

Cadre d'identification microbienne pour l'évaluation des risques (CIMER)



mai 2017

No de cat. : En14-317/2018F-PDF

ISBN 978-0-660-24941-4

Le contenu de cette publication ou de ce produit peut être reproduit en tout ou en partie, et par quelque moyen que ce soit, sous réserve que la reproduction soit effectuée uniquement à des fins personnelles ou publiques mais non commerciales, sans frais ni autre permission, à moins d'avis contraire.

On demande seulement :

- de faire preuve de diligence raisonnable en assurant l'exactitude du matériel reproduit;
- d'indiquer le titre complet du matériel reproduit et l'organisation qui en est l'auteur;
- d'indiquer que la reproduction est une copie d'un document officiel publié par le gouvernement du Canada et que la reproduction n'a pas été faite en association avec le gouvernement du Canada ni avec l'appui de celui-ci.

La reproduction et la distribution à des fins commerciales est interdite, sauf avec la permission écrite de l'auteur. Pour de plus amples renseignements, veuillez communiquer avec l'informathèque d'Environnement et Changement climatique Canada au 1-800-668-6767 (au Canada seulement) ou 819-997-2800 ou par courriel à ec.enviroinfo.ec@canada.ca.

© Sa Majesté la Reine du chef du Canada, représentée par le ministre de l'Environnement et Changement climatique, 2016.

Also available in English

Sommaire

Le Règlement sur les renseignements concernant les substances nouvelles (organismes) (le règlement) de la Loi canadienne sur la protection de l'environnement, 1999 (LCPE) est structuré selon le type d'organisme (micro-organismes et organismes autres que les micro-organismes) et le type d'activité.

Le Cadre d'identification microbienne pour l'évaluation des risques (CIMER) fournit des indications sur les renseignements étayant l'identification d'un micro-organisme déclaré. Ce document a été préparé pour quiconque s'occupe des aspects techniques d'éléments d'information ou des exigences relatives aux renseignements du règlement se rapportant à l'identification d'un micro-organisme déclaré. Il a été préparé pour aider les déclarants dans le choix des méthodes et l'analyse des données requises pour assurer une identification microbienne appropriée. De par sa nature technique, le présent document fournit des directives détaillées sur les éléments d'information technique et s'appuie largement sur les concepts de la microbiologie, de la taxonomie microbienne et des méthodes d'identification microbienne.

Table des matières

Cadre d'identification microbienne pour l'évaluation des risques (CIMER).....	5
1. Introduction	5
2. Qui devrait utiliser le CIMER?	7
3. L'importance de l'identification microbienne aux fins de l'évaluation des risques	7
4. Niveau d'identification taxonomique acceptable.....	8
5. Approche générale à l'égard de l'identification microbienne	10
Approche polyphasique à paliers à l'identification d'un micro-organisme.....	10
Méthodes reconnues d'identification d'un micro-organisme	17
6. Études de cas d'identification de différents micro-organismes	17
7. Mises à jour du CIMER	19
Annexes	20
Annexe A – Glossaire.....	20
Termes	20
Annexe B – Méthodes reconnues pour identifier un micro-organisme.....	22
Méthodes phénotypiques.....	22
Méthodes génotypiques	29
Autres méthodes utiles pour l'identification microbienne	38
Annexe C – Modèle	42
Annexe D – Identification microbienne : Études de cas	43
Étude de cas – <i>Arcobacter</i> sp.....	43
Étude de cas - <i>Aspergillus niger</i>	48
Étude de cas – <i>Aurantiochytrium limacinum</i>	51
Étude de cas – <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	54
Étude de cas – <i>Candida tropicalis</i>	59
Étude de cas – <i>Deinococcus proteolyticus</i>	61
Étude de cas – virus <i>Influenza</i>	64
Étude de cas – <i>Komagataella phaffii</i>	66
Étude de cas – <i>Listeria monocytogenes</i>	68
Étude de cas – <i>Rhodococcus aetherivorans</i>	73
Étude de cas – <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	80
Étude de cas – <i>Shewanella indica</i>	84
Étude de cas – <i>Trichoderma reesei</i>	88
Annexe E – Références	91

Cadre d'identification microbienne pour l'évaluation des risques (CIMER)

1. Introduction

Le *Règlement sur les renseignements concernant les substances nouvelles* (organismes) (le règlement) de la *Loi canadienne sur la protection de l'environnement, 1999* (LCPE) est structuré selon le type d'organisme (micro-organismes et autres organismes que les micro-organismes) et le type d'activité. Les renseignements étayant l'identification d'un micro-organisme déclaré¹ constituent un élément d'information commun aux annexes portant sur les micro-organismes. Le Cadre d'identification microbienne pour l'évaluation des risques (CIMER) fournit des indications sur cet élément d'information. Il vise à établir un cadre de référence commun à utiliser dans l'identification des micro-organismes aux fins de l'évaluation des risques liés à la déclaration d'une substance nouvelle (DSN). Ce cadre de référence devrait faciliter le choix des méthodes et l'analyse des données requises pour assurer une identification microbienne appropriée. Il décrit des méthodes d'identification microbienne spécifiques et comporte 13 études de cas démontrant l'application du cadre, ainsi qu'un modèle de présentation. Les méthodes d'identification et de caractérisation des micro-organismes évoluent constamment, et de nouvelles méthodes plus spécifiques et plus fiables sont mises au point régulièrement. Le Programme des substances nouvelles (PSN) mettra ce document à jour périodiquement et selon les besoins.

Les modifications génétiques apportées à un micro-organisme déclaré ne relèvent pas de la portée de ce document, elles sont traitées aux termes d'éléments d'information spécifiques dans le règlement. Le CIMER doit être utilisé conjointement avec les *Directives pour la déclaration et les essais de substances nouvelles : Organismes*, lesquelles expliquent comment remplir une déclaration avec tous les autres éléments d'information du règlement. De plus, la portée du présent document ne s'étend pas aux micro-organismes synthétiques qui ont été fabriqués avec un contenu génomique important provenant d'espèces possiblement non apparentées (par exemple, le micro-organisme expérimental *Mycoplasma laboratorium*).

¹ Renseignements sur le micro-organisme : identification et renseignements étayant son identification (alinéa 1a) des annexes 1, 2, 3 et 4 du règlement (<http://laws-lois.justice.gc.ca/fra/reglements/DORS-2005-248/index.html>).

Comme de tels micro-organismes artificiels sont susceptibles de ne pas avoir de lien taxonomique pertinent avec des espèces naturelles, ils sont considérés comme étant des cas spéciaux dans le contexte d'une identification pour un usage relevant de la portée de la LCPE. Une consultation avant déclaration (CAD) devrait être demandée au PSN afin de discuter de la déclaration d'un micro-organisme synthétique.



Consultation avant déclaration (CAD)

La CAD est une option qui peut être envisagée par les déclarants qui souhaitent consulter le PSN lors de la planification ou de la préparation de leur trousse de DSN pour discuter de questions ou de préoccupations liées aux renseignements exigés.

Veillez communiquer avec le PSN pour demander une CAD :

Ligne d'information de la gestion des substances

N° de téléphone : 1-800-567-1999 (sans frais au Canada) ou 1-819-938-3232 (à l'extérieur du Canada)

N° de télécopieur : 1-819-938-5212

Courriel : eccc.substances.eccc@canada.ca

Ce document a été préparé pour aider les déclarants à observer ce règlement de la LCPE. Toutes obligations en vertu du règlement sont indépendantes de toutes obligations que le déclarant peut avoir en vertu de tout autre règlement ou loi.

L'annexe A présente la définition des termes techniques utilisés dans ce document.

2. Qui devrait utiliser le CIMER?

Quiconque s'occupe des aspects techniques d'éléments d'information ou des exigences relatives aux renseignements du règlement se rapportant à l'identification d'un micro-organisme déclaré : les déclarants (parfois appelés « promoteurs » ou « demandeurs »), y compris leurs partenaires commerciaux, leurs agents canadiens, leurs fournisseurs étrangers, leurs personnes-ressources techniques, leurs laboratoires commerciaux tiers, etc.

De par sa nature technique, le présent document fournit des directives détaillées sur les éléments d'information technique et s'appuie largement sur les concepts de la microbiologie, de la taxonomie microbienne et des méthodes d'identification microbienne.

3. L'importance de l'identification microbienne aux fins de l'évaluation des risques

Une identification microbienne valide et bien étayée constitue la pierre angulaire de l'évaluation des risques liés aux micro-organismes qui sont déclarés en vertu du règlement.

L'identification exacte d'un micro-organisme permet d'utiliser les caractéristiques connues d'un groupe taxonomique pour en évaluer les risques. Les renseignements sur ce groupe taxonomique peuvent également contribuer à identifier des organismes « étroitement apparentés » (au niveau de l'espèce ou des souches), lesquels peuvent servir à fournir des renseignements complémentaires permettant de déterminer le danger lié à un micro-organisme déclaré et de faire la distinction entre celui-ci et de possibles pathogènes d'importance clinique ou environnementale. En outre, les renseignements sur des organismes étroitement apparentés pourraient servir à fournir des données de substitution pour d'autres éléments d'information du règlement.

L'identification inexacte d'un micro-organisme peut fausser la détermination du niveau de danger lié à celui-ci, ce qui pourrait par ailleurs mener à une conclusion qui ne s'applique pas au micro-organisme déclaré. Une telle conclusion pourrait à son tour avoir des répercussions néfastes sur la santé humaine et l'environnement ou donner lieu à des mesures de gestion des risques inutiles pour des micro-organismes peu dangereux.

4. Niveau d'identification taxonomique acceptable

L'identification des micro-organismes vise à utiliser les caractéristiques phénotypiques et génotypiques d'un micro-organisme déclaré pour le classer dans un groupe taxonomique reconnu. Le déclarant doit établir l'identité du micro-organisme déclaré.

Bien que le niveau de désignation taxonomique varie en fonction du micro-organisme, on s'attend en général à une identification au niveau de l'espèce. Dans le contexte d'une DSN, il n'est pas nécessaire que le niveau acceptable d'identification soit le niveau taxonomique le plus bas qui est connu pour le micro-organisme (par exemple, la sous-espèce, la souche ou le sérovar). La désignation au niveau de la sous-espèce, de la souche ou du sérovar peut toutefois être appropriée lorsque l'organisme déclaré est étroitement apparenté à des micro-organismes pathogènes d'importance clinique ou environnementale. Par exemple, *Escherichia coli*, en tant qu'espèce, comprend bon nombre de sérotypes pathogènes et non pathogènes. Dans ce cas, si une espèce d'*E. coli* était déclarée comme étant une souche non pathogène, le niveau d'identification requis pour différencier l'*E. coli* déclaré serait la souche ou le sérotype. Les données fournies pour justifier l'identification devraient permettre de distinguer le micro-organisme déclaré des sérotypes pathogènes d'*E. coli*. En l'absence de telles mesures, l'évaluation des risques comporterait des incertitudes en raison de la possibilité que l'*E. coli* déclaré soit pathogène.

Si un micro-organisme peut seulement être identifié au niveau du genre ou du sous-genre (par exemple, un clade composé de plusieurs espèces) en raison du manque de renseignements disponibles ou de méthodes appropriées pour l'identifier jusqu'à l'espèce, les membres de ce groupe taxonomique seront considérés comme des candidats potentiels d'identification du micro-organisme déclaré. Comme cette situation causera des incertitudes quant à l'identité du micro-organisme, le déclarant devra élucider la question en effectuant des recherches documentaires et en choisissant le micro-organisme de substitution approprié.

Le PSN reconnaît que la taxonomie microbienne est en constante évolution. La désignation taxonomique d'un micro-organisme déclaré doit respecter les plus récents codes internationaux de nomenclature ainsi que les sources taxonomiques habituelles. Les codes internationaux de nomenclature sont ceux qui sont officiellement reconnus et acceptés par les comités internationaux.



Comités internationaux

- Pour les bactéries : International Committee on Systematics of Prokaryotes (ICSP) (<http://www.the-icsp.org/>)
- Pour les algues et les champignons : International Association for Plant Taxonomy (IAPT) (<http://www.iapt-taxon.org/nomen/main.php?page=pf>)
- Pour les virus : International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) (<http://www.ictvonline.org/codeOfVirusClassification.asp>)

Les ressources courantes acceptables servant à l'identification des micro-organismes et à la classification taxonomique sont celles qui sont jugées acceptables par les autorités reconnues ou par la communauté scientifique. Elles comprennent notamment :

- (i) les textes de référence, comme le manuel intitulé *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (2015) ou l'étude intitulée *The Yeasts, A Taxonomic Study* (Kurtzman *et al*, 2011);
- (ii) les articles de revues scientifiques examinés par des pairs;
- (iii) les ressources en ligne.

Dans la mesure du possible, on préférera l'utilisation de plusieurs sources d'information convergente à l'usage d'une seule source.



Exemples de ressources en ligne

- NCBI (National Center for Biotechnology Information) Taxonomy (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy>)
- *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature* (LPSN) (<http://www.bacterio.net/>)
- CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre (<http://www.cbs.knaw.nl/>)
- Mycobank (<http://www.mycobank.org/>)

5. Approche générale à l'égard de l'identification microbienne

Comme les espèces microbiennes sont très diversifiées, la délimitation entre les espèces peut s'avérer ambiguë (Konstantinidis *et al.*, 2006; Liti *et al.*, 2006). En dépit de cette ambiguïté, les micro-organismes ont été classés à des fins pratiques en différentes espèces selon l'uniformité de leurs caractéristiques génétiques et biologiques.



« Malgré le manque de renseignements sur les mécanismes de spéciation et les similitudes des séquences génomiques, les membres de la plupart des espèces de procaryotes forment une entité cohérente sur le plan génomique. »
Stackebrandt (2011).

Bien que le PSN reconnaisse les enjeux liés au concept de l'espèce, il est important de considérer l'espèce comme une entité taxonomique définie et une composante pratique de l'évaluation des risques. Parmi les facteurs qui influencent l'identification microbienne et la classification taxonomique, on retrouve le concept de spéciation, la nature pluraliste des taxons microbiens, l'incongruité topologique, les transferts horizontaux de gènes et la présence de nombreuses copies de régions génétiques conservées. Les experts recommandent par ailleurs d'adopter une approche polyphasique à l'égard de l'identification exacte et de la désignation taxonomique des micro-organismes (Stackebrandt, 2011, 2014; CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, Pays-Bas).

Différents outils et méthodes sont disponibles pour identifier un micro-organisme au niveau de l'espèce et établir ses relations phylogénétiques et taxonomiques avec les autres membres du genre, du clade ou de l'espèce, habituellement à un niveau taxonomique approprié pour réaliser une évaluation rigoureuse des risques en vertu du règlement.

Approche polyphasique à paliers à l'identification d'un micro-organisme

Une **approche polyphasique à paliers** doit être adoptée pour identifier de façon exacte des micro-organismes. Le principe de **polyphasie** utilise plusieurs éléments de preuve (des données) issus d'une combinaison de différentes méthodes, alors que le principe des **paliers** permet la sélection séquentielle de ces méthodes afin d'identifier de façon efficace un micro-organisme.

Une approche polyphasique favorise la justification de l'identification et diminue l'incertitude liée aux résultats générés par les méthodes individuelles. Certains caractères ou caractéristiques

du micro-organisme sont utiles à son identification. Selon le micro-organisme, la combinaison de méthodes complémentaires utilisées pour examiner ces caractéristiques variera. Une approche polyphasique efficace combinera les caractéristiques phénotypiques et génotypiques, comme ceux qui sont décrites aux tableaux 1 et 2.

Tableau 1. liste des caractéristiques phénotypiques d'un micro-organisme pouvant être utilisées dans une approche d'identification polyphasique

Caractéristiques	Exemples (liste non exhaustive)	Méthodes (liste non exhaustive)
a) Morphologiques	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Morphologie de la colonie (couleur, forme, présence d'un halo, etc.), organes de fructification, structure des hyphes et du mycélium ➤ Morphologie des cellules et des spores (forme, type de groupement, type de paroi cellulaire, etc.), coloration cellulaire, mobilité (présence et quantité de pili, fimbriae, flagelles), présence ou absence de structures d'enveloppe, comme une capsule ou un film biologique, etc. 	Croissance du micro-organisme dans un milieu donné, avec ou sans suppléments, étalement sur gélose, coloration et observation microscopique.
b) Physiologiques et biochimiques	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Température de croissance (optimale, maximale, minimale, et plage) ➤ pH optimal et plage ➤ Besoins en matière d'éléments nutritifs et de suppléments de croissance ➤ Activités enzymatiques ➤ Utilisation de glucides ➤ Production d'acides à partir de glucides ➤ Utilisation de sources de carbone, d'azote, etc. ➤ Besoins en oxygène ➤ Tolérance au sel ➤ Croissance dans des milieux sélectifs, différentiels ou enrichis ➤ Sensibilité/résistance aux 	Croissance du micro-organisme dans certaines conditions et milieux précis.

	antibiotiques, antifongiques ou antiviraux	
	➤ Sensibilité/résistance aux métaux lourds ou à d'autres substances	
	➤ Production de pigments	
c) Sérologiques	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Agglutination ➤ Immunodiffusion ➤ ELISA ➤ Détection de protéines précises (transfert de type western) 	Vérifier l'action d'anticorps spécifiques à l'égard des antigènes du micro-organisme.
d) Production de métabolites ou de toxines	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Endotoxines, exotoxines, etc. ➤ Mycotoxines ➤ Autres métabolites 	Méthodes moléculaires, CLHP, ELISA.
e) Chimiotaxonomiques	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Esters méthyliques d'acides gras (EMAG) ➤ Lipopolysaccharides, type de peptidoglycane, sucres cellulaires, sucres de la paroi cellulaire, acides mycoliques, diaminoacides, système quinone, teneur en polyamines, acides aminés de la paroi cellulaire, etc. ➤ Protéome cellulaire, métabolome, etc. 	Analyse de l'extrait du micro-organisme (acides gras, protéines, etc.)

Tableau 2. liste des caractéristiques génotypiques d'un micro-organisme qui peuvent être utilisées dans une approche d'identification polyphasique

Caractéristiques	Exemples (liste non exhaustive)	Méthodes (liste non exhaustive)
a) Gènes conservés ou régions hypervariables dans la séquence d'un gène conservé	<ul style="list-style-type: none"> ➤ ARNr 16S, chaperonine-60 (cpn60) chez les bactéries; ARNr 16S, chaperonine de type II chez les archées ➤ Opéron du gène de l'ARNr 18S, 5,8S et 28S (ainsi que les régions ITS1, ITS2, D1/D2) chez les eucaryotes ➤ Alignement de séquences multilocus (MLSA) ou typage de séquences multilocus (MLST) à 	Séquençage et alignement de l'ADN

Caractéristiques	Exemples (liste non exhaustive)	Méthodes (liste non exhaustive)
	l'aide de gènes domestiques (par exemple, gyrase A, gyrase B, facteur 1 d'initiation de la traduction, facteur 2 d'initiation de la traduction, facteur 1 d'élongation de la transcription, recombinaise A, recombinaise B, cytochrome C oxydase, sous-unité- β de l'ATP-synthase, etc.)	
b) Séquence du génome entier	➤ Analyse du génome entier	Séquençage et alignement d'ADN, et annotation du génome (par exemple, utile dans la détection de gènes spécifiques pouvant contribuer à l'identification, comme des facteurs de virulence).
c) Polymorphisme d'ADN	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Rapport des bases de l'ADN (teneur en G+C) ➤ Amplification aléatoire de l'ADN polymorphe (RAPD) ➤ Polymorphisme de taille des fragments de restriction (RFLP) ➤ Électrophorèse en champ pulsé ➤ Transferts de Southern et de Northern ➤ Transcriptome cellulaire 	Utilisation de l'ADN et de la PCR pour le typage, hybridation
d) Hybridation de l'ADN	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Hybridation ADN:ADN ➤ Hybridation ADN:ARN 	Hybridation

Une approche à paliers est utile pour choisir parmi les méthodes appropriées énumérées aux tableaux 1 et 2. Les méthodes décrites ci-dessus ne seront pas toutes nécessaires pour identifier un micro-organisme. Idéalement, le choix des méthodes servant à justifier l'identité d'un micro-organisme aux fins de la DSN devrait commencer par les plus discriminatoires. L'approche à paliers facilite l'organisation des nombreux éléments de preuve (données) recueillis dans le cadre de l'identification et de la caractérisation du micro-organisme.



Une **approche polyphasique à paliers** devrait commencer par le recours à des méthodes qui permettent le classement présumé du micro-organisme déclaré dans un groupe taxonomique. Ces méthodes comprennent souvent l'analyse de la séquence d'une région génique conservée comme première étape (d'autres méthodes propres à un groupe de micro-organisme peuvent également être utilisées).

Selon les résultats de la première étape, ce classement dans un groupe taxonomique éclairera le choix des méthodes subséquentes à utiliser jusqu'à l'atteinte d'un niveau d'identification taxonomique acceptable aux fins de l'évaluation des risques. Selon le type de micro-organisme (une bactérie, une archée, un champignon, une levure, un virus), l'approche à paliers peut varier. Pour certains organismes, les éléments d'une approche polyphasique à paliers et les méthodes à utiliser sont bien établis (des exemples sont présentés à la section 5 « Études de cas »).

Vous trouverez ci-dessous le schéma de l'approche polyphasique à paliers pour l'identification d'un micro-organisme déclaré (figure 1). Les décisions liées au nombre de paliers, à la quantité de détails à fournir à chaque palier, au type de renseignements supplémentaires à fournir et aux tests requis dépendent de :

- la source du micro-organisme (par exemple, une souche provenant d'une collection reconnue, un isolat clinique ou environnemental, etc.);
- la parenté ou la similarité du micro-organisme déclaré avec d'autres micro-organismes pathogènes connus ou soupçonnés de présenter des dangers pour les humains, les végétaux ou les animaux;
- du détail avec lequel les caractéristiques d'identification du groupe taxonomique sont décrites dans la littérature scientifique.

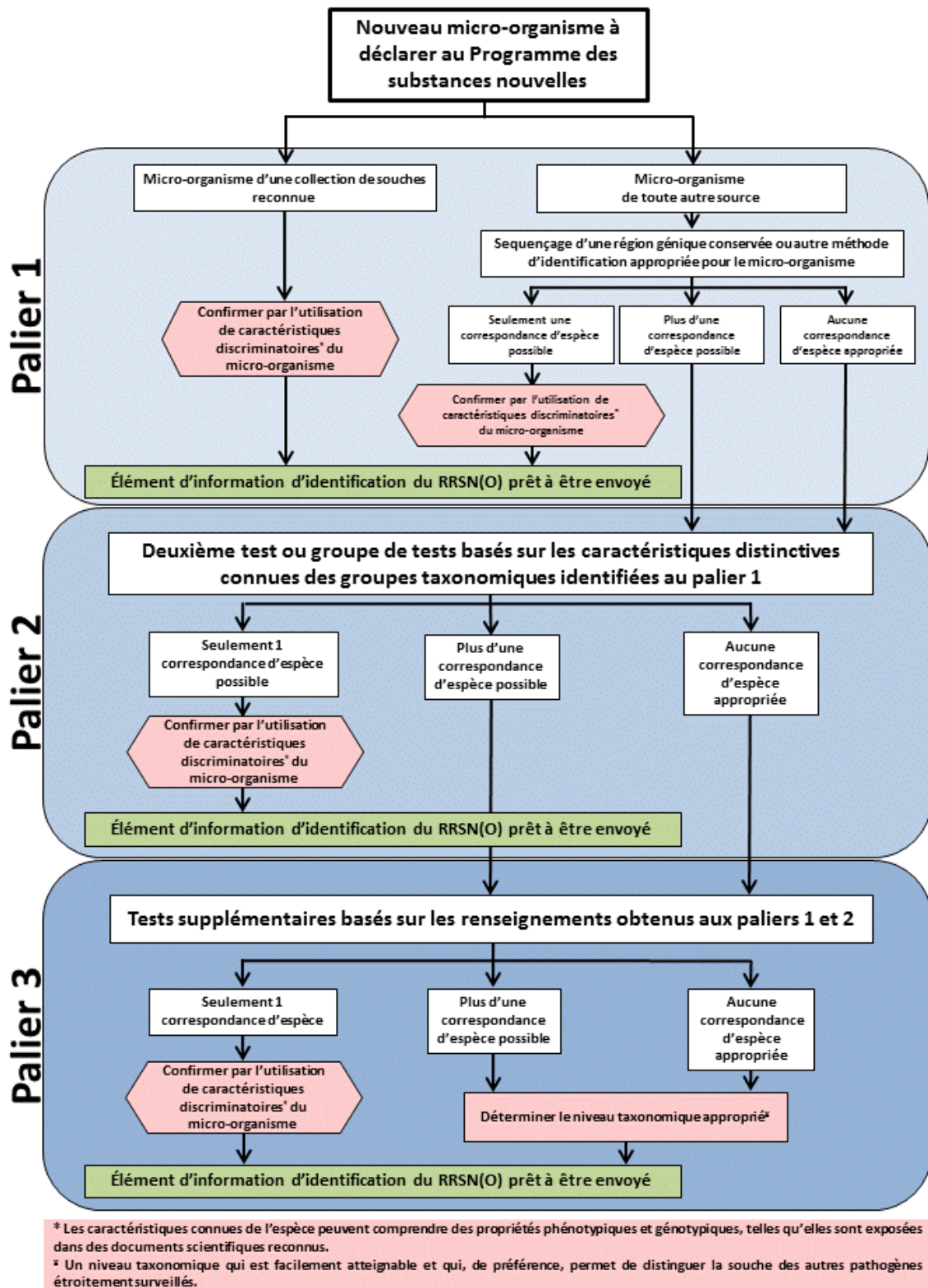


Figure 1. approche polyphasique à paliers pour identifier un micro-organisme déclaré et justifier son identité.

