

Université de Limoges
Faculté de Pharmacie

Année 2017

Thèse N°

Thèse pour le diplôme d'Etat de docteur en Pharmacie

présentée et soutenue publiquement
le 25 avril 2017
par

Jules Voincon

né le 30 septembre 1990, à Mulhouse

Série de cas de bactériémies à *Atopobium* sp et revue de la littérature

A propos de huit cas survenus au CHU de Toulouse

Maitre de thèse : M le Docteur Damien DUBOIS

Examineurs de la thèse :

M^{me} le Professeur Sylvie ROGEZ
M. le Professeur Patrice MASSIP
M^{me} le Docteur Danielle CLAVE
M. le Docteur Damien DUBOIS

Président
Juge
Juge
Juge



Université de Limoges
Faculté de Pharmacie

Année 2017

Thèse N°

Thèse pour le diplôme d'Etat de docteur en Pharmacie

présentée et soutenue publiquement

le 25 avril 2017

par

Jules Voincon

né(e) le 30 septembre 1990, à Mulhouse

Série de cas de bactériémies à Atopobium et revue de la littérature
A propos de huit cas survenus au CHU de Toulouse

Maitre de thèse : M. le Docteur Damien DUBOIS

Examineurs de la thèse :

M^{me} le Professeur Sylvie ROGEZ

M le Professeur Patrice MASSIP

M^{me} le Docteur Danielle CLAVE

M le Docteur Damien DUBOIS

Président

Juge

Juge

Juge



Liste des enseignants

PROFESSEURS :

BATTU Serge	CHIMIE ANALYTIQUE
CARDOT Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
DESMOULIERE Alexis	PHYSIOLOGIE
DUROUX Jean-Luc	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE
FAGNERE Catherine	CHIMIE THERAPEUTIQUE - CHIMIE ORGANIQUE
LIAGRE Bertrand	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
MAMBU Lengo	PHARMACOGNOSIE
ROUSSEAU Annick	BIOSTATISTIQUE
TROUILLAS Patrick	CHIMIE PHYSIQUE - PHYSIQUE
VIANA Marylène	PHARMACOTECHNIE

PROFESSEURS DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES :

MOESCH Christian	HYGIENE HYDROLOGIE ENVIRONNEMENT
PICARD Nicolas	PHARMACOLOGIE
ROGEZ Sylvie	BACTERIOLOGIE ET VIROLOGIE
SAINT-MARCOUX Franck	TOXICOLOGIE

ASSISTANT HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES :

CHAUZEIX Jasmine	HEMATOLOGIE
-------------------------	-------------

MAITRES DE CONFERENCES :

BASLY Jean-Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
BEAUBRUN-GIRY Karine	PHARMACOTECHNIE
BILLET Fabrice	PHYSIOLOGIE



CALLISTE Claude	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE
CLEDAT Dominique	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
COMBY Francis	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
COURTIOUX Bertrand	PHARMACOLOGIE, PARASITOLOGIE
DELEBASSEE Sylvie	MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE-IMMUNOLOGIE
DEMIOT Claire-Elise	PHARMACOLOGIE
FROISSARD Didier	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE
GRIMAUD Gaëlle	CHIMIE ANALYTIQUE ET CONTROLE DU MEDICAMENT
JAMBUT Anne-Catherine	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
LABROUSSE Pascal	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE
LEGER David	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
MARION-THORE Sandrine	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
MARRE-FOURNIER Françoise	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
MERCIER Aurélien	PARASITOLOGIE
MILLOT Marion	PHARMACOGNOSIE
MOREAU Jeanne	MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE-IMMUNOLOGIE
MUSUAMBA TSHINANU Flora	PHARMACOLOGIE
PASCAUD Patricia	PHARMACIE GALENIQUE – BIOMATERIAUX CERAMIQUES
POUGET Christelle	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
VIGNOLES Philippe	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE

ATTACHE TEMPORAIRE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE :

FABRE Gabin	(01.09.2016 au 31.08.2017) CHIMIE PHYSIQUE - PHYSIQUE
--------------------	--



LAVERDET Betty

(1.09.2016 au 31.08.2017)
PHARMACIE GALENIQUE

PHAM Thanh Nhat

(1.09.2016 au 31.08.2017)
CHIMIE ORGANIQUE - BIOCHIMIE

PROFESSEURS EMERITES :

BUXERAUD Jacques

DREYFUSS Gilles

LOUDART Nicole



Remerciements

Au Professeur Sylvie Rogez,

Je vous remercie d'avoir accepté de présider ce jury. Merci pour vos conseils concernant l'organisation de ce travail, et également pour votre aide précieuse, votre écoute, et votre soutien dans la réalisation de mon projet.

Au Docteur Danielle Clavé,

Merci d'avoir accepté de participer à ce jury. Je suis heureux d'avoir pu bénéficier de vos enseignements, et de votre expérience en bactériologie, ainsi que de votre bonne humeur quotidienne.

Au Professeur Patrice Massip,

Je vous remercie d'avoir si gentiment accepté de participer à ce jury et d'y apporter votre expertise clinique.

Au Docteur Damien Dubois,

Merci de m'avoir fait confiance et de m'avoir proposé ce sujet. J'ai apprécié ta disponibilité malgré ton emploi du temps chargé, ta gentillesse, tes conseils, et ta rigueur qui m'ont permis de mener à bien ce travail.



A mes parents, qui ont cru en moi et m'ont toujours soutenus, sans limites, c'est grâce à vous si je suis arrivé jusqu'ici.

A mon frère, un peu têtu et fonceur, artiste et passionné, on n'est pas toujours d'accord mais tu me fais énormément rire, et je suis fier d'avancer à tes côtés, persuadé que tu iras loin.

A Alice-Anne, mon amour, tu es parfaite et ton soutien est infini, merci pour tout.

A Christelle, merci de m'accompagner depuis toujours, tu n'étais pas obligé de me suivre jusqu'à Toulouse mais ça me touche.

A mon coloc', mon ami Arnaud, pour qui la pharmacie n'a aucun secret, merci pour tous ces bons moments passés ensemble notamment pendant le concours de l'internat.

A mes amis du Lot et Garonne Joachim, Elie, Colin, Morgane, Estelle, merci pour tout.

A tous les internes et bien plus encore qui ont été formidables, partenaires de travail, de soirées, de sorties, ou de voyage, camarades ou amis, Shérazade, François, Antho, Louis-Thomas, Etienne, Cédric, Elodie, Manu, Morgane, Laurie et Sam, Margaux, Cécile, Camille Ciccone, Julien G, Julien L, Camille G., Thomas, Brice, John, Jérôme, Laura, Catherine, Camille Chagneau, Tiphaine, Marion, JK, Agnès, les Yohan, Grégoire, Hélène, Hadrien, Carole, Noémie, Medhi, Martial, Etienne, Nico, Alix, Guigui, Julian, qui ont partagés ces belles années d'internat.

Aux différents services qui m'ont accueilli, aux praticiens et aux techniciens du laboratoire de bactériologie, de virologie et d'hygiène, aux infectiologues, ce fut un plaisir de travailler à vos côtés, d'échanger avec vous, d'apprendre chaque jour.

Bien que je n'ai pas choisi cette voie, merci au Docteur Sophie Voisin et au Professeur Pierre Sié de m'avoir fait partager leur passion pour l'hémostase.

A Séverine et à tous les techniciens de biologie moléculaire qui m'ont patiemment expliqué et permis de réaliser mes manip's.

Et comme avec elle rien n'est impossible, merci à Muriel, la secrétaire du laboratoire de bactériologie.



Droits d'auteurs

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :

« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »

disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>



Table des matières

I. Objectif de ce travail	4
II. Revue de la littérature	6
II.1. Généralités sur le genre <i>Atopobium</i>	6
II.2. Morphologie :	6
II.3. Culture :	7
II.4. Caractères biochimiques.....	7
II.5. <i>Atopobium vaginae</i> et vaginose	9
II.5.1. Généralités sur la vaginose bactérienne.....	9
II.5.2. Association de <i>Atopobium vaginae</i> et de la vaginose bactérienne.....	10
II.5.3. Diagnostic de vaginose par quantification moléculaire de <i>Atopobium vaginae</i>	12
II.5.4. <i>Atopobium vaginae</i> et traitement de la vaginose	15
II.6. <i>Atopobium vaginae</i> et infections génitales hautes féminines.....	17
II.7. <i>Atopobium</i> spp dans les flores ORL et digestive.	19
II.7.1. <i>Atopobium parvulum</i> et halitose.....	19
II.7.2. <i>Atopobium rimae</i> et <i>Atopobium parvulum</i> en pathologies dentaires.....	19
II.7.3. <i>Atopobium parvulum</i> et maladie de Crohn.....	20
II.8. Sensibilité aux antibiotiques	21
III. Analyse de 8 cas de bactériémies à <i>Atopobium</i>	24
III.1. Article.....	24
III.2. Complément de l'article.....	37
III.2.1. Sélection des bactériémies.....	37
III.2.2. Aspect macroscopique et microscopique des sept isolats de <i>Atopobium</i>	38
III.2.3. Identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF.....	41
III.2.3.1 Principe.....	41
III.2.3.2 Identification et règles d'interprétation :	42
III.2.3.3 Réidentification de souches par spectrométrie de masse.....	43
III.2.4. Confirmation de l'identification par séquençage.....	44
III.2.4.1 Généralités sur le gène de l'ARN ribosomal 16S.....	44
III.2.4.2 Critères pour l'identification bactérienne.....	45
III.2.4.3 Choix des amorces :	45
III.2.4.4 Alignement des séquences et détermination de l'identification	46
III.2.4.5 Création d'un arbre phylogénétique	47
III.2.5. Détermination de la sensibilité aux antibiotiques	49
IV. Conclusion.....	51
Références bibliographiques	53
Serment de Galien	62



Table des illustrations

Figure 1 : Concentrations bactériennes obtenues par real time PCR sur 20 échantillons de femmes présentant une vaginose bactérienne (à gauche) et 167 échantillons de femmes présentant une flore génitale normale d'après le score de Nugent (à droite).	11
Figure 2 Présence d'une Clue cell (à gauche ; cellules épithéliale recouverte par de petits bacilles Gram variable, bords non visibles) et d'une cellule épithéliale vaginale normale (à droite).	16
Figure 3 Colonies sur gélose au sang après 72h d'incubation en anaérobiose : loupe binoculaire X10.....	39
Figure 4 Coloration de Gram, Microscope (X 1000).....	40
Figure 5 : Principe de fonctionnement du MALDI TOF-MS.	42
Figure 6 Représentation schématique du gène de l'ARN 16S avec les amorces utilisées pour le séquençage.	45
Figure 7 Arbre phylogénétique d' <i>Atopobium spp.</i>	48
Figure 8 : Schéma d'un epsilomètre.	50



Table des tableaux

Tableau 1 : Tests biochimiques distinguant <i>A. vaginae</i> , <i>A. minutum</i> , <i>A. parvulum</i> et <i>A. rimae</i>	8
Tableau 2 : Système de calcul du score de Nugent.	10
Tableau 3 Performances rapportées de la recherche de <i>A. vaginae</i> par biologie moléculaire pour le diagnostic de vaginose	14
Tableau 4 CMI des souches d' <i>Atopobium</i> rapportées dans la littérature	22
Tableau 5 Résultats des identifications par spectrométrie de masse.	44



I. Objectif de ce travail

Depuis la mise en place de la spectrométrie de masse MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation-Time of Flight) pour l'identification bactérienne en routine dans le laboratoire de Bactériologie-Hygiène du CHU de Toulouse en avril 2014, nous avons observé 8 bactériémies à *Atopobium* sp. Ce genre de bactéries à Gram positif anaérobies strictes a été rarement rapporté comme responsable de bactériémies et d'infections humaines en général, hormis dans le contexte de vaginose bactérienne. La signification clinique d'une bactériémie à *Atopobium* reste peu décrite avec 7 cas rapportés seulement.

Des difficultés d'identification de ces bactéries par méthodes conventionnelles ont été rapportées dans la littérature, notamment en raison de la quasi-absence de ces espèces dans les bases de données des galeries biochimiques d'identification commerciales. Ceci pourrait expliquer la très faible fréquence d'isolement de ce genre bactérien en pathologie humaine d'après la littérature et avant l'utilisation de la spectrométrie de masse au CHU de Toulouse. De plus, certaines espèces comme *Atopobium vaginae* semblent avoir la particularité d'être résistantes au métronidazole, antibiotique habituellement actif sur les bactéries anaérobies.

Nous avons décidé d'étudier la présentation clinique de ces différents cas de bactériémies et de déterminer la sensibilité aux antibiotiques des souches en cause, afin de documenter la signification d'hémocultures positives à *Atopobium* sp d'étayer la pathogénicité et la sensibilité aux antibiotiques de ces espèces.

Afin de tenter d'expliquer l'occurrence inhabituelle de ces bactériémies et partant de l'hypothèse que celle-ci est due à des problèmes d'identification par méthodes biochimiques antérieurement, nous avons réidentifié par spectrométrie de masse MALDI-TOF des souches de bactéries à Gram positif anaérobies ayant un aspect à la coloration de Gram compatible avec le genre *Atopobium*, identifiées initialement uniquement au niveau du genre et isolées d'hémocultures entre 2012 et avril 2014, toutes les souches d'hémocultures étant conservées au laboratoire pendant 5 ans.

Ce travail est présenté sous la forme d'un manuscrit en langue anglaise pour soumission à publication à un journal international, et est complété de données de matériel et méthodes

ainsi que de résultats en langue française. Notre rapport est précédé d'une revue bibliographique sur le genre *Atopobium*.



II. Revue de la littérature

II.1. Généralités sur le genre *Atopobium*

Le genre *Atopobium* fut créé en 1993 par Olsen *et al.* [1] pour reclasser plusieurs espèces, *Lactobacillus minutus*, *Lactobacillus rimae* et *Streptococcus parvulus*, sous le nom d'*A. minutum*, *A. rimae* et *A. parvulum* ; en 1998, *Eubacterium fossor* fut reclassé en *A. fossor* par Kagayema *et al* [2], grâce à l'étude phylogénétique de ces bactéries par séquençage du gène de l'ARN 16S. *A. vaginae* a été isolé pour la première fois d'un prélèvement vaginal en 1999 par Jovita *et al* [3]. L'espèce la plus récemment décrite est *A. deltae*, isolée en 2014 dans les hémocultures d'un patient présentant une gangrène de Fournier par Cools *et al* [4]. Aujourd'hui, le genre *Atopobium* est ainsi constitué de 6 espèces : *A. minutum*, *A. parvulum*, *A. rimae*, *A. vaginae*, *A. deltae* et *A. fossor*.

Le genre *Atopobium* est constitué de bactéries à Gram positif, productrices d'acide lactique, appartenant à la famille des *Atopobiaceae* [5], incluse dans le phylum des *Actinobacteria* qui regroupe des bactéries pathogènes d'intérêt médical (*Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Tropheryma*, et *Propionibacterium*) mais aussi de nombreuses espèces saprophytes de l'environnement ou commensaux de l'homme ou l'animal comme *Lactobacillus* [6]. A l'exception de *A. fossor* retrouvé uniquement dans la flore ORL des chevaux [2], les autres espèces de *Atopobium* spp sont présentes chez l'homme dans les flores ORL, digestive et vaginale, avec une répartition différente en fonction des espèces.

Atopobium spp présentent la caractéristique d'avoir un génome avec un faible contenu en G+C (entre 39 et 45%) contrairement aux autres bactéries du phylum des *Actinobacteria* [4].

II.2. Morphologie :

Le genre *Atopobium* inclut des bactéries à Gram positif, non sporulées et non mobiles. Leur aspect au Gram est variable en fonction des espèces. *A. rimae*, *A. minutum*, *A. deltae* [4] et *A. fossor* [2] ont l'aspect de petits bacilles (0.9-1.5 µm) effilés, seuls ou par paires. *A. vaginae* et *A. parvulum* ont l'aspect de petits cocci de 0.3-0.6 µm pour *A. parvulum* jusqu'à 0.9 µm

pour *A. vaginae*. Ils sont seuls, par paires ou forment de courtes chainettes, *A. parvulum* pouvant apparaître en amas.

II.3. Culture :

Les espèces du genre *Atopobium* sont des bactéries exigeantes. Elles sont anaérobies stricts et poussent sur gélose Columbia additionnée de 5% de sang de mouton, sur gélose Brucella à 5% de sang de mouton additionnée d'hémine et de vitamine K, ainsi que sur gélose chocolat à 35-37°C. En 3 à 4 jours, les colonies apparaissent punctiformes (0.5-1 mm), brillantes, lisses, translucides, blanches à grisâtres et non hémolytiques. La pousse est stimulée par l'addition de 0.02% (vol/vol) de Tween 80 ainsi que par 10% (vol/vol) de sérum de lapin.

II.4. Caractères biochimiques

Ce sont des bactéries catalase et oxydase négatives. Elles fermentent le glucose, produisant majoritairement de l'acide lactique et acétique [2], [3]. Les tests d'identification biochimiques ne sont presque plus utilisés en routine pour l'identification bactérienne et sont peu discriminant pour l'identification de ces bactéries dont la position taxonomique a été déterminée grâce au séquençage du gène de l'ARN ribosomal 16S ; toutefois ces caractères restent utilisés pour la description de l'espèce (Tableau 1).



Tableau 1 : Tests biochimiques distinguant *A. vaginae*, *A. minutum*, *A. parvulum* et *A. rimae*.

