

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Constantine 1  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Microbiologie

N° d'ordre : 91/DS/2014

N° de série : 05/MBIO/2014

Thèse présentée par : **OULMI Lamia**

En vue de l'obtention du Diplôme de : **DOCTORAT EN SCIENCES**

Option : **Biochimie et Microbiologie Appliquées**

**ÉTUDE DES INFECTIONS CAUSÉES PAR LES  
ACTINOMYCÈTES AÉROBIE AUTRES QUE LES  
MYCOBACTÉRIES DANS LA RÉGION DE  
CONSTANTINE**

Soutenue le 22/09/2014 devant le jury

Présidente :	<b>Pr. MIHOUBI Ilhem</b>	Univ. Constantine 1
Directeur de thèse :	<b>Pr. BOULAHROUF Abderrahmane</b>	Univ. Constantine 1
Examineur :	<b>Pr. AITKAKI Zahia</b>	Univ. Constantine 3
	<b>Pr. KARAM Nouredine</b>	Univ. Essania-Oran
	<b>Pr. MOULAHM Tayeb</b>	Univ. Constantine 3

Année universitaire 2013/2014

## *DÉDICACES*

*A mes très chers parents*

*En hommage à tous les sacrifices que vous avez consenti pour moi. Je vous remercie d'avoir fait de moi ce que je suis. Aucune dédicace, aucun mot, ne saurait exprimer réellement mon profond amour, mon respect et ma vive gratitude.*

*Veillez trouver dans ce travail le fruit de toutes vos espérances et vos sacrifices.*

*A mon très cher époux qui m'a encouragée, qui m'a donné la force et la volonté de surmonter tous les obstacles et les difficultés. Merci pour m'avoir soutenu dans les moments les plus difficiles.*

*A mon cher poussin, Moncef*

*A ma famille, je dédie ce mémoire*

*Quoique je fasse, je ne pourrais vous rendre ce que vous avez fait pour moi. Si j'en suis là, c'est bien grâce à vous. Que Dieu vous donne longue vie et vous protège pour moi.*

*Lamia*

## REMERCIEMENTS

Que Monsieur **Abderrahmane BOULAHROUF** (Professeur au département de Microbiologie de l'Université Constantine 1) trouve ici l'expression de ma très vive reconnaissance pour avoir accepté la responsabilité de ce travail. Je garderais toujours les meilleurs souvenirs de votre immense savoir et de votre sens du devoir. Qu'il me soit permis de vous exprimer ici mon profond respect et mon intense admiration pour vos qualités humaines exceptionnelles.

Je remercie Madame **Ilhem MIHOUBI** (Professeur à l'Université Constantine 1) de m'avoir fait l'honneur de présider ce jury.

Mes remerciements vont également à Madame **Zahia AITKAKI** (Professeur à l'Université Constantine 3), Monsieur **Noureddine KARAM** (Professeur à l'Université Essania Oran) et Monsieur **Tayeb MOULAHLEM** (Professeur à l'Université Constantine 3) d'avoir accepté de siéger dans ce jury.

Je dois une profonde reconnaissance à Monsieur **Mahmoud KITOUNI**, qui a suivi de très près ce travail avec une grande attention et une disponibilité remarquable. C'est avec gentillesse et patience qu'il m'a toujours fait bénéficier de ses connaissances. Un grand merci d'avoir supporté mes sauts d'humeur.

Toute la partie isolément a été réalisée à l'unité de tuberculose du laboratoire de bactériologie C.H.U. **BENBADIS** de Constantine. Je suis très reconnaissante à Madame **Zahia AITKAKI** qui a veillé à la réalisation de ces travaux et avec qui les discussions ont toujours été fructueuses.

Je tiens à remercier le Professeur **Didier Raoult** pour m'avoir accueillie au sein de son Unité de Recherche sur les Maladies Infectieuses et Tropicales Emergentes, UMR CNRS. Faculté de Médecine (Marseille).

*Un grand merci pour Véronique Roux pour m'avoir formée et assisté à la biologie moléculaire et à la spectrométrie de masse. Merci pour la qualité de son encadrement et la pertinence de ses remarques. Je la remercie également pour sa disponibilité quotidienne et pour son degré d'implication dans ces travaux. Merci enfin pour son amitié.*

*Merci à tous les membres du laboratoire de Bactériologie de l'Hôpital de La Timone (Marseille) et le laboratoire de bactériologie du C.H.U. BENBADIS (Consantine), que j'ai pu côtoyer. Difficile de citer tout le monde, alors merci à tous.*

*Que mes remerciements aillent également à mes collègues et amies de l'Université de Constantine.*

## Table des matières

Remerciements	
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Résumés	
Introduction .....	1
<b>Revue bibliographique</b>	
1 <sup>o</sup> Caractéristiques générales des actinomycétales .....	4
1-1 Définition et caractéristiques principales.....	4
1-2 Caractères morphologiques.....	6
1-2-1 Le mycélium du substrat .....	7
1-2-2 Le mycélium aérien .....	8
1-2-3 Les spores.....	8
1-3 Ecologie .....	9
2 <sup>o</sup> Pouvoir pathologique .....	10
2-1 l'infection pulmonaire .....	12
2-2 l'infection du système nerveux central .....	12
2-3 l'infection cutanée, sous-cutanée et lymphocutanée .....	13
2-4 L'infection extrapulmonaire (autre que le système nerveux et le tissu cutané).....	13
2-5 L'infection disséminée (impliquant deux ou plusieurs sites infectieux) ...	14
2-6 Transmission nosocomiale .....	14
3 <sup>o</sup> Les techniques conventionnelles d'identification des actinomycètes.....	15
3-1 Méthode morphologique .....	15
3-2 Méthode numérique.....	16
3-3 Méthode Chimiotaxinomique .....	16
3-3-1 Composition en acides aminés et spectre glucidique.....	16
3-3-2 Composition en lipides .....	17
4 <sup>o</sup> Le diagnostic rapide en bactériologie .....	20
4-1 Technologie du séquençage d'ADN .....	21
4-1-1 L'identification bactérienne par séquençage du gène ARN 16S. ....	23
4-1-2 L'identification bactérienne par séquençage des gènes domestiques (Housekeeping Gene HKG).....	25

4-2 La spectrométrie de masse .....	26
4-2-1 Historique .....	26
4-2-2 Principe .....	27
4-2-3 Application de la spectrométrie de masse au laboratoire de microbiologie .....	28
4-2-4 Conclusion .....	29
5% Classification des actinomycètes .....	29

### **Partie expérimentale**

1% Isolement des actinomycètes à partir des prélèvements cliniques .....	32
1-1 Les prélèvements .....	32
1-1-1 Prélèvements contaminés .....	33
1-1-2 Prélèvements non contaminés .....	33
1-2 Traitements des prélèvements.....	34
1-3 Recherche de BAAR à l'examen direct.....	35
1-3-1 Préparation des frottis .....	35
1-3-2 Coloration de Dugommier à l'auramine .....	35
1-3-3 Coloration de Ziehl-Neelsen.....	35
1-4 stratégie d'isolement des actinomycètes .....	36
1-4-1 Isolement des actinomycètes selon le premier protocole .....	36
1-4-2 Isolement des actinomycètes selon le deuxième protocole.....	37
2% Caractérisation morphologique des isolats actinomycétales .....	38
2-1 Préparation de l'inoculum .....	38
2-2 Caractères morphologiques et culturels .....	38
2-3 Aspect des isolats en microscopie optique .....	39
2-4 Aspect des isolats en microscopie électronique (Coloration négative) ...	39
2-5 Etude physiologique .....	40
2-5-1 Production de pigments mélanoides .....	40
2-5-2 Tolérance au chlorure de sodium.....	40
2-5-3 Croissance à différentes températures.....	40
2-5-4 Croissance à différentes concentrations de CO <sub>2</sub> .....	40
2-5-5 Sensibilité au lysozyme .....	40
3% Etude de la diversité des actinomycètes isolés. ....	41
3-1 Identification moléculaire des souches d'actinomycètes isolées .....	41
3-1-1 Extraction de l'ADN .....	41

3-1-2 La PCR.....	41
3-1-3 L'électrophorèse des produits de PCR.....	42
3-1-4 La purification des produits de PCR.....	42
3-1-5 Le séquençage des produits de PCR.....	43
4% L'analyse des séquences .....	44
5% La chimiotaxinomie de l'isolat 5110 .....	45
5-1 L'analyse des acides gras cellulaires.....	45
5-2 Analyse des quinones respiratoires.....	46
5-3 Extraction et analyse des lipides polaires .....	46
6% Mise au point des protocoles rapides pour les analyses de routine au laboratoire clinique .....	47
6-1 Étude phylogénétique par MLST de l'isolat 1534 .....	47
6-1-1 L'amplification des gènes domestiques.....	47
6-1-2 L'analyse phylogénétique.....	49
6-2 Profilage des espèces type du genre <i>Tsukamurella</i> par MALDI-TOF et validation d'une banque.....	49
6-2-1 Préparation du matériel biologique.....	49
6-2-2 Préparation de la matrice MALDI et dépôt des échantillons (annexe 5) .....	50
7% Séquençage du génome de la souche <i>Tsukamurella</i> 1534 .....	51
7-1 Préparation des cellules .....	52
7-2 Extraction de l'ADN.....	52
7-3 Contrôle qualitatif et quantitatif de l'ADN .....	52
7-3-1 Contrôle de la pureté de l'ADN en solution .....	52
7-3-2 Quantification de l'ADN par spectrofluorimétrie .....	53
7-4 Préparation des banques de fragments d'ADNs :.....	53
7- 4-1 Shotgun-library.....	55
7- 4-2 3-Kb paired-end library .....	55
7-5 L'amplification clonale des molécules d'ADN simple brin .....	55
7- 6 Le pyroséquençage dans des plaques PicoTiterPlate.....	55
7-7 L'analyse des images et la détermination de la séquence d'ADN .....	56

## **Résultats et discussions**

1% Isolement des actinomycètes à partir des prélèvements clinique .....	57
1-1 La première partie de l'isolement.....	57
1-2 La deuxième partie de l'isolement .....	60

2° Diversité phylogénétique des souches isolées ..	63
3° Identification et caractérisation des isolats .	71
3-1 Le genre <i>Nocardiopsis</i> .....	71
3-1-1 Etude phylogénétique des isolats (142, 1326, 524, 20, 6554, 1486, 04, 539) .....	71
3-1-2 Pouvoir pathogène .....	75
3-1-3 Étude morphologique .....	77
3-1-4 Étude physiologique .....	81
3-2 Le genre <i>Murinocardiopsis</i> .....	82
3-2-1 Étude phylogénétique de la souche 5110 .....	82
3-2-2 Pouvoir pathogène .....	82
3-2-3 Étude morphologique de la souche 5110 .....	84
3-2-4 Étude physiologique de la souche 5110.....	87
3-2-5 Étude chimiotaxonomique de la souche 5110.....	87
3-3 Le genre <i>Actinomadura</i> .....	93
3-3-1 Etude phylogénétique de la souche 1327 .....	93
3-3-2 Pouvoir pathogène .....	96
3-3-3 Étude morphologique de la souche 1327 .....	98
3-3-4 Étude physiologique de la souche 1327 .....	100
3-4 Le genre <i>Pseudonocardia</i> .....	102
3-4-1 Etude phylogénétique des isolats 122 et 409.....	102
3-4-2 Pouvoir pathogène .....	102
3-4-3 Etude morphologique .....	103
3-4-2 Etude physiologique .....	105
3-5 Le Genre <i>Saccharopolyspora</i> .....	108
3-5-1 Etude phylogénétique de la souche 1348 .....	108
3-5-2 Pouvoir pathogène .....	108
3-5-3 Étude morphologique de la souche 1348.....	109
3-5-4 Étude physiologique de la souche 1348.....	110
3-7 Le genre <i>Micromonospora</i> .....	113
3-7-1 Étude phylogénétique de la souche 531 .....	113
3-7-2 Pouvoir pathogène .....	113
3-7-3 Étude morphologique de la souche 531 .....	114
3-7-4 Étude physiologique de la souche 531 .....	117

3-8 Le genre <i>Tsukamurella</i> .....	120
3-8-1 Étude phylogénétique de l'isolat 1534.....	120
3-8-2 Pouvoir pathogène .....	120
3-8-3 Étude morphologique de la souche 1534.....	123
3-8-4 Étude physiologique de la souche 1534.....	125
4% Mise au point des protocoles rapides pour les analyses de routine au laboratoire clinique .....	127
4-1 Etude phylogénétique par MLST de l'isolat 1534 .....	127
4-2 Profilage des espèces type du genre <i>Tsukamurella</i> par MALDI-TOF et validation d'une banque.....	133
5% Séquençage du génome de la souche <i>Tsukamurella</i> 1534 .....	141
 Conclusion générale et perspectives .....	 150
 Références bibliographique .....	 153
 Annexes	

## Liste des abréviations

A	Adénine
ACN	Acétonitrile
BAAR	Bacilles acido-alcool-résistant
BET	Bromure d'éthidium
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
C	Cytosine
COG	Cluster of Orthologous Groups
Da	Dalton
DAPI	4-6-diamidino-2-phénylindole
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EDTA	Ethylène diamine tétraacétate
G	Guanine
GS	Gélose au sang
ISP	International Streptomyces Project
m/z	Masse/charge
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation
MH	Mueller-Hinton
MLST	<i>Multi Locus Sequencing Typing</i>
MSP	Main Spectra Projection
NCBI	National Center for Biotechnology Information
p/v	Poids par volume
PA	Acide phosphatidique
PCA	Principal Component Analysis
PCR	Polymerase Chain Reaction
PG	Phosphatidyl glycérol
PGP	Phosphatidyl glycérol phosphate
PGP-Me	Phosphatidyl glycérol phosphate méthyle ester
PGS	Phosphatidyl glycérol sulfate
PMSF	Phénylméthyl Sulfonyl Fluorure
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SM	Spectrométrie de Masse
SSC	Sodium saline citraté
T	Thymine
TAE	Tris-Acétate EDTA

TeGD	Tétraglycosyl
TFA	Acide tri-fluoro acétique (CF <sub>3</sub> COOH)
TGD	Triglycosyl
TOF	Temps de vol (Time of Flight)
$\alpha$ -HCCA	Acide $\alpha$ -cyano-4-hydroxy-cinnamique

## Liste des tableaux

Tableau 1 : liste des agents étiologiques et les sites des infections les plus couramment associés .....	11
Tableau 2 : types pariétaux en fonction des constituants majeurs des parois cellulaires des actinomycètes .....	17
Tableau 3 : principaux groupes et genres d'actinomycètes. ....	18
Tableau 4 : les prélèvements étudiés pour l'isolement des actinomycètes.....	32
Tableau 5 : les séquences des amorces d'amplification utilisées en BDV1.....	44
Tableau 6: séquences des amorces des gènes de ménage et leur position sur les gènes correspondant de <i>T. paurometabola</i> DSM 20162.....	47
Tableau 7 : programme de PCR utilisé pour l'amplification des gènes de ménage.....	48
Tableau 8 : séquences des amorces utilisées dans le séquençage des gènes de ménage... ..	48
Tableau 9 : les espèces type du genre <i>Tsukamurella</i> de la collection DSM.....	50
Tableau 10 : prélèvements étudiés dans la première partie de l'isolement des actinomycètes.....	10
Tableau 11 : répartition du nombre d'isolats actinomycétale en fonction des prélèvements d'origine étudiés dans la deuxième partie de l'isolement des actinomycètes.....	61
Tableau 12 : distribution des isolats d'actinomycètes en fonction des prélèvements et des services.....	61
Tableau 13 : ordres, famille et genres des actinomycètes isolés de différents prélèvements ..	65
Tableau 14 : affiliation phylogénétique des isolats étudiés.....	66
Tableau 15 : matrice des distances calculées à partir des séquences de l'ARNr 16S des bactéries du genre <i>Nocardiopsis</i> .....	73
Tableau 16 : caractères culturels des huit isolats appartenant au genre <i>Nocardiopsis</i> sur les différents milieux de culture après 21 jours d'incubation.....	78
Tableau 17 : caractères physiologiques des huit isolats appartenant au genre <i>Nocardiopsis</i> .....	81
Tableau 18 : caractères culturels de l'isolat 5110 sur les différents milieux de culture	83
Tableau 19 : quelques caractéristiques phénotypiques, physiologiques et chimiotaxonomiques qui différencient la souche 5110 de <i>Murinocardiopsis flavida</i> .....	91
Tableau 20 : matrice des distances calculées à partir des séquences de l'ARNr 16S des bactéries du genre <i>Actinomadura</i> .....	94
Tableau 21 : caractères culturels de l'isolat 1327 sur les différents milieux de culture ..	97

Tableau 22 : quelques caractéristiques phénotypiques, physiologiques et chimiotaxonomiques qui différencient la souche 1327 des espèces proches du genre <i>Actinomadura</i> .....	100
Tableau 23 : caractères cultureux des isolats 122 et 409 appartenant au genre <i>Pseudonocardia</i> sur les différents milieux de culture après 21 jours d'incubation .....	103
Tableau 24 : caractères cultureux de l'isolat 1348 sur les différents milieux de culture...	110
Tableau 25 : caractères cultureux de l'isolat 531 sur les différents milieux de culture ....	117
Tableau 26 : caractères cultureux de l'isolat 1534 sur les différents milieux de cultures..	122
Tableau 27 : alignement MLST et pourcentages d'identité.....	129
Tableau 28 : les numéros d'accessions des 42 contigs et leurs tailles en paires de bases..	145
Tableau 29 : comparaison entre les données de séquençage des génomes de <i>Tsukamurella sp.</i> 1534 et <i>Tsukamurella paurometabola</i> .....	145
Tableau 30 : nombre de gènes associés aux 18 catégories fonctionnelles de COG .....	147

## Liste des figures

Figure 1 : coloration de Gram d'un prélèvement de liquide péritonéal avec présence de l'espèce <i>Actinomyces israelii</i> .....	5
Figure 2 : schéma représentant une colonie du genre <i>Streptomyces</i> sur milieu solide ....	7
Figure 3 : diagrammes schématiques des mycéliums aériens et de substrat des actinomycétales et autres genres de morphologies similaires.....	15
Figure 4 : principes du séquençage selon la méthode de Sanger .....	23
Figure 5 : ordres de la classe des <i>Actinobacteria</i> .....	30
Figure 6 : phylogénie du phylum <i>Actinobacteria</i> .....	31
Figure 7 : isolement des actinomycètes selon le premier protocole .....	37
Figure 8 : isolement des actinomycètes selon le deuxième protocole.....	38
Figure 9 : aperçu de la technologie 454 d'après Metzker (2010) Modifié.....	54
Figure 10a : photos des cultures des isolats 4 et 409 sur le milieu Bennett, une culture de la souche 1534 dans le milieu <i>ISP2</i> liquide.....	59
Figure 10b : examen en microscope optique après coloration de Gram de l'isolat 1486 et de l'isolat 1348.....	59
Figure 11 : distribution des isolats actinomycétales en fonction des types de prélèvements.....	62
Figure 12 : arbre montrant la position phylogénétique des 14 isolats.....	64
Figure 13 : arbre montrant la position phylogénétique des isolats parmi les espèces représentatives des genres <i>Nocardiopsis</i> et <i>Murinocardiopsis</i> .....	70
Figure 14 : photos des cultures des isolats appartenant au genre <i>Nocardiopsis</i> .....	76
Figure 15 : observation microscopique des mycéliums des isolats appartenant au genre <i>Nocardiopsis</i> après coloration de Gram .....	80
Figure 16 : photomicrographies électroniques à transmission des isolats 04 et 1486....	80
Figure 17 : photos des cultures de l'isolat 5110 .....	85
Figure 18 : l'isolat 5110 en microscopie optique après coloration de Gram .....	85
Figure 19 : photomicrographies électroniques de l'isolat 5110. ....	86
Figure 20 : chromatographie bidimensionnelle sur couche mince de gel de silice des lipides polaires extraits de l'isolat 5110.....	90
Figure 21 : arbre montrant la position phylogénétique de l'isolat 1327 parmi les espèces du genre <i>Actinomadura</i> .....	92
Figure 22 : photos d'une culture de l'isolat 1327.....	99

Figure 23 : l'isolat 1327 en microscopie optique après coloration de Gram.....	99
Figure 24 : photomicrographies électroniques de l'isolat 1327.....	99
Figure 25 : arbre phylogénétique des isolats 122 et 409 .....	101
Figure 26 : photos des cultures des isolats 122 et 409 .....	104
Figure 27 : photos des isolats 122 (a) et 409 (b) en microscopie optique.....	104
Figure 28 : photomicrographies électroniques des isolats 122 et 409 .....	104
Figure 29 : photomicrographies électroniques de l'isolat 122 .....	106
Figure 30 : photomicrographies électroniques de l'isolat 409 .....	106
Figure 31 : photomicrographies électroniques des deux couches de la paroi cellulaire des isolats 122 et 409 .....	106
Figure 32 : arbre phylogénétique des isolats parmi les espèces représentatives des genres <i>Saccharopolyspora</i> .....	107
Figure 33 : photos d'une culture de l'isolat 1348 .....	109
Figure 34 : l'isolat 1348 en microscopie optique après coloration de Gram.....	111
Figure 35 : photomicrographies électroniques de l'isolat 1348 .....	111
Figure 36 : photomicrographies électroniques de l'isolat 1348.....	111
Figure 37 : arbre phylogénétique de l'isolat 531 parmi les espèces représentatives du genre <i>Micromonospora</i> .....	112
Figure 38 : photos des cultures de l'isolat 531 .....	115
Figure 39 : l'isolat 531 en microscopie optique après coloration de Gram.....	116
Figure 40 : photomicrographies électroniques de l'isolat 531 .....	116
Figure 41 : arbre phylogénétique de l'isolat 1534 parmi les espèces représentatives des genres <i>Tsukamurella</i> .....	119
Figure 42 : photos montrant les cultures de l'isolat 1534.....	124
Figure 43 : l'isolat 1534 en microscopie optique après coloration de Gram .....	124
Figure 44 : photomicrographies électroniques de l'isolat 1534.....	124
Figure 50 : l'aspect des cultures de l'isolat 1534 et les espèces type du genre <i>Tsukamurella</i> sur différents milieux de culture. ....	126
Figure 46 : résolution taxonomique des outils de typage les plus couramment utilisés...	128
Figure 47-a : arbre construit d'après l'analyse des séquences du gène <i>Ftsz</i> montrant la position phylogénétique de l'isolat 1534 parmi les espèces du genre <i>Tsukamurella</i> .....	129

Figure 47-b : arbre construit d'après l'analyse des séquences du gène <i>LepA</i> montrant la position phylogénétique de l'isolat 1534 parmi les espèces du genre <i>Tsukamurella</i> .....	130
Figure 47-c : arbre construit d'après l'analyse des séquences du gène <i>RpoA</i> montrant la position phylogénétique de l'isolat 1534 parmi les espèces du genre <i>Tsukamurella</i> .....	130
Figure 47-d : arbre construit d'après l'analyse des séquences du gène <i>RpoB</i> montrant la position phylogénétique de l'isolat 1534 parmi les espèces du genre <i>Tsukamurella</i> .....	131
Figure 47-e : arbre construit d'après l'analyse des séquences des gènes 16S rRNA, <i>Ftsz</i> , <i>LepA</i> , <i>RpoA</i> et <i>RpoB</i> montrant la position phylogénétique de l'isolat 1534 parmi les espèces du genre <i>Tsukamurella</i> .....	131
Figure 48 : les douze différents profils des 12 souches du genre <i>Tsukamurella</i> .....	136
Figure 49 : vue en pseudogel (MALDI BioTyper™ 2.0) des douze profils protéique représentant les espèces type du genre <i>Tsukamurella</i> et le spectre de l'isolat 1534.....	138
Figure 50 : dendrogramme de classification des 12 souches du genre <i>Tsukamurella</i> réalisé par le logiciel MALDI BioTyper™ 2.0 de ruker.....	139
Figure 51 : courbe étalon pour le dosage spectrofluorimétrique de l'ADN.....	142
Figure 52 : carte graphique circulaire du génome de la souche <i>Tsukamurella</i> 1534.....	146
Figure 53 : photomicrographies électroniques.....	149

**Nom** : OULMI épouse KITOUNI

**Prénom** : Lamia

**Intitulé** : ÉTUDE DES INFECTIONS CAUSÉES PAR LES ACTINOMYCÈTES AÉROBIE AUTRES QUE LES MYCOBACTÉRIES DANS LA REGION DE CONSTANTINE

### **Résumé**

Les actinomycètes sont des bactéries, à coloration de Gram positive, ubiquitaires. Elles vivent à l'état de saprophyte dans le sol. Bien qu'elles soient rarement rencontrées dans la pratique clinique, elles ont un potentiel important et causent de graves infections humaines.

Quarante-deux souches d'actinomycètes aérobies (autres que les mycobactéries) ont été isolées à partir 3682 prélèvements cliniques provenant de malades hospitalisés ou suivis au Centre Hospitalo-Universitaire Benbadis de Constantine. La diversité des actinomycètes isolés et l'identification de quelques souches représentatives ont été établies par une approche polyphasique (informations phénotypique, génotypique et phylogénétique).

L'analyse phylogénétique des isolats a permis de les classer dans le phylum des *Actinobacteria*, familles des *Nocardiopsaceae*, des *Pseudonocardiaceae*, des *Micromonosporaceae* des *Tsukamurellaceae* et des *Thermomonosporaceae*. Elles sont affiliées à sept genres différents, *Nocardiopsis* (53,33%), *Pseudonocardia* (13,33%), *Murinocardiopsis* (6,66%), *Tsukamurella* (6,66%), *Actinomadura* (6,66%), *Micromonospora* (6,66) et *Saccharopolyspora* (6,66%).

L'approche en analyse protéomique de la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF a été validée et optimisée pour l'identification et la classification des bactéries du genre *Tsukamurella*. Grâce à la méthode de typage par *MLST* et l'amplification de quatre gènes de ménages (*lepA*, *rpoA*, *rpoB* et *ftsZ*) ainsi que la technique de la spectrométrie de masse nous avons pu conclure que l'isolat 1534 est probablement une nouvelle espèce du genre *Tsukamurella*. Par ailleurs, le séquençage du génome complet de cet isolat 1534 a été réalisé par deux techniques de séquençage, la méthode *shotgun* et la *3-kb paired-end*

**Mots clés** : actinomycètes aérobies pathogènes, *Nocardiopsaceae*, *Pseudonocardiaceae*, *Micromonosporaceae*, *Thermomonosporaceae*, *Tsukamurellaceae*, diagnostic bactériologique, pyroséquençages, MALDI-TOF.

**Name:** OULMI-KITOUNI

**First name:** Lamia

**Title:** STUDY OF INFECTIONS CAUSED BY AEROBIC ACTINOMYCETES EXCEPT MYCOBACTERIA IN THE REGION OF CONSTANTINE

**Abstract**

Actinomycetes are Gram-stain-positive. Ubiquitous, they live as saprophyte in the soil. Although they are rarely encountered in clinical practice, they have great potential and cause serious human infections.

Forty-two strains of aerobic actinomycetes (except mycobacteria) were isolated from 3682 clinical specimens patients from Benbadis Hospital of Constantine. The diversity and identification of some representative isolates were determined by a polyphasic approach (phenotypic, genotypic and phylogenetic informations).

Phylogenetic analysis of the isolates allowed to classify them in the phylum of Actinobacteria, to the families of *Nocardiopsaceae*, *Pseudonocardiaceae*, *Micromonosporaceae*, *Tsukamurellaceae*, and *Thermomonosporaceae*. They are affiliated to seven different genera, *Nocardiopsis* (53.33%), *Pseudonocardia* (13.33%), *Murinocardiopsis* (6.66%), *Tsukamurella* (6.66%), *Actinomadura* (6.66%), *Micromonospora* (6.66) et *Saccharopolyspora* (6.66%).

Approach by proteomics analysis of mass spectrometry MALDI-TOF has been validated and optimized for the identification and classification of bacteria of the genus *Tsukamurella*. Through the MLST method and the amplification of four genes (*lepA*, *rpoA*, *rpo B* and *ftsZ*) and the technique of mass spectrometry we were able to conclude that isolate 1534 is probably a new species of *Tsukamurella*. Furthermore, sequencing of the complete genome of this isolate was done by two sequencing techniques, the shotgun method and 3-kb paired-end.

**Keywords:** pathogenic aerobic actinomycetes, *Nocardiopsaceae*, *Pseudonocardiaceae*, *Micromonosporaceae*, *Tsukamurellaceae*, *Thermomonosporaceae*, bactériological diagnostic, pyrosequencing, MALDI-TOF.

لقب: علمي

الاسم: لامية

لعنوان: واسةالت مباللت يتسببها الأكتينوميستاتال موطية (بلسيتق اءال يكويئفيري ابي في طق سن طينة).

### المخلص

الأكتينوميستاتية موصلة غرام متتواجف في كل الأوساط، حيث أن هلتكوفيلتية. ررغمتواج داللق لي في الأوساط الصحية غير أن ملتتبع عق درة طلة وتشرك الصابات خطيرة جرد الإسان.

