériser une éventuelle D-Ala-D-Ala ligase ainsi que l'analyse de son rôle dans la résistance aux glycopeptides chez la souche CCRI-16110.
- 2- Déterminer en présence ou en absence d'induction la proportion relative des précurseurs tardifs du peptidoglycane terminés par D-Ala-D-Ala, D-Ala-D-Lac et D-Ala-D-Ser.
- 3- Caractériser l'environnement génétique en amont et en aval du locus *vanD* afin de déterminer si ce locus est porté par un élément génétique mobile dans la souche CCRI-16110.
- 4- Caractériser l'intégralité du locus de type *vanG* chez la souche CCRI-16110. L'analyse de la séquence complète du locus de type *vanG* permettra d'étudier la présence des gènes de régulation *vanU_G*, *vanR_G* et *vanS_G*.
- 5- Approfondir les tentatives de transfert de la résistance aux glycopeptides entre la souche CCRI-16110 et une souche d'entérocoque sensible aux glycopetides afin de répondre à la question du rôle essentiel des bactéries commensales dans l'origine de la résistance chez les bactéries pathogènes.

La présence d'un locus apparenté au locus *vanG* chez les souches de *C. difficile* sensibles aux glycopeptides ouvre également des perspectives intéressantes dans l'étude de l'expression de la résistance aux glycopeptides.

- 1- Dans les souches de *C. difficile* contenant un locus de type *vanG*, il serait intéressant de rechercher la présence d'un promoteur dans la séquence génomique autour des gènes de type *vanG*.
- 2- D'étudier si l'absence du gène *vanW_G* serait impliquée dans l'expression de la résistance chez les souches de *C. difficile* contenant un locus apparenté au locus *vanG*.
- 3- De déterminer en présence ou en absence de glycopeptides la proportion relative des précurseurs tardifs du peptidoglycane terminés par D-Ala-D-Ala et du D-Ala-D-Ser.

Toutes ces données vont fournir des éléments importants pour mettre en place des outils de surveillance et de diagnostic rapide des infections dues aux bactéries résistantes aux glycopeptides.

CHAPITRE XII. CONCLUSION GÉNÉRALE

Les glycopeptides sont des antibiotiques utilisés pour traiter des infections graves causées par les bactéries à Gram positif. Cependant, une grande proportion de souches d'entérocoques, quelques souches de staphylocoques et certaines souches de bactéries anaérobies ont développé une résistance à ces antibiotiques. Dans ce contexte, il est important de trouver des moyens efficaces pour limiter la dissémination des gènes de résistance aux glycopeptides à d'autres souches d'entérocoques, de staphylocoques ainsi qu'à d'autres pathogènes. Des efforts remarquables ont été accomplis depuis près de vingt ans pour comprendre le support génétique de la résistance aux glycopeptides et leur mécanisme de dissémination entre les espèces et entre les genres bactériens. La dissémination des gènes *vanA* et *vanB* est facilitée par leur présence sur des éléments génétiques mobiles qui s'insèrent sur des plasmides ou dans le chromosome bactérien. Mais le mécanisme moléculaire de la dissémination des gènes *vanD* chez les entérocoques est encore inconnu. Enfin, la dissémination du gène *vanG* pourrait impliquer un élément génétique mobile dont la caractérisation est encore incomplète et qui porte également la résistance à l'érythromycine.

Notre étude a mis en évidence pour la première fois une prévalence élevée des gènes de résistance *vanB*, *vanD* et *vanG* qui n'étaient pas associés à des ERG dans la flore digestive humaine ainsi que l'association de ces gènes à des bactéries anaérobies du tube digestif. Les bactéries du tube digestif de l'homme qui, intimement associées, échangent et trafiquent du matériel génétique pour assurer la pérennité de leur espèce ou de leur genre au détriment de la santé humaine. Les résultats de ce travail démontrent clairement l'existence d'échanges de gènes de résistance aux glycopeptides entre les bactéries constituant la flore digestive humaine et apportent un éclairage nouveau sur le rôle de ces microorganismes dans l'épidémiologie de la résistance à ces antibiotiques. Malgré tous les efforts de lutte et de prévention, la résistance aux glycopeptides s'étend inexorablement à d'autres genres bactériens redoutables pour leur pathogénicité comme le SARM. Devant cette situation, l'utilisation rationnelle des antibiotiques demeure un moyen sûr et efficace pour ralentir la propagation des gènes de résistances aux glycopeptides en attendant la mise sur le marché de nouveaux antibiotiques capables de combattre les infections dues aux bactéries

résistantes aux glycopeptides. Une surveillance des patients colonisés par les bactéries résistantes aux glycopeptides ainsi que le dépistage des porteurs sains en utilisant des techniques de diagnostic rapide doivent également être envisagés. Les mesures d'hygiène notamment le lavage minutieux des mains demeure un moyen important, simple et efficace de prévention et de contrôle de la dissémination des bactéries résistantes aux glycopeptides (75, 215, 251, 256).

BIBLIOGRAPHIE

1. **Aarestrup, F. M., A. M. Seyfarth, H. D. Emborg, K. Pedersen, R. S. Hendriksen, and F. Bager.** 2001. Effect of abolishment of the use of antimicrobial agents for growth promotion on occurrence of antimicrobial resistance in fecal enterococci from food animals in Denmark. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:2054-9.
2. **Abadia-Patino, L., K. Christiansen, J. Bell, P. Courvalin, and B. Périchon.** 2004. VanE-type vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* clinical isolates from Australia. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:4882-5.
3. **Abadia Patino, L., P. Courvalin, and B. Périchon.** 2002. *vanE* gene cluster of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* BM4405. *J. Bacteriol.* **184**:6457-64.
4. **Allen, N. E., J. N. Hobbs, Jr., J. M. Richardson, and R. M. Riggin.** 1992. Biosynthesis of modified peptidoglycan precursors by vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *FEMS Microbiol. Lett.* **77**:109-15.
5. **Arias, C. A., P. Courvalin, and P. E. Reynolds.** 2000. *vanC* cluster of vancomycin-resistant *Enterococcus gallinarum* BM4174. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:1660-6.
6. **Arias, C. A., M. Martin-Martinez, T. L. Blundell, M. Arthur, P. Courvalin, and P. E. Reynolds.** 1999. Characterization and modelling of VanT: a novel, membrane-bound, serine racemase from vancomycin-resistant *Enterococcus gallinarum* BM4174. *Mol. Microbiol.* **31**:1653-64.
7. **Arias, C. A., J. Pena, D. Panesso, and P. Reynolds.** 2003. Role of the transmembrane domain of the VanT serine racemase in resistance to vancomycin in *Enterococcus gallinarum* BM4174. *J. Antimicrob. Chemother.* **51**:557-64.
8. **Arioli, V., and R. Pallanza.** 1987. Teicoplanin-resistant coagulase-negative staphylococci. *Lancet* **1**:39.
9. **Arthur, M., and P. Courvalin.** 1993. Genetics and mechanisms of glycopeptide resistance in enterococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**:1563-71.
10. **Arthur, M., F. Depardieu, L. Cabanie, P. Reynolds, and P. Courvalin.** 1998. Requirement of the VanY and VanX D,D-peptidases for glycopeptide resistance in enterococci. *Mol. Microbiol.* **30**:819-30.

11. **Arthur, M., F. Depardieu, and P. Courvalin.** 1999. Regulated interactions between partner and non-partner sensors and response regulators that control glycopeptide resistance gene expression in enterococci. *Microbiology* **145** (Pt 8):1849-58.
12. **Arthur, M., F. Depardieu, G. Gerbaud, M. Galimand, R. Leclercq, and P. Courvalin.** 1997. The VanS sensor negatively controls VanR-mediated transcriptional activation of glycopeptide resistance genes of Tn1546 and related elements in the absence of induction. *J. Bacteriol.* **179**:97-106.
13. **Arthur, M., F. Depardieu, C. Molinas, P. Reynolds, and P. Courvalin.** 1995. The *vanZ* gene of Tn1546 from *Enterococcus faecium* BM4147 confers resistance to teicoplanin. *Gene* **154**:87-92.
14. **Arthur, M., F. Depardieu, P. Reynolds, and P. Courvalin.** 1996. Quantitative analysis of the metabolism of soluble cytoplasmic peptidoglycan precursors of glycopeptide-resistant enterococci. *Mol. Microbiol.* **21**:33-44.
15. **Arthur, M., F. Depardieu, H. A. Snaith, P. E. Reynolds, and P. Courvalin.** 1994. Contribution of VanY D,D-carboxypeptidase to glycopeptide resistance in *Enterococcus faecalis* by hydrolysis of peptidoglycan precursors. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**:1899-903.
16. **Arthur, M., C. Molinas, T. D. Bugg, G. D. Wright, C. T. Walsh, and P. Courvalin.** 1992. Evidence for *in vivo* incorporation of D-lactate into peptidoglycan precursors of vancomycin-resistant enterococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36**:867-9.
17. **Arthur, M., C. Molinas, and P. Courvalin.** 1992. Sequence of the *vanY* gene required for production of a vancomycin-inducible D,D-carboxypeptidase in *Enterococcus faecium* BM4147. *Gene* **120**:111-4.
18. **Arthur, M., C. Molinas, and P. Courvalin.** 1992. The VanS-VanR two-component regulatory system controls synthesis of depsipeptide peptidoglycan precursors in *Enterococcus faecium* BM4147. *J. Bacteriol.* **174**:2582-91.
19. **Arthur, M., C. Molinas, F. Depardieu, and P. Courvalin.** 1993. Characterization of Tn1546, a Tn3-related transposon conferring glycopeptide resistance by synthesis of depsipeptide peptidoglycan precursors in *Enterococcus faecium* BM4147. *J. Bacteriol.* **175**:117-27.
20. **Arthur, M., C. Molinas, S. Dutka-Malen, and P. Courvalin.** 1991. Structural relationship between the vancomycin resistance protein VanH and 2-hydroxycarboxylic acid dehydrogenases. *Gene* **103**:133-4.