Comme le montre le schéma (figure 1), si une souche provient d'une collection de souches reconnue, un certificat d'analyse de la collection ainsi que les données confirmant les caractéristiques de la souche doivent être fournis pour corroborer son identité.

En ce qui concerne les micro-organismes isolés de l'environnement, l'identification devrait idéalement commencer par le séquençage de régions géniques conservées, comme les gènes de l'ARN ribosomique, ou toute autre méthode d'identification établie propre à un groupe de micro-organismes. L'analyse des résultats du Palier 1 peut générer trois possibilités :

- 1) Le micro-organisme déclaré correspond à une seule espèce : dans ce cas, il faut confirmer l'identité avec d'autres caractéristiques connues de l'espèce.
- 2) Le micro-organisme déclaré correspond à plus d'une espèce possible : dans ce cas, des analyses supplémentaires (palier 2) doivent être faites pour préciser le classement taxonomique du micro-organisme. Les analyses choisies dépendent des données recueillies et des renseignements publiés dans la littérature scientifique sur le groupe taxonomique identifié au Palier 1.
- 3) Aucune correspondance appropriée n'est établie entre le micro-organisme déclaré et une espèce connue : lorsque les données recueillies ne sont concluantes pour aucune espèce ou aucun genre, des analyses supplémentaires (Palier 2) doivent être faites pour préciser le classement taxonomique du micro-organisme déclaré. Ces analyses dépendent des données recueillies et des renseignements publiés dans la littérature scientifique sur le groupe taxonomique identifié au Palier 1.

L'analyse des résultats du Palier 2 peut donner des conclusions semblables à celles obtenues au Palier 1, permettant soit d'identifier de façon concluante le micro-organisme déclaré ou de déterminer les analyses supplémentaires requises pour le Palier 3. L'analyse des résultats du Palier 3 mène habituellement à la désignation de l'espèce. Si, à ce stade, il subsiste encore une ambiguïté quant à l'espèce, le déclarant peut désigner le micro-organisme déclaré à un palier taxonomique supérieur (par exemple, au niveau du clade) après l'analyse du Palier 3.



Remarque : En cas de doute sur le choix des méthodes, du nombre de palier et de la conclusion sur l'identification du micro-organisme déclaré, les déclarants peuvent demander une CAD.

Méthodes reconnues d'identification d'un micro-organisme

Plusieurs méthodes sont couramment utilisées pour identifier et caractériser des micro-organismes. Chacune d'entre elles comporte des forces et des limites. Une liste des méthodes et des pratiques exemplaires proposées figurent à l'annexe B.

Que l'identification du micro-organisme soit réalisée par le déclarant ou un laboratoire commercial tiers, les principes d'une approche polyphasique à paliers ainsi que les pratiques exemplaires décrits à l'annexe B doivent être appliqués.

La liste des tests qui ont servi à la désignation taxonomique du micro-organisme déclaré, ainsi que les résultats et tout autre renseignement servant à la désignation taxonomique doivent être fournis dans la trousse de la DSN. On suggère aux déclarants d'utiliser le modèle qui figure à l'annexe C, lequel permet d'organiser et d'analyser les données conformément à l'approche polyphasique à paliers.

6. Études de cas d'identification de différents micro-organismes

Plusieurs études de cas axées sur une approche polyphasique à paliers pour identifier des micro-organismes (bactéries, virus, champignons, algues) sont présentées à l'annexe D. Les méthodes et les analyses utilisées dans les études de cas reposent sur la littérature scientifique corroborant l'identification de ces micro-organismes.



- Les études de cas présentées servent à illustrer les niveaux taxonomiques appropriés suffisants aux fins de l'évaluation des risques liés à différents micro-organismes.
- Les études de cas visent à aider les déclarants à structurer les données générées pour justifier l'identification du micro-organisme déclaré.

Tableau 3. liste des études de cas mettant en évidence le type de micro-organisme et les méthodes utilisées pour son identification.

Étude de cas	Points saillants	N° de page
<i>Arcobacter</i> sp.	<ul style="list-style-type: none"> • Identification d'une bactérie ne pouvant être attribuée à une espèce précise. • Utilisation de l'analyse des gènes de l'ARNr 16S et <i>gyrB</i>, ainsi que de caractéristiques phénotypiques. 	43
<i>Aspergillus niger</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Identification d'un champignon à l'aide de caractéristiques morphologiques, de la production d'extralites et de l'analyse génétique (région D2, région ITS et gène de la calmoduline). 	48
<i>Aurantiochytrium limacinum</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Identification d'une microalgue à l'aide de l'analyse du gène de l'ARNr 18S, des caractéristiques morphologiques, de l'analyse des EMAG et du profil de pigmentation. 	51
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Identification d'une bactérie à l'aide des propriétés phénotypiques et du polymorphisme dans une région variable du gène de l'ARNr 16S. 	54
<i>Candida tropicalis</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Identification d'une levure provenant d'une collection de souches. • Utilisation de l'analyse de la région D1D2 du gène de l'ARNr 28S et des caractéristiques morphologiques. 	59
<i>Deinococcus proteolyticus</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Identification d'une bactérie à l'aide des caractéristiques morphologiques et de l'analyse des gènes de l'ARNr 16S et <i>cpn60</i>. 	61
Virus <i>Influenza</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Identification d'un virus à l'aide du séquençage du génome entier et de données immunologiques. 	64
<i>Komagataella phaffii</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Identification d'une levure à l'aide des caractéristiques morphologiques et de l'analyse de la région D1D2 de la grande sous-unité du gène de l'ARNr. 	66
<i>Listeria monocytogenes</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Identification d'une bactérie à l'aide du séquençage du génome de la souche parentale, des caractéristiques morphologiques, de l'analyse génétique et de l'expression protéique. 	68

Étude de cas	Points saillants	N° de page
<i>Rhodococcus aetherivorans</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Identification d'une bactérie à l'aide de l'analyse du gène de l'ARNr 16S, de l'analyse des EMAG, de l'activité enzymatique et des caractéristiques morphologiques. 	73
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Identification d'une levure à l'aide de l'analyse génique de la région D2 de la grande sous-unité, ainsi que des caractéristiques morphologiques et phénotypiques. 	80
<i>Shewanella indica</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Identification d'une bactérie pouvant être attribuée à une espèce spécifique, mais qui est étroitement apparentée à une souche d'une autre espèce. • Utilisation de l'analyse des gènes de l'ARNr 16S et gyrB, ainsi que des propriétés phénotypiques. 	84
<i>Trichoderma reesei</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Identification d'un champignon à l'aide des caractéristiques morphologiques et physiologiques, ainsi que de l'analyse des régions ITS1 et ITS2 de l'opéron de l'ARNr et du gène tef1. 	88

7. Mises à jour du CIMER

Les méthodes d'identification et de caractérisation des micro-organismes évoluent constamment, et de nouvelles méthodes plus spécifiques et plus fiables sont mises au point régulièrement. Même s'il existe de nombreux protocoles pour identifier les souches microbiennes d'importance médicale, agricole et environnementale, force est d'admettre qu'aucune norme internationale n'existe à l'heure actuelle pour déterminer les fondements de l'identification exacte d'un micro-organisme. Le PSN vise donc à mettre à jour ce document périodiquement et selon les besoins. Bien que le PSN continue de reconnaître le fait que les déclarants puissent utiliser des méthodes d'identification et des outils qui pourraient ne pas être mentionnés dans ce document, il incombe au déclarant de prouver la validité de ces méthodes, conformément à l'approche polyphasique à paliers décrite dans ce document.

Annexes

Annexe A – Glossaire

Termes

Analyse phylogénétique – Étude des relations évolutives entre les organismes d'un groupe taxonomique et les membres d'autres taxons, normalement réalisée à l'aide de données de séquence.

Clade – Groupe d'organismes résultant d'une analyse phylogénétique qui ont un ancêtre commun. Aux fins du CIMER, la désignation d'un clade sera acceptée au niveau du genre ou de l'espèce.

Collection de souches reconnue – Collection accessible au public et conforme aux lignes directrices de la World Federation for Culture Collections intitulées « Guidelines for Establishment and Operation of Cultures of Microorganisms » (3^e édition, février 2010). Parmi des exemples de collections reconnues, on retrouve l'American Type Culture Collections (ATCC), la Leibniz-Institut DSZM – German Culture Collection of Microorganisms and Cell Cultures, ainsi que le CBS Fungal Biodiversity Centre (CBS-KNAW), etc.

Groupe taxonomique – Rang (comme l'espèce, le genre, la famille, l'ordre, etc.) dans la hiérarchie taxonomique, où les organismes d'un rang sont regroupés selon leurs similitudes phénotypiques ou génotypiques.

Incongruité topologique – Phénomène qui peut être observé lorsqu'une espèce contient des gènes issus d'un transfert horizontal de gènes d'une espèce non apparentée et qui peuvent évoluer de façon différente des autres gènes de son génome.

Méthodes génotypiques – Techniques permettant d'analyser le patrimoine génétique d'un organisme et d'établir les relations entre celui-ci et les autres organismes.

Méthodes phénotypiques – Techniques permettant de détecter, de mesurer ou de caractériser, directement ou indirectement, les caractéristiques d'un organisme résultant de l'expression observable de sa constitution génétique. Les caractéristiques phénotypiques comprennent les caractéristiques morphologiques, physiologiques et biochimiques (OCDE, 2003).

Morphologie – Étude de la forme d'un organisme ou d'une partie de celui-ci, observable directement à l'œil nu ou en utilisant des procédures ou des instruments spécifiques (p. ex., le microscope, la procédure de coloration, la croissance dans un milieu sélectif, etc.) (OCDE, 2003).

Sérotype – Groupe distinct de souches au sein d'une espèce (ou d'une sous-espèce) de bactéries ou de virus, classées en fonction des antigènes de leur surface cellulaire (par exemple, les antigènes O, H ou K).

Spéciation – Formation d'une nouvelle espèce distincte au cours de l'évolution.

Taxonomie – Science visant à identifier et à classer un organisme, et à y attribuer un nom, afin d'établir la relation de l'organisme avec les autres organismes, ainsi que les variations génétiques au sein des différents groupes taxonomiques et entre ceux-ci de même les aspects évolutifs d'un groupe taxonomique.

Annexe B – Méthodes reconnues pour identifier un micro-organisme

Méthodes phénotypiques

Tableau B-1.1. propriétés morphologiques

Méthodes	<p>La morphologie de la colonie comprend les éléments suivants :</p> <ul style="list-style-type: none"> - forme : circulaire, filamenteuse (fibreuse), rhizoïde (fibres épaisses), irrégulière; - élévation : élevée, plate, convexe (arrondie), ombonée (saillie), cratériforme; - pourtour de la colonie (bordure) : régulier (entier), ondulé (ondoyant), lobulaire (projections digitiformes), filiforme (projections fibreuses), recourbée (tourbillonnée); - surface : lisse, terne, luisante (muqueuse), mate (verre dépoli), rugueuse (plissée); - opacité et couleur : transparente, translucide, opaque, fluorescente, irisée, pigmentée. <p>La morphologie des cellules comprend les éléments suivants :</p> <p>Bactéries –taille, forme (bacilles, coques, spirales, etc.), coloration de Gram (négatif ou positif) et sporulation incluant des endospores. Caractéristiques de la surface : coloration des flagelles (monotriche, amphitriche, lophotriche ou péritriche – la présence de flagelles indique également la mobilité) et capsule ou film biologique.</p> <p>Champignons et microalgues –forme et taille des cellules végétatives (par exemple, mycélium, hyphes) et organes de fructification (conidiospores, téliospores, sporanges, etc.).</p> <p>Virus – enveloppe (présence = virus enveloppé; absence = virus nu) et forme de la capside (polyédrique, sphérique, filamenteuse, etc.).</p>
Niveau d'identification	<p>Cette méthode est utile pour l'identification préliminaire d'un micro-organisme ou pour la confirmation de l'identité.</p> <p>Chez certains organismes, comme les champignons, la morphologie des colonies et des cellules peut s'avérer un facteur de discrimination important.</p>

Forces	<p>Les bactéries et les champignons sont directement observables à l'œil nu ou avec un microscope optique. Pour observer des virus ou pour grossir ou avoir une meilleure résolution des structures bactériennes et fongiques, il faut un microscope électronique (à transmission) [ME] ou un microscope électronique à balayage (MEB).</p> <p>Méthode est simple, rapide et abordable.</p>
Limites	<p>Ne convient qu'aux organismes cultivables.</p> <p>Dépend beaucoup des conditions de culture.</p> <p>Peu utile pour une identification au niveau de l'espèce lorsqu'il y a des variations entre les souches.</p> <p>Des espèces non apparentées peuvent avoir des propriétés morphologiques similaires.</p> <p>Peut nécessiter nécessite de l'équipement cher, comme un ME ou un MEB, ainsi que des connaissances techniques.</p> <p>Peut nécessiter des réactions de coloration spéciales.</p> <p>Plusieurs espèces bactériennes ne réagissent pas bien à la coloration de Gram (par exemple, ne fonctionne pas chez <i>Mycoplasma</i> spp., <i>Mycobacteria</i> spp., <i>Chlamydia</i> spp., <i>Rickettsia</i> spp., <i>Campylobacter</i> spp., <i>Fusobacterium</i> spp. et <i>Brucella</i> spp., etc.). D'autres méthodes de coloration ou de contre-coloration peuvent être nécessaires.</p>
Pratiques exemplaires	<p>Idéalement, seules les conditions de culture documentées propres au test et à l'espèce d'intérêt devraient être utilisées.</p> <p>La morphologie de la colonie du micro-organisme déclaré doit être décrite et comparée à celle de la souche type de l'espèce.</p>
Conseils liés à la déclaration	<p>Inclure tous les renseignements pertinents (le protocole, les résultats, l'analyse et l'interprétation) liés aux tests, les données et les conditions de culture liées au micro-organisme déclaré et tous les comparateurs utilisés.</p>
Références	<p>Busse <i>et al.</i>, 1996 ; Jackman, 2012; Janda et Abbott, 2002; OECD, 2003; UK Standards for Microbiology Investigation 2016; Tshikhudo <i>et al.</i>, 2013; Gram stain, 2010; et McClelland, 2001</p>

Tableau B-1.2. propriétés physiologiques et biochimiques

Méthodes	<p>Ces méthodes comprennent les éléments suivants :</p> <ul style="list-style-type: none"> - température de croissance (optimale, maximale, minimale et plage); - pH optimal et plage; - besoins en oxygène (aérobie, anaérobie, facultatif) - besoins en matière d'activité de l'eau; - tolérance au sel; - croissance en milieu sélectif, différentiel ou enrichi; - sensibilité et résistance aux antibiotiques, aux antifongiques ou aux antiviraux; - sensibilité et tolérance aux métaux lourds ou à d'autres substances (bile, chlore, etc.) - besoins en éléments nutritifs et en facteurs de croissance; - utilisation des sources de carbone et d'azote; - activités enzymatiques; - utilisation des glucides; - production d'acides à partir de glucides; - production de pigments.
Niveau d'identification	<p>Sa valeur pour l'identification microbienne doit être considérée comme auxiliaire et complémentaire, à moins de fournir une justification étayée par des données détaillées suffisamment discriminantes. Elle est souvent utile pour confirmer l'identité de certains micro-organismes.</p> <p>Combinée à d'autres méthodes d'identification, elle peut permettre d'identifier certains micro-organismes jusqu'à l'espèce.</p>
Forces	<p>Économiques, faciles à réaliser et les résultats sont faciles à interpréter.</p> <p>Chez certains micro-organismes, les propriétés physiologiques et biochimiques peuvent différencier les espèces au sein d'un même genre.</p> <p>Des trousse commerciales normalisées sont disponibles pour bon nombre de ces propriétés. Des systèmes commerciaux automatisés pour des groupes microbiens spécifiques sont disponibles pour assurer une plus grande fiabilité de l'identification.</p>
Limites	<p>Dépendent beaucoup des conditions de culture.</p> <p>Ne conviennent qu'aux micro-organismes cultivables.</p> <p>Peu utiles pour une identification au niveau de l'espèce lorsqu'il y a des variations entre les souches. Une mutation aura généralement une incidence sur une propriété physiologique ou biochimique.</p> <p>Les bases de données sont souvent biaisées envers les espèces d'importance</p>

	clinique. La fiabilité dépend de la richesse et de la qualité de la base de données utilisée. Les espèces ou les groupes taxonomiques qui ne font pas partie de la base de données ne seront pas identifiés ou pourraient être mal identifiés.
Pratiques exemplaires	<p>Les propriétés physiologiques et biochimiques du micro-organisme déclaré doivent être décrites et comparées à celles de la souche type de l'espèce.</p> <p>Lorsque des trousse d'analyses commerciales sont utilisées, le choix de la trousse doit être pertinent pour le groupe de micro-organismes auquel le micro-organisme déclaré est soupçonné d'appartenir. La souche déclarée et les souches de référence doivent être testées en même temps.</p>
Conseils liés à la déclaration	<p>Inclure tous les renseignements pertinents (le protocole, les résultats, l'analyse et l'interprétation) liés aux tests, les données et les conditions de culture liées au micro-organisme déclaré et tous les comparateurs utilisés.</p> <p>Les renseignements sur la base de données de référence et le logiciel utilisés pour identifier le micro-organisme, obtenir les indices de similitude et déterminer d'autres possibilités d'espèces d'appartenance doivent être fournis. La spécificité, la richesse et les limites des bases de données doivent être clairement indiquées.</p> <p>Ces méthodes fournissent des renseignements importants propres au micro-organisme déclaré qui peuvent aussi servir à d'autres éléments d'information de la déclaration.</p>
Références	Anders <i>et al.</i> , 2007; Busse <i>et al.</i> , 1996; Gillis <i>et al.</i> , 2005; Colwell et Grigorova, 1987; Janda et Abbott, 2002; et UK Standards for Microbiology Investigation 2016

Tableau B-1.3. propriétés sérologiques (analyses immunologiques)

Méthodes	<p>Permettent de détecter les marqueurs phénotypiques (antigènes de surface) avec des anticorps ou des antisérums spécifiques aux éléments cellulaires, tels que les parois cellulaires, les capsules, les flagelles, les récepteurs, etc.</p> <p>Permettent de déterminer l'homologie antigénique des micro-organismes apparentés.</p>
Niveau d'identification	Leur valeur pour l'identification microbienne doit être considérée comme auxiliaire et complémentaire, à moins de fournir une justification étayée par des données détaillées suffisamment discriminantes. L'identification des sérotypes ou des sérovars est possible pour certains genres et certaines espèces.

	<p>La détection de protéines spécifiques et l'activité immunologique des protéines homologues peuvent également aider à identifier un micro-organisme au niveau de la souche.</p>
Forces	<p>Fiables si les antigènes choisis pour le sérotypage sont appropriés pour le groupe de micro-organismes.</p> <p>Les essais à base d'anticorps sont généralement sensibles et très spécifiques.</p> <p>Des trousse commerciales et des procédures normalisées sont disponibles.</p>
Limites	<p>Il faut que les sérotypes du groupe taxonomique soient déjà établis.</p> <p>Les techniques sérologiques nécessitent l'expression d'une molécule antigénique.</p> <p>Disponibilité et coût des anticorps commerciaux. Le processus de production des anticorps requis peut être complexe lorsqu'ils ne sont pas commercialement disponibles.</p> <p>Les méthodes peuvent devoir être optimisées.</p> <p>La sensibilité et à la spécificité des analyses immunologiques peuvent être affectées par les anticorps donnant des réactions croisées.</p> <p>Expertise technique requise.</p> <p>En ce qui concerne les espèces qui ne peuvent être cultivées, des processus additionnels, comme la production d'antigènes semi-synthétiques, peuvent être nécessaires.</p>
Pratiques exemplaires	<p>Le profil sérologique de la souche déclarée doit être décrit et comparé à celui des sérotypes connus décrits pour le groupe taxonomique.</p> <p>Lorsque des trousse d'analyse commerciales sont utilisées, la souche déclarée et les souches de référence doivent être testées en même temps que les témoins positifs et négatifs.</p>
Conseils liés à la déclaration	<p>Inclure tous les renseignements pertinents (le protocole, les résultats, l'analyse et l'interprétation) liés aux tests, les données et les conditions de culture liées au micro-organisme déclaré et tous les comparateurs utilisés.</p>
Références	<p>Andreotti <i>et al.</i>, 2003; Gasanov <i>et al.</i>, 2005; Jones et Krieg, 1984; Oskam <i>et al.</i>, 2000 et Stanier <i>et al.</i>, 1970</p>

Tableau B-1.4. production de toxines ou de métabolites

Méthodes	<p>L'absence ou la présence de toxines ou d'autres métabolites peut servir à l'identification de certains micro-organismes.</p> <p>Certaines méthodes peuvent cibler les toxines ou métabolites (analyse par chromatographie ou ELISA) ou les déterminants génétiques de ces produits.</p>
Niveau d'identification	<p>Combinée à d'autres méthodes d'identification, cette méthode peut permettre d'identifier un micro-organisme au niveau du genre, de l'espèce ou de la souche selon le micro-organisme.</p> <p>Par exemple, la détection de toxines spécifiques facilite l'attribution d'une souche d'<i>Escherichia coli</i> aux catégories d'intérêt clinique.</p>
Forces	<p>Certaines toxines sont propres à certains genres ou espèces (par exemple, la production d'aflatoxines par <i>Aspergillus spp.</i> peut être une information utile dans le cadre de leur identification). Des méthodes normalisées ou des trousseaux commerciaux sont disponibles pour certaines toxines et certains métabolites secondaires.</p>
Limites	<p>Dépendent beaucoup des conditions de culture.</p> <p>Peu utiles pour une identification au niveau de l'espèce lorsqu'il y a des variations entre les souches.</p> <p>Le milieu de culture, les conditions de croissance et les procédures d'analyse doivent être normalisés.</p> <p>Certaines trousseaux commerciaux ne génèrent que des résultats préliminaires; des tests supplémentaires sont donc nécessaires pour confirmer la production de toxines.</p>
Pratiques exemplaires	<p>Le choix des toxines ou des métabolites secondaires à rechercher devrait reposer sur le profil de toxines ou de métabolites secondaires documenté du groupe taxonomique pertinent pour le micro-organisme déclaré.</p>
Conseils liés à la déclaration	<p>Inclure tous les renseignements pertinents (le protocole, les résultats, l'analyse et l'interprétation) liés aux tests, les données et les conditions de culture liées au micro-organisme déclaré et tous les comparateurs utilisés.</p> <p>Ces méthodes fournissent des renseignements importants propres au micro-organisme déclaré qui peuvent aussi servir à d'autres éléments d'information de la déclaration.</p>
Références	<p>Arenas-Hernandez <i>et al.</i>, 2012; Cecchini <i>et al.</i>, 2016; Nielson <i>et al.</i>, 2011; Samson <i>et al.</i>, 2014 et Touzet <i>et al.</i>, 2007</p>

Tableau B-1.5. propriétés chimiotaxonomiques – analyse des acides gras (AG)