Source : Mar Rodriguez Jovita [3], Kageyama et al [2]

Production d'enzyme	<i>A. vaginae</i>	<i>A. minutum</i>	<i>A. parvulum</i>	<i>A. rimae</i>
Acide pyroglutamique arylamidase	-	v	+	+
Alanine arylamidase	-	-	+	-
Arginine dihydrolase	+	+	-	-
Arginine arylamidase	+	+	+	-
B-galactosidase	-	-	+	-
Glycine arylamidase	+	-	+	-
Histidine arylamidase	+	-	-	-
Leucine arylamidase	+	-	+	-
Proline arylamidase	+	+	-	-
Phosphatase acide	+	-	+	+
Serine arylamidase	+	-	-	-
Tyrosine arylamidase	-	-	+	-
Fermentation des sucres				
Arabinose	AD	-	-	-
Cellobiose	AD	-	+	+
Fructose	AD	+	+	+
Glucose	AD	+	+	+
Inuline	AD	-	-	+
Lactose	AD	-	-	+
Maltose	AD	-	+	+
Mannose	AD	+	+	+
Ribose	AD	-	+	-
Salicine	AD	-	-	+
Sucrose	AD	-	+	+
Trehalose	AD	-	+	+

+ : positif, - : négatif, v : variable, **AD** : absence de données



II.5. *Atopobium vaginae* et vaginose

II.5.1. Généralités sur la vaginose bactérienne

La vaginose bactérienne est une pathologie fréquente dont la prévalence en France est estimée entre 10 et 20%. (CNGOF 2007 www.cngof.asso.fr/d_livres/2007_GM_141_bohbot.pdf). Elle est due à un déséquilibre de la flore vaginale caractérisé par la diminution de la quantité de Lactobacilles, *Lactobacillus crispatus* principalement [7], au profit d'une flore polymorphe caractérisée par une augmentation des bactéries anaérobies et anaérobies facultatives (*Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Megasphaera*, *Prevotella*, *Eggerthella* et *Mobiluncus* principalement) [5]–[7]. Cliniquement la vaginose se manifeste par des leucorrhées grisâtres, fluides et malodorantes.

Les conséquences de la vaginose sont multiples. Lors de la grossesse, la vaginose est associée à une augmentation du risque de rupture prématurée des membranes [9], de fausse couche [10] [11], de prématurité, et de petit poids à la naissance [12]. La vaginose bactérienne serait également associée à une augmentation du risque d'infection par le virus HIV [13].

Actuellement, il existe principalement deux méthodes diagnostiques de la vaginose bactérienne. Le score de Amsel permet le diagnostic de vaginose si au moins trois critères suivants sont présents:

- Leucorrhées fines, blanches ou grises, homogènes
- Présences de Clue cells (>20% des cellules épithéliales) à l'examen direct
- pH > 4,5
- Odeur de poisson au test à la potasse (10%)



La deuxième méthode, appelée score de Nugent-Krohn-Hillier, appelé communément score de Nugent se base sur l'observation des sécrétions vaginales après coloration de Gram. Une diminution des morphotypes lactobacilles (bacilles à Gram positif à bords parallèles) associée à une augmentation des morphotypes *Gardnerella* (bacilles à Gram variable, polymorphes) et/ou des morphotypes *Mobiluncus* (bacilles incurvés à Gram variable) est en faveur d'un déséquilibre de la flore. Un score de Nugent strictement supérieur à 6 confirme le diagnostic de vaginose (Tableau 2).

Tableau 2 : Système de calcul du score de Nugent.

Bactéries /champ (objectif X 1000)	≥30	5 à 30	1 à 4	<1	0
Morphotypes Lactobacillus	0	1	2	3	4
Morphotypes Gardnerella, Bacteroides	4	3	2	1	0
Bacilles incurvés à Gram variable (Mobiluncus)	2	2	1	1	0

L'addition des 3 scores permet le calcul du score de Nugent :

0-3 : Flore normale

4-6 : Flore intermédiaire

7-10 : Vaginose

D'après Nugent et al. [14]

II.5.2. Association de *Atopobium vaginae* et de la vaginose bactérienne

A. vaginae a été récemment décrit comment hautement associé à la vaginose bactérienne [7], [15]–[18]. Plusieurs études ont mis en évidence, par biologie moléculaire, une prévalence de *A. vaginae* comprise entre 87 à 96% dans les prélèvements vaginaux de patientes atteintes de vaginose (score de Nugent entre 7 et 10). La sensibilité obtenue est comprise entre 84 et 96.3% (Tableau 3).

Chez les patientes présentant une flore vaginale normale (score de Nugent < 4), la proportion d'échantillons positifs à *A. vaginae* est variable selon les études, allant de 6 à 69%. La spécificité rapportée est donc variable.



L'étude de Ménard *et al* de 2008 [16] est la seule étude à avoir montré une forte prévalence de *A. vaginae* (69%) chez la femme avec une flore génitale normale, mais elle montre également que ces femmes présentaient une concentration vaginale de *A. vaginae* bien inférieure à celle présentant une vaginose (Figure 1). Cette étude utilisait comme comparateur le score de Nugent et a été réalisée par PCR en temps réel avec une sonde type Taqman et des amorces ciblant le gène de l'ARN ribosomal 16S de *A. vaginae*. Il a été déterminé qu'un seuil de $\geq 10^8$ copies/ml de *A. vaginae* permettait d'augmenter la spécificité du diagnostic de vaginose bactérienne par détection et quantification de *A. vaginae* sans en diminuer la sensibilité (Sensibilité 90-96%, Spécificité 96-99%). Il est donc probable que *A. vaginae* soit plus largement présent dans la flore vaginale que décrit précédemment mais à faible concentration.

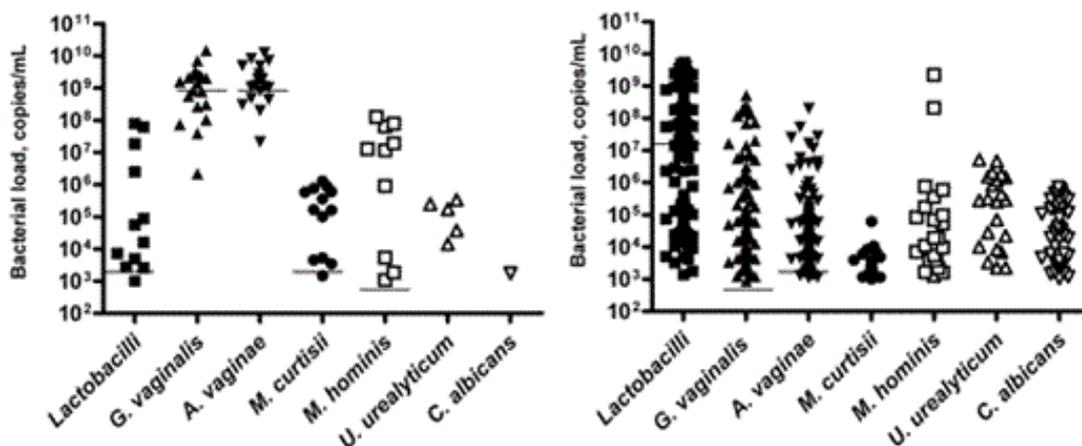


Figure 1 : Concentrations bactériennes obtenues par real time PCR sur 20 échantillons de femmes présentant une vaginose bactérienne (à gauche) et 167 échantillons de femmes présentant une flore génitale normale d'après le score de Nugent (à droite).

G. vaginalis : *Gardnerella vaginalis*, ***M. curtisii*** : *Mobiluncus curtisii*, ***M. hominis*** : *Mycoplasma hominis*, ***U. urealyticum*** : *Ureaplasma urealyticum*, ***C. albicans*** : *Candida albicans*.

Source : Ménard et al. 2008 [16]

Cette hétérogénéité peut avoir plusieurs explications. Tout d'abord, la population étudiée pourrait avoir un impact sur la prévalence de *A. vaginae* car on sait qu'en fonction de la population étudiée et de son origine géographique, la prévalence de la vaginose bactérienne varie de façon importante et nous pouvons supposer que les mécanismes en cause et les bactéries responsables ne sont pas identiques dans chaque population [19]. Ensuite, une différence de sensibilité entre les méthodes de biologie moléculaire utilisées (amorces et protocoles) pourrait avoir un impact sur la prévalence de *A. vaginae*. En effet, une

technique de détection par PCR plus sensible détectera des échantillons positifs avec de faibles charges bactériennes n'entraînant pas de vaginose, ce qui aura un impact négatif sur la spécificité du test. Le comparateur utilisé est aussi très important car les performances diagnostiques du score de Nugent et du score d'Amsel ne sont pas les mêmes. Prenant le score de Nugent comme comparateur, une étude menée chez des femmes non enceintes retrouvait une sensibilité du score de Amsel de 70% et une spécificité de 94% [20]. Plusieurs autres études réalisées chez des populations de femmes enceintes retrouvaient quant à elles une sensibilité du score de Amsel comprise entre 35 et 46%, toujours par rapport au score de Nugent [21]. Enfin, le caractère opérateur dépendant des scores de Nugent et d'Amsel utilisés comme référence oblige à des lectures en double aveugle pour minimiser ces différences.

Il existe une très forte association entre la présence d'*A. vaginae* et de *G. vaginalis* dans les prélèvements vaginaux [15]. On peut donc supposer que la présence de *G. vaginalis* serait une condition nécessaire à la colonisation vaginale par *A. vaginae*, l'inverse n'est pas vérifié. En effet, on retrouve fréquemment *G. vaginalis* en l'absence de *A. vaginae* et la détection de *G. vaginalis* est moins spécifique de la vaginose que celle de *A. vaginae* puisque ce dernier est plus fréquemment présent chez les femmes ayant une flore génitale normale [7].

II.5.3. Diagnostic de vaginose par quantification moléculaire de *Atopobium vaginae*

En plus de sa bonne sensibilité et de sa bonne spécificité dans le diagnostic de la vaginose bactérienne, la quantification de *A. vaginae* par biologie moléculaire pourrait présenter d'autres avantages comparée aux méthodes actuelles de diagnostic.

Dans la prédiction du risque obstétricale, la quantification de *A. vaginae* par biologie moléculaire pourrait être plus performante que les méthode actuelles. Bretelle et al ont montré lors d'une étude prospective sur une population de 764 femmes enceintes (14-34SA) à haut risque d'accouchement prématuré, un lien entre une concentration importante de *G. vaginalis* ($\geq 10^9$ copies/mL) et/ou de *A. vaginae* ($\geq 10^8$ copies/mL) et le risque de prématurité (HR = 3.9; IC 95% 1.1–14.1; $P = 0.031$) alors que dans cette même étude, un score de Nugent supérieur à 3 ou à 6 n'était pas corrélé à ce risque [23].



De plus, chez les femmes enceintes présentant une vaginose dépistées par le score de Nugent, le bénéfice sur le risque de prématurité d'un traitement antibiotique de la vaginose n'a pas été mis en évidence. Une méta-analyse de Brocklehurst *et al* a montré que le traitement de la vaginose diagnostiquée d'après le score de Nugent durant la grossesse permet de corriger le déséquilibre de la flore et de diminuer le risque de fausse couche tardive (moyenne des RR = 0.20, IC 95% : 0.05-0.76 ; 2 études incluant 1270 femmes) [22]. Néanmoins, il n'a pas été mis en évidence de réduction du risque de prématurité avant 37 semaines d'aménorrhée (SA) ni de diminution du risque de rupture prématurée des membranes après traitement chez ces femmes ayant une vaginose (moyenne des RR = 0.93, IC 95% 0.75-1.16 ; 10 études incluant 5584 femmes).

D'autres études d'effectifs plus faibles, retrouvent un bénéfice du traitement antibiotique sur la prématurité avant 37 SA lorsqu'on traite également les femmes avec une flore vaginale intermédiaire donc ayant un score de Nugent entre 4 et 10 (moyenne des RR = 0.53, IC 95% 0.34- 0.84 : 2 études incluant 894 femmes). Ces dernières observations pourraient être expliquées par un manque de sensibilité du score de Nugent dans la prédiction du risque de naissances prématurées liées à la vaginose bactérienne et pose la question de la significativité des flores intermédiaires (score de Nugent compris entre 4 et 6).

Il serait aussi intéressant de vérifier si le traitement antibiotique des femmes dépistées avec des méthodes de biologie moléculaire quantifiant certaines bactéries responsables de vaginose et notamment *A. vaginae* montre un bénéfice sur les conséquences obstétricales de cette dysbiose.

Des perspectives s'ouvrent avec la biologie moléculaire mais le test de référence reste le score de Nugent en raison de son faible coût, de sa facilité de réalisation, de ses performances assez bonnes et du manque d'études concernant les méthodes diagnostiques par biologie moléculaire.



Tableau 3 Performances rapportées de la recherche de *A. vaginae* par biologie moléculaire pour le diagnostic de vaginose

	Fredriecks, 2005 [7]*	Bradshaw, 2006 [15]	Menard, 2008 [16]	Menard, 2010 [17]	Kuster ,2015 [18]
Population	Femmes de 16 à 45 ans, Etats-Unis	Femmes symptomatiques (odeur, écoulement) Australie	Femmes enceintes 1er trimestre France	Femmes enceintes <20SA France	Femmes symptomatiques (écoulement anormal), Pays bas, Caucasiens
Age moyen (années)	16-45	29.8	N/A	29 ± 7	32
Comparateur	Amsel	Nugent	Nugent	Nugent	Nugent
Prévalence vaginose (Amsel ou Nugent)	27/73 (37%)	141/358 (39%)	20/231 (9%)	25/163 (15%)	55/151 (36%)
Méthode PCR	PCR (16S) <i>Atopobium spp.</i> qualitative	PCR temps réel (16S) spécifique de <i>A. vaginae</i>	PCR temps réel (16S) spécifique de <i>A. vaginae</i>	PCR temps réel (16S) spécifique de <i>A. vaginae</i>	PCR temps réel spécifique de <i>A. vaginae</i>
Nombre de patientes positive à <i>A. vaginae</i> / total de patientes atteinte de vaginose (%)	26/27 (96)	133/141 (96)	19/20 (95) 18/20 (90) ^a	24/25 (96) ^a	48/55 (87)
Nombre de patientes positive à <i>A. vaginae</i> / total de patientes avec une flore génitale intermédiaire (%)	Non applicable ^b	28/37 (78)	37/44 (84) 24/44 (55) ^a	6/21 (28) ^a	4/13 (31)
Nombre de patientes positive à <i>A. vaginae</i> / total de patientes avec une flore génitale normale (%)	9/46 (20)	20/180 (12)	116/167 (69) 1/167 (1) ^a	0 (0) ^a	5/83 (6)
Performances de la détection par biologie moléculaire de <i>A. vaginae</i> pour le diagnostic de vaginose	Se 96.3%* Sp 80.4%	Se 96% Sp 77% VPP 74% VPN 96%	Au seuil de 10 ⁸ cp/ml Se 90%, Sp 99%, VPP 95%, VPN 99%	Au seuil de 10 ⁸ cp/ml Se 96%, Sp 96%, VPP 80%, VPN 99%	Se 84%, Sp 90%, VPP 84%, VPN 92%

Se : sensibilité, **Sp** : spécificité, **VPN** : valeur prédictive négative, **VPP** : valeur prédictive positive, **cp** : copies, **N/A** : absence de données.

(*) Etude PCR utilisant des amorces spécifiques d'*Atopobium spp.* [24]. (a) échantillons positif supérieures 10⁸ copies/ml (b) le score de Amsel n'a pas de zone intermédiaire.



II.5.4. *Atopobium vaginae* et traitement de la vaginose

A. vaginae a été largement rapporté comme étant résistant au métronidazole [25], [26], traitement de première intention de la vaginose bactérienne, ce qui permettrait de penser qu'il est impliqué dans le taux de rechute important après traitement (>50% à un an). Paradoxalement, au vue des CMI élevées au métronidazole observées *in-vitro* pour *A. vaginae*, il a été rapporté une diminution plus importante de la quantité de *A. vaginae* que de *G. vaginalis* après traitement [15], [27]. Cette discordance *in vitro/in vivo* pourrait être expliquée par une synergie entre les différentes bactéries responsables de la vaginose bactérienne.

Il a été montré que *G. vaginalis* est capable de synthétiser un biofilm à la surface des cellules de l'épithélium vaginal à l'origine des cellules indicatrices ou Clue cells (Figure 2) qui sont un des marqueurs de vaginose bactérienne à l'examen direct, après coloration de Gram. Ce biofilm est également colonisé par *A. vaginae* et d'autres bactéries anaérobies [28]–[30], entraînant une plus grande résistance des bactéries aux antibiotiques et pouvant donc expliquer le taux important de rechute après traitement par métronidazole (>50% à un an) [31], [32]. La résistance au traitement par le métronidazole pourrait donc être expliquée par deux phénomènes, la résistance intrinsèque de *A. vaginae* au métronidazole mais également la présence d'un biofilm à la surface des cellules épithéliale entraînant une persistance des bactéries responsables de vaginose après traitement.



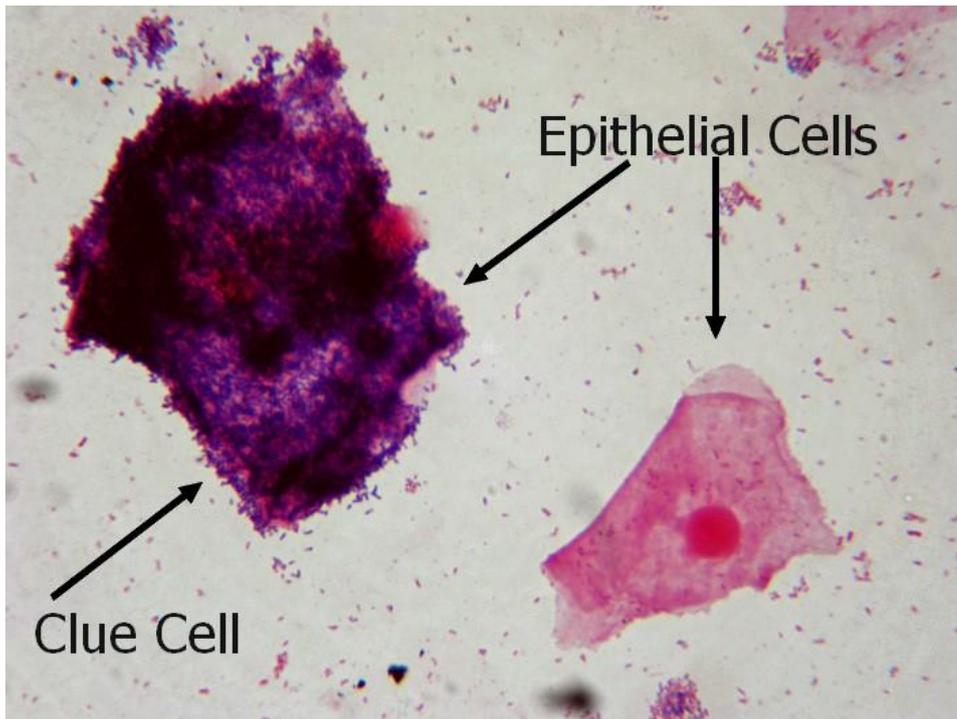


Figure 2 Présence d'une Clue cell (à gauche ; cellule épithéliale recouverte par de petits bacilles Gram variable, bords non visibles) et d'une cellule épithéliale vaginale normale (à droite).