24 اللة أكتينوميستات غيرال يكويئفي يتم عزلها من 2864 عينة مرضي في عدد من المرضي بلبش في لاجامعي لربنا ايسر سن طينة بتقوع الأكتينوميستاتال موزولة وكذلتصريفالعض في هلم عن طريق اليزالتمرفول ومجة و لجمية مما لكانا من تصريفها ضمن الأكتينوميستاتيا و العللات التالية *Nocardiopsaceae* و *Thermomonosporaceae* و *Tsukamurellaceae* و *Micromonosporaceae* و *Pseudonocardiaceae* الأخراس التالية، *Nocardiosis* (53,33%)، *Pseudonocardia* (13,33%)، *Murinocardiosis* (6,66%)، *Tsukamurella* (6,66%)، *Actinomadura* (6,66%)، *Micromonospora* (6,66%) و *Saccharopolyspora* (6,66%).

ال ل هذه الواس قتم أيضا وضع خطة عمل لتصريف اليفيري اليتسبب عن *Tsukamurella* عن طريق تقنية MALDI-TOF بولسطة لاجينات ( *ftsZ*, *rpoA*, *rpoB*, *lepA* ) بواسط عمل التقوية السرافية لالكرت ميبات أن الولة 4322 عبارة عن اللة جيدة من جنس *Tsukamurella* وتتم حدي دالقتبع اليفيري الكويئفي لاجين وم اللامي ل مذهب ال عمل بوطقتين *shotgun method* و *2-kb paired-end*.

الكلمات للبحثية : الأكتينوميستات ال موطية، تاليس خي ص الكتريولوجي، PCR، MALDI-TOF، *Tsukamurella*

Les actinomycètes sont des bactéries ubiquitaires qui vivent à l'état de saprophytes dans le sol. Elles ne font pas partie de la flore microbienne normale de l'homme.

Leur prolifération dans l'organisme est à l'origine d'une infection granulomateuse et suppurative, localisée ou disséminée. Elle affecte principalement les sujets immunodéprimés, bien que l'observation de cas en l'absence de facteurs prédisposant ne soit pas exceptionnelle.

La place de pathogènes opportunistes des actinomycètes tend à se préciser devant le nombre croissant d'infections systémiques rapportées dans la littérature : péritonite, péricardite, septicémie, abcès du cerveau, pneumopathie, endocardite, surinfection de plaie...

Les actinomycètes bénéficient d'un indice de suspicion faible au sein du corps médical ce qui explique sans doute une sous-estimation du nombre véritable d'infections dues à ces bactéries.

En fait, le diagnostic devait être évoqué devant un certain nombre de signes cliniques non spécifiques comme une maladie fébrile suppurative ou une image radiologique pulmonaire pathologique au même titre que des infections bactériennes et virales courantes, de la tuberculose et des infections fongiques opportunistes, et ce d'autant plus que les patients présentent un système immunitaire altéré.

Le seul critère formel est constitué par la mise en évidence du germe, après des prélèvements nécessitant quelques fois des méthodes invasives. L'origine des prélèvements pour la recherche des actinomycètes aérobies peut être très diverse en raison des différentes formes cliniques qu'il est possible d'observer : sang, LCR, liquide pleural, tissu osseux, ganglion lymphatique, sphère ORL, épanchement péritonéal, tissu hépatique, cornée. Ils peuvent être recueillis par ponction, biopsie ou en cours d'intervention chirurgicale. Comme pour les mycobactéries, les produits pathologiques peuvent être relativement pauvres en bactéries, de plus l'isolement des germes peut être très tardif après l'apparition des premiers symptômes cliniques.

En raison de la nature et de la gravité des infections dont elles peuvent être responsables, l'identification rapide et précise des espèces est justifiée car leurs caractéristiques épidémiologiques, leur pouvoir pathogène et leur sensibilité aux antibiotiques sont différents.

L'identification s'avère cependant particulièrement difficile, elle repose sur des bases chimiotaxonomiques et biochimiques de haute technicité et réservées aux laboratoires de référence. Il s'agit d'une série de plusieurs dizaines de tests manuels non commercialisés dont l'interprétation est difficile et le délai de lecture important.

Généralement, les méthodes d'identification utilisées en routine dans les laboratoires sont des méthodes dites conventionnelles et reposent essentiellement sur des tests phénotypiques et/ou biochimiques. Le pouvoir discriminant des méthodes conventionnelles reste assez limité et présente un délai d'identification relativement long. Ce délai peut retarder le diagnostic et la prise en charge adaptée des patients atteints.

Au cours des dix dernières années, des méthodes génotypiques ont été proposées en utilisant des techniques de biologie moléculaire. Leur pouvoir de discrimination est généralement élevé par rapport aux techniques phénotypiques. Cependant, ces méthodes génotypiques ont également leurs limites, à savoir la complexité des protocoles, le savoir-faire nécessaire pour maîtriser ces systèmes, le coût des réactifs, l'utilisation de sondes ou de séquences nucléotidiques spécifiques pour chaque espèce, et enfin le délai important nécessaire pour l'identification. Il faut noter également qu'il n'existe pas de méthode moléculaire générale pour tous les microorganismes.

Ces difficultés ont conduit au développement de méthodes alternatives, le plus souvent des méthodes de chimie analytique. Parmi les applications récentes de technologies émergentes figure la spectrométrie de masse. Cette technique permet de définir des masses différentes à une précision moléculaire. Elle peut théoriquement s'appliquer à la définition des microorganismes grâce à sa sensibilité en termes de quantité de produits.

L'objectif principal de notre étude consiste en la mise en évidence et l'isolement de souches d'actinomycètes aérobies pathogènes non usuels responsables d'infections chez l'homme, dans une région qui ne fait pas encore l'objet de cette étude. Sur le plan microbiologique, elle portera essentiellement sur la détection et l'isolement de ces germes. Les patients principalement concernés par cette étude seront les malades hospitalisés ou suivis au C.H.U. Benbadis de Constantine. Pour atteindre les objectifs fixés, il est nécessaire :

- de mettre au point des protocoles pour l'isolement de bactéries actinomycètes aérobies (à l'exception des mycobactéries) à partir de différents prélèvements cliniques,
- de constituer une collection d'isolats actinomycétales à partir des prélèvements cliniques,
- d'étudier la diversité phylogénétique des souches actinomycétales isolées,
- de mettre au point des protocoles techniques notamment les techniques des MLST pour des analyses de routine au laboratoire clinique,
- de valider et d'optimiser l'approche en analyse protéomique de la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF pour l'identification et la classification des bactéries d'un genre appartenant aux actinomycètes aérobies.

## 1°/ Caractéristiques générales des actinomycétales

### 1-1 Définition et caractéristiques principales

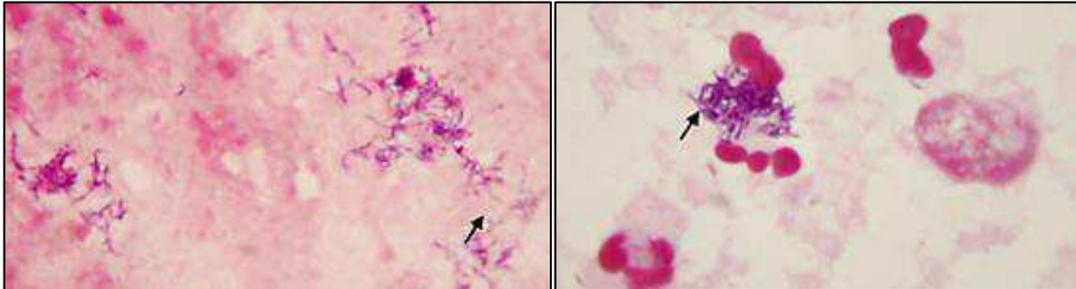
Les actinomycètes sont des bactéries à coloration de Gram positive (Williams *et al.*, 1993 ; Sanglier et Trujillo, 1997). Leur nom trompeur est rattaché à leur croissance qui donne lieu à des colonies circulaires (Eunice et Prosser, 1983) constituées d'hyphes c'est-à-dire des filaments qui irradient par croissance centrifuge tout autour du germe qui leur a donné naissance (Gottlieb, 1973 ; Lechevalier et Lechevalier, 1981 ; Eunice et Prosser, 1983). En effet, leur dénomination « Actinomycètes », provient de deux substantifs grecs aktino, mycetes qui signifie « champignons à rayons » ou champignons rayonnant (Gottlieb, 1973).

Les actinomycètes se situent dans l'ordre des *Actinomycetales* (Mariat et Sebald, 1990) dont le coefficient de Chargaff (G+C %) est supérieur à 55 %, généralement compris entre 60 et 75 % (Ensign, 1978 ; Larpent et Sanglier, 1989 ; Chun *et al.*, 1997). Les formes les plus évoluées des actinomycètes, surtout parmi les aérobies, rivalisent en complexité morphologique avec les moisissures et elles ont longtemps été rejeté de l'ensemble des bactéries et confondus avec les champignons du fait de l'allure mycosique des maladies qu'elles provoquent (Gazenko *et al.*, 1998 ; Hirvonen *et al.*, 1997) et aussi de leur morphologie, parfois fungoïdes : filaments ramifiés, organes de sporulation etc. (Becker *et al.*, 1965 ; Reponen *et al.*, 1998).

Le terme actinomycètes a été utilisé pour la première fois par Bollinger, en 1877, pour désigner l'agent responsable d'une maladie du bétail. L'agent étiologique des actinomycoses, précédemment décrit par Harz sous forme de grains parasitaires, a été isolé par Israel en 1879 qui décrit l'aspect clinique de la maladie. Il s'agit d'un bacille anaérobie pour lequel Wright propose le binôme *Actinomyces bovis* et Kruse, en 1896, celui d'*Actinomyces israelii* (figure 1). L'isolement de ces actinomycètes pathogènes constitue la première période de leur histoire.

La seconde période de 1900 à 1910 (Mariat et Sebald, 1990) se rapporte à la mise en évidence et à l'étude des actinomycètes dans le sol, avec les travaux de Krainsky, Conn, Waksman et Curtis. Puis suit la période d'étude des caractères bactériologiques de ces microorganismes.

La dernière période s'attache aux antibiotiques produits par les actinomycètes. Elle commence en 1940 et le nom de Waksman lui est indiscutablement lié à la découverte, en 1944, de la streptomycine produite par *Streptomyces griseus* (Sanglier et Trujillo, 1997).



**Figure 1 :** coloration de Gram d'un prélèvement de liquide péritonéal avec présence d'amas de bacilles à coloration de Gram positive (flèche) branchés correspondant à l'espèce *Actinomyces israelii*

Les bactériologistes considèrent les actinomycètes comme des bactéries tandis que les mycologistes les considèrent comme des champignons (Gottlieb, 1973). Aujourd'hui, ce problème est résolu et ce groupe de microorganismes est définitivement classé parmi les bactéries (Becker *et al.*, 1965 ; Lechevalier et Lechevalier, 1981). Leurs propriétés chimiques, physiologiques immunologiques, les rangent parmi les procaryotes (Williams *et al.*, 1973 ; Sanglier et Trujillo, 1997). Leur paroi cellulaire ne renferme ni chitine ni cellulose mais une glycoprotéine contenant de la lysine (formes fermentatives) ou de l'acide diaminopimélique (formes oxydatives) et leur cytologie est celle des bactéries (Lechavalier et Lechavalier, 1985 ; Mariat et Sebald, 1990).

Les actinomycètes sont, pour la plupart, sensibles aux lysozymes et aux agents antibactériens ; le diamètre de leurs hyphes est plus petits que celui des champignons qui est de l'ordre de 0,5  $\mu\text{m}$ , soit approximativement un dixième de celui de la plupart des hyphes fongiques (Gottlieb, 1973). Ces caractères s'ajoutant à d'autres comme la sensibilité aux actinophages... confirment leur classification parmi les bactéries (Demain et Solomon, 1985 ; Mariat et Sebald, 1990). Il s'agit d'un groupe supra-générique, rassemblant des bactéries très diverses dispersées dans la systématique (Gottlieb, 1973), où les genres *Nocardia*, *Actinomyces*, *Mycobacterium*, *Corynebacterium*, *Streptomyces*, *Bifidobacterium* ont des caractéristiques très rapprochées (Mariat et Sebald, 1990).

La morphologie des différents groupes d'actinomycètes est très variable. Elle va de simples bacilles diphtéroïdes (la plupart des mycobactéries) à des formes mycéliennes complexes (comme le genre *Streptomyces*) (Gottlieb, 1973). Cette variabilité morphologique s'accompagne souvent d'une différenciation importante avec un cycle biologique comparable à celui de certains Eucaryotes. Certains peuvent présenter un mycélium se développant sur et dans les milieux (mycélium végétatif) ou dans l'air au-dessus du substrat (mycélium aérien) (figure 2). Les filaments peuvent produire des spores soit isolées, soit groupées en chaînes ou même enfermés dans un sporange. D'autres actinomycètes forment un mycélium non persistant rapidement transformé en une masse de formes bactéroïdes irrégulières, et enfin d'autres, ne présentent que des mycéliums très rudimentaires au point d'être inexistantes (Mariat et Sebald, 1990 ; Lacey, 1997).

En général, les actinomycètes sont des hétérotrophes, mais plusieurs espèces sont capables aussi de croissance chimio-autotrophique (Ensign *et al.*, 1993). Certaines ont des exigences nutritionnelles telles que les vitamines et certains acides aminés. Elles colonisent fréquemment les substrats insolubles tel que le charbon par pénétration mécanique de la matrice (Crawford, 1993) et peuvent dégrader les protéines, la cellulose et d'autres matières organiques (en incluant la paraffine) (Hernandez-Coronado *et al.*, 1997) et les résidus des plantes dans le sol (Lacey, 1997).

Les actinomycètes préfèrent un pH neutre ou peu alcalin, elles sont généralement mésophiles, d'autres sont thermophiles tolérant des températures avoisinant 50°C et peuvent aller jusqu'à 60°C (Omura, 1992).

## **1-2 Caractères morphologiques**

Les actinomycètes possèdent une structure de procaryotes, mais un cycle biologique semblable à certains champignons (Floyd *et al.*, 1987 ; Sanglier et Trujillo, 1997).

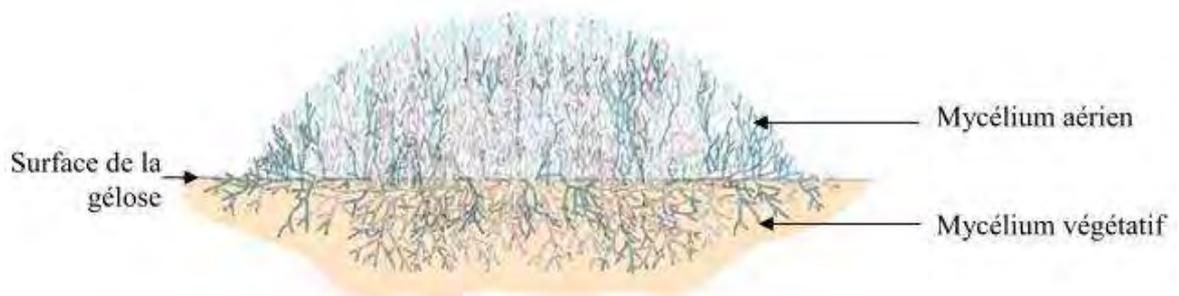
Elles tendent à croître lentement comme des filaments ramifiés (0.5-1.0 µm de diamètre) (Eunice, 1983). Leur croissance, avec un temps de génération moyen de 2 à 3 heures, est plus lente que celle des autres bactéries (Ottow et Glathe, 1968 ; Larpent et Sanglier, 1989). Sur les milieux solides, les actinomycètes forment en une semaine environ des colonies souvent pigmentées (gris, vert, rouge ...) provenant de

l'accumulation d'hyphes ramifiés à contour lisse ou échancré à aspect compact, poudreux ou en chou-fleur.

### 1-2-1 Le mycélium du substrat

Le mycélium résultant de la germination des spores est constitué par des hyphes qui pénètrent dans le milieu ou se propagent à sa surface. Il est appelé mycélium du substrat, primaire ou végétatif. Il représente une des caractéristiques des actinomycètes (Miguèlez, *et al.*, 1993). Cette habitude de formation de mycélium du substrat montre la capacité des actinomycètes à dégrader la matière organique insoluble grâce à leurs enzymes extracellulaires (Locci, 1976). Dans la plupart des cas, les hyphes ont une elongation monopodiale mais la ramification dichotomique est observée chez les thermoactinomycètes.

Chez les actinomycètes nocardioformes, le mycélium se fragmente en éléments dont chacun devient un centre de croissance (Prauser, 1976). Ce mycélium ramifié, éventuellement pigmenté, forme des parois transversales isolant les zones les plus âgées (Larpen et Sanglier, 1989). Cette fragmentation des hyphes se retrouve, également, pour des genres ne produisant que peu ou pas de spores. Par contre, dans d'autres genres comme *Rhodococcus*, il n'y a plus de véritable mycélium primaire car on constate simplement la croissance d'une propagule originelle qui donne un filament, lequel se fragmente alors en petites unités.



**Figure 2** : schéma représentant une colonie du genre *Streptomyces* sur milieu solide (Dvorak et Johnston, 1999)

### 1-2-2 Le mycélium aérien

Après une certaine croissance du mycélium du substrat, les filaments se développent verticalement. Dans certains cas, les hyphes aériens se lèvent à partir de ramifications de mycélium du substrat (Locci, 1976). Une fois développé, le mycélium aérien couvre les surface de colonies en leur donnant un aspect poudreux, compact, poilu ou en chou-fleur. La production de mycélium aérien est influencée par plusieurs facteurs, notamment la composition du milieu de croissance, la température d'incubation et la présence de composés stimulant spécifiquement le mycélium aérien (Pine, 1970).

Généralement le mycélium aérien est hydrophobe et plus épais et moins ramifié que le mycélium du substrat. Le mycélium du substrat est aérobic facultatif. Par contre, le mycélium aérien est aérobic strict (Silvey et Roach, 1975).

Les actinomycètes aquatiques sont habituellement dépourvus de ce type de croissance (mycélium aérien) (Moore *et al.*, 1999).

Le mycélium aérien n'est pas une spécificité des actinomycètes qui possèdent le mycélium végétatif. En effet, le genre *Sporichthya* n'a qu'une croissance aérienne.

La structure mycélienne des actinomycètes est typique, mais quelquefois transitoire (Lopes *et al.*, 1999). Le mycélium rampant et/ou aérien subit une évolution complexe donnant naissance à des structures spécialisées, conidies ou sporanges, qui libèrent des spores de formes variées (Ogata *et al.*, 1992 ; Miguélez *et al.*, 1993).

### 1-2-3 Les spores

Les différents groupes d'actinomycètes peuvent sporuler soit en morcelant certains hyphes pour former des conidies, un peu plus résistantes aux conditions hostiles que les hyphes, soit en produisant des endospores hautement résistantes à la chaleur et autres adversités. Les endospores sont semblables, morphologiquement et chimiquement, à celles des *Bacillaceae*. Les actinomycètes du genre *Thermoactinomyces*, qui les produisent sur leurs hyphes, semblent être proches parents de ce groupe bactérien.

Les conidies peuvent, suivant les groupes, être produites isolément (*Micromonospora*), deux à deux longitudinalement (*Microbispora*), en courtes chaînes (*Actinomadura*),

et/ou en longues chaînettes (*Streptomyces*). Les chaînettes de spores peuvent être ramifiées ou non, droites, sinuées ou en spirales. De plus, elles peuvent être rayonnantes autour d'hyphes sporophores (*Streptoverticillium*).

Il existe d'autres structures morphologiques comme les sclérotés qui sont formés dans le genre *Chainia*, ou des Synnemas (ou Corémies) par les *Actinosynnema*, ou bien des vésicules, différentes des spores, chez les *Frankia* et les *Dactylosporangium*.

Certains facteurs externes et internes contrôlent la sporulation. Les principaux facteurs externes favorisant la sporulation sont la dessiccation, le glycérol comme source de carbone, les sources minérales d'azote plutôt que les sources organiques complexes, l'addition d'extrait de sol et de carbonate de calcium, la présence de manganèse, de magnésium, de fer et un pH voisin de 7,5 (Larpen et Sanglier, 1989).

Les facteurs internes sont de nature génétique et biochimique. Ainsi, une dizaine de gènes chromosomiques sont impliqués directement dans la sporulation de *Streptomyces coelicolor*. Leur mutation peut conduire à des phénotypes divers présentant une sporulation incomplète ou même totalement absente (mutants « bald »). Il a été mis en évidence des bioréacteurs codés par des gènes chromosomiques influant sur la sporulation, la différenciation cellulaire ou le métabolisme secondaire (Larpen et Sanglier, 1989).

### **1-3 Ecologie**

Les actinomycètes, très ubiquitaires, sont rencontrés dans tous les habitats naturels. Le sol, à partir duquel les actinomycètes peuvent coloniser de nombreux biotopes, en est le réservoir le plus riche (Larpen et Sanglier, 1989 ; Xu, 1996 ; Katsifas *et al.*, 1999) à l'exception des espèces anaérobies appartenant aux genres *Actinomyces*, *Arachnia* et groupes voisins qui font partie de la flore endogène de Veillon et qui ne sont souvent dans la nature que dans les endroits récemment contaminés par l'homme (Mariat et Sebald, 1990 ; Sanglier et Trujillo, 1997). Par contre, ils semblent être absents des eaux minières très acides (pH<1) et des sources thermales très chaudes d'origine volcanique (Xu, 1996 ; Hwang *et al.*, 2001).

Certaines espèces d'actinomycètes semblent préférer certains habitats à d'autres. Par exemple, les *Thermoactinomyces* et les *Faenia* se trouvent dans les composts, les foin en fermentation et les condenseurs de réfrigérateurs et de climatiseurs. Les

*Actinoplanes* et les *Actinosynnema* se rencontrent dans les sols cultivés et sur les débris végétaux qu'on trouve aux bords des rivières et des lacs, les *Micromonospora* au fond des lacs et des réservoirs ; les *Streptosporangium* à la surface des sols forestiers, les *Microbispora* et les *Actinomadura* dans les sols cultivés. Les *Streptomyces*, si nombreux, se rencontrent presque partout (Xu, 1996 ; Lacey, 1997).

Une majorité d'actinomycètes est saprophytes, mais il existe des formes parasites et symbiotiques des plantes ou des animaux (Goodfellow et Williams, 1983).

Les actinomycètes ont été, également, mentionnés dans les milieux marins (Woo *et al.*, 2002). L'écologie des actinomycètes des mers et du littoral a été revue par Goodfellow et Williams en 1983. Il a été démontré que les actinomycètes constituent une petite partie de la flore totale ; leur nombre est faible comparé à leur présence dans les eaux douces ou les sols. Quelques chercheurs considèrent les actinomycètes marins comme une partie de la microflore indigène marine alors que d'autres les considèrent comme des survivants du lavage marin des sédiments et du littoral (Moore *et al.*, 1999). Cette théorie est basée sur le fait que le nombre d'actinomycètes rencontrés dans l'eau de mer diminue avec la distance qui sépare le lieu de prélèvement de la côte (Okami et Okazaki, 1978 ; Xu, 1996).

Enfin, l'air constitue pour les actinomycètes, non pas un habitat, mais un moyen de transport (Gazenko *et al.*, 1998 ; Reponen *et al.*, 1998).

## 2°/ Pouvoir pathologique

Les actinomycètes aérobies les plus connus en pathologie humaines sont *Corynebacterium* et *Mycobacterium*, mais il existe d'autres qualifiées de rares, il s'agit notamment des membres de plusieurs genres : *Actinomadura*, *Dermatophilus*, *Gordonia*, *Nocardia*, *Nocardiosis*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, *Tsukamurella*, et dans une moindre mesure, *Amycolata*, *Amycolatopsis*, *Micromonospora*, *Saccharopolyspora*, *Saccharomonospora*, et *Thermoactinomyces* (Garcia et Isenberg, 2007).

Bien que les actinomycètes aérobies sont rarement rencontrés dans la pratique clinique, ils ont un potentiel important et causent de graves infections chez les humains, le plus souvent chez des patients immunodéprimés (notamment les sujets sous corticothérapie, ceux qui ont subi une transplantation d'organe, ainsi que les patients sous chimio- ou radiothérapie des affections malignes et les patients atteints de virus

d'immunodéficiences humaine, etc...) ou les animaux domestiques ou sauvages (McNeil et Brown, 1994). Une infection mortelle causée par *Nocardia brasiliensis* a été décrite chez le tatou. Des maladies dues aux bactéries du genre *Nocardia* sont aussi décrites chez les oiseaux : la perruche de Derby, la paruline orangée, le pigeon biset, le râle à bec jaune, l'albatros et le perroquet. *N. crassostreae* a été responsable de la mort d'huîtres en culture aux USA et au Canada, comme elle a été trouvée chez certaines plantes (Zoropogui, 2011). Le tableau 1 expose quelques noms d'infections humaines causées par quelques bactéries appartenant au groupe des actinomycètes aérobies.

**Tableau 1** : liste des agents étiologiques et les sites des infections les plus couramment associés (Garcia et Isenberg, 2007).

Agent causal	Type d'infection
<i>Actinomadura madurae</i>	mycétome (rare aux Etats Unis mais, plus courante dans les pays tropicaux et subtropicaux) autres infections (très rares, mais certains rapportent des infections post-opératoires de la plaie, des pneumonies et des bactériémies)
<i>Actinomadura pelletieri</i>	mycétomes (rares)
<i>Dermatophilus congolensis</i>	dermatophilose, affectant en particulier les travailleurs en contact avec des animaux infectés (rare)
<i>Gordonia bronchialis</i> , <i>G. sputi</i> , <i>G. terrae</i> , et <i>Gordonia spp.</i>	infections pulmonaire (rares), bactériémie (rare), et infections post-opératoire ( <i>Gordonia bronchialis</i> ; rares)
<i>Nocardia asteroides sensu stricto</i> (types I et VI)	nocardiose (pulmonaire et/ou infection du système nerveux central)
<i>Nocardia brasiliensis</i>	nocardiose (cutanée et lymphocutanée (rare) et mycétomes (rares aux Etats Unis mais plus fréquents en Amérique du Sud, en Mexique, et en Australie)
<i>Nocardia farcinica</i>	nocardiose (pulmonaire et/ou infection du système nerveux central ; infections postopératoire rares)
<i>Nocardia nova</i>	nocardiose (pulmonaire et/ou cutanée)
<i>Nocardia otitidiscaviarum</i>	nocardiose (pulmonaire et/ou cutanée) (rare)
<i>Nocardia pseudobrasiliensis</i>	nocardiose (pulmonaire) (rare)
<i>Nocardia transvalensis</i>	nocardiose (pulmonaire, disséminée, et mycétomes) (très rare)
<i>Rhodococcus equi</i>	pulmonaire (rare) et bactériémie (rare), particulièrement chez les personnes immunodéprimées et infectées par le VIH
<i>Rhodococcus spp.</i>	infection disséminée (très rare)
<i>Streptomyces somaliensis</i>	mycétomes (très rares)
<i>Tsukamurella inchonensis</i> , <i>T. pulmonis</i> , et <i>T. tyrosinosolvans</i>	pulmonaire (rare), cutanée (rare), et bactériémie (rare)

Les manifestations cliniques et la gravité de la maladie ainsi que le pronostic dans un hôte infecté sont extrêmement variables et peuvent être déterminés par plusieurs facteurs tels que la voie d'infection et la présence ou l'absence d'un système immunitaire. En clinique, différentes formes d'infections par les actinomycètes aérobies sont clairement documentées.

### **2-1 l'infection pulmonaire**

Une infection du poumon peut survenir suite à l'inhalation ou l'aspiration de spores ou de fragments de filaments de bactéries actinomycétales aérosolisées ou associées à des poussières

Ainsi plusieurs cas d'infections pulmonaires pseudo-tuberculeuses décrites sont causées par des actinomycètes : *Streptomyces somaliensis*, *S. pelletieri* et *S. griseus* (Kapadia *et al.*, 2007), *Actinomadura madurae* et *A. pelletieri* (Trujillo, 2011) ainsi que *Rhodococcus equi* (Debarati *et al.*, 2011)

La localisation pulmonaire d'une infection est souvent identifiée comme site primaire de l'infection à partir duquel l'agent bactérien va pouvoir se disséminer à d'autres tissus par voie lymphatique ou sanguine. Les complications locales des infections pulmonaires sont très répandues et peuvent inclure une atteinte pleurale, une péricardite, l'obstruction de la veine cave supérieure et plus rarement la formation d'abcès dans la cage thoracique ou la nuque (McNeil et Brown, 1994).

### **2-2 l'infection du système nerveux central**

L'atteinte du système nerveux central est généralement secondaire à un foyer pulmonaire. Le système nerveux central est le plus souvent touché dans le cas de métastases ; cependant, elle peut s'observer de façon isolée sans détection d'autres sites d'infection dans 7 % des cas (Oshiro *et al.*, 2003).

Les infections du système nerveux central semblent se développer plus rapidement chez les patients immunodéprimés que chez les individus sans facteurs de prédispositions (Beaman et Beaman, 1994).

L'expression clinique d'une atteinte cérébrale est extrêmement variable, en fonction de la région affectée, elle témoigne de l'existence d'un processus expansif intra cérébral. Elle peut être totalement silencieuse de découverte autopsique ou

elle peut mimer une tumeur cérébrale ou se présenter comme une méningite (Moiton *et al.*, 2006 ; Kennedy *et al.*, 2007 ; Soraa *et al.*, 2009). Ce dernier auteur a exposé un cas d'abcès cérébral à *Nocardia* chez un patient de 47 ans sous corticoïdes pour une sarcoïdose pulmonaire confirmée par un examen histologique. Le malade a été hospitalisé pour un tableau clinique en faveur d'un processus expansif intra crânien.