Méthode	<p>L'analyse des acides gras (AG) permet d'identifier et de classer des micro-organismes en fonction de la composition des AG de la bicouche phospholipidique de leur membrane cellulaire.</p> <p>Selon le type de micro-organisme, différents types de profils d'AG sont possibles, dont l'analyse EMAG, des acides gras phospholipidiques (AGPL) et des acides gras polyinsaturés (AGPI), des éthers phospholipidiques (LPLE) et des acides gras hydroxylés de lipopolysaccharides (AFHY-LPS), etc.</p>
Niveau d'identification	<p>Les profils d'AG sont généralement utiles pour identifier le genre bactérien ou fongique; dans certains cas, l'identification peut être réalisée au niveau de l'espèce ou de la sous-espèce. Les profils d'AG servent souvent pour identifier les espèces de microalgues.</p> <p>Sa valeur pour l'identification microbienne doit être considérée comme auxiliaire et complémentaire, à moins de fournir une justification étayée par des données détaillées suffisamment discriminantes.</p>
Forces	<p>La composition en AG semble très conservée et par conséquent fiable.</p> <p>Il existe un système d'identification commercial (système MIDI Sherlock®) pour l'analyse des AG. Celui-ci offre l'accès à une base de données établie qui peut être personnalisée pour l'espèce d'intérêt.</p>
Limites	<p>Dépend beaucoup des conditions de culture.</p> <p>Ne convient qu'aux organismes cultivables.</p> <p>Nécessite de la chromatographie gazeuse et une expertise technique.</p> <p>Les erreurs d'identification des AG sont courantes; de nouveaux AG inconnus peuvent devoir être identifiés par spectrométrie de masse.</p> <p>La fiabilité dépend de la richesse et de la qualité de la base de données utilisée. L'identification est limitée aux micro-organismes faisant partie de la base de données. Les espèces ou les groupes taxonomiques qui ne font pas partie de la base de données ne seront pas identifiés ou pourraient être mal identifiés.</p>
Pratiques exemplaires	<p>La base des données de référence devrait être à jour.</p>
Conseils liés à la déclaration	<p>Inclure tous les renseignements pertinents (le protocole, les résultats, l'analyse et l'interprétation) liés aux tests, les données et les conditions de culture liées au micro-organisme déclaré et tous les comparateurs utilisés.</p> <p>Les renseignements sur la base de données de référence et le logiciel utilisés pour identifier le micro-organisme, obtenir les indices de similitude et déterminer d'autres possibilités d'espèces d'appartenance doivent être fournis.</p>

	La spécificité, la richesse et les limites de la base de données doivent être clairement indiquées.
Références	Busse <i>et al.</i> , 1996; da Costa <i>et al.</i> , 2011a; Kunitsky <i>et al.</i> , 2006; Purcaro <i>et al.</i> , 2010; Spiegelman <i>et al.</i> , 2005 et Tshikhudo <i>et al.</i> , 2013

Méthodes génotypiques

Tableau B-2.1. séquençage de régions géniques conservées

Méthode	<p>Dans la plupart des cas, l'analyse de la séquence des régions géniques conservées, parfois en combinaison avec des régions très variables du même gène, permet souvent le classement présumé d'un micro-organisme dans un groupe taxonomique relativement à d'autres membres du groupe.</p> <p>Les gènes de l'ARNr 16S et de la chaperonine 60 (<i>cpn60</i>) sont couramment utilisés pour les bactéries; ceux de l'ARNr 16S et de la chaperonine de type II sont couramment utilisés pour les archées; les opérons de l'ARN ribosomal sont couramment utilisés pour les eucaryotes (habituellement des parties de ces gènes, comme 18S/ITS1, 5,8S, ITS2, ARNr 28S).</p>
Niveau d'identification	<p>Surtout au niveau du genre et de l'espèce (selon les régions variables du gène séquencé).</p> <p>Sa valeur pour l'identification microbienne devrait être considérée comme significative et primaire.</p>
Forces	<p>En raison des régions fortement conservées, ces séquences sont des marqueurs phylogénétiques universels efficaces. Il s'agit de la méthode la plus couramment utilisée pour l'identification et la classification phylogénétique des micro-organismes.</p> <p>Selon le gène conservé ou la région utilisée et le groupe de micro-organismes, des bases de données et des outils en ligne bien étayés sont disponibles, et l'interprétation des analyses est simple.</p> <p>Le séquençage des régions géniques conservées est simple et économique.</p>
Limites	<p>Le gène de l'ARNr 16S a peu de pouvoir discriminant au niveau de l'espèce pour plusieurs groupes taxonomiques en raison de sa fonction très conservée (par exemple, certaines espèces de <i>Bacillus</i> et <i>Pseudomonas</i>).</p> <p>Les résultats peuvent varier selon :</p> <ul style="list-style-type: none"> - la qualité de la séquence générée; - les méthodes de regroupement ou les indices d'alignement des séquences;

	<ul style="list-style-type: none"> - la multiplicité des copies, les variations intergéniques et la nécessité d'analyser une séquence consensus; - la richesse des bases de données (la couverture des séquences influe sur les résultats); - le niveau de maintenance de la base de données
Pratiques exemplaires	<p>Le choix du (des) gène(s) conservé(s) utilisé(s) pour l'identification (autres que ceux de l'ARNr ou <i>cpn 60</i>) doit être expliqué. La conservation de la séquence de la région ou du gène choisi doit être bien documentée pour l'espèce.</p> <p>Choisir des amorces spécifiques aux archées, aux bactéries ou aux champignons.</p> <p>Choisir une base de données de référence appropriée (par exemple, cpnDB, Ribosomal Database Project (RDP), CBS-KNAW, SGD, etc.) selon le micro-organisme déclaré.</p> <p>Pour l'analyse de l'ARNr 16S, il faut séquencer le gène complet, à moins que l'analyse d'une séquence plus courte ait été démontrée dans la littérature comme étant discriminatoire.</p> <p>Le seuil généralement accepté pour l'identification de l'espèce est de 99 % pour les séquences complètes de gènes ribosomaux (et idéalement une similitude de séquence de 99,5 % devrait être utilisée). Des seuils inférieurs peuvent toutefois être utilisés si des références permettent de justifier la valeur du seuil pour l'espèce en question.</p>
Conseils liés à la déclaration	<p>Les séquences en format FASTA doivent être fournies au PSN, ou déposées dans une base de données à laquelle celui-ci a accès.</p> <p>Fournir les renseignements voulus sur la base des données de référence et le logiciel qui ont été utilisés pour corroborer l'identification du micro-organisme.</p> <p>Les résultats de l'alignement des séquences doivent inclure les pourcentages d'identité et les autres espèces possibles. Préciser la méthode, le logiciel ou l'algorithme utilisé dans l'alignement ainsi que la longueur de la séquence utilisée dans l'alignement.</p>
Références	<p>Anderson et Cairney, 2004; Azevedo <i>et al.</i>, 2014; Debourgogne <i>et al.</i>, 2012; Hanson <i>et al.</i>, 2015; Hill <i>et al.</i>, 2004; Hill <i>et al.</i>, 2006; Hirsch <i>et al.</i>, 2010; Hirsch <i>et al.</i>, 2013; Janda et Abbott, 2007; Janke <i>et al.</i>, 2013; Kurosawa et Itoh, 1993; Links <i>et al.</i>, 2012; Parlapani et Boziaris, 2016; Schoch <i>et al.</i>, 2012; Srinivasan <i>et al.</i>, 2015 ; Tindall <i>et al.</i>, 2010 et Zeaiter <i>et al.</i>, 2002</p>

Tableau B-2.2. alignement de séquences multilocus (MLSA) ou typage de séquences multilocus (MLST)

Méthode	<p>Analyse phylogénétique de plusieurs fragments internes de gènes domestiques (habituellement jusqu'à huit), qui sont omniprésents dans un groupe taxonomique, qui sont présents en une seule copie dans le génome et ne sont pas assujettis à des pressions sélectives.</p> <p>Par exemple: gyrase A, gyrase B, facteur 1 d'initiation de la traduction, le facteur 2 d'initiation de la traduction 2, le facteur 1 d'élongation de la transcription, recombinaison A, recombinaison B, cytochrome C oxydase, sous-unité β de l'ATP synthase, etc.</p>
Niveau d'identification	<p>L'analyse des séquences liées peut permettre d'identifier un micro-organisme au niveau de la souche, mais selon la combinaison de gènes utilisée, il se peut que la distinction ne soit possible qu'au niveau de la sous-espèce, de l'espèce, du clade ou du genre.</p> <p>Sa valeur pour l'identification microbienne doit être considérée comme significative et primaire.</p>
Forces	<p>Les gènes domestiques sont associés au métabolisme cellulaire; ils peuvent donc être très discriminants et fiables s'ils sont choisis de manière appropriée.</p> <p>Permet d'éviter les effets de la recombinaison et du transfert horizontal d'un seul gène.</p> <p>Lorsque l'analyse de gènes ciblés universels montre une faible résolution, cette méthode permet de faire la distinction entre des espèces et des souches étroitement apparentées.</p> <p>La MLST et la MLSA sont bien soutenues par des bases de données et des outils en ligne.</p>
Limites	<p>Le pouvoir discriminant dépend des gènes domestiques utilisés.</p> <p>En ce qui concerne la MLSA, l'alignement des séquences liées pourrait ne pas être universellement compatible avec tous les logiciels.</p> <p>Il existe peu de logiciels de gestion des ensembles de données multilocus.</p> <p>L'analyse et l'interprétation des données peuvent s'avérer complexes lorsqu'il n'existe aucune documentation pour soutenir la stratégie MLST choisie pour le groupe taxonomique étudié.</p> <p>L'analyse peut être compliquée pour les organismes diploïdes et polyploïdes.</p>
Pratiques exemplaires	<p>De nombreux marqueurs améliorent la résolution parmi les espèces étroitement apparentées et le taux de réussite de l'identification.</p>

	<p>Les gènes utilisés pour la MLSA devraient comporter :</p> <ul style="list-style-type: none"> - une seule copie dans le génome; - idéalement, des fonctions de codage de protéines; - une distance de répartition minimale de 100 kb entre les gènes; - un pouvoir de discrimination suffisant; - une longueur de nucléotides permettant un séquençage convenable (900 à 2 250 pb) - doivent prédire les relations entre les génomes de façon précise et exacte
Conseils liés à la déclaration	<p>Les séquences en format FASTA doivent être fournies au PSN, ou déposées dans une base de données à laquelle celui-ci a accès.</p> <p>Le groupage phylogénétique, les pourcentages d'identité et les autres espèces possibles doivent être indiqués.</p> <p>Fournir les renseignements sur les bases de données de référence (par exemple, PubMLST et MLST.net) et le logiciel utilisés pour corroborer l'identification du micro-organisme.</p>
Références	<p>Azevedo <i>et al.</i>, 2014; Das <i>et al.</i>, 2014; Fan <i>et al.</i>, 2014; Kurosawa et Itoh, 1993; Macheras <i>et al.</i>, 2011; Maiden <i>et al.</i>, 1998; Pascual <i>et al.</i>, 2010; Thompson <i>et al.</i>, 2005; Tindall <i>et al.</i>, 2010 et Zeigler, 2003</p>

Tableau B-2.3. séquençage du génome entier

Méthode	<p>Convient bien à l'identification des espèces et des souches de bactéries, d'archées, de champignons, de virus, de microalgues, etc.</p> <p>L'analyse comparative de la séquence de génomes permet d'identifier des gènes ou des complexes géniques qui codent pour des éléments putatifs tels que des facteurs de virulence, enzymes, toxines, métabolites, résistances aux antibiotiques ou antifongiques, résistances aux stress abiotiques et biotiques, facteurs de survie et de persistance, etc.</p>
Niveau d'identification	<p>Identification possible au niveau de l'espèce et de la souche.</p> <p>Sa valeur pour l'identification microbienne doit être considérée comme significative et primaire.</p>
Forces	<p>Convient très bien aux micro-organismes qui ne peuvent être identifiés au moyen de la culture classique ou par des méthodes de séquençage de gènes individuels.</p> <p>Risque d'erreurs de séquençage plus faible en raison des longues séquences de lecture et du chevauchement des séquences.</p> <p>Fournit des renseignements importants propres au micro-organisme déclaré.</p> <p>Permet un MLST rapide de diverses régions génomiques d'intérêt (par exemple, le MLST de sous-unités de protéines ribosomiques (gènes <i>rps</i>) dans le génome).</p> <p>L'analyse de la séquence du génome entier et des plateformes bioinformatiques combinées aux bases de données sont de plus en plus disponibles publiquement aux fins de diagnostics cliniques, d'épidémiologie et de surveillance.</p>
Limites	<p>Les positions hétérozygotes dans le génome et la polyploïdie peuvent être problématiques.</p> <p>Processus fastidieux en raison de la grande quantité d'ADN de haute qualité requise, de la préparation de la banque génomique et du séquençage, etc.</p> <p>Production d'une grande quantité de données de séquence.</p> <p>Nécessite une grande puissance informatique pour assembler et annoter le génome, identifier les types de séquences multilocus, aligner les séquences et utiliser les données de séquençage du génome entier pour identifier l'espèce.</p> <p>Nécessite des systèmes de réseau avancés sur le plan technique, des pipelines de traitement de données et une expertise bio-informatique pour traduire les résultats en renseignements utiles pour l'identification microbienne de même que pour mettre en évidence leur pertinence biologique et écologique.</p>

	<p>Les résultats dépendent de la richesse et de la qualité des bases de données de références génomiques utilisées.</p> <p>Il n'existe, à l'heure actuelle, aucune norme sur les résultats de séquençage, la profondeur de la couverture et la qualité de l'assemblage.</p>
Pratiques exemplaires	Les pratiques exemplaires dépendent de la plateforme et des méthodes utilisées pour le séquençage, y compris la couverture génomique appropriée.
Conseils liés à la déclaration	<p>Les séquences annotées doivent être fournies au PSN dans un format lisible à la machine ou déposées dans une base de données accessible. Les données de séquence brutes doivent être fournies sur demande. Si seules des séquences génétiques clés sont utilisées pour l'identification, seules ces séquences annotées doivent être fournies.</p> <p>Le groupage phylogénétique, les pourcentages d'identité et les autres espèces possibles doivent être indiqués.</p> <p>Les renseignements sur les bases de données de références (par exemple, NCBI Genome, RDP database, CBS-KNAW, SGD, etc.) et le logiciel utilisés pour identifier le micro-organisme doivent être fournis.</p> <p>Cette méthode fournit des renseignements importants propres au micro-organisme déclaré qui peuvent aussi servir à d'autres éléments d'information de la déclaration.</p>
Références	Larsen <i>et al.</i> , 2012; Thomsen <i>et al.</i> , 2016; Ronholm <i>et al.</i> , 2016; Salvetti <i>et al.</i> , 2016; Saputra <i>et al.</i> , 2015; Schatz <i>et al.</i> , 2012 et Zhang <i>et al.</i> , 2015

Tableau B-2.4. typage par PCR et par empreinte génétique, et hybridation (RAPD, RFLP, ribotypage, PFGE)

Méthodes	<p>L'analyse des polymorphismes, y compris ceux des régions variables, des séquences non codantes et répétitives du génome, du nombre de copies de divers gènes d'intérêt (par exemple, facteurs de virulence, résistance aux antimicrobiens, etc.).</p> <p>Parmi les méthodes, on retrouve :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Rapport des bases de l'ADN (% G+C); - Études du polymorphisme de l'ADN, comme l'amplification aléatoire de l'ADN polymorphe (RAPD); - Polymorphisme de taille des fragments de restriction (RFLP); - Électrophorèse en champ pulsé (PFGE); - Électrophorèse sur gel de gradient dénaturant (DGGE); - Nombre variable de séquences répétées en tandem (VNTR); - Analyse multilocus du polymorphisme de séquences répétées en tandem (MLVA); - Polymorphisme de longueur des fragments de restriction amplifiés (AFLP), etc.; - Transferts de types Southern et de northern.
Niveau d'identification	<p>Identification possible au niveau de l'espèce et de la souche dans les groupes taxonomiques au sein desquels une méthode a été établie comme étant discriminatoire.</p> <p>Ces méthodes sont souvent utilisées pour analyser les variations inter-espèces et établir la phylogénie entre espèces apparentées.</p> <p>Leur valeur pour l'identification microbienne doit être considérée comme significative et primaire dans les groupes taxonomiques au sein desquels une méthode spécifique a été établie aux fins d'identification.</p>
Forces	<p>Le niveau de résolution et de spécificité est modéré à élevé.</p> <p>Ces méthodes conviennent aux micro-organismes cultivables.</p> <p>La plupart des méthodes sont associées à des protocoles normalisés et sont offertes sur le marché.</p>
Limites	<p>La plupart de ces méthodes exigent une expertise technique et du matériel spécialisé (PFGE or DGGE) pour obtenir et analyser les résultats. L'analyse et l'interprétation des données peuvent s'avérer complexes lorsqu'il n'existe aucune documentation pour appuyer l'utilisation de la méthode choisie pour l'identification et le groupage taxonomique de micro-organismes similaires.</p>

	<p>Pour certaines techniques comme la PCR-RFLP, il faut connaître les séquences génomiques sensibles à des endonucléases données.</p> <p>Pour les méthodes comme le RFLP, la normalisation des processus constitue une étape importante, et les résultats varient selon les conditions de PCR.</p> <p>Ces méthodes exigent beaucoup de travail et de temps (c.-à-d., jusqu'à quatre à sept jours pour la PFGE).</p>
Pratiques exemplaires	<p>Des souches de référence appropriées doivent être incluses dans ces méthodes.</p> <p>Dans le cas des méthodes fondées sur la PCR, le choix des amorces doit être justifié (c.-à-d., justifier le fait de fonder l'identification sur une région d'ADN ou un gène en particulier), et leur séquence nucléotidique doit être fournies.</p>
Conseils liés à la déclaration	<p>Inclure tous les renseignements pertinents (le protocole, les résultats, l'analyse et l'interprétation) liés aux tests, les données et les conditions de culture liées au micro-organisme déclaré et tous les comparateurs utilisés.</p>
Références	<p>Olive et Bean, 1999 et Raengpradub, 2009</p>

Tableau B-2.5. hybridation ADN-ADN

Méthode	<p>L'hybridation ADN-ADN permet de mesurer la similarité entre des génomes.</p> <p>Cette méthode sert à confirmer l'attribution d'une souche à une espèce donnée.</p>
Niveau d'identification	<p>Niveau de l'espèce.</p> <p>Sert à la classification taxonomique et à identifier une nouvelle espèce.</p> <p>Sa valeur pour l'identification microbienne doit être considérée comme significative et primaire.</p>
Forces	<p>Grande fiabilité dans la désignation de l'espèce.</p> <p>Il existe des laboratoires qui offrent ce service.</p>
Limites	<p>La technique est considérée comme étant difficile en raison de la variabilité des conditions et des résultats.</p> <p>Convient aux micro-organismes cultivables.</p> <p>Doit être optimisée dans chaque laboratoire.</p> <p>Les résultats dépendent de la taille du génome, de la présence de grands plasmides et de la pureté de l'ADN.</p>
Pratiques exemplaires	<p>Les taxons les plus étroitement apparentés doivent être examinés en même temps. Il faut justifier le choix des taxons les plus étroitement apparentés.</p>
Conseils liés à la déclaration	<p>Inclure tous les renseignements pertinents (le protocole, les résultats, l'analyse et l'interprétation) liés aux tests, les données et les conditions de culture liées au micro-organisme déclaré et tous les comparateurs et étalons de référence utilisés. La température (indicatrice du degré de complémentarité des séquences) à laquelle l'hybridation est réalisée ainsi que la justification de ce choix doivent être indiquées.</p>
Références	<p>Stackebrandt <i>et al.</i>, 2011 et Wayne <i>et al.</i>, 1987</p>

Autres méthodes utiles pour l'identification microbienne

Tableau B-3.1. Méthodes dépendant de la spectrométrie de masse (SM)

Méthode	<p>Technique d'analyse puissante.</p> <p>La SM à temps de vol pour la désorption-ionisation laser assistée par matrice (MALDI-TOF) est aussi utilisée pour l'identification microbienne et le typage de souches.</p> <p>La SM MALDI-TOF et la SM avec ionisation par électronébulisation (SM-ESI) ont été utilisés pour analyser les protéines ou toxines bactériennes aux fins d'une identification rapide des espèces.</p> <p>L'analyse de protéines sans gel à l'aide de la technique iTRAQ ou de l'ICAT peut être utilisée pour des protéomes et des métabolomes cellulaires; ceux-ci peuvent ensuite être comparés à des spectres de référence (bibliothèques de spectres de référence).</p>
Niveau d'identification	<p>L'identification de l'espèce et le typage de la souche sont possibles, selon l'espèce et la méthode.</p> <p>Sa valeur pour l'identification microbienne peut être considérée comme significative et primaire si elle est appuyée par de la documentation sur le groupe taxonomique.</p>
Forces	<p>Méthode rapide, exacte, sensible et moins chère que les méthodes de détection moléculaires et immunologiques, pourvu que la bibliothèque de référence soit riche et exhaustive afin d'analyser l'espèce et la souche d'intérêt.</p> <p>Le spectre de la SM MALDI-TOF d'un seul micro-organisme est une propriété spécifique du taxon de cet organisme; elle ne dépend ni de son emplacement géographique, ni de ses conditions de culture (ce qui ne devrait pas être complètement différent) ni de la méthode de préparation de l'échantillon.</p>
Limites	<p>L'acquisition et l'analyse de données prennent du temps et nécessitent une expertise technique et du matériel coûteux.</p> <p>L'identification de nouveaux isolats n'est possible que si la base de données spectrale contient des empreintes de masses peptidiques spécifiques aux souches types de genres, d'espèces, de sous-espèces ou de souches.</p> <p>Manque de références appropriées.</p> <p>Couverture faible des bases de données existantes.</p>

Pratiques exemplaires	<p>Le spectrogramme de masse de la souche déclarée doit être comparé à celui d'une espèce ou d'une souche représentative.</p> <p>Il faut au moins 5 à 10 biomarqueurs pour identifier une espèce; pour une souche ou une sous-espèce, il faut un nombre beaucoup plus élevé de pics reproductibles ou la présence de pics propres à la sous-espèce ou à un sérotype.</p>
Conseils liés à la déclaration	<p>Inclure tous les renseignements pertinents (le protocole, les résultats, l'analyse et l'interprétation) liés aux tests, les données et les conditions de culture liées au micro-organisme déclaré et tous les comparateurs et étalons de référence utilisés.</p> <p>La base de données servant à l'identification de la souche déclarée doit être clairement décrite.</p>
Références	Cheng <i>et al.</i> , 2016; Karger, 2016; Singhal <i>et al.</i> , 2015; Suarez <i>et al.</i> , 2015 et Wunschel <i>et al.</i> , 2012

Tableau B-3.2. analyse des lipoquinones respiratoires

Méthode	La caractérisation des différents types de quinones (ubiquinone, ménaquinone, dihydroménaquinone, déméthylménaquinone, rhodoquinone), la longueur de la chaîne latérale d'isoprénoïdes et le nombre d'unités d'isoprénoïdes saturées servent à identifier les bactéries et les archées et à déterminer les relations phylogénétiques.
Niveau d'identification	Identification du genre bactérien et, dans certains cas, de l'espèce. Sa valeur pour l'identification microbienne doit être considérée comme auxiliaire et complémentaire, à moins de fournir une justification étayée par des données détaillées suffisamment discriminantes.
Forces	Peut servir à identifier les différentes populations microbiennes d'échantillons environnementaux, telle qu'une boue activée. Méthode fiable si le type de quinones et la longueur de la chaîne d'isoprénoïdes sont déjà établis pour le groupe taxonomique du micro-organisme déclaré.
Limites	Nécessite un degré élevé d'expertise technique et une connaissance des quinones respiratoires pour l'analyse et l'interprétation des résultats. Les échantillons doivent être analysés par chromatographie en phase gazeuse, CLHP ou CLUP.
Pratiques exemplaires	Comme les études de chromatographie peuvent ne produire que des résultats préliminaires, il faut des tests de confirmation supplémentaires (spectres de résonance magnétique nucléaire ou spectrogrammes de masse) pour confirmer l'identification des quinones.
Conseils liés à la déclaration	Inclure tous les renseignements pertinents (le protocole, les résultats, l'analyse et l'interprétation) liés aux tests, les données et les conditions de culture liées au micro-organisme déclaré et tous les comparateurs et étalons de référence utilisés. Les chromatographes doivent être fournis.
Références	Busse <i>et al.</i> , 1996; Collins et Jones, 1981; Hiraishi, 1997; Spiegelman <i>et al.</i> , 2005 et Tindall, 2010

Tableau B-3.3. analyse des peptidoglycanes

Méthode	Les peptidoglycanes se divisent en deux principaux types (A et B) en fonction de leurs liaisons transversales.
Niveau d'identification	Bien que la structure des peptidoglycanes soit uniforme chez les bactéries à Gram négatif, elle varie beaucoup chez certains groupes de bactéries à Gram positif. Sa valeur pour l'identification microbienne doit être considérée comme auxiliaire ou complémentaire, à moins de fournir une justification étayée par des données détaillées suffisamment discriminantes.
Forces	La structure des peptidoglycanes constitue un critère taxonomique important pour la caractérisation des bactéries à Gram positif, particulièrement les membres du sous-ordre <i>Micrococccineae</i> , des staphylocoques et des bactéries aérobies formant des endospores. Méthode simple et rapide, ne nécessitant qu'une faible quantité de cellules et du matériel peu coûteux. Il existe un certain nombre de méthodes pour extraire les peptidoglycanes de la paroi cellulaire ou de cellules bactériennes entières.
Limites	Le pouvoir discriminant de la structure des peptidoglycanes se limite aux bactéries à Gram positif. On ne décèle aucune variation dans l'embranchement des <i>Proteobacteria</i> ni des <i>Bacteroidetes</i> . Cette méthode ne présente pas d'intérêt taxonomique pour les archées, les champignons, les algues et d'autres groupes de micro-organismes.
Pratiques exemplaires	Les taxons les plus étroitement apparentés doivent être examinés en même temps. L'analyse de l'acide 2,6-diaminopimélique (Dpm) et de l'OH-Dpm dans les hydrolysats de cellules entières est plus fiable que l'analyse des sucres des cellules entières (leur composition peut varier selon les conditions de culture alors que le Dpm et l'OH-Dpm ne changent pas, puisqu'ils proviennent du peptidoglycane).
Conseils liés à la déclaration	Inclure tous les renseignements pertinents (le protocole, les résultats, l'analyse et l'interprétation) liés aux tests, les données et les conditions de culture liées au micro-organisme déclaré et tous les comparateurs et étalons de référence utilisés.
Références	Busse <i>et al.</i> , 1996; Schumann, 2011 et Tindall, 2010

Annexe C – Modèle

Tableau C-1. modèle d'organisation des données générées et de l'analyse réalisée aux fins d'identification polyphasique d'un micro-organisme déclaré

Désignation du micro-organisme déclaré	Indiquez la désignation exclusive de la souche du micro-organisme déclaré.
Source	Indiquez la source de la souche ou de l'isolat.
Méthodes d'analyse Palier 1 Palier 2 Palier 3	Décrivez les méthodes d'analyse utilisées.
Données Palier 1 Palier 2 Palier 3	Fournissez des résultats clairement documentés des essais réalisés sur la souche déclarée ainsi que sur toute souche de comparaison (témoin) utilisée. Joignez toute pièce nécessaire
Analyse	Décrivez la façon dont les données présentées ci-dessus ont été analysées pour en arriver à formuler une conclusion sur l'identification et la confirmation du micro-organisme déclaré. Décrivez les caractéristiques observées chez le micro-organisme déclaré et celles du genre, de l'espèce et de la souche, telles qu'elles sont décrites dans la documentation de référence. Expliquez, le cas échéant, les différences entre les caractéristiques de la souche déclarée et celles des souches de comparaison utilisées.
Conclusion	Identifiez le micro-organisme jusqu'à l'espèce (au moins) ou au niveau taxonomique approprié.