II.6. *Atopobium vaginae* et infections génitales hautes féminines

Les infections génitales hautes féminines (cervicite, endométrite et salpingite) ont une origine le plus souvent ascendante, due à des bactéries responsables d'infections sexuellement transmissibles comme *Neisseria gonorrhoeae* ou *Chlamydia trachomatis* mais aussi à des bactéries de la flore vaginale et digestive de voisinage (entérobactéries, streptocoques et bactéries anaérobies), ce qui rend compte du caractère souvent polymicrobien de ces infections. Celles-ci augmentent le risque d'infertilité tubaire, de douleurs pelviennes chroniques et de grossesse extra utérine et peuvent se compliquer de pyosalpinx, d'abcès tubo-ovarien et d'adhérence pelvienne [33].

Le lien entre vaginose bactérienne et la survenue d'infections génitales hautes reste discuté en raison de résultats contradictoires en fonction des études, ce qui pourrait être expliqué par le fait que la vaginose est une affection polymicrobienne et on peut supposer que les bactéries responsables n'augmentent pas toutes le risque d'infections génitales hautes, en fonction de leur pouvoir pathogène intrinsèque. Une des causes de ces disparités pourrait également résider dans l'hétérogénéité des méthodes de diagnostic de la vaginose et des infections génitales hautes, et plus particulièrement au niveau de la confirmation histologique du diagnostic d'endométrite réalisée sur biopsie d'endomètre puisque les critères varient en fonction des études, la référence étant ≥ 5 polynucléaires neutrophiles par champ (X400) et/ou ≥ 2 plasmocytes par champ (x 120) [34]. Néanmoins la présence d'une vaginose bactérienne pourrait favoriser l'acquisition d'infections sexuellement transmissibles à *C. trachomatis* et *N. gonorrhoeae* et augmenter de façon indirecte le risque d'infection génitale haute [35].

La question du lien entre la présence de *A. vaginae* et la survenue d'infections génitales hautes reste débattue. Une étude de 2016 de Haggerty *et al* [36] évaluant par biologie moléculaire le risque d'endométrite associé à certaines bactéries responsables de vaginose dont *A. vaginae*, ne retrouve pas de risque significatif après exclusion des patients ayant une infection à *C. trachomatis* et *N. gonorrhoeae* [35]. Cette étude utilisait une PCR en point final avec des amorces ciblant le gène de l'ARN 16S de *A. vaginae*.

L'implication de *A. vaginae* dans la survenue d'infections génitales hautes n'est donc pas encore prouvée. Néanmoins *A. vaginae* a été isolé, sans autres bactéries, d'un abcès



tuboovarien chez une femme après une implantation transcervicale d'ovocytes [37], et également rapporté comme impliqué dans un cas d'endométrite [38], et deux de salpingite (associé à d'autres bactéries responsables de vaginose) [39]. Dans le cas de l'abcès tuboovarien, le prélèvement a été réalisé par laparotomie, donc présente peu ou pas de risque de contamination par la flore vaginale, à l'inverse les prélèvements effectués dans les cas d'endométrites ont été réalisés par voie trans-cervicale et sont de fait à haut risque de contamination.

A. vaginae pourrait être un facteur de risque indirect d'infection génitale haute dans le cadre de la vaginose bactérienne, en augmentant le risque d'acquisition de pathogènes spécifiques tels que *C. trachomatis* et *N. gonorrhoeae* ; son implication directe reste cependant à démontrer. Dans de rares situations, comme après réalisation de gestes invasifs, il pourrait se comporter comme un pathogène opportuniste et entraîner des infections génitales hautes.



II.7. *Atopobium* spp dans les flores ORL et digestive.

Les deux espèces d'*Atopobium* décrites en pathologie oto-rhino-laryngologique (ORL) sont *A. rimae* et *A. parvulum* mais semblent faire partie de la flore ORL normale. *A. rimae*, *A. parvulum* et *A. minutum* sont les trois espèces d'*Atopobium* que l'on retrouve dans la flore digestive [40]. Nous n'avons pas retrouvé d'études donnant la fréquence des différentes espèces au sein de ces microbiotes chez des patients sains, et la plupart des études par séquençage haut débit s'arrête à l'analyse au niveau du genre *Atopobium*.

II.7.1. *Atopobium parvulum* et halitose

L'halitose est une pathologie fréquente caractérisée par une mauvaise haleine. Son origine peut être multiple mais la plus fréquente est une origine buccale, due à une modification de la flore orale caractérisé par une augmentation des bactéries anaérobies synthétisant des composés volatiles sulfurés qui sont à l'origine de l'odeur incommode [41]. La détection d'*A. parvulum* sur la face dorsale de la langue semble corrélée à l'halitose d'après plusieurs études de faible effectif [42], [43].

II.7.2. *Atopobium rimae* et *Atopobium parvulum* en pathologies dentaires

Les pathologies infectieuses dentaires sont très souvent polymicrobiennes. *A. rimae* a été retrouvé dans des abcès endodontiques lors d'une étude par biologie moléculaire, mais l'étude avait été conduite sur de petits effectifs (n = 18) et sans groupe contrôle de patients sains alors que le risque de contamination par la flore ORL, même après antiseptie rigoureuse, reste important, notamment en raison des bactéries présentes dans la plaque dentaire leur conférant une protection vis-à-vis des antiseptiques [44], [45]. Il existe néanmoins une seconde étude montrant la présence en quantité importante des bactéries du genre *Atopobium* exclusivement dans la dentine atteinte, ceci en comparaison des zones saines de la bouche [46].

A. parvulum pourrait également être un des acteurs potentiel de la formation de caries. En effet, ils ont été plus fréquemment retrouvés chez des enfants de 3 ans (n = 155) ayant des caries que chez des enfants indemnes [47].



II.7.3. *Atopobium parvulum* et maladie de Crohn

Une étude de Mottawea *et al.* [48] montre un lien entre *A. parvulum* et la maladie de Crohn grâce à l'étude par séquençage haut débit du microbiote de la muqueuse colique.

Il a été mis en évidence l'implication dans la maladie de Crohn de plusieurs bactéries productrices de sulfure d'hydrogène (H₂S) par dégradation des acides aminés parmi lesquelles on retrouve *Atopobium*, *Fusobacterium*, *Veillonella*, *Prevotella*, *Streptococcus* et *Leptotrichia*. La prolifération de ces bactéries se fait au dépend d'autres produisant du butyrate qui stimule la mitochondrie et permet la synthèse des systèmes de détoxification de l'H₂S que sont la sulfure dioxygénase (ETHE1), la thiosulfate sulfurtransferase (TST) et les composants du complexe III et IV de la chaîne respiratoire mitochondriale. Cette augmentation d'H₂S entraînerait une inflammation de la muqueuse.

Grâce à une PCR spécifique de *A. parvulum*, les auteurs ont pu montrer que son abondance est liée à la sévérité de la maladie.

De plus, chez des souris knockout pour le gène de l'interleukine 10 (IL10^{-/-}) les rendant sensibles aux colites, la colonisation par *A. parvulum* au sein d'une flore digestive normale, entraîne des colites avec un score d'inflammation supérieur à celui retrouvé dans le groupe contrôle. Toutefois, cet effet serait bien polymicrobien car lorsque les auteurs ont pris ces mêmes souris mais avec un tube digestif stérile secondairement colonisé avec *A. parvulum*, aucune différence d'inflammation n'a été observée par rapport au groupe contrôle.



II.8. Sensibilité aux antibiotiques

Il existe très peu d'études concernant la sensibilité aux antibiotiques des différentes espèces de *Atopobium*. Il a été rapporté la sensibilité aux antibiotiques d'une souche de *Atopobium sp*, une de *Atopobium deltae*, deux de *A. rimae* issues d'hémocultures, de 15 souches de *A. vaginae* dont deux issues d'hémocultures, 12 de prélèvements vaginaux et une d'abcès tubo-ovarien et une souche de *A. minutum* isolé d'un ulcère sacré. Pour une interprétation homogène, nous avons utilisé les seuils de concentration minimale inhibitrice (CMI) édités par l'European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) en 2017 [49], pour l'interprétation clinique de la sensibilité aux antibiotiques, les CMI étant disponibles pour ces souches dans la littérature.

Les souches testées sont sensibles à la pénicilline (CMI 0.008-0.25 µg/ml ; n = 16), à l'ampicilline seule et associée à un inhibiteur de bêtalactamase, acide clavulanique ou sulbactam (CMI < 0.016 – 0.94 µg/ml ; n = 15), à l'imipénème et au méropénème (CMI < 0.015-0.5 µg/ml ; n = 8), et à la clindamycine (CMI < 0.015 – 2 µg/ml ; n = 15). A l'exception d'une souche de *A. minutum* qui fut retrouvé résistante à la vancomycine (CMI 64 µg/ml) du a un génotype vanB, les souches des autres espèces étaient sensible à la vancomycine (CMI 0.5 – 2 µg/ml ; n = 14). La plupart des souches de *A. vaginae* sont résistantes au métronidazole (CMI 2 - >256 µg/mL ; n = 13), seul 2 souches sur 13 ont été rapportées comme sensibles (CMI à 2 et 4 µg/mL). La souche de *A. deltae* était également résistante au métronidazole (CMI 24 µg/ml). *A. rimae* et la souche d'*Atopobium sp* étaient sensibles au métronidazole (CMI à 0.75 et 0.12 µg/ml respectivement).

En résumé, les différentes souches de *Atopobium* testées montrent une sensibilité constante aux bêtalactamines et à la clindamycine. La plupart des souches sont sensibles à la vancomycine, à l'exception d'une souche de *A. minutum*. Enfin la plupart des souches de *A. vaginae* et la souche de *A. deltae* étaient résistantes au métronidazole.



Tableau 4 CMI des souches d'*Atopobium* rapportées dans la littérature

	Clinical breakpoint EUCAST 2017 (µg/ml)	Salimnia 2009 [50]	Oyaert 2013 [51]	Angelakis 2014 [52]	Chung 2007 [53]	Knoester 2011 [54]	Jasper 2012 [55]	De Backer et al [25] *	Ferris et al [26] *	Geißdörfer et al [37]	Marvaud et al [56]
Prélèvement (nombre d'isolats)		Hémo- culture (1)	Hémo- culture (1)	Hémo- culture (1)	Hémo- culture (1)	Hémo- culture (1)	Hémo- culture (1)	Vaginal (9)	Vaginal (3)	Abcès tubo ovarien (1)	Ulcère sacré (1)
Espèces CMI (µg/mL)	Bactérie anaérobie à Gram positif	<i>Atopobium sp</i>	<i>A. deltae</i>	<i>A. rimae</i>	<i>A. rimae</i>	<i>A. vaginae</i>	<i>A. vaginae</i>	<i>A. vaginae</i>	<i>A. vaginae</i>	<i>A. vaginae</i>	<i>A. minutum</i>
Penicilline G	S ≤ 0.25 ; R > 0.5	0.064	0.016	0.064	0.094	0.094	0.25	0.008-0.25	NT	0.125	NT
Ampicilline	S ≤ 4; R > 8	NT	NT	0.023	NT	NT	NT	< 0.016 – 0.94	NT	0.032	NT
Ampicilline- clavulanate /Ampicilline- sulbactam	S ≤ 4 ; R > 8	- /0.032	NT	0.012 / -	NT	NT	NT	NT	- / 0.06-0.025	NT	NT
Cefoxitine	N/A	3	NT	NT	NT	NT	NT	NT	2	2	NT
Céfuroxime	N/A	NT	NT	NT	NT	0.125	NT	0.016-0.25	NT	0.19	NT
Ceftriaxone	N/A	0.25	NT	NT	NT	NT	NT	NT	0.5-2	NT	NT
Céfotaxime	N/A	NT	0.016	NT	0.5	NT	NT	NT	NT	NT	NT
Céfépime	N/A	1.0	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
Imipénème /Meropénème	S ≤ 2 ; R > 8	0.016 / -	- /0.012	0.032 / -	0.032 / -	NT	NT	NT	< 0.015-0.5 / < 0.015-0.5	0.016 / -	NT
Linézolide	N/A	NT	NT	NT	NT	NT	NT	0.016- 0.125	0.06-0.25	NT	NT



Métronidazole	S ≤ 4	0.12	24	NT	0.75	24	>256	2- > 256 ^a	> 32	> 16	NT
Vancomycine	S ≤ 2	1.0	0.5	1.25	2	1.5	NT	1-2	NT	NT	64
Rifampicine	N/A	NT	NT	NT	NT	NT	NT	< 0.002	NT	NT	NT
Clindamycine	S ≤ 4	2	<0.016	NT	NT	0.016	NT	< 0.016	< 0.015	NT	NT
Azithromycine /Erythromycine	N/A	NT	NT	<0.016/ <0.016	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
Ciprofloxacine	N/A	NT	NT	0.06	NT	NT	NT	0.023-0.25	NT	NT	NT
Moxifloxacine	N/A	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	0.06-1	NT	NT
Doxyxycline	N/A	NT	NT	NT	NT	NT	NT	0.19-0.75	NT	NT	NT

N/A : Absence de données, NT : Non testé, Sensible, Résistant, Absence de seuil clinique d'interprétation.

(*) Gamme de CMI en µg/ml, (^a) 2 souches sur 9 sensibles au métronidazole.



III. Analyse de 8 cas de bactériémies à *Atopobium*

III.1. Article

Atopobium bacteremia: a case series and review of the literature

Jules VOINCON¹, Hélène GUET-REVILLET^{1,2}, Eric OSWALD^{1,2}, Damien DUBOIS^{1,2}

¹ CHU Toulouse, Hôpital Purpan, Laboratoire de Bactériologie-Hygiène, Toulouse, France

² IRSD, Université de Toulouse, INSERM, INRA, ENVT, UPS, Toulouse, France

Corresponding author: Dr Damien DUBOIS

Laboratoire de Bactériologie-Hygiène - Institut Federatif de Biologie - CHU Toulouse

Faculte de Medecine Toulouse-Purpan - Université Toulouse III Paul Sabatier

330 avenue de Grande Bretagne - TSA40031 - 31059 Toulouse Cedex 9 - FRANCE

Tel: 33 (0)5 67 69 03 94

Fax: 33 (0)5 67 69 04 83

E-mail address: dubois.d@chu-toulouse.fr



ABSTRACT

We report eight cases of bacteremia caused by *Atopobium* species, a genus of Gram-positive anaerobes. The causative species included *A. parvulum* (n=3), *A. rimae* (n=3), and *A. vaginae* (n=2). According to this case series and the seven previously reported cases, *A. vaginae* bacteremia occurred after upper genital tract infection in women, whereas *A. rimae* and *A. parvulum* bacteremia are mostly secondary to oral or digestive source of infection. Pathogenicity of *Atopobium* seems to be moderate and infections resolved with empirical antibiotic treatment adapted to the site of infection. A summary of the antibiotic susceptibility pattern of these strains showed that *Atopobium* species are overall susceptible to most antimicrobials usually active against Gram-positive anaerobes, except *A. vaginae* strains and the single isolated *A. deltae* strain that were essentially nonsusceptible to metronidazole, a classical anti-anaerobes agent. These data will guide interpretation of future positive blood cultures for *Atopobium* species and their management.

Introduction

Atopobium species are anaerobic, non sporulating, Gram-positive elliptical short rod or coccoid-shaped bacteria. Six species have been described currently: *A. minutum* the type species [1], *A. vaginae*, *A. parvulum*, *A. rimae*, *A. deltae*, and *A. fossor*. Most *Atopobium* species seems to be part of the human oral [2], intestinal [3], [4] and genital [5] microbiota but no study reports their carrying frequency, except for *A. vaginae* for which numerous studies observed a strongly association between its presence in vaginal samples and bacterial vaginosis [6]–[9]. Few data were published on the spectrum of diseases that *Atopobium* species may cause and on their susceptibility to antimicrobials, possibly due to difficulties with their biochemical identification [10]. *Atopobium* species are probably misidentified or not identified routinely by commercially available biochemical identification panels for anaerobes poorly or not include *Atopobium* species in their database. The first case of *Atopobium* bacteremia has been reported in 2007, due to the widespread uptake of new technologies such as molecular sequencing techniques.

Since the implementation of MALDI-TOF mass spectrometry (MS) technology for bacterial identification in our university hospital of Toulouse, France, we observed eight *Atopobium* bacteremia from April 2014 to February 2016. To evaluate the significance of *Atopobium* bacteremia, we reported the clinical characteristics and the outcome of these eight bacteremia, and retrospectively determined susceptibility to eleven antimicrobials for seven of these isolates.



Material and Methods

All patients with at least one blood culture growing with an *Atopobium* isolate were included. Blood cultures were performed using sets of one Bactec Plus Aerobic/F bottle and one Bactec Lytic Anaerobic/F bottle incubated on the Bactec FX system (Becton Dickinson). Bottle cultures were then subcultured to Columbia agar + 5% sheep blood and incubated in an anaerobic sealed plastic pouch at 35°C. The identification of all isolates were retrospectively confirmed by MALDI-TOF MS system MALDI BioTyper (Bruker Daltonics, database MBT-BDAL-5989) without protein extraction step, according to the manufacturer instructions, and by 16S rDNA gene sequencing of the upstream third (variable region V1, V2, and V3) using the fD1mod/16S1RR-B primer pair [11] and the downstream third (variable region V6, V7, and V8) using the MFP889/ MFP890 primer pair [12] with BigDye Terminator method. The concatenated obtained sequences were between 881 and 961 bp of length, and were compared to the National Center for Biotechnology Information GenBank database. Antimicrobial susceptibility testing was performed by determination of Minimum Inhibitory Concentration (MICs) using MICEvaluator strips (Thermo scientific) for amoxicillin and vancomycin and E-test strips (bioMérieux) for others on Brucella Blood Agar, using an inoculum of 1 Mc Farland. MICs were read after 48h of incubation at 35°C under anaerobic atmosphere, and interpreted according to clinical breakpoints for gram positive anaerobe of European Committee on Microbial Susceptibility Testing (EUCAST) 2017 (http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/). Patient charts were reviewed with regard to clinical presentation, laboratory findings, treatment, and outcome.