### **2-3 l'infection cutanée, sous-cutanée et lymphocutanée**

Les infections cutanées se subdivisent en quatre pathologies différentes : l'abcès et la cellulite, la lymphangite, le mycétome, et les atteintes cutanées secondaires avec dissémination. Les trois premières formes correspondant à une infection primaire, affectent généralement les individus apparemment immuno-compétents et surviennent le plus souvent suite à un traumatisme cutané au cours duquel les microorganismes traversent la peau par l'intermédiaire d'une épine, d'un éclat de bois, d'une morsure de chien ou d'une griffure de chat, l'ensemble de ces éléments jouent le rôle de vecteurs mécaniques des bactéries. Les lésions sont aiguës ou subaiguës et siègent en général au niveau des parties découvertes comme les mains, les bras, les jambes et les pieds.

La dissémination à partir du foyer cutané primaire peut avoir lieu par voie lymphatique, entraînant une infection lymphocutanée.

*S. somaliensis* est le principal agent étiologique des mycétomes en Amérique du Sud, en Afrique, en Inde, au Mexique, en Malaisie et aux Etats Unis (Bhuyar *et al.*, 2011), des cas ont aussi été décrits avec *N. brasiliensis*, *N. asteroides*, *N. otitidiscaviarum* ou *N. nova* (Inamadar *et al.*, 2004).

### **2-4 L'infection extrapulmonaire (autre que le système nerveux et le tissu cutané)**

À côté des atteintes cérébrales et cutanées presque tous les organes peuvent être atteints, souvent de façon secondaire. Des études ont été réalisées afin de déterminer l'implication de *Rhodococcus equi* dans les abcès de la thyroïde, de la rate, du foie, des infections des voies urinaires et de la vessie, de la moelle osseuse, l'adénite et la péritonite, l'abcès des reins et des surrénales (Debarati *et al.*, 2011).

## **2-5 L'infection disséminée (impliquant deux ou plusieurs sites infectieux)**

Le développement d'un agent pathogène dans un organe abouti fréquemment à sa dissémination dans l'organisme par voie sanguine. Il s'agit alors de forme disséminée, puisque l'infection touche deux organes ou plus. Les patients immunodéprimés sont les plus prédisposés à développer ce type d'infections.

Bhuyar *et al.*, (2011) ont présenté des cas de septicémie : le premier cas un bébé âgé de 22 jours de sexe masculin léthargique qui présentait une septicémie néonatale causée par *Streptomyces annulatus*, et le deuxième un malade atteint d'une pneumopathie chronique avec *S. somaliensis* comme agent responsable.

## **2-6 Transmission nosocomiale**

Plusieurs épidémies impliquant les espèces du genre *Nocardia* ont été décrites dans la littérature (Stevens *et al.*, 1981 ; Sahathevan *et al.*, 1991). Les services hospitaliers accueillant les patients ayant subi une transplantation cardiaque ou rénale ont été les plus touchés par ce type de transmission (Exmelin *et al.*, 1996). Certaines infections à *Nocardia* se sont déclenchées de façon post-opératoire suite à des actes de chirurgie cardio-vasculaire tels que les valvuloplasties (Falk *et al.*, 1979) ou artériectomies. Mrozek *et al.*, en 2008, ont publié le cas d'un patient immunocompétent ayant présenté un abcès du psoas et des abcès cérébraux dus à *N. asteroides* suite à la pose d'une prothèse totale de la hanche. Ces cas de transmission nosocomiale ont été plus souvent observés dans des hôpitaux ayant réalisé ou réalisant des travaux de réfection. La transmission par les poussières en suspension a été alors fortement suspectée (Stevens *et al.*, 1981 ; Sahathevan *et al.*, 1991).

Un seul cas de transmission interhumaine a été décrit dans la littérature (Houang *et al.*, 1980). *N. asteroides* est mise en cause dans six cas d'infections pulmonaires chez des patients ayant une transplantation rénale dans une unité rénale de soins intensifs sur une période de six mois. La transmission de l'agent pathogène par voie aérienne a été fortement soupçonnée.

Les corynébactéries, dont certaines présentent une multirésistance aux antibiotiques, peuvent être responsables d'infections nosocomiales. Ainsi, le pouvoir pathogène de *Corynebacterium urealyticum* a été reconnu dans des infections urinaires

survenant en milieu urologique et *Corynebacterium jeikeium* est fréquemment retrouvée à partir de divers matériels implantés et peut être à l'origine de septicémies (Riegel, 1998).

### **3°/ Les techniques conventionnelles d'identification des actinomycètes**

#### **3-1 Méthode morphologique**

L'étude morphologique des actinomycètes se base essentiellement sur la présence ou l'absence du mycélium du substrat et le mycélium aérien, la couleur du mycélium, la production et la couleur de pigments diffusibles, la production de pigments mélanoides ainsi que la structure et la forme des spores (figure 3 annexe 1).

En effet, les spores représentent un critère fondamental dans la taxinomie des actinomycètes (Locci et Sharples, 1984). Chez les genres *Micropolyspora* et *Micromonospora* et les Thermoactinomycètes, la formation des spores se fait directement sur le mycélium de substrat (Cross et Goodfellow, 1973). Chez le genre *Streptomyces*, les spores surmontent le mycélium aérien. Les spores mobiles caractérisent le groupe des *Actinoplanes* et *Actinosynnema*, alors que *Thermoactinomyces* présente des endospores uniques thermorésistantes (Cross et Goodfellow, 1973). Les spores flagellées caractérisent les espèces du genre *Oerskovia*.

Le nombre de spores est également un caractère de classification important, ainsi *Micromonospora*, *Thermomonospora*, *Saccharomonospora* et *Promicromonospora* ne produisent que des spores isolées, *Microbispora* produit des spores en paires longitudinales. *Actinomadura*, *Sporichthya*, et certaines *Nocardia* présentent des chaînes de spores très courtes (inférieures à 20) alors que *Streptomyces*, *Nocardoides*, *Kitasatospora*, *Streptovercillium* et certaines *Nocardia* sont caractérisés par la présence de longues chaînes de spores. Les chaînes de spores du genre *Streptomyces* sont soit droites (type Rectis), sinuées (type Rectiflexibilis) soit spirales (types Spirales) alors que le genre *Streptovercillium* présente des chaînes de spores en verticilles.

### **3-2 Méthode numérique**

A la fin des années 1950, suite au développement des techniques biochimiques analytiques, Sneath applique une méthode similaire aux bactéries et développe une taxonomie qualifiée de numérique ou d'adansonienne. De manière schématique, la méthode consiste à étudier, pour chaque souche, plus d'une centaine de caractères morphologiques, biochimiques, physiologiques etc. et à attribuer le même poids à chacun des caractères qui sont codés 1 (présence du caractère) ou 0 (absence du caractère). Les degrés de similitude entre individus sont finalement représentés sous la forme de dendrogrammes, et permettent de rassembler dans une même classe de similitude les individus les plus semblables.

Les caractères métaboliques et physiologiques sont dès lors largement employés telles que les propriétés de décomposition des substrats (tyrosine, xanthine, acide urique, adénine, hypoxanthine, caséine, et urée), la capacité de croissance sur des substrats carbonés (citrate, acétamide, rhamnose, mannitol, sorbitol, etc.), les activités enzymatiques (arylsulfatase, catalase, acetamidase, galactosidase, uréase, etc.) et les caractères de sensibilité ou de résistance aux antibiotiques (ampicilline, amoxicilline + acide clavulanique, kanamycine, etc.).

Pour les actinomycètes cette approche taxonomique a été utilisée par plusieurs chercheurs (Williams *et al.*, 1983 ; Kämpfer *et al.*, 1991 ; Kim *et al.*, 1996).

### **3-3 Méthode Chimiotaxinomique**

La chimiotaxinomie est un système de classification et d'identification basé sur des caractères chimiques permettant de distinguer et de grouper des microorganismes. Ces déterminations chimiques se montrent surtout efficaces pour délimiter des groupes et des genres. L'examen des acides aminés de la paroi cellulaire, des glucides, des lipides et des acides nucléiques constituent les principaux caractères utilisés en chimiotaxonomie (O'donnell, 1982 ; O'donnell *et al.*, 1985). Cette approche taxonomique a permis une grande avancée dans la classification des actinomycètes.

#### **3-3-1 Composition en acides aminés et spectre glucidique**

La combinaison du type d'acide aminé du peptidoglycane et du spectre glucidique permet un classement en groupes principaux (tableau 2).

**Tableau 2** : types pariétaux en fonction des constituants majeurs des parois cellulaires des actinomycètes (Lechavalier et Lechevalier, 1970).

Types de parois	Constituants majeurs	Exemple de genres
I	LL-DAP <sup>a</sup>	<i>Streptomyces</i>
II	Méso ou hydroxy-DAP <sup>a</sup> Glycine, xylose, arabinose	<i>Micromonospora</i>
III	Méso-DAP <sup>a</sup> , madurose ou aucun sucre	<i>Actinomadura</i>
IV	Méso-DAP <sup>a</sup> , arabinose, galactose	<i>Nocardia</i>
V	Lysine, ornithine	<i>Actinomyces israelii</i>
VI	Lysine	<i>Oerskovia</i>
VII	DAB <sup>b</sup> , glycine	<i>Agromyces</i>
VIII	Ornithine	<i>Cellulomonas</i>

<sup>a</sup>) Ac. 2,6-diaminopimélique ; <sup>b</sup>) Ac. 2,4-diaminobutyrique.

### 3-3-2 Composition en lipides

Les lipides ; importants en taxonomie peuvent être divisés en trois groupes :

- Les acides gras sont des chaînes qui peuvent être droites ou ramifiées, les molécules saturées ou insaturées avec la présence éventuelle de groupes cyclopropane. Les plus communs chez les actinomycètes appartiennent soit à un groupe de molécules comportant de 12 à 20 atomes de carbone, soit au groupe des acides mycoliques à 20-90 atomes de carbone, caractéristique des genres tels que *Mycobacterium*, *Nocardia* et *Rhodococcus*.

- Les ménaquinones sont classées en fonction du nombre d'unités isoprènes et du nombre de doubles liaisons. Dans le groupe des genres dont les parois contiennent du LL-DAP, le genre *Nocardioides* se caractérise par du MK-8(H4) alors que le genre *Streptomyces* synthétise principalement du MK-9(H6). Le genre *Thermoactinomyces* est caractérisé par la présence de MK-7.

- Les lipides polaires, les plus communs chez les actinomycètes sont les phospholipides.

La combinaison du type de paroi, du spectre de glucides, la composition lipidique membranaire et le GC % permettent un classement en différents groupes principaux (tableau 3).

**Tableau 3** : principaux groupes et genres d'actinomycètes. (Actinobactéries non incluses) (Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol 4, 1989)

Groupe/Genre	Type de Paroi	Spectre Des Glucides	Acides Gras	Ménaquinones Majeures (MK)	Type de Phospho-Lipides	G+C %
<b>ACTINOPLANETES</b>						
<i>Actinoplanes</i>	II	D	2d	-9(H <sub>4</sub> ), - 10(H <sub>4</sub> )	PII	72-73
<i>Ampullariella</i>			2d	-9(H <sub>4</sub> ), - 10(H <sub>4</sub> )	PII	72-73
<i>Catellatospora</i>			ND	-9(H <sub>4</sub> ), - 10(H <sub>8</sub> )	PII	71-72
<i>Dactylosporangium</i>			3b	-9(H <sub>4</sub> ,H <sub>6</sub> , H <sub>8</sub> )	PII	71-73
<i>Micromonospora</i>			3b	-9(H <sub>4</sub> ), - 10(H <sub>4</sub> )	PII	71-73
<i>Pilimelia</i>			2d	-9(H <sub>2</sub> ), - 9(H <sub>4</sub> )	PII	ND
<b>MADUROMYCETES</b>						
<i>Actinomadura pusilla</i> group	III	B, C	3c	-9(H <sub>0</sub> ,H <sub>2</sub> ,H <sub>4</sub> )	PIV	64-69
<i>Microbispora</i>		B, C	3c	-9(H <sub>6</sub> ,H <sub>2</sub> ,H <sub>4</sub> )	PIV	67-74
<i>Microtetraspora glauca</i> groupe		B, C	3c	-9(H <sub>0</sub> ,H <sub>2</sub> ,H <sub>4</sub> )	PIV	66
<i>Planobispora</i>		B	3c	-9(H <sub>2</sub> ,H <sub>4</sub> )	PIV	70-71
<i>Planomonospora</i>		B	3c	-9(H <sub>2</sub> )	PIV	72
<i>Streptosporangium</i>		B	3c	-9(H <sub>2</sub> ,H <sub>4</sub> )	PIV	69-71
<b>MICROPOLYSPORAS</b>						
<i>Actinopolyspora</i>	IV	A	2c	-9(H <sub>4</sub> ,H <sub>6</sub> )	PIII	64
<i>Amycolata</i>			3e	-8(H <sub>4</sub> )	PIII	68-72
<i>Amycolatopsis</i>			3f	-9(H <sub>2</sub> ,H <sub>4</sub> )	PII	66-69
<i>Faenia</i> ( <i>Micropolyspora</i> )			2c	-9(H <sub>4</sub> )	PIII	66-71
<i>Kibdelosporangium</i>			3c	ND	PII	66
<i>Pseudonocardia</i>			2b	-8(H <sub>4</sub> )	PIII	79
<i>Saccharomonospora</i>			2a	-9(H <sub>4</sub> )	PII	69-74
<i>Saccharopolyspora</i>			2c	-9(H <sub>4</sub> )	PIII	77
<b>ACTINOMYCETES AVEC SPORANGES MULTILOCULAIRES</b>						
<i>Frankia</i>	III	B, C, E	1	ND	PI	66-71
<i>Geodermatophilus</i>	III	C	2b	-9(H <sub>4</sub> )	PII	73-76

**Tableau 3** (suite) : principaux groupes et genres d'actinomycètes. (Actinobactéries non incluses) (Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol 4, 1989).

Groupe/Genre	Type de Paroi	Spectre Des Glucides	Acides Gras	Ménaquinones Majeures	Type de Phospholipides	G+C%
<b>NOCARDIOFORMES</b>						
<i>Caseobacter</i>			1b	-8(H <sub>2</sub> ), -9(H <sub>2</sub> )	ND	65-67
<i>Corynebacterium</i>			1a	-8(H <sub>2</sub> ), -9(H <sub>2</sub> )	PI	51-63
<i>Mycobacterium</i>			1b	-9(H <sub>2</sub> )	PII	62-69
<i>Nocardia</i>	IV	A	1b	-8(H <sub>2</sub> ), -9(H <sub>2</sub> )	PII	64-72
<i>Rhodococcus</i>			1b	-8(H <sub>2</sub> ), -9(H <sub>2</sub> )	PII	63-72
<b>NOCARDIOIDES</b>						
<i>Nocardioides</i>	I	-	3a	-8(H <sub>2</sub> )	PI	ND
<b>STREPTOMYCETES</b>						
<i>Intrasporangium</i>			1a	-8	PI	ND
<i>Kineosporia</i>			ND	-9(H <sub>4</sub> )	PIII	ND
<i>Sporichthya</i>			3a	-9(H <sub>6</sub> , H <sub>8</sub> )	ND	ND
<i>Streptomyces</i>	I	-	2c	-9(H <sub>6</sub> , H <sub>8</sub> )	PII	69-78
<i>Streptoverticillium</i>			2c	-9(H <sub>6</sub> , H <sub>8</sub> )	PII	69-73
<b>THERMOMONOSPORA</b>						
<i>Actinomadura madurae</i>		B	3a	-9(H <sub>6</sub> )	PI	66-69
<b>groupe</b>		C	3f	-9(H <sub>4</sub> ), -10(H <sub>4</sub> )	PII	71-73
<i>Actinosynema</i>		C	3a	-9(H <sub>4</sub> )	PI	67
<i>Microtetraspora viridis</i>		C	3d	-10(H <sub>2</sub> , H <sub>4</sub> , H <sub>6</sub> )	PIII	64-69
<i>Nocardiopsis</i>		C	3f	-9(H <sub>4</sub> ), -10(H <sub>4</sub> )	PII	70-76
<i>Saccharothrix</i>	III	C	ND	-9(H <sub>6</sub> ), -10(H <sub>6</sub> )	ND	ND
<i>Streptoalloteichus</i>		C	3e	-10(H <sub>4</sub> , H <sub>6</sub> )	PII	ND
<i>Thermomonospora</i>		C	3c	-9(H <sub>2</sub> , H <sub>4</sub> )	PIV	ND
<b>AUTRES GENRES</b>						
<i>Glycomyces</i>	II	D	2c	-9(H <sub>4</sub> ), -10(H <sub>4</sub> )	PI	71-73
<i>Kitasatosporia</i>	I, III	C	ND	ND	ND	66-73
<i>Spirillospira</i>	III	B	3a	-9(H <sub>4</sub> , H <sub>6</sub> )	PI, PII	69-71
<i>Thermoactinomyces</i>	III	C	2b	-7, -9	ND	53-55

## 4°/ Le diagnostic rapide en bactériologie

L'identification des microorganismes est essentiellement phénotypique (aspect et morphologie des colonies, coloration de Gram, caractéristiques de croissance, pigmentation, présence ou absence d'enzymes, utilisation ou non de sucres par fermentation ou oxydation) (Rouessac *et al.*, 2004). Ces techniques de recherche ont été miniaturisées grâce aux galeries d'identifications de type Api et leur lecture automatisée (Vitek 2, BioMérieux, Phoenix BD...). Ces techniques simples permettent une bonne identification des microorganismes rencontrés en pratique médicale courante.

Si ces techniques ont permis des avancées dans l'isolement et l'identification des microorganismes potentiellement pathogènes pour l'homme, certaines sont longues et fastidieuses et d'autres sont coûteuses. Des progrès apparaissent encore nécessaires face à la multiplication des espèces rencontrées chez des patients de plus en plus fragilisés, et dont la diagnose est nécessaire pour une meilleure prise en charge thérapeutique.

Actuellement, l'expertise bactériologique repose principalement sur des techniques manuelles classiques (culture sur gélose, identification biochimique d'un pathogène, antibiogramme ...) et la majorité des résultats est rendue en 48 heures. À l'échelle individuelle, un retard dans le diagnostic peut entraîner un retard de prise en charge thérapeutique adaptée avec une perte de chance pour le patient. À l'échelle collective, la mise en place différée de mesures d'hygiène renforcées peut favoriser la diffusion de bactéries multirésistantes aux antibiotiques (Marcadé, 2013).

Depuis quelques années, les progrès technologiques ont permis de mettre sur le marché de nouveaux outils permettant de réduire les délais du diagnostic bactériologique. Les tests biochimiques ou immunologiques, la biologie moléculaire et la spectrométrie de masse permettent désormais d'obtenir des résultats plus rapidement que les méthodes conventionnelles, ce qui favorise une prise en charge adaptée précoce des patients (Marcadé, 2013).

Deux méthodes de diagnostic rapide disponibles à ce jour en bactériologie seront développées dans cette partie : le diagnostic par séquençage d'ADN et le diagnostic par spectrométrie de masse.

#### 4-1 Technologie du séquençage d'ADN

Depuis la description de la structure de l'ADN en 1955 jusqu'à nos jours, la biologie a connu une suite de remarquables progrès technologiques dont le séquençage qui constitue l'un des événements clés.

Étant donné l'unicité et la spécificité de la structure de l'ADN chez chaque individu, la séquence de l'ADN permet de nombreuses applications dans le domaine de la médecine, comme, par exemple, le diagnostic, les enquêtes épidémiologiques, les études génétiques, l'étude de paternité, la criminologie, la compréhension de mécanismes physiopathologiques, la synthèse de médicaments.

Les génomes de nombreux agents infectieux, de mammifères et de plantes ont été séquencés dans leur totalité (nombre d'entre eux sont accessibles sur le site web [www.ncbi.nlm.nih.gov/Genomes](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genomes)). Leur connaissance a modifié considérablement les recherches biomédicales et biologiques en ouvrant de vastes panoramas dans le domaine de la médecine (diagnostic, thérapeutique, prédiction, pronostic, prévention..) et dans de nombreuses autres disciplines biologiques (anthropologie, agronomie, environnement...).

Par ailleurs, le séquençage a pu « se démocratiser » dans de nombreux laboratoires, en partie depuis la description de la *polymerase chain reaction* (PCR) en 1985, suivie de sa diffusion très large dans les laboratoires de biologie moléculaire. Depuis 2000, outre la PCR, de nouvelles techniques de séquençage se sont développées, par exemple, le pyroséquençage. Elles constituent un progrès technologique révolutionnaire.

Initialement, deux méthodes ont été développées pour le séquençage de l'ADN : la méthode chimique de A.M. Maxam et W. Gilbert (Gilbert et Maxam, 1973) et la méthode enzymatique proposée par F. Sanger (Sanger *et al.*, 1977).

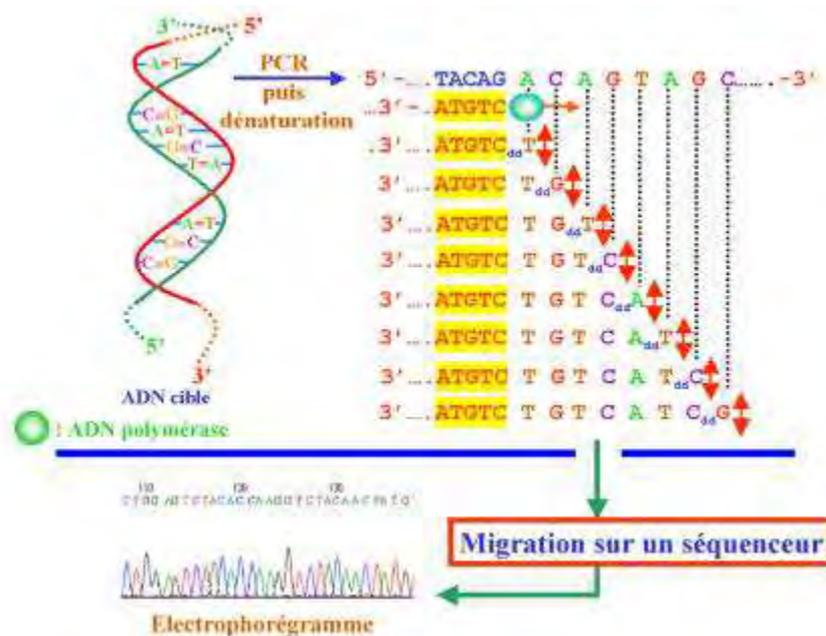
La technique de Maxam-Gilbert permettait d'analyser des fragments allant jusqu'à 500 pb, cette technique est pratiquement abandonnée de nos jours. La technique de Sanger la remplace et reste à ce jour la principale méthode de séquençage utilisée dans les laboratoires.

La technique de Sanger utilise le principe de la synthèse enzymatique de l'ADN à séquencer en présence de nucléotides triphosphate (NTP) (dont l'ATP est marqué radio activement) et d'inhibiteurs d'élongation de l'ADN polymérase les

2',3'-di-déoxynucléotides (ddNTP). La réaction de séquençage s'effectue grâce à quatre réactions enzymatiques menées parallèlement. Ainsi, l'incorporation d'un ddNTP à la place d'un dNTP interrompant la polymérisation. Les différents fragments de chaque réaction enzymatique sont séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide et visualisés par autoradiographie. La longueur des fragments identifiera la position de la base.

Dans un souci d'automatisation, plusieurs modifications ont été apportées à cette technique. Ainsi, le principe de la technique de Sanger automatisé est le suivant : dans un premier temps, il est nécessaire d'amplifier l'ADN cible par PCR, puis de le dénaturer afin d'obtenir un ADN simple brin. À l'aide d'une amorce spécifique et complémentaire du brin étudié (sens ou antisens), identique ou différente de celle utilisée pour la PCR, une ADN polymérase effectue alors la synthèse de l'ADN complémentaire à partir de cette amorce. La réaction se faisant dans un seul tube, les ddNTP (ddATP, ddGTP, ddCTP et ddTTP) sont marqués à l'aide de fluorophores différents pour chaque ddNTP (fluorophores « quatre couleurs »). Lorsqu'un ddNTP est incorporé à la place d'un dNTP, l'ADN polymérase ne peut plus continuer sa polymérisation. L'émission de fluorescence est mesurée à quatre longueurs d'ondes correspondant aux quatre fluorophores. À la fin de la réaction, nous obtiendrons des fragments de taille différente repérés individuellement dans le mélange (figure 4) (Lamoril *et al.*, 2008).

Aujourd'hui, l'électrophorèse capillaire réalisée sur un automate de séquençage est la méthode de choix. Lors de la migration, chaque fragment (contenant un ddNTP marqué par un fluorophore) sera excité par un laser et le signal obtenu est analysé par un logiciel spécifique. L'analyse informatique des signaux permet d'obtenir la séquence étudiée, par exemple, sous forme d'un électrophorégramme, de lecture manuelle aisée mais souvent fastidieuse (figure 4). Des logiciels d'analyse des séquences peuvent être utilisés. Dans tous les cas, l'analyse d'un fragment d'ADN après PCR se fait toujours à l'aide d'une amorce sens et antisens afin de confirmer la séquence (et une éventuelle anomalie de séquence). En général, cette technique permet d'obtenir des séquences de longueur comprise entre 400 et 850 pb (Lamoril *et al.*, 2008).



**Figure 4** : Principes du séquençage selon la méthode de Sanger (Lamoril *et al.*, 2008).

#### 4-1-1 L'identification bactérienne par séquençage du gène ARN 16S.

En 1980, Kimura émis le concept d'horloge « évolutionnaire » : la vitesse de l'évolution est constante, les mutations qui surviennent dans le génome n'ont pas nécessairement des conséquences phénotypiques mais elles sont étroitement corrélées avec le temps. Il est ainsi possible de construire un arbre phylogénétique en utilisant des méthodes mathématiques. Les ARNr étant essentiels à la bactérie et ayant un rôle fonctionnel identique pour tous les ribosomes, leur structure évolue très lentement au cours du temps, vraisemblablement en raison de leur rôle critique et constant dans la physiologie bactérienne. Le gène codant l'ARN ribosomal 16S présente ainsi à la fois des régions hautement conservées tout en contenant de courtes séquences signatures spécifiques de genre et parfois d'espèces. Ces caractéristiques particulières font de ce gène une cible intéressante. Le séquençage de l'ARNr 16S permet l'identification du genre bactérien dans plus de 90 % des cas et de l'espèce bactérienne dans 65-85 % (Lamoril *et al.*, 2008). Selon les études, 1 à 14 % des isolats étudiés demeurent non identifiés après utilisation de cette méthode (Lamoril *et al.*, 2008). Dans tous les cas, l'identification par séquençage de l'ARNr 16S reste supérieure aux méthodes bactériologiques conventionnelles. La généralisation de l'analyse des séquences d'ADNr 16S a incité les auteurs à corréliser les pourcentages d'identité entre les séquences d'ADNr 16S et les pourcentages de réassociations ADN-ADN. Il a été mis en évidence que des similitudes d'ADNr 16S inférieures à 97 %

ne correspondent jamais à des pourcentages de réassociation ADN-ADN supérieures à 60 % (Devereux *et al.*, 1990 ; Fry *et al.*, 1991). Par extension nous considérons que des souches dont les séquences ont un pourcentage de similitude inférieur à 97 % n'appartiennent pas à la même espèce (Stackebrandt et Goebel, 1994). S'il est compris entre 93 et 95 %, les deux souches appartiennent à des genres différents (Devereux *et al.*, 1990 ; Whitman *et al.*, 2001). Néanmoins, deux espèces peuvent avoir des séquences des ARNr 16S très proches et être différentes par hybridation ADN-ADN (Dijkshoorn *et al.*, 2000).

Le séquençage de l'ARNr présente toutefois des limites. À titre d'exemple, dans le genre *Nocardia*, selon les travaux de Rodriguez-Nava *et al.*, (2007) portant sur le séquençage du gène ADNr16S de l'ensemble des souches type du genre *Nocardia* (soit les 43 espèces décrites), ils ont constaté les limites du gène codant l'ARNr 16S en tant que marqueur génotypique pour l'identification de l'ensemble des espèces du genre *Nocardia*. Par exemple, *N. cummidelens* et *N. sofii* d'une part, et *N. shimofusensis* et *N. higoensis*, d'autre part, présentent des séquences identiques ; également, les séquences des espèces *N. abscessus* et *N. asiatica* ne présentent qu'un seul nucléotide de différence. Clarridge, (2004) indique clairement qu'il n'est pas possible de donner une similitude définie ou une valeur de dissimilitude pour définir l'espèce par séquençage de l'ARNr 16S, en partie parce que des valeurs différentes sont produites en analysant des bases de données séparées et en utilisant des méthodes différentes. Ces éléments soulignent le besoin de bases de données de référence propres, corrigées et contrôlées. Selon les travaux réalisés par ces auteurs, les tests phénotypiques sous-estiment la complexité du genre *Nocardia* : des souches différentes correspondant à des espèces phénotypiquement identiques présentent des séquences de l'ARNr 16S différentes.