Annexe D – Identification microbienne : Études de cas

Étude de cas – *Arcobacter* sp.

Tableau D-1.1. Renseignements sur la souche et les méthodes d'identification de la souche W34m d'*Arcobacter* sp.

Désignation du microorganisme déclaré	<i>Arcobacter</i> sp. souche W34m
Source	Milieu d'enrichissement favorisant la croissance bactérienne provenant d'un aquifère contaminé par des hydrocarbures.
Méthodes d'analyse	
Palier 1	1. Méthodes génotypiques : Analyse de la séquence du gène de l'ARNr 16S (segment d'environ 1 400 pb).
Palier 2	2. Méthodes génotypiques : Analyse de séquence du gène de la gyrase B (<i>gyrB</i>) (segment de 2 100 pb).
Palier 3	3. a) Propriétés morphologiques (coloration de Gram, couleur et taille des colonies, taille et forme des cellules). b) Propriétés physiologiques et biochimiques (caractéristiques et besoins de croissance, mobilité).
Données	
Palier 1	1. L'analyse primaire a permis de relever un haut degré d'identité avec les séquences de plusieurs espèces du genre <i>Arcobacter</i> de la base de données du NCBI. Analyse secondaire approfondie : comparaison entre la séquence d'essai et la séquence complète du gène de l'ARNr 16S de la souche type de chacune des 16 espèces reconnues du genre <i>Arcobacter</i> dans la base de données du NCBI (tableau D-1.2). À l'aide de renseignements tirés d'études (Collado <i>al.</i> , 2011; Levican <i>et al.</i> , 2012), il a été possible de classer cette souche dans un des trois clades du genre, soit le clade 1,

	constitué de cinq espèces : <i>Arcobacter marinus</i> , <i>Arcobacter halophilus</i> , <i>Arcobacter mytili</i> , <i>Arcobacter molluscorum</i> et <i>Arcobacter bivalviorum</i> .
Palier 2	2. L'analyse de la séquence du gène <i>gyrB</i> a révélé une structure de clade similaire à celle de l'analyse de la séquence du gène de l'ARNr 16S (voir, au tableau D-1.3, le degré d'identité entre la souche W34m et d'autres espèces d' <i>Arcobacter</i>).
Palier 3	3. a) Gram négatif, colonies de couleur beige, d'environ 1 mm de diamètre, cellules en forme d'arc dont la taille varie de 0,5 à 2 microns; observations faites après 96 heures de croissance sur gélose de bouillon marin. b) Croissance optimale dans 3 % de NaCl, croissance dans 2 % à 10 % de NaCl, croissance dans des conditions aérobies ou anaérobies, mobilité modérée, catalase+, oxydase-, incapable d'hydrolyser l'acétate d'indoxyle.
Analyse	Bien que l'analyse phylogénétique de deux gènes fut effectuée afin d'attribuer sans équivoque cette souche à un clade constitué de cinq espèces, il a été impossible de déterminer hors de tout doute l'espèce en question. L'espèce <i>A. marinus</i> a été considérée comme candidat en raison du taux d'identité de 99,6 % avec la séquence du gène de l'ARNr 16S. Cependant, la séquence du gène <i>gyrB</i> ne présentait que 94,1% d'identité avec celle d' <i>A. marinus</i> . La comparaison des propriétés phénotypiques de la souche déclarée avec celles des souches de référence du genre <i>Arcobacter</i> n'a pas permis d'attribuer la souche W34m à l'une de ces espèces (tableau D-1.4).
Conclusion	La souche W34m n'a pas pu être assignée à une espèce précise du genre <i>Arcobacter</i> ; à la lumière de l'analyse phylogénétique, elle peut être attribuée au clade 1 d' <i>Arcobacter</i> , une désignation taxonomique supérieure constituée de cinq espèces. En l'absence de renseignements propres à la souche, toutes les espèces du clade 1 sont considérées comme des substituts adéquats pour l'évaluation du risque lié à cette souche. Dans ce cas, l'attribution au clade 1 a contribué à réduire l'incertitude concernant le profil de risque généralement associé aux espèces d' <i>Arcobacter</i> , puisqu'aucune espèce pathogène n'appartient à ce clade (en comparaison, le clade 3 comprend des pathogènes d'origine alimentaire). De plus, l'évaluation du risque associé à cette souche a été rigoureuse, puisque la souche elle-même était bien caractérisée pour bon nombre de propriétés importantes.

Tableau D-1.2. comparaison entre la séquence du gène de l'ARNr 16S de la souche W34m d'*Arcobacter* sp. et celle des souches types des espèces d'*Arcobacter*

Clades	Espèces et souches	Identité de séquence avec celle de la souche W34m d' <i>Arcobacter</i> sp
Clade 3	<i>Arcobacter thereius</i> CCUG 56902	92.7%
Clade 3	<i>Arcobacter trophiarum</i> CCUG 59229	92.3%
Clade 3	<i>Arcobacter skirrowii</i> ATCC 51132	92.4%
Clade 3	<i>Arcobacter cryaerophilus</i> ATCC 43158	92.1%
Clade 3	<i>Arcobacter cibarius</i> CCUG 48482	92.6%
Clade 3	<i>Arcobacter butzleri</i> ATCC 49616	92.7%
Clade 2	<i>Arcobacter defluvii</i> CECT 7697	94.6%
Clade 2	<i>Arcobacter ellisii</i> CECT 7837	94.3%
Clade 2	<i>Arcobacter venerupis</i> CECT 7836T	94.8%
Clade 2	<i>Arcobacter nitrofigilis</i> ATCC 33309	94.4%
Clade 1	<i>Arcobacter marinus</i> CECT 7277	99.6%
Clade 1	<i>Arcobacter molluscorum</i> CECT 7696	97.5%
Clade 1	<i>Arcobacter halophilus</i> ATCC BAA 1022	96.4%
Clade 1	<i>Arcobacter mytili</i> CECT 7386	94.3%
Clade 1	<i>Arcobacter bivalviorum</i> CECT 7835T	92.8%
Non attribuée à un clade	<i>Arcobacter sulfidicus</i> (nom de la souche non précisée)	92.4%

Tableau D-1.3. comparaison entre la séquence du gène *gyrB* de la souche W34m d'*Arcobacter* sp. et celle des souches types des espèces d'*Arcobacter*

Clades	Espèces et souches	Identité de séquence avec celle de la souche W34m d' <i>Arcobacter</i> sp
Clade 3	<i>Arcobacter thereius</i> CCUG 56902	81.0%
Clade 3	<i>Arcobacter trophiarum</i> CCUG 59229	79.5%
Clade 3	<i>Arcobacter skirrowii</i> ATCC 51132	81.9%
Clade 3	<i>Arcobacter cryaerophilus</i> ATCC 43158	80.2%
Clade 3	<i>Arcobacter cibarius</i> CCUG 48482	83.0%
Clade 3	<i>Arcobacter butzleri</i> ATCC 49616	81.9%
Clade 2	<i>Arcobacter defluvii</i> CECT 7697	84.0%
Clade 2	<i>Arcobacter ellisii</i> CECT 7837	83.5%
Clade 2	<i>Arcobacter venerupis</i> CECT 7836T	83.0%
Clade 2	<i>Arcobacter nitrofigilis</i> ATCC 33309	82.9%
Clade 1	<i>Arcobacter marinus</i> CECT 7277	94.1%
Clade 1	<i>Arcobacter molluscorum</i> CECT 7696	88.8%
Clade 1	<i>Arcobacter halophilus</i> ATCC BAA 1022	88.0%
Clade 1	<i>Arcobacter mytili</i> CECT 7386	87.2%
Clade 1	<i>Arcobacter bivalviorum</i> CECT 7835T	84.0%

Tableau D-1.4. comparaison entre les propriétés de la souche W34m d'*Arcobacter* sp. et celles d'autres espèces d'*Arcobacter*

Caractéristiques	souche W34m d' <i>Arcobacter</i> sp.	<i>Arcobacter marinus</i> CECT 7277 (clade 1)	<i>Arcobacter halophilus</i> ATCC BAA 1022 (clade 1)	<i>Arcobacter nitrofigilis</i> ATCC 33309 (clade 2)	<i>Arcobacter butzleri</i> ATCC 49616 (clade 3)	<i>Arcobacter cryaerophilus</i> ATCC 43158 (clade 3)
Morphologie cellulaire	arc	arc	arc	arc	hélice	hélice
Mobilité	+	+	+	++	+++	++
Croissance à un taux de salinité de 1 %	-	+	-	+	+	+
Croissance à un taux de salinité supérieur à 10 %	+	-	+	-	-	-
Croissance à 37 °C sur CCDA	-	-	-	-	+	+
Catalase	+	-	-	+	+	+
Oxydase	-	+	+	+	+	+
Hydrolyse de l'acétate d'indoxyle	-	+	+	+	+	+
Croissance anaérobie	+	-	+	variable	variable	variable

CCDA : Gélose *Campylobacter* avec charbon de bois et désoxycholate

Étude de cas - *Aspergillus niger*

Tableau D-2.1. renseignements sur la souche et méthode d'identification de la souche VMZ d'*Aspergillus niger*

Désignation du micro-organisme déclaré	<i>Aspergillus niger</i> VMZ
Source	Cette souche provient de la collection d'un collaborateur. À l'origine, elle aurait été isolée du son.
Méthodes d'analyse	
Palier 1	1. Propriétés morphologiques : Couleur, forme et taille des colonies, des conidies et des conidiophores
Palier 2	2. Production de toxines/métabolites : profil des extrolites
Palier 3	3. Méthodes génotypiques : analyse de la séquence du gène de la grande sous-unité de l'ARN ribosomique (région D2 et région de l'ITS) et du gène de la calmoduline
Données	
Palier 1	1. - Colonies noires avec bordure blanche sur gélose CYA (casitone extrait de levure) après 7 jours à 25 °C - Tête conidiale globulaire de $50,9 \pm 17,2 \mu\text{m}$ - Conidiophore/stipe lisse et incolore - Les conidies forment des chaînes; centre lisse, globulaire et indenté, $4,2 \pm 0,5 \mu\text{m}$.
Palier 2	2. Extrolites produits : Ochratoxine A, fumonisine B, analénone (kotanines), naphtho- γ -pyrones, pyranonigrine A, pyrophène, tensidol A et B.
Palier 3	3. La comparaison de la région D2 à l'aide d'une base de données exclusive a montré que la séquence de la souche VMZ correspondait au même pourcentage d'identité à un certain nombre de séquences d'espèces d' <i>Aspergillus</i> , notamment <i>A. awamori</i> , <i>A. niger</i> et <i>A. foetidus</i> . - La comparaison de la région ITS à l'aide de la base de données ribosomiques du Nite Biological Resource Centre (NBRC) a montré que la séquence consensus de la souche VMZ était identique à un certain nombre d'entrées de la base de données pour <i>A. niger</i> et <i>A. phoenicis</i> . - L'analyse phylogénétique (figure D-2.1) a révélé que le gène de la calmoduline de la souche VMZ était ancré près d'autres gènes de calmoduline de souches d' <i>A. niger</i> .

Analyse

Les propriétés morphologiques de la souche VMZ concordent avec celles d'*A. awamori* et *A. niger* et sont semblables à celles des espèces du genre *Aspergillus* section *nigri*, comme *A. brasiliensis*, *A. tubingensis* et *A. acidus*, tel que reporté dans les publications scientifiques (Varga *et al.*, 2011). Les propriétés morphologiques à elles seules ne sont pas suffisantes pour l'identification au niveau de l'espèce. Une comparaison avec les données scientifiques accessibles au public montre qu'*A. niger* et *A. awamori* présentent des profils d'extrolites similaires (Frisvad *et al.*, 2011; Perrone *et al.*, 2011). Par conséquent, les deux espèces, *A. niger* et *A. awamori*, ne peuvent être différenciées par leurs caractéristiques morphologiques ou leurs profils d'extrolites (Perrone *et al.*, 2011). Les régions D2 et ITS ne contiennent pas assez de variation pour faire la distinction entre les espèces dans la section *nigri*. Des marqueurs secondaires sont donc nécessaires, tels que la calmoduline, la β -tubuline ou la deuxième plus grande sous-unité de l'ARN polymérase II (Samson *et al.*, 2014). Selon la littérature scientifique, les espèces de la section *nigri* peuvent être différenciées à l'aide des données de la séquence du gène de la calmoduline (Samson *et al.*, 2007a; Samson *et al.*, 2007b; Varga *et al.*, 2011). Une comparaison de la séquence partielle du gène de la calmoduline de la souche VMZ et de gènes de la calmoduline dans la banque de référence GenBank a montré que la séquence de la souche VMZ correspondait plus étroitement aux séquences d'*A. niger* qu'à celles d'*A. awamori*.

Conclusion

Les propriétés de la souche VMZ, l'analyse de données et la comparaison avec les descriptions parues dans des publications récentes appuient la conclusion que la souche VMZ appartient à l'espèce *A. niger*.

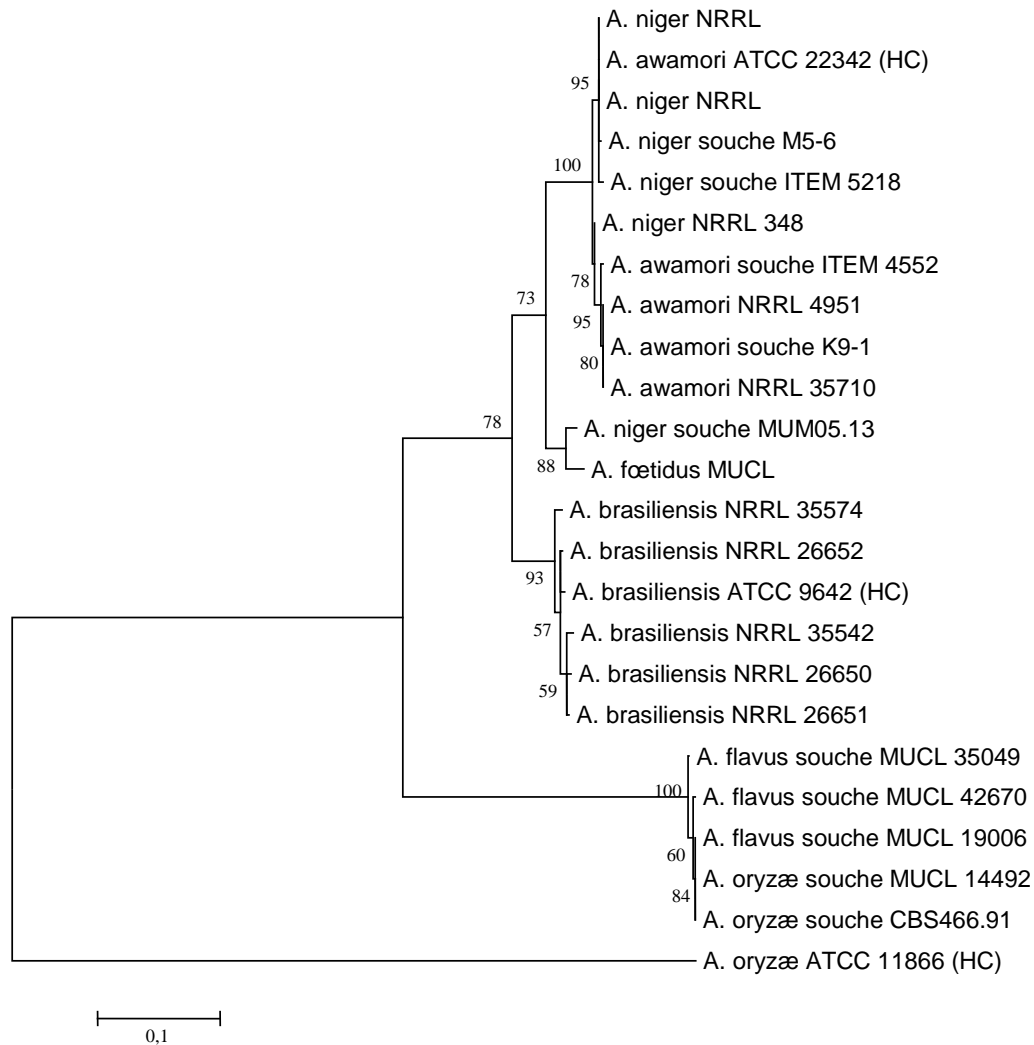


Figure D-2.1. arbre phylogénétique réalisé à l'aide de séquences partielles du gène de la calmoduline de la souche VMZ ainsi que de gènes de calmoduline d'espèces d'*Aspergillus* de la banque GenBank. L'alignement a été généré au moyen du logiciel Muscle et analysé à l'aide du modèle de distance de Kimura à deux paramètres, qui a ensuite été utilisé pour construire un arbre phylogénétique à l'aide de l'outil MEGA, version 5.2 (Tamura *et al.*, 2011).

Étude de cas – *Aurantiochytrium limacinum*

Tableau D-3.1. renseignements sur la souche et les méthodes d'identification de la souche EnX1 d'*Aurantiochytrium limacinum*

Désignation du micro-organisme déclaré	<i>Aurantiochytrium limacinum</i> EnX1
Source	Isolat environnemental d'eaux côtières, choisi pour sa production extracellulaire d'enzyme X1
Méthodes d'analyse	
Palier 1	1. Méthodes génotypiques : analyse de la séquence du gène de l'ARNr 18S (~1 700 pb) à l'aide des séquences accessibles au public du NCBI.
Palier 2	2. Propriétés morphologiques : caractéristiques morphologiques des cellules en microscopie électronique et photonique (tel qu'il est décrit dans Yokohoma et Honda, 2007 et dans Manikan <i>et al.</i> , 2015)
Palier 3	3. Propriétés chimiotaxonomiques : analyse EMAG pour le profil des acides gras polyinsaturés (tel qu'il est indiqué dans Manikan <i>et al.</i> , 2015)
Palier 4	4. Propriétés physiologiques et biochimiques : Profil pigmentaire (comme il est décrit dans Yokohoma et Honda, 2007)
Données	
Palier 1	1. D'après l'analyse de la séquence du gène de l'ARNr 18S (tableau D-3.2), la souche EnX1 fait clairement partie de la famille des <i>Thraustochytriaceae</i> , et présente 99,6 % de similitude avec la souche type <i>Aurantiochytrium limacinum</i> ATCC MYA-1381 (SR21) et 99,4 % avec la souche SW1 du genre <i>Aurantiochytrium</i> (nom déposé : <i>Schizochytrium limacinum</i> ATCC MYA-1381). L'analyse a également montré plus de 99 % de similitude avec différentes espèces du genre <i>Aurantiochytrium</i> de même qu'avec un genre étroitement apparenté, <i>Schizochytrium</i> .
Palier 2	2. La souche EnX1 forme de petites colonies sur de la gélose nutritive à l'eau de mer, mesurant jusqu'à 3-4 mm de diamètre après 1 semaine de croissance. Son thalle, globulaire et orange, a des parois minces. Les cellules végétatives (spores) sont sphériques, dispersées en cellules

isolées de 8-15 µm de diamètre; et présentaient des divisions binaires continues ou successives pour former des dyades, des tétrades et des grappes. Les sporanges matures semblent former des grappes de cellules se développant en zoosporanges. Le stade de protoplaste amiboïde mobile des zoosporanges a été observé avant la production des zoospores. Les zoospores sont de forme ovoïde et de type morphologique hétérokonte (biflagellé).

Palier 3

3. L'analyse EMAG révèle que la souche EnX1 produit des taux élevés d'acide docosahexaénoïque (DHA, C22: 6) [48 %] et d'acide hexadécanoïque (DHA, C16: 0) [28 %] avec des quantités détectables d'acide docosahexaénoïque (DHA, C22:6) [8 %], d'acide octadécanoïque (C18:0) [4 %] ainsi que d'infimes quantités d'acide 6-docosapentaénoïque (EPA, C20:5) [0,6 %] et d'acide arachidonique (AA, C20:4n6) [0,5 %].

Palier 4

4. Le profil pigmentaire de la souche EnX1 révèle que les cellules contiennent de l'astaxanthine, de la phoenicoxanthine, de la canthaxanthine, de l'échinénone et du bêta-carotène (tableau D-3.3).

Analyse

L'analyse génotypique du gène de l'ARNr 18S montre que la souche EnX1 appartient soit au genre *Aurantiochytrium* de la famille des thraustochytrides, soit au genre étroitement apparenté *Schizochytrium*.

Les profils morphologique, d'acides gras et pigmentaires de la souche EnX1 concordent avec ce qui a été publié dans la littérature scientifique et fournissent des preuves suffisantes pour identifier la souche EnX1 comme étant *A. limacinum* :

- La souche EnX1 forme de petites colonies et ne produit pas de réseau ectoplasmique, deux caractéristiques distinctives essentielles du genre *Aurantiochytrium*. En comparaison, *Schizochytrium sensu stricto* n'a pas tendance à former de petites colonies quel que soit le milieu et produit un réseau ectoplasmique (Yokohoma et Honda, 2007).
- La souche EnX1 produit des cellules amiboïdes en milieu nutritif, une caractéristique de l'espèce type *A. limacinum* SR21 (Yokohoma et Honda, 2007) et de la souche SW1 d'*Aurantiochytrium* sp. (Manikan *et al.*, 2015).
- Le profil d'acides gras de la souche EnX1 est semblable à celui de l'espèce type *A. limacinum* SR21 (Yokohoma et Honda, 2007) et d'*Aurantiochytrium* sp. SW1 (Manikan *et al.*, 2015).
- Le profil pigmentaire de la souche EnX1 est également semblable à celui de l'espèce type *A. limacinum*, et différent de celui u profil rapporté pour *Schizochytrium sensu stricto*

(Yokohoma et Honda, 2007).

Ensemble, ces données confirment que la souche EnX1 appartient à l'espèce *A. limacinum*.

Conclusion Les propriétés morphologiques, phénotypiques et génotypiques ont servi à identifier de façon fiable la nouvelle souche comme appartenant à l'espèce *A. limacinum*. La souche a été nommée *A. limacinum* EnX1.

Tableau D-3.2. comparaison de la séquence du gène de l'ARNr 18S de la souche EnX1 à l'aide du NCBI (Base de données nucleotide - nt)

Descriptions	Couverture d'interrogation %	% d'identité
<i>Aurantiochytrium limacinum</i> ATCC MYA-1381 (SR21)	100	99,6
Souche SW1 d' <i>Aurantiochytrium</i>	99	99,4
Souches BL11, KRS101, TF23, YLH70 d' <i>Aurantiochytrium</i>	>98	>99,0
Isolats OUC174, OUC166, LY02012 de <i>Schizochytrium</i>	>98	>99,0

Tableau D-3.3. profil caroténoïde de la souche EnX1 comparé à celui d'une souche d'*A. limacinum* et d'une souche de *Schizochytrium aggregatum*.