21. **Arthur, M., and R. J. Quintiliani.** 2001. Regulation of VanA- and VanB-type glycopeptide resistance in enterococci. *Antimicrob Agents Chemother* **45**:375-381.
22. **Aslangul, E., M. Baptista, B. Fantin, F. Depardieu, M. Arthur, P. Courvalin, and C. Carbon.** 1997. Selection of glycopeptide-resistant mutants of VanB-type *Enterococcus faecalis* BM4281 *in vitro* and in experimental endocarditis. *J. Infect. Dis.* **175**:598-605.
23. **Balis, E., A. C. Vatopoulos, M. Kanelopoulou, E. Mainas, G. Hatzoudis, V. Kontogianni, H. Malamou-Lada, S. Kitsou-Kiriakopoulou, and V. Kalapothaki.** 1996. Indications of *in vivo* transfer of an epidemic R plasmid from *Salmonella enteritidis* to *Escherichia coli* of the normal human gut flora. *J. Clin. Microbiol.* **34**:977-9.
24. **Ballard, S. A., E. A. Grabsch, P. D. Johnson, and M. L. Grayson.** 2005. Comparison of three PCR primer sets for identification of *vanB* gene carriage in feces and correlation with carriage of vancomycin-resistant enterococci: interference by *vanB*-containing anaerobic bacilli. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:77-81.
25. **Ballard, S. A., K. K. Pertile, M. Lim, P. D. Johnson, and M. L. Grayson.** 2005. Molecular characterization of *vanB* elements in naturally occurring gut anaerobes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:1688-1694.
26. **Baptista, M., F. Depardieu, P. Reynolds, P. Courvalin, and M. Arthur.** 1997. Mutations leading to increased levels of resistance to glycopeptide antibiotics in VanB-type enterococci. *Mol. Microbiol.* **25**:93-105.
27. **Bardone, M. R., M. Paternoster, and C. Coronelli.** 1978. Teichomycins, new antibiotics from *Actinoplanes teichomyceticus* nov. sp. II. Extraction and chemical characterization. *J. Antibiot. (Tokyo)* **31**:170-7.
28. **Barna, J. C., and D. H. Williams.** 1984. The structure and mode of action of glycopeptide antibiotics of the vancomycin group. *Annu. Rev. Microbiol.* **38**:339-357.
29. **Berchieri, A.** 1999. Intestinal colonization of a human subject by vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Clin Microbiol Infect* **5**:97-100.
30. **Biavasco, F., E. Giovanetti, A. Miele, C. Vignaroli, B. Facinelli, and P. E. Varaldo.** 1996. *In vitro* conjugative transfer of VanA vancomycin resistance between Enterococci and Listeriae of different species. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **15**:50-9.
31. **Billot-Klein, D., L. Gutmann, D. Bryant, D. Bell, J. Van Heijenoort, J. Grewal, and D. M. Shlaes.** 1996. Peptidoglycan synthesis and structure in *Staphylococcus*

- haemolyticus* expressing increasing levels of resistance to glycopeptide antibiotics. *J. Bacteriol.* **178**:4696-703.
32. **Billot-Klein, D., L. Gutmann, E. Collatz, and J. van Heijenoort.** 1992. Analysis of peptidoglycan precursors in vancomycin-resistant enterococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36**:1487-90.
 33. **Billot-Klein, D., L. Gutmann, S. Sable, E. Guittet, and J. van Heijenoort.** 1994. Modification of peptidoglycan precursors is a common feature of the low-level vancomycin-resistant VANB-type *Enterococcus* D366 and of the naturally glycopeptide-resistant species *Lactobacillus casei*, *Pediococcus pentosaceus*, *Leuconostoc mesenteroides*, and *Enterococcus gallinarum*. *J. Bacteriol.* **176**:2398-405.
 34. **Bischoff, M., M. Roos, J. Putnik, A. Wada, P. Glanzmann, P. Giachino, P. Vaudaux, and B. Berger-Bachi.** 2001. Involvement of multiple genetic loci in *Staphylococcus aureus* teicoplanin resistance. *FEMS Microbiol. Lett.* **194**:77-82.
 35. **Boneca, I. G., and G. Chiosis.** 2003. Vancomycin resistance: occurrence, mechanisms and strategies to combat it. *Expert Opin. Ther. Targets* **7**:311-28.
 36. **Bonten, M. J., M. K. Hayden, C. Nathan, J. van Voorhis, M. Matushek, S. Slaughter, T. Rice, and R. A. Weinstein.** 1996. Epidemiology of colonisation of patients and environment with vancomycin-resistant enterococci. *Lancet* **348**:1615-9.
 37. **Bourgault, A. M., F. Lamothe, V. G. Loo, and L. Poirier.** 2006. *In vitro* susceptibility of *Clostridium difficile* clinical isolates from a multi-institutional outbreak in Southern Quebec, Canada. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**:3473-5.
 38. **Bourgeois-Nicolaos, N., C. Moubareck, N. Mangeney, M. J. Butel, and F. Doucet-Populaire.** 2006. Comparative study of *vanA* gene transfer from *Enterococcus faecium* to *Enterococcus faecalis* and to *Enterococcus faecium* in the intestine of mice. *FEMS Microbiol. Lett.* **254**:27-33.
 39. **Boyce, J. M., S. M. Opal, J. W. Chow, M. J. Zervos, G. Potter-Bynoe, C. B. Sherman, R. L. Romulo, S. Fortna, and A. A. Medeiros.** 1994. Outbreak of multidrug-resistant *Enterococcus faecium* with transferable *vanB* class vancomycin resistance. *J. Clin. Microbiol.* **32**:1148-53.
 40. **Boyd, D. A., T. Cabral, P. Van Caesele, J. Wylie, and M. R. Mulvey.** 2002. Molecular characterization of the *vanE* gene cluster in vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* N00-410 isolated in Canada. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:1977-9.
 41. **Boyd, D. A., J. Conly, H. Dedier, G. Peters, L. Robertson, E. Slater, and M. R. Mulvey.** 2000. Molecular characterization of the *vanD* gene cluster and a novel

- insertion element in a vancomycin-resistant *enterococcus* isolated in Canada. J. Clin. Microbiol. **38**:2392-2394.
42. **Boyd, D. A., T. Du, R. Hizon, B. Kaplen, T. Murphy, S. Tyler, S. Brown, F. Jamieson, K. Weiss, and M. R. Mulvey.** 2006. VanG-type vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* strains isolated in Canada. Antimicrob. Agents Chemother. **50**:2217-2221.
 43. **Boyd, D. A., P. Kibsey, D. Roscoe, and M. R. Mulvey.** 2004. *Enterococcus faecium* N03-0072 carries a new VanD-type vancomycin resistance determinant: characterization of the *vanD5* operon. J. Antimicrob. Chemother. **54**:680-683.
 44. **Boyd, D. A., M. A. Miller, and M. R. Mulvey.** 2006. *Enterococcus gallinarum* N04-0414 harbors a VanD-type vancomycin resistance operon and does not contain a D-alanine:D-alanine 2 (*ddl2*) gene. Antimicrob. Agents Chemother. **50**:1067-1070.
 45. **Boyle-Vavra, S., B. L. de Jonge, C. C. Ebert, and R. S. Daum.** 1997. Cloning of the *Staphylococcus aureus* *ddh* gene encoding NAD⁺-dependent D-lactate dehydrogenase and insertional inactivation in a glycopeptide-resistant isolate. J. Bacteriol. **179**:6756-63.
 46. **Bradley, S. J., A. L. Wilson, M. C. Allen, H. A. Sher, A. H. Goldstone, and G. M. Scott.** 1999. The control of hyperendemic glycopeptide-resistant *Enterococcus* spp. on a haematology unit by changing antibiotic usage. J. Antimicrob. Chemother. **43**:261-6.
 47. **Brown, A. R., S. G. Amyes, R. Paton, W. D. Plant, G. M. Stevenson, R. J. Winney, and R. S. Miles.** 1998. Epidemiology and control of vancomycin-resistant enterococci (VRE) in a renal unit. J. Hosp. Infect. **40**:115-24.
 48. **Brynstad, S., and P. E. Granum.** 1999. Evidence that Tn5565, which includes the enterotoxin gene in *Clostridium perfringens*, can have a circular form which may be a transposition intermediate. FEMS Microbiol. Lett. **170**:281-286.
 49. **Brynstad, S., B. Synstad, and P. E. Granum.** 1997. The *Clostridium perfringens* enterotoxin gene is on a transposable element in type A human food poisoning strains. Microbiology **143**:2109-2115.
 50. **Bryskier, A.** 2005. Antimicrobial agents: antibacterials and antifungals. ASM press **Chapitre 30**:826-879.
 51. **Bryskier, A.** 2005. Antimicrobial agents: antibacterials and antifungals. ASM press **Chapitre 31**:880-905.