Malgré ces inconvénients et bien que le coût limite son utilisation dans certains laboratoires de biologie clinique, l'analyse par séquençage partiel (500 pb) ou total (1 500 pb) de l'ARNr 16S reste une alternative utile que ce soit pour l'identification de bactéries inconnues, ou pour celles au profil biochimique ambigu ou encore pour l'identification des bactéries à croissance lente et pour lesquelles des techniques d'identification spécialisées sont nécessaires. Cependant, l'identification précise d'un microorganisme par séquençage dépendra de la soumission des séquences dans les

bases de données qui sont accessibles au public. En effet, une base de données de qualité contrôlée est essentielle dans le cadre de l'identification de microorganismes.

#### **4-1-2 L'identification bactérienne par séquençage des gènes domestiques (Housekeeping Gene HKG)**

Les gènes domestiques, ou gènes de ménage (housekeeping genes), codent principalement pour des protéines essentielles aux fonctions indispensables à la vie de tous les types de cellules. Ils existent en un seul exemplaire chez pratiquement tous les microorganismes et présentent une grande diversité intra-spécifique.

Cette caractéristique a fait que ces gènes sont considérés comme un outil de choix dans les expériences de typage moléculaire (Multi-Locus Sequence Typing : MLST) (Maeda *et al.*, 2000). Ils permettent d'obtenir un résultat rapide, précis et fiable dans l'identification des souches très proches. Ceci présente une grande importance dans le domaine thérapeutique (identification des souches pathogène appartenant à la même espèce) (Maeda *et al.*, 2000). Les gènes de ménage sont généralement de petite taille quoique celle-ci est très variable, notamment d'une espèce à une autre. Par exemple, pour le gène *pdhC* (codant pour la pyruvate déshydrogénase), alors que la taille de celui-ci est de 1239 paires de base (pb) au sein de *Staphylococcus aureus* (Forsyth *et al.*, 2002) et de 1329 pb chez *Bacillus subtilis* (Kunst *et al.*, 1997), elle n'est que de 480 pb chez *Neisseria meningitis* (Maeda *et al.*, 2000).

Le gène *hsp65* constitue une cible intéressante selon des études publiées concernant *Mycobacterium*. Rodriguez-Nava *et al.* (2007) ont décrit une nouvelle technique moléculaire pour la différenciation et l'identification de 43 espèces de référence du genre *Nocardia* par amplification et séquençage d'un fragment de 440 pb du gène *hsp65*. L'intérêt du séquençage de ce gène chez le genre *Nocardia* a été évalué en le comparant à celui codant l'ARNr 16S. Ils ont calculé une matrice des distances évolutives afin d'évaluer le polymorphisme inter-espèces de chaque cible génétique, et observé une variabilité inter-espèces de l'ordre de 88 % à 100 % de similarité de séquence avec 93,7 % en moyenne pour le gène *hsp65* et de 90,5 % à 100 % de similarité de séquence avec 94,8 % en moyenne pour le gène codant l'ARNr 16S. Ces résultats montrent l'intérêt du séquençage de *hsp65* ; sa capacité discriminante plus élevée permet de différencier des espèces possédant une molécule d'ARNr 16S

identique. L'étude d'autres marqueurs génotypiques, comme les gènes *hsp65*, *rpoB*, *recA*, *sod* et *gyrB* (utilisés pour l'identification des mycobactéries), pourrait être envisagée pour résoudre certains problèmes de différenciation d'espèces au sein du genre *Nocardia* (Rodriguez-Nava *et al.*, 2007).

En pratique le choix de ces différents gènes ménagers est variable. Nous devons choisir des gènes appartenant à des classes fonctionnelles différentes. Aussi de choisir un gène dont l'expression est constante dans les conditions expérimentales testées. En fait, il est parfois nécessaire de tester un panel de gènes ménagers pour choisir celui qui n'est pas régulé par les conditions expérimentales.

## **4-2 La spectrométrie de masse**

La technique *Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation Time Of Flight* (MALDI-TOF) est une technique en plein essor mise au point au début des années 2000. Elle permet à partir d'un spectre des protéines ribosomales et membranaires d'identifier les microorganismes par comparaison à une base de données (Gravet *et al.*, 2010).

En effet, la spectrométrie de masse est une technique ancienne dont la première description du principe par Thompson remonte à 1899. Elle fut largement utilisée dans les laboratoires de chimie ou de physique à partir du milieu du XX<sup>e</sup> siècle. Il s'agit d'une technique physique d'analyse fondée sur la séparation de molécules transformées en ions, en fonction de leur rapport  $m/z$  (où  $m$  = masse et  $z$  = charge). Elle est dorénavant utilisée dans pratiquement tous les domaines scientifiques (physique, astrophysique, chimie organique, chimie biologique...). De manière récente et suite à l'enrichissement des bases de données, elle est maintenant utilisée dans les laboratoires de biologie médicale.

### **4-2-1 Historique**

Chronologiquement, cette technique a concerné en premier lieu la cancérologie, les modifications étant le reflet des anomalies de fonctionnement cellulaire (Vercoutter-Edouart *et al.*, 2001). Elle s'est ensuite étendue à l'étude et surtout à l'identification des organismes unicellulaires, en se basant sur le fait que chaque espèce possède son propre protéome. Une fois les protéomes connus et répertoriés, ils sont saisis dans une banque de données de référence. D'abord utilisée en

bactériologie (Fastner *et al.*, 2001) ou en parasitologie (Papadopoulos *et al.*, 2004) la SM MALDI-TOF s'est ensuite appliquée aux levures, en complément, voire en alternative aux méthodes conventionnelles de diagnostic d'espèce, à partir des cultures et même, récemment à partir de flacons d'hémoculture (Desoubeaux *et al.*, 2010).

Les premiers travaux sur l'étude de bactéries entières datent de 1975. Ils ont mis en évidence les capacités de l'analyse par spectrométrie de masse et principalement celles de la spectrométrie de masse MALDI-TOF pour détecter les protéines de masses importantes à partir de souches d'*Escherichia coli* (Chong *et al.*, 1997) et la caractérisation de microorganismes (Fenseleau et Demirov, 2001) en vue d'études taxonomiques (Lay, 2000 et 2001).

#### **4-2-2 Principe**

L'échantillon biologique est d'abord mélangé à une matrice dont la nature acide favorise l'ionisation des composés. Le choix de la matrice dépend du type de molécule que nous souhaitons mettre en évidence (peptides, protéines, hydrates de carbone). Le mélange matrice-échantillon est ensuite déposé sur une surface métallique appelée « cible MALDI » par évaporation où des microcristaux sont formés : ils contiennent les molécules de l'échantillon dans une phase solide. La cible MALDI est placée dans le spectromètre et chaque dépôt est alors soumis à 1000 tirs aléatoires du LASER à l'azote pulsé. Sous l'effet du LASER (337 nm, 20 Hz), les biomolécules sont désorbées du mélange et protonées ou déprotonées. Les ions formés sont accélérés par un champ électrique homogène de 19 kV et pénètrent dans le tube de vol, long de 1 m. Ils poursuivent alors leur trajectoire de façon rectiligne, sous vide, grâce à la vitesse acquise au cours de la phase d'accélération, et viennent impacter le détecteur. Le temps de vol, ou durée nécessaire pour atteindre le détecteur, est proportionnel à la masse et à la charge de l'ion. Plus un ion sera lourd, c'est-à-dire plus son rapport  $m/z$  sera élevé, plus il sera lent. L'interface informatique, pilotée par des logiciels logarithmiques, convertit le signal correspondant aux ions impactés en grandeurs électriques, représentées par des pics sur un graphique. L'ensemble des pics obtenus forme le « spectre » du mélange. La résolution de l'appareil représente sa faculté à distinguer deux pics de rapport  $m/z$  proche. Elle est d'autant meilleure que tous les ions de même nature, donc de même masse, arrivent dans un temps le plus court au niveau du

détecteur, formant un pic étroit. Ainsi, la spectrométrie de masse est une méthode d'analyse qui permet la détermination de la masse moléculaire des composés analysés, ainsi que leur identification et leur quantification.

L'identification rapide des microorganismes par MS-MALDI-TOF repose sur l'analyse des protéines ribosomales et des protéines associées aux membranes ; elle passe par une comparaison des spectres obtenus avec des spectres de référence validés (Ingrand, 2012).

#### **4-2-3 Application de la spectrométrie de masse au laboratoire de microbiologie**

La spectrométrie de masse de type MALDI TOF est à l'origine d'une véritable révolution dans les laboratoires de microbiologie. Elle s'avère facile à utiliser, moyennant une bonne formation, et nécessite peu de matériel biologique. Elle est économique, peu coûteuse hors achat de l'appareil (une identification qui revient environ à 3 euros contre 5 à 14 euros par les techniques d'identification traditionnelles). Outre sa facilité d'utilisation et sa fiabilité, elle permet en quelques minutes et à partir d'une fraction de colonie, d'obtenir l'identification d'une bactérie sur la base de son profil protéique (Émile, 2012). Elle nécessite peu de matériel biologique, ce qui est un atout majeur pour les espèces à croissance difficile et les germes fastidieux (par exemple : *Campylobacter*). Elle permet d'identifier plus de 90 % des souches au laboratoire sans test complémentaire (Émile, 2012) générant ainsi une diminution du temps de réponse des identifications bactériennes et une amélioration notable de la prise en charge des patients.

Gravet *et al.*, (2010) ont pu identifier en routine, par spectrométrie de masse, des microorganismes qu'ils auraient identifié en plusieurs jours, voire pour lesquels une identification par biologie moléculaire, notamment le séquençage de l'ARN 16S aurait été la seule technique d'identification concluante.

Le gain de temps réalisé est encore plus important pour les espèces à croissance fastidieuse ou d'identification difficile (Martiny et Vandenberg, 2012) avec un moindre recours à la biologie moléculaire (Gravet *et al.*, 2011). Cependant, des progrès doivent encore être faits pour certains types de microorganismes notamment les anaérobies et les mycobactéries (Justesen *et al.*, 2011).

Les performances de la spectrométrie de masse (SM) en microbiologie sont satisfaisantes, avec des résultats de bonne identification dans 84 à 95 % des cas. Les systèmes disponibles sur le marché sont Vitek ® MS Biomérieux et Microflex ® Bruker (Émile, 2012).

Au niveau des performances, les publications font état d'au moins 90 % de concordance avec les méthodes d'identifications conventionnelles.

Comparées aux techniques classiques, les identifications donnent globalement de très bons résultats pour les bacilles à coloration de Gram négative (*E. coli*, *Klebsiella*) et les cocci à coloration de Gram positive (staphylocoque doré et entérocoques). Les résultats sont plus mitigés pour les streptocoques non hémolytiques et il est difficile de distinguer les pneumocoques de *Streptococcus mitis/oralis*. De même, la différenciation entre les bactéries du genre *Shigella* et *E. coli* n'est parfois pas possible, ne posant toutefois pas de problème majeur en routine, mais devant être prise en compte lors de la validation des résultats des coprocultures (Émile, 2012).

#### **4-2-4 Conclusion**

Le MALDI-TOF en bactériologie est une technique rapide, économique, nécessitant peu de matériel biologique. Plus de 90 % des souches sont identifiées au laboratoire sans test complémentaire.

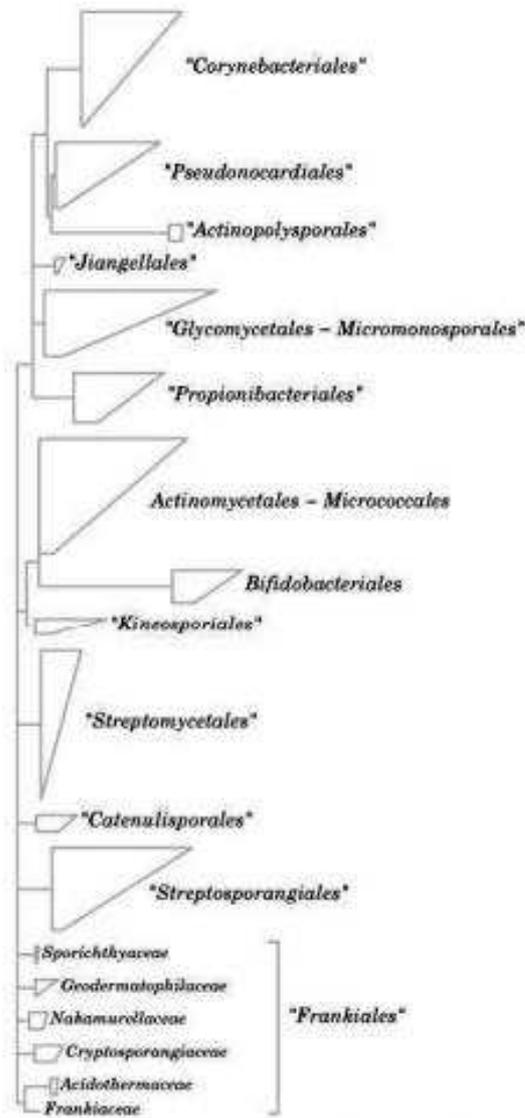
Plusieurs pistes de développement sont actuellement explorées : utilisation de la SM pour l'identification de germes directement à partir des flacons d'hémoculture, identification des mycobactéries et des germes anaérobies, application dans le futur au typage bactérien et à la mise en évidence de mécanismes de résistance. Ces nouveaux développements devaient élargir son utilisation (Émile, 2012).

Cependant, ces tests ont aussi leurs limites, et leurs performances analytiques doivent être connues, afin de les intégrer dans une stratégie de diagnostic globale, adaptée au contexte local.

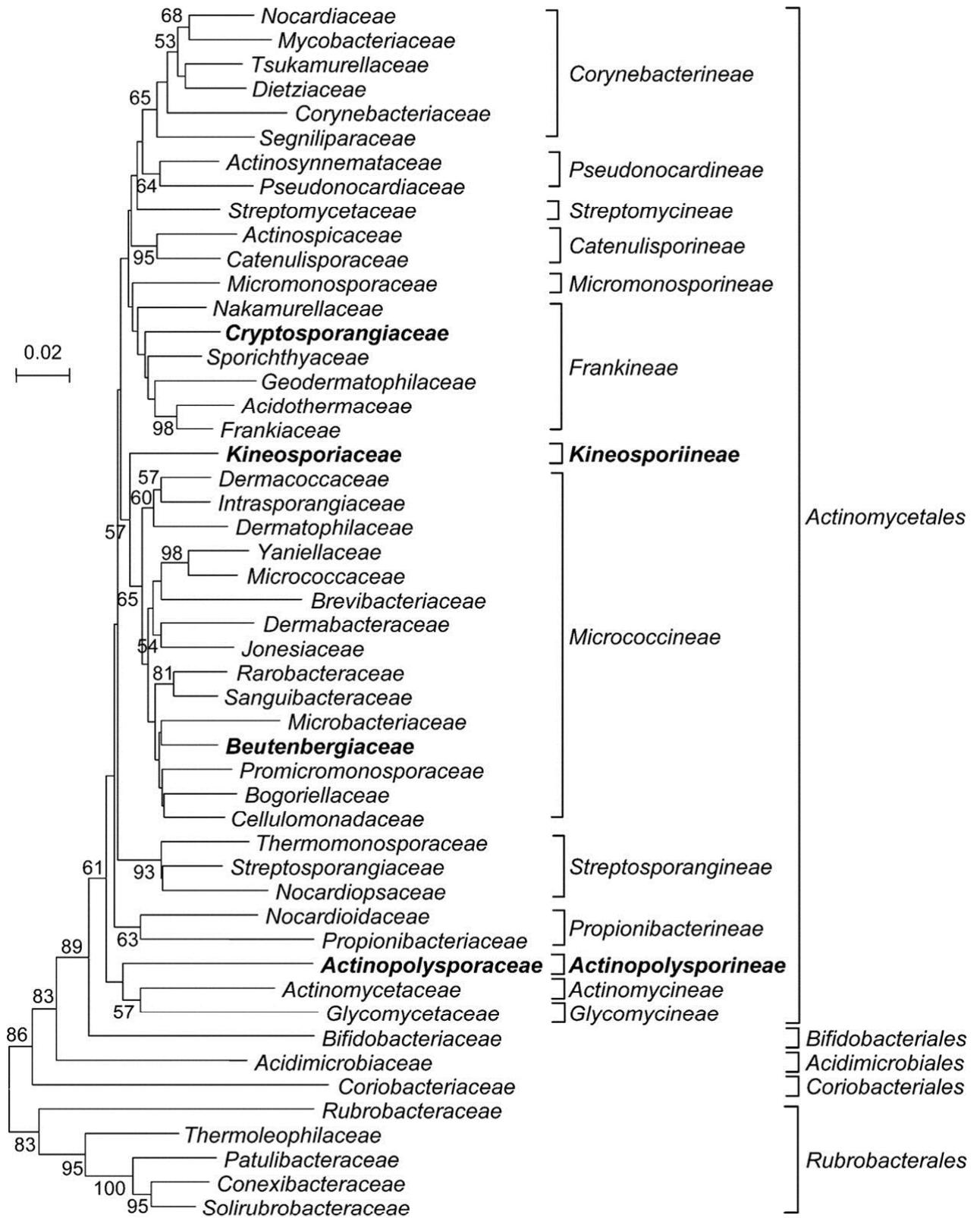
### **5°/ Classification des actinomycètes**

En 2012 le Bergey's manual of systématique bacteriology a consacré tout le volume cinq (V) au phylum *Actinobacteria*. Cette classification a pour but de refléter la phylogénie des *Actinobacteria* pour les taxons d'un rang hiérarchique supérieur au

genre, elle est basée principalement, voire exclusivement, sur les séquences des ADNr 16S (figures 5, 6). Dans ce volume du Manuel, le phylum *Actinobacteria* comprend cinq classes, 19 ordres, 50 familles et 221 genres (annexe 2). Cependant, de nombreux nouveaux taxons continuent d'être découverts donc cette liste est inévitablement incomplète (Ludwig *et al.*, 2012).



**Figure 5** : Ordres de la classe des *Actinobacteria* (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2012)



**Figure 6** : Phylogénie du phylum *Actinobacteria* (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2012)

## 1°/ Isolement des actinomycètes à partir des prélèvements clinique

### 1-1 Les prélèvements

L'étude a été réalisée entre Mars 2009 et Août 2010, sur des prélèvements provenant de patients suspectés d'être atteints de tuberculose. Elle a porté sur un total de 3682 prélèvements (tableau 4) réceptionnés au niveau de l'unité de la tuberculose du laboratoire de Bactériologie du Centre Hospitalo-Universitaire Benbadis de Constantine.

**Tableau 4** : les prélèvements étudiés pour l'isolement des actinomycètes.

Type de prélèvements	Prélèvements	Nombre prélèvements
Prélèvements contaminés	Crachats	3037
	Urines	280
	Pus	43
	Sang de règles	7
	Sperme	2
	Adénite suppurée	1
	Prélèvements inguinale	5
Prélèvements non contaminés	Liquide pleural	157
	Ascite	72
	Liquide céphalo-rachidien	32
	Liquide articulaire	20
	Prélèvement cutané	3
	Biopsie	3
	Lavage broncho-alvéolaire	3
	Ponction trachéal	2
	Ganglion cervical	2
	Aspiration bronchique	2
	Drain thoracique	2
	Kyste	2
	Myeloculture	1
	Suppuration ganglionnaire	2
	Epanchement péricardique	1
Abcès du psoas	1	
TOTAL		3682

## **1-1-1 Prélèvements contaminés**

### ***1-1-1-1 Les prélèvements respiratoires non protégés***

Il s'agit de crachats et/ou expectorations (CRA), d'aspirations bronchiques (AB), d'aspirations trachéales (ATR) et de tubage gastrique. Il est nécessaire d'examiner ces prélèvements afin d'évaluer, la contamination salivaire, donc la validité des prélèvements, ainsi que leur purulence. Si le prélèvement est spumeux, il est impropre à l'analyse bactériologique. Par contre, le prélèvement est étudié, s'il est purulent ou mucopurulent. Les prélèvements sont réalisés, si possible, dans l'heure qui suit le lever des patients (la remobilisation du malade après une nuit de sommeil aide à la production d'expectoration de bonne qualité) avant antibiothérapie et après rinçage de la bouche au sérum physiologique stérile. Les prélèvements sont recueillis dans des pots stériles et acheminés rapidement au laboratoire (conservation possible de ces prélèvements 48 h à + 4°C).

***1-1-1-2 Les urines*** : il s'agit de la totalité des urines du matin recueillie stérilement et concentrée par centrifugation à 4 000 g dans un nombre suffisant de tubes Falcon. Le culot est mis en suspension dans 1 ml de surnageant.

***1-1-1-3 Autres prélèvements*** : pus d'abcès ouverts d'adénite suppurée, de collection inguinale, de sperme et de sang de règles.

## **1-1-2 Prélèvements non contaminés**

***1-1-1-1 prélèvements internes*** : il s'agit de prélèvements normalement stériles, ce sont les liquides pleuraux (LP), les liquides céphalorachidiens (LCR), l'ascite, les pus d'abcès fermés, la moelle osseuse, les kystes du sein, l'abcès du psoas, liquide synovial, etc. Les liquides clairs sont centrifugés pendant 30 mn à 1500 g. Les culots sont suspendus dans quelques gouttes de surnageant.

***1-1-1-2 Les prélèvements respiratoires protégés*** : les lavages broncho-alvéolaire (LBA), les brossages bronchique (BB) et les ponctions trachéale (PTT).

***1-1-1-3 Les tissus*** : ce sont des biopsies ganglionnaires, pulmonaires ou autres. Elles sont acheminées rapidement au laboratoire, immergées dans du sérum physiologique stérile, ou humidifiées. Elles sont dilacérées et broyées stérilement. La moitié du

prélèvement est diluée au ¼ et l'autre est soumise à une décontamination fluidification. Les mycobactéries sont recherchées sur les deux échantillons.

**1-1-1-4 Les cathéters** : une portion de 5 cm du cathéter est recueillie dans un tube stérile qui doit parvenir au laboratoire dans les plus brefs délais pour éviter un dessèchement excessif. Le cathéter est immergé en bouillon nutritif ou en sérum physiologique, « vortexé » 30 sec. à 1 minute.

## 1-2 Traitements des prélèvements

L'isolement des mycobactéries à partir de produits pathologiques contaminés nécessite la mise en œuvre de procédés de décontamination susceptibles de concilier une action énergique vis-à-vis de la flore d'accompagnement et une agressivité très faible vis-à-vis des bacilles acido-alcool-résistants. Le choix du traitement des produits pathologiques en vue de l'isolement des mycobactéries est fonction de la nature même de ces produits.

Pour la décontamination des échantillons :

- d'expectorations, la méthode à la soude utilisée est celle de Pétroff. Deux volumes de prélèvement sont mis dans un tube conique stérile, auxquels sont ajoutés deux volumes de solution de NaOH à 4% (annexe 3) en présence du bleu de bromothymol comme indicateur de pH coloré. Après agitation puis incubation dans une étuve à 37°C pendant 30 minutes, l'action de la solution de décontamination est stoppée par l'addition d'une solution d'acide sulfurique (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 15% annexe 3) jusqu'à neutralisation. Le mélange est ensuite centrifugé à 4 000 g pendant 20 minutes. Le culot est utilisé pour l'examen direct et la mise en culture.
- des écouvillons laryngés ou les pus d'abcès ouvert, 4 ml d'acide sulfurique à 4% sont ajoutés dans le tube à écouvillon. Après dix minutes d'action une neutralisation est réalisée par addition de 3,5 ml de NaOH à 6% (annexe 3).
- des biopsies, après broyage, il faut laisser agir l'acide sulfurique à température ambiante du laboratoire pendant 15 minutes en présence de quelques gouttes de bromothymol. La neutralisation est obtenue avec du NaOH à 6%.

## 1-3 Recherche de BAAR à l'examen direct

### 1-3-1 Préparation des frottis

À partir des prélèvements éventuellement traités et enrichis, le frottis est confectionné par étalement homogène, d'une faible épaisseur sur une surface de 2 cm<sup>2</sup>, ce qui permet une coloration optimale. Pour les urines et les liquides de ponctions, le culot est utilisé. Seul le LCR souvent en volume réduit est étalé sous forme de gouttes déposées et séchées sur le même endroit.

Les lames sont ensuite séchées et fixées sur une plaque chauffante électrique pendant deux heures à 65 °C.

### 1-3-2 Coloration de Dugommier à l'auramine

Après 10 minutes de contact à froid avec l'auramine, les frottis sont lavés puis décolorés 3 minutes par un mélange acide-alcool. Les lames sont lavées une deuxième fois et contre-colorées par la solution de permanganate de potassium et égouttées (annexe 3). Les mycobactéries prennent un aspect jaune-vert brillant et se détachent sur un fond rouge. La lecture se fait avec un microscope à fluorescence, à l'obscurité, à l'objectif x40. Toutes les lames qui présentent des résultats positifs sont colorées une deuxième fois par la coloration de Ziehl-Neelsen pour confirmer la présence des bacilles du complexe tuberculeux. Cette coloration est sensible mais longue (15 minutes par lames).

L'examen direct est important, il permet une réponse rapide, sa positivité signe la gravité de la pathologie ; dans le cas de prélèvements externes et de tuberculose, il signe la contagiosité du patient.

**Nota-béné :** les prélèvements correspondants aux lames considérées comme lames faiblement, moyennement ou fortement positive vis-à-vis de la présence des bacilles du complexe tuberculeux (annexe 3) sont exclus des cultures pour la recherche des actinomycètes.

### 1-3-3 Coloration de Ziehl-Neelsen

Cette méthode utilise la fuschine comme colorant, le phénol permettant une meilleure fixation de celle-ci à chaud. La décoloration est ensuite assurée par un acide fort concentré comme l'acide sulfurique à 25 %, et de l'éthanol à 94 °C. Le bleu de

méthylène est employé comme contre-colorant (annexe 3). La lecture se fait au microscope à transmission optique à l'objectif d'immersion.

## **1-4 stratégie d'isolement des actinomycètes**

L'isolement des actinomycètes a été réalisé en deux périodes selon deux protocoles différents. La première période a duré huit mois où nous avons adopté le protocole utilisé dans l'unité de la tuberculose suivi d'une purification sur le milieu de Bennett. Durant la deuxième période d'isolement qui a duré onze mois nous avons opté pour un autre protocole d'isolement élaboré par nos soins.

### **1-4-1 Isolement des actinomycètes selon le premier protocole**

#### **1-4-1-1 Les prélèvements**

Tous les prélèvements reçus au niveau de l'unité ont été utilisés (pulmonaire ou non). Dans le cas des prélèvements récoltés des sites non contaminés, la mise en culture est effectuée directement sans prétraitement. Quant aux prélèvements récoltés de sites contaminés ils ont été au préalable décontaminés et fluidifiés (*cf* 1-2 traitements des prélèvements) pour ensuite être mis en culture.

#### **1-4-1-2 La mise en culture**

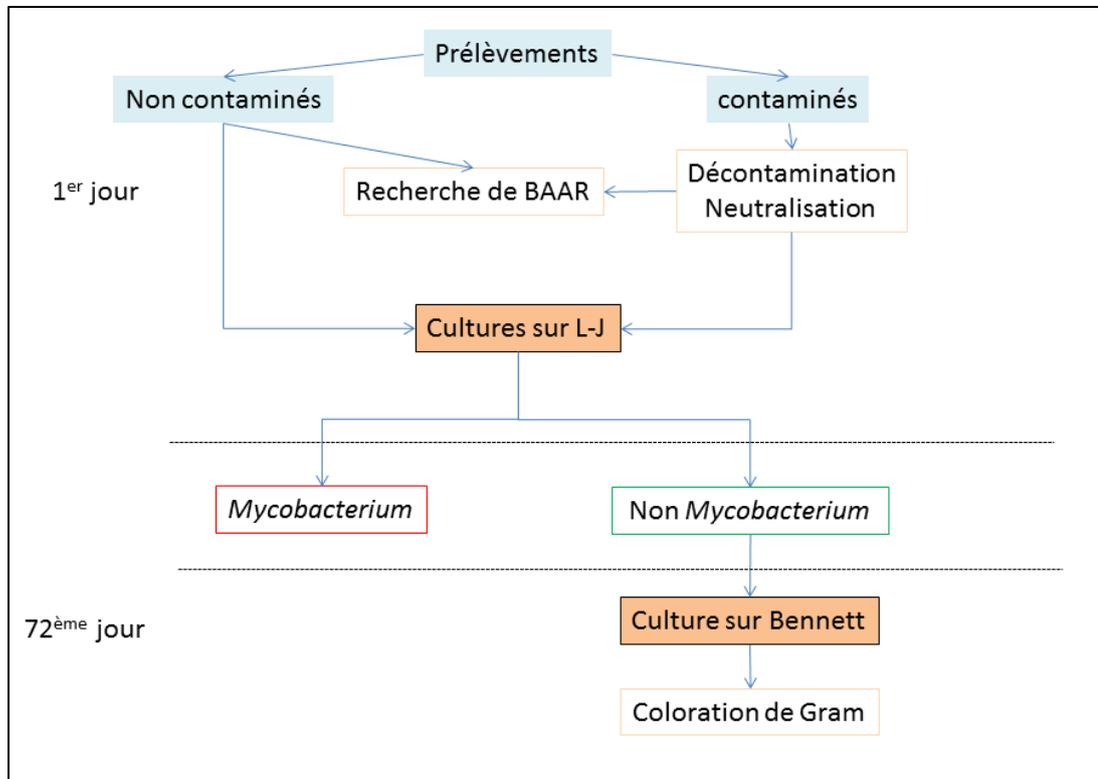
Les prélèvements sont mis en culture sur le milieu Lowenstein-Jensen (L-J) composé de sels minéraux, de glycérol, d'œuf et de vert de malachite. L'œuf permet la neutralisation des agents de décontamination encore présents dans le culot de décontamination.