Micro-organisme	Astaxanthine	Phoenicoxanthine	Canthaxanthine	Échinénone	Carotène
Souche EnX1 ^a	+	+	+	+	+
<i>Aurantiochytrium limacinum</i> ATCC MYA-1381 (SR21) ^b	+	+	+	+	+
<i>Schizochytrium aggregatum</i> ATCC 28209 ^b	-	-	-	-	+

^a Tests pigmentaires réalisés chez la souche EnX1

^b Données de Yokohoma et Honda, 2007

Étude de cas – *Bacillus amyloliquefaciens*

Tableau D-4.1. renseignements sur la souche et les méthodes d'identification de la souche 74-57 de *Bacillus amyloliquefaciens*

Désignation du micro-organisme déclaré	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> 74-57
Source	Sédiments lacustres situés dans la région de Lanaudière dans la province de Québec
Méthodes d'analyse	
Palier 1	1. Méthodes génotypiques : analyse de la séquence du gène de l'ARNr 16S (fragment de ~1 400 pb).
Palier 2	2. Propriétés physiologiques et biochimiques : hydrolyse et dégradation des glucides, réduction des nitrates, réaction Voges-Proskauer, croissance avec une source unique de carbone, production d'acide ou de gaz à partir de glucides, tolérance au NaCl et à la température de croissance.
Palier 3	3. Méthodes génotypiques : polymorphisme de la région V3 du gène de l'ARNr 16S, selon Jeyaram <i>et al.</i> , (2011).
Données	
Palier 1	1. La séquence complète du gène de l'ARNr 16S a montré un pourcentage d'identité de 99 % avec la séquence de plusieurs souches de <i>B. subtilis</i> et de <i>B. amyloliquefaciens</i> de la base de données du NCBI (tableau D-4.2).
Palier 2	2. La souche 74-57 est un bâtonnet gram positif capable de dégrader l'esculine, la gélatine, la caséine et le Tween 20. Elle entraîne une réaction Voges-Proskauer positive. Elle réduit les nitrates en nitrites, peut utiliser le citrate comme seule source de carbone et produit de l'acide sans gaz à partir du glucose, du fructose, du maltose, du ribose, du saccharose et du tréhalose. La croissance est optimale à 30 °C. Tolérance au NaCl est jusqu'à 8 % (tableau D-4.3).
Palier 3	3. L'alignement de la séquence de la région V3 du gène de l'ARNr 16S de la souche 74-57 avec celles de plusieurs souches de <i>B. subtilis</i> et de <i>B. amyloliquefaciens</i> a montré que la souche 74-57 présente le même polymorphisme que <i>B. amyloliquefaciens</i> (tableau D-4.4).

Analyse

La séquence du gène de l'ARNr 16S présentait plus de 98 % d'identité avec la séquence du gène de l'ARNr 16S de plusieurs souches de *B. subtilis* et *B. amyloliquefaciens* ainsi qu'avec d'autres espèces de *Bacillus*, y compris *B. mojavensis*, *B. atrophaeus*, *B. vallismortis*, etc. (tableau D-4.2).

Les propriétés phénotypiques de la souche 74-57 ont permis de limiter l'identité à *B. subtilis* ou à *B. amyloliquefaciens*, et d'exclure les autres espèces de *Bacillus*.

B. subtilis et *B. amyloliquefaciens* ont de nombreuses caractéristiques en commun, ce qui les rend particulièrement difficiles à différencier en s'appuyant sur leurs propriétés phénotypiques. Au niveau de l'espèce, la distinction entre *B. subtilis* et *B. amyloliquefaciens* peut être établie par polymorphismes de la région V3 du gène de l'ARNr 16S (Jeyaram, 2011). L'alignement de la séquence de la région V3 du gène de l'ARNr 16S de la souche 74-57 avec celles d'autres souches de *B. subtilis* et *B. amyloliquefaciens* confirme que la souche 74-57 appartient à l'espèce *B. amyloliquefaciens*.

Conclusion

Les propriétés génotypiques, biochimiques et physiologiques de la souche 74-57 montrent qu'elle appartient à l'espèce *B. amyloliquefaciens*.

Tableau D-4.2. échantillons de séquences produisant des alignements significatifs

Description	Couverture d'interrogation	Valeur E	% d'identité
Séquence partielle du gène de l'ARN ribosomique 16S de la souche ATCC 23350 de <i>B. amyloliquefaciens</i>	100 %	0,0	100 %
Génome complet de la souche SDLI1 de <i>Bacillus</i> sp.	100 %	0,0	99 %
Génome complet de la souche ATCC 13952 de <i>B. subtilis</i>	100 %	0,0	99 %
Génome complet de la souche XH7 de <i>B. amyloliquefaciens</i>	100 %	0,0	99 %
Génome complet de la souche RD7-7 de <i>B. amyloliquefaciens</i>	100 %	0,0	99 %
Génome complet de la souche BH072 de <i>Bacillus</i> sp.	100 %	0,0	99 %
Génome complet de la souche NAU-B3 de <i>B. amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i>	100 %	0,0	99 %
Séquence partielle du gène de l'ARN ribosomique 16S du clone Filt.87 de <i>Bacillus</i> sp. non cultivé	99 %	0,0	99 %
Séquence partielle du gène de l'ARN ribosomique 16S de la souche B10 de <i>B. subtilis</i>	99 %	0,0	99 %
Séquence partielle du gène de l'ARN ribosomique 16S de la souche BS5582 de <i>B. amyloliquefaciens</i>	100 %	0,0	99 %
Séquence partielle du gène de l'ARN ribosomique 16S de la souche Ab-525 de <i>B. amyloliquefaciens</i>	99 %	0,0	99 %
Séquence partielle du gène de l'ARN ribosomique 16S de la souche IHB B 1516 de <i>B. subtilis</i>	99 %	0,0	99 %
Séquence partielle du gène de l'ARN ribosomique 16S de la souche M14K de <i>B. subtilis</i>	99 %	0,0	99 %
Séquence partielle du gène de l'ARN ribosomique 16S de la souche ET de <i>B. subtilis</i>	99 %	0,0	99 %
Séquence partielle du gène de l'ARN ribosomique 16S de la souche GXBA-4 de <i>B. amyloliquefaciens</i>	99 %	0,0	99 %
Séquence partielle du gène de l'ARN ribosomique 16S de la souche LCEP-1 de <i>B. amyloliquefaciens</i>	99 %	0,0	99 %
Séquence partielle du gène de l'ARN ribosomique 16S de la souche BIHB 335 de <i>Bacillus</i> sp.	99 %	0,0	99 %
Séquence partielle du gène de l'ARN ribosomique 16S de la souche ZJ06 de <i>B. subtilis</i>	99 %	0,0	99 %
Séquence partielle du gène de l'ARN ribosomique 16S de l'isolat G8 de <i>B. subtilis</i>	99 %	0,0	99 %
<i>Etc. - Plusieurs souches supplémentaires avec une couverture d'interrogation et un % d'identité similaires ont été trouvées</i>			

Tableau D-4.3. propriétés morphologiques et biochimiques de la souche 74-57 comparées à celles d'espèces correspondantes potentielles dans le groupe *B. subtilis*

Caractéristiques	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6051	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> ATCC 23350	Souche 74-57 déclarée
Coloration de Gram	Gram positif	Gram positif	Gram positif
Forme et taille des cellules	Bâtonnet 0,7-0,8 × 2,0-3,0 µm	Bâtonnet 0,7-0,9 × 1,8-3,0 µm	Bâtonnet
Spores	Spores ellipsoïdales à cylindriques	Spores ellipsoïdales, centrales, paracentrales ou terminales	Oui, forme non indiquée
Caséine	+	+	+
Esculine	+	+	+
Gélatine	+	+	+
Amidon	+	+	+
Réduction des nitrates	+	+	+
Tween 20	+	+	+
Urée	-	-	-
Voges-Proskauer	+	+	+
Citrate comme seule source de carbone	+	+	+
Production d'acide sans gaz à partir du			
Glucose	+	+	+
Fructose	+	+	+
Maltose	+	+	+
Ribose	+	+	+
Saccharose	+	+	+
Tréhalose	+	v	+
Catalase	+	Non disponible	-
Température de croissance	Optimale 28-30 °C	Optimale 30-40 °C	Positive à 25 °C
NaCl à 7 %	+	+	+

Tableau D-4.4. alignement de la séquence de la région V3 du gène de l'ARNr 16S de la souche 74-57 avec celles des souches de *B. amyloliquefaciens* et de *B. subtilis*. Les nucléotides G et C en caractères gras montrent les polymorphismes dans la région V3 de l'ARNr 16S.

Désignation	Souche	Séquence	N° dans GenBank#
<i>B. amyloliquefaciens</i>	ATCC 23842	TTGTTAGGGAAGAACAAGT G CCGTTCAAATAGGGCGG C ACCTTG	JF749277
	At4	TTGTTAGGGAAGAACAAGT G CCGTTCAAATAGGGCGG C ACCTTG	AY211486
	At1	TTGTTAGGGAAGAACAAGT G CCGTTCAAATAGGGCGG C ACCTTG	AY211483
	ATCC 23350	TTGTTAGGGAAGAACAAGT G CCGTTCAAATAGGGCGG C ACCTTG	EF433406
Souche déclarée	74-57	TTGTTAGGGAAGAACAAGT G CCGTTCAAATAGGGCGG C ACCTTG	Sans objet
<i>B. subtilis</i>	ATCC 6633	TTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCGAATAGGGCGGTACCTTG	EF433403
	DSM 10	TTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCGAATAGGGCGGTACCTTG	AJ276351
	JN-1	TTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCGAATAGGGCGGTACCTTG	AB07253.1
	ATCC 6051	TTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCGAATAGGGCGGTACCTTG	EF423592

Étude de cas – *Candida tropicalis*

Tableau D-5.1. renseignements sur la souche et les méthodes d'identification de la souche ATCC 13803 de *Candida tropicalis*

Désignation du micro-organisme déclaré	<i>Candida tropicalis</i> ATCC 13803 (Désignation initiale : FDA PCI M-59)
Source	Achetée de l'American Type Culture Collection (ATCC) en octobre 2016. La souche a été déposée à l'ATCC par la Food and Drug Agency des États-Unis, d'une origine non précisée. La fiche de renseignements et le certificat d'analyse sont joints au présent document.
Méthodes d'analyse	Étant donné que l'identité de la souche a été déterminée par l'ATCC, le déclarant n'a qu'à confirmer l'identité aux fins d'assurance de la qualité :
Palier 1	<ol style="list-style-type: none">1. Propriétés morphologiques : vérifier la pureté par culture sur gélose et confirmer la couleur et l'aspect des colonies, ainsi que l'aspect des cellules.2. Méthodes génotypiques : analyse de la séquence du gène de l'ARNr 28S (fragment de 592 pb de la région D1D2) et comparaison avec la séquence de nucléotides de 521 pb du locus KU729171 de GenBank, qui est la séquence de référence utilisée par l'ATCC.
Données	
Palier 1	<ol style="list-style-type: none">1. Sur gélose YPGA (extrait de levure, peptone et galactose), les colonies sont de couleur crème, lisses avec une bordure ridée. Les cellules en bourgeonnement sont ellipsoïdales. Le pseudomycélium est abondant et composé d'éléments longs et peu ramifiés. Les conidies sont disposées en petits groupes autour du milieu de chaque élément cellulaire.2. La séquence de la région D1D2 s'est avérée identique (c'est-à-dire 100 % de similitude) à celle de la séquence de nucléotides KU729171 de GenBank (figure D-5.1).
Analyse	Les propriétés morphologiques et génétiques sont conformes aux caractéristiques prévues pour cette souche, telles qu'elles sont décrites dans la fiche de renseignements et le certificat d'analyse.
Conclusion	L'identité de la souche reçue de l'ATCC est confirmée comme étant <i>Candida tropicalis</i> ATCC 13803.

Requête	1	GGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACTGATTTGCTTAATTGCACCACATGT	60
KU729171	1	GGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACTGATTTGCTTAATTGCACCACATGT	60
Requête	1	GTTTTTTTATTGAACAAATTTCTTTGGTGGCGGGAGCAATCCTACCGCCAGAGGTTATAAC	120
KU729171	61	GTTTTTTTATTGAACAAATTTCTTTGGTGGCGGGAGCAATCCTACCGCCAGAGGTTATAAC	120
Requête	1	TAAACCAAACCTTTTTATTTACAGTCAAACCTTGATTTATTATTACAATAGTCAAACCTTTC	180
KU729171	121	TAAACCAAACCTTTTTATTTACAGTCAAACCTTGATTTATTATTACAATAGTCAAACCTTTC	180
Requête	1	AACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATA	240
KU729171	181	AACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATA	240
Requête	1	TGAATTGCAGATATTCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATT	300
KU729171	241	TGAATTGCAGATATTCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATT	300
Requête	1	CCAAAGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTCCCTCAAACCCCGGGTTTGGTGTGAG	360
KU729171	301	CCAAAGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTCCCTCAAACCCCGGGTTTGGTGTGAG	360
Requête	1	CAATACGCTAGGTTTGTGTTGAAAGAATTTACGTGGAAACTTATTTTAAGCGACTTAGGTT	420
KU729171	361	CAATACGCTAGGTTTGTGTTGAAAGAATTTACGTGGAAACTTATTTTAAGCGACTTAGGTT	420
Requête	1	TATCCAAAACGCTTATTTTGCTAGTGGCCACCACAATTTATTTTCATAACTTTGACCTCA	480
KU729171	421	TATCCAAAACGCTTATTTTGCTAGTGGCCACCACAATTTATTTTCATAACTTTGACCTCA	480
Requête	1	AATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAA	521
KU729171	481	AATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAA	521

Figure D-5.1. comparaison de la séquence de la région D1D2 du gène de l'ARNr 28S de la souche déclarée avec celle des nucléotides KU729171 de GenBank

Étude de cas – *Deinococcus proteolyticus*

Tableau D-6.1. renseignements sur la souche et méthode d'identification de la souche Alpha1 de *Deinococcus proteolyticus*

Désignation du micro-organisme déclaré	Souche Alpha1 de <i>Deinococcus proteolyticus</i>
Source	Échantillon de sol à proximité d'une centrale nucléaire en Ontario (Canada).
Méthodes d'analyse	
Palier 1	1. Propriétés morphologiques, physiologiques et biochimiques : L'aspect des cellules, la couleur des colonies, la coloration de Gram, la production de catalase et la résistance à l'irradiation (ce test particulier a été effectué parce que le micro-organisme a été obtenu près d'une centrale nucléaire).
Palier 2	2. Méthodes génotypiques : analyse de la séquence du gène de l'ARNr 16S (~1 100 pb).
Palier 3	3. Méthodes génotypiques : analyse de la séquence du gène cpn60 (554 pb).
Données	
Palier 1	1. La souche Alpha1 produit des colonies rouge-rose lorsqu'elle est cultivée sur un milieu de culture solide; elle est Gram positive, catalase positive et résistante à l'irradiation gamma de 10 kGy. L'analyse par microscopie électronique révèle des cellules sphériques de 1,0 à 3,0 µm.
Palier 2	2. Un amplicon de 1,1 kb du gène de l'ARNr 16S de la souche Alpha1 a été analysé au moyen du logiciel BLASTN du NCBI (tableau D-6.2). Les résultats donnent à penser que la souche Alpha 1 fait partie du genre <i>Deinococcus</i> . Les taux d'identité les plus élevés (95 %) correspondent à deux séquences provenant de la souche MRP de <i>Deinococcus proteolyticus</i> . Des taux de similitude de 93 % et 94 % sont rapportés avec la séquence du gène de l'ARNr 16S d'autres espèces de <i>Deinococcus</i> . De plus, il y avait un écart de 2 % dans l'alignement avec la séquence du gène de l'ARNr 16S de la souche MRP de <i>Deinococcus proteolyticus</i> .
Palier 3	3. Une région du gène cpn60 de la souche Alpha1 (correspondant aux positions 274-828 du gène cpn60 d' <i>Escherichia coli</i>) a été amplifiée selon les protocoles publiés par Hill et ses collaborateurs (2006) et sa séquence de nucléotides a été déterminée. Une recherche de

similitude de séquences dans la banque de données cpnDB (<http://cpndb.ca/seqComp.php> - Hill et al, 2004) montre une similitude de 99,3 % avec la séquence du gène cpn60 de la souche type *D. proteolyticus*. La similitude avec le gène cpn60 d'autres espèces de *Deinococcus* est beaucoup plus faible : 88,2 % à 84,2 % (tableau D-6.3).

Analyse

La résistance à l'irradiation gamma suggère fortement que la souche Alpha1 appartient au genre *Deinococcus*. Les données morphologiques, physiologiques et biochimiques ne permettent pas de déterminer l'espèce de la souche Alpha1, étant donné que ses caractéristiques sont communes à plusieurs espèces du genre *Deinococcus*.

L'analyse de la séquence indique que le gène de l'ARNr 16S de la souche Alpha1 présente des similarités avec plusieurs espèces du genre *Deinococcus*, mais les taux de similitude ne permettent pas de déterminer l'espèce à laquelle appartient la souche Alpha 1 parce que :

- on recommande une similitude de séquences de plus de 99 % pour déterminer l'espèce (Janda et Abbott, 2002; Tindall *et al.*, 2010);
- seulement 1 097 pb du gène ont été séquencés, et le pourcentage d'ambiguïtés (trous) est supérieur à 1 %. La longueur de la séquence est inférieure au seuil idéal de 1 300 pb, et le pourcentage d'ambiguïtés (trous) est supérieur au seuil recommandé de 1 % (Janda et Abbott, 2002).

L'analyse de la séquence du fragment de 554 pb du gène cpn60 de la souche Alpha1 a montré une grande similarité avec le gène cpn60 de *D. proteolyticus*. Même si le gène cpn60 de la souche Alpha1 présente aussi une certaine similarité avec le gène cpn60 d'autres espèces de *Deinococcus*, le pourcentage est nettement plus faible.

Conclusion

Les propriétés génotypiques, biochimiques et physiologiques de la souche Alpha1 permettent de conclure qu'elle appartient à l'espèce *Deinococcus proteolyticus*.

Tableau D-6.2. comparaison de la séquence du gène de l'ARNr 16S de la souche Alpha1 à l'aide du logiciel BLAST du NCBI

Description	Couverture d'interrogation %	% d'identité	Trous %
Séquence complète du gène de l'ARN ribosomique 16S de la souche MRP de <i>Deinococcus proteolyticus</i>	98	95	2
Génome complet de la souche MRP de <i>Deinococcus proteolyticus</i>	98	95	2
Séquence partielle du gène de l'ARN ribosomique 16S de la souche MRP de <i>Deinococcus proteolyticus</i>	98	94	2
Séquence partielle du gène de l'ARN ribosomique 16S de la souche 14 pro de <i>Deinococcus</i> sp.	96	94	2
Séquence partielle du gène de l'ARN ribosomique 16S de la souche Grk2 de <i>Deinococcus</i> sp.	97	93	
Séquence partielle du gène de l'ARN ribosomique 16S de la souche 3ax de <i>Deinococcus piscis</i>	98	93	

Tableau D-6.3. comparaison du fragment de 552 pb du gène cpn60 de la souche Alpha1 avec la banque de données cpnDB

Description	Identifiant du gène cpn (cpnID)	Couverture d'interrogation %	Valeur E	% d'identité
NC_015161 <i>Deinococcus proteolyticus</i> MRP (souche type)	b18672	552	38	99,3
NZ_KB899708 <i>Deinococcus aquatilis</i> DSM 23025	b27375	552	1,7e+02	88,2
AY453859 <i>Deinococcus grandis</i> DSMZ 3693	b9497	552	2e+02	87,1
CP002191 <i>Deinococcus gobiensis</i> I-0	b20546	552	2e+02	86,8
CP001114 <i>Deinococcus deserti</i> VCD115	b13538	552	2,1e+02	86,4
NZ_ATTJ01000001 <i>Deinococcus</i> sp. 2009	b28170	552	2,3e+02	85,8
NC_001263 <i>Deinococcus radiodurans</i> R1	b1273	552	2,4e+02	85,7
CP000359 <i>Deinococcus geothermalis</i> DSM 11300	b7527	552	2,8e+02	84,4
NZ_APCS01000080 <i>Deinococcus wulumuqiensis</i> R12	b26963	552	2,9e+02	84,2

Étude de cas – virus *Influenza*

Tableau D-7.1. renseignements sur la souche et méthode d'identification de la souche vaccinale du virus de l'*Influenza A/Vancouver/35/2016* (ca *A/Vancouver*)

Désignation du micro-organisme déclaré	Souche vaccinale du virus de l' <i>Influenza A/Vancouver/35/2016</i> (ca <i>A/Vancouver</i>)
Source	Virus <i>Influenza</i> vivant, atténué, adapté au froid et réassorti, dérivé du virus adapté au froid <i>A/Ann Arbor/6/60</i> et du virus <i>Influenza</i> de type sauvage <i>A/Vancouver/35/2016</i> (H3N2)
Méthodes d'analyse	
Palier 1	1. Méthodes génotypiques : séquence génomique complète
Palier 2	2. Propriétés sérologiques : inhibition de l'hémagglutination (IH) des virus <i>Influenza</i> H3
Données	
Palier 1	1. Le séquençage du génome de la souche déclarée, qui est un virus réassorti 6:2, a montré que les segments de son génome sont presque identiques à ceux de ses organismes donneurs : le virus maître donneur ca <i>A/Ann Arbor/6/60</i> adapté au froid (ca, pour <i>cold adapted</i>), qui a fourni les segments PB1, PB2, PA, NP, M et NS, et le virus de type sauvage <i>A/Vancouver/35/2016</i> (H3N2), qui a fourni les segments HA et NA (voir la comparaison des séquences entre les virus donneurs et le virus déclaré au tableau D-7.2). Trois mutations ponctuelles ont été observées, dont deux se sont traduites par un changement d'acide aminé.
Palier 2	2. Le virus ca <i>A/Vancouver</i> réagit avec des antisérums de furet produits contre la souche de référence avec un titre d'IH égal ou se situant à l'intérieur d'une fourchette de deux fois le titre d'IH de la souche de référence de type sauvage (tableau D-7.3).
Analyse	Les séquences des segments PB2, PB1, PA, NP, M et NS du génome du virus ca <i>A/Vancouver</i> sont identiques à celles des segments correspondants du virus <i>A/Ann Arbor/6/60</i> , à l'exception d'une mutation dans le segment de la Matrice. Le segment NA du génome du virus déclaré est identique au segment d'ADN correspondant du virus de type sauvage <i>A/Vancouver/35/2016</i> , et deux mutations ponctuelles ont été observées dans le segment HA. La modification de deux acides aminés sur l'antigène HA n'a pas diminué son antigénicité, laquelle a été confirmée par sérotypage par le test d'IH; le sérotypage a également permis de confirmer le sérotype H3 du virus ca <i>A/Vancouver</i> .