52. **Bugg, T. D., S. Dutka-Malen, M. Arthur, P. Courvalin, and C. T. Walsh.** 1991. Identification of vancomycin resistance protein VanA as a D-alanine:D-alanine ligase of altered substrate specificity. *Biochemistry (Mosc)*. **30**:2017-21.
53. **Bugg, T. D., G. D. Wright, S. Dutka-Malen, M. Arthur, P. Courvalin, and C. T. Walsh.** 1991. Molecular basis for vancomycin resistance in *Enterococcus faecium* BM4147: biosynthesis of a depsipeptide peptidoglycan precursor by vancomycin resistance proteins VanH and VanA. *Biochemistry (Mosc)*. **30**:10408-15.
54. **Carias, L. L., S. D. Rudin, C. J. Donskey, and L. B. Rice.** 1998. Genetic linkage and cotransfer of a novel, *vanB*-containing transposon (Tn5382) and a low-affinity penicillin-binding protein 5 gene in a clinical vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolate. *J. Bacteriol.* **180**:4426-34.
55. **Carmeli, Y., G. M. Eliopoulos, and M. H. Samore.** 2002. Antecedent treatment with different antibiotic agents as a risk factor for vancomycin-resistant *Enterococcus*. *Emerg. Infect. Dis.* **8**:802-7.
56. **Carmeli, Y., M. H. Samore, and C. Huskins.** 1999. The association between antecedent vancomycin treatment and hospital-acquired vancomycin-resistant enterococci: a meta-analysis. *Arch. Intern. Med.* **159**:2461-8.
57. **Casadewall, B., and P. Courvalin.** 1999. Characterization of the *vanD* glycopeptide resistance gene cluster from *Enterococcus faecium* BM4339. *J. Bacteriol.* **181**:3644-3648.
58. **Casadewall, B., P. E. Reynolds, and P. Courvalin.** 2001. Regulation of expression of the *vanD* glycopeptide resistance gene cluster from *Enterococcus faecium* BM4339. *J. Bacteriol.* **183**:3436-3446.
59. **CDC.** 1993. Nosocomial enterococci resistant to vancomycin--United States, 1989-1993. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **42**:597-9.
60. **CDC.** 2002. *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin--United States, 2002. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **51**:565-567.
61. **CDC.** 2004. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*--New York, 2004. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **53**:322-323.
62. **CDC.** 2002. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*--Pennsylvania, 2002. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **51**:902.
63. **Cercenado, E., S. Unal, C. T. Eliopoulos, L. G. Rubin, H. D. Isenberg, R. C. J. Moellering, and G. M. Eliopoulos.** 1995. Characterization of vancomycin resistance in *Enterococcus durans*. *J Antimicrob Chemother* **36**: 821-825.

64. **Cetinkaya, Y., P. Falk, and C. G. Mayhall.** 2000. Vancomycin-resistant enterococci. *Clin. Microbiol. Rev.* **13**:686-707.
65. **Chang, F. Y., B. B. P. MacDonald, J. E. Jr., D. M. Musher, P. Triplett, J. M. Mylotte, A. O'Donnell, M. M. Wagener, and V. L. Yu.** 2003. A prospective multicenter study of *Staphylococcus aureus* bacteremia: incidence of endocarditis, risk factors for mortality, and clinical impact of methicillin resistance. *Medicine (Baltim.)* **82**:322-332.
66. **Christiansen, K. J., P. A. Tibbett, W. Beresford, J. W. Pearman, R. C. Lee, G. W. Coombs, I. D. Kay, F. G. O'Brien, S. Palladino, C. R. Douglas, P. D. Montgomery, T. Orrell, A. M. Peterson, F. P. Kosaras, J. P. Flexman, C. H. Heath, and C. A. McCullough.** 2004. Eradication of a large outbreak of a single strain of *vanB* vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* at a major Australian teaching hospital. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **25**:384-90.
67. **Citron, D. M., C. V. Merriam, K. L. Tyrrell, Y. A. Warren, H. Fernandez, and E. J. Goldstein.** 2003. *In vitro* activities of ramoplanin, teicoplanin, vancomycin, linezolid, bacitracin, and four other antimicrobials against intestinal anaerobic bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:2334-8.
68. **Clark, N. C., L. M. Teixeira, R. R. Facklam, and F. C. Tenover.** 1998. Detection and differentiation of *vanC-1*, *vanC-2*, and *vanC-3* glycopeptide resistance genes in enterococci. *J. Clin. Microbiol.* **36**:2294-7.
69. **Clewell, D. B., F. Y. An, S. E. Flannagan, M. Antiporta, and G. M. Dunny.** 2000. Enterococcal sex pheromone precursors are part of signal sequences for surface lipoproteins. *Mol. Microbiol.* **35**:246-7.
70. **CLSI.** 2006. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that grow Aerobically; Approved Standard - Seventh Edition. Clinical and Laboratory Standards Institute **26**, M7-A7.
71. **CLSI.** 2006. Table 2C. MIC interpretive Standards ($\mu\text{g/mL}$) for *Staphylococcus* spp. Clinical and Laboratory Standards Institute **26**, M7-MIC:118-123.
72. **CLSI.** 2006. Table 2D. MIC interpretive Standards ($\mu\text{g/mL}$) for *Enterococcus* spp. Clinical and Laboratory Standards Institute **26**, M7-MIC:124-127.
73. **Collins, M. D., P. A. Lawson, A. Willems, J. J. Cordoba, J. Fernandez-Garayzabal, P. Garcia, J. Cai, H. Hippe, and J. A. Farrow.** 1994. The phylogeny of the genus *Clostridium*: proposal of five new genera and eleven new species combinations. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**:812-826.
74. **Conly, J.** 2002. Antimicrobial resistance in Canada. *CMAJ* **167**:885-91.

75. **Cookson, B. D., M. B. Macrae, S. P. Barrett, D. F. Brown, C. Chadwick, G. L. French, P. Hateley, I. K. Hosein, and J. J. Wade.** 2006. Guidelines for the control of glycopeptide-resistant enterococci in hospitals. *J. Hosp. Infect.* **62**:6-21.
76. **Coque, T. M., J. F. Tomayko, S. C. Rieke, P. C. Okhyusen, and B. E. Murray.** 1996. Vancomycin-resistant enterococci from nosocomial, community, and animal sources in the United States. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**:2605-9.
77. **Courvalin, P.** 2005. Genetics of glycopeptide resistance in gram-positive pathogens. *Int. J. Med. Microbiol.* **294**:479-86.
78. **Courvalin, P.** 2006. Vancomycin resistance in gram-positive cocci. *Clin. Infect. Dis.* **42 Suppl 1**:S25-34.
79. **Cui, L., A. Iwamoto, J. Q. Lian, H. M. Neoh, T. Maruyama, Y. Horikawa, and K. Hiramatsu.** 2006. Novel mechanism of antibiotic resistance originating in vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**:428-38.
80. **Cui, L., H. Murakami, K. Kuwahara-Arai, H. Hanaki, and K. Hiramatsu.** 2000. Contribution of a thickened cell wall and its glutamine nonamidated component to the vancomycin resistance expressed by *Staphylococcus aureus* Mu50. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:2276-85.
81. **Cunha, B. A.** 1995. Vancomycin. *Med. Clin. North Am.* **79**:817-31.
82. **Cunha, B. A., and A. M. Ristuccia.** 1983. Clinical usefulness of vancomycin. *Clin. Pharm.* **2**:417-24.
83. **Dahl, K. H., E. W. Lundblad, T. P. Rokenes, O. Olsvik, and A. Sundsfjord.** 2000. Genetic linkage of the *vanB2* gene cluster to Tn5382 in vancomycin-resistant enterococci and characterization of two novel insertion sequences. *Microbiology* **146 (Pt 6)**:1469-79.
84. **Dahl, K. H., T. P. Rokenes, E. W. Lundblad, and A. Sundsfjord.** 2003. Nonconjugative transposition of the *vanB*-containing Tn5382-like element in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **47**:786-789.
85. **Dahl, K. H., G. S. Simonsen, O. Olsvik, and A. Sundsfjord.** 1999. Heterogeneity in the *vanB* gene cluster of genomically diverse clinical strains of vancomycin-resistant enterococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:1105-1110.
86. **Dahl, K. H., and A. Sundsfjord.** 2003. Transferable *vanB2* Tn5382-containing elements in fecal streptococcal strains from veal calves. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:2579-83.

87. **Dalla Costa, L. M., P. E. Reynolds, H. A. Souza, D. C. Souza, M. F. Palepou, and N. Woodford.** 2000. Characterization of a divergent *vanD*-type resistance element from the first glycopeptide-resistant strain of *Enterococcus faecium* isolated in Brazil. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:3444-3446.
88. **David, V., B. Bozdogan, J. L. Mainardi, R. Legrand, L. Gutmann, and R. Leclercq.** 2004. Mechanism of intrinsic resistance to vancomycin in *Clostridium innocuum* NCIB 10674. *J. Bacteriol.* **186**:3415-3422.
89. **Depardieu, F., M. G. Bonora, P. E. Reynolds, and P. Courvalin.** 2003. The *vanG* glycopeptide resistance operon from *Enterococcus faecalis* revisited. *Mol. Microbiol.* **50**:931-948.
90. **Depardieu, F., and P. Courvalin.** 2005. Frontiers in antimicrobial resistance: a tribute to Stuart B. Levy. ASM press **Chapter 8**:101-121.
91. **Depardieu, F., P. Courvalin, and A. Kolb.** 2005. Binding sites of VanRB and sigma70 RNA polymerase in the *vanB* vancomycin resistance operon of *Enterococcus faecium* BM4524. *Mol. Microbiol.* **57**:550-64.
92. **Depardieu, F., P. Courvalin, and T. Msadek.** 2003. A six amino acid deletion, partially overlapping the VanSB G2 ATP-binding motif, leads to constitutive glycopeptide resistance in VanB-type *Enterococcus faecium*. *Mol. Microbiol.* **50**:1069-83.
93. **Depardieu, F., M. Kolbert, H. Pruul, J. Bell, and P. Courvalin.** 2004. VanD-type vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:3892-3904.
94. **Depardieu, F., I. Podglajen, R. Leclercq, E. Collatz, and P. Courvalin.** 2007. Modes and modulations of antibiotic resistance gene expression. *Clin. Microbiol. Rev.* **20**:79-114.
95. **Depardieu, F., P. E. Reynolds, and P. Courvalin.** 2003. VanD-type vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* 10/96A. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:7-18.
96. **Dever, L. L., C. China, R. H. Eng, C. O'Donovan, and W. G. Johanson, Jr.** 1998. Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in a Veterans Affairs Medical Center: association with antibiotic usage. *Am. J. Infect. Control* **26**:40-6.
97. **Dever, L. L., S. M. Smith, S. Handwerger, and R. H. Eng.** 1995. Vancomycin-dependent *Enterococcus faecium* isolated from stool following oral vancomycin therapy. *J. Clin. Microbiol.* **33**:2770-3.
98. **Diekema, D. J., M. A. Pfaller, F. J. Schmitz, J. Smayevsky, J. Bell, R. N. Jones, and M. Beach.** 2001. Survey of infections due to Staphylococcus species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the