Results

All isolates grew only in the anaerobic bottles: positivity of the growth was detected in one day for two patients (3 isolates), in two days for three patients, and in three days or more for three others with a maximum incubation time of 4.5 days. 16S rDNA gene sequencing identified two *A. vaginae* isolates, three *A. parvulum* isolates, and three *A. rimae* isolates, with 99.7% to 99.9% identity to sequences available in public databases (Table 2). MALDI-TOF MS identification gave scores between 2.24 and 2.38 with a second proposed species with a score <2.00, and well correlated at species level with genetic identification in all cases except for patient 1 isolate which species was undetermined. Isolate from patient 7 was not reanalyse because absent from our lab strain collection.



All seven isolates were susceptible with low MICs to most of beta-lactamin agents tested (amoxicillin, amoxicillin-clavulanate, and meropenem; overall MIC, 0.002 to 0.125 µg/ml), and harbored heterogeneous MIC distribution to penicillin (MIC, 0.06 to 0.5 µg/ml) and to ceftriaxone (MIC, 0.094 to 0.5 µg/ml) (Table 2). Isolates were susceptible with low MICs to rifampicin (MIC, <0.002 to 0.047 µg/ml), susceptible with moderate MICs to vancomycin (MIC, 0.5 to 1 µg/ml) and susceptible to clindamycin with heterogeneous MICs distribution (MIC, <0.016 to 4 µg/ml). Isolates harbored low MICs to levofloxacin (MIC, 0.094 to 0.25 µg/ml) and ciprofloxacin (MIC, 0.094 to 0.38 µg/ml), except one *A. parvulum* isolate (patient 3) that was highly resistant to levofloxacin and ciprofloxacin (MIC >32 µg/ml).

Both *A. vaginae* isolates were metronidazole resistant (MIC, 64 and 256 µg/ml) whereas the *A. parvulum* and *A. rimae* isolates were metronidazole susceptible (MIC, 0.125 to 0.75 µg/ml).

All but one patient were female (7/8) (table 1). All patients were adults older than 50 years, except two female patients that were in their twenties. Half of patients presented neoplasia. Three out of eight patients exhibited a bacteremia associated with another bacterium. All patients had fever and harbored at least another criteria of Systemic Inflammatory Response Syndrome (Heart rate >90 /min, respiratory rate > 20 /min or a leucytosis > 12000 / mm³) that was in favor of sepsis for seven patients and of septic shock for patient 7. An infectious port of entry was clearly identified in six out of eight patients (patients 2, 3, 4, 6, 7, and 8).

The two *A. vaginae* blood culture were observed in young female without comorbidities: patient 1 presented an influenza-like syndrome associated with a *Veillonella* sp bacteremia without clinical significance as initially assessed by the treating physician (follow up information missing); patient 2 harbored an endometritis relate to spontaneous miscarriage in the first trimester. All three *A. parvulum* bacteremia were observed in patients harboring abdominal neoplasia. Bacteremia occurred 14 days after pelvic exenteration and colpectomy and was associated with methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* in abdominal fluid drain for patient 3; after endometritis and was associated with *Fingoldia magna* in blood culture for patient 4; and concomitantly with a fundic gastric ulcer for patient 5. *A. rimae* bacteremia were observed during ventilator-associated pneumoniae with a *Klebsiella pneumoniae* strain isolated from tracheal aspirate (patient 6), a Fournier gangrene concomitant with a pleural effusion with classical digestive polymicrobial flora (patient 7), and an angiocholitis related to hepatic abscess, associated with a concomitant *Escherichia coli* bacteremia.

All patients but patient 1 received broad spectrum initial antimicrobial therapy depending on site of infection. *Atopobium* blood culture results do not modified the initial



antimicrobial therapy, particularly for patients 2, 4, 6, 7 and 8 because of polymicrobial site of infection (endometritis, ventilator associated pneumonia, Fournier gangrene, angiocholitis) . Duration of antimicrobial therapy had never been modified by the presence of positive blood culture and was determined by the local site of infection. No death was recorded due to *Atopobium* bacteremia. Patient 5 died from a digestive haemorrhage one day after blood culture sampling, in a context of metastatic neoplasia.

Discussion

Atopobium are non-motile, non-spore forming Gram-positive bacteria. *A. vaginae* and *A. parvulum* are small cocci whereas *A. rimae*, *A. deltae*, *A. minutum*, and *A. fossor* have a short stretched rod [1], [13]. They appeared singly, in pair, in clumps for *A. parvulum*, or in short chains for *A. vaginae*. Strictly anaerobic, they grow in 2-5 days on Columbia agar + 5% sheep blood and appear as small (0.5-1 mm), translucent, and white, greyish colonies. Except *A. fossor* which is a horse commensal oropharyngeal bacteria [13], *Atopobium* species have been found in oral, genital, and gut human microbiota, but were also responsible for various infectious syndromes.

A. vaginae is found in vaginal microflora where its overgrowth is strongly associated with bacterial vaginosis [7]–[9] an alteration of the vaginal ecosystem dominated by different bacterial species, mostly anaerobic, associated with the decrease or disappearance of the usual *Lactobacillus* residents. *A. vaginae* presence seems quite sensitive and specific of bacterial vaginosis, from 87 to 96% in vaginal samples of women with bacterial vaginosis against 6 to 20% in women with normal vaginal microflora [14]–[18], although one study yet reported 69% of positives vaginal samples in pregnant women with normal vaginal microflora [15]. *A. vaginae* has also been reported as an agent of upper female genital tract infection such as endometritis [19] and tuboovarian abscess [20] .

A. rimae and *A. parvulum* seems to be part of the oral and digestive human microbiota [2], [3], especially in pathological conditions, although no data on the *A. parvulum* and *A. rimae* frequencies in the normal digestive and oral microbiota is available.

There is a link between the presence of *A. parvulum* in oral microbiota and caries, and an association between increasing of *A. parvulum* loads and halitosis is suspected [21], [22]. *A. rimae* has been widely found in endodontic abscess [24], [25].



A recent study on colic microbiota of infants with Crohn disease showed that *A. parvulum*, with other bacteria (*Fusobacterium*, *Veillonella*, *Prevotella*, *Streptococcus* and *Leptotrichia*) could be implicated in Crohn disease by hydrogen sulphide (H₂S) production, and that *A. parvulum* abundance was linked with the severity of the colic inflammation.

We reported here eight bacteremia due to *Atopobium* species, with single blood cultures grew for seven of the eight patients. All patients harbored sepsis criteria with the *Atopobium* species isolated in agreement with the suspected site of infection. Our standard incubation time of 5 days for blood bottles associated with the slow growth of *Atopobium* isolates (up to 4.5 days in our cases) may account for false negativity of other sampled blood cultures.

Seven cases of *Atopobium sp.* bacteremia were previously reported in the literature whose main characteristic are summarized in Table 3; two bacteremia were due to *A. vaginae*, three others to *A. rimae*, one to *A. deltae* and one bacteremia concerning a currently unnamed species. Reported *A. vaginae* bacteremia followed ascending female genital tract infection [15],[16], as endometritis in patient 3, that is in relation to the female genital tract habitat of this species. *A. parvulum* and *A. rimae* bacteremia have been mainly reported with an assumed oral or digestive source according to their habitats (parapharyngeal abscess [28], inhalation pneumonia [33], and abscess near the adrenal gland in a patient with liver cirrhosis [29]), as for cases presented here (Fournier gangrene, angiocholitis, gastric ulcer, and ventilator associated pneumonia). To our knowledge, the three *A. parvulum* bacteremia reported herein are the first described ones. Two other reported bacteremia, related to skin and soft tissue infections involved *A. deltae* in an obese patient who suffer from Fournier gangrene, and a currently unnamed *Atopobium* species in a paraplegic patient with a necrotizing decubitus ulcer but an oral source of infection is possible due to the poor oral hygiene of the patient and it would be consistent with the molecular identification.

As for our case series, clinical outcome of *Atopobium* bacteremia previously reported were favorable under broad spectrum antimicrobial therapy and possibly surgery drainage, with the exception of a spontaneous abortion whose etiology remains unresolved between villus sampling and bacteremia [27]. Of note, a ciprofloxacin-based treatment was initiated in patient 3 for a urinary tract infection, three days before *A. parvulum* bacteremia, and pursued for five days whereas the strain was ciprofloxacin-resistant. The bacteremia was yet resolute, probably due to the low pathogenicity of the bacteria and its clearance by the immune system.

Although antimicrobial susceptibility have been reported for few non-*A. vaginae* strains, no resistance to penicillins, cefotaxime/ceftriaxone, imipenem/meropenem, rifampicin and



clindamycin have been reported to date for any *Atopobium* species [29], [31]–[33]. *A. vaginae* susceptibility has been reported in some studies, and is correlated with our data. De Backer et al tested nine strains isolated from vaginal samples with low MICs for penicillin (0.008 – 0.25 µg/ml), ampicillin (< 0.016 – 0.94 µg/ml), rifampicin (< 0.002 µg/ml), azithromycin (< 0.016 – 0.32 µg/ml), ciprofloxacin (0.023 – 0.125 µg/ml), clindamycin (< 0.016 µg/ml), and linezolid (0.016 – 0.25 µg/ml), and moderate MICs for vancomycin (1 – 2 µg/ml) [34]. Ferris *and al.* tested three vaginal strains with low MICs for ampicillin/sulbactam (0.06 – 0.25 µg/ml), imipenem (< 0.015 – 0.5 µg/ml), clindamycin (< 0.015 µg/ml), moxifloxacin (0.06 – 1 µg/ml), and linezolid (0.06 – 0.25 µg/ml), and moderate MICs for ceftioxin (2 µg/ml) and ceftriaxone (0.5 – 2 µg/ml) [6]. In these two studies, MICs for metronidazole varying from 2 to 64 µg/ml with only two strains moderately susceptible to metronidazole (MICs, 2 and 4 µg/ml) [6], [34].

With further relation to *A. vaginae* species, one strain isolated from tuboovarian abscess [20] and two bloodstream strains [26], [27] as well as our two isolates were resistant to metronidazole with MICs from 24 µg/ml to >256 µg/ml. The unique *A. deltae* strain reported was also resistant to metronidazole (24 µg/ml) [32]. One of our two *A. parvulum* strains was resistant to levofloxacin and ciprofloxacin, and an *A. minutum* isolate from deep infected tissue of a sacral bed sore was reported resistant to vancomycin due to *vanB* genotype [30].

In summary, bloodstream infections due to *Atopobium* species are frequently associated with polymicrobial local infection. *A. rimae* and *A. parvulum* bacteremia occurred mainly in patients with oral or digestive source of infection whereas *A. vaginae* occurred in the context of genital tract infection. Of note, in our case series, all six *A. rimae* or *A. parvulum* bacteremia occurred in patients with neoplasia in contrast to the two previously reported *A. rimae* ones. Overall, *Atopobium* species seem to be weakly virulent during bloodstream infection, that is probably promoted by local factors such as neoplasia, invasive procedures or polymicrobial infections which damaged the epithelial barrier. Bacteremia resolved mostly with empirical broad spectrum antibiotic treatment adapted to the local site of infection, and possibly surgery drainage. *Atopobium* species seem to be susceptible to most antimicrobials usually active against Gram-positive anaerobes, except *A. vaginae* strains that are widely resistant to metronidazole, as well as the single isolated *A. deltae* strain. This case series and review of the literature will guide interpretation of future positive blood cultures for *Atopobium* species and their management.



Table 1: Characteristic of patients with positive blood cultures for *Atopobium* species.

Patient number	Age (Gender)	Clinical context	comorbidities	Identification* (number of positive blood culture**)	Other bacteria (Sample)	Treatment (duration in days)	Outcome
1	20 (F)	Influenza-like syndrome	None	<i>A. vaginae</i> (1/2)	<i>Veillonella</i> sp. (peripheral blood culture) (1/2**)	ND ^a	ND
2	25 (F)	Endometritis post spontaneous miscarriage during first trimester	None	<i>A. vaginae</i> (1/1)	<i>Gardnerella vaginalis</i> (endocervix)	Amoxicillin-clavulanate, metronidazole (10)	Favorable
3	70 (F)	Bacteremia d3 post urinary tract infection, d14 post pelvic exenteration and colpectomy,	Diabetes mellitus, endometrioid adenocarcinoma recurrence, endo ureteral prosthesis	<i>A. parvulum</i> (1/2)	Methicillin sensitive <i>Staphylococcus aureus</i> (abdominal fluid drain)	Ciprofloxacin since three days for the urinary tract infection, for a total of 8 days	Favorable
4	81 (F)	Endometritis lead to diagnosis of endometrioid adenocarcinoma	<i>Pasteurella</i> chronic arthritis of the right shoulder	<i>A. parvulum</i> (1/1)	<i>Fingoldia magna</i> (blood culture), <i>Pasteurella multocida</i> , anaerobes (endocervix),	Ceftriaxone, metronidazole (ND)	Favorable
5	53 (H)	Fundic gastric ulcer	Metastatic non germinomatous germ cell tumour (brain, lung, peritoneum)	<i>A. parvulum</i> (1/1)	None	Vancomycin, piperacillin-tazobactam, amikacin (1, death)	Death (digestive haemorrhage)
6	72 (F)	Ventilator associated pneumonia	Hemorrhagic stroke, glomerular renal failure, pulmonary arterial hypertension	<i>A. rimae</i> (1/1)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (tracheal aspirate)	Ceftriaxone (7)	Favorable
7	57 (F)	Perineal Fournier gangrene	Uterine fibroid operated	<i>A. rimae</i> (2/2)	<i>Escherichia coli</i> , <i>Streptococcus anginosus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Bacteroides fragilis</i> (excised perineal tissues) <i>Peptoniphilus harei</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Escherichia coli</i> (pleural effusion)	Piperacillin-tazobactam (1), Meropenem (15) Surgical debridement	Favorable
8	59 (F)	Bacteremia related angiocholitis with hepatic abscess	Cecal adenocarcinoma	<i>A. rimae</i> (1/2)	<i>Escherichia coli</i> (peripheral blood culture)	Ceftriaxone, metronidazole (21)	Favorable

ND: No data.

a: no clinical significance assessed by treating physician

(*) According to 16S rDNA sequencing

(**) number of anaerobic positive blood bottles / number of anaerobic blood bottles sampled, before initiation of antimicrobial therapy.



Table 2: Bacteriological characteristics of *Atopobium* isolates from positive blood cultures.

Patient number	16S rDNA sequencing ID				Minimum Inhibitory Concentrations (µg/ml)										
	Species	% identity	GenBank no	Total length	PEN	AMX	AMX/AC	CTX	MER	LVX	CIP	CLI	MTR	VAN	RIF
					S ≤ 0.25(*) R > 0.5	S ≤ 4 R > 8	S ≤ 4 R > 8	NA	S ≤ 2 R > 8	NA	NA	S ≤ 4 R > 4	S ≤ 4 R > 4	S ≤ 2 R > 2	NA
1	<i>A. vaginae</i>	99.9	AJ585206	910	0.06	0.03	0.023	0.125	0.032	0.25	0.094	<0.016	>256	1	0.047
2	<i>A. vaginae</i>	99.8	NR117757	896	0.5	0.12	0.125	0.5	0.016	0.094	0.38	<0.016	64	1	<0.002
3	<i>A. parvulum</i>	99.8	NR102936	881	0.25	0.03	0.19	0.094	0.064	>32	>32	4	0.75	1	0.030
4	<i>A. parvulum</i>	99.7	NR113159	945	0.25	0.06	0.064	0.094	0.032	0.25	0.094	<0.016	0.25	0.5	0.002
5	<i>A. parvulum</i>	99.9	NR102936	950	0.5	0.06	0.094	0.25	0.094	0.25	0.38	3	0.250	1	0.030
6	<i>A. rimae</i>	99.9	EU828366	907	0.06	0.03	0.023	0.094	0.003	0.125	0.19	0.38	0.125	1	<0.002
8	<i>A. rimae</i>	99.7	NR113038	961	0.12	0.03	0.047	0.125	0.002	0.125	0.19	0.38	0.125	0.5	<0.002

*Susceptibility clinical categorisation according to clinical breakpoints for Gram-positive anaerobes of European Committee on Microbial Susceptibility Testing (EUCAST) 2017.

PEN: Penicillin, **AMX:** Amoxicillin, **AMX/AC:** Amoxicillin/clavulanate, **CTX:** Ceftriaxone, **MER:** Meropenem, **LVX:** Levofloxacin, **CIP:** Ciprofloxacin, **CLI:** clindamycin, **MTR:** Metronidazole, **VAN:** Vancomycin, **RIF:** Rifampicin.

ID: Identification, **GenBank no:** Genbank accession number, **S:** susceptible, **R:** resistant, **NA:** not available.