Le milieu (L-J) permet la croissance du plus grand nombre d'espèces de mycobactéries par rapport aux autres milieux utilisés (Coletsos et BO Colestos). Ces derniers favorisent la croissance des mycobactéries les plus exigeantes ou micro aérophiles (*M. bovis*, *M. africanum*).

L'ensemencement se fait par inondation à travers le bouchon à raison d'un tube par prélèvement pour les prélèvements pulmonaires et deux tubes pour les autres prélèvements. Les tubes sont disposés sur des portoirs adaptés en position horizontale légèrement inclinée, le bouchon vers le haut, puis incubés à 37 °C.

Les premiers jours, les bouchons sont légèrement dévissés pour que le liquide résiduel s'évapore, par la suite ils sont revissés. Chaque tube est observé au moins deux fois par semaine jusqu'au 72<sup>ème</sup> jour d'icubation.

Dans le cas d'**absence** de bactéries appartenant au genre *Mycobacterium*, toute colonie présente sur le milieu L-J est **repiquée** et **purifiée** par la technique des stries sur le milieu Bennett coulé en boîtes (figure 7) afin de **chercher** cette fois-ci les bactéries actinomycétales. Les boîtes sont ensuite incubées à 28°C et examinées quotidiennement pendant deux mois.



**Figure 7** : isolement des actinomycètes selon le premier protocole.

## 1-4-2 Isolement des actinomycètes selon le deuxième protocole

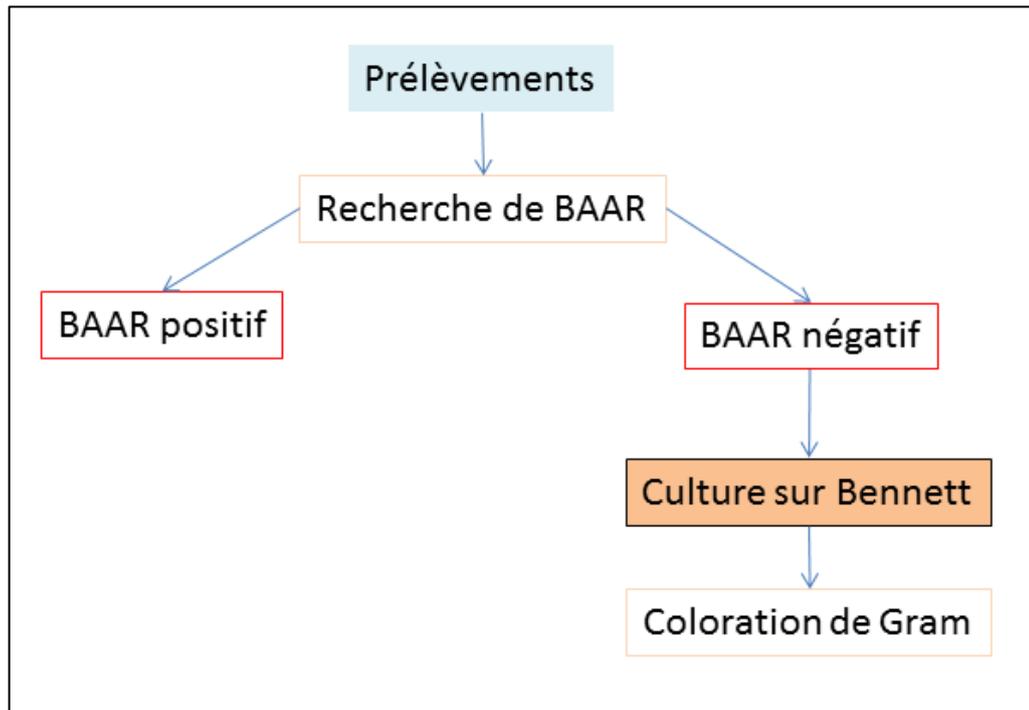
### 1-4-2-1 Les prélèvements

Seuls les prélèvements non pulmonaires, excepté l'urine, ont été étudiés. L'étape de la décontamination et de la neutralisation (*cf* 1-2 traitements des prélèvements) précédant la mise en culture des prélèvements contaminés a été supprimée (figure 8).

### 1-4-2-2 La mise en culture

Tous les prélèvements sont ensemencés par inondation, directement sur le milieu de Bennett coulé en boîtes de Pétri. Les cultures sont incubées à 28°C pendant deux mois et la lecture se fait quotidiennement. Les colonies actinomycétales sont repérées

d'après leur aspect macroscopique. Leur appartenance à ce groupe est confirmée par examen microscopique après coloration de Gram.



**Figure 8** : isolement des actinomycètes selon le deuxième protocole.

## 2°/ Caractérisation morphologique des isolats actinomycétales

Les souches actinomycétales sont soumises à une étude des différents caractères morphologiques, cultureux et physiologiques dans le but de leur caractérisation.

### 2-1 Préparation de l'inoculum

Les souches d'actinomycètes, conservées sur gélose inclinée de Bennett, sont ensemencées sur le milieu gélosé ISP<sub>3</sub> de *l'International Streptomyces Project* (annexe 4). Les boîtes sont incubées à 30°C pendant 14 jours. À partir des cultures obtenues, des suspensions denses de fragments mycéliens et de spores sont préparées dans des flacons contenant de l'eau distillée stérile. Elles vont servir d'inoculum pour l'ensemencement de tous les milieux utilisés.

### 2-2 Caractères morphologiques et cultureux

Les caractères morphologiques et cultureux sont déterminés sur des milieux de culture spécifiques (annexe 4) : ISP<sub>1</sub>, ISP<sub>2</sub>, ISP<sub>3</sub>, ISP<sub>4</sub> et ISP<sub>5</sub> (Shirling et Gottlieb, 1966), le milieu Glucose Asparagine et le milieu Sporulation Agar. Les milieux sont

coulés dans les boîtes de Pétri 36 heures avant leur utilisation, afin de diminuer l'humidité à la surface de la gélose et de contrôler leur stérilité. Ils sont ensuite ensemencés par stries à partir d'une goutte de l'inoculum déposée en bordure de la gélose. L'évaluation de l'importance de la croissance et du développement des mycélia sur chaque milieu est observée après 7, 14 et 21 jours d'incubation à 30°C. L'observation de la pigmentation, du mycélium secondaire, du mycélium de substrat ainsi que la présence ou l'absence dans la gélose de pigments diffusibles autres que les pigments mélanoïdes, est réalisée en même temps.

### **2-3 Aspect des isolats en microscopie optique**

L'observation *in situ* de la morphologie des chaînes de spores, du mycélium aérien et du mycélium de substrat a été effectuée selon la technique des lamelles décrite par Cross (1989). Cette technique consiste à insérer délicatement une lamelle stérile dans un milieu gélosé (ISP<sub>2</sub>, ISP<sub>3</sub> ou ISP<sub>4</sub>), de manière à former un angle d'environ 45 degrés. Une goutte de l'inoculum est déposée contre la lamelle en contact avec le milieu nutritif. Après 14 jours d'incubation à 30°C, la lamelle est retirée délicatement de la gélose. Elle est ensuite déposée sur une lame et examinée au microscope (Leica DM 2000) les photos sont prises avec un appareil photos (Leica DFC 320) à l'aide du programme Leica application version 3.3.0.

### **2-4 Aspect des isolats en microscopie électronique (Coloration négative)**

Quarante microlitres d'une suspension cellulaire d'une culture en croissance exponentielle est déposée sur une grille de cuivre. Après deux minute de contact, la grille est asséchée au moyen d'un papier filtre. La préparation est colorée en déposant la grille sur une goutte du contrastant (molybdate à 1% ou l'acide phosphotungstique PTA à 2%) pendant 2 à 3 secondes. L'excès du liquide est levé en effleurant le bord de la grille contre du papier filtre. Après séchage de 10 minutes à température ambiante, les grilles sont observées à l'aide d'un microscope électronique à transmission Morgani 268D (Philips) à 60 kV.

## **2-5 Etude physiologique**

### **2-5-1 Production de pigments mélanoides**

La mise en évidence de la production de ces pigments mélanoides (pigments bruns diffusibles) est réalisée par culture des souches sur le milieu ISP<sub>7</sub> (annexe 4). Les résultats sont appréciés après 48 heures d'incubation à 30°C en comparaison avec le milieu témoin non ensemencé, mais incubé dans les mêmes conditions.

### **2-5-2 Tolérance au chlorure de sodium**

Ce test est réalisé sur milieu nutritif contenant 7% (poids/volume) de glycérol. Dans des tubes contenant 10 ml de ce bouillon, nous ajoutons du NaCl jusqu'à atteindre des concentrations en poids/volume de (0 ; 3 ; 5 ; 6 ; 7 ; 9 et 10 %). Après ensemencement, les tubes sont incubés à 30°C pendant 14 jours sous agitation. Un trouble du milieu de culture témoigne de la croissance de la souche. La tolérance maximale au NaCl correspond au dernier tube présentant une croissance (Tresner *et al.*, 1968).

### **2-5-3 Croissance à différentes températures**

Les souches sont ensemencées sur le milieu Bennett, à raison de 3 boîtes de Pétri par souche pour chaque température d'incubation. La croissance est appréciée, après 21 jours d'incubation à 5°C, 20°C, 25°C, 27°C, 30°C, 37°C, 45°C et 55°C.

### **2-5-4 Croissance à différentes concentration de CO<sub>2</sub>**

Les souches sont ensemencées sur le milieu Bennett, à raison de 3 boîtes de Pétri par souche. Les boîtes sont incubées sous atmosphère enrichie en 2%, et 5% de CO<sub>2</sub> et en anaérobiose dans des jarres contenant des sachets CO<sub>2</sub> Gen Compact (Oxoid) pour la création d'atmosphères enrichie en CO<sub>2</sub>. La croissance est estimée pendant 21 jours d'incubation à 30°C.

### **2-5-5 Sensibilité au lysozyme**

Normalement les bactéries à coloration de Gram positive sont sensibles au lysozyme, à l'exception des bactéries qui ont les acides teichoïques ou un peptidoglycane modifié. Le lysozyme est une enzyme qui clive les chaînes polysaccharidiques du peptidoglycane entre l'acide N-acétylmuramique et la N-acétylglucosamine.

La sensibilité des souches aux lysozymes a été effectuée selon la technique préconisée par la DSMZ. Le milieu 5339 DSM (annexe 4) est préparé puis réparti dans des tubes à raison de 5 ml par tube. Une quantité précise, d'une solution de lysozymes à 10 mg/ml stérilisée par filtration à travers des filtres de 0,2  $\mu\text{m}$ , est ajoutée dans chaque tube contenant le milieu 5339 DSM en surfusion pour atteindre des concentrations finales de 10, 25, 50, 75 et 100  $\mu\text{g/ml}$ . Les tubes sontensemencés dans la masse puis coulés dans des boîtes de Pétri de 50 mm de diamètre à raison de trois boîtes par concentration et par souche. Après cinq à dix jours d'incubation à 30°C, la plus grande concentration du lysozyme qui donne une croissance est mentionnée.

### **3°/ Etude de la diversité des actinomycètes isolés**

#### **3-1 Identification moléculaire des souches d'actinomycètes isolées**

##### **3-1-1 Extraction de l'ADN**

L'extraction d'ADN a été réalisée à l'aide de l'automate EZ1 BioRobot de QIAGEN selon le protocole d'extraction avec EZ1 Advanced XL Sample & Assay Technologies. La technique utilisée est celle des particules magnétiques, elle permet d'obtenir un extrait d'ADN de haute qualité. Elle est utile pour une utilisation directe d'amplification ou autre application enzymatique. Le rendement dépend de la souche bactérienne, de la densité, du volume d'échantillon et du volume d'élution. Pour se faire, une suspension cellulaire est préparée dans 100  $\mu\text{l}$  d'eau à qualité biologie moléculaire BioRad, à laquelle sont ajoutés 100  $\mu\text{l}$  de tampon de protéinase K et 20  $\mu\text{l}$  de protéinase K.

Pour nos isolats l'action optimale est obtenue après une nuit de digestion à 56°C. Le tampon ainsi que la protéinase K vont permettre de libérer les acides nucléiques qui sont ensuite capturés par les particules magnétiques. Le complexe est lavé à plusieurs reprises. Le QIAmp Kit (Qiagen) a été utilisé pour l'extraction et la concentration de l'ADN. Lors de l'élution, l'éluat se détache des billes et celles-ci sont capturées par un système d'aimantation qui les retient. Les éluats contenant les ADN génomique sont alors récupérés dans des microtubes stériles et conservés à 4°C.

##### **3-1-2 La PCR**

Chaque souche est identifiée au niveau du genre ou de l'espèce par séquençage d'un fragment  $\geq 1400$  pb du gène ADNr 16S après amplification génique (PCR) à

l'aide du couple d'amorces **fd1** (3'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 5') et **rp2** (3'ACGGCTACCTTGTTAC GACTT 5') (Weisburg *et al.*, 1991).

Dans un tube Eppendorf (Thermo-Stip) de 0,2 ml, et pour un volume réactionnel de 50 µl, 5µl d'extrait d'ADN sont rajoutés à 45 µl de Mix constitué de 1 µl de l'amorce fd1 (Eurogentec), 1µl de l'amorce rp2 (Eurogentec), 5µl des dNTP (Euromedex), 5 µl du tampon de la taq polymérase (Invitrogen), 2 µl de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen), 0,25 µl de la Taq polymérase (Invitrogen) et 30,75 µl d'H<sub>2</sub>O (BioRad). L'amplification est réalisée dans un thermocycleur (Applied biosystems, 2720 thermal cyler) selon le programme suivant : après une dénaturation initiale à 95°C pendant 5 minutes suivi de 45 cycles de PCR à 95°C, 52°C pendant 30 secondes chacun et 72°C pendant 1 minute suivi enfin par une élongation finale à 72°C pendant 7 minutes.

### **3-1-3 L'électrophorèse des produits de PCR**

Après amplification, et afin de s'assurer de la qualité et de la spécificité de l'amplification, les échantillons sont analysés par électrophorèse dans une cuve de type MUPID (Eurogentec) pendant 20 minutes à 135 volts dans un gel d'agarose (Invitrogene) à 1,5 % dans le tampon Tris Acétate EDTA TAE 0,5X, additionné de 0,5 µg/ml de bromure d'éthidium (BET). 7 µl de produit de la PCR sont déposés dans les puits du gel avec 2 µl de tampon de charge (10X Blue Juice invitrogene) en présence d'un témoin de poids moléculaire 100 paires de base (Bench top pGEM DNA Markers Promega). Après migration, le gel est examiné sous lumière ultraviolette (UV) pour repérer les bandes amplifiées et photographiées à l'aide d'un transluminateur à UV.

### **3-1-4 La purification des produits de PCR**

La purification est conçue pour le nettoyage rapide des produits de PCR, elle est réalisée par ultrafiltration suivant les recommandations du fournisseur (Macherey-Nagel). Au cours de la procédure, les produits de PCR sont soumis à une ultrafiltration sur membrane sous vide ou dans une centrifugeuse, les amorces, les dNTP et les sels sont des résidus ainsi éliminés. Les produits de PCR souhaités sont retenus sur la membrane, et récupérés à partir de la membrane après addition d'eau ou de tampon à faible teneur en sel et une courte durée d'agitation. Les fragments de PCR purifiés peuvent être utilisés directement pour de plus amples applications en aval, comme le séquençage. Pour cela 150 µl d'échantillons (50 µl de chaque produit PCR +100 µl d'H<sub>2</sub>O) sont déposés dans les puits d'une plaque (NucleoFast ® 96 PCR Macherey-

Nagel), placée sur un socle approprié. Les résidus sont éliminés sous vide pendant 10 min sous une pression de 24 mm d'Hg. Les produits de PCR purs sont récupérés (après addition de 50 µl d'H<sub>2</sub>O dans chaque puits et agitation pendant 10 min à l'aide d'une table d'agitation horizontale KS 125 *IKA Labortechnik*) et conservés à 4°C.

### 3-1-5 Le séquençage des produits de PCR

La technique de séquençage utilisée est adaptée à celle décrite par Sanger *et al.* (1977). Elle est basée sur l'incorporation de didésoxynucléotides. La polymérase permettant l'amplification du gène d'intérêt est mise en présence d'oligonucléotides non marqués (dNTP) et de didésoxynucléotides (ddNTP) marqués par des fluochromes différents selon leur nature. L'incorporation d'un ddNTP entraîne l'arrêt de l'élongation. Ainsi, on obtient théoriquement des séquences d'ADN de toutes tailles dont le dernier nucléotide est fluorescent. La réaction de séquence utilise la chimie du « BigDye Terminator » (AppliedBiosystem) selon les recommandations du fabricant. La solution commerciale « BigDye Terminator » contient les dNTP, les ddNTP marqués ainsi que l'ADN polymérase.

Le séquençage a été effectué en utilisant trois couples d'amorces (tableau 5). Dans un volume réactionnel de 20µl, sont ajoutés : 1µl d'amorce (5pmol), 3µL du tampon de dilution (BigDye® Terminator v1.1/3.1 Sequencing Buffer 5X), 2µL du Mix réactionnel (BigDye Terminator v1.1 cycle sequecing), 4µl de produit de PCR et 10µl d'H<sub>2</sub>O qualité biologie moléculaire. La PCR pour le séquençage appelée BDV1 s'effectue dans un thermocycleur selon le programme suivant : une dénaturation initiale à 96°C pendant une minute, suivi de 25 cycles de PCR à 96°C pendant dix secondes, 50°C pendant cinq secondes, 60°C pendant trois minutes et enfin 4°C pendant cinq minutes. L'amplification est réalisée dans un thermocycleur (Applied biosystems, 2720 thermal cycler).

Les produits amplifiés sont ensuite purifiés par gel-filtration sur des plaques MultiScreen de Millipore. La résine Sephadex® G50 utilisée permet de dessaler les échantillons et d'éliminer les nucléotides non incorporés et les amorces de PCR en excès. La limite d'exclusion de la résine G50 est d'environ 20 bases. La plaque 96 puits MultiScreen HV (Multiscreen Filter Plates MAHVN4550) est utilisée comme support inerte de la résine G50 (gel sephadex G50 Sigma Aldrich). Les puits de la plaque MultiScreen HV, sont chargés par la résine sèche Sephadex® G-50 Superfine en

utilisant le chargeur de colonne de 45  $\mu$ l comme suit : la résine Sephadex® G-50 est déposée dans chaque puits (45 $\mu$ l) du chargeur de colonne, l'excès de résine est retiré avec une raclette, la plaque MultiScreen HV est alors placée à l'envers sur le chargeur jusqu'au butoir, l'ensemble est enfin retourné. 300  $\mu$ l d'eau ultra pure sont alors ajoutés dans chaque puits contenant de la résine, la plaque est fermée avec son couvercle et laissée 3 heures à température ambiante.

Une fois que les mini-colonnes sont gonflées, la plaque MultiScreen HV est alors placée sur une plaque de micro-titration au format standard 96 puits. L'ensemble est centrifugé 5 minutes à 2600 trs/min pour éliminer l'eau et compacter les mini-colonnes.

Les produits de PCR BDV1 sont déposés au centre des mini-colonnes, ensuite la plaque MultiScreen HV est placée sur une plaque de polypropylène au format standard 96 suivi d'une centrifugation pendant 6 minutes à 2600 trs/min, les filtrats aqueux obtenus contiennent les produits purifiés. Le séquençage est alors réalisé à l'aide d'un séquenceur automatique (ABI-3130xL Genetic Analyser).

**Tableau 5** : les séquences des amorces d'amplification utilisées en BDV1.

Amorces	Séquences
536f	5' CAGCAGCCGCGGTAATAC 3'
536r	5' GTATTACCGCGGCTGCTG 3'
800f	5' ATTAGATACCCTGGTAG 3'
800r	5' CTACCAGGGTATCTAAT 3'
1050f	5' TGTCGTCAGCTCGTG 3'
1050r	5' CACGAGCTGACGACA 3'

f : Forward ; r : Reverse

#### 4°/ L'analyse des séquences

Les électrophorégrammes bruts sous le format chromas ont été analysés et assemblés par le logiciel chromas Pro 1.5 (Technesium Pty Ltd, Tewantin Australie). La séquence consensus obtenue est comparée à d'autres séquences procaryotiques à l'aide du programme BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul *et al.*, 1990) dans le site web de Genbank de la NCBI (National Center for Biotechnology Information) ([www.ncbi.nih.gov/blast/blast.cgi](http://www.ncbi.nih.gov/blast/blast.cgi)) afin d'établir le pourcentage d'identité de la souche d'intérêt avec les espèces les plus proches.

Après avoir aligné les séquences à l'aide du logiciel CLUSTAL W 1.8 (Thompson *et al.*, 1994), les arbres phylogénétiques ont été construits avec le programme Mega version 5 (Tamura *et al.*, 2011) selon la méthode de « Neighborjoining » (Saitou et Nei, 1987). La matrice des distances est calculée selon le modèle Kimura à deux paramètres (Kimura, 1980). Les niveaux de confiance de la topologie des arbres phylogénétiques obtenus ont été estimés par la méthode des analyses de ré-échantillonnage des données avec 1000 répliques.

## **5°/ La chimiotaxinomie de l'isolat 5110**

L'analyse des acides gras, des ménaquinones et des phospholipides de l'isolat 5110 a été effectuée par l'équipe du Dr. S. Verburg du DSMZ (service d'identification de la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Allemagne).

### **5-1 L'analyse des acides gras cellulaires**

Les esters méthyliques d'acides gras sont obtenus à partir de 40 mg de cellules par saponification, méthylation et extraction en utilisant les méthodes décrites par Kuykendall *et al.*, (1988) et Miller, (1982) avec des modifications mineures.

Les mélanges des esters méthyliques d'acides gras sont séparés à l'aide du système d'identification microbienne Sherlock (MIS) (MIDI, Microbial ID, Newark, DE 19711, USA) qui consiste en un chromatographe en phase gazeuse (modèle Agilent 6890N) équipé d'une colonne capillaire de silicone à 5% de phénylméthyl (0,2 mm x 25 m), d'un détecteur à ionisation de flamme (modèle Agilent 7683A), un échantillonneur automatique et un ordinateur HP avec une base de données MIDI (Hewlett-Packard Co., Palo Alto, Californie, USA). Les pics et les noms d'acides gras sont automatiquement intégrés et les pourcentages sont calculés par le logiciel standard MIS (Microbial ID). Les paramètres de chromatographie en phase gazeuse sont les suivants : le gaz porteur est de l'hydrogène ultra-pur ; la pression en tête de colonne est de 60 kPa, le volume d'injection est de 2 µl ; le rapport de fractionnement de la colonne, 100:1; la purge de la pastille souple (septum) est de 5 ml/min, la température de la colonne, est de 170 à 270°C à 5°C/min, la température de l'orifice d'injection, est de 240°C, et la température du détecteur, est à 300°C.

## 5-2 Analyse des quinones respiratoires

L'extraction est réalisée à partir de 100 mg de cellules lyophilisées en utilisant la méthode décrite par Tindall (1990 a, b). Les quinones respiratoires sont extraites à l'aide d'un mélange de méthanol et d'hexane, suivie d'une séparation dans la phase hexane.

Les lipoquinones respiratoires sont alors séparées en différentes classes par CCM sur gel de silice (plaque n° 805023 ; Macherey-Nagel) en utilisant le système de solvant hexane/ méthyl *tert*-butyl éther aux proportions (9:1, v/v). Les bandes absorbant les UV correspondant aux différentes classes de quinones sont grattées de la plaque et analysées par chromatographie liquide à haute performance en phase reverse (HPLC) sur un appareil HPLC analytique LDC (séparation thermique des produits). La colonne HPLC utilisée est de type C18 (2 mm 6125 mm 63 mm ; model RP18 ; Macherey-Nagel). L'élution des molécules est réalisée avec le solvant méthanol/heptane (9:1 v/v). Les lipoquinones sont détectées à 269 nm.

## 5-3 Extraction et analyse des lipides polaires

Les lipides polaires sont extraits, selon la méthode de Bligh et Dyer modifiée, à partir de 100 mg de cellules séchées par congélation en utilisant le système de solvant : chloroforme-méthanol-0,3 % NaCl (dans l'H<sub>2</sub>O) avec les proportions 1:2:0,8 (v/v/v). Le solvant d'extraction est agité pendant une nuit. Les débris cellulaires sont sédimentés par centrifugation, les lipides polaires sont alors récupérés dans la phase chloroformique par ajustement du solvant chloroforme-méthanol-0,3% NaCl (dans l'H<sub>2</sub>O) aux proportions 1:1:0,9 (v/v/v) (Bligh et Dyer, 1959).

Les lipides polaires sont séparés par chromatographie sur couche mince en deux dimensions sur plaques recouvertes d'une mince couche de gel de silice (Macherey-Nagel Art. No 818 135). Le premier sens est développé dans le système de migration : chloroforme-méthanol-eau (65:25:4, v/v/v), et le second dans le chloroforme-méthanol-acide acétique-eau (80:12:15:4, v/v/v/v). Les lipides totaux sont détectés à l'aide d'acide de dodecamolybdo-phosphorique et les groupes fonctionnels spécifiques par le réactif Zinzadze pour les groupes phosphates, par la ninhydrine pour les groupes amines libres, par le periodate-Schiff pour les  $\alpha$ -glycols, par le réactif de Dragendorff pour l'azote quaternaire et par le  $\alpha$ -naphtol-acide sulfurique pour les glycolipides (Tindall *et al.*, 2007).

## 6°/ Mise au point des protocoles rapides pour les analyses de routine au laboratoire clinique

### 6-1 Étude phylogénétique par MLST de l'isolat 1534

#### 6-1-1 L'amplification des gènes domestiques

Quatre gènes de ménage, répartis sur l'ensemble du génome de *Tsukamurella paurometabola*, ont été analysés : *rpoA* (gène codant la sous unité  $\alpha$  de l'ARN polymérase), *rpoB* (gène codant la sous unité  $\beta$  de l'ARN polymérase), *lepA* (gène codant la protéine de liaison du GTP), *ftsZ* (gène codant une protéine responsable de la division cellulaire). Les numéros d'accèsion de ces quatre gènes sont mentionnés dans le tableau 6. Nous avons conçus des couples consensus d'amorces pour l'amplification des quatre gènes de ménage pour les 11 souches du genre *Tsukamurella* et l'isolat 1534 après l'alignement des gènes *rpoB*, *rpoA*, *lepA* et *ftsZ* de *Tsukamurella paurometabola* DSM 20162, *Rhodococcus equi*, *Nocardia farcinica* et *Mycobacterium tuberculosis* (tableau 6).

**Tableau 6** : séquences des amorces des gènes de ménage et leur position sur les gènes correspondant de *T. paurometabola* DSM 20162

Gènes	Amorces	Séquences (5' → 3')	Positions	Taille des gènes	N° d'accèsion des gènes
<i>rpoB</i>	rpoB 1d	GGCACGTTTCATCAACGG	444-461	3513 nt	YP_003645729.1
	rpoB 3r	ACGTTSAGGCACAGCGACTG	3357-3377		
<i>rpoA</i>	rpoA d	ATGCTSATYTCNCAGCGACC	1-20	1059 nt	YP_003648305.1
	rpoA r	TCGGTCTCGGCGTAGTCCTG	1029-1049		
<i>LepA</i>	lepA 1dbis	CACATYGACCACGGSAAAGTC	105-125	1884 nt	YP_003647727.1
	lepA 1r	GCCGCNACGAARGCYTCCTG	1821-1841		
<i>ftsZ</i>	ftsZ 1d	ACCSCCSCGCACAACCTACCT	4-23	1149 nt	YP_003647582.1
	ftsZ 1r	CCGTCGAAGCCSGCSGCGAT	921-941		

**S** : G ou C ; **Y** : C ou T ; **R** : A ou G

Les conditions optimales d'amplification sont obtenues dans un volume réactionnel de 50  $\mu$ l contenant un mix constitué de 2  $\mu$ l de chaque amorce (0,01 nM Eurogentec) et auquel sont ajoutés : 5 $\mu$ l d'extrait d'ADN, 5 $\mu$ l des dNTP (100 mM, Euromedex), 5 $\mu$ l du tampon de la Taq polymérase (10x, Quiagen), 0,25  $\mu$ l de la Taq polymérase Hot Start (5 U/ $\mu$ l, Quiagen) et 30,75  $\mu$ l d'H<sub>2</sub>O (BioRad).

Les amplifications sont réalisées dans un thermocycleur (Applied biosystems, 2720 thermal cycler) selon les programme indiqués dans le tableau 7. Avant le séquençage,

les amplicons ont été analysés par électrophorèse capillaire à l'aide d'un système automatisé QIAxcel en utilisant un kit d'ADN haute résolution QIAxcel (Qiagen Sample and Essay Technology), montrant la taille des amplifiats. Les produits de PCR sont ensuite purifiés et séquencés selon le protocole déjà décrit dans les paragraphes 3-4 et 3-5 en utilisant les couples d'amorces indiquées dans le tableau 8.