- United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. *Clin. Infect. Dis.* **32** Suppl 2:S114-32.
99. **Dobbs, T. E., M. Patel, K. B. Waites, S. A. Moser, A. M. Stamm, and C. J. Hoesley.** 2006. Nosocomial spread of *Enterococcus faecium* resistant to vancomycin and linezolid in a tertiary care medical center. *J. Clin. Microbiol.* **44**:3368-70.
 100. **Dubberke, E. R., J. M. Hollands, P. Georgantopoulos, K. Augustin, J. F. DiPersio, L. M. Mundy, and H. J. Khoury.** 2006. Vancomycin-resistant enterococcal bloodstream infections on a hematopoietic stem cell transplant unit: are the sick getting sicker? *Bone Marrow Transplant.* **38**:813-9.
 101. **Dunny, G. M., and B. A. Leonard.** 1997. Cell-cell communication in gram-positive bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **51**:527-64.
 102. **Dutka-Malen, S., B. Blaimont, G. Wauters, and P. Courvalin.** 1994. Emergence of high-level resistance to glycopeptides in *Enterococcus gallinarum* and *Enterococcus casseliflavus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**:1675-7.
 103. **Dutka-Malen, S., C. Molinas, M. Arthur, and P. Courvalin.** 1992. Sequence of the *vanC* gene of *Enterococcus gallinarum* BM4174 encoding a D-alanine:D-alanine ligase-related protein necessary for vancomycin resistance. *Gene* **112**:53-58.
 104. **Dutta, I., and P. E. Reynolds.** 2002. Biochemical and genetic characterization of the *vanC-2* vancomycin resistance gene cluster of *Enterococcus casseliflavus* ATCC 25788. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:3125-32.
 105. **Eckburg, P. B., E. M. Bik, C. N. Bernstein, E. Purdom, L. Dethlefsen, M. Sargent, S. R. Gill, K. E. Nelson, and D. A. Relman.** 2005. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* **308**:1635-8.
 106. **Edmond, M. B., J. F. Ober, D. L. Weinbaum, M. A. Pfaller, T. Hwang, M. D. Sanford, and R. P. Wenzel.** 1995. Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* bacteremia: risk factors for infection. *Clin. Infect. Dis.* **20**:1126-33.
 107. **Elisha, B. G., and P. Courvalin.** 1995. Analysis of genes encoding D-alanine:D-alanine ligase-related enzymes in *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus* spp. *Gene* **152**:79-83.
 108. **Endtz, H. P., N. van den Braak, H. A. Verbrugh, and A. van Belkum.** 1999. Vancomycin resistance: status quo and quo vadis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **18**:683-90.

109. **Evers, S., and P. Courvalin.** 1996. Regulation of VanB-type vancomycin resistance gene expression by the VanS(B)-VanR (B) two-component regulatory system in *Enterococcus faecalis* V583. *J. Bacteriol.* **178**:1302-9.
110. **Evers, S., P. E. Reynolds, and P. Courvalin.** 1994. Sequence of the *vanB* and *ddl* genes encoding D-alanine:D-lactate and D-alanine:D-alanine ligases in vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* V583. *Gene* **140**:97-102.
111. **Farr, B. M.** 1998. Hospital wards spreading vancomycin-resistant enterococci to intensive care units: returning coals to Newcastle. *Crit. Care Med.* **26**:1942-3.
112. **Fines, M., B. Périchon, P. Reynolds, D. F. Sahm, and P. Courvalin.** 1999. VanE, a new type of acquired glycopeptide resistance in *Enterococcus faecalis* BM4405. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:2161-4.
113. **Flannagan, S. E., J. W. Chow, S. M. Donabedian, W. J. Brown, M. B. Perri, M. J. Zervos, Y. Ozawa, and D. B. Clewell.** 2003. Plasmid content of a vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* isolate from a patient also colonized by *Staphylococcus aureus* with a VanA phenotype. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:3954-9.
114. **Fontana, R., M. Ligozzi, C. Pedrotti, E. M. Padovani, and G. Cornaglia.** 1997. Vancomycin-resistant *Bacillus circulans* carrying the *vanA* gene responsible for vancomycin resistance in enterococci. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **16**:473-4.
115. **Franks, A. H., H. J. Harmsen, G. C. Raangs, G. J. Jansen, F. Schut, and G. W. Welling.** 1998. Variations of bacterial populations in human feces measured by fluorescent *in situ* hybridization with group-specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:3336-3345.
116. **French, G. L.** 1998. Enterococci and vancomycin resistance. *Clin. Infect. Dis.* **27 Suppl 1**:S75-83.
117. **Fridkin, S. K.** 2001. Vancomycin-intermediate and -resistant *Staphylococcus aureus*: what the infectious disease specialist needs to know. *Clin. Infect. Dis.* **32**:108-15.
118. **Fridkin, S. K., R. Lawton, J. R. Edwards, F. C. Tenover, J. E. McGowan, Jr., and R. P. Gaynes.** 2002. Monitoring antimicrobial use and resistance: comparison with a national benchmark on reducing vancomycin use and vancomycin-resistant enterococci. *Emerg. Infect. Dis.* **8**:702-7.
119. **Frieden, T. R., S. S. Munsiff, D. E. Low, B. M. Willey, G. Williams, Y. Faur, W. Eisner, S. Warren, and B. Kreiswirth.** 1993. Emergence of vancomycin-resistant enterococci in New York City. *Lancet* **342**:76-9.

120. **Garnier, F., S. Taourit, P. Glaser, P. Courvalin, and M. Galimand.** 2000. Characterization of transposon Tn1549, conferring VanB-type resistance in *Enterococcus* spp. *Microbiology* **146 (Pt 6)**:1481-1489.
121. **Geraci, J. E.** 1977. Vancomycin. *Mayo Clin. Proc.* **52**:631-4.
122. **Gerding, D. N.** 1997. Is there a relationship between vancomycin-resistant enterococcal infection and *Clostridium difficile* infection? *Clin. Infect. Dis.* **25 Suppl 2**:S206-10.
123. **Goldstein, F. W., A. Coutrot, A. Sieffer, and J. F. Acar.** 1990. Percentages and distributions of teicoplanin- and vancomycin-resistant strains among coagulase-negative staphylococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**:899-900.
124. **Gonzalez-Zorn, B., and P. Courvalin.** 2003. VanA-mediated high level glycopeptide resistance in MRSA. *Lancet Infect. Dis.* **3**:67-8.
125. **Goossens, H.** 1999. The epidemiology of vancomycin-resistant enterococci. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **12**:537-41.
126. **Goossens, H.** 1998. Spread of vancomycin-resistant enterococci: differences between the United States and Europe. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **19**:546-51.
127. **Goossens, H., D. Jabes, R. Rossi, C. Lammens, G. Privitera, and P. Courvalin.** 2003. European survey of vancomycin-resistant enterococci in at-risk hospital wards and in vitro susceptibility testing of ramoplanin against these isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* **51 Suppl 3**:iii5-12.
128. **Granlund, M., C. Carlsson, H. Edebro, K. Emanuelsson, and R. Lundholm.** 2006. Nosocomial outbreak of *vanB2* vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in Sweden. *J. Hosp. Infect.* **62**:254-6.
129. **Gray, J. W., and R. H. George.** 2000. Experience of vancomycin-resistant enterococci in a children's hospital. *J. Hosp. Infect.* **45**:11-18.
130. **Griffith, R. S.** 1981. Introduction to vancomycin. *Rev. Infect. Dis.* **3 suppl**:S200-4.
131. **Griffith, R. S.** 1984. Vancomycin use--an historical review. *J. Antimicrob. Chemother.* **14 Suppl D**:1-5.
132. **Guardabassi, L., H. Christensen, H. Hasman, and A. Dalsgaard.** 2004. Members of the genera *Paenibacillus* and *Rhodococcus* harbor genes homologous to enterococcal glycopeptide resistance genes *vanA* and *vanB*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:4915-8.