Conclusion	L'analyse des segments génomiques et les données d'IH permettent de conclure avec que certitude la souche virale déclarée est un virus <i>Influenza</i> ayant des propriétés antigéniques identiques à celles du virus de type sauvage A/Vancouver/356/2016, ainsi que des propriétés d'adaptation au froid. Par conséquent, la désignation du virus déclaré est acceptée comme étant « A/Vancouver/35/2016 adapté au froid ».
-------------------	--

Tableau D-7.2. comparaison de la séquence de la souche vaccinale déclarée ca A/Vancouver avec celles du virus ca A/Ann Arbor/6/60 et du virus *Influenza* de type sauvage A/Vancouver/35/2016 (H3N2)

Segment <i>Influenza</i>	ca A/Vancouver (position du nucléotide modifié entre parenthèses)	Virus de type sauvage A/Vancouver/35/2016 (H3N2)	ca A/Ann Arbor/6/60
PB1	Identique	Pas de données	Identique
PB2	Identique	Pas de données	Identique
Pa	Identique	Pas de données	Identique
NP	Identique	Pas de données	Identique
M	A (Thr) (at 256)	Pas de données	T (Thr) (at 256)
NS	Identique	Pas de données	Identique
HA	G (Gly) (at 637) G(Gly) (at 735)	A (Asp) (at 637) A (Gly) (at 735)	Pas de données
NA	Identique	Identique	Pas de données

Tableau D-7.3. réaction d'hémagglutination des virus *Influenza* H3 (utilisant le sérum de référence de furet)

	A/HongKong/4801/2014	A/California/7/2004	A/New Caledonia/20/99	A/Vancouver/35/2016	ca A/Vancouver
Antigène de référence					
A/HongKong/4801/2014	320	160	80	160	160
A/California/7/2004	160	320	40	160	320
A/New Caledonia/20/99	40	40	1280	40	40
A/Vancouver/35/2016	160	160	80	320	160
Antigène à l'essai					
ca A/Vancouver	160	160	80	640	320

Étude de cas – *Komagataella phaffii*

Tableau D-8.1. renseignements sur la souche et les méthodes d'identification de la souche C345 de *Komagataella phaffii*

Désignation du micro-organisme déclaré	Souche <i>Komagataella phaffii</i> C345
Source	Isolat environnemental provenant de chênes noirs de la Californie, É.-U.
Méthodes d'analyse	
Palier 1	1. Propriétés morphologiques : morphologie des cellules et des colonies
Palier 2	2. Méthodes génotypiques : analyse de la séquence de l'opéron du gène de la grande sous-unité de l'ARN ribosomique (région D1/D2) à l'aide de la base de données CBS-KNAW et la banque GenBank du NCBI, tel qu'il est indiqué dans Kurtzman (2009)
Données	
Palier 1	1. Les cellules de la souche C345 sont sphériques à ovales. Les colonies sur gélose sont de couleur blanc-havane, leur surface est terne et leur texture, butyreuse. Les pseudohyphes et les hyphes sont absents. Le pourtour des colonies est finement à modérément lobé. Les ascospores sont en forme de chapeau.
Palier 2	2. L'alignement par paires des séquences de la région D1/D2 du gène de la grande sous-unité de l'ARNr de la souche C345 avec la banque de données CBS-KNAW montre 99,8 % de similitude avec la souche <i>K. phaffii</i> CBS 2612 ^T , 98,6 % de similitude avec <i>K. kurtzmanii</i> CBS 12817 ^T , 97,9 % avec <i>K. ulmi</i> CBS 12361 ^T et 97,6 % avec <i>K. pastoris</i> CBS 704 ^T . Les recherches au moyen du logiciel BLAST dans GenBank ont également montré des résultats similaires (tableau D-8.2).
Analyse	La description morphologique concorde avec la morphologie publiée de <i>K. phaffii</i> (précédemment connue sous le nom de <i>Pichia pastoris</i>). Toutefois, <i>K. phaffii</i> ne peut pas être différenciée des autres espèces étroitement apparentées de <i>Komagataella</i> par la morphologie des cellules et des colonies ou par ses réactions aux tests de fermentation et d'assimilation standard (Kurtzman, 2005, 2009). L'alignement par paires des séquences de la région D1/D2 du gène de la grande sous-unité de l'ARNr n'a montré qu'une seule possibilité de plus de 99 % d'identité à <i>K. phaffii</i> CBS 2612 ^T , ce qui permet de conclure que cette souche appartient à l'espèce <i>K. phaffii</i> .

Conclusion

D'après les propriétés morphologiques et l'analyse de la séquence de la région D1/D2 du gène de la grande sous-unité de l'ARNr, la souche C345 a été identifiée comme étant *Komagataella phaffii*. La souche déclarée a été désignée *Komagataella phaffii* C345. Étant donné la reclassification taxonomique de *K. phaffii*, le nom *P. pastoris* devrait être également utilisé lors des recherches documentaires.

Tableau D-8.2. comparaison de la séquence de la région D1/D2 du gène de la grande sous-unité de l'ARNr de la souche C345 avec celles d'autres espèces de *Komagataella* dans la banque de données CBS-KNAW

Identité de séquence de la souche <i>Komagataella phaffii</i> C 345 avec	% d'identité
<i>K. phaffii</i> CBS 2612 = NRRL Y-7556	99,8
<i>K. kurtzmanii</i> CBS 12817 =NRRL Y-63667	98,6
<i>K. ulmi</i> CBS12361 = NRRL YB-407	97,9
<i>K. pastoris</i> CBS704 = NRRL Y-1603	97,6

Étude de cas – *Listeria monocytogenes*

Tableau D-9.1. renseignements sur la souche et les méthodes d'identification de la souche WEX 321 de *Listeria monocytogenes*

Désignation du micro-organisme déclaré	Souche <i>Listeria monocytogenes</i> WEX 321
Source	Organisme génétiquement modifié dérivé de la souche de type sauvage <i>L. monocytogenes</i> 10403S isolée de lésions cutanées humaines. La souche WEX 321 est fortement atténuée en raison de délétions du gène <i>sigL</i> et peut exprimer l'interféron gamma humain (IFN- γ) par suite de l'insertion d'une cassette d'expression d'IFN- γ dans son génome.
Méthodes d'analyse	
Palier 1	1. a) Méthodes génotypiques : séquence génomique de la souche parentale b) Propriétés morphologiques : (coloration de Gram, propriétés des colonies et des cellules)
Palier 2	2 a) Méthodes génotypiques : analyse par PCR du locus d'intégration de la cassette d'expression b) Méthodes génotypiques : séquençage de l'ADN de la cassette d'expression c) Propriétés sérologiques : transfert de type western, expression protéique de l'IFN- γ
Données	
Palier 1	1. a) La comparaison de la séquence de la souche parentale (numéro d'accès NC_017544) avec celles d'autres génomes de <i>L. monocytogenes</i> a donné entre 96 % et 99 % d'identité symétrique, et la comparaison de la séquence du gène de l'ARNr 16S a donné 99 % d'identité avec plus de 50 souches de <i>L. monocytogenes</i> dans GenBank avec le logiciel d'alignement MegaBlast et la base de données nr/nt de même que 100 % d'identité avec la souche <i>L. monocytogenes</i> NCTC 10357, 99 % d'identité avec <i>Listeria innocua</i> NCTC 11288, 98 % d'identité avec <i>Listeria welshimeri</i> NCTC 11857 et 97 % d'identité avec <i>Listeria seeligeri</i> NCTC 11856 (tableau D-9.2). b) Bâtonnet Gram positif, colonies bleues sans halo jaune sur gélose chromogène Rapid'L.mono (RLM). Des données identiques ont été obtenues pour la souche parentale et la souche WEX 321 (figure D-9.1).

Palier 2

2. a) L'amplification des régions du gène *sigL* de la souche WEX 321 (900 pb) présentait une délétion par rapport à la même amplification chez la souche parentale (2 545 pb). L'amplification spécifique de la cassette d'expression de l'IFN- γ de la souche WEX 321 par rapport à la même amplification chez la souche parentale montre des bandes d'ADN de taille appropriée pour la cassette d'expression dans WEX 321 (1 555 pb) [figure D-9.2].
- b) La séquence d'ADN de la cassette d'expression IFN- γ de la souche WEX 321 montre une identité de 100 % avec la séquence prévue *in silico*.
- c) L'expression de l'IFN- γ a été démontrée par la présence d'une bande distincte dans le transfert de type western. Les témoins appropriés et l'échelle de poids moléculaire confirment qu'il s'agit de l'IFN- γ (figure D-9.3).

Analyse

La séquence génomique complète et la séquence du gène de l'ARNr 16S de la souche parentale de 10403S avec un seuil de 98,9 % (Stackebrandt, 2011), et la morphologie des colonies sur gélose RLM (confirmant l'activité de la phosphatidylinositol phospholipase C et l'incapacité de la souche à métaboliser le xylose) permettent de confirmer que la souche WEX 321 appartient à l'espèce *L. monocytogenes*. Les données fournies permettent de distinguer la souche WEX 321 d'autres espèces pathogènes de *Listeria* : *Listeria ivanovii*, *Listeria innocua* et *Listeria welshimeri*. Les données obtenues par l'amplification de la région *sigL* et le séquençage de l'ADN de la cassette d'expression de la souche parentale et la comparaison à l'ADN de la souche WEX 321, ainsi que l'analyse par transfert de type western, confirment que le micro-organisme déclaré est la souche *L. monocytogenes* WEX 321.

Conclusion

L'analyse de toutes les données permet de confirmer que la souche déclarée appartient au taxon *L. monocytogenes*, laquelle peut être spécifiquement identifiée comme étant la souche WEX 321.

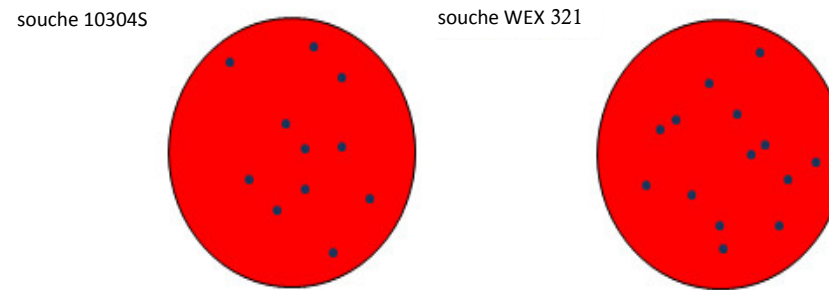


Figure D-9.1. croissance des souches 10304S et WEX 321 sur gélose Rapid'L.mono pendant 24 h à 30 °C

Tableau D-9.2. comparaison de la séquence du gène de l'ARNr 16S de la souche 10403S avec celle de la souche type dans la base de données du NCBI

Genre – Espèce – Souche	Couverture d'interrogation %	Valeur E	% d'identité
<i>Listeria monocytogenes</i> NCTC 10357	100	0,0	100
<i>Listera innocua</i> NCTC 11288	100	0,0	99
<i>Listeria welshimeri</i> NCTC 11857	100	0,0	98
<i>Listeria seeligeri</i> NCTC 11856	98	0,0	97

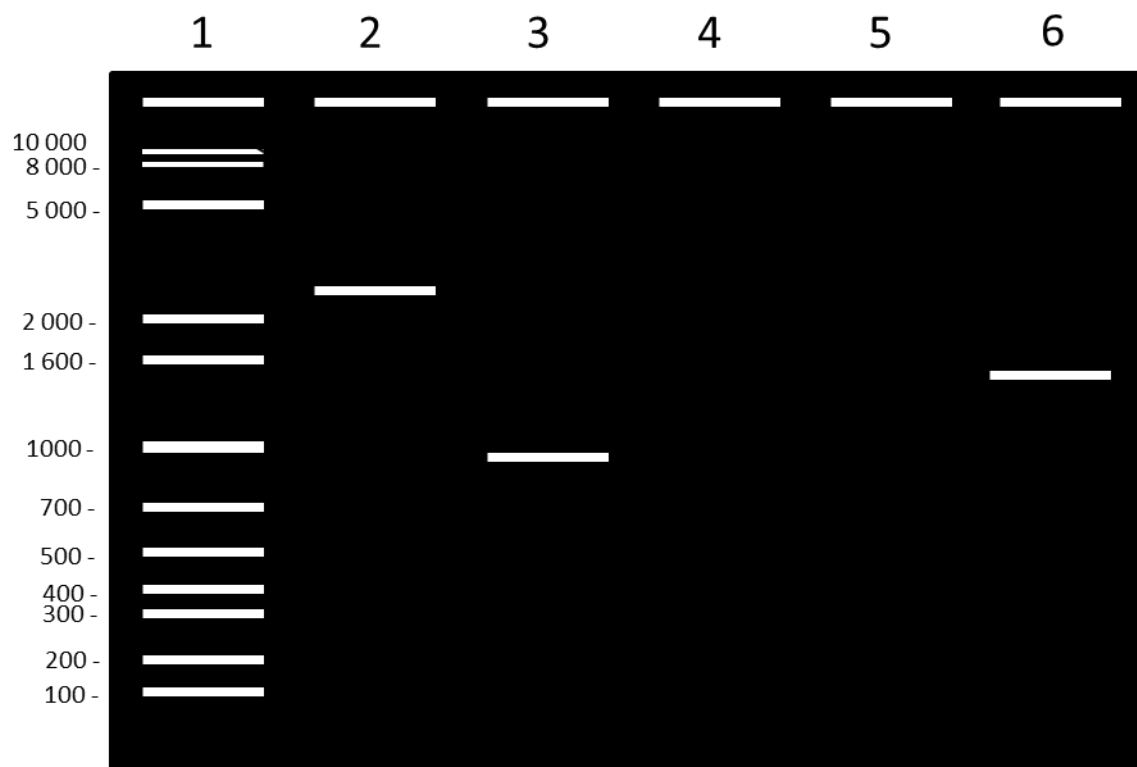


Figure D-9.2. image du gel d'électrophorèse à base d'agarose montrant les résultats de la PCR pour les souches 10403S et WEX 321. Piste 1 : Échelle de poids moléculaire (kb); piste 2 : amplification par PCR du locus *sigL* de la souche 10403S; piste 3 : amplification par PCR du locus *sigL* de la souche WEX 321; piste 4 : amplification par PCR du locus *sigL* de *S. cerevisiae* (témoin négatif); piste 5 : amplification par PCR de l'interféron humain IFN- γ chez la souche 10403S (témoin négatif); piste 6 : amplification par PCR de l'interféron humain IFN- γ de la souche WEX 321

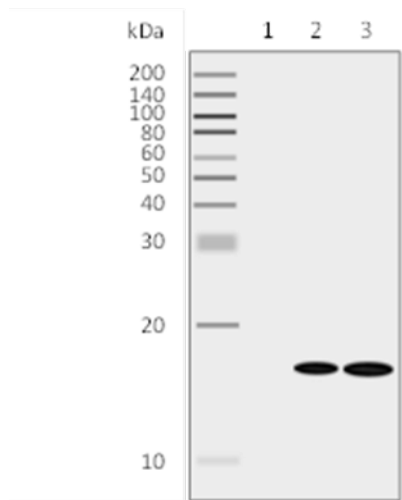


Figure D-9.3. analyse par transfert de type western de l'IFN- γ humain et d'anti-IFN- γ humain de souris. Piste 1 : extrait de protéines de la souche 10403S, piste 2 : extrait de protéines de la souche WEX 321; piste 3 : 10 ng d'IFN- γ humain

Étude de cas – *Rhodococcus aetherivorans*

Tableau D-10.1. renseignements sur la souche et les méthodes d'identification de la souche Rae1 de *Rhodococcus aetherivorans*

Désignation du micro-organisme déclaré	Souche <i>Rhodococcus aetherivorans</i> Rae1
Source	Enrichissement d'hydrocarbures d'une boue activée provenant d'un site de traitement d'eaux usées industrielles au Canada.
Méthodes d'analyse	
Palier 1	1. Méthodes génotypiques : analyse de la séquence du gène de l'ARNr 16S (~1 421 pb) à l'aide du logiciel BLAST du NCBI et du RDP.
Palier 2	2. Propriétés chimiotaxonomiques : analyse EMAG par chromatographie en phase gazeuse selon le système d'identification microbienne (MIDI; v 6.2) avec la base de données RTSBA6 en utilisant des cellules entières cultivées sur gélose de bouillon trypticase soja (TSBA) pendant 5 jours à 25 °C.
Palier 3	3. a) Propriétés physiologiques et biochimiques : trousse d'essais API 20NE (BioMérieux). b) Propriétés morphologiques : morphologie des colonies et des cellules sur gélose d'extrait de levure.
Données	
Palier 1	1. L'analyse par le logiciel BLAST du NCBI de la séquence du gène de l'ARNr 16S de la souche Rae1 montre que cette souche appartient au genre <i>Rhodococcus</i> et fait partie du clade de l'ARNr 16S de <i>Rhodococcus rhodochrous</i> (tableau D-10.2). La souche Rae1 montre une similitude de 99,7 % avec <i>Rhodococcus aetherivorans</i> DSM 44752 ^T , 99,5 % avec la souche type <i>Rhodococcus ruber</i> KCCM 41053 ^T , 97,8 % avec <i>Rhodococcus zopfii</i> DSM 44108 ^T et 97,2 % avec <i>Rhodococcus phenolicus</i> DSM 44812 ^T (tableau D-10.3). De plus, l'analyse de la séquence à l'aide de la base de données du RDP pour les souches type a révèle un indice de similarité élevé de plus de 0,999 avec <i>R. aetherivorans</i> et <i>R. ruber</i> (tableaux D-10.4 et D-10.5).

Palier 2	2. Le profil des acides gras de la souche Rae1 est très similaire à celui de <i>R. aetherivorans</i> KCCM 41053 ^T , en particulier pour certains acides gras insaturés (acide <i>cis</i> -9-octadécénoïque C _{18:1} ω9c; acide tuberculostéarique 10-Méthyl C _{18:0}), ce qui permet de distinguer entre <i>R. aetherivorans</i> et <i>R. ruber</i> . Toutefois, la composition d'autres acides gras de la souche Rae1 est semblable à celle des deux espèces (tableau D-10.6).
Palier 3	3. La trousse d'essais API 20NE montre que la souche Rae1 peut utiliser le glucose, le mannose, le cellobiose et le D-galactose; qu'elle peut réduire les nitrates et qu'elle n'hydrolyse pas la gélatine ni l'urée (tableau D-10.7). Morphologie des colonies et des cellules : La souche Rae1 semblait rugueuse et rosâtre sur gélose d'extrait de levure. Il s'agit d'un bâtonnet Gram positif (d'une largeur de 0,6 à 0,9 μm et d'une longueur de 1,7 à 8,2 μm) ne produisant pas de spores.
Analyse	<p>D'après l'analyse de la séquence du gène de l'ARNr 16S, la souche Rae1 peut être classée dans le clade de <i>Rhodococcus rhodochrous</i> (ARNr 16S). La souche Rae1 est étroitement apparentée à deux espèces de ce clade, à savoir <i>R. aetherivorans</i> et <i>R. ruber</i>. La similitude élevée entre la séquence du gène de l'ARNr 16S de la souche Rae1 et celle de <i>R. aetherivorans</i> et de <i>R. ruber</i> laisse supposer que la souche pourrait appartenir à une des deux espèces.</p> <p>L'analyse EMAG révèle que la souche Rae1 présente plus de similitude avec <i>R. aetherivorans</i> (pour la composition en acides gras insaturés : acide <i>cis</i>-9-octadécénoïque C_{18:1}ω9c; acide tuberculostéarique 10-Méthyl C_{18:0}) qu'avec <i>R. ruber</i>; toutefois, d'autres acides gras ne permettent pas de faire la distinction.</p> <p>La capacité de la souche Rae1 à utiliser le glucose, le mannose, le cellobiose, le D-galactose et la N-acétyl glucosamine, son incapacité à hydrolyser la gélatine et l'urée, et sa capacité à réduire les nitrates sont des propriétés semblables à celles de <i>R. aetherivorans</i>.</p> <p>La morphologie des colonies et des cellules de la souche Rae1 concorde avec celle de la souche type <i>R. aetherivorans</i> DSM 44752^T, bien que les propriétés morphologiques ne permettent pas de faire la distinction entre <i>R. aetherivorans</i> et <i>R. ruber</i>.</p>
Conclusion	Ensemble, les données indiquent que la souche Rae1 appartient à l'espèce <i>R. aetherivorans</i> .

Tableau D-10.2. comparaison de la séquence du gène de l'ARNr 16S de la souche Rae1 à l'aide de la base de données nr/nt et du logiciel BLAST du NCBI

Description	Couverture d'interrogation %	Valeur E	% d'identité
<i>Rhodococcus</i> sp. WB1; <i>Rhodococcus</i> sp. USA-AN012; <i>Rhodococcus</i> sp. L3	100	0,0	100
Souches <i>R. aetherivorans</i> icdP1, IAR1, 126189	100	0,0	100
Souche <i>R. aetherivorans</i> DSM 44752 ^T =10bc312 = JCM 14343 = NCIMB 13964.	98	0,0	99,7
<i>R. ruber</i> DSM 43338 ^T	100	0,0	99,5
Isolat de <i>R. ruber</i> OUCZ91B	99	0,0	100
Souche <i>R. ruber</i> M2	100	0,0	99,6
Plusieurs espèces de <i>Rhodococcus</i> non cultivées	100	0,0	>99

Tableau D-10.3. comparaison de la séquence du gène de l'ARNr 16S de la souche Rae1 à l'aide de la base de données RefSeq_RNA et du logiciel BLAST du NCBI (limitée aux souches types)

Description	Couverture d'interrogation %	Valeur E	% d'identité
<i>R. aetherivorans</i> DSM 44752 ^T	98	0,0	99,7
<i>R. ruber</i> DSM 43338 ^T	100	0,0	99,5
<i>R. zopfii</i> DSM 44108 ^T	100	0,0	97,8
<i>R. phenolicus</i> DSM 44812 ^T	98	0,0	97,2

Tableau D-10.4. comparaison de la séquence du gène de l'ARNr 16S de la souche Rae1 à l'aide de la base de données du RDP

Identification de la séquence	Indice de similarité	Indice S_ab	Oligomères uniques communs	Nom complet de la séquence
S000015815	1,000	1,000	1 267	<i>Rhodococcus ruber</i> ; AS4.1187; AF350248
S000393887	1,000	1,000	1 404	<i>Rhodococcus</i> sp. USA-AN012; AF420413
S000539645	0,998	0,998	1 231	<i>Rhodococcus ruber</i> ; IV11; AJ833916
S000893761	0,998	1,000	1 299	<i>Rhodococcus aetherivorans</i> ; AK44; EU004422
S000965726	1,000	1,000	1 316	<i>Rhodococcus</i> sp. 9camb; EF151233
S001014613	0,999	0,995	1 410	<i>Rhodococcus</i> sp. L3; EF426447
S001155726	0,999	0,995	1 405	<i>Rhodococcus</i> sp. XQ-K; EU876664
S001187762	0,999	1,000	1 307	<i>Rhodococcus</i> sp. NCIMB 9784; EU445342
S001572358	1,000	1,000	1 328	<i>Rhodococcus aetherivorans</i> ; IAR1; AB453385
S002165055	1,000	1,000	1 397	<i>Rhodococcus aetherivorans</i> ; IR34-DHCE-402; AB546298
S002907533	1,000	1,000	1 221	<i>Rhodococcus aetherivorans</i> ; BW38; HE578785
S002949467	1,000	1,000	1 244	<i>Rhodococcus aetherivorans</i> ; M8; AB610652
S002957974	1,000	1,000	1 196	<i>Rhodococcus ruber</i> ; W3; JN613346
S004052277	0,999	1,000	1 306	<i>Rhodococcus aetherivorans</i> I24; KF410351
S004052290	0,999	1,000	1 307	<i>Rhodococcus aetherivorans</i> ; DSM 44752; KF410364
S004071425	1,000	1,000	1 440	<i>Rhodococcus</i> sp. BCP1; CM002177
S004071426	1,000	0,996	1 440	<i>Rhodococcus</i> sp. BCP1; CM002177
S004091284	1,000	0,995	1 338	<i>Rhodococcus aetherivorans</i> ; 8; KJ571061
S004232883	1,000	0,995	1 399	<i>Rhodococcus</i> sp. ADA-2; KM210251
S004449071	1,000	0,995	1 394	<i>Rhodococcus</i> sp. FCL1; KM461685

Tableau D-10.5. comparaison de la séquence du gène de l'ARNr 16S de la souche Rae1 à l'aide de la base de données du RDP (limitée aux souches types)

Identification de la séquence	Indice de similarité	Indice S_ab	Oligomères uniques communs	Nom complet de la séquence
S000010863	0,971	0,872	1 384	<i>Rhodococcus rhodochrous</i> (T); X79288
S000126126	0,961	0,838	1 396	<i>Rhodococcus equi</i> (T); DSM 20307T; AF490539
S000322868	0,999	0,957	1 344	<i>Rhodococcus aetherivorans</i> (T); 10bc312; AF447391
S000359172	0,973	0,873	1 295	<i>Rhodococcus phenolicus</i> (T); G2P; AY533293
S000364376	0,974	0,846	1 386	<i>Rhodococcus rhodnii</i> (T); Souche type : DSM43336; X80621
S000364380	1,000	0,985	1 400	<i>Rhodococcus ruber</i> (T); Souche type : DSM43338; X80625
S000388573	0,972	0,882	1 390	<i>Rhodococcus pyridinivorans</i> (T); PDB9; AF173005
S000388867	0,976	0,904	1 389	<i>Rhodococcus zopfii</i> (T); DSM 44108 (T); AF191343
S000394065	0,970	0,857	1 400	<i>Rhodococcus corynebacterioides</i> (T); DSM 20151; AF430066
S000403334	0,966	0,848	1 326	<i>Rhodococcus gordoniae</i> (T); W4937; AY233201
S000424749	0,962	0,838	1 369	<i>Rhodococcus kroppenstedtii</i> (T); K07-23; AY726605
S000438867	0,965	0,837	1 398	<i>Rhodococcus coprophilus</i> (T); JCM 3200; U93340
S000544287	0,971	0,852	1 394	<i>Rhodococcus triatomae</i> (T); Souche type : IMMIB RIV-085; AJ854055
S002918508	0,965	0,838	1 312	<i>Rhodococcus nanhaiensis</i> (T); SCSIO 10187; JN582175

Tableau D-10.6. contenu cellulaire en acides gras de la souche Rae1 et d'espèces étroitement apparentées du genre *Rhodococcus*. Les valeurs sont en pourcentage des acides gras totaux.