**Tableau 7** : programme de PCR utilisé pour l'amplification des gènes de ménage

Couple d'amorces	Programme de PCR
rpoB 1d rpoB 3r	5 min, 95°C ; 35 x (30 sec, 95°C, 30 sec, 62°C, 3 min, 72°C) ; 7 min, 72°C ; ∞, 4°C
rpoA d rpoA r	5 min, 95°C ; 35 x (30 sec, 95°C, 30 sec, 62°C, 1 min, 72°C) ; 7 min, 72°C ; ∞, 4°C
lepA 1dbis lepA 1r	5 min, 95°C ; 35 x (30 sec, 95°C, 30 sec, 63°C, 1 min, 72°C) ; 7 min, 72°C ; ∞, 4°C
ftsZ 1d ftsZ 1r	5 min, 95°C ; 35 x (30 sec, 95°C, 30 sec, 62°C, 1 min, 72°C) ; 7 min, 72°C ; ∞, 4°C

**Tableau 8** : séquences des amorces utilisées dans le séquençage des gènes de ménage.

Genes	Amorces	Séquences (5' → 3')	[nmol]	Tm °C
rpoB	Rpob1d	GGCACGTTCATCAACGG	51,0	62
	Rpob1r	CGGTACGGSGTYTCGATGAA	132,2	66
	Rpob2d	TACGGCCG5ATGTGCCCGAT	308,5	62
	Rpob2r	CG5CGCGGMACRCCGTGGGT	439,3	68
	Rpob3d	AACAAGGGYGT5RTC GGCAA	444,6	58
	Rpob3r	ACGTTSAGGCACAGCGACTG	128,6	64
	Rpob4d	CGGAGCAGCTGACSTACATG	43,9	64
	Rpob4r	CGGTGGCCGAAGTGGTCGAT	46,1	64
	Rpob5d	CCTGCGSAAGTTCGCGCG	121	62
	Rpob5r	GTGCAGGGKCCGTCGGCCAG	55,9	74
rpoA	rpoA Tsu d	ATG CTS ATY TCN CAG CGA CC	50,3	62
	rpoA Tsu r	TCG GTC TCG GCG TAG TCC TG	57,5	66
	rpoA Tsu 2d	AGC ACG GGC GAG TAG ATC GA	48,4	64
	rpoA Tsu 1R	CTC GAG ATC GAG CTC GTC GTC	20,4	53
lepA	lepA Tsu 1dbis	CAC ATY GAC CAC GGS AAG TC	130,5	66
	lepA Tsu r	GCC GCN ACG AAR GCY TCC TG	125,9	70
	lepA Tsu 2d	TSC GYG TGG TCG ACG GCA AG	148,3	70
	lepA Tsu 2r	AGA AGT CGA AGA TGA TCT CG	52,0	58
	lepA Tsu 3d	GAG NTS GGS GGC ATG GAC TA	25,8	64
ftsZ	ftsZ Tsu 1d	ACC SCC SCG CAC AAC TAC CT	144,7	66
	ftsZ Tsu 1r	CCG TCG AAG CCS GCS GCG AT	141,3	70
	ftsZ Tsu 1ter	TCG GCG AAG TCG ACG TTG AT	68,8	62
	ftsZ Tsu 2d	GTS CAG GGCATC ACC GAC CT	172	66
	ftsZ 44118 d	GTC CAG GGC ATC ACC GAT CT	101,6	64

S : G ou C ; Y : C ou T ; N : A ou T ou C ou G ; K : G ou T ; R : A ou G ; M : A ou C

Les électrophorégrammes bruts des quatre gènes de ménage sous le format chromas ont été analysés et assemblés par le logiciel chromas Pro 1.5 (Technesium Pty Ltd, Tewantin Australie). Les séquences consensus obtenues sous le format FASTA sont traduites en séquences d'acides aminés des protéines correspondantes sur le site web (<http://www.fr33.net/translator.php>).

### **6-1-2 L'analyse phylogénétique**

L'alignement multiple des séquences nucléotidiques des cinq gènes *ADNr 16S*, *rpoA*, *rpoB*, *lepA*, et *ftsZ* des onze souches du genre *Tsukamurella* et l'isolat 1534, ainsi que les séquences d'acides aminés a été réalisé à l'aide du logiciel Clustal W (Thompson *et al.*, 1994). Les arbres phylogénétiques ont été construits en utilisant le programme Mega 5 (Tamura *et al.*, 2011) avec la méthode de Neighbour Joining appliquée aux distances à 2 paramètres de Kimura (Kimura, 1980). La fiabilité de la topologie a été évaluée par la méthode des bootstraps en réalisant 1000 réplicats. Les séquences obtenues à partir de la souche *Rhodococcus opacus* B4 ont été utilisées pour l'ancrage des arbres.

## **6-2 Profilage des espèces type du genre *Tsukamurella* par MALDI-TOF et validation d'une banque**

### **6-2-1 Préparation du matériel biologique**

#### **6-2-1-1 Préparation des cellules**

Les onze espèces type du genre *Tsukamurella* ainsi que l'isolat 1534 (tableau 9) sont cultivées sur le milieu gélosé Bennett pendant 24 à 48h (culture en phase exponentiel) et incubées à leur température optimale. Les cellules sont récupérées dans des tubes Eppendorf contenant 1 ml de Dulbecco Phosphate Buffer Saline (DPBS) stérile, homogénéisées par pipetage puis centrifugées et les surnageant sont jetés. Le matériel biologique est ensuite lavé de la même manière deux fois avec de l'eau déminéralisée stérile (H<sub>2</sub>O qualité HPLC).

Afin d'inactiver les cellules, 15 à 20 mg de culture bactérienne de chaque souche sont mises en suspension dans des tubes Eppendorf contenant 300 µl d'eau HPLC. Neuf cent microlitre d'éthanol absolu sont rajoutés et le mélange est vortexé (la suspension peut alors être stockée à -18°C et conservée jusqu'à 6 mois).

**Tableau 9:** les espèces type du genre *Tsukamurella* de la collection DSM

Espèces type du genre <i>Tsukamurella</i>	Référence DSM	Température optimale	Références
<i>T. paurometabola</i>	20162	28	Collins M. D. <i>et al.</i> , 1988
<i>T. inchonensis</i>	44067	37	Yassin A. F. <i>et al.</i> , 1995
<i>T. pulmonis</i>	44142	28	Yassin A. F. <i>et al.</i> , 1996
<i>T. tyrosinosolvans</i>	44234	28	Yassin A. F. <i>et al.</i> , 1997
<i>T. strandjordii</i>	44573	28	Kattar M. M. <i>et al.</i> , 2001
<i>T. sunchonensis</i>	45335	28	Seong C.N. <i>et al.</i> , 2003
<i>T. spumae</i>	44113	28	Nam S.W. <i>et al.</i> , 2003
<i>T. pseudospumae</i>	44118	28	Nam S.W. <i>et al.</i> , 2004
<i>T. spongiae</i>	44990	28	Olson J. B. <i>et al.</i> , 2007
<i>T. carboxydivorans</i>	45557	28	Park S. W. <i>et al.</i> , 2009
<i>T. soli</i>	45046	28	Weon H. Y. <i>et al.</i> , 2010

### 6-2-1-2 Préparation des extraits protéiques

La méthode de préparation par extraction permet de caractériser les organismes difficiles qui ne donnent pas de résultats avec la procédure de dépôt direct.

Après une centrifugation de 2 minutes à 13000g, les surnageants sont rejetés. Pour éliminer au maximum la solution alcoolique, les culots sont à nouveau centrifugés 30 secondes à 13000 g et les surnageants sont ôtés à l'aide d'une pipette. Les culots sont ensuite remis en suspension dans 50 µl d'acide formique à 70 % et 50 µl d'acétonitrile. Une quantité de billes de verre (diamètres  $\leq 106$  µm, Sigma) équivalente à la masse cellulaire est alors ajoutée, dans chaque tube d'extraction. Tous les tubes sont placés dans le FastPrep-24 (MP Biomedicals, USA) afin de les secouer 3 fois à la vitesse maximale pendant 20 secondes (le but de ce geste est de perturber les membranes cellulaires pour une meilleure extraction). Enfin, les mélanges sont laissés à décanter pendant 5 minutes, et les surnageants-échantillons sont immédiatement transférés dans d'autres tubes Eppendorf et serviront pour les dépôts sur la cible MALDI (Bruker, Daltonics, Bremen, Germany).

### 6-2-2 Préparation de la matrice MALDI et dépôt des échantillons (annexe 5)

Dans un tube polypropylène de 1,5 ml, sont mis deux spatules d'acide alpha-cyano-4-hydroxy-cinnamique, auxquelles sont ajoutés 500 µl d'acétonitrile HPLC, 250 µl de TFA à 10 % (acide trifluoroacétique) et 250 µl d'eau HPLC, le tout est soniqué 10 min (P : 30 W, F : 50/60 Hz) à température ambiante jusqu'à l'obtention d'une solution saturée (la solution doit être trouble). Cette dernière est centrifugée pendant 5 min à

13000 g. Le surnageant est alors transféré dans un tube propre, la matrice est prête. Des aliquotes de 1 ml sont préparés, la matrice peut être conservée 4 jours à 4°C à l'abri de la lumière.

La matrice permet de protéger l'analyte-échantillon d'une ionisation directe, de refroidir les ions grâce à une distribution plus fine de l'énergie cinétique, et d'améliorer le rendement d'ionisation.

1,5 µl d'analyte-échantillon sont placés sur la cible MALDI d'une façon homogène. L'opération est répétée 8 fois pour chaque extrait. Après séchage des dépôts à température ambiante, 1,5 µl de matrice sont ajoutés. Pour valider les résultats de l'ensemble des analyses nous avons utilisé sur chaque plaque MSP 96 cibles, comme contrôle positif la solution (*Escherichia coli* DH5 alpha protein extract ; Bruker Daltonics ref. 255343) et comme contrôle négatif la solution de la matrice non inoculée.

**Remarque :** une fois sec, le dépôt, doit être recouvert de matrice dans les 10 minutes qui suivent. Il faut travailler rapidement pour éviter tout risque d'oxydation de l'analyte pouvant conduire à une modification des pics, surtout avant l'ajout de la solution matrice.

Pour la robustesse de notre travail, la manipulation est répétée six fois pour chaque souche en utilisant le même protocole de culture cellulaire et d'extraction protéique.

L'analyse des plaques MSP contenant 96 cibles est réalisée par le spectromètre de masse Microflex MALDI-TOF (Bruker Daltonics) réglé à 330 nm et contrôlé par le logiciel Flex Control Software (Bruker Daltonics). Les ions positifs sont extraits par une tension d'accélération de 20 KV en mode linéaire.

## **7°/ Séquençage du génome de la souche *Tsukamurella* 1534**

Dans notre projet de séquençage du génome de la souche *Tsukamurella* 1534, nous avons adopté la technologie 454 *pyrosequencing*. La compagnie 454 life science, basée aux États-Unis (Connecticut), spécialisée dans la fabrication de séquenceur de gènes à haut débit a développé une technologie de séquençage innovante (four five four : pour facile functional findings) (Margulies, Egholm *et al.*, 2005) caractérisée par la mise en œuvre de la nanotechnologie pour le séquençage. La spécificité de cette technologie repose sur l'intégration de plusieurs techniques : la PCR en émulsion (emPCR) dans des microréacteurs (une microgoutte renfermant une microbille

d'agarose en phase aqueuse, séparée des autres billes par de l'huile), les technologies des plaques en fibre optique picotitré [PicoTiterplate (PTP)] qui contient 1,6 millions de puits. (un picolitre est un billionième de litre), le pyroséquençage, ainsi que des technologies informatiques de pointe pour l'acquisition, le traitement et l'analyse des images.

### **7-1 Préparation des cellules**

La souche 1534 a été cultivée sur le milieu ISP2 et incubée à 37°C. Après 3 jours d'incubation en atmosphère aérobie, la biomasse de six boîtes de Pétri (90 mm de diamètre) a été récupérée et suspendue dans 3 tubes contenant chacun 100 µl du tampon G2 (EZ1 DNA Tissue kit, Qiagen).

### **7-2 Extraction de l'ADN**

Une quantité de poudre de verre équivalente à la biomasse est ajoutée aux suspensions cellulaires. Les tubes sont agités dans l'appareil FastPrep-24 (MP Biomédical, USA) 3 fois pendant 20 secondes. Les suspensions ont ensuite subi une digestion enzymatique par la protéinase K. La concentration et la purification de l'ADN est réalisée avec le kit QIAmp (Qiagen) et l'automate EZI Advanced XL BioRobot (Qiagen) (cf. 3-1-1 Extraction de l'ADN). Les éluats contenant l'ADN génomique sont alors récupérés dans des microtubes stériles et conservés à 4°C.

### **7-3 Contrôle qualitatif et quantitatif de l'ADN**

#### **7-3-1 Contrôle de la pureté de l'ADN en solution**

Afin de s'assurer de la qualité des extraits d'ADN, ces derniers sont analysés par électrophorèse dans une cuve de type MUPID (Eurogentec) pendant 30 minutes à 135 volts dans un gel d'agarose (invitrogene) à 3 % dans le tampon Tris Acétate EDTA TAE 0,5X, additionné de 0,5 µg/ml de bromure d'éthidium (BET). Sept microlitre des extraits d'ADN sont déposés dans les puits du gel avec 2 µl de tampon de charge (10X Blue Juice invitrogene) en présence d'un témoin de poids moléculaire 1 Kb (Bench top pGEM DNA Markers Promega). Après migration, le gel est examiné sous lumière ultraviolette (UV) pour repérer les bandes.

### 7-3-2 Quantification de l'ADN par spectrofluorimétrie

La quantification de l'ADN double brin (ADNdb) a été réalisée en utilisant le kit Quant-it PicoGreen (Invitrogen). Dans une cuve appropriée, nous avons introduit 100  $\mu$ l d'une solution d'ADN (échantillon à tester) dilué dans du tampon TE 1X et 100  $\mu$ l de la solution PicoGreen à 2X.

Pour un dosage précis de la quantité d'ADN, une courbe étalon est réalisée à l'aide d'un standard d'ADN de concentration connue. Des dilutions en tampon TE 1X de l'ADN standard sont effectuées pour obtenir une gamme de concentration en ADN comprise entre 0 et 100 ng/ $\mu$ l.

Par la suite la cuve est incubée pendant 2 à 5 minutes à la température ambiante à l'abri de la lumière pour éviter la photodégradation du PicoGreen, puis placée dans le spectrofluoromètre Genios\_Tecan. La concentration de l'échantillon d'ADN est alors déterminée par comparaison de la valeur de fluorescence obtenue avec les valeurs de fluorescence de la courbe étalon.

### 7-4 Préparation des banques de fragments d'ADNsb :

Pour la préparation des banques d'ADN simple brin nous avons utilisé deux méthodes : la méthode *shotgun* et la méthode *3-kb paired-end*.

Les techniques *shotgun* (séquençage aléatoire globale) et *3-Kb paired-end* sont utilisées massivement pour le séquençage d'un grand nombre de génomes notamment le génome bactérien. Schématiquement, ces méthodes consistent à fragmenter le génome à étudier en petits fragments d'ADN à l'aide de moyens mécaniques. La technique *shotgun* génère des fragments aléatoires de tailles différentes alors que la technique *3-Kb paired-end* génère des fragments d'une taille comprise entre 3 et 4 kb. Sur chaque fragment, une réaction de ligation permet de fixer aux deux extrémités de courtes séquences d'ADN appelées adaptateurs (A et B), ces derniers servent d'amorce pour la PCR. Un adaptateur est lié à la biotine pour permettre la purification des molécules d'ADN porteurs des adaptateurs A et B. Ces fragments constituent une banque (library) de fragments d'ADN simple brin (ADNsb). Ils sont ensuite amplifiés par PCR, puis séquencés (figure 9).

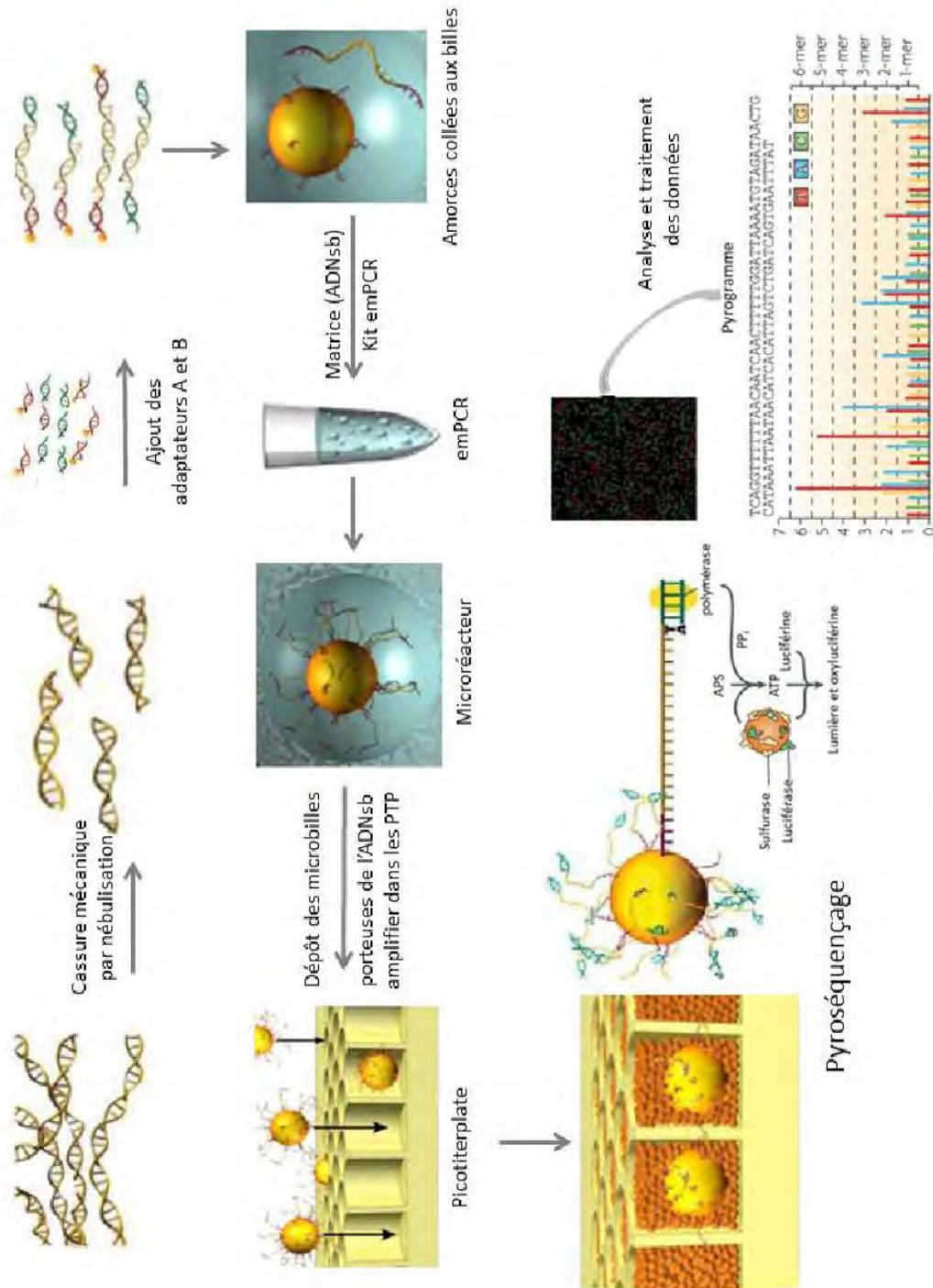


Figure 9 : Aperçu de la technologie de séquençage 454 d'après Metzker (2010) Modifié.  
 PTP : PicoTiterPlate, PPi : pyrophosphate inorganique, APS : adénosine phosphosulphate, ATP : adénosine triphosphate..

### **7- 4-1 Shotgun-library**

Selon les recommandations du fournisseur (Roche), 500 ng d'ADN ont été utilisés pour la préparation de la banque de fragments aléatoires d'ADNsb (*shotgun-library*) suivant le protocole du kit GS Rapid library Prep.

### **7- 4-2 3-Kb paired-end library**

La préparation de la *3-Kb paired-end library* a été réalisée selon le protocole 454 GS FLX Titanium paired-end (Roche). Pour cela, cinq µg d'ADN ont été fragmentés mécaniquement par Hydroshear en utilisant l'appareil (Digilab, Holliston, MA). La pureté et la taille des fragments d'ADN ont été contrôlées en utilisant l'appareil Agilent 2100 BioAnalyzer avec le kit ADN LabChip 7500.

Les banques de fragments sont quantifiées en utilisant le kit Quant-it RiboGreen (Invitrogen) et la concentration est mesurée par Genios Tecan fluorometer. Les banques de fragments sont alors stockées à -20 ° C jusqu'à utilisation ultérieure.

### **7-5 L'amplification clonale des molécules d'ADN simple brin**

Les banques de fragments sont amplifiées par emPCR en utilisant le kit GS Titanium SV emPCR (Lib-L) v2 (Roche). Des microbilles avec en surface des amorces complémentaires à un des adaptateurs permettent de fixer une molécule d'ADN simple brin (ADNsb de la *shotgun library* et de la *3Kb paired-end library*) à la fois. Les microbilles porteuses des brins d'ADNsb sont mises en émulsion (eau/huile) en présence des réactifs pour PCR. Chaque microgouttelette (microréacteurs) englobe une microbille et donc une molécule d'ADN, ce qui permet une amplification clonale de chaque fragment (figure 9).

### **7- 6 Le pyroséquençage dans des plaques PicoTiterPlate**

Après amplification, les microgouttelettes sont dissociées en utilisant le kit GS Titanium PicoTiterPlate (Roche). Environ 482 748 microbilles porteuses de l'ADNsb largement amplifiés sont pipetés dans une plaque en fibre optique Picotiterplate (PTP) contenant 1,4 millions de puits. Un quart de la plaque 70x75 GS FLX Titanium PTP Device (Roche) a été réservé pour la *shotgun library* et une zone de 2 x 1/8 de PTP pour la *3-kb paired-end library*. Les puits possèdent un diamètre qui assure le dépôt d'une microbille par puits. Le séquençage a été effectué par le pyroséquenceur 454 GS FLX en utilisant le kit GS FLX Titanium XLR70 (Roche).

Selon le principe de pyroséquençage, une caméra CCD permet de capturer les images après addition de chaque nucléotide (figure 9).

### **7-7 L'analyse des images et la détermination de la séquence d'ADN**

L'analyse des différentes images capturées permet la déduction de la séquence des différents morceaux d'ADN (illustré par pyrogramme). Des logiciels bioinformatiques sont ensuite utilisés pour reconstituer la séquence initiale grâce aux groupages des contigs (figure 9).

L'analyse bioinformatique des résultats a été réalisée par une équipe de bioinformaticiens de l'URMITE, UM63 CNRS 7278, IRD 198, INSERM 1095, Faculté de Médecine, Marseille. Université d'Aix Marseille (France) sous la direction du Docteur V. Roux.

## 1° Isolement des actinomycètes à partir des prélèvements clinique

L'objectif principal de ce travail de thèse, est de mettre en évidence la présence des bactéries actinomycétales aérobies autres que les mycobactéries dans les prélèvements clinique dans la région de Constantine. Les prélèvements de patients hospitalisés ou non suspectés d'être atteints de tuberculose sont récupérés au niveau de l'unité de la tuberculose (laboratoire de bactériologie du CHU Benbadis Constantine). Ce travail a porté sur un total de 3682 prélèvement et a été réalisé en deux étapes :

### 1-1 La première partie de l'isolement

Elle a porté sur 3517 prélèvements (19 prélèvements de nature différentes) recueillis durant huit mois de suite, avec en première position les crachats (86,35 %), suivi des prélèvements urinaires (7,96 %) et en troisième position des liquides pleuraux (2,07%). Le tableau 10 résume le nombre et la nature des 3517 prélèvements récoltés durant cette première partie d'isolement.

**Tableau 10 :** prélèvements étudiés dans la première partie de l'isolement des actinomycètes.

Nature des prélèvements	Nombre de prélèvements	Nombre de tubes L-J cultivés sur Bennett	Nombre d'isolats actinomycétales
Crachats	3037	337	20
Urines	280	37	0
Liquide pleural	73	3	0
Ascite	42	6	0
Pus	25	5	0
Liquide céphalo-rachidien	29	5	0
Sang de règles	7	0	0
Liquide articulaire	7	1	0
Prélèvements inguinale	4	0	0
Prélèvement cutané	3	3	0
Ganglion cervical	2	0	0
Drain thoracique	2	0	0
Trachéal	2	0	0
Biopsie synovial	1	0	0
Sperme	1	0	0
Epanchement péricardique	1	0	0
Kyste	1	0	0
TOTAL	3517	397	20

Après incubation à 37°C, seulement 765 ont montré une croissance microbienne. Les colonies des mycobactéries sont repérées d'après leur aspect macroscopique caractéristique et confirmées par la bactérioscopie (la coloration à l'auramine et la coloration de Ziehl-Neelsen) comme méthode de diagnostic de bacilles acido-alcoolo-résistants sur frottis colorés. L'identité de ces mycobactéries a été établie par l'équipe du laboratoire pour un diagnostic de tuberculose. Les bactéries du genre *Mycobacterium* (le complexe tuberculeux et les mycobactéries atypiques) ne constituent pas l'objectif du présent travail.

Ainsi, cette étape nous a permis de récupérer toutes les cultures non mycobactérienne apparues sur LJ.

Sur les 3517 prélèvements récoltés au départ, seulement 397 ont donné des cultures de colonies non mycobactérienne (337 de crachats, 37 d'urines et 23 d'autres prélèvements). Ce nombre représente 11,28 % du nombre total des prélèvements récoltés initialement. Les 397 cultures ont été cultivées à nouveau et purifiées sur le milieu Bennett afin de rechercher cette fois-ci des souches actinomycétales.

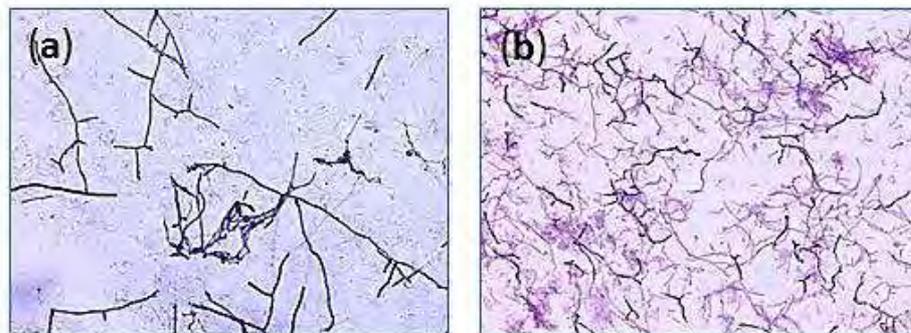
Les premières colonies des actinomycètes ont été obtenues dans un délai variant entre 4 et 20 jours d'incubation à 30°C. Les colonies actinomycétales sont repérées sur le milieu Bennett d'après leurs aspects macroscopiques caractéristiques. La morphologie des colonies varie beaucoup avec les genres, les espèces et même d'une souche à l'autre en fonction de l'âge de la culture (figure 10a). Ainsi, plusieurs types de colonies ont été observés.

Habituellement, les colonies sont rondes à contours irréguliers, opaques, légèrement surélevées, leur surface est souvent cérébriforme et se recouvre après plusieurs jours de courts mycéliums aériens masquant la surface de la colonie lui donnant un aspect assez sec, crayeux ou poudreux. Ces aspects ne sont pas spécifiques et dépendent des conditions de culture. Leur consistance est généralement ferme. La plupart des souches adhèrent fermement au milieu de culture où elles forment de légères dépressions et sont difficiles à mettre en suspension. En milieux liquides, les actinomycètes ne font jamais troubler le milieu, elles croissent sous forme de pellets d'environ 1mm de diamètre ou en mie de pains déposés au fond des tubes (figure 10a).



**Figure 10a** : photographies des cultures âgées de 21 jours à gauche l'isolat 4 et à droite l'isolat 409 sur le milieu Bennett. Une culture âgée de 15 jours de la souche 1534 dans le milieu *ISP2* liquide.

L'examen microscopique, après coloration de Gram, a révélé la présence de bactéries à coloration de Gram positive parfois non uniforme mais ponctuée présentant un aspect moucheté ou tigré en rapport très certainement avec la composition particulière de la paroi de ces bactéries. Il s'agit de bâtonnet plus ou moins allongés isolés ou formant des filaments ou des fragments de filaments fins, ramifiés ou non, peut ou très enchevêtrés pour la plupart des isolats. Une telle morphologie est largement répandue dans ce groupe bactérien (figure 10b).



**Figure 10b** : examen en microscope optique après coloration de Gram (microscope modèle Leica 2000, programme Leica application 3.3.0) Gx100. (a) : frottis de l'isolat 1486 ; (b) : frottis de l'isolat 1348.

L'aspect des colonies et la coloration de Gram constituent des éléments d'orientation essentiels pour l'identification de ces bactéries. Ainsi, Vingt souches appartenant au groupe des actinomycétales aérobies ont pu être isolées de vingt prélèvements (de patients différents) ce qui représente un pourcentage de 0,5 % du nombre totale de prélèvements. Ils proviennent tous de prélèvements respiratoires (le crachat). Grâce à ce protocole, Yassin (2009) a pu isoler une nouvelle espèce actinomycétale nommée *Saccharopolyspora rosea* à partir d'un lavage bronchique d'un

patient âgé de 45 ans avec un carcinome pulmonaire. Le prélèvement a été lavé avec du N-acétylcystéine, puis cultivé sur LJ ensuite repiqué sur le milieu gélosé Columbia supplémenté de 5% de sang de mouton. Il faut noter qu'aucun isolat n'a été obtenu à partir des 480 prélèvements non respiratoires étudiés.