Table 3: Characteristics of *Atopobium* bacteremia cases previously reported in the literature

Age (Gender)	Comorbidities	Clinical syndrome	<i>Atopobium</i> species (no. of positive blood cultures)	Other bacteria (sample)	Antimicrobial susceptibility	Treatment (duration in days)	Outcome	Source
47 (M)*	Cirrhosis	Bacteremia with an abscess near the left adrenal gland	<i>A. rimae</i> (3)	<i>E. coli</i> , <i>Perptostreptococcus micros</i> (abscess)	(S) penicillin, cefotaxime, imipenem, metronidazole, tetracycline	Imipenem, metronidazole (ND)	Favorable	Chung, 2007, Korea [29]
38 (M)	Paraplegia since many years, decubitus necrotic ulcer, poor oral hygiene	Bacteremia	<i>Atopobium</i> sp (1)	<i>Enterococcus faecalis</i> and <i>Streptococcus milleri</i> group (decubitus ulcer debridement fluid)	(S) penicillin, ampicillin-sulbactam, ceftriaxone, cefepime, imipenem, metronidazole, vancomycin, clindamycin	IV : Ceftriaxone, vancomycin, and metronidazole (ND)	Favorable	Salimnia, 2008, USA [31]
77 (F)	None	Inhalation pneumonia	<i>A. rimae</i> (2 - 48h apart)	<i>Streptococcus gordonii</i> (peripheral blood culture)	(S) penicillin, ampicillin, ampicillin-clavulanate, imipenem, metronidazole, erythromycin, azithromycin, ciprofloxacin, vancomycin	IV: piperacillin-tazobactam, amikacin then amoxicillin-clavulanic acid	Favorable	Angelakis, 2009, France [33]
40 (F)	Diaphragmatic hernia	Transcervical chorionic villus sampling (12WA)	<i>A. vaginae</i> (1)	None	(S) penicillin, cefuroxime, vancomycin, clindamycin (R) MTR	PO: cefuroxime (4) amoxicillin-clavulanate (14)	Spontaneous abortion. Favorable	Knoester, 2011, Netherlands [27]
33 (F)	None	Spontaneous maternal (39AW) bacteremia with fetal distress	<i>A. vaginae</i> (1)	None	(S) penicillin (R) metronidazole	IV: amoxicillin-clavulanate (15)	Favorable (mother and neonate)	Jasper, 2012, Hong Kong [26]
43 (F)	-Mental retard, obesity	Fournier gangrene	<i>A. deltae</i> (2)	<i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> and <i>Atopobium deltae</i> (debridement fluid)	(S) Penicillin, cefotaxime, meropenem, vancomycin, clindamycin (R) metronidazole	IV: empirical amoxicillin-clavulanate, switch for meropenem Surgical drainage	Favorable	Oyaert, 2013, Belgium [32]

Age (Gender)	Comorbidities	Clinical syndrome	<i>Atopobium</i> species (no. of positive blood cultures)	Other bacteria (sample)	Antimicrobial susceptibility	Treatment (duration in days)	Outcome	Source
56 (M)	Heart transplanted under ciclosporine	Abscess of the left parapharyngeal space with parotiditis, acute kidney injury complicated by an infection-related glomerulonephritis.	<i>A. rimae</i> (1)	None	None	IV: ceftazidime, penicillin, and vancomycin (ND). Then amoxicillin-clavulanate (4) To finish oral clindamycin for a total of 2 months. Surgical drainage	Favorable	Devresse, 2016, Belgium [28]

AW: amenorrhea week, **IV:** Intravenous, **PO:** per os, **ND:** no data

*This case cannot be more detailed herein by the authors due to no availability of the report in Anglo-Saxon language



Bibliography

- [1] M. D. Collins and S. Wallbanks, "Comparative sequence analyses of the 16S rRNA genes of *Lactobacillus minutus*, *Lactobacillus rimae* and *Streptococcus parvulus*: proposal for the creation of a new genus *Atopobium*," *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 74, no. 2–3, pp. 235–240, Aug. 1992.
- [2] F. E. Dewhirst *et al.*, "The Human Oral Microbiome." [Online]. Available: <http://j.b.asm.org>. [Accessed: 08-Feb-2017].
- [3] M. Rajilić-Stojanović and W. M. de Vos, "The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota," *FEMS Microbiol. Rev.*, vol. 38, no. 5, pp. 996–1047, Sep. 2014.
- [4] W. Mottawea *et al.*, "Altered intestinal microbiota–host mitochondria crosstalk in new onset Crohn's disease," *Nat. Commun.*, vol. 7, Nov. 2016.
- [5] H. Mendes-Soares, V. Krishnan, M. L. Settles, J. Ravel, C. J. Brown, and L. J. Forney, "Fine-scale analysis of 16S rRNA sequences reveals a high level of taxonomic diversity among vaginal *Atopobium* spp.," *Pathog. Dis.*, vol. 73, no. 4, Jun. 2015.
- [6] M. J. Ferris, A. Masztal, K. E. Aldridge, J. D. Fortenberry, P. L. Fidel, and D. H. Martin, "Association of *Atopobium vaginae*, a recently described metronidazole resistant anaerobe, with bacterial vaginosis," *BMC Infect. Dis.*, vol. 4, p. 5, Feb. 2004.
- [7] R. Verhelst *et al.*, "Cloning of 16S rRNA genes amplified from normal and disturbed vaginal microflora suggests a strong association between *Atopobium vaginae*, *Gardnerella vaginalis* and bacterial vaginosis," *BMC Microbiol.*, vol. 4, p. 16, 2004.
- [8] D. W. Hilbert *et al.*, "Utilization of molecular methods to identify prognostic markers for recurrent bacterial vaginosis," *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 86, no. 2, pp. 231–242, Oct. 2016.
- [9] M. Romanik, D. Friedek, A. Wojciechowska-Wieja, and G. Martirosian, "[*Atopobium vaginae*: characterization and association with pathogenesis of bacterial vaginosis]," *Ginekol. Pol.*, vol. 77, no. 5, pp. 398–403, May 2006.
- [10] J. DOWNES *et al.*, "Characterisation of Eubacterium-like strains isolated from oral infections," *J. Med. Microbiol.*, vol. 50, no. 11, pp. 947–951, 2001.
- [11] S. Nikkari *et al.*, "Broad-Range Bacterial Detection and the Analysis of Unexplained Death and Critical Illness," *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 8, no. 2, pp. 188–194, Feb. 2002.
- [12] M.-F. Prère and O. A. Fayet, "A specific polymerase chain reaction test for the identification of *Streptococcus pneumoniae*," *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 70, no. 1, pp. 45–53, May 2011.
- [13] A. Kageyama, Y. Benno, and T. Nakase, "Phylogenic and Phenotypic Evidence for the Transfer of *Eubacterium fossor* to the Genus *Atopobium* as *Atopobium fossor* Comb. Nov.," *Microbiol. Immunol.*, vol. 43, no. 5, pp. 389–395, May 1999.
- [14] C. S. Bradshaw, S. N. Tabrizi, C. K. Fairley, A. N. Morton, E. Rudland, and S. M. Garland, "The association of *Atopobium vaginae* and *Gardnerella vaginalis* with bacterial vaginosis and recurrence after oral metronidazole therapy," *J. Infect. Dis.*, vol. 194, no. 6, pp. 828–836, Sep. 2006.
- [15] J.-P. Menard, F. Fenollar, M. Henry, F. Bretelle, and D. Raoult, "Molecular Quantification of *Gardnerella vaginalis* and *Atopobium vaginae* Loads to Predict Bacterial Vaginosis," *Clin. Infect. Dis.*, vol. 47, no. 1, pp. 33–43, Jul. 2008.
- [16] J.-P. Menard, "Antibacterial treatment of bacterial vaginosis: current and emerging therapies," *Int. J. Womens Health*, vol. 3, pp. 295–305, Aug. 2011.
- [17] D. N. Fredricks, T. L. Fiedler, K. K. Thomas, B. B. Oakley, and J. M. Marrazzo, "Targeted PCR for Detection of Vaginal Bacteria Associated with Bacterial Vaginosis," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 45, no. 10, pp. 3270–3276, Oct. 2007.
- [18] J. G. Kusters, E. A. Reuland, S. Bouter, P. Koenig, and J. W. Dorigo-Zetsma, "A multiplex real-time PCR assay for routine diagnosis of bacterial vaginosis," *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 34, no. 9, pp. 1779–1785, 2015.



- [19] Y. Yamagishi, H. Mikamo, K. Tanaka, and K. Watanabe, "A case of uterine endometritis caused by *Atopobium vaginae*," *J. Infect. Chemother. Off. J. Jpn. Soc. Chemother.*, vol. 17, no. 1, pp. 119–121, Feb. 2011.
- [20] W. Geißdörfer, C. Böhmer, K. Pelz, C. Schoerner, W. Frobenius, and C. Bogdan, "Tuboovarian Abscess Caused by *Atopobium vaginae* following Transvaginal Oocyte Recovery," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 41, no. 6, pp. 2788–2790, Jun. 2003.
- [21] C. E. Kazor *et al.*, "Diversity of bacterial populations on the tongue dorsa of patients with halitosis and healthy patients," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 41, no. 2, pp. 558–563, Feb. 2003.
- [22] M. Riggio *et al.*, "Molecular identification of bacteria on the tongue dorsum of subjects with and without halitosis," *Oral Dis.*, vol. 14, no. 3, pp. 251–258, Apr. 2008.
- [23] J. A. Aas *et al.*, "Bacteria of Dental Caries in Primary and Permanent Teeth in Children and Young Adults," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 46, no. 4, pp. 1407–1417, Apr. 2008.
- [24] P. Lif Holgerson, C. Öhman, A. Rönnlund, and I. Johansson, "Maturation of Oral Microbiota in Children with or without Dental Caries," *PLoS ONE*, vol. 10, no. 5, May 2015.
- [25] N. George *et al.*, "Oral microbiota species in acute apical endodontic abscesses," *J. Oral Microbiol.*, vol. 8, Mar. 2016.
- [26] J. F. W. Chan *et al.*, "First Report of Spontaneous Intrapartum *Atopobium vaginae* Bacteremia," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 50, no. 7, pp. 2525–2528, Jul. 2012.
- [27] M. Knoester, L. E. E. L. O. Lashley, E. Wessels, D. Oepkes, and E. J. Kuijper, "First Report of *Atopobium vaginae* Bacteremia with Fetal Loss after Chorionic Villus Sampling," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 49, no. 4, pp. 1684–1686, Apr. 2011.
- [28] A. Devresse, L. Labriola, T. Dossin, M. Vatlet, and P. Hantson, "*Atopobium rimae* bacteremia complicated by an infection-related glomerulonephritis in a cardiac transplanted patient," *Transpl. Infect. Dis.*, vol. 18, no. 4, pp. 637–638, Aug. 2016.
- [29] H.-Y. Chung *et al.*, "[A case of bacteremia by *Atopobium rimae* in a patient with liver cirrhosis]," *Korean J. Lab. Med.*, vol. 27, no. 5, pp. 351–354, Oct. 2007.
- [30] J.-C. Marvaud, F. Mory, and T. Lambert, "Clostridium clostridioforme and *Atopobium minutum* Clinical Isolates with VanB-Type Resistance in France ▽," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 49, no. 9, pp. 3436–3438, Sep. 2011.
- [31] H. Salimnia, A. Noronha, J. D. Sobel, and M. R. Fairfax, "Sepsis associated with a new *Atopobium* species, provisionally named *Atopobium detroitii*: Case report and review of the current status of the species *Atopobium*," *Scand. J. Infect. Dis.*, vol. 40, no. 8, pp. 679–681, Jan. 2008.
- [32] M. Oyaert *et al.*, "Sepsis with an *Atopobium*-Like Species in a Patient with Fournier's Gangrene," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 52, no. 1, pp. 364–366, Jan. 2014.
- [33] E. Angelakis, V. Roux, D. Raoult, and M. Drancourt, "Human Case of *Atopobium rimae* Bacteremia," *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 15, no. 2, pp. 354–355, Feb. 2009.
- [34] E. De Backer *et al.*, "Antibiotic susceptibility of *Atopobium vaginae*," *BMC Infect. Dis.*, vol. 6, p. 51, 2006.



III.2. Complément de l'article

III.2.1. Sélection des bactériémies

De façon rétrospective, nous avons sélectionné les patients ayant eu au moins une hémoculture positive à *Atopobium* sp au laboratoire de bactériologie du CHU de Toulouse depuis le début de l'identification des bactéries par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Entre avril 2014 et février 2016, 9 hémocultures positives à *Atopobium* sp. ont été isolées, correspondant à 8 patients.

Toutes les souches isolées d'hémocultures étant conservées congelées pendant 5 ans au laboratoire, nous avons également réidentifié par spectrométrie de masse les bactéries dont l'espèce n'a pu être identifiée ; *Bifidobacterium* sp, *Actinomyces* sp, *Peptostreptococcus* sp, *Lactobacillus* sp. et *Eubacterium* sp isolées d'hémocultures entre 2012 et avril 2014, afin de mettre en évidence la présence éventuelle d'isolats de *Atopobium* sp qui auraient été mal ou non identifiés par les galeries biochimiques utilisées durant cette période. La sélection de ces genres repose sur leur type respiratoire, ainsi que sur leur aspect à la coloration de Gram qui pourrait être similaire aux bactéries du genre *Atopobium*, à savoir que ce sont des bactéries Gram positif anaérobies ou anaérobies facultatives ; des bacilles droits ou incurvés pour *Eubacterium* sp ; des bacilles d'aspect branchés pour *Bifidobacterium* sp, *Actinomyces* sp ; des cocci en chaînettes pour *Peptostreptococcus* sp. Un total de 26 souches ont ainsi été ciblées dont seules 23 ont poussées en subculture : 2 souches de *Bifidobacterium* sp, 2 souches de *Actinomyces* sp, 18 souches de *Peptostreptococcus* sp. Aucune souche de *Lactobacillus* sp. et de *Eubacterium* sp n'ont été retrouvées sur cette période.

Par ailleurs, la base de données du système informatique du laboratoire a été interrogée sans succès pour retrouver un éventuel isolat de *Atopobium* identifié par séquençage du gène de l'ARNr 16S depuis 2012.



III.2.2. Aspect macroscopique et microscopique des sept isolats de *Atopobium*

Les aspects macroscopique et microscopique des sept isolats retrouvés dans notre collection de laboratoire parmi les huit cas de bactériémies inclus dans notre étude sont décrits dans ce paragraphe. Les colonies de *A. parvulum*, *A. rimae* et *A. vaginae* obtenues après 72h d'incubation sur gélose au sang sont très semblables à l'œil nu ; elles ont un aspect punctiforme (0.5-1 mm), translucides avec une couleur blanche grisâtre. L'aspect des colonies sur gélose au sang à la loupe binoculaire (grossissement X 10) après 72h d'incubation est légèrement différent en fonction des espèces : les colonies de *A. rimae* sont plus plates, mates et de couleur homogène blanche à grisâtre alors que les colonies de *A. parvulum* paraissent plus muqueuses et translucides. Les colonies de *A. vaginae* sont plus opaques au centre avec des bords translucides (Figure 3).

L'aspect de bactéries à Gram positif, non sporulées retrouvé à la coloration de Gram est concordant avec ce qui est rapporté dans la littérature. Les souches de *A. rimae* ont l'aspect de petits bacilles effilés, seuls ou par paires avec un aspect parfois pseudo-branchés (Figure 4, photo C). De plus, *A. rimae* est pléomorphe, puisqu'après 10 jours de culture sans repiquage en anaérobiose, on observe de longues et fines chainettes coccobacillaires visibles sur la Figure 4, photo B. Sur cette même photo, il y a aussi des formes de *Enterococcus faecalis* (gros cocci Gram positif) permettant de se rendre compte de la petite taille de *A. rimae*. *A. vaginae* et *A. parvulum* ont l'aspect de petits cocci. Ils sont isolés, par paires ou forment de courtes chainettes ou de petits amas (Figure 4, photo A, D, E). *A. parvulum* apparaît parfois sous forme de gros amas (Figure 4, photo F).



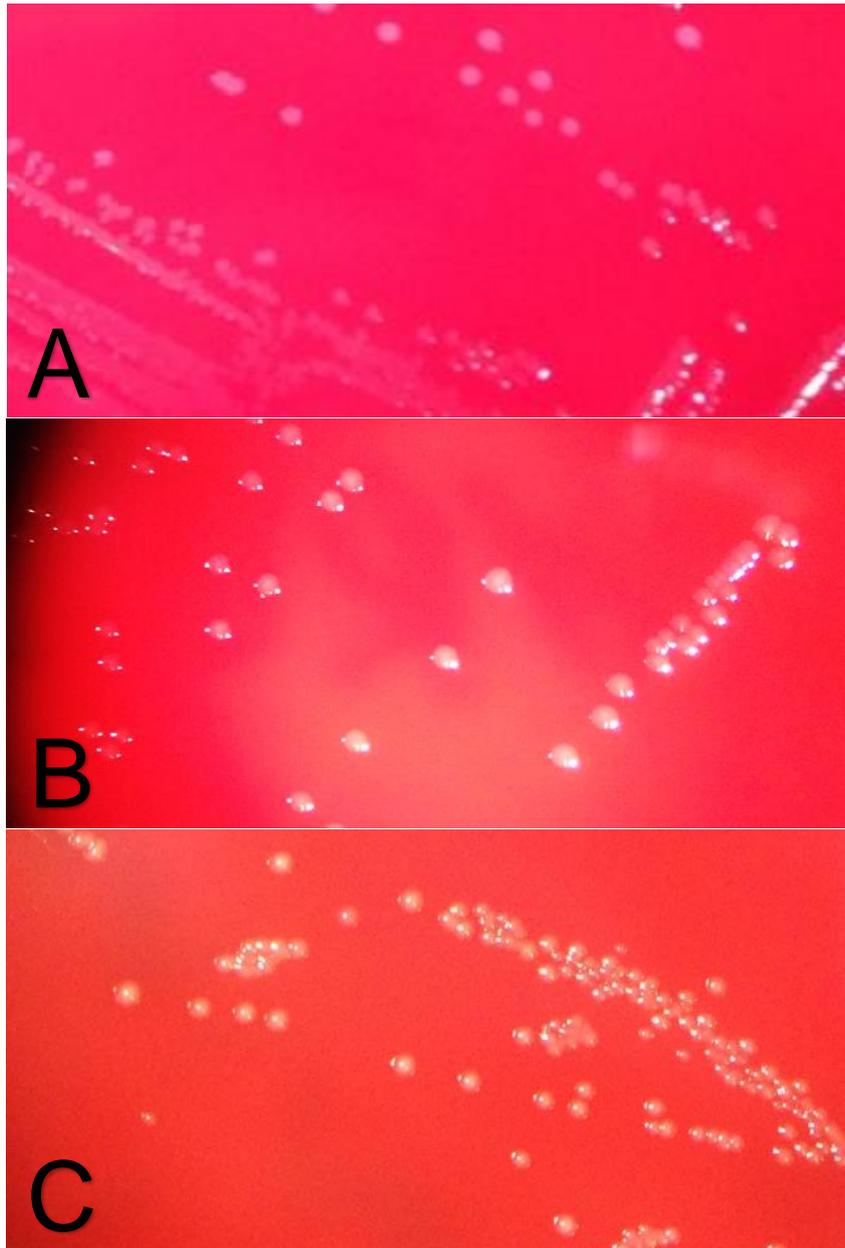


Figure 3 Colonies sur gélose au sang après 72h d'incubation en anaérobiose : loupe binoculaire X10