Acide gras	souche Rae 1 ^a	<i>R. aetherivorans</i> DSM 44752 ^b	<i>R. ruber</i> KCCM 41053 ^b	<i>R. ruber</i> DSM 43338 ^c
Saturé				
Acide tétradécanoïque C _{14:0}	2,0	1,8	2,4	1,5-2,0
Acide pentadécanoïque C _{15:0}	2,5	2,6	1,6	2,9-4,0
Acide hexadécanoïque C _{16:0}	22,1	23,5	28,5	25-27,4
Acide septadécanoïque C _{17:0}	4,5	3,0	1,9	3,0-4,3
Acide octadécanoïque C _{18:0}	3,0	2,2	3,4	1,0-2,4
Acide <i>cis</i> -9-octadécénoïque insaturé C _{18:1} ω9c	16,8	15,6	22,7	16,0-20,7
Méthyl				
10-méthyl C _{17:0}	2,6	1,7	trace	1,8-3,0
Acide tuberculostéarique 10-méthyl C _{18:0}	26,6	27,6	17,7	15,6-18,0
Caractéristiques cumulées‡				
3 (C _{16:1} ω6c et/ou C _{16:1} ω7c)	22,4	20,1	16,2	Non disponible

^a Analyse EMAG réalisée chez la souche Rae1;

^b Résultats publiés dans Hwang *et al.*, 2015;

^c Résultats publiés dans Jones et Goodfellow, 2012;

‡ Les caractéristiques cumulées représentent des groupes de deux ou trois acides gras qui ne pouvaient pas être séparés par chromatographie en phase gazeuse selon le système d'identification microbienne MIDI

Tableau D-10.7. caractéristiques biochimiques différentielles de la souche Rae1 et de ses espèces étroitement apparentées

Caractéristiques	souche Rae1 ^a	<i>R. aetherivorans</i> DSM 44752 ^{b,c}	<i>R. ruber</i> KCCM 41053 ^{b,c}
Hydrolyse de la gélatine	-	- ^b	- ^b
Réduction des nitrates	+	+ ^b	- ^b
Hydrolyse de l'urée	-	- ^b	+ ^b
Utilisation de :			
N-acétyle-D-glucosamine	+	+ ^b	- ^b
Cellobiose	+	+ ^b et - ^c	- ^b
Galactose	+	+ ^b	+ ^b et - ^c

^a Tests de la trousse API 20NE réalisés chez la souche Rae1;

^b Résultats publiés dans Hwang *et al.*, 2015;

^c Résultats publiés dans Jones et Goodfellow, 2012

Étude de cas – *Saccharomyces cerevisiae*

Tableau D-11.1. renseignements sur la souche et les méthodes d'identification de la souche BioEt de *Saccharomyces cerevisiae*

Désignation du micro-organisme déclaré	Souche <i>Saccharomyces cerevisiae</i> BioEt
Source	Une souche sauvage de levure de vin isolée d'un vignoble et maintenue dans une collection de cultures. La souche a été adaptée à tolérer des températures élevées.
Méthodes d'analyse	
Palier 1	1. Propriétés morphologiques : couleur et forme des colonies, aspect des cellules.
Palier 2	2. Propriétés physiologiques et biochimiques : température, pH, salinité, utilisation du carbone, croissance sans vitamines et sensibilité aux antibiotiques.
Palier 3	3. Méthodes génotypiques : analyse de la séquence de l'opéron du gène de l'ARNr (~2 300 pb comprenant les régions ITS1, ITS2, D1/D2/D3).
Données	
Palier 1	1. Les colonies sont butyreuses, de couleur crème, opaques avec une surface lisse parfois surélevée ou pliée sur gélose YPD (extrait de levure, peptone et dextrose). Les cellules sont ovoïdes, et un certain bourgeonnement a été observé.
Palier 2	2. Propriétés physiologiques et biochimiques de la souche BioEt : <ul style="list-style-type: none">• capable de croître à une température variant de 27 °C à 42°C.• croissance observée dans la plage de pH de 3,0 à 6,0.• capable de croître à des concentrations de NaCl variant de 0 à 3,0 %.• forme des pseudohyphes sur du tourteau de maïs et sur milieu SLAD pauvre en azote.• capable de fermenter le maltose et de croître sans vitamines; incapable de croître si le mannitol ou le glycérol sont la seule source de carbone (tableau D-11.2).• sensible à l'amphotéricine B et à la 5-fluorocytosine; résistant à la griséofulvine, à l'itraconazole et à la terbinafine.

Palier 3

3. L'alignement de multiples séquences au moyen de la base de données d'identification des champignons Microseq® D2 LSU a montré que la souche BioEt présente un pourcentage d'identité de 100 % avec la souche *S. cerevisiae* ATCC 18824 (souche type) et de 99,52 % avec la souche *S. cerevisiae* ATCC 9763 (tableau D-11.3). Pour confirmer ces données avec une base de données à couverture plus élevée, un alignement de multiples séquences a été réalisé en utilisant les régions ITS1/5,8S/ITS2 de la souche BioEt et les séquences accessibles au public du NCBI. La souche BioEt présente un taux d'identité de 99 % avec d'autres souches de *S. cerevisiae* (y compris l'isolat clinique *S. cerevisiae* YJM 451) et avec *S. cerevisiae* var. *boulardii* (Isolat Biocodex, Unique 28); et 98 % d'identité avec *S. paradoxus*, *S. pastorianus* et *S. bayanus* (tableau D-11.4).

Analyse

Les propriétés morphologiques de la souche BioEt correspondent à celles des souches de *S. cerevisiae* qui sont rapportées dans les publications (Barnett et al., 2000; Vaughan-Martini et Martini, 2011). La comparaison des propriétés physiologiques et biochimiques de la souche BioEt et de celles des espèces candidates possibles montre que la souche BioEt possède des propriétés communes avec *S. cerevisiae*, *S. bayanus*, *S. paradoxus* et *S. pastorianus*. En s'appuyant sur l'analyse de la séquence de l'opéron du gène de l'ARNr, on peut limiter les possibilités à *S. cerevisiae*. Le profil de sensibilité antifongique de la souche BioEt est également semblable à celui des autres souches de *S. cerevisiae*, tel qu'il est indiqué dans les publications.

Conclusion

En s'appuyant principalement sur les données génotypiques et en confirmant avec les propriétés morphologiques, physiologiques et biochimiques, on peut conclure que la souche BioEt appartient certainement à l'espèce *S. cerevisiae*.

Tableau D-11.2. comparaison des propriétés biochimiques de la souche BioEt et de celles des espèces du genre *Saccharomyces*

Caractéristique	Fermentation du maltose	Fermentation du mélibiose	Utilisation de l'inuline	Croissance sans vitamines	Mannitol	Glycérol
souche BioEt	+	-	-	+	-	-
<i>S. cerevisiae</i> ATCC 18824 ^a	+	-	-	-	-	-
<i>S. cerevisiae</i> var. <i>boulardii</i> ATCC MYA 796 ^a	+	-	-	+	-	-
<i>S. cerevisiae</i> YJM 309 ^a	+	-	-	+	-	-
<i>S. cerevisiae</i> ^b	v	v	-	v	-	v
<i>S. paradoxus</i> ^b	v	-	-	v	+	v
<i>S. bayanus</i> ^b	v	v	-	v	v	v
<i>S. pastorianus</i> ^b	+	v	-	v	-	v

+ indique un résultat positif; - indique un résultat négatif; v signifie un résultat variable;

^a Données générées avec la souche BioEt;

^b Données compilées à partir de la publication *The Yeasts, a Taxonomic Study* (Vaughan-Martini et Martini, 2011)

Tableau D-11.3. comparaison de la séquence des régions ITS1/5.8S/ITS2 du gène de l'ARNr de la souche BioEt avec la base de données d'identification des champignons Microseq[®] D2 LSU

Entrée de séquence	% d'identité
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (ATCC 18824)	100,00
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (ATCC 9763)	99,55
<i>Saccharomyces bayanus</i> (ATCC 76513)	98,12
<i>Saccharomyces pastorianus</i> (ATCC 12752)	97,96
<i>Zygosaccharomyces microellipsoides</i> (ATCC 10605)	95,85

Tableau D-11.4. comparaison de la séquence des régions ITS1/5,8S/ITS2 du gène de l'ARNr de la souche BioEt à l'aide du logiciel BLAST du NCBI

Descriptions	Couverture d'interrogation %	Valeur E	% d'identité
<i>S. cerevisiae</i> ATCC 18824	99	0,0	99
<i>S. cerevisiae</i> CBS 1171	99	0,0	99
<i>S. cerevisiae</i> var. <i>boulardii</i> souche biocodex	99	0,0	99
<i>S. cerevisiae</i> var. <i>boulardii</i> souche Unique 28	99	0,0	99
<i>S. cerevisiae</i> YJM 451	99	0,0	99
<i>S. paradoxus</i> CBS 432	98	0,0	98
<i>S. pastorianus</i> NRRL-Y-17217	98	0,0	98
<i>S. mikatae</i> ATCC MYA-4448	98	0,0	98
<i>S. bayanus</i> CBS 380	98	0,0	98

Étude de cas – *Shewanella indica*

Tableau D-12.1. renseignements sur la souche et les méthodes d'identification de la souche ECM3 de *Shewanella indica*

Désignation du micro-organisme déclaré	Souche <i>Shewanella indica</i> ECM3
Source	Enrichissement pour la croissance bactérienne à partir d'un aquifère contaminé par des hydrocarbures
Méthodes d'analyse	
Palier 1	1. Méthodes génotypiques : analyse de la séquence du gène de l'ARNr 16S (~1 400 pb, en appliquant les procédures et les amorces proposées par Ruimy <i>et al.</i> , 1994).
Palier 2	2. Méthodes génotypiques : analyse de la séquence du gène de la gyrase B (<i>gyrB</i>) (~1 200 pb, en appliquant les procédures et les amorces proposées par Yamamoto et Harayama, 1995).
Palier 3	3. a) Propriétés morphologiques : coloration de Gram, propriétés des colonies et des cellules. b) Propriétés physiologiques et biochimiques : besoins et caractéristiques de croissance.
Données	
Palier 1	1. L'analyse avec le logiciel BLAST a permis de comparer la séquence du gène de l'ARNr 16S de la souche ECM3 avec celles accessibles au public de la banque GenBank du NCBI. Cette analyse a montré un pourcentage d'identité de 99,6 % avec la souche type <i>Shewanella indica</i> KJW27, de 99,5 % avec la souche <i>Shewanella algae</i> BrY (ATCC 51181), de 99,0 % avec la souche type <i>S. algae</i> ATCC 51192, de 98,7 % avec la souche <i>Shewanella upenei</i> 20-23 et de 98,1 % avec les souches types <i>Shewanella haliotis</i> DW01 et <i>Shewanella chilikensis</i> JC5 (tableau D-12.2).
Palier 2	2. L'analyse au moyen du logiciel BLAST a aussi permis de comparer la séquence du gène <i>gyrB</i> de la souche ECM3 avec les séquences accessibles au public de la banque GenBank du NCBI. C'est avec la souche <i>S. indica</i> KJW27 que le pourcentage d'identité était le plus élevé (99,9 %), suivie de la souche <i>S. algae</i> BrY (ATCC 51181) (99,7 %), de <i>S. haliotis</i> DW01 (95,2 %), de <i>S. chilikensis</i> JC5 (94,7 %) et de la souche type <i>S. algae</i> ATCC 51192 (93,1 %) [tableau D-12.2].

Palier 3

3. a) Les colonies de la souche ECM3 sont lisses, opaques et de couleur brun clair, de 2,0 – 3,0 mm de diamètre. Les cellules de la souche ECM3 sont Gram négatives et se présentent sous forme de bâtonnets avec un flagelle polaire unique.
- b) La croissance optimale a été observée à 37 °C, avec 3 % de NaCl et à pH de 7,5. La croissance a été observée dans une plage de températures allant de 10 °C à 42 °C et à des concentrations de NaCl de 2 % et de 5 %. La croissance a été observée tant en aérobiose qu'en anaérobiose; la souche ECM3 produit une β -hémolyse sur de la gélose de sang de mouton. D'autres tests physiologiques ont été choisis pour pouvoir déterminer la parenté de la souche ECM3 avec *S. indica* KJW27, *S. algae* BrY (ATCC 51181) et *S. algae* ATCC 51192, deux espèces étroitement apparentées (comme le suggèrent Verma *et al.*, 2011, ainsi que Zhao *et al.*, 2007, tableau D-12.3).

Analyse

D'après l'analyse des séquences du gène de l'ARNr 16S et du gène *gyrB*, la souche ECM3 est étroitement apparentée à deux souches de *Shewanella*, la souche type *S. indica* KJW27 et la souche *S. algae* BrY (ATCC 51181). Toutefois, le gène *gyrB* de la souche ECM3 ne ressemblait que peu à celui de la souche de type *S. algae* ATCC 51192. Par conséquent, les données génétiques indiquent que la souche ECM3 est étroitement apparentée à *S. indica* KJW27 et à *S. algae* BrY (ATCC 51181), mais beaucoup moins étroitement apparentée à la souche type *S. algae*. L'analyse des propriétés physiologiques et biochimiques de ces quatre souches indique également que la souche ECM3 est étroitement apparentée à la souche type *S. indica*, ainsi qu'à la souche BrY. Il se peut que la souche BrY soit en fait une souche de *S. indica*, et non de *S. algae*. En se basant sur l'analyse de la séquence du gène de l'ARNr 16S, Venkateswaran *et al.*, (1999) ont signalé que, même si la souche *S. algae* BrY fait partie du clade de *S. algae*, elle forme une branche distincte pour la séquence du gène *gyrB*.

Conclusion

Compte tenu de la séquence des deux gènes analysés et du profil phénotypique de la souche ECM3, cette dernière appartiendrait à l'espèce *S. indica*.

Néanmoins, en l'absence de données spécifiques à la souche, les données sur *S. algae* BrY (ATCC 51181) peuvent également être considérées comme appropriées pour répondre à des besoins en information spécifiques.

Tableau D-12.2. comparaison des séquences des gènes de l'ARNr 16S et *gyrB* de la souche ECM3 à celles des espèces de *Shewanella*. Les souches types sont suivies de l'exposant ^T.

Identité de séquence de <i>Shewanella</i> ECM3 avec :	Pour le gène de l'ARNr 16S	Pour le gène <i>gyrB</i>
<i>Shewanella indica</i> KJW27 ^T	99,6 %	99,9 %
<i>Shewanella algae</i> BrY (ATCC 51181)	99,5 %	99,7 %
<i>Shewanella algae</i> ATCC 51192 ^T	99,0 %	93,1 %
<i>Shewanella upenei</i> 20-23 ^T	98,7 %	94,2 %
<i>Shewanella chilikensis</i> JC5 ^T	98,1 %	94,7 %
<i>Shewanella haliotis</i> DW01 ^T	98,1 %	95,2 %
<i>Shewanella aquamarina</i> SW-120 ^T	96,6 %	91,6 %
<i>Shewanella loihica</i> PV-4 ^T	96,3 %	91,3 %
<i>Shewanella piezotolerans</i> WP3 ^T	94,8 %	Aucune donnée
<i>Shewanella literosedimensis</i> SMK1-12 ^T	93,4 %	Aucune donnée

Tableau D-12.3. propriétés phénotypiques de la souche *Shewanella* ECM3 comparées avec celles de *Shewanella indica* KJW27^T, de *Shewanella algae* BrY (ATCC 51181) et de la souche type *Shewanella algae* ATCC 51192^T

Caractéristiques	strain ECM3 ^a	<i>S. algae</i> BrY ATCC 51181 ^b	<i>S. indica</i> KJW27 ^c	<i>S. algae</i> ATCC 5119 ^d
Croissance à 4°C	-	-	-	-
Croissance à 45°C	+	pas de données	+	-
Croissance dans du NaCl à 10 % (p/v)	+	+	+	-
Utilisation des substrats :				
Acide cis-aconitique	+	pas de données	+	-
Acide citrique	+	-	+	-
Acide formique	+	-	+	-
Acide pyruvique	+	+	pas de données	pas de données
Acide lactique	+	+	+	pas de données
Acide succinique	-	-	+	pas de données
Acide fumarique	-	-	pas de données	pas de données
Acide α-cétobutyrique	-	-	-	+
Acide α-cétovalérique	-	pas de données	-	+
L-asparagine	-	pas de données	-	+
Acide L-aspartique	-	pas de données	-	+
L-histidine	-	pas de données	-	-
L-sérine	-	pas de données	-	+
L-proline	+	pas de données	+	-

^a Résultats des tests d'études menées avec la souche ECM3;

^b Données de Caccavo *et al.*, 1992, Venkateswaran *et al.*, 2011;

^c Données de Verma *et al.*, 2011; ^d Données de Verma *et al.*, 2011;

Étude de cas – *Trichoderma reesei*

Tableau D-13.1. renseignements sur la souche et les méthodes d'identification de la souche Xyl123 de *Trichoderma reesei*

Désignation du micro-organisme déclaré	Souche <i>Trichoderma reesei</i> Xyl123
Source	Un mutant dérivé de <i>T. reesei</i> RUT-C30 (souche parentale) a été obtenu d'un chercheur universitaire. Le chercheur avait acheté RUT-C30 de l'ATCC (ATCC 56765). La souche parentale a été soumise à des modifications génétiques supplémentaires de même qu'à une culture sélective pour augmenter la production de xylanase, et la souche a été désignée sous le nom de souche <i>T. reesei</i> Xyl123.
Méthodes d'analyse	
Palier 1	1. Propriétés morphologiques, physiologiques et biochimiques : Morphologie et couleur des colonies et des cellules (Bissett, 1984, 1991 a,b,c, 1992; Samuels, 1996);
Palier 2	2. Méthodes génotypiques : L'analyse de la séquence de l'opéron de l'ARNr (régions ITS1 et ITS2) et d'un segment (420 pb) du gène codant le facteur d'élongation de traduction (<i>tef1</i>) a été réalisée conformément à la procédure décrite dans la littérature scientifique (Kuhls <i>et al.</i> , 1997; Druzhinina <i>et al.</i> , 2006; Hoyos-Carvajal <i>et al.</i> , 2009; Samuels et Ismaïel, 2009; Druzhinina <i>et al.</i> , 2012; Cummings <i>et al.</i> , 2016). L'analyse des séquences a été effectuée à l'aide des bases de données du NCBI et TrichoKEY 2.0.
Données	
Palier 1	1. Les caractéristiques morphologiques de la souche Xyl123 ont été vérifiées sur gélose de tourteau de maïs de Difco. Les colonies de la souche Xyl123 sont lisses et blanches; les conidies, de couleur verte, sont ellipsoïdales à oblongues.
Palier 2	2. L'analyse de la séquence des régions ITS1 et ITS2 du gène de l'ADNr (Kuhls, 1997; Kubecek <i>et al.</i> , 2003; Druzhinina <i>et al.</i> , 2006) à l'aide de la base de données du NCBI montre une similitude de 99,9 % de la souche Xyl123 avec <i>T. reesei</i> QM 6a (100 % de couverture) et <i>Trichoderma parareesei</i> ATCC MYA-4777 (avec 97 % de couverture) [tableau D-13.2]. L'analyse de la séquence

du gène *tef1* révèle un pourcentage d'identité de 100 % de la souche Xyl123 avec *T. reesei* CBS 836.91, et de moins de 90 % avec d'autres espèces du clade de *T. longibrachiatum* (tableau D-13.3).

Analyse

Les propriétés de la souche Xyl123 concordent avec ce qui a été décrit dans les publications concernant le clade *Longibrachiatum*. Celui-ci est caractérisé par des conidiophores peu ramifiés portant une forte proportion de phialides solitaires. L'absence de caractéristiques distinctives propres aux différentes espèces et la présence de téléomorphes appartenant à des genres apparentés (p. ex. *Hypocrea*) compliquent la taxonomie des *Trichoderma* et entraînent de nombreuses erreurs de classification. Par exemple, dans le clade *Longibrachiatum*, *Trichoderma longibrachiatum* est morphologiquement synonyme de *T. reesei*. Selon Druzhinina *et al.*, (2012), la plupart des espèces du clade *Longibrachiatum* ont des conidies lisses, ellipsoïdales à oblongues, à l'exception de *Trichoderma ghanense*, *Trichoderma saturnisporum* et *Trichoderma* sp. TR 175 qui ont des conidies tuberculées.

Le séquençage des régions ITS n'a pas permis de différencier la souche Xyl123 des membres du clade *Longibrachiatum* du genre *Trichoderma*, car la souche présente une similitude de plus de 99 % avec plusieurs espèces du clade. Toutefois, le séquençage du gène *tef1* a permis de distinguer clairement la souche Xyl123 d'espèces étroitement apparentées du clade *Longibrachiatum* (Gazis *et al.*, 2011; Druzhinina *et al.*, 2012) et de déterminer que la souche Xyl123 appartient à l'espèce *T. reesei*. L'analyse de la séquence des régions ITS1/ITS2 et du gène *tef1* au moyen de TrichOKEY2.0 a également montré un indice de fiabilité d'identification « élevé » pour l'identification de l'espèce *Hypocrea jecorina/Trichoderma reesei*.

Conclusion

D'après les données morphologiques et l'analyse des séquences (ITS1/2 et *tef1*), on peut confirmer que la souche Xyl123 appartient à l'espèce *T. reesei*.

Tableau D-13.2. comparaison des régions ITS1/2 de la souche Xyl123 avec celles des espèces du genre *Trichoderma* à l'aide du logiciel BLAST du NCBI limité aux séquences des souches types

Description	Couverture d'interrogation %	Valeur E	% d'identité
<i>T. reesei</i> QM 6a	100	0,0	99,9
<i>T. parareesei</i> ATCC MYA-4777	97	0,0	100
<i>T. saturnisporum</i> ATCC 18903	100	0,0	99,3
<i>T. citrinoviridae</i> CBS 258	100	0,0	99,3
<i>T. longibrachiatum</i> ATCC 18648	100	0,0	99,2
<i>Hypocrea orientalis</i> GJS 88-81	99	0,0	98,9
<i>T. pseudokoningii</i> DAOM 167678	99	0,0	98,8
<i>T. ghanense</i> ATCC 208858	100	0,0	98,2
<i>T. novae-zelandiae</i> CBS 639-92	94	0,0	98,0

Tableau D-13.3. comparaison de la séquence du gène *tef1* de la souche Xyl123 avec celle des espèces du genre *Trichoderma* à l'aide du logiciel BLAST du NCBI limité aux séquences de souches types

Description	Couverture d'interrogation %	Valeur E	% d'identité
<i>T. reesei</i> CBS 836.91	100	0,0	100
<i>T. reesei</i> DAOM 167654	100	0,0	99,6
<i>T. parareesei</i> TUB F-1066	99	0,0	87,2
<i>T. saturnisporum</i> ATCC 18903	99	0,0	84,5

Annexe E – Références

- Anders, H.-J., M. Keller, M. Berchtold, and W. Hecker. 2007. Polyphasic approach to microbial identification. *Amer. Pharm. Rev.* Publié le 1 octobre, 2007.
- Anderson, I.C. and J.W.G Cairney. 2004. Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. *Environ. Microbiol.* 6:769-779.
- Andreotti, P. E., G. V. Ludwig, A. Harwood Peruski, J. J. Tuite, S. S. Morse, and L. F. Peruski. 2003. Immunoassay of infectious agents. *Biotech.* 35:859.
- Arenas-Hernandez, M. M. P., Y. Martinez-Laguna, and A. G. Torres. 2012. Clinical implications of enteroadherent *Escherichia coli*. *Curr. Gastroenterol. Rep.* 14:386-394.
- Azevedo, H., F.M. Lopes, P.R. Silla, and M. Hungria. 2015. A database for the taxonomic and phylogenetic identification of the genus *Bradyrhizobium* using multilocus sequence analysis. *BMC Genomics* 16;S10.
- Barnett, J. A. 2000. Commentary on a new major reference work *Yeasts: Characteristics and Identification*, 3rd edn. By JA Barnett, RW Payne and D. Yarrow. Cambridge University Press: Cambridge. £ 200.00, ix+ 1139 pp., 1376 photomicrographs by Linda Barnett. ISBN 0 521 57396 3. Published 25 May 2000. *Yeast*, 16: 1445–1447.
- Battista, J.R. and Rainey, F.A. (2012) Genus I. *Deinococcus*, pages 396-403, in *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed., Vol. 1. The Archaea and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria. Boone, D.R. and Casternholz, R.W. (eds. For Vol. 1). Springer, New York. 721 p
- Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. 2015. Whitman, W.B. (ed) <http://onlinelibrary.wiley.com/book/10.1002/9781118960608>
- Bissett, J., Gams, W., Jaklitsch, W., and G.J. Samuels. 2015. Accepted *Trichoderma* names in the year 2015. *IMA Fungus* 6: 263.
- Bissett, J. 1992. *Trichoderma atroviride*. *Can. J. Botany* 70: 639-641.
- Bissett, J. 1991a. A revision of the genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification. *Can. J. Bot.* 69: 2357-2372.