Le faible pourcentage, peut être attribué soit :

- à un phénomène de compétition bactérienne ; la croissance des actinomycètes pourrait être masquée, voir même inhibée lors de l'isolement, par les bactéries qui sont moins exigeantes et par conséquent plus faciles à cultiver,
- aux conditions physicochimiques d'incubation notamment la température. En effet, la température d'incubation recommandée pour l'isolement de ce groupe bactérien est de 28 à 30°C (Laurent *et al.*, 2007 ; Rodriguez-Nava *et al.*, 2007),
- aux traitements de fluidification et de décontamination des échantillons clinique destinés à la recherche des mycobactéries, du fait que certains auteurs rapportent que ses derniers ne conviennent pas aux bactéries actinomycétales notamment pour le genre *Nocardia* qui peuvent être tuées empêchant leur isolement ultérieur (Murray *et al.*, 1987, Laurent *et al.*, 2007).

## 1-2 La deuxième partie de l'isolement

Elle a porté sur 165 prélèvements (11 prélèvements de natures différentes). Ils ont été recueillis durant dix mois de suite avec en première position les liquides pleuraux avec 34,54 %, suivi des ascites avec 18,18 %. Le tableau 11 résume le nombre et la nature des 165 prélèvements récoltés. Ces prélèvements ont été sélectionnés en fonction d'un résultat négatif de BAAR après examen microscopique direct des prélèvements (coloration au Ziehl-Neelsen classique). En effet le caractère acido-alccolo-résistance des actinomycètes est absent par la technique de Z-N à chaud, mais partielle (pour quelques genres seulement) avec la technique modifiée de Kinyoun (coloration de Z-N à froid). En plus, ce caractère est plus prononcé dans les produits pathologiques qu'après l'isolement (Laurent *et al.*, 2007).

Dans cette deuxième étape, la recherche des actinomycètes a été réalisée suivant le protocole que nous avons mis au point. Il consistait à mettre en culture les prélèvements directement sur le milieu de Bennett sans passer par la culture sur LJ et

sans prétraitements préalables (sans fluidification et décontamination pour les prélèvements contaminés). La température d'incubation est de 30°C au lieu de 37°C.

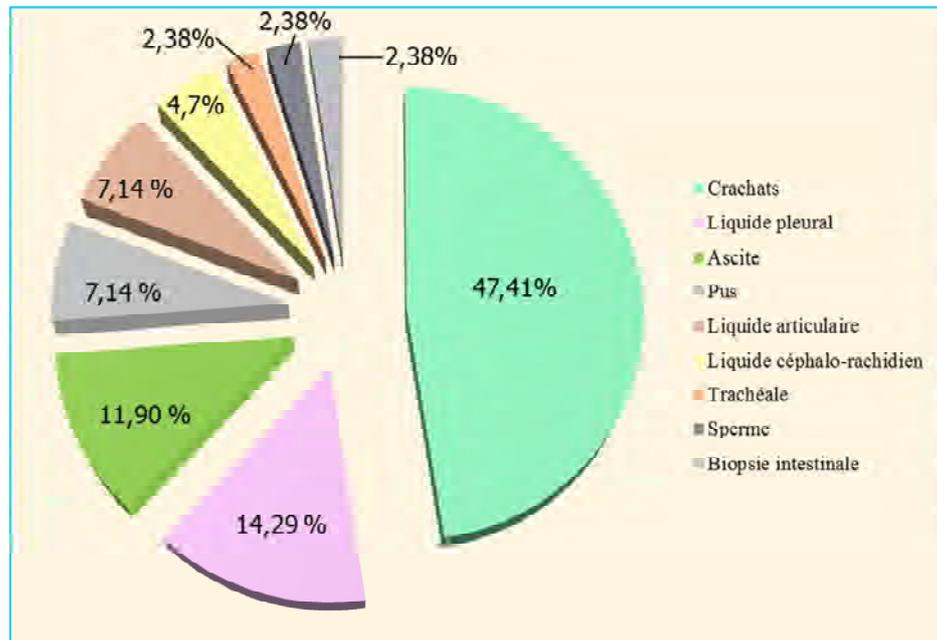
**Tableau 11** : répartition du nombre d'isolats d'actinomycètes en fonction des prélèvements étudiés dans la deuxième partie de l'isolement.

Nature des Prélèvements	Nombre de prélèvements	Nombre d'isolats actinomycétales	% d'isolats par prélèvement
Liquide pleural	57	6	10,53
Ascite	30	5	16,66
Pus	18	3	16,66
Liquide céphalo-rachidien	30	2	6,66
Liquide articulaire	13	3	23,08
Lavage broncho-alvéolaire	3	0	0
Aspiration ganglionnaire	3	0	0
Biopsie	2	1	50,00
Aspiration bronchique	2	0	0
Trachéale	1	1	100
Abcès du psoas	1	0	0
Kyste du sein	1	0	0
Moelle osseuse	1	0	0
Collection inguinale	1	0	0
Sperme	1	1	100
Total	165	22	13,33

L'examen morphologique des 165 cultures a révélé la présence de 22 isolats identifiés comme appartenant aux bactéries actinomycétales aérobies. Ce qui représente un pourcentage de 13,33 % du nombre total de prélèvements, dont seize (72,72 %) isolats à partir de cinq prélèvements de sites stériles (liquide pleural n = 6 ; ascite n = 5 ; ponctions articulaire n = 3 ; L.C.R. n = 1 ; ponction lombaire n = 1) et six (27,27 %) isolats de quatre prélèvements de site contaminés (pus n = 3 ; biopsie intestinale n = 1 ; trachéale n = 1 ; sperme n = 1). L'augmentation du pourcentage d'isolement à partir des prélèvements non pulmonaire de 0% dans la première étape à 13,33 % dans la deuxième étape illustre l'efficacité et la sensibilité de ce protocole (tableau 12 annexe 6).

Au total 42 souches d'actinomycètes aérobies ont été isolées à partir de dix types de prélèvements différents. Les résultats présentés sur la figure 11 font apparaître une variation importante du nombre de souches d'actinomycètes isolées à partir de chaque prélèvement. Sur l'ensemble des 42 souches d'actinomycètes isolées et purifiées 47,61 % proviennent des crachats de différents services du CHU, 14,29 % des liquides pleuraux, 11,90 % des ascites, 7,14 % de ponctions articulaire et de pus et 2,38 % de

chacun des prélèvements suivants : ponctions lombaire, biopsie intestinale, trachéale et sperme.



**Figure 11 :** distribution des isolats actinomycétales en fonction des types de prélèvements

Le diagnostic bactériologique des actinomycètes est dominé par la longueur des délais de la réponse liée à la lenteur de culture des actinomycètes. L'isolement des bactéries actinomycétales nécessite une méthode performante pour leur sélection et ne peuvent être isolées par les méthodes courantes utilisées en microbiologie. Certains chercheurs préconisent l'utilisation de certaines sources de carbone et d'azote (amidon, chitine, glycérol, caséine, arginine, asparagine) rendant les milieux moins favorables à la croissance des bactéries autres que les bactéries actinomycétales (Cavalla et Eberlin, 1994). Dans ce but, nous avons mis au point une méthode d'isolement des bactéries actinomycétales à partir de prélèvements clinique d'origine diverses et ce par ensemencement direct des prélèvements sans prétraitement préalable sur un milieu spécifique (le milieu de Bennett) pour l'isolement des actinomycètes aérobies. Cette stratégie d'isolement nous a permis d'augmenter le pourcentage d'isolats de 0,5 % obtenu en suivant le protocole spécifique à la recherche des mycobactéries dans les prélèvements cliniques à 13,33 %.

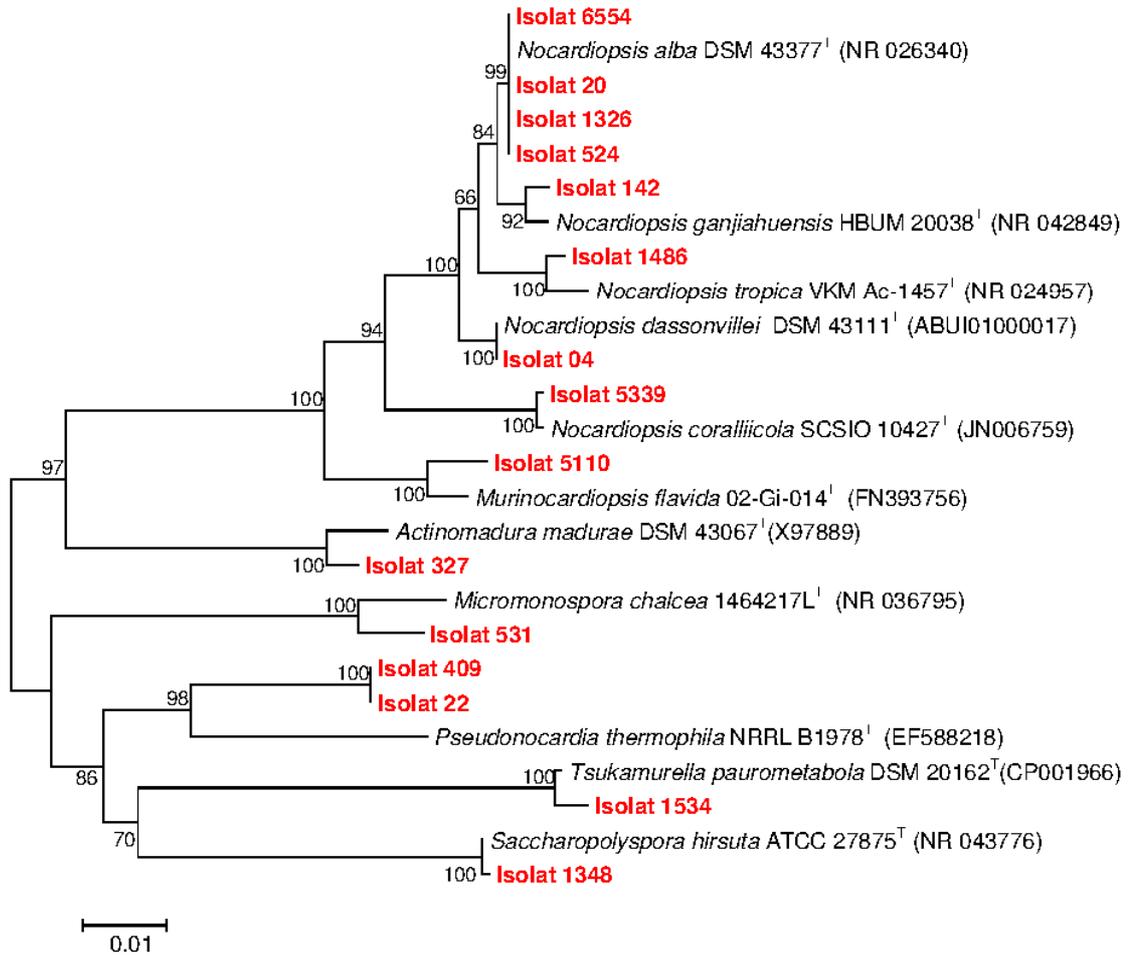
Au terme de cette première partie du travail, nous pouvons conclure que la recherche des actinomycètes doit être effectuée indépendamment de la recherche des mycobactéries par ensemencement de milieux adéquats comme le milieu Bennett et dans des conditions physicochimiques appropriés, ce qui est consolidé par Laurent *et al.*, (2007) qui ont proposé le milieu BCYE comme milieu sélectif pour l'isolements des bactéries du genre *Nocardia* présentes dans les prélèvements cliniques. Ils préconisent une incubation poursuivie pendant 15 jours dans tous les cas avant de rendre tout compte rendu définitif afin d'éviter un faux diagnostic négatif. D'après les mêmes auteurs le milieu BCYE normal ou sélectif est intéressant car il permet d'éliminer les bactéries associées ou contaminants appartenant à la flore oro-pharyngée. Ils rajoutent même, que la recherche des bactéries appartenant au genre *Nocardia* dans des prélèvements cliniques doit faire l'objet d'une demande spécifique par le clinicien et d'une attention particulière du microbiologiste. L'incubation à 35°C ou mieux à 30°C doit être poursuivie trois semaines au minimum avant tout compte rendu définitif d'un résultat négatif.

## **2°/ Diversité phylogénétique des souches isolées**

Quinze isolats ont fait l'objet d'une extraction d'ADN génomique, une amplification et séquençage de leurs ADNr 16S afin de déterminer leurs emplacements phylogénétique. Une électrophorèse des produits de la PCR est effectuée sur gel d'agarose-TAE. Les amplifiats d'ADN ont migré dans la région 1500 paires de bases du gel d'agarose à 1,5 %. Les produits de la PCR purifiés des isolats ont été séquencés et les séquences obtenues ont été comparées avec celles d'autres organismes de la base de données GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) (Benson *et al.*, 2013).

La comparaison de ces séquences avec celles disponibles au niveau de la banque génomique NCBI nous a permis d'évaluer la diversité phylogénétique et la position taxonomique de ses isolats à l'aide du logiciel Mega (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) version 5 (Tamura *et al.*, 2011). Les résultats obtenus sont présentés dans l'arbre phylogénétique de la figure 12 et le tableau 13.

Les similitudes des séquences des ADNr 16S des souches étudiées avec les espèces représentatives correspondante sont mentionnées dans le tableau 14.



**Figure 12** : Arbre selon la méthode des distances (Neighbor-Joining) construit d'après l'analyse des séquences du gène qui code pour l'ADNr 16S en utilisant le logiciel Mega (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) version 5 (Tamura *et al.*, 2011) montrant la position phylogénétique des 15 isolats parmi les espèces types représentatives des genres *Murinocardiopsis*, *Nocardioopsis*, *Tsukamurella*, *Pseudonocardia*, *Actinomadura*, *Micromonospora* et *Saccharopolyspora*. La matrice des distances est calculée selon le modèle Kimura à 2 paramètres (Kimura, 1980). Les valeurs mentionnées à l'origine des nœuds représentent les pourcentages supérieurs à 40 % de 1000 bootstrap. 0,01 représente le nombre de substitution par position de nucléotide.

**Tableau 13** : ordres, familles et genres des actinomycètes isolés de différents prélèvements

Ordres	Familles	Genre	Code	Prélèvements
<i>Streptosporangiales</i>	<i>Nocardiopsaceae</i>	<i>Nocardiopsis</i>	4	ASC
			20	PA
			142	LP
			524	TRA
			1486	CRA
			1326	Pus
			5339	CRA
	6554	CRA		
	<i>Murinocardiopsis</i>		5110	CRA
	<i>Thermomonosporaceae</i>	<i>Actinomadura</i>	1327	CRA
<i>Pseudonocardiales</i>	<i>Pseudonocardiaceae</i>	<i>Pseudonocardia</i>	409	LP
			122	ASC
		<i>Saccharopolyspora</i>	1348	PUS
<i>Corynebacteriales</i>	<i>Tsukamurellaceae</i>	<i>Tsukamurella</i>	1534	CRA
<i>Micromonosporales</i>	<i>Micromonosporaceae</i>	<i>Micromonospora</i>	531	LP

ASC : Ascite ; PA : Ponction articulaire ; LP : Liquide pleural ; TRA : Trachéale ; CRA : crachats.

L'analyse des séquences obtenues nous a permis à l'aide du logiciel Mega de construire l'arbre phylogénétique présenté sur la figure 12, d'où il ressort que les quinze souches isolées étaient apparentées à des organismes cultivés des ordres *Streptosporangiales*, *Pseudonocardiales*, *Corynebacteriales* et *Micromonosporales*. Elles font partie des familles des *Tsukamurellaceae*, des *Nocardiopsaceae*, des *Pseudonocardiaceae*, des *Micromonosporaceae* et des *Thermomonosporaceae*. Elles sont affiliées à sept genres différents, *Murinocardiopsis* (Kaïmpfer *et al.*, 2010), *Nocardiopsis* (Meyer, 1976), *Tsukamurella* (Collins *et al.*, 1988), *Pseudonocardia* (Henssen, 1957), *Actinomadura* (Lechevalier et Lechevalier, 1968), *Micromonospora* (Ørskov, 1923) et *Saccharopolyspora* (Lacey et Goodfellow, 1975).

53,33 % des isolats identifiés appartiennent au genre *Nocardiopsis*, 13,33 % au genre *Pseudonocardia*, le reste font partie des genres *Actinomadura*, *Murinocardiopsis*, *Micromonospora*, *Saccharopolyspora* et *Tsukamurella* avec des pourcentage de 6,66 % chacun.

**Tableau 14** : Affiliation phylogénétique des isolats étudiés.

Isolat	Nom	Accession	Pairwise Similarity(%)
5110	<i>Murinocardiosis flavida</i>	FN393755	98,94
	<i>Spinactinospora alkalitolerans</i>	GU112453	96,07
	<i>Marinactinospora thermotolerans</i>	EU698029	95,98
1534	<i>Tsukamurella paurometabola</i>	CP001966	99,45
	<i>Tsukamurella strandjordii</i>	AF283283	99,18
	<i>Tsukamurella inchonensis</i>	X85955	99,18
	<i>Tsukamurella tyrosinosolvans</i>	Y12246	99,17
	<i>Tsukamurella pulmonis</i>	X92981	99,10
	<i>Tsukamurella spumae</i>	AY238513	98,84
	<i>Tsukamurella sunchonensis</i>	AF150494	98,84
	<i>Tsukamurella pseudospumae</i>	AY333425	98,84
	<i>Tsukamurella carboxydivorans</i>	EU521689	98,77
	<i>Tsukamurella spongiae</i>	AY714239	98,09
1327	<i>Actinomadura meyeriae</i>	AY273787	99,51
	<i>Actinomadura bangladeshensis</i>	AB331652	99,45
	<i>Actinomadura geliboluensis</i>	HQ157187	98,98
	<i>Actinomadura chokoriensis</i>	AB331730	98,91
	<i>Actinomadura madurae</i>	X97889	98,69
	<i>Actinomadura napierensis</i>	AY568292	98,44
	<i>Actinomadura maheshkhaliensis</i>	AB331731	98,43
	<i>Actinomadura xylanilytica</i>	FR692101	98,35
	<i>Actinomadura livida</i>	AF163116	98,27
	<i>Actinomadura mexicana</i>	AF277195	98,24
	<i>Actinomadura yumaensis</i>	AF163122	98,20
	<i>Actinomadura verrucosospora</i>	U49011	98,15
	<i>Actinomadura formosensis</i>	AF002263	98,14
	<i>Actinomadura luteofluorescens</i>	U49008	98,08
	<i>Actinomadura vinacea</i>	AF134070	98,05
	<i>Actinomadura nitritigenes</i>	AY035999	98,05
	<i>Actinomadura rudentiformis</i>	DQ285420	98,04
<i>Actinomadura coerulea</i>	U49002	98,01	
409	<i>Pseudonocardia alni</i>	Y08535	99,93
	<i>Pseudonocardia carboxydivorans</i>	EF114314	99,80
	<i>Pseudonocardia antarctica</i>	AJ576010	99,66
	<i>Pseudonocardia tropica</i>	GQ906587	98,63
	<i>Pseudonocardia parietis</i>	FM863703	98,43
	<i>Pseudonocardia nitrificans</i>	X55609	98,15
	<i>Pseudonocardia autotrophica</i>	AJ252824	98,10

**Tableau 14 (suite)** : Affiliation phylogénétique des isolats étudiés.

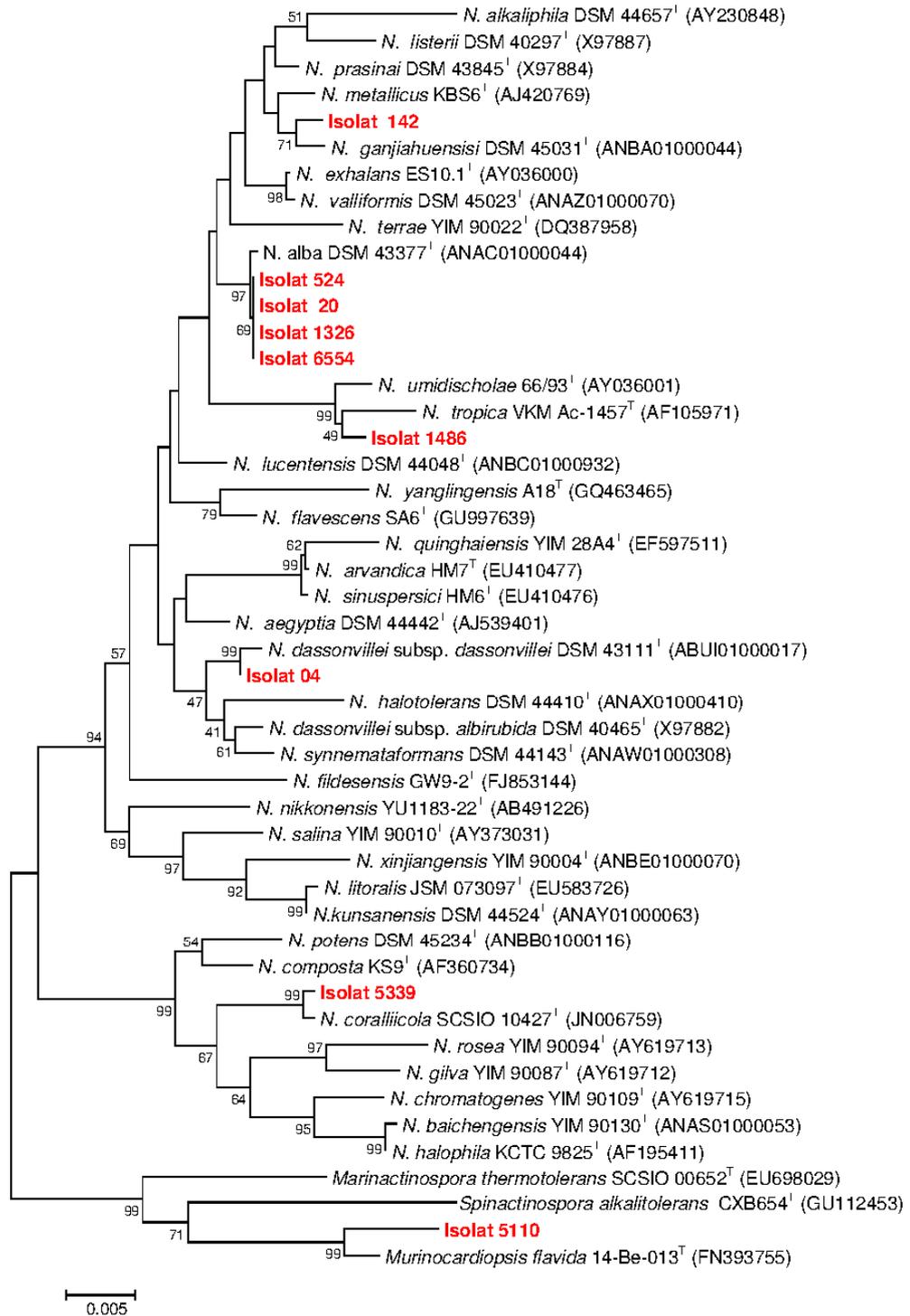
Isolat	Nom	Accession	Pairwise Similarity(%)
122	<i>Pseudonocardia alni</i>	Y08535	99,93
	<i>Pseudonocardia carboxydivorans</i>	EF114314	99,80
	<i>Pseudonocardia antarctica</i>	AJ576010	99,46
	<i>Pseudonocardia tropica</i>	GQ906587	98,90
	<i>Pseudonocardia parietis</i>	FM863703	98,43
	<i>Pseudonocardia nitrificans</i>	X55609	98,15
	<i>Pseudonocardia autotrophica</i>	AJ252824	98,10
531	<i>Micromonospora eburnea</i>	AB107231	98,90
	<i>Micromonospora narathiwatensis</i>	AB193559	98,84
	<i>Micromonospora rosaria</i>	X92631	98,84
	<i>Micromonospora inositola</i>	X92610	98,70
	<i>Micromonospora endolithica</i>	AJ560635	98,70
	<i>Micromonospora echinaurantiaca</i>	X92618	98,64
	<i>Micromonospora pallida</i>	X92608	98,64
	<i>Micromonospora chersina</i>	X92628	98,63
	<i>Micromonospora tulbaghiaie</i>	EU196562	98,62
	<i>Micromonospora sagamiensis</i>	X92624	98,57
	<i>Micromonospora inyonensis</i>	X92629	98,50
	<i>Micromonospora fulviviridis</i>	X92620	98,43
	<i>Micromonospora spongicola</i>	AB645957	98,35
	<i>Micromonospora halotolerans</i>	FN658652	98,34
	<i>Micromonospora chaiyaphumensis</i>	AB196710	98,33
	<i>Micromonospora citrea</i>	X92617	98,29
	<i>Micromonospora humi</i>	GU459068	98,23
	<i>Micromonospora echinofusca</i>	X92625	98,23
	<i>Micromonospora echinospora</i>	U58532	98,22
	<i>Micromonospora cremea</i>	FN658654	98,20
	<i>Micromonospora haikouensis</i>	GU130129	98,17
	<i>Micromonospora auratinigra</i>	AB159779	98,16
	<i>Micromonospora pattaloongensis</i>	AB275607	98,16
	<i>Micromonospora maritima</i>	HQ704071	98,16
	<i>Micromonospora viridifaciens</i>	X92623	98,16
	<i>Micromonospora nigra</i>	X92609	98,16
	<i>Micromonospora avicenniae</i>	JQ867183	98,10
	<i>Micromonospora yangpuensis</i>	GU002071	98,10
	<i>Micromonospora siamensis</i>	AB193565	98,09
	<i>Micromonospora schwarzwaldensis</i>	KC517406	98,08
<i>Micromonospora equina</i>	JF912511	98,03	
<i>Micromonospora coxensis</i>	AB241455	98,03	
<i>Micromonospora halophytica</i>	X92601	98,02	

**Tableau 14 (suite)** : Affiliation phylogénétique des isolats étudiés.

Isolat	Nom	Accession	Pairwise Similarity(%)
20	<i>Nocardiopsis alba</i>	ANAC01000044	99,73
	<i>Nocardiopsis exhalans</i>	AY036000	99,04
	<i>Nocardiopsis prasina</i>	X97884	98,90
	<i>Nocardiopsis ganjiahuensis</i>	ANBA01000044	98,86
	<i>Nocardiopsis valliformis</i>	ANAZ01000070	98,79
	<i>Nocardiopsis lucentensis</i>	ANBC01000932	98,79
	<i>Nocardiopsis aegyptia</i>	AJ539401	98,56
	<i>Nocardiopsis dassonvillei subsp. Albirubida</i>	X97882	98,56
	<i>Nocardiopsis dassonvillei subsp. dassonvillei</i>	ABUI01000017	98,52
	<i>Nocardiopsis metallicus</i>	AJ420769	98,51
	<i>Nocardiopsis terrae</i>	DQ387958	98,50
	<i>Nocardiopsis synnemataformans</i>	ANAW01000308	98,46
	<i>Nocardiopsis listeri</i>	X97887	98,42
	<i>Nocardiopsis flavescens</i>	GU997639	98,28
	<i>Nocardiopsis umidischolae</i>	AY036001	98,28
	<i>Nocardiopsis tropica</i>	AF105971	98,07
1486	<i>Nocardiopsis umidischolae</i>	AY036001	99,59
	<i>Nocardiopsis tropica</i>	AF105971	99,38
	<i>Nocardiopsis aegyptia</i>	AJ539401	98,43
	<i>Nocardiopsis alba</i>	ANAC01000044	98,39
	<i>Nocardiopsis exhalans</i>	AY036000	98,28
	<i>Nocardiopsis valliformis</i>	ANAZ01000070	98,19
	<i>Nocardiopsis metallicus</i>	AJ420769	98,17
	<i>Nocardiopsis terrae</i>	DQ387958	98,16
	<i>Nocardiopsis prasina</i>	X97884	98,15
	<i>Nocardiopsis lucentensis</i>	ANBC01000932	98,12
	<i>Nocardiopsis arvandica</i>	EU410477	98,12
	<i>Nocardiopsis ganjiahuensis</i>	ANBA01000044	98,05
	<i>Nocardiopsis sinuspersici</i>	EU410476	98,05
	<i>Nocardiopsis listeri</i>	X97887	98,01
6554	<i>Nocardiopsis alba</i>	ANAC01000044	99,93
	<i>Nocardiopsis exhalans</i>	AY036000	99,10
	<i>Nocardiopsis valliformis</i>	ANAZ01000070	98,99
	<i>Nocardiopsis lucentensis</i>	ANBC01000932	98,99
	<i>Nocardiopsis prasina</i>	X97884	98,97
	<i>Nocardiopsis ganjiahuensis</i>	ANBA01000044	98,93
1326	<i>Nocardiopsis alba</i>	ANAC01000044	99,87
	<i>Nocardiopsis exhalans</i>	AY036000	99,04
	<i>Nocardiopsis ganjiahuensis</i>	ANBA01000044	98,99

**Tableau 14 (suite)** : Affiliation phylogénétique des isolats étudiés.

Isolat	Nom	Accession	Pairwise Similarity(%)
04	<i>Nocardiopsis dassonvillei subsp. dassonvillei</i>	ABUI01000017	99,87
	<i>Nocardiopsis dassonvillei subsp. albirubida</i>	X97882	99,59
	<i>Nocardiopsis synnemataformans</i>	ANAW01000308	99,53
	<i>Nocardiopsis lucentensis</i>	ANBC01000932	98,99
	<i>Nocardiopsis aegyptia</i>	AJ539401	98,84
	<i>Nocardiopsis alba</i>	ANAC01000044	98,79
	<i>Nocardiopsis flavescens</i>	GU997639	98,64
	<i>Nocardiopsis halotolerans</i>	ANAX01000410	98,59
	<i>Nocardiopsis arvandica</i>	EU410477	98,38
	<i>Nocardiopsis prasina</i>	X97884	98,36
	<i>Nocardiopsis sinuspersici</i>	EU410476	98,32
	<i>Nocardiopsis exhalans</i>	AY036000	98,14
	<i>Nocardiopsis listeri</i>	X97887	98,08
	<i>Nocardiopsis valliformis</i>	ANAZ01000070	98,05
	<i>Nocardiopsis ganjiahuensis</i>	ANBA01000044	98,05
1348	<i>Saccharopolyspora hordei</i>	FN179275	100,00
5339	<i>Nocardiopsis coralliicola</i>	JN006759	99,86
	<i>Nocardiopsis chromatogenes</i>	AY619715	98,04
524	<i>Nocardiopsis alba</i>	ANAC01000044	99,93
	<i>Nocardiopsis exhalans</i>	AY036000	99,08
142	<i>Nocardiopsis prasina</i>	X97884	99,38
	<i>Nocardiopsis ganjiahuensis</i>	ANBA01000044	99,26
	<i>Nocardiopsis exhalans</i>	AY036000	99,10
	<i>Nocardiopsis metallicus</i>	AJ420769	99,05
	<i>Nocardiopsis valliformis</i>	ANAZ01000070	98,99
	<i>Nocardiopsis listeri</i>	X97887	98,70
	<i>Nocardiopsis alba</i>	ANAC01000044	98,52
	<i>Nocardiopsis flavescens</i>	GU997639	98,43
	<i>Nocardiopsis terrae</i>	DQ387958	98,36
	<i>Nocardiopsis umidischolae</i>	AY036001	98,35
	<i>Nocardiopsis lucentensis</i>	ANBC01000932	98,12
	<i>Nocardiopsis aegyptia</i>	AJ539401	98,09



**Figure 13** : arbre selon la méthode des distances (Neighbor-Joining) construit d’après l’analyse des séquences du gène qui code pour l’ADNr 16S en utilisant le logiciel Mega (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) version 5 (Tamura *et al.*, 2011) montrant la position phylogénétique des isolats **142**, **1326**, **524**, **20**, **6554**, **1486**, **04**, **539** et **5110** parmi les espèces du genres *Nocardiopsis* et *Murinocardiopsis*. La matrice des distances est calculée selon le modèle Kimura à 2 paramètres (Kimura, 1980). Les valeurs mentionnées à l’origine des nœuds représentent les pourcentages supérieurs à 40 % de 1000 bootstrap. 0,005 représente le nombre de substitution par position de nucléotide.