A : Colonies de *A. rimae*, homogènes, lisses, translucides, blanches/ grisâtres

B : Colonies de *A. parvulum* lisses, grisâtres

C : Colonies de *A. vaginae* lisses, centre opaque, grisâtres, contours translucides



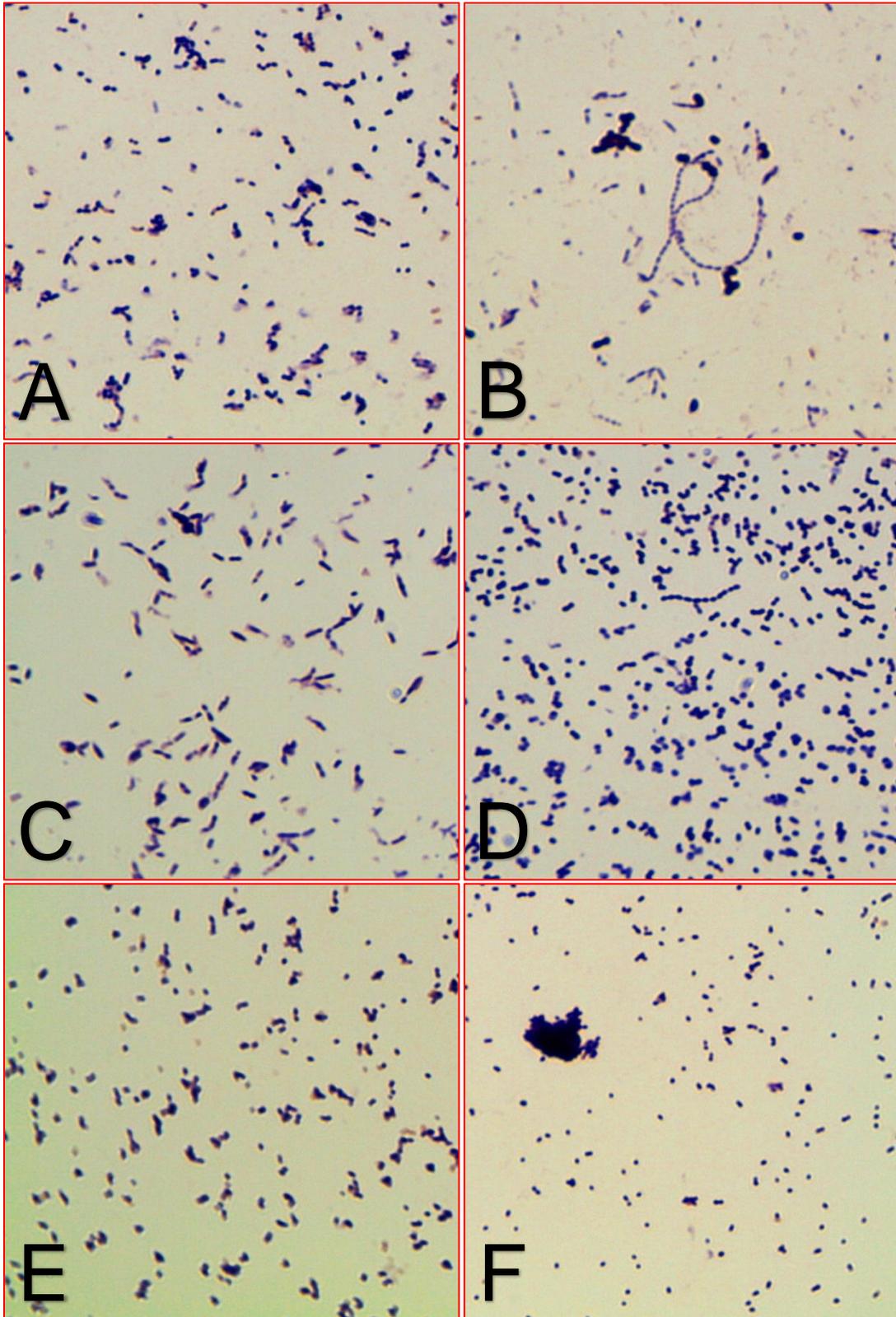


Figure 4 Coloration de Gram, Microscope (X 1000)

A: *A. vaginae*, cocci à Gram positif, seuls, par paires ou en chaînettes

B: *A. rimae* après 10j en culture : formation de longues et fines chaînettes (associé à un *E. faecalis*, gros cocci à Gram positif en diplocoques et en chaînettes)

C: *A. rimae*, petits bacilles à Gram positif, effilés seuls ou par paires.

D: *A. vaginae* (patient 1) : aspect similaire au Gram A mais les cocci semblent plus grands

E: *A. parvulum* : cocci à Gram positif, seuls, par paires ou courtes chaînettes

F: *A. parvulum* (patient 4) : formation en amas



III.2.3. Identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF

III.2.3.1 Principe

La spectrométrie de masse est basée sur la séparation de molécules ionisées en fonction de leur masse et de leur charge. La particularité de la spectrométrie de masse MALDI TOF réside dans la méthode d'ionisation qui utilise un laser UV assisté d'une matrice et également par l'analyseur qui détermine le temps de vol des ions, proportionnel à leur rapport masse sur charge (m/z).

L'échantillon à analyser est déposé sur une plaque métallique puis recouvert d'une matrice organique d'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique qui va cristalliser avec l'échantillon. Cette matrice va permettre le transfert d'énergie du laser UV à l'échantillon sans destruction des molécules fragiles que sont les peptides, les protéines, et les glycoprotéines, ces dernières vont être ionisées et mises en suspension dans un vide poussé.

Les ions générés vont être accélérés par un champ électrostatique et envoyé dans l'analyseur de temps de vol (« time of flight ») qui est un tube dans lequel règne un vide poussé (10^{-7} mbar) permettant aux ions d'avoir un cheminement linéaire dont la vitesse et le temps de vol est proportionnel au rapport m/z , les petites molécules ayant un temps de vol plus court (Figure 5).

Enfin les ions atteignent le détecteur et un spectre est formé dont la hauteur des pics est proportionnelle à l'abondance relative d'un ion de rapport m/z donné [57].



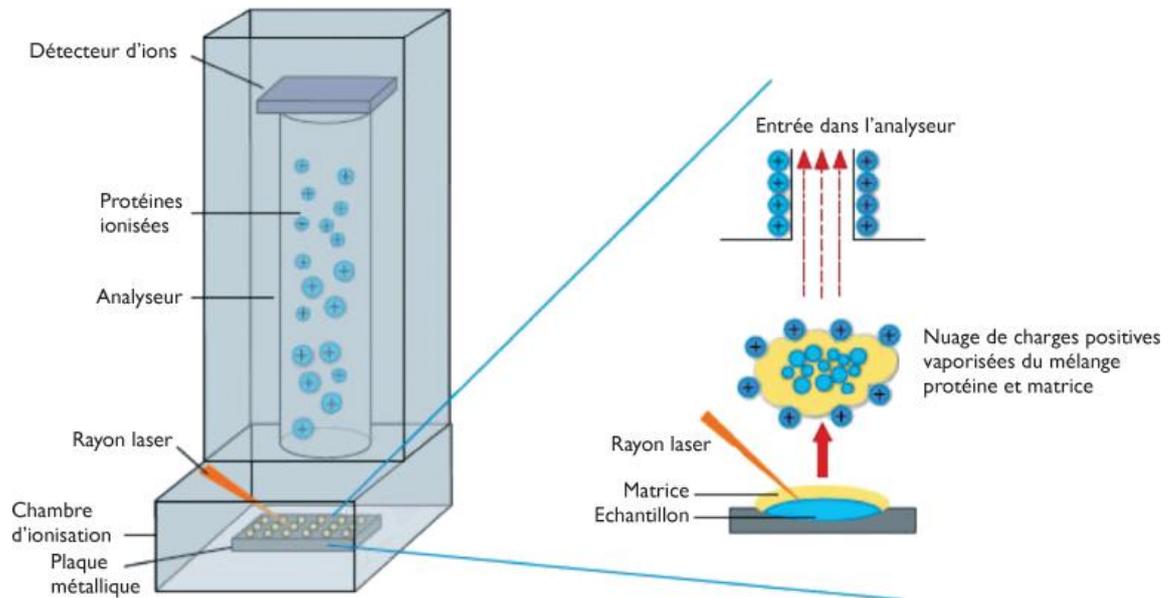


Figure 5 : Principe de fonctionnement du MALDI TOF-MS.

Source : Riat et al [57]

III.2.3.2 Identification et règles d'interprétation :

L'identification microbienne par MALDI-TOF MS est basée sur la comparaison du spectre de protéines (comprises entre 2 et 20kDa) obtenu avec une banque de donnée de spectres consensus d'une espèce ou de spectres individuels, chacun obtenu à partir d'une souche unique (méthode Bruker). On obtient ainsi un score de confiance arbitraire entre 0 et 3 reflétant la ressemblance du spectre analysé avec ceux de la base de données. Un score supérieur ou égal à 2.0 permet l'identification correcte au niveau de l'espèce, entre 1.7 et 2 l'identification est correcte au niveau du genre et aucune identification n'est possible avec une score strictement inférieur à 1.7 [58]. Pour valider l'identification, une bonne discrimination entre les identifications est nécessaire avec une différence de score supérieure ou égale à 0.2 communément admise.

L'identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF a été réalisée sur colonies après 48h de culture sans extraction protéique préalable.

III.2.3.3 Réidentification de souches par spectrométrie de masse

L'ensemble des identifications des isolats initialement identifiés en routine comme *Actinomyces* sp, *Bifidobacterium* sp et *Peptostreptococcus* sp ont donné un résultat concordant avec l'identification par spectrométrie de masse.

Pour *Actinomyces* sp et *Bifidobacterium* sp, l'identification rétrospective au genre était correcte (Tableau 5) pour les 4 isolats testés et l'utilisation de la spectrométrie de masse a permis de déterminer l'espèce de ces isolats.

Pour *Peptostreptococcus* sp, la spectrométrie de masse a identifié 16 souches de *Parvimonas micra*, une souche de *Peptoniphilus harei*, et une souche de *Streptococcus pleomorphus*, toutes ces espèces étant proche taxonomiquement et appartenant anciennement au genre *Peptostreptococcus* [65], [66], [67].

Nous n'avons donc pas retrouvé de souche de *Atopobium* isolée d'hémoculture qui aurait été non ou incorrectement identifiée au laboratoire avant l'utilisation de la spectrométrie de masse. La survenue de 8 cas de bactériémies à *Atopobium* en 23 mois (d'avril 2014 à février 2016) mais l'absence de cas pendant les 27 mois précédents nous a demandé de rechercher une modification de pratique autre que la méthode d'identification bactérienne dans notre laboratoire. Le changement de système d'hémocultures BactAlert (BioMérieux) pour le système BacTec (Becton-Dickinson) à l'automne 2014 pourrait être la raison de ce changement épidémiologique des bactériémies à *Atopobium*. Le milieu de culture anaérobie des flacons du système BacTec, ou la méthode et les algorithmes de détection de croissance de ce système pourraient être plus propices à la mise en évidence de bactériémies à *Atopobium*.



Tableau 5 Résultats des identifications par spectrométrie de masse.

Identification initiale de routine par galerie biochimique (nombre de souches)	Identification rétrospective par spectromètre de masse
<i>Actinomyces</i> sp (2)	<i>Actinomyces europaeus</i> (1) <i>Actinomyces oris</i> (1)
<i>Bifidobacterium</i> sp (2)	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> (1) <i>Bifidobacterium longum</i> (1)
<i>Peptostreptococcus</i> sp (19)	<i>Parvimonas micra</i> (16) <i>Peptoniphilus harei</i> (1) <i>Streptococcus pleomorphus</i> (1)

III.2.4. Confirmation de l'identification par séquençage

La confirmation de l'identification a été réalisée par le séquençage partiel du gène de l'ARN ribosomal (ARNr) 16S par la méthode de Sanger. Cette analyse étant considérée comme la méthode de référence, et une des méthodes utilisées actuellement pour la classification taxonomique bactérienne. Les conditions de PCR sont décrites en annexe 1.

III.2.4.1 Généralités sur le gène de l'ARN ribosomal 16S

Le gène de l'ARNr 16S est très utilisé en identification bactérienne en raison de son caractère très conservé dans l'évolution et de sa répartition universelle parmi les bactéries. En effet, l'ARNr 16S est un constituant de la petite sous-unité 30S du ribosome des procaryotes permettant la traduction des ARN messager en protéine. Il est donc indispensable au métabolisme bactérien.

Le gène de l'ARNr 16S fait environ 1500 paires de bases et est constitué de 9 régions hypervariables et de régions conservées encadrant ces régions hypervariable [59] (Figure 6). Les 9 régions hypervariables V1 à V9 s'étendent respectivement entre les positions 69-99, 137-242, 433-497, 576-682, 822-879, 986-1043, 1117-1173, 1243-1294 et 1435-1465 en se basant sur le génome d'*E. coli* [60]. Les régions variables sont amplifiées grâce à des amorces situées dans les régions conservées.



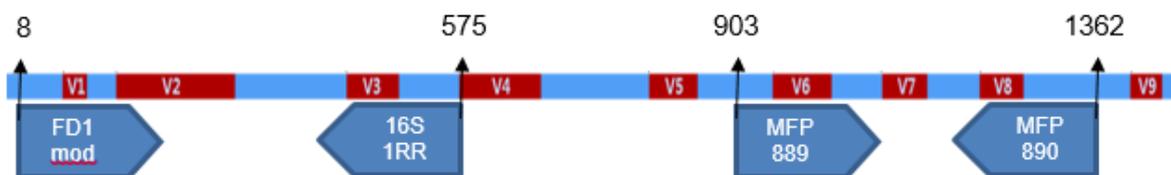


Figure 6 Représentation schématique du gène de l'ARN 16S avec les amorces utilisées pour le séquençage.

Schéma issu de <https://chunlab.wordpress.com/16s-rna-and-16s-rna-gene/>, D'après Chakravorty et al [60].

III.2.4.2 Critères pour l'identification bactérienne

A l'heure actuelle, la méthode utilisée pour définir une espèce est le séquençage du gène de l'ARN ribosomal 16S, mais malheureusement, il n'existe pas de seuil d'homologie entre deux séquences clairement défini pour conclure que ces dernières appartiennent à la même espèce et le séquençage complet du gène est onéreux [61].

Des recommandations ont été proposées par Drancourt *et al* [62], [63] recommandant un minimum de 500 à 525 paires de bases séquencées (idéalement le génome complet) avec un minimum de 99% (idéalement 99.5%) d'homologie pour une identification au niveau de l'espèce. L'identification devrait se faire par rapport à une souche de référence caractérisée par la méthode de l'hybridation ADN-ADN. Pour les souches ayant moins de 0.5% de différence avec la seconde identification proposée, il est nécessaire pour conclure d'avoir recours à d'autres techniques notamment phénotypiques.

Néanmoins en pratique, dans la littérature, les seuils d'interprétation sont variables et sont fixés de façon différente en fonction des études.

III.2.4.3 Choix des amorces :

Nous avons amplifié deux portions du gène, une première séquence utilisant les amorces de routine du laboratoire MFP889 (5'_TCAA(A/G/T)GAATTGACGGGGGC_3') et MFP890 (5'_GGCCCGGAACGTATTAC_3') [64]. Ces amorces amplifient les régions variables V6, V7, V8 du gène de l'ARNr 16S. Les amorces se fixent respectivement en position 903–922 et 1380-1362 du gène de l'ARN ribosomal 16S. Afin d'obtenir des séquences de longueur suffisantes (> 550 paires de bases) pour confirmer l'identification des isolats de *Atopobium* au niveau de l'espèce, en augmentant la discrimination entre espèces, nous avons identifié grâce à la base de données du National Center for Biotechnology Information (NCBI) que la région

la plus discriminante pour les différentes espèces de *Atopobium* correspond aux 500 premières bases des régions variables V1, V2, V3.

Nous avons choisi les amorces largement décrites dans la littérature FD1mod (5'_AGAGTTTGATCYTGGYTYAG_3') et 16S1RR (5'_CTTTACGCCCARTRAWTCCG_3') se fixant respectivement en position 8-27 et 556-575 du gène de l'ARN ribosomal 16S.

III.2.4.4 Alignement des séquences et détermination de l'identification

Nous avons dans un premier temps aligné les séquences homologues à l'aide du logiciel MEGA 7. Nous les avons ensuite concaténées, c'est-à-dire que nous avons accolé la séquence correspondant aux régions V1, V2, V3 avec celle correspondant aux régions V6, V7, V8. Enfin, nous avons procédé à la comparaison des séquences obtenues avec la banque de données du NCBI GenBank grâce au logiciel BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, paramètres par défaut). Nous avons considéré l'identification correcte au niveau de l'espèce lorsque le degré d'homologie était supérieur à 99.5% avec au moins 0.5% de différence avec la seconde identification conformément aux recommandations de Drancourt *et al* mais nous n'avons pas exigé que la souche de référence soit caractérisée par hybridation ADN-ADN car aucune souche d'*Atopobium* de la base de données ne l'a été.