- Bissett, J. 1991b. A revision of the genus *Trichoderma*. III. Section *Pachybasium*. Can. J. Bot. 69: 2373-2417.
- Bissett, J. 1991c. A revision of the genus *Trichoderma*. IV. Additional notes on section *Longibrachiatum*. Can. J. Bot. 69: 2418-2420.
- Bissett, J. 1984. A revision of the genus *Trichoderma*. I. Section *Longibrachiatum* sect. nov. Can. J. Bot. 62: 924-931.
- Busse, H. J., E. B. M. Denner, and W. Lubitz. 1996. Classification and identification of bacteria: Current approaches to an old problem. Overview of methods used in bacterial systematics. J. Biotechnol. 47:3-38.
- Caccavo, F., R.P. Blakemore, and D.R. Lovley. 1992. A hydrogen-oxidizing, Fe (III)-reducing microorganism from the Great Bay Estuary, New Hampshire. Appl. Environ. Microbiol. 58: 3211-3216.
- Cecchini, F., L. Fajs, S. Cosnier, and R.S. Marks. 2016. *Vibrio cholerae* detection: Traditional assays, novel diagnostic techniques and biosensors. TrAC Trends Anal. Chem. 79:199-209.
- Cheng, K., H. Chui, L. Domish, D. Hernandez, and G. Wang . 2016. Recent development of mass spectrometry and proteomics applications in identification and typing of bacteria. Prot. Clin. Appl. 10:346-357.
- Clarke, S. C. 2005. Pyrosequencing: Nucleotide sequencing technology with bacterial genotyping applications. Expert Rev. Mol. Diag. 5:947-953.
- Collado, L., A. Levican, J. Perez, and M. J. Figueras. 2011. *Arcobacter defluvii* sp. nov., isolated from sewage samples. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 61: 2155-2161.
- Collins, M. D. and D. Jones. 1981. Distribution of isoprenoid quinone structural types in bacteria and their taxonomic implications. Microbiol. Rev. 45:316-354.
- Colwell, R. R. and R. Grigorova. 1987. Current methods for classification and identification of microorganisms. *In* Methods in microbiology, London : Academic Press.
- Cummings, N. J., Ambrose, A., Braithwaite, M., Bissett, J., Roslan, H. A., Abdullah, J., Stewart, A., Agbayani, F.V., Steyaert, J. and R.A. Hill. 2016. Diversity of root-endophytic *Trichoderma* from Malaysian Borneo. Mycol. Prog. 15: 1-14.
- Da Costa, M. S., L. Albuquerque, M. F. Nobre, and R. Wait. 2011a. The identification of fatty acids in bacteria. Methods Microbiol. 38:183-196.

- Da Costa, M. S., L. Albuquerque, M. F. Nobre, and R. Wait. 2011b. The Extraction and Identification of Respiratory Lipoquinones of Prokaryotes and Their Use in Taxonomy. *Methods Microbiol.* 38:197-206.
- Das, S., H.R. Dash, N. Mangwani, J. Chakraborty, and S. Kumari. 2014. Understanding molecular identification and polyphasic taxonomic approaches for genetic relatedness and phylogenetic relationships of microorganisms. *J Microbiol Meth* 103:80-100.
- Debourgogne, A., C. Gueidan, S. de Hoog, A. Lozniewski, and M. Machouart. 2012. Comparison of two DNA sequence-based typing schemes for the *Fusarium solani* Species Complex and proposal of a new consensus method. *J Microbiol Meth* 91:65-72.
- Diggle, M. A. and S. C. Clarke. 2004. PyrosequencingTM: Sequence typing at the speed of light. *Appl. Biochem. Biotechnol. - Part B Mol. Biotech.* 28:129-138.
- Druzhinina, I. S., A. G. Kopchinskiy, and C.P. Kubicek. 2006. The first 100 *Trichoderma* species characterized by molecular data. *Mycosci.* 47: 55-64.
- Druzhinina, I. S., M. Komon-Zelazowska, A. Ismaiel, W. Jaklitsch, T. Mullaw, G. J. Samuels, and C. P. Kubicek. 2012. Molecular phylogeny and species delimitation in the section Longibrachiatum of *Trichoderma*. *Fungal Genetics and Biology* 49:358-368.
- Fan, L., J.H.L. Hui, Z.G. Yu, and K.H. Chu. 2014. VIP Barcoding: composition vector-based software for rapid species identification based on DNA barcoding. *Mol. Ecol. Resour.* 14:871-881.
- Frisvad, J.C., T.O. Larsen, U. Thrane, M. Meijer, J. Varga, R.A. Samson, and K.F. Nielsen. 2011. Fumonisin and ochratoxin production in industrial *Aspergillus niger* strains. *PLoS ONE* 6: e23496.
- Gasanov, U., Hughes, D. and P. M. Hansbro. 2005. Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: A review. *FEMS Microbiol. Rev.* 29:851-875.
- Gazis, R., S. Rehner, and P. Chaverri. 2011. Species delimitation in fungal endophyte diversity studies and its implications in ecological and biogeographic inferences. *Mol. Ecol.* 20: 3001-3013.
- Gillis, M., P. Vandamme, P. De Vos, J. Swings, and K. Kersters. 2005. Polyphasic Taxonomy, p. 43-48. *In* D. J. Brenner, N. R. Krieg, J. T. Staley, and G. M. Garrity (eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume Two: The Proteobacteria, Part A Introductory Essays*. Springer US, Boston, MA.
- Gram Strain. 2010. Staining Procedures, p. 91-123. *In* L. S. Garcia (ed.), *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. American Society for Microbiology.

Hanson, B., Y. Zhou, E.J. Bautista, *et al.* 2016. Characterization of the bacterial and fungal microbiome in indoor dust and outdoor air samples: a pilot study. *Environ. Sci.: Proc. Impacts* 18:713-724

Hill, J. E., S. L. Penny, K. G. Crowell, S. H. Goh, and S. M. Hemmingsen. 2004. cpnDB: A Chaperonin Sequence Database. *Genome Res.* 14:1669-1675.

Hill, J. E., A. Paccagnella, K. Law, P. L. Melito, D. L. Woodward, L. Price, A. H. Leung, S. M. Hemmingsen, and S. H. Goh. 2006. Identification of *Campylobacter* spp. and discrimination from *Helicobacter* and *Arcobacter* spp. by direct sequencing of PCR-amplified cpn60 sequences and comparison to cpnDB, a chaperonin reference sequence database. *J. Med. Microbiol.* 55:393-399.

Hiraishi, A., K. Inagaki, Y. Tanimoto, M. Iwasaki, N. Kishimoto, H. Tanaka. 1997. Phylogenetic characterization of a new thermoacidophilic bacterium isolated from hot springs in Japan. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 43:295-304.

Hirsch, P.R., T.H. Mauchline, and I.M. Clark. 2010. Culture-independent molecular techniques for soil microbial ecology. *Soil Biol. Biochem.* 42:878-887.

Hirsch, P.R., T.H. Mauchline, and I.M. Clark. 2013. Culture-independent molecular approaches to microbial ecology in the soil and the rhizosphere. In FJ de Bruijn ed, *Molecular Microbial Ecology of the Rhizosphere*, Volume 1 pp. 45-55. Rothamsted Research, UK: John Wiley & Sons.

Hoyos-Carvajal, L., S. Orduz, and J. Bissett. 2009. Genetic and metabolic biodiversity of *Trichoderma* from Colombia and adjacent neotropical regions. *Fungal Genet. Biol.* 46: 615-631.

Hong, S., Lee, M., Kim, D., Varga, J., Frisvad, J.C., Perrone, G., Gomi, K., Yamada, O., Machida, M., Machida, M., and R.A. Samson. 2013. *Aspergillus luchuensis*, an Industrially Important Black *Aspergillus* in East Asia. *PLoS ONE* 8: e63769.

Hwang, C. Y., I. Lee, Y. Cho, Y. M. Lee, K. Baek, Y.-J. Jung, Y. Y. Yang, T. Lee, T. S. Rhee, and H. K. Lee. 2015. *Rhodococcus aerolatus* sp. nov., isolated from subarctic rainwater. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 65:465-471.

Jackman, J. 2012. The Microbe: The Basics of Structure, Morphology, and Physiology as They Relate to Microbial Characterization and Attribution, p. 13-34. In J. B. Cliff, H. W. Kreuzer, C. J. Ehrhardt, and D. S. Wunschel (eds.), *Chemical and Physical Signatures for Microbial Forensics*. Springer New York, New York, NY.

Janda, J. M. and S. L. Abbott. 2002. Bacterial identification for publication: When is enough enough? *J. Clin. Microbiol.* 40:1887-1891.

- Janke, T., K. Schwaiger, M. Ege, C. Fahn, E. von Mutius, J. Bauer, and M. Mayer. 2013. Analysis of the Fungal Flora in Environmental Dust Samples by PCR–SSCP Method. *Curr. Microbiol.* 67:156-169.
- Jeyaram, K., Romi, W., Singh, T.A., Adewumi, G.A., Basanti, K., and F.A. Oguntoyinbo. 2011. Distinct differentiation of closely related species of *Bacillus subtilis* group with industrial importance. *J. Microbiol. Methods* 87: 161-164.
- Jones, A.L. and M. Goodfellow. 2012. Genus IV. *Rhodococcus*, pages 437-464, in *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. 5. The Actinobacteria*. Whitman, E. *et al.*, (eds.). Springer-Verlag, New York. 2083 p.
- Jones, D. and N. R. Krieg. 1984. Bacterial Classification V: Serology and Chemotaxonomy *In* N. R. Krieg (ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. 1*. Williams & Wilkins.
- Karger, A. 2016. Current developments to use linear MALDI-TOF spectra for the identification and typing of bacteria and the characterization of other cells/organisms related to infectious diseases. *Prot. Clin. Appl.* 10:982-993.
- Kim, M., Oh, H.-S., S.-C. Park, and J. Chun. 2014. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64: 346–351.
- Konstantinidis, K. T., A. Ramette, and J. M. Tiedje. 2006. The bacterial species definition in the genomic era. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biol. Sci.* 361:1929-1940.
- Kubicek, C. P., J. Bissett, I. Druzhinina, C. Kullnig-Gradinger, and G. Szakacs. 2003. Genetic and metabolic diversity of *Trichoderma*: a case study on South-East Asian isolates. *Fungal Genet. Biol.* 38: 310-319.
- Kuhls, K., E. Lieckfeldt, G. J. Samuels, W. Meyer, C. P. Kubicek, and T. Börner. 1997. Revision of *Trichoderma* sect. *Longibrachiatum* including related teleomorphs based on analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences. *Mycol.* 89: 442-460.
- Kunitsky, C., G. Osterhout, and M. Sasser. 2006. Identification of microorganisms using fatty acid methyl ester (FAME) analysis and the MIDI Sherlock® Microbial Identification System *In* M. Miller (ed.), *Encyclopedia of rapid microbiological methods, Volume 3*.
- Kurosawa, N. and Y.H. Itoh. 1993 Nucleotide sequence of the 16S rRNA gene from thermoacidophilic archaea *Sulfolobus acidocaldarius* ATCC909. *Nuc. Acids Res.* 21:357.
- Kurtzman, C. P., J.W. Fell, and T. Boekhout. 2011. *The Yeasts, a Taxonomic Study, Fifth Edition*.

- Kurtzman, C.P. 2009. Biotechnological strains of *Komagataella (Pichia) pastoris* are *Komagataella phaffii* as determined from multigene sequence analysis. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 36: 1435-1438.
- Kurtzman, C.P., 2005. Description of *Komagataella phaffii* sp. nov. and the transfer of *Pichia pseudopastoris* to the methylotrophic yeast genus *Komagataella*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55: 973-976.
- Larsen, M.V., S. Cosentino, S. Rasmussen, C. Friis, H. Hasman, R.L. Marvig, L. Jelsbak, T. Sicheritz-Pontén, D.W. Ussery, F.M. Aarestrup, and O. Lunda. 2012. Multilocus Sequence Typing of Total-Genome-Sequenced Bacteria. *J. Clin. Microbiol.* 50:1355-1361.
- Levican, A., L. Collado, C. Aguilar, C. Yustes, A. L. Dieguez, J. L. Romalde, and M. J. Figueras. 2012. *Arcobacter bivalviorum* sp. nov. and *Arcobacter venerupis* sp. nov., new species isolated from shellfish. *Syst. Appl. Microbiol.* 35: 133-138.
- Links, M. G., T. J. Dumonceaux, S. M. Hemmingsen, and J. E. Hill. 2012. The Chaperonin-60 Universal Target Is a Barcode for Bacteria That Enables De Novo Assembly of Metagenomic Sequence Data. *PLoS ONE* 7:e49755.
- Liti, G., D.B.H. Barton, and E. J. Louis. 2006. Sequence diversity, reproductive isolation and species concepts in saccharomyces. *Genet.* 174:839-850.
- Macheras, E., A.L. Roux, S. Bastian, *et al.*, 2011. Multilocus sequence analysis and *rpoB* sequencing of *Mycobacterium abscessus sensu lato* strains. *J. Clin. Microbiol.* 49:491-499.
- Maiden, M.C.J., J.A. Bygraves, E. Feill, G. Morelli, J.E. Russell, R. Urwin, Q. Zhang, K. Zhou, K. Zurth, D.A. Caugant, I.M. Feavers, M. Achtmans, and B.G. Spratt. 1998. *P. Natl. A. Sci. USA* 95:3140-3145.
- Manikan, V., M.Y.M. Nazir, M.S. Kalil, M.H.M. Isa, A.J.A. Kader, W.M.W. Yusoff, and A.A. Hamid. 2015. A new strain of docosahexaenoic acid producing microalga from Malaysian coastal waters. *Algal Res.* 9: 40-47.
- McClelland, R. 2001. Gram's stain: the key to microbiology. *MLO: medical laboratory observer* 33:20-28.
- Nielsen, M. L., J. B. Nielsen, C. Rank, M. L. Klejnstrup, D. K. Holm, K. H. Brogaard, B. G. Hansen, J. C. Frisvad, T. O. Larsen, and U. H. Mortensen. 2011. A genome-wide polyketide synthase deletion library uncovers novel genetic links to polyketides and meroterpenoids in *Aspergillus nidulans*. *FEMS Microbiol. Lett.* 321:157-166.

OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development). Guidance document on the use of taxonomy in risk assessment of micro-organisms: Bacteria. ENV/JM/MONO(2003)13. 19-8-2003.

Olive, D.M. and P. Bean. 1999. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *J. Clin. Microbiol.* 37:1661-1669.

Oskam, L., E. Slim, and S. Buhner-Sekula. 2003. Serology: Recent developments, strengths, limitations and prospects: A state of the art overview. *Lep. Rev.* 74:196-205.

Parlapani, F.F. and I.S. Boziaris. 2016. Monitoring of spoilage and determination of microbial communities based on 16S rRNA gene sequence analysis of whole sea bream stored at various temperatures. *LWT – Food. Sci. Technol.* 66:553-559.

Pascual, J., M.C. Macián, D.R. Arahal, E. Garay, and M.J. Pujalte. 2010. Multilocus sequence analysis of the central clade of the genus *Vibrio* by using the 16S rRNA, *recA*, *pyrH*, *rpoD*, *gyrB*, *rctB* and *toxR* genes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60:154-165.

Perrone, G., G. Stea, F. Epifani, J. Varga, J.C. Frisvad, and R.A. Samson. 2011. *Aspergillus niger* contains the cryptic phylogenetic species *A. awamori*. *Fungal Biol.* 115: 1138-1150.

Purcaro, G., P. Q. Tranchida, P. Dugo, E. La Camera, G. Bisignano, L. Conte, and L. Mondello. 2010. Characterization of bacterial lipid profiles by using rapid sample preparation and fast comprehensive two-dimensional gas chromatography in combination with mass spectrometry. *J. Sep. Sci.* 33:2334-2340.

Raengpradub, S. 2009 Microbial Identification: Tracking the Great Unknown with Innovative and Advanced Technologies. *J. Lab. Automat.* 14:232-234.

Rogers, G.N., T.J. Pritchett, J.L. Lane, and J.C. Paulson. 1983. Differential sensitivity of human, avian, and equine influenza A viruses to a glycoprotein inhibitor of infection: Selection of receptor specific variants. *Virology* 131: 394-408.

Ronholm, J., N. Naseri, N. Petronella, and F. Pagotto. 2016. Navigating Microbiological Food Safety in the Era of Whole-Genome Sequencing. *Clin. Microbiol. Rev.* 29:837-857.

Ruimy, R., V. Breittmayer, P. Elbaze, B. Lafay, O. Boussemart, M. Gauthier, and R. Christen. 1994. Phylogenetic analysis and assessment of the genera *Vibrio*, *Photobacterium*, *Aeromonas*, and *Plesiomonas* deduced from small-subunit rRNA sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 44: 416-426.

Salvetti, E., L. Orru, V. Capozzi, A. Martina, A. Lamontanara, D. Keller, H. Cash, G. E. Felis, L. Cattivelli, S. Torriani, and G. Spano . 2016. Integrate genome-based assessment of safety for

probiotic strains: *Bacillus coagulans* GBI-30, 6086 as a case study. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100:4595-4605.

Samson, R. A., C.M. Visagie, J. Houbraken, S.B. Hong, V. Hubka, C.H.W. Klaassen, G. Perrone, K. A. Seifert, A. Susca, J. B. Tanney, J. Varga, S. Kocsube, G. Szigeti, T. Yaguchi, and J. C. Frisvad. 2014. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Stud. Mycol.* 78:141-173.

Samson, R.A., P. Noonim, M. Meijer, J. Houbraken, J.C. Frisvad, and J. Varga. 2007a. Diagnostic tools to identify black aspergilli. *Stud. Mycol.* 59: 129-145.

Samson, R.A., J. Varga, S.M. Witiak, and D.M. Geiser. 2007b. The species concept in *Aspergillus*: Recommendations of an international panel. *Stud. Mycol.* 59: 71-73.

Samuels, G. J. 1996. *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus. *Mycol. Res.* 100: 923-935.

Samuels, G. J., and A. Ismaiel. 2009. *Trichoderma evansii* and *T. lieckfeldtia*: two new *T. hamatum*-like species. *Mycol.* 101: 142-156.

Saputra, D., S. Rasmussen, M. V. Larsen, N. Haddad, M. M. Sperotto, F. M. Aarestrup, O. Lund, and T. Sicheritz-Ponten. 2015. Reads2Type: a web application for rapid microbial taxonomy identification. *BMC Bioinform.* 16:1-10.

Schatz, M.C., J. Witkowski, and W.R. McCombie. 2012 Current challenges in de novo plant genome sequencing and assembly. *Genome Biol.* 13:243,

Schoch, C.L., K.A. Seifert, S. Huhndorf, V. Robert, J.L. Spouge, C.A. Levesque, W. Chen, and Fungal Barcoding Consortium. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer ITS region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *PNAS* 109:6241-6246.

Schumann, P. 2011. Peptidoglycan Structure. *Methods Microbiol.* 38 ;, 101-129.

Singhal, N., M. Kumar, P. K. Kanaujia, and J. S. Viridi. 2015. MALDI-TOF mass spectrometry: An emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Front. Microbiol.* 6.

Siqueira, J., A. F. Fouad, and I. N. Rocas. 2012. Pyrosequencing as a tool for better understanding of human microbiomes. *J. Oral Microbiol.* 4.

Spiegelman, D., G. Whissell, and C. W. Greer. 2005. A survey of the methods for the characterization of microbial consortia and communities. *Can. J. Microbiol.* 51:355-386.

Srinivasan, R., U. Karaoz, M. Volegova, J. MacKichan, M. Kato-Maeda, S. Miller, R. Nadarajan, E.L. Brodie, and S.V. Lynch. 2015. Use of 16S rRNA Gene for Identification of a Broad Range of Clinically Relevant Bacterial Pathogens. *PLoS ONE* 10:e0117617.

- Stackebrandt, E. 2011. Report of the *ad hoc* committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology, p. 99-104. *In* F. J. de Bruijn (ed.), Handbook of Molecular Microbial Ecology I: Metagenom. Compl. Approach.
- Stackebrandt, E., D. Smith, S. Casaregola, G. C. Varese, G. Verkleij, N. Lima, and P. Bridge. 2014. Deposit of microbial strains in public service collections as part of the publication process to underpin good practice in science. SpringerPlus 3:1-4.
- Stanier, R. Y., D. Wachter, C. Gasser, and A. C. Wilson. 1970. Comparative immunological studies of two *Pseudomonas* enzymes. *J. Bacteriol.* 102:351-362.
- Suarez, S., X. Nassif, and A. Ferroni. 2015. Applications of MALDI-TOF technology in clinical microbiology. *Pathol. Biol.* 63:43-52.
- Sutton, S. 2006. The Gram Stain. *Pharm. Microbiol. Forum* 12:4-8.
- Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei, and S. Kumar. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28: 2731-2739.
- Thompson FL, Gevers D, Thompson CC, Dawyndt P, Naser S, Hoste B, et al. 2005. Phylogeny and molecular identification of vibrios on the basis of multilocus sequence analysis. *Appl Environ Microbiol.* 71: 5107-5115
- Thomsen, M. C. F., J. Ahrenfeldt, J. L. B. Cisneros, V. Jurtz, M. V. Larsen, H. Hasman, F. M. Aarestrup, and O. Lund. 2016. A Bacterial Analysis Platform: An integrated system for analysing bacterial whole genome sequencing data for clinical diagnostics and surveillance. *PLoS ONE* 11:e0157718.
- Tindall, B. J., R. Rossello-Mora, H. J. Busse, W. Ludwig, and P. Kämpfer. 2010. Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60:249-266.
- Touzet, N., J. M. Franco, and R. Raine. 2007. Characterization of Nontoxic and Toxin-Producing Strains of *Alexandrium minutum* (Dinophyceae) in Irish Coastal Waters. *Appl. Env. Microbiol.* 73:3333-3342.
- Tshikhudo, P., R. Nnzeru, K. Ntushelo, and F. Mudau. 2013. Bacterial species identification getting easier. *Afri. J. Biotechnol.* 12:5975-5982.
- UK Standards for Microbiology Investigations. 2016. Identification of aerobic actinomycetes. Public Health England. Issue 2.1. 28 p. (PDF)

(https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/509336/ID_10i2.1.pdf)

Varga, J., J.C. Frisvad, S. Kocsubé, B. Brankovics, B. Tóth, G. Szigeti, and R.A. Samson. 2011. New and revisited species in *Aspergillus* section *Nigri*. *Stud. Mycol.* 69: 1-17.

Vaughan-Martini, A., and A. Martini. 2011. Chapter 61 - *Saccharomyces* Meyen ex Reess (1870), pp. 733-746. *In* The Yeasts Taxonomy (Fifth Edition), Kurtzman, C.P., Fell, J.W. and T. Boekhout (eds.). Elsevier, London. 2354 p.

Venkateswaran, K., D.P. Moser, M.E. Dollhopf, D.P. Lies, D.A. Saffarini, B.J. MacGregor, D.B. Ringelberg, D.C. White, M. Nishijima, H. Sano, and J. Burghardt. 1999. Polyphasic taxonomy of the genus *Shewanella* and description of *Shewanella oneidensis* sp. nov *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 49: 705-724.

Verma, P., P.K. Pandey, A.K. Gupta, H.J. Kim, K.S. Baik, C.N. Seong, M.S. Patole, and Y.S. Shouche. 2011. *Shewanella indica* sp. nov., isolated from sediment of the Arabian Sea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61: 2058-2064.

Wayne, L. G., D. J. Brenner, R. R. Colwell, P. A. D. Grimont, O. Kandler, M. I. Krichevsky, L. H. Moore, W. E. C. Moore, R. G. E. Murray, E. Stackebrandt, M. P. Starr, and H. G. Truper. 1987. Report of the Ad Hoc Committee on Reconciliation of Approaches to Bacterial Systematics. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 37:463-464.

Wunschel, D. S., A. Fox, and K. L. Wahl. 2012. Glycoprotein and Protein Markers for Strain Differentiation and Growth Environment or Media Attribution, p. 61-70. *In* J. B. Cliff, H. W. Kreuzer, C. J. Ehrhardt, and D. S. Wunschel (eds.), *Chemical and Physical Signatures for Microbial Forensics*. Springer New York, New York, NY.

Yamamoto, S. and S. Harayama. 1995. PCR amplification and direct sequencing of *gyrB* genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1104-1109.

Yokoyama, R. and D. Honda. 2007. Taxonomic rearrangement of the genus *Schizochytrium* sensu lato based on morphology, chemotaxonomic characteristics, and 18S rRNA gene phylogeny (Thraustochytriaceae, Labyrinthulomycetes): emendation for *Schizochytrium* and erection of *Aurantiochytrium* and *Oblongichytrium* gen. nov. *Mycosci.* 48: 199-211.

Zeaiter, Z., P.-E. Fournier, H. Ogata, and D. Raoult. 2002. Phylogenetic classification of Bartonella species by comparing groEL sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52:165-171.

Zeigler, D. R. 2003. Gene sequences useful for predicting relatedness of whole genomes in bacteria. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53:1893-1900.

Zhou, D. and R. H. White. 1989. Biosynthesis of caldariellaquinone in *Sulfolobus* spp. *J. Bacteriol.* 171:6610-6616.