133. **Guardabassi, L., B. Périchon, J. van Heijenoort, D. Blanot, and P. Courvalin.** 2005. Glycopeptide resistance *vanA* operons in *Paenibacillus* strains isolated from soil. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:4227-33.
134. **Hanaki, H., K. Kuwahara-Arai, S. Boyle-Vavra, R. S. Daum, H. Labischinski, and K. Hiramatsu.** 1998. Activated cell-wall synthesis is associated with vancomycin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strains Mu3 and Mu50. *J. Antimicrob. Chemother.* **42**:199-209.
135. **Handwerger, S., M. J. Pucci, and A. Kolokathis.** 1990. Vancomycin resistance is encoded on a pheromone response plasmid in *Enterococcus faecium* 228. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**:358-60.
136. **Handwerger, S., M. J. Pucci, K. J. Volk, J. Liu, and M. S. Lee.** 1992. The cytoplasmic peptidoglycan precursor of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* terminates in lactate. *J. Bacteriol.* **174**:5982-4.
137. **Handwerger, S., M. J. Pucci, K. J. Volk, J. Liu, and M. S. Lee.** 1994. Vancomycin-resistant *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus casei* synthesize cytoplasmic peptidoglycan precursors that terminate in lactate. *J. Bacteriol.* **176**:260-4.
138. **Handwerger, S., B. Raucher, D. Altarac, J. Monka, S. Marchione, K. V. Singh, B. E. Murray, J. Wolff, and B. Walters.** 1993. Nosocomial outbreak due to *Enterococcus faecium* highly resistant to vancomycin, penicillin, and gentamicin. *Clin. Infect. Dis.* **16**:750-5.
139. **Handwerger, S., and J. Skoble.** 1995. Identification of chromosomal mobile element conferring high-level vancomycin resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**:2446-53.
140. **Hanrahan, J., C. Hoyen, and L. B. Rice.** 2000. Geographic distribution of a large mobile element that transfers ampicillin and vancomycin resistance between *Enterococcus faecium* strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:1349-51.
141. **Harbarth, S., S. Cosgrove, and Y. Carmeli.** 2002. Effects of antibiotics on nosocomial epidemiology of vancomycin-resistant enterococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:1619-28.
142. **Hayashi, H., M. Sakamoto, and Y. Benno.** 2002. Phylogenetic analysis of the human gut microbiota using 16S rDNA clone libraries and strictly anaerobic culture-based methods. *Microbiol. Immunol.* **46**:535-48.
143. **Henning, K. J., H. Delencastre, J. Eagan, N. Boone, A. Brown, M. Chung, N. Wollner, and D. Armstrong.** 1996. Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* on a pediatric oncology ward: duration of stool shedding and incidence of clinical infection. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **15**:848-54.

144. **Hermans, P. E., and M. P. Wilhelm.** 1987. Vancomycin. *Mayo Clin. Proc.* **62**:901-5.
145. **Hiramatsu, K.** 2001. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: a new model of antibiotic resistance. *Lancet Infect. Dis.* **1**:147-55.
146. **Hiramatsu, K., N. Aritaka, H. Hanaki, S. Kawasaki, Y. Hosoda, S. Hori, Y. Fukuchi, and I. Kobayashi.** 1997. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. *Lancet* **350**:1670-3.
147. **Hiramatsu, K., H. Hanaki, T. Ino, K. Yabuta, T. Oguri, and F. C. Tenover.** 1997. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *J. Antimicrob. Chemother.* **40**:135-6.
148. **Hold, G. L., S. E. Pryde, V. J. Russell, E. Furrrie, and H. J. Flint.** 2002. Assessment of microbial diversity in human colonic samples by 16S rDNA sequence analysis. *FEMS Microbiol. Ecol.* **39**:33-39.
149. **Holman, T. R., Z. Wu, B. L. Wanner, and C. T. Walsh.** 1994. Identification of the DNA-binding site for the phosphorylated VanR protein required for vancomycin resistance in *Enterococcus faecium*. *Biochemistry (Mosc).* **33**:4625-31.
150. **Huletsky, A., A. Bernal, A. Cartier, V. Rossbach, M. Boissinot, F. J. Picard, and M. G. Bergeron.** 2002. Genetic linkage of the *vanB2* gene cluster to Tn1549-like transposon in a *Clostridium* sp. Strain isolated from the normal flora of human bowel. Presented at the 102nd General Meeting of the American Society of Microbiology, Salt Lake City, Utah, May 2002.
151. **Jones, R. N.** 2006. Microbiological features of vancomycin in the 21st century: minimum inhibitory concentration creep, bactericidal/static activity, and applied breakpoints to predict clinical outcomes or detect resistant strains. *Clin. Infect. Dis.* **42 Suppl 1**:S13-24.
152. **Karanfil, L. V., M. Murphy, A. Josephson, R. Gaynes, L. Mandel, B. C. Hill, and J. M. Swenson.** 1992. A cluster of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in an intensive care unit. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **13**:195-200.
153. **Kawalec, M., M. Gniadkowski, J. Kedzierska, A. Skotnicki, J. Fiett, and W. Hryniewicz.** 2001. Selection of a teicoplanin-resistant *Enterococcus faecium* mutant during an outbreak caused by vancomycin-resistant enterococci with the VanB phenotype. *J. Clin. Microbiol.* **39**:4274-4282.
154. **Kirst, H. A., D. G. Thompson, and T. I. Nicas.** 1998. Historical yearly usage of vancomycin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:1303-4.

155. **Klare, I., D. Badstubner, C. Konstabel, G. Bohme, H. Claus, and W. Witte.** 1999. Decreased incidence of VanA-type vancomycin-resistant enterococci isolated from poultry meat and from fecal samples of humans in the community after discontinuation of avoparcin usage in animal husbandry. *Microb. Drug Resist.* **5**:45-52.
156. **Kruse, H., and H. Sorum.** 1994. Transfer of multiple drug resistance plasmids between bacteria of diverse origins in natural microenvironments. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:4015-21.
157. **Kuroda, M., H. Kuroda, T. Oshima, F. Takeuchi, H. Mori, and K. Hiramatsu.** 2003. Two-component system VraSR positively modulates the regulation of cell-wall biosynthesis pathway in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* **49**:807-21.
158. **Kuroda, M., K. Kuwahara-Arai, and K. Hiramatsu.** 2000. Identification of the up- and down-regulated genes in vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* strains Mu3 and Mu50 by cDNA differential hybridization method. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **269**:485-90.
159. **Launay, A., S. A. Ballard, P. D. Johnson, M. L. Grayson, and T. Lambert.** 2006. Transfer of vancomycin resistance transposon Tn1549 from *Clostridium symbiosum* to *Enterococcus* spp. in the gut of gnotobiotic mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**:1054-1062.
160. **Leclercq, R.** 1997. Résistance bactérienne aux glycopeptides. *Médecine thérapeutique* **3**:77-85.
161. **Leclercq, R., E. Derlot, J. Duval, and P. Courvalin.** 1988. Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. *N. Engl. J. Med.* **319**:157-161.
162. **Leclercq, R., E. Derlot, M. Weber, J. Duval, and P. Courvalin.** 1989. Transferable vancomycin and teicoplanin resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33**:10-5.
163. **Leclercq, R., S. Dutka-Malen, A. Brisson-Noel, C. Molinas, E. Derlot, M. Arthur, J. Duval, and P. Courvalin.** 1992. Resistance of enterococci to aminoglycosides and glycopeptides. *Clin. Infect. Dis.* **15**:495-501.
164. **Leclercq, R., S. Dutka-Malen, J. Duval, and P. Courvalin.** 1992. Vancomycin resistance gene *vanC* is specific to *Enterococcus gallinarum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36**:2005-8.
165. **Lee, K., K. H. Park, S. H. Jeong, H. S. Lim, J. H. Shin, D. Yong, G. Y. Ha, Y. Chong, and K. group.** 2006. Further increase of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*, amikacin- and fluoroquinolone-resistant *Klebsiella*

- pneumoniae*, and imipenem-resistant *Acinetobacter* spp. in Korea: 2003 KONSAR surveillance. *Yonsei Med. J.* **47**:43-54.
166. **Lee, W. G., and W. Kim.** 2003. Identification of a novel insertion sequence in *vanB2*-containing *Enterococcus faecium*. *Lett. Appl. Microbiol.* **36**:186-90.
 167. **Lesens, O., L. Mihaila, F. Robin, O. Baud, J. P. Romaszko, O. Tourniac, J. M. Constantin, B. Souweine, R. Bonnet, A. Bouvet, J. Beytout, O. Traore, and H. Laurichesse.** 2006. Outbreak of colonization and infection with vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in a French university hospital. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **27**:984-6.
 168. **Ligozzi, M., G. Lo Cascio, and R. Fontana.** 1998. *vanA* gene cluster in a vancomycin-resistant clinical isolate of *Bacillus circulans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:2055-9.
 169. **Livornese, L. L., Jr., S. Dias, C. Samel, B. Romanowski, S. Taylor, P. May, P. Pitsakis, G. Woods, D. Kaye, M. E. Levison, and et al.** 1992. Hospital-acquired infection with vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* transmitted by electronic thermometers. *Ann. Intern. Med.* **117**:112-6.
 170. **Low, D. E., N. Keller, A. Barth, and R. N. Jones.** 2001. Clinical prevalence, antimicrobial susceptibility, and geographic resistance patterns of enterococci: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. *Clin. Infect. Dis.* **32 Suppl 2**:S133-45.
 171. **Lucas, G. M., N. Lechtzin, D. W. Puryear, L. L. Yau, C. W. Flexner, and R. D. Moore.** 1998. Vancomycin-resistant and vancomycin-susceptible enterococcal bacteremia: comparison of clinical features and outcomes. *Clin. Infect. Dis.* **26**:1127-33.
 172. **Maki, H., N. McCallum, M. Bischoff, A. Wada, and B. Berger-Bachi.** 2004. *tcaA* inactivation increases glycopeptide resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:1953-9.
 173. **Malabarba, A., P. Strazzolini, A. Depaoli, M. Landi, M. Berti, and B. Cavalleri.** 1984. Teicoplanin, antibiotics from *Actinoplanes teichomyceticus* nov. sp. VI. Chemical degradation: physico-chemical and biological properties of acid hydrolysis products. *J. Antibiot. (Tokyo)* **37**:988-99.
 174. **Marshall, C. G., G. Broadhead, B. K. Leskiw, and G. D. Wright.** 1997. D-Ala-D-Ala ligases from glycopeptide antibiotic-producing organisms are highly homologous to the enterococcal vancomycin-resistance ligases VanA and VanB. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**:6480-3.