III.2.4.5 Création d'un arbre phylogénétique

Nous avons réalisé un arbre phylogénétique afin de vérifier la bonne identification de nos souches isolées d'hémocultures, et de mettre en évidence les relations taxonomiques entre les espèces de *Atopobium*. A partir des séquences du gène de l'ARN ribosomal 16S concaténés obtenues à partir des souches de *Atopobium* issues d'hémoculture ainsi que de séquences du gène de l'ARN ribosomal 16S complet obtenues à partir de la banque de données du NCBI GenBank, nous avons aligné ces séquences grâce au logiciel MEGA 7 (en utilisant les paramètres par défaut) puis créé un arbre phylogénétique par la méthode du Neighbour Joining. L'ensemble des séquences ont été alignées et coupées à la même longueur de 697 nucléotides, ceci en raison de longueurs différentes des séquences obtenues et de celles présentes dans la base de données, les premiers nucléotides et les derniers étant fréquemment absents des séquences enregistrées dans la banque de donnée, et nos séquences ont également une longueur variable notamment en raison de la présence d'artéfacts aux niveau des extrémités. L'arbre phylogénétique a été enraciné avec 2 séquences de *Eggerthella lenta*, espèce appartenant au phylum des *Actinobacteria*.

Cet arbre montre la bonne discrimination entre les espèces puisque les séquences appartenant à une même espèce sont bien individualisées au sein de clade unique pour chacune d'elles.

Par ailleurs, cette analyse phylogénétique montre que les espèces de *A. rimae* et *A. parvulum* sont proche, cette proximité est cohérente avec leurs apparents habitats ORL et digestif communs. Avec un habitat génitale féminin, *A. vaginae* semble plus éloignée phylogénétiquement des autres espèces de *Atopobium* (Figure 7).



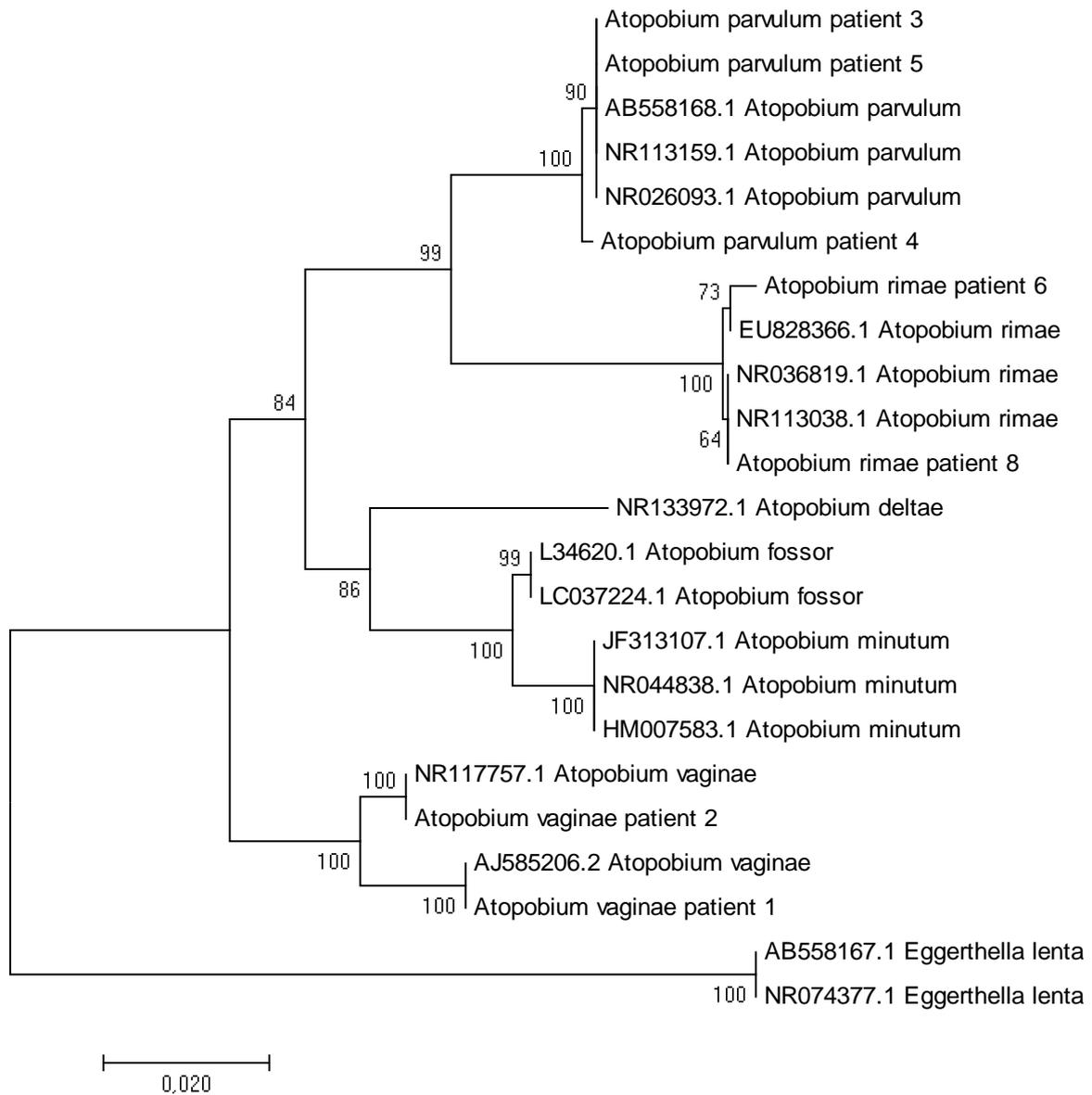


Figure 7 Arbre phylogénétique d'*Atopobium* spp.

Réalisé par la méthode du neighbor joining. Les bootstraps de chaque branche sont reportées.

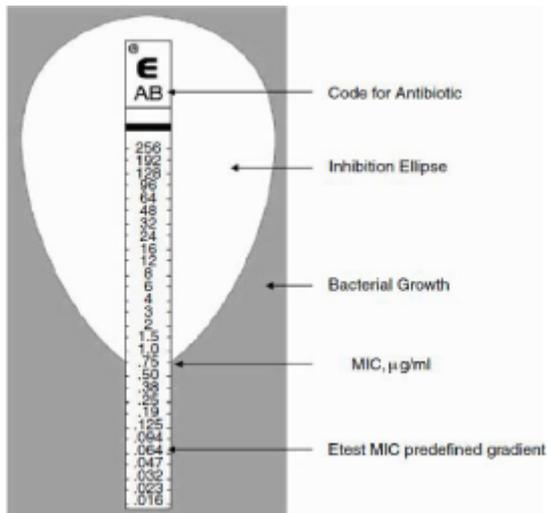
III.2.5. Détermination de la sensibilité aux antibiotiques

La sensibilité aux antibiotiques des souches d'*Atopobium* issues d'hémocultures a été déterminée par la méthode de l'épsilomètre (type Etest®) par diffusion en milieu gélosé car celle-ci montre une bonne corrélation avec la méthode de référence qui est la dilution en milieu liquide, plus fastidieuse et difficile à mettre en place notamment pour les bactéries anaérobies. L'épsilomètre est une fine bandelette de plastique non poreux imprégnée sur sa face inférieure par un gradient exponentiel et prédéfini d'antibiotique. Lors de l'application de la bandelette à la surface de la gélose, il se produit un transfert immédiat de l'antibiotique sur la gélose, recréant le gradient le long de la bandelette. Après incubation on observe une zone d'inhibition en forme d'ellipse répartie symétriquement de chaque côté de la bandelette, dont le point d'intersection avec l'extrémité inférieure de la zone d'inhibition indique la CMI de la souche, lisible directement sur la bandelette (Figure 8).

En l'absence de recommandation de l'EUCAST concernant la réalisation des antibiogrammes d'anaérobies, nous avons suivi les recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie 2013 (CA-SFM 2013). A partir d'une culture de 48 h sur gélose Columbia + 5 % de sang de mouton (COS, Biomérieux, France), une suspension de 1 McFarland a été réalisé et ensemencé sur gélose Brucella + vitamine K1 (1 mg/L) + 5 % de sang de mouton à l'aide d'un écouvillon. La lecture a été réalisée par deux opérateurs après 48 h d'incubation à 35 °C en anaérobiose.

Nous avons choisi d'étudier la plupart des molécules utilisées pour le traitement des anaérobies, amoxicilline-acide clavulanique, méropénème, métronidazole, clindamycine, et également les molécules utilisées en probabiliste au cours des bactériémies telle la ceftriaxone ainsi que la vancomycine en raison de son activité sur les bactéries à Gram positif. Les fluoroquinolones ont été testées car sont utilisées en monothérapie dans un des cas de bactériémie.





IV. Conclusion

A. vaginae, *A. rimae* et *A. parvulum* sont les espèces les plus fréquentes et sont présentes dans différents microbiotes chez l'homme, *A. vaginae* dans la flore vaginale, *A. parvulum* et *A. rimae* dans les flores ORL et digestives. Ces espèces sont liées de façon plus ou moins spécifiques à des pathologies secondaires à un déséquilibre de la flore bactérienne. La vaginose bactérienne est la plus étudiée de ces pathologies et semble liée à la présence de *A. vaginae* de façon spécifique, en étant largement absente de la flore génitale normale. L'habitat et le pouvoir pathogène de *A. rimae* et *A. parvulum* restent néanmoins peu étudiés à ce jour.

Nous avons rapporté la présentation clinique de 3 bactériémies à *A. rimae*, 3 bactériémies à *A. parvulum* et 2 bactériémies à *A. vaginae*. Selon notre série de cas et les 7 cas rapportés dans la littérature, les bactériémies à *Atopobium* ont été fréquemment associées à une infection locale polymicrobienne ; de plus les bactériémies étaient polymicrobiennes dans 4 cas sur 15. Ces infections à *A. rimae* et *A. parvulum* ont principalement eu lieu chez des patients présentant de préférence une source d'infection orale ou digestive alors que les bactériémies à *A. vaginae* se sont produites dans un contexte d'infection des voies génitales. Dans notre série de cas, les six bactériémies à *A. rimae* ou *A. parvulum* se sont produites chez des patients atteints de néoplasie contrairement aux deux bactériémies à *A. rimae* précédemment rapportées.

Dans l'ensemble, les espèces de *Atopobium* semblent être faiblement virulentes lors de bactériémies, celles-ci étant probablement favorisées par des facteurs locaux tels que la néoplasie, les procédures invasives ou les infections polymicrobiennes qui endommagent la barrière épithéliale. Dans la grande majorité des cas, ces bactériémies ont été résolutive avec un traitement antibiotique empirique à large spectre et éventuellement chirurgical, adapté au foyer infectieux.

Les espèces du genre *Atopobium* semblent sensibles de façon constante aux pénicillines, aux céphalosporines de 3ème génération et aux carbapénèmes, ainsi qu'à la clindamycine. Contrairement aux autres espèces, *A. vaginae* et l'unique souche de *A. deltae* rapportée semblent être largement résistants au métronidazole ; la concordance entre leurs résistances *in vitro* et *in vivo* reste à déterminer.



Nous n'avons pas réussi au cours de ce travail à mettre en évidence de souches de *Atopobium* issues d'hémocultures qui auraient pu être mal identifiées avant l'utilisation de la spectrométrie de masse MALDI-TOF pour l'identification bactérienne dans notre laboratoire depuis avril 2014. L'hypothèse d'une mauvaise identification de souches de *Atopobium* par les méthodes conventionnelles reste possible pour expliquer la survenue inhabituellement élevée de ces cas de bactériémies entre avril 2014 et février 2016. Le changement de système d'hémocultures BactAlert (BioMérieux) pour le système BacTec (Becton-Dickinson) à l'automne 2014 pourrait aussi être une raison de ce changement épidémiologique des bactériémies à *Atopobium*.

Notre série de bactériémies à *Atopobium* associée à l'analyse de la littérature pourront guider l'interprétation de futures hémocultures positives à *Atopobium* et faciliter leur prise en charge.



Références bibliographiques

- [1] M. D. Collins and S. Wallbanks, "Comparative sequence analyses of the 16S rRNA genes of *Lactobacillus minutus*, *Lactobacillus rimae* and *Streptococcus parvulus*: proposal for the creation of a new genus *Atopobium*," *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 74, no. 2–3, pp. 235–240, Aug. 1992.
- [2] A. Kageyama, Y. Benno, and T. Nakase, "Phylogenic and Phenotypic Evidence for the Transfer of *Eubacterium fossor* to the Genus *Atopobium* as *Atopobium fossor* Comb. Nov.," *Microbiol. Immunol.*, vol. 43, no. 5, pp. 389–395, May 1999.
- [3] M. Rodriguez Jovita, M. D. Collins, B. Sjöden, and E. Falsen, "Characterization of a novel *Atopobium* isolate from the human vagina: description of *Atopobium vaginae* sp. nov.," *Int. J. Syst. Bacteriol.*, vol. 49 Pt 4, pp. 1573–1576, Oct. 1999.
- [4] P. Cools, M. Oyaert, M. Vaneechoutte, E. De Laere, and S. Vervaeke, "*Atopobium deltae* sp. nov., isolated from the blood of a patient with Fournier's gangrene," *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, vol. 64, no. Pt 9, pp. 3140–3145, Sep. 2014.
- [5] R. S. Gupta, W. J. Chen, M. Adeolu, and Y. Chai, "Molecular signatures for the class Coriobacteriia and its different clades; proposal for division of the class Coriobacteriia into the emended order Coriobacteriales, containing the emended family Coriobacteriaceae and Atopobiaceae fam. nov., and Eggerthellales ord. nov., containing the family Eggerthellaceae fam. nov.," *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, vol. 63, no. Pt 9, pp. 3379–3397, Sep. 2013.
- [6] M. Ventura *et al.*, "Genomics of Actinobacteria: Tracing the Evolutionary History of an Ancient Phylum," *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR*, vol. 71, no. 3, pp. 495–548, Sep. 2007.
- [7] D. N. Fredricks, T. L. Fiedler, and J. M. Marrazzo, "Molecular Identification of Bacteria Associated with Bacterial Vaginosis," *N. Engl. J. Med.*, vol. 353, no. 18, pp. 1899–1911, Nov. 2005.
- [8] R. Romero *et al.*, "The composition and stability of the vaginal microbiota of normal pregnant women is different from that of non-pregnant women," *Microbiome*, vol. 2, p. 4, Feb. 2014.
- [9] B. Jacobsson, P. Pernevi, L. Chidekel, and J. Jörgen Platz-Christensen, "Bacterial vaginosis in early pregnancy may predispose for preterm birth and postpartum endometritis," *Acta Obstet. Gynecol. Scand.*, vol. 81, no. 11, pp. 1006–1010, Nov. 2002.
- [10] S. G. Ralph, A. J. Rutherford, and J. D. Wilson, "Influence of bacterial vaginosis on conception and miscarriage in the first trimester: cohort study," *BMJ*, vol. 319, no. 7204, pp. 220–223, Jul. 1999.
- [11] G. Işık, Ş. Demirezen, H. G. Dönmez, and M. S. Beksaç, "Bacterial vaginosis in association with spontaneous abortion and recurrent pregnancy losses," *J. Cytol. Indian Acad. Cytol.*, vol. 33, no. 3, pp. 135–140, 2016.
- [12] S. L. Hillier *et al.*, "Association between Bacterial Vaginosis and Preterm Delivery of a Low-Birth-Weight Infant," *N. Engl. J. Med.*, vol. 333, no. 26, pp. 1737–1742, Dec. 1995.
- [13] T. E. Taha *et al.*, "Bacterial vaginosis and disturbances of vaginal flora: association with increased acquisition of HIV," *AIDS Lond. Engl.*, vol. 12, no. 13, pp. 1699–1706, Sep. 1998.
- [14] R. P. Nugent, M. A. Krohn, and S. L. Hillier, "Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram stain interpretation," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 29, no. 2, pp. 297–301, Feb. 1991.



- [15] C. S. Bradshaw, S. N. Tabrizi, C. K. Fairley, A. N. Morton, E. Rudland, and S. M. Garland, "The association of *Atopobium vaginae* and *Gardnerella vaginalis* with bacterial vaginosis and recurrence after oral metronidazole therapy," *J. Infect. Dis.*, vol. 194, no. 6, pp. 828–836, Sep. 2006.
- [16] J.-P. Menard, F. Fenollar, M. Henry, F. Bretelle, and D. Raoult, "Molecular Quantification of *Gardnerella vaginalis* and *Atopobium vaginae* Loads to Predict Bacterial Vaginosis," *Clin. Infect. Dis.*, vol. 47, no. 1, pp. 33–43, Jul. 2008.
- [17] J.-P. Menard, C. Mazouni, F. Fenollar, D. Raoult, L. Boubli, and F. Bretelle, "Diagnostic accuracy of quantitative real-time PCR assay versus clinical and Gram stain identification of bacterial vaginosis," *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol.*, vol. 29, no. 12, pp. 1547–1552, Dec. 2010.
- [18] J. G. Kusters, E. A. Reuland, S. Bouter, P. Koenig, and J. W. Dorigo-Zetsma, "A multiplex real-time PCR assay for routine diagnosis of bacterial vaginosis," *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 34, no. 9, pp. 1779–1785, 2015.
- [19] C. Kenyon, R. Colebunders, and T. Crucitti, "The global epidemiology of bacterial vaginosis: a systematic review," *Am. J. Obstet. Gynecol.*, vol. 209, no. 6, pp. 505–523, Dec. 2013.
- [20] J. R. Schwebke, S. L. Hillier, J. D. Sobel, J. A. McGregor, and R. L. Sweet, "Validity of the vaginal gram stain for the diagnosis of bacterial vaginosis," *Obstet. Gynecol.*, vol. 88, no. 4 Pt 1, pp. 573–576, Oct. 1996.
- [21] B. E. Sha, H. Y. Chen, Q. J. Wang, M. R. Zariffard, M. H. Cohen, and G. T. Spear, "Utility of Amsel Criteria, Nugent Score, and Quantitative PCR for *Gardnerella vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, and *Lactobacillus* spp. for Diagnosis of Bacterial Vaginosis in Human Immunodeficiency Virus-Infected Women," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 43, no. 9, pp. 4607–4612, Sep. 2005.
- [22] P. Brocklehurst, A. Gordon, E. Heatley, and S. J. Milan, "Antibiotics for treating bacterial vaginosis in pregnancy," *Cochrane Database Syst. Rev.*, no. 1, p. CD000262, Jan. 2013.
- [23] F. Bretelle *et al.*, "High *Atopobium vaginae* and *Gardnerella vaginalis* Vaginal Loads Are Associated With Preterm Birth," *Clin. Infect. Dis.*, vol. 60, no. 6, pp. 860–867, Mar. 2015.
- [24] H. Mendes-Soares, V. Krishnan, M. L. Settles, J. Ravel, C. J. Brown, and L. J. Forney, "Fine-scale analysis of 16S rRNA sequences reveals a high level of taxonomic diversity among vaginal *Atopobium* spp.," *Pathog. Dis.*, vol. 73, no. 4, Jun. 2015.
- [25] E. De Backer *et al.*, "Antibiotic susceptibility of *Atopobium vaginae*," *BMC Infect. Dis.*, vol. 6, p. 51, 2006.
- [26] M. J. Ferris, A. Masztal, K. E. Aldridge, J. D. Fortenberry, P. L. Fidel, and D. H. Martin, "Association of *Atopobium vaginae*, a recently described metronidazole resistant anaerobe, with bacterial vaginosis," *BMC Infect. Dis.*, vol. 4, p. 5, Feb. 2004.
- [27] D. N. Fredricks, T. L. Fiedler, K. K. Thomas, C. M. Mitchell, and J. M. Marrazzo, "Changes in Vaginal Bacterial Concentrations with Intravaginal Metronidazole Therapy for Bacterial Vaginosis as Assessed by Quantitative PCR," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 47, no. 3, pp. 721–726, Mar. 2009.
- [28] L. Hardy *et al.*, "Unravelling the Bacterial Vaginosis-Associated Biofilm: A Multiplex *Gardnerella vaginalis* and *Atopobium vaginae* Fluorescence In Situ Hybridization Assay Using Peptide Nucleic Acid Probes," *PLoS One*, vol. 10, no. 8, p. e0136658, 2015.
- [29] J. L. PATTERSON, P. H. GIRERD, N. W. KARJANE, and K. K. JEFFERSON, "Effect of biofilm phenotype on resistance of *Gardnerella vaginalis* to hydrogen peroxide and lactic acid," *Am. J. Obstet. Gynecol.*, vol. 197, no. 2, p. 170.e1-170.e7, Aug. 2007.