### 3°/ Identification et caractérisation des isolats

#### 3-1 Le genre *Nocardiopsis*

##### 3-1-1 Etude phylogénétique des isolats (142, 1326, 524, 20, 6554, 1486, 04, 5339)

L'analyse des séquences des gènes codants pour l'ARNr (16S, 23S, et 5S) et en particulier le gène de l'ARNr 16S, est devenue un outil important dans l'identification bactérienne, puisqu'elle fournit des informations sur l'emplacement phylogénétique des espèces (Woese, 1987 ; Brenner *et al.*, 2001). Les séquences du gène ARNr 16S pour les souches 142, 1326, 524, 20, 6554, 1486, 04 et 5339 ont été comparées aux séquences des espèces disponibles au niveau de la base de données (GenBank) en utilisant le programme Blast (Altschul *et al.*, 1990).

L'analyse moléculaire qui donne des pourcentages de similitude de 98,01 à 99,93 % (tableau 13) entre les souches 142, 1326, 524, 20, 6554, 1486, 04 et 5339 et les espèces *Nocardiopsis prasina*, *N. ganjiahuensis*, *N. exhalans*, *N. metallicus*, *N. valliformis*, *N. dassonvillei subsp. dassonvillei*, *N. dassonvillei subsp. Albirubida*, *N. synnemataformans*, *N. lucentensis*, *N. alba*, *N. coralliicola*, *N. umidischolae*, *N. tropica* et *N. ganjiahuensis*, est confirmée par l'emplacement de ses dernières sur l'arbre obtenu par l'algorithme de Neighbor-Joining (figure 13).

*No.car.di.op'sis.* est un mot latin formé par la composition de deux mots « *Nocardia* » genre des actinomycetes et « *opsis* » apparence. Donc le mot *Nocardiopsis* est un nom féminin qui signifie un organisme qui a une apparence des *Nocardia* (Hozzein et Trujillo, 2012).

L'arbre phylogénétique de la figure 13 qui inclut également la séquence de *Murinocardiopsis* et les séquences proches de ce genre permet de mieux visualiser les affiliations des souches. Les isolats appartenant au genre *Nocardiopsis* sont répartis sur cinq clades différents. L'isolat 142 semble être apparenté à *N. ganjiahuensis* DSM 45031<sup>T</sup> car il occupe la même ligne phylogénétique que cette espèce avec une valeur de bootstrap faible (73%).

L'isolats 1486 est apparenté, d'après l'arbre phylogénétique de la figure 13, à l'espèces du genre *Nocardiopsis* (*N. umidischolae*) avec un bootstrap très faible (46 %).

L'isolat 04, occupe la même ligne phylogénétique que *N. dassonvillei* subsp. *dassonvillei* avec une valeur de bootstrap de 100, et l'isolat 5339, est apparenté à la souche *N. coralliicola* SCSIO 10427<sup>T</sup> avec une valeur de bootstrap de 100 %. Quant aux isolats (1326, 524, 20 et 6554), ils partagent la même distance qui est égale à zéro (tableau 15) ceci nous permet de conclure qu'il peut s'agir de la même espèce, ce qui est d'ailleurs consolidé par leur emplacement en occupant la même ligne phylogénétique de l'arbre obtenu par l'algorithme de Neighbor-Joining (figure 13) que l'espèce *N. alba* DSM 43377<sup>T</sup> avec une valeur de bootstrap égale à 97%.

L'information apportée par les séquences de l'ADNr 16S seule, n'est pas suffisante pour l'identification d'espèces (Rosselló-Mora et Amann, 2001). Pour cela plusieurs auteurs ont utilisé d'autres techniques et d'autres outils pour l'identification des espèces comme les séquences intergéniques répétitives d'ADN (rep-PCR) (Sadowsky *et al.*, 1996), et PCR-RFLP du gène codant la protéine du choc thermique 65-kDa (Steingrube *et al.*, 1997).

Pour confirmer l'appartenance ou non des isolats (1326, 524, 20 et 6554) à la même espèce, il nous reste l'hybridation qui jusqu'à présent est considérée comme la seule technique discriminante entre les espèces très proches. L'hybridation ADN-ADN est une méthode qui permet d'estimer le degré de parenté entre deux microorganismes. Elle s'est avérée appropriée dans l'investigation des relations entre des taxons étroitement liés, tels que les espèces (Stackebrandt et Goebel, 1994).

Les souches appartenant à la même espèce auront généralement plus de 70 % d'homologie DNA-DNA (Stackebrandt et Goebel 1994). La méthode a été utilisée dans de nombreuses études ; dans certains cas elle a montré une bonne corrélation avec l'identification basée sur la morphologie et la physiologie, mais dans d'autres aucune corrélation apparente (Healy et Lambert, 1991, Doering-Saad *et al.*, 1992 ; Labeda, 1992; Labeda et Lyon, 1992 ; Kim *et al.*, 1999 ; Bouchek-Mechiche *et al.*, 2000).

La méthode de l'identification polyphasique c'est-à-dire la combinaison des techniques moléculaires avec les tests morphologiques et biochimiques semble être la plus efficace pour séparer les espèces très proches.

**Tableau 15** : matrice de distances génétiques séparant les isolats appartenant au genre *Nocardioopsis* et les espèces représentatives du genre calculées selon Kimura du Logiciel Mega 5.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
[1] <i>N. valijiformis</i>																	
[2] Isolot 1486	0.02																
[3] <i>N. aegyptia</i>	0.02	0.02															
[4] <i>N. terrae</i>	0.01	0.02	0.02														
[5] <i>N. listeri</i>	0.02	0.02	0.02	0.02													
[6] <i>N. synnemataformans</i>	0.02	0.02	0.01	0.03	0.02												
[7] <i>N. umidischalae</i>	0.02	0.00	0.02	0.02	0.02	0.02											
[8] <i>N. sinuspersici</i>	0.03	0.02	0.01	0.02	0.03	0.02	0.02										
[9] <i>N. arvadica</i>	0.03	0.02	0.01	0.02	0.03	0.02	0.02	0.00									
[10] <i>N. exhalans</i>	0.00	0.02	0.01	0.01	0.02	0.02	0.02	0.03									
[11] Isolot 20	0.01	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.02	0.01								
[12] Isolot 6554	0.01	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.02	0.01	0.00							
[13] <i>N. kusanensis</i>	0.03	0.03	0.02	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03						
[14] <i>N. lucentensis</i>	0.01	0.02	0.01	0.02	0.02	0.01	0.02	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01					
[15] <i>N. composita</i>	0.04	0.04	0.03	0.04	0.04	0.04	0.04	0.03	0.03	0.04	0.03	0.03	0.00				
[16] <i>N. litoralis</i>	0.03	0.03	0.02	0.04	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.04	0.03			
[17] <i>N. prasina</i>	0.01	0.02	0.01	0.01	0.01	0.02	0.02	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.03	0.01	0.04		
[18] <i>N. tropica</i>	0.02	0.01	0.02	0.02	0.02	0.03	0.03	0.03	0.03	0.02	0.02	0.02	0.03	0.02	0.04	0.03	
[19] <i>N. salina</i>	0.03	0.03	0.02	0.03	0.03	0.02	0.03	0.02	0.02	0.03	0.02	0.02	0.02	0.02	0.03	0.02	0.03
[20] <i>N. metallicus</i>	0.01	0.02	0.01	0.01	0.01	0.02	0.02	0.02	0.00	0.01	0.01	0.01	0.03	0.02	0.04	0.00	
[21] <i>N. xinjiangensis</i>	0.04	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.04	0.03	0.03	0.03	0.01	0.03	0.04	0.01	0.03
[22] <i>N. nikkonensis</i>	0.03	0.03	0.02	0.03	0.03	0.02	0.03	0.02	0.03	0.03	0.02	0.02	0.02	0.02	0.03	0.02	0.03
[23] <i>N. dassonvillei</i> subsp. <i>albirubida</i>	0.02	0.02	0.01	0.02	0.02	0.00	0.02	0.02	0.02	0.02	0.01	0.01	0.03	0.01	0.03	0.03	0.02
[24] Isolot 04	0.02	0.02	0.01	0.02	0.02	0.01	0.02	0.01	0.01	0.02	0.01	0.01	0.02	0.01	0.03	0.02	0.02
[25] Isolot 1326	0.01	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.02	0.01	0.00	0.00	0.00	0.03	0.01	0.03	0.03	0.01
[26] <i>N. alba</i>	0.01	0.02	0.01	0.01	0.02	0.01	0.02	0.02	0.02	0.01	0.00	0.00	0.03	0.01	0.03	0.03	0.01
[27] <i>N. halotolerans</i>	0.03	0.03	0.02	0.03	0.03	0.01	0.03	0.02	0.02	0.03	0.02	0.02	0.03	0.02	0.03	0.03	0.03
[28] Isolot 524	0.01	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.02	0.01	0.00	0.00	0.00	0.03	0.01	0.03	0.03	0.01
[29] <i>N. ganjiahuensis</i>	0.01	0.02	0.01	0.01	0.01	0.02	0.02	0.03	0.03	0.01	0.01	0.01	0.03	0.02	0.04	0.03	0.01
[30] <i>N. yanglingensis</i>	0.02	0.03	0.02	0.03	0.02	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.02	0.04	0.02	0.04	0.04	0.02
[31] Isolot 142	0.01	0.02	0.02	0.01	0.01	0.02	0.02	0.03	0.03	0.01	0.01	0.01	0.03	0.02	0.04	0.03	0.01
[32] <i>N. dassonvillei</i> subsp. <i>dassonvillei</i>	0.02	0.02	0.01	0.02	0.02	0.01	0.02	0.02	0.02	0.02	0.01	0.01	0.03	0.01	0.04	0.03	0.02
[33] <i>N. alkaliphila</i>	0.02	0.03	0.02	0.02	0.02	0.03	0.03	0.03	0.03	0.02	0.02	0.02	0.03	0.02	0.04	0.03	0.01
[34] <i>N. fidesensis</i>	0.02	0.03	0.02	0.03	0.03	0.02	0.03	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.03	0.02	0.03	0.03	0.02
[35] Isolot 5339	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.03	0.03	0.04	0.03	0.02	0.05	0.04
[36] <i>N. halophila</i>	0.05	0.05	0.04	0.04	0.04	0.04	0.05	0.04	0.04	0.05	0.04	0.04	0.05	0.04	0.02	0.05	0.05
[37] <i>N. baichengensis</i>	0.05	0.05	0.04	0.04	0.04	0.05	0.05	0.04	0.04	0.05	0.04	0.04	0.05	0.04	0.02	0.05	0.05
[38] <i>N. corallicola</i>	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.03	0.03	0.04	0.03	0.02	0.05	0.04
[39] <i>N. giiva</i>	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.04	0.05	0.05	0.05	0.05	0.04	0.04	0.05	0.04	0.03	0.05	0.05
[40] <i>N. patens</i>	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.03	0.01	0.04	0.04
[41] <i>N. chromatogenes</i>	0.05	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.05	0.04	0.04	0.05	0.04	0.04	0.05	0.04	0.02	0.05	0.05
[42] <i>N. rosea</i>	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.04	0.04	0.05	0.04	0.03	0.05	0.05

**Tableau 15 (suite)** : matrice de distances génétiques séparant les isolats appartenant au genre *Nocardioopsis* et les espèces représentatives du genre calculées selon Kimura du Logiciel Mega 5.

	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	
[19] <i>N. salina</i>	0.03																								
[20] <i>N. metallicus</i>	0.02	0.03																							
[21] <i>N. xinjiangensis</i>	0.04	0.01	0.04																						
[22] <i>N. nikkonensis</i>	0.04	0.02	0.03	0.02																					
[23] <i>N. dassonvillei</i> subsp. <i>albirubida</i>	0.03	0.02	0.02	0.03	0.02																				
[24] isolat 04	0.02	0.02	0.02	0.03	0.02	0.00																			
[25] isolat 1326	0.02	0.02	0.01	0.03	0.02	0.01	0.01																		
[26] <i>N. alba</i>	0.02	0.02	0.01	0.03	0.02	0.01	0.01	0.01	0.00																
[27] <i>N. halobacterans</i>	0.03	0.02	0.03	0.03	0.02	0.01	0.01	0.01	0.02	0.02															
[28] isolat 524	0.02	0.02	0.01	0.03	0.02	0.01	0.01	0.00	0.00	0.02	0.02														
[29] <i>N. ganjiahuensis</i>	0.02	0.03	0.01	0.03	0.03	0.02	0.02	0.01	0.01	0.03	0.01	0.01													
[30] <i>N. yanglingensis</i>	0.03	0.03	0.02	0.04	0.03	0.03	0.03	0.02	0.02	0.03	0.02	0.02	0.02												
[31] isolat 142	0.02	0.03	0.01	0.04	0.03	0.02	0.02	0.01	0.01	0.03	0.01	0.00	0.02	0.02											
[32] <i>N. dassonvillei</i> subsp. <i>dassonvillei</i>	0.02	0.02	0.02	0.03	0.02	0.01	0.00	0.01	0.01	0.02	0.01	0.02	0.02	0.02	0.03										
[33] <i>N. alkaliphila</i>	0.03	0.03	0.02	0.04	0.03	0.03	0.03	0.02	0.02	0.03	0.02	0.02	0.02	0.02	0.03	0.03									
[34] <i>N. fidesensis</i>	0.03	0.03	0.03	0.03	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.03	0.03	0.02	0.03	0.04	0.04							
[35] isolat 5339	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.03	0.03	0.03	0.04	0.03	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04						
[36] <i>N. halophila</i>	0.05	0.04	0.05	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.05	0.04	0.04	0.05	0.04	0.02	0.02						
[37] <i>N. baichengensis</i>	0.05	0.04	0.05	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.05	0.05	0.05	0.04	0.05	0.04	0.02	0.00	0.00					
[38] <i>N. corallicola</i>	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.03	0.03	0.03	0.04	0.03	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.00	0.02	0.02	0.02				
[39] <i>N. gitva</i>	0.05	0.04	0.05	0.05	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.05	0.05	0.05	0.04	0.05	0.04	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02			
[40] <i>N. potens</i>	0.04	0.04	0.04	0.04	0.03	0.03	0.03	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.03	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.03		
[41] <i>N. chromatogenes</i>	0.05	0.04	0.05	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.05	0.05	0.05	0.04	0.05	0.04	0.02	0.01	0.01	0.02	0.02	0.02	0.02	
[42] <i>N. rosea</i>	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.04	0.04	0.05	0.04	0.04	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.04	0.03	0.02	0.03	0.03	0.01	0.03	0.02	

### 3-1-2 Pouvoir pathogène

Le genre *Nocardiosis* est le genre type de la famille *Nocardiosaceae* proposé par Meyer (1976). Numériquement c'est le genre le plus important de la famille. Le taxon comprend 36 espèces reconnues (Li *et al.*, 2012).

Les bactéries de ce genre sont souvent isolées de l'environnement, mais elles ont également été retrouvées dans le matériel clinique humain ou animale (Yassin *et al.*, 1997, 2009, Hozzein et Trujillo, 2012). Comme la plupart des autres agents pathogènes d'actinomycètes aérobies, les espèces du genre *Nocardiosis* sont opportunistes plutôt que des agents pathogènes envahissants (Yassin *et al.*, 2009).

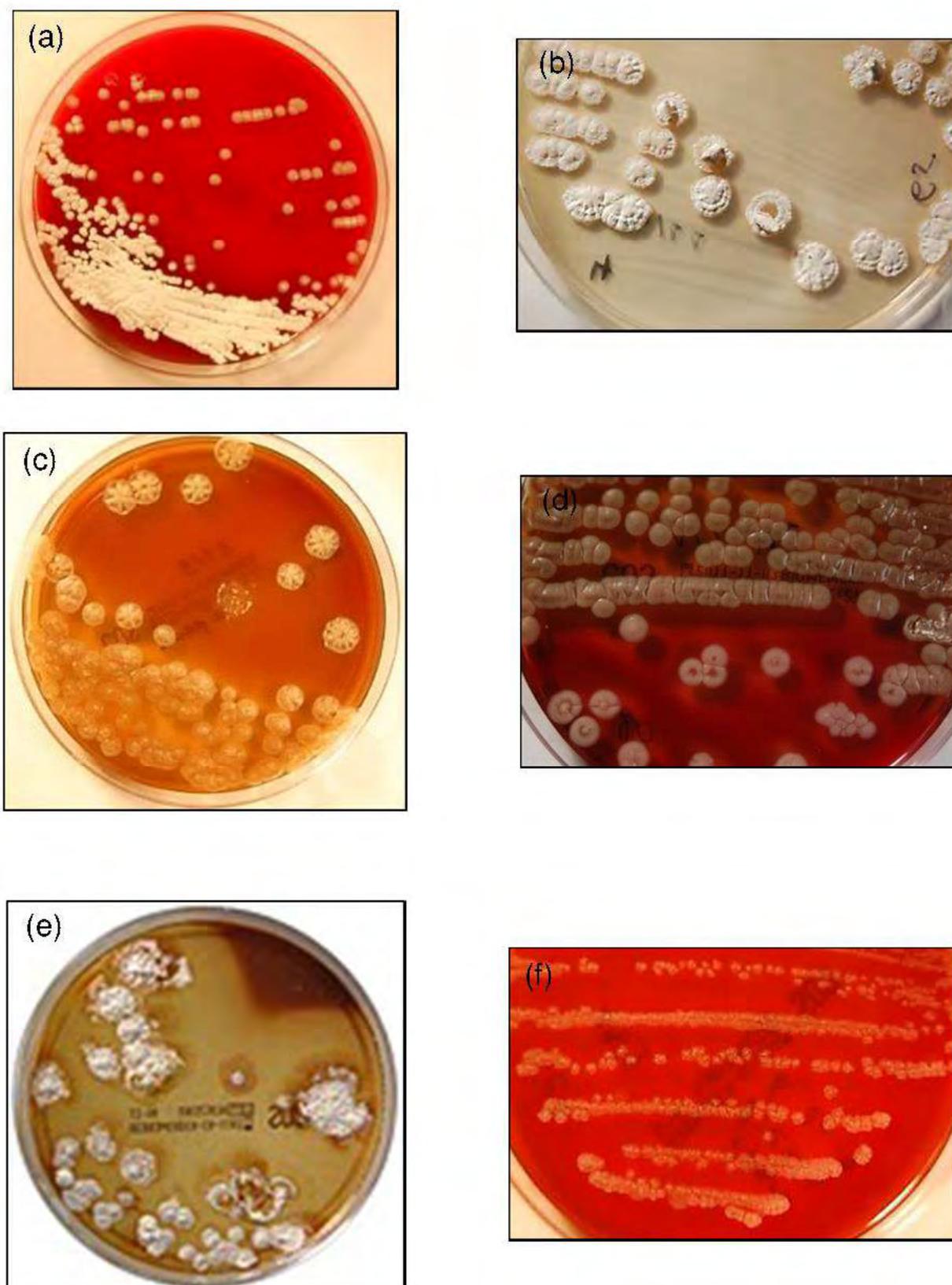
Selon la bibliographie, seul *N. dassonvillei* et *N. synnemataformans* sont impliquées dans les infections humaine.

*N. dassonvillei* est l'espèce type du genre *Nocardiosis*. Selon Hozzein et Trujillo (2012), cette espèce a été rarement impliquée dans les infections humaines, en particulier dans les mycétomes et les infections de la peau ainsi que dans les maladies respiratoires et les conjonctivites. Elle fait même partie des germes impliqués dans les infections nosocomiales (Yassine *et al.*, 2009).

Le premier cas de mycétome causé par *N. dassonvillei* a été publié par Sindhuphak *et al.*, (1985), qui ont isolé à plusieurs reprises des souches de *N. dassonvillei* à partir des nodules au niveau d'une jambe d'un homme âgé de 39 ans. Ajello *et al.*, (1987) ont confirmé la présence de *N. dassonvillei* dans des cas d'actinomycétomes (Hozzein et Trujillo, 2012).

Elle a également été mentionnée dans les infections broncho-pulmonaires par Gugnani *et al.*, (1998) et par Mordarska *et al.*, (1998). Elle a aussi été isolée à partir d'échantillons de sang (Beau *et al.*, 1999 ; Yassine *et al.*, 2009). Elle a été impliquée dans un cas de cellulite du bras (Philip et Robert, 1984) et dans le cas d'une alvéolite (Bernatchez et Lebreux, 1991). Liegard et Landrieu (1911) ont rapporté l'isolement d'une souche correspondant à la description de Brocq-Rousseau (1904) à partir d'un cas de conjonctivite oculaire où ils lui donnèrent le nom de *Nocardia dassonvillei*, qui devint plus tard *Nocardiosis dassonvillei* (Meyer, 1976 ; Hozzein et Trujillo, 2012).

Bien que le pouvoir pathogène de *Nocardiosis synnemataformans* isolé du crachat d'un patient greffé de rein n'ait pu être vérifié, cette espèce est considérée comme un pathogène potentiel (Hozzein et Trujillo, 2012).



**Figure 14** : photographies des cultures des isolats appartenant au genre *Nocardiosis* : (a) isolat **04** sur le milieu COS (gélrose au sang) ; (b) isolat **04** sur *ISP2* ; (c) isolat **142** sur COS ; (d) isolat **6554** sur COS ; (e) isolat **1486** sur COS ; (f) isolat **5339** sur COS.

Gordon et Horan (1968) rapportent que des cultures de *Nocardiopsis* de sources cliniques peuvent être éliminées par ignorance dans des laboratoires cliniques en raison de leur ressemblance macroscopique au genre *Streptomyces*, évoquant des colonies fongiques (Hozzein et Trujillo, 2012).

Nous avons isolé cinq espèces différentes du genre *Nocardiopsis* (annexe 6). L'espèce *N. dassonvillei* a été isolée à partir d'un prélèvement d'ascite qui est un prélèvement d'un site normalement stérile. L'espèce *Nocardiopsis alba* a été isolée à partir de quatre types de prélèvements : crachat, trachéal, ponction articulaire et pus. En effet, l'origine du pus n'est pas connu par conséquent nous ne pouvons pas savoir s'il est de suppuration superficielle ou de collection profonde. Les espèces *N. coralliicola* et *N. tropica* ont été isolées des crachats de deux patients, alors que *N. ganjiahuensis* a été isolée d'un liquide pleural.

D'un autre point de vue, nous avons pu isoler à partir des crachats de trois patients différent, trois différentes espèces du genre *Nocardiopsis* (*N. alba*, *N. coralliicola* et *N. tropica*).

### 3-1-3 Étude morphologique

L'étude morphologique de ces isolats a montré qu'ils poussent très lentement, surtout à l'isolement. Ils se développent sous forme de colonies compactées (figure 14) avec des bords filamenteux, très incrustés dans la gélose, d'aspect corné. Au repiquage, les isolats montrent une bonne et abondante croissance sur tous les milieux de culture utilisés sauf pour le milieu ISP7 où nous avons noté une très faible croissance avec absence totale de production de pigments mélanoides. La couleur des mycéliums de substrat diffère énormément d'une souche à l'autre et d'un milieu de culture à l'autre (figure 14), il est incolore, crème, jaune clair, jaune-olive, brun ou gris (tableau 16).

Généralement le mycélium aérien est blanc. Il confère à la surface des colonies un aspect laineux. D'autres cultures sont abondamment couvertes d'un mycélium aérien en tapis de velours saupoudré de poudre blanche simulant ainsi des cultures de *Streptomyces*. Quelques fois les hyphes aériennes peuvent ne pas être visible à l'œil nu, nécessitant une observation attentive sous un microscope. Dans ces cas, la surface des colonies est grossièrement froissée ou plissée (figure 14). Sur la même figure photo (e), nous observons une hémolyse totale de type  $\beta$  sur le milieu gélose au sang pour l'isolat 1486, d'ailleurs c'est le seul isolat possédant ce caractère hémolytique.

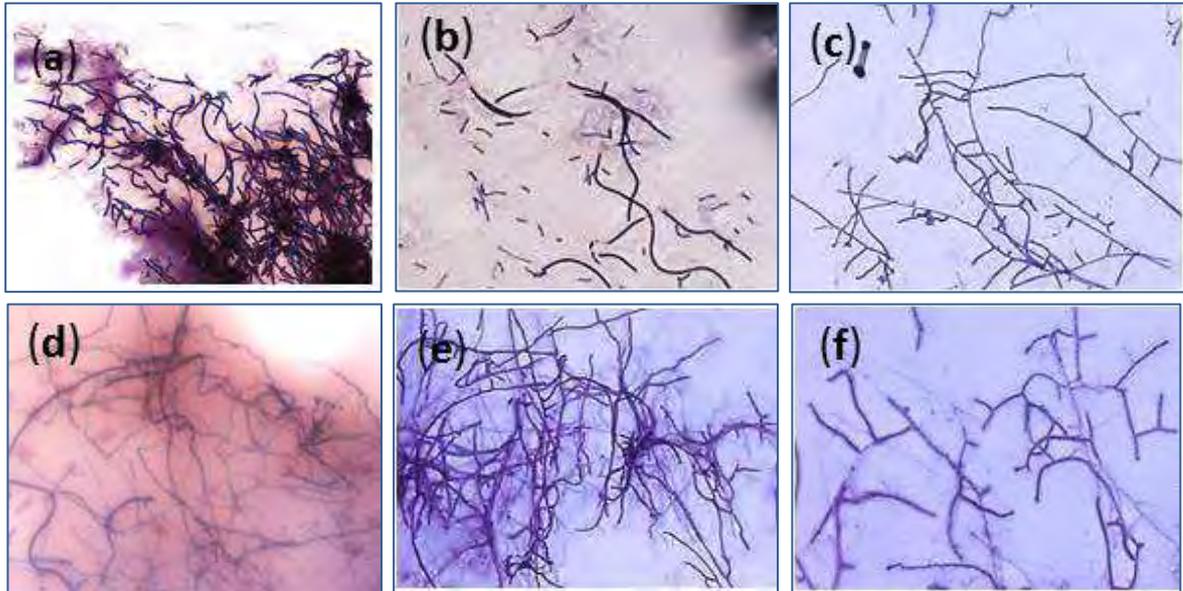
**Tableau 16** : caractères cultureux des huit isolats appartenant au genre *Nocardiosis* sur les différents milieux