175. **Marshall, C. G., I. A. Lessard, I. Park, and G. D. Wright.** 1998. Glycopeptide antibiotic resistance genes in glycopeptide-producing organisms. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:2215-20.
176. **Marshall, C. G., and G. D. Wright.** 1998. DdlN from vancomycin-producing *Amycolatopsis orientalis* C329.2 is a VanA homologue with D-alanyl-D-lactate ligase activity. *J. Bacteriol.* **180**:5792-5.
177. **Martone, W. J.** 1998. Spread of vancomycin-resistant enterococci: why did it happen in the United States? *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **19**:539-45.
178. **Mascaretti, O. A.** 2003. Bacteria versus antibacterial agents: an integrated approach / Oreste A. Mascaretti. ASM press **chapter 14**:203-216.
179. **Maukonen, J., R. Satokari, J. Matto, H. Soderlund, T. Mattila-Sandholm, and M. Saarela.** 2006. Prevalence and temporal stability of selected clostridial groups in irritable bowel syndrome in relation to predominant faecal bacteria. *J. Med. Microbiol.* **55**:625-33.
180. **McAleese, F., S. W. Wu, K. Sieradzki, P. Dunman, E. Murphy, S. Projan, and A. Tomasz.** 2006. Overexpression of genes of the cell wall stimulon in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* exhibiting vancomycin-intermediate- *S. aureus*-type resistance to vancomycin. *J. Bacteriol.* **188**:1120-33.
181. **McKessar, S. J., A. M. Berry, J. M. Bell, J. D. Turnidge, and J. C. Paton.** 2000. Genetic characterization of *vanG*, a novel vancomycin resistance locus of *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:3224-8.
182. **Messer, J., and P. E. Reynolds.** 1992. Modified peptidoglycan precursors produced by glycopeptide-resistant enterococci. *FEMS Microbiol. Lett.* **73**:195-200.
183. **Mevius, D., L. Devriese, P. Butaye, P. Vandamme, M. Verschure, and K. Veldman.** 1998. Isolation of glycopeptide resistant *Streptococcus gallolyticus* strains with *vanA*, *vanB*, and both *vanA* and *vanB* genotypes from faecal samples of veal calves in The Netherlands. *J. Antimicrob. Chemother.* **42**:275-6.
184. **Milewski, W. M., S. Boyle-Vavra, B. Moreira, C. C. Ebert, and R. S. Daum.** 1996. Overproduction of a 37-kilodalton cytoplasmic protein homologous to NAD⁺-linked D-lactate dehydrogenase associated with vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**:166-72.
185. **Moore, W. E., and L. V. Holdeman.** 1974. Human fecal flora: the normal flora of 20 Japanese-Hawaiians. *Appl. Microbiol.* **27**:961-79.
186. **Moreno, F., P. Gota, C. Crisp, K. Magnon, G. P. Melcher, J. H. Jorgensen, and J. E. Patterson.** 1995. Clinical and molecular epidemiology of vancomycin-

- resistant *Enterococcus faecium* during its emergence in a city in southern Texas. Clin. Infect. Dis. 21:1234-7.
187. **Morris, J. G., Jr., D. K. Shay, J. N. Hebden, R. J. McCarter, Jr., B. E. Perdue, W. Jarvis, J. A. Johnson, T. C. Dowling, L. B. Polish, and R. S. Schwalbe.** 1995. Enterococci resistant to multiple antimicrobial agents, including vancomycin. Establishment of endemicity in a university medical center. Ann. Intern. Med. 123:250-9.
 188. **Moubareck, C., N. Bourgeois, P. Courvalin, and F. Doucet-Populaire.** 2003. Multiple antibiotic resistance gene transfer from animal to human enterococci in the digestive tract of gnotobiotic mice. Antimicrob. Agents Chemother. 47:2993-6.
 189. **Murray, B. E.** 2000. Problems and perils of vancomycin resistant enterococci. Braz. J. Infect. Dis. 4:9-14.
 190. **Murray, B. E.** 2000. Vancomycin-resistant enterococcal infections. N. Engl. J. Med. 342:710-21.
 191. **Nagarajan, R.** 1991. Antibacterial activities and modes of action of vancomycin and related glycopeptides. Antimicrob. Agents Chemother. 35:605-9.
 192. **NARSA.** 2007, The network on antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus*. (en ligne) (<http://narsa.net/control/member/search?repositoryId=99>). (Pages consultées le 24 avril 2007).
 193. **Navarre, W. W., and O. Schneewind.** 1999. Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 63:174-229.
 194. **Navarro, F., and P. Courvalin.** 1994. Analysis of genes encoding D-alanine-D-alanine ligase-related enzymes in *Enterococcus casseliflavus* and *Enterococcus flavescens*. Antimicrob. Agents Chemother. 38:1788-93.
 195. **Nicas, T. I., C. T. Cole, D. A. Preston, A. A. Schabel, and R. Nagarajan.** 1989. Activity of glycopeptides against vancomycin-resistant gram-positive bacteria. Antimicrob. Agents Chemother. 33:1477-81.
 196. **Nicas, T. I., C. Y. Wu, J. N. Hobbs, Jr., D. A. Preston, and N. E. Allen.** 1989. Characterization of vancomycin resistance in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. Antimicrob. Agents Chemother. 33:1121-4.
 197. **Nicoletti, G., G. Schito, G. Fadda, S. Boros, D. Nicolosi, A. Marchese, T. Spanu, A. Pantosti, M. Monaco, G. Rezza, A. Cassone, and E. Garaci.** 2006. Bacterial isolates from severe infections and their antibiotic susceptibility patterns in Italy: a nationwide study in the hospital setting. J. Chemother. 18:589-602.

198. **NNIS.** 2004. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. *Am. J. Infect. Control* **32**:470-85.
199. **Noble, W. C., Z. Virani, and R. G. Cree.** 1992. Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from *Enterococcus faecalis* NCTC 12201 to *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **72**:195-8.
200. **Orberg, P. K., and W. E. Sandine.** 1984. Common occurrence of plasmid DNA and vancomycin resistance in *Leuconostoc* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**:1129-33.
201. **Ostrowsky, B. E., N. C. Clark, C. Thauvin-Eliopoulos, L. Venkataraman, M. H. Samore, F. C. Tenover, G. M. Eliopoulos, R. C. Moellering, Jr., and H. S. Gold.** 1999. A cluster of VanD vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*: molecular characterization and clinical epidemiology. *J. Infect. Dis.* **180**:1177-1185.
202. **Palepou, M. F., A. M. Adebisi, C. H. Tremlett, L. B. Jensen, and N. Woodford.** 1998. Molecular analysis of diverse elements mediating VanA glycopeptide resistance in enterococci. *J. Antimicrob. Chemother.* **42**:605-12.
203. **Pallanza, R., M. Berti, B. P. Goldstein, E. Mapelli, E. Randisi, R. Scotti, and V. Arioli.** 1983. Teichomycin: *in-vitro* and *in-vivo* evaluation in comparison with other antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.* **11**:419-25.
204. **Parenti, F., G. Beretta, M. Berti, and V. Arioli.** 1978. Teichomycins, new antibiotics from *Actinoplanes teichomyceticus* Nov. Sp. I. Description of the producer strain, fermentation studies and biological properties. *J. Antibiot. (Tokyo)* **31**:276-83.
205. **Patel, R.** 2003. Clinical impact of vancomycin-resistant enterococci. *J. Antimicrob. Chemother.* **51 Suppl 3**:13-21.
206. **Patel, R.** 2000. Enterococcal-type glycopeptide resistance genes in non-enterococcal organisms. *FEMS Microbiol. Lett.* **185**:1-7.
207. **Patel, R., K. Piper, F. R. r. Cockerill, J. M. Steckelberg, and A. A. Yousten.** 2000. The biopesticide *Paenibacillus popilliae* has a vancomycin resistance gene cluster homologous to the enterococcal *vanA* vancomycin resistance gene cluster. *Antimicrob Agents Chemother.* **44**:705-709.
208. **Patel, R., J. R. Uhl, P. Kohner, M. K. Hopkins, J. M. Steckelberg, B. Kline, and F. R. Cockerill, 3rd.** 1998. DNA sequence variation within *vanA*, *vanB*, *vanC-1*, and *vanC-2/3* genes of clinical *Enterococcus* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:202-5.

209. **Paulsen, I. T., L. Banerjee, G. S. Myers, K. E. Nelson, R. Seshadri, T. D. Read, D. E. Fouts, J. A. Eisen, S. R. Gill, J. F. Heidelberg, H. Tettelin, R. J. Dodson, L. Umayam, L. Brinkac, M. Beanan, S. Daugherty, R. T. DeBoy, S. Durkin, J. Kolonay, R. Madupu, W. Nelson, J. Vamathevan, B. Tran, J. Upton, T. Hansen, J. Shetty, H. Khouri, T. Utterback, D. Radune, K. A. Ketchum, B. A. Dougherty, and C. M. Fraser.** 2003. Role of mobile DNA in the evolution of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Science* **299**:2071-4.
210. **Pegues, D. A., C. F. Pegues, P. L. Hibberd, D. S. Ford, and D. C. Hooper.** 1997. Emergence and dissemination of a highly vancomycin-resistant *vanA* strain of *Enterococcus faecium* at a large teaching hospital. *J. Clin. Microbiol.* **35**:1565-70.
211. **Périchon, B., B. Casadewall, P. Reynolds, and P. Courvalin.** 2000. Glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* BM4416 is a VanD-type strain with an impaired D-Alanine:D-Alanine ligase. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:1346-1348.
212. **Périchon, B., and P. Courvalin.** 2004. Heterologous expression of the enterococcal *vanA* operon in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:4281-5.
213. **Périchon, B., P. Reynolds, and P. Courvalin.** 1997. VanD-type glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* BM4339. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:2016-2018.
214. **Peta, M., E. Carretto, D. Barbarini, A. Zamperoni, L. Carnevale, L. Perversi, M. Pagani, M. G. Bonora, R. Fontana, P. Marone, and M. Langer.** 2006. Outbreak of vancomycin-resistant *Enterococcus* spp. in an Italian general intensive care unit. *Clin Microbiol Infect* **12**:163-9.
215. **Pittet, D., S. Hugonnet, S. Harbarth, P. Mourouga, V. Sauvan, S. Touveneau, and T. V. Perneger.** 2000. Effectiveness of a hospital-wide programme to improve compliance with hand hygiene. *Infection Control Programme. Lancet* **356**:1307-12.
216. **Pontius, L. T., and D. B. Clewell.** 1992. Conjugative transfer of *Enterococcus faecalis* plasmid pAD1: nucleotide sequence and transcriptional fusion analysis of a region involved in positive regulation. *J. Bacteriol.* **174**:3152-60.
217. **Pontius, L. T., and D. B. Clewell.** 1992. Regulation of the pAD1-encoded sex pheromone response in *Enterococcus faecalis*: nucleotide sequence analysis of *traA*. *J. Bacteriol.* **174**:1821-7.
218. **Pootoolal, J., J. Neu, and G. D. Wright.** 2002. Glycopeptide antibiotic resistance. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **42**:381-408.
219. **Pootoolal, J., M. G. Thomas, C. G. Marshall, J. M. Neu, B. K. Hubbard, C. T. Walsh, and G. D. Wright.** 2002. Assembling the glycopeptide antibiotic scaffold:

- The biosynthesis of A47934 from *Streptomyces toyocaensis* NRRL15009. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **99**:8962-7.
220. **Power, E. G., Y. H. Abdulla, H. G. Talsania, W. Spice, S. Aathithan, and G. L. French.** 1995. *vanA* genes in vancomycin-resistant clinical isolates of *Oerskovia turbata* and *Arcanobacterium (Corynebacterium) haemolyticum*. J. Antimicrob. Chemother. **36**:595-606.
 221. **Poyart, C., C. Pierre, G. Quesne, B. Pron, P. Berche, and P. Trieu-Cuot.** 1997. Emergence of vancomycin resistance in the genus *Streptococcus*: characterization of a *vanB* transferable determinant in *Streptococcus bovis*. Antimicrob. Agents Chemother. **41**:24-9.
 222. **Quintiliani, R., Jr., and P. Courvalin.** 1996. Characterization of Tn1547, a composite transposon flanked by the IS16 and IS256-like elements, that confers vancomycin resistance in *Enterococcus faecalis* BM4281. Gene **172**:1-8.
 223. **Quintiliani, R., Jr., and P. Courvalin.** 1994. Conjugal transfer of the vancomycin resistance determinant *vanB* between enterococci involves the movement of large genetic elements from chromosome to chromosome. FEMS Microbiol. Lett. **119**:359-63.
 224. **Quintiliani, R., Jr., S. Evers, and P. Courvalin.** 1993. The *vanB* gene confers various levels of self-transferable resistance to vancomycin in enterococci. J. Infect. Dis. **167**:1220-3.
 225. **Reynolds, P. E.** 1989. Structure, biochemistry and mechanism of action of glycopeptide antibiotics. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **8**:943-50.
 226. **Reynolds, P. E., O. H. Ambur, B. Casadewall, and P. Courvalin.** 2001. The VanY(D) DD-carboxypeptidase of *Enterococcus faecium* BM4339 is a penicillin-binding protein. Microbiology **147**:2571-8.
 227. **Reynolds, P. E., C. A. Arias, and P. Courvalin.** 1999. Gene *vanXYC* encodes D,D-dipeptidase (VanX) and D,D-carboxypeptidase (VanY) activities in vancomycin-resistant *Enterococcus gallinarum* BM4174. Mol. Microbiol. **34**:341-9.
 228. **Reynolds, P. E., and P. Courvalin.** 2005. Vancomycin resistance in enterococci due to synthesis of precursors terminating in D-alanyl-D-serine. Antimicrob. Agents Chemother. **49**:21-5.
 229. **Reynolds, P. E., F. Depardieu, S. Dutka-Malen, M. Arthur, and P. Courvalin.** 1994. Glycopeptide resistance mediated by enterococcal transposon Tn1546 requires production of VanX for hydrolysis of D-alanyl-D-alanine. Mol. Microbiol. **13**:1065-70.

230. **Reynolds, P. E., H. A. Snaith, A. J. Maguire, S. Dutka-Malen, and P. Courvalin.** 1994. Analysis of peptidoglycan precursors in vancomycin-resistant *Enterococcus gallinarum* BM4174. *Biochem. J.* **301 (Pt 1):**5-8.
231. **Rice, L. B., L. L. Carias, C. L. Donskey, and S. D. Rudin.** 1998. Transferable, plasmid-mediated *vanB*-type glycopeptide resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42:**963-964.
232. **Rippere, K., R. Patel, J. R. Uhl, K. E. Piper, J. M. Steckelberg, B. C. Kline, F. R. Cockerill, 3rd, and A. A. Yousten.** 1998. DNA sequence resembling *vanA* and *vanB* in the vancomycin-resistant biopesticide *Bacillus popilliae*. *J. Infect. Dis.* **178:**584-8.
233. **Rosato, A., J. Pierre, D. Billot-Klein, A. Buu-Hoi, and L. Gutmann.** 1995. Inducible and constitutive expression of resistance to glycopeptides and vancomycin dependence in glycopeptide-resistant *Enterococcus avium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39:**830-3.
234. **Rotschafer, J. C., K. Crossley, D. E. Zaske, K. Mead, R. J. Sawchuk, and L. D. Solem.** 1982. Pharmacokinetics of vancomycin: observations in 28 patients and dosage recommendations. *Antimicrob. Agents Chemother.* **22:**391-4.
235. **Ruef, C.** 2004. Epidemiology and clinical impact of glycopeptide resistance in *Staphylococcus aureus*. *Infection* **32:**315-27.
236. **Sakoulas, G., G. M. Eliopoulos, R. C. Moellering, Jr., R. P. Novick, L. Venkataraman, C. Wennersten, P. C. DeGirolami, M. J. Schwaber, and H. S. Gold.** 2003. *Staphylococcus aureus* accessory gene regulator (*agr*) group II: is there a relationship to the development of intermediate-level glycopeptide resistance? *J. Infect. Dis.* **187:**929-38.
237. **Salyers, A. A., A. Gupta, and Y. Wang.** 2004. Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotic resistance genes. *Trends. Microbiol.* **12:**412-416.
238. **Salyers, A. A., K. Moon, and M. S. Schlessinger.** 2007. The Human Intestinal Tract-a Hotbed of Resistance Gene Transfer? Part I. *Clin. Microbiol. Newsl.* **29:**17-21.
239. **Salyers, A. A., K. Moon, and M. S. Schlessinger.** 2007. The Human Intestinal Tract-a Hotbed of Resistance Gene Transfer? Part II. *Clin. Microbiol. Newsl.* **29:**25-30.
240. **Schwalbe, R. S., J. T. Stapleton, and P. H. Gilligan.** 1987. Emergence of vancomycin resistance in coagulase-negative staphylococci. *N. Engl. J. Med.* **316:**927-31.

241. **Sebahia, M., B. W. Wren, P. Mullany, N. F. Fairweather, N. Minton, R. Stabler, N. R. Thomson, A. P. Roberts, A. M. Cerdeno-Tarraga, H. Wang, M. T. Holden, A. Wright, C. Churcher, M. A. Quail, S. Baker, N. Bason, K. Brooks, T. Chillingworth, A. Cronin, P. Davis, L. Dowd, A. Fraser, T. Feltwell, Z. Hance, S. Holroyd, K. Jagels, S. Moule, K. Mungall, C. Price, E. Rabinowitsch, S. Sharp, M. Simmonds, K. Stevens, L. Unwin, S. Whithead, B. Dupuy, G. Dougan, B. Barrell, and J. Parkhill.** 2006. The multidrug-resistant human pathogen *Clostridium difficile* has a highly mobile, mosaic genome. *Nat. Genet.* **38**:779-786.
242. **Shlaes, D. M., J. H. Shlaes, S. Vincent, L. Etter, P. D. Fey, and R. V. Goering.** 1993. Teicoplanin-resistant *Staphylococcus aureus* expresses a novel membrane protein and increases expression of penicillin-binding protein 2 complex. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**:2432-7.
243. **Shoemaker, N. B., H. Vlamakis, K. Hayes, and A. A. Salyers.** 2001. Evidence for extensive resistance gene transfer among *Bacteroides* spp. and among *Bacteroides* and other genera in the human colon. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:561-8.
244. **Sieradzki, K., T. Leski, J. Dick, L. Borio, and A. Tomasz.** 2003. Evolution of a vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* strain *in vivo*: multiple changes in the antibiotic resistance phenotypes of a single lineage of methicillin-resistant *S. aureus* under the impact of antibiotics administered for chemotherapy. *J. Clin. Microbiol.* **41**:1687-93.
245. **Simjee, S., D. G. White, P. F. McDermott, D. D. Wagner, M. J. Zervos, S. M. Donabedian, L. L. English, J. R. Hayes, and R. D. Walker.** 2002. Characterization of Tn1546 in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolated from canine urinary tract infections: evidence of gene exchange between human and animal enterococci. *J. Clin. Microbiol.* **40**:4659-65.
246. **Slaughter, S., M. K. Hayden, C. Nathan, T. C. Hu, T. Rice, J. Van Voorhis, M. Matushek, C. Franklin, and R. A. Weinstein.** 1996. A comparison of the effect of universal use of gloves and gowns with that of glove use alone on acquisition of vancomycin-resistant enterococci in a medical intensive care unit. *Ann. Intern. Med.* **125**:448-56.
247. **Smith, T. L., M. L. Pearson, K. R. Wilcox, C. Cruz, M. V. Lancaster, B. Robinson-Dunn, F. C. Tenover, M. J. Zervos, J. D. Band, E. White, and W. R. Jarvis.** 1999. Emergence of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. Glycopeptide-Intermediate *Staphylococcus aureus* Working Group. *N. Engl. J. Med.* **340**:493-501.
248. **Srinivasan, A., J. D. Dick, and T. M. Perl.** 2002. Vancomycin resistance in staphylococci. *Clin. Microbiol. Rev.* **15**:430-8.