- [30] J. L. Patterson, A. Stull-Lane, P. H. Girerd, and K. K. Jefferson, "Analysis of adherence, biofilm formation and cytotoxicity suggests a greater virulence potential of *Gardnerella vaginalis* relative to other bacterial-vaginosis-associated anaerobes," *Microbiology*, vol. 156, no. Pt 2, pp. 392–399, Feb. 2010.
- [31] H. Verstraelen and R. Verhelst, "Bacterial vaginosis: an update on diagnosis and treatment," *Expert Rev. Anti Infect. Ther.*, vol. 7, no. 9, pp. 1109–1124, Nov. 2009.
- [32] C. S. Bradshaw *et al.*, "High recurrence rates of bacterial vaginosis over the course of 12 months after oral metronidazole therapy and factors associated with recurrence," *J. Infect. Dis.*, vol. 193, no. 11, pp. 1478–1486, Jun. 2006.
- [33] "Pelvic Inflammatory Disease: Guidelines for Prevention and Management." [Online]. Available: <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00031002.htm>. [Accessed: 23-Mar-2017].
- [34] B. D. Taylor, T. Darville, and C. L. Haggerty, "Does bacterial vaginosis cause pelvic inflammatory disease?," *Sex. Transm. Dis.*, vol. 40, no. 2, pp. 117–122, Feb. 2013.
- [35] H. C. Wiesenfeld, S. L. Hillier, M. A. Krohn, D. V. Landers, and R. L. Sweet, "Bacterial vaginosis is a strong predictor of *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* infection," *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.*, vol. 36, no. 5, pp. 663–668, Mar. 2003.
- [36] C. L. Haggerty *et al.*, "Identification of novel microbes associated with pelvic inflammatory disease and infertility," *Sex. Transm. Infect.*, vol. 92, no. 6, pp. 441–446, Sep. 2016.
- [37] W. Geißdörfer, C. Böhmer, K. Pelz, C. Schoerner, W. Frobenius, and C. Bogdan, "Tuboovarian Abscess Caused by *Atopobium vaginae* following Transvaginal Oocyte Recovery," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 41, no. 6, pp. 2788–2790, Jun. 2003.
- [38] Y. Yamagishi, H. Mikamo, K. Tanaka, and K. Watanabe, "A case of uterine endometritis caused by *Atopobium vaginae*," *J. Infect. Chemother. Off. J. Jpn. Soc. Chemother.*, vol. 17, no. 1, pp. 119–121, Feb. 2011.
- [39] J. K. Hebb, C. R. Cohen, S. G. Astete, E. A. Bukusi, and P. A. Totten, "Detection of novel organisms associated with salpingitis, by use of 16S rDNA polymerase chain reaction," *J. Infect. Dis.*, vol. 190, no. 12, pp. 2109–2120, Dec. 2004.
- [40] M. Rajilić-Stojanović and W. M. de Vos, "The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota," *FEMS Microbiol. Rev.*, vol. 38, no. 5, pp. 996–1047, Sep. 2014.
- [41] T. Takeshita *et al.*, "Discrimination of the oral microbiota associated with high hydrogen sulfide and methyl mercaptan production," *Sci. Rep.*, vol. 2, Jan. 2012.
- [42] C. E. Kazor *et al.*, "Diversity of bacterial populations on the tongue dorsa of patients with halitosis and healthy patients," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 41, no. 2, pp. 558–563, Feb. 2003.
- [43] M. Riggio *et al.*, "Molecular identification of bacteria on the tongue dorsum of subjects with and without halitosis," *Oral Dis.*, vol. 14, no. 3, pp. 251–258, Apr. 2008.
- [44] N. George *et al.*, "Oral microbiota species in acute apical endodontic abscesses," *J. Oral Microbiol.*, vol. 8, Mar. 2016.
- [45] B. Kouidhi, Y. M. A. Al Qurashi, and K. Chaieb, "Drug resistance of bacterial dental biofilm and the potential use of natural compounds as alternative for prevention and treatment," *Microb. Pathog.*, vol. 80, pp. 39–49, Mar. 2015.
- [46] N. Kianoush, C. J. Adler, K.-A. T. Nguyen, G. V. Browne, M. Simonian, and N. Hunter, "Bacterial Profile of Dentine Caries and the Impact of pH on Bacterial Population Diversity," *PLoS ONE*, vol. 9, no. 3, Mar. 2014.



- [47] P. Lif Holgerson, C. Öhman, A. Rönnlund, and I. Johansson, "Maturation of Oral Microbiota in Children with or without Dental Caries," *PLoS ONE*, vol. 10, no. 5, May 2015.
- [48] W. Mottaweia *et al.*, "Altered intestinal microbiota–host mitochondria crosstalk in new onset Crohn's disease," *Nat. Commun.*, vol. 7, Nov. 2016.
- [49] "EUCAST: Clinical breakpoints." [Online]. Available: http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/. [Accessed: 12-Mar-2017].
- [50] H. Salimnia, A. Noronha, J. D. Sobel, and M. R. Fairfax, "Sepsis associated with a new *Atopobium* species, provisionally named *Atopobium detroitii*: Case report and review of the current status of the species *Atopobium*," *Scand. J. Infect. Dis.*, vol. 40, no. 8, pp. 679–681, Jan. 2008.
- [51] M. Oyaert *et al.*, "Sepsis with an *Atopobium*-Like Species in a Patient with Fournier's Gangrene," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 52, no. 1, pp. 364–366, Jan. 2014.
- [52] E. Angelakis, V. Roux, D. Raoult, and M. Drancourt, "Human Case of *Atopobium rimae* Bacteremia," *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 15, no. 2, pp. 354–355, Feb. 2009.
- [53] H.-Y. Chung *et al.*, "[A case of bacteremia by *Atopobium rimae* in a patient with liver cirrhosis]," *Korean J. Lab. Med.*, vol. 27, no. 5, pp. 351–354, Oct. 2007.
- [54] M. Knoester, L. E. E. L. O. Lashley, E. Wessels, D. Oepkes, and E. J. Kuijper, "First Report of *Atopobium vaginae* Bacteremia with Fetal Loss after Chorionic Villus Sampling," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 49, no. 4, pp. 1684–1686, Apr. 2011.
- [55] J. F. W. Chan *et al.*, "First Report of Spontaneous Intrapartum *Atopobium vaginae* Bacteremia," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 50, no. 7, pp. 2525–2528, Jul. 2012.
- [56] J.-C. Marvaud, F. Mory, and T. Lambert, "Clostridium clostridioforme and *Atopobium minutum* Clinical Isolates with VanB-Type Resistance in France ▽," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 49, no. 9, pp. 3436–3438, Sep. 2011.
- [57] Netgen, "Quels bénéfices pour les cliniciens de la mise en place du MALDI-TOF/MS dans le laboratoire de bactériologie?," *Revue Médicale Suisse*. [Online]. Available: <https://www.revmed.ch/RMS/2014/RMS-N-450/Quels-benefices-pour-les-cliniciens-de-la-mise-en-place-du-MALDI-TOF-MS-dans-le-laboratoire-de-bacteriologie>. [Accessed: 05-Apr-2017].
- [58] A. Bizzini, C. Durussel, J. Bille, G. Greub, and G. Prod'hom, "Performance of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Identification of Bacterial Strains Routinely Isolated in a Clinical Microbiology Laboratory," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 48, no. 5, pp. 1549–1554, May 2010.
- [59] L. B. Reller, M. P. Weinstein, and C. A. Petti, "Detection and Identification of Microorganisms by Gene Amplification and Sequencing," *Clin. Infect. Dis.*, vol. 44, no. 8, pp. 1108–1114, Apr. 2007.
- [60] S. Chakravorty, D. Helb, M. Burday, N. Connell, and D. Alland, "A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria.," *J. Microbiol. Methods*, vol. 69, no. 2, pp. 330–339, May 2007.
- [61] J. E. Clarridge, "Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases," *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 17, no. 4, pp. 840–862, Oct. 2004.
- [62] M. Drancourt, C. Bollet, A. Carlioz, R. Martelin, J.-P. Gayral, and D. Raoult, "16S Ribosomal DNA Sequence Analysis of a Large Collection of Environmental and Clinical Unidentifiable Bacterial Isolates," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 38, no. 10, pp. 3623–3630, Oct. 2000.



- [63] J. M. Janda and S. L. Abbott, "16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 45, no. 9, pp. 2761–2764, Sep. 2007.
- [64] M.-F. Prère and O. A. Fayet, "A specific polymerase chain reaction test for the identification of *Streptococcus pneumoniae*," *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 70, no. 1, pp. 45–53, May 2011.
- [65] T. Ezaki, Y. Kawamura, N. Li, Z. Y. Li, L. Zhao, and S. Shu, "Proposal of the genera *Anaerococcus* gen. nov., *Peptoniphilus* gen. nov. and *Gallicola* gen. nov. for members of the genus *Peptostreptococcus*," *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, vol. 51, no. Pt 4, pp. 1521–1528, Jul. 2001.
- [66] H. Uemura *et al.*, "*Parvimonas micra* as a causative organism of spondylodiscitis: a report of two cases and a literature review," *Int. J. Infect. Dis.*, vol. 23, pp. 53–55, Jun. 2014.
- [67] E. M. Barnes, C. S. Impey, B. J. Stevens, and J. L. Peel, "*Streptococcus pleomorphus* sp.nov.: an anaerobic streptococcus isolated mainly from the caeca of birds," *J. Gen. Microbiol.*, vol. 102, no. 1, pp. 45–53, Sep. 1977.



Annexes	
Annexe 1. Protocole de séquençage	59
Annexe 1.1. Extraction d'ADN à partir d'une culture fongique	59
Annexe 1.2. Réalisation de la PCR « matrice »	59
Annexe 1.3. Electrophorèse dur gel d'agarose	60
Annexe 1.4. Réalisation de la PCR de séquençage	61
Annexe 1.5. Elimination de la fluorescence	61
Annexe 1.1. Séquençage	61



Annexe 1. Protocole de séquençage

Annexe 1.1. Extraction d'ADN à partir d'une culture fongique

Extraction par Qlys..

Mettre quelques colonies dans 300µL de Qlys.

Chauffer à 95°C sur incubateur sec pendant 10min.

Centrifuger à 14000 tr/min pendant 5 min.

Annexe 1.2. Réalisation de la PCR « matrice »

Les conditions de PCR sont les mêmes pour les deux paires d'amorce.

MFP889 : 5'_TCAAA(G/T)GAATTGACGGGGGC_3'

MFP890 : 5'_GGCCCGGGAACGTATTCAC_3'

FD1mod (5'_AGAGTTTGATCYTGGYTYAG_3')

16S1RR (5'_CTTTACGCCCARTRAWTCCG_3')

Préparation du Mix en salle sans ADN :

Réactifs	Volume en µL
Taq DFS	0.12
Amorces 889 ou amorces 16S1RR (100µM)	0.6
Amorces 890 ou amorces fD1mod (100µM)	0.6
Tampon 10X	3
dNTp (2mM)	3
Eau distillée	18.68
Volume final	26
Volume d'ADN	4
Volume FINAL	30µL



Programme de la PCR :

Etapes		Température en °C	Durée	Nombre de cycles
Dénaturation initiale		95	5min	1
Amplification	Dénaturation	95	20sec	35
	Hybridation	55	20sec	
	Elongation	72	20sec	
Refroidissement		4	infini	1

Annexe 1.3. Electrophorèse dur gel d'agarose

Préparation du gel d'agarose 8 puits :

Préparation d'un gel d'agarose à 2% :

Mélanger 0.30g d'agarose à 15ml de TBE 1X.

Chauffer au micro-onde de façon à obtenir une préparation limpide.

Procéder en plusieurs fois, il ne doit plus y avoir de cristaux.

Laisser refroidir.

Couler le gel dans le moule correspondant et placer le peigne.

Laisser refroidir pendant au moins 30 min.

Electrophorèse :

Le mélange amplicon et bleu de trace est préparé en plaque de microfiltration.

Déposer dans chaque puits 6 µL d'échantillon à analyser préalablement mélangés avec une goutte de bleu de dépôt (2 µl).

Déposer 6 µL le marqueur de poids moléculaire.

Réserver un puits pour déposer le marqueur de poids moléculaire.

Immerger le gel d'agarose dans une cuve d'électrophorèse contenant du TBE 1X.

Brancher la cuve et laisser migrer 20 à 30 minutes, selon la taille du fragment à analyser.

Eteindre la cuve et enlever le gel.

Révélation sur gel Red 10000x:

Incuber 15 à 20 minutes dans la petite cuve en inox fermée puis rincer dans le bac d'eau.

Visualisation des bandes sous UV.



Annexe 1.4. Réalisation de la PCR de séquençage

Préparation du Mix :

Réactifs	Volume en μL
Big DYE	1.0 μL
Tampon 5X	2.0 μL
Amorce (MFP889 ou MFP890 ou 16S1RR ou fD1mod) 10 μM	0,32 μL
Produits PCR	3 μL
Eau distillée	13.68 μL
Volume total	20 μL

Programme de la PCR :

Etapes	Température en $^{\circ}\text{C}$	Durée	Nombre de cycles
Dénaturation initiale	96	1min	1
Amplification	Dénaturation 96	10sec	25
	Hybridation 50	5sec	
	Elongation 60	4min	
Refroidissement	4	infini	1

Annexe 1.5. Elimination de la fluorescence

L'élimination de la fluorescence a été réalisée sur plaque Sephadex G50 Superfine conformément aux instructions du fabricant.

Annexe 1.6. Séquençage

Le séquençage est réalisé sur séquenceur 3130 Genetic XL Analyzer conformément aux instructions du fabricant.



Serment de Galien

Je jure en présence de mes Maîtres de la Faculté et de mes condisciples :

- d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;
- d'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;
- de ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères, si j'y manque.



Série de cas de bactériémies à *Atopobium* et revue de la littérature

Nous avons décrit huit cas de bactériémies à *Atopobium*, genre regroupant des bactéries à Gram positif anaérobies. Les espèces en cause sont *A. parvulum* (n=3), *A. rimae* (n=3), et *A. vaginae* (n=2). Au vu de cette série de cas et des sept cas décrits précédemment, les bactériémies à *A. vaginae* survenaient après des infections génitales hautes chez la femme, tandis que les bactériémies à *A. rimae* et *A. parvulum* avaient principalement une origine ORL ou digestive. La pathogénicité des *Atopobium* semble modérée et les bactériémies étaient résolutive après une antibiothérapie empirique adaptée au point d'appel infectieux. Les souches de *Atopobium* étaient sensibles à la plupart des antibiotiques actifs sur les anaérobies à Gram positif, à l'exception de la plupart des souches de *A. vaginae* et de l'unique souche *A. deltae* rapportée qui étaient résistantes au métronidazole, un antibiotique classiquement utilisé contre les anaérobies. Ces données pourront guider l'interprétation des hémocultures à *Atopobium* et leur prise en charge.

Mots-clés : *Atopobium*, bactériémie, sensibilité

Case series of *Atopobium* bacteremia and review of literature

We reported eight cases of bacteremia caused by *Atopobium*, a genus of Gram-positive anaerobes. The causative species included *A. parvulum* (n=3), *A. rimae* (n=3), and *A. vaginae* (n=2). According to this case series and the seven previously reported cases, *A. vaginae* bacteremia occurred after upper genital tract infection in women, whereas *A. rimae* and *A. parvulum* bacteremia are mostly secondary to oral or digestive source of infection. Pathogenicity of *Atopobium* seems to be moderate and infections resolved with empirical antibiotic treatment adapted to the site of infection. A summary of the antibiotic susceptibility pattern of these strains showed that *Atopobium* species are overall susceptible to most antimicrobials usually active against Gram-positive anaerobes, except *A. vaginae* strains and the single isolated *A. deltae* strain that were essentially nonsusceptible to metronidazole, a classical anti-anaerobes agent. These data will guide interpretation of future positive blood cultures for *Atopobium* species and their management.

Keywords : *Atopobium*, bacteremia, susceptibility