249. **Stackebrandt, E., I. Kramer, J. Swiderski, and H. Hippe.** 1999. Phylogenetic basis for a taxonomic dissection of the genus *Clostridium*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **24**:253-8.
250. **Stinear, T. P., D. C. Olden, P. D. Johnson, J. K. Davies, and M. L. Grayson.** 2001. Enterococcal *vanB* resistance locus in anaerobic bacteria in human faeces. *Lancet* **357**:855-856.
251. **Stone, S., L. Teare, and B. Cookson.** 2001. Guiding hands of our teachers. Hand-hygiene Liaison Group. *Lancet* **357**:479-80.
252. **Suau, A., R. Bonnet, M. Sutren, J. J. Godon, G. R. Gibson, M. D. Collins, and J. Dore.** 1999. Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:4799-807.
253. **Swenson, J. M., R. R. Facklam, and C. Thornsberry.** 1990. Antimicrobial susceptibility of vancomycin-resistant *Leuconostoc*, *Pediococcus*, and *Lactobacillus* species. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**:543-9.
254. **Tancrede, C.** 1992. Role of human microflora in health and disease. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **11**:1012-5.
255. **Tanimoto, K., T. Nomura, H. Maruyama, H. Tomita, N. Shibata, Y. Arakawa, and Y. Ike.** 2006. First VanD-Type vancomycin-resistant *Enterococcus raffinosus* isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**:3966-3967.
256. **Teare, L., B. Cookson, and S. Stone.** 2001. Hand hygiene. *BMJ* **323**:411-2.
257. **Tenover, F. C., J. W. Biddle, and M. V. Lancaster.** 2001. Increasing resistance to vancomycin and other glycopeptides in *Staphylococcus aureus*. *Emerg. Infect. Dis.* **7**:327-32.
258. **Tenover, F. C., and L. C. McDonald.** 2005. Vancomycin-resistant staphylococci and enterococci: epidemiology and control. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **18**:300-5.
259. **Tenover, F. C., L. M. Weigel, P. C. Appelbaum, L. K. McDougal, J. Chaitram, S. McAllister, N. Clark, G. Killgore, C. M. O'Hara, L. Jevitt, J. B. Patel, and B. Bozdogan.** 2004. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate from a patient in Pennsylvania. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:275-80.
260. **Tokars, J. I., S. Satake, D. Rimland, L. Carson, E. R. Miller, E. Killum, R. L. Sinkowitz-Cochran, M. J. Arduino, F. C. Tenover, B. Marston, and W. R. Jarvis.** 1999. The prevalence of colonization with vancomycin-resistant *Enterococcus* at a Veterans' Affairs institution. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **20**:171-5.

261. **Tornieporth, N. G., R. B. Roberts, J. John, A. Hafner, and L. W. Riley.** 1996. Risk factors associated with vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* infection or colonization in 145 matched case patients and control patients. *Clin. Infect. Dis.* **23**:767-72.
262. **Torres, C., J. A. Reguera, M. J. Sanmartin, J. C. Perez-Diaz, and F. Baquero.** 1994. *vanA*-mediated vancomycin-resistant *Enterococcus* spp. in sewage. *J. Antimicrob. Chemother.* **33**:553-61.
263. **Trieu-Cuot, P., M. Arthur, and P. Courvalin.** 1987. Origin, evolution and dissemination of antibiotic resistance genes. *Microbiol. Sci.* **4**:263-6.
264. **Tynkkynen, S., K. V. Singh, and P. Varmanen.** 1998. Vancomycin resistance factor of *Lactobacillus rhamnosus* GG in relation to enterococcal vancomycin resistance (*van*) genes. *Int. J. Food Microbiol.* **41**:195-204.
265. **Umeda, A., F. Garnier, P. Courvalin, and M. Galimand.** 2002. Association between the *vanB2* glycopeptide resistance operon and Tn1549 in enterococci from France. *J. Antimicrob. Chemother.* **50**:253-6.
266. **Uttley, A. H., C. H. Collins, J. Naidoo, and R. C. George.** 1988. Vancomycin-resistant enterococci. *Lancet* **1**:57-8.
267. **Uttley, A. H., R. C. George, J. Naidoo, N. Woodford, A. P. Johnson, C. H. Collins, D. Morrison, A. J. Gilfillan, L. E. Fitch, and J. Heptonstall.** 1989. High-level vancomycin-resistant enterococci causing hospital infections. *Epidemiol. Infect.* **103**:173-81.
268. **Van Caesele, P., S. Giercke, J. Wylie, D. Boyd, M. Mulvey, S. Amin, and M. Ofner-Agostini.** 2001. Identification of the first vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* harbouring *vanE* in Canada. *Can. Commun. Dis. Rep.* **27**:101-4.
269. **van den Bogaard, A. E., N. Bruinsma, and E. E. Stobberingh.** 2000. The effect of banning avoparcin on VRE carriage in The Netherlands. *J. Antimicrob. Chemother.* **46**:146-8.
270. **Walsh, C.** 2003. Antibiotics: actions, origins, resistance. ASM press **chapter 3**:p.23-49.
271. **Walsh, C. T., S. L. Fisher, I. S. Park, M. Prahalad, and Z. Wu.** 1996. Bacterial resistance to vancomycin: five genes and one missing hydrogen bond tell the story. *Chem. Biol.* **3**:21-8.
272. **Walsh, T. R., and R. A. Howe.** 2002. The prevalence and mechanisms of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Annu. Rev. Microbiol.* **56**:657-75.

273. **Weigel, L. M., D. B. Clewell, S. R. Gill, N. C. Clark, L. K. McDougal, S. E. Flannagan, J. F. Kolonay, J. Shetty, G. E. Killgore, and F. C. Tenover.** 2003. Genetic analysis of a high-level vancomycin-resistant isolate of *Staphylococcus aureus*. *Science* **302**:1569-71.
274. **Weinstein, J. W., M. Roe, M. Towns, L. Sanders, J. J. Thorpe, G. R. Corey, and D. J. Sexton.** 1996. Resistant enterococci: a prospective study of prevalence, incidence, and factors associated with colonization in a university hospital. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **17**:36-41.
275. **Willems, R. J., J. Top, N. van den Braak, A. van Belkum, D. J. Mevius, G. Hendriks, M. van Santen-Verheuevel, and J. D. van Embden.** 1999. Molecular diversity and evolutionary relationships of Tn1546-like elements in enterococci from humans and animals. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:483-91.
276. **Willey, B. M., A. J. McGeer, M. A. Ostrowski, B. N. Kreiswirth, and D. E. Low.** 1994. The use of molecular typing techniques in the epidemiologic investigation of resistant enterococci. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **15**:548-56.
277. **Wilson, A. P., M. D. O'Hare, D. Felmingham, and R. N. Gruneberg.** 1986. Teicoplanin-resistant coagulase-negative *staphylococcus*. *Lancet* **2**:973.
278. **Witte, W.** 2000. Selective pressure by antibiotic use in livestock. *Int. J. Antimicrob. Agents* **16 Suppl 1**:S19-24.
279. **Woodford, N.** 2001. Epidemiology of the genetic elements responsible for acquired glycopeptide resistance in enterococci. *Microb. Drug Resist.* **7**:229-36.
280. **Woodford, N.** 1998. Glycopeptide-resistant enterococci: a decade of experience. *J. Med. Microbiol.* **47**:849-62.
281. **Woodford, N., A. M. Adebisi, M. F. Palepou, and B. D. Cookson.** 1998. Diversity of VanA glycopeptide resistance elements in enterococci from humans and nonhuman sources. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:502-8.
282. **Woodford, N., A. P. Johnson, D. Morrison, and D. C. Speller.** 1995. Current perspectives on glycopeptide resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **8**:585-615.
283. **Woodford, N., B. L. Jones, Z. Baccus, H. A. Ludlam, and D. F. Brown.** 1995. Linkage of vancomycin and high-level gentamicin resistance genes on the same plasmid in a clinical isolate of *Enterococcus faecalis*. *J. Antimicrob. Chemother.* **35**:179-84.
284. **Woodford, N., D. Morrison, A. P. Johnson, A. C. Bateman, J. G. Hastings, T. S. Elliott, and B. Cookson.** 1995. Plasmid-mediated VanB glycopeptide resistance in enterococci. *Microb. Drug Resist.* **1**:235-40.

285. **Wright, G. D., T. R. Holman, and C. T. Walsh.** 1993. Purification and characterization of VanR and the cytosolic domain of VanS: a two-component regulatory system required for vancomycin resistance in *Enterococcus faecium* BM4147. *Biochemistry (Mosc)*. **32**:5057-63.
286. **Wright, G. D., C. Molinas, M. Arthur, P. Courvalin, and C. T. Walsh.** 1992. Characterization of vanY, a DD-carboxypeptidase from vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* BM4147. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36**:1514-8.
287. **Wu, Z., G. D. Wright, and C. T. Walsh.** 1995. Overexpression, purification, and characterization of VanX, a D-, D-dipeptidase which is essential for vancomycin resistance in *Enterococcus faecium* BM4147. *Biochemistry (Mosc)*. **34**:2455-63.
288. **Zimmermann, A. E., B. G. Katona, and K. I. Plaisance.** 1995. Association of vancomycin serum concentrations with outcomes in patients with gram-positive bacteremia. *Pharmacotherapy* **15**:85-91.
289. **Zirakzadeh, A., and R. Patel.** 2006. Vancomycin-resistant enterococci: colonization, infection, detection, and treatment. *Mayo Clin. Proc.* **81**:529-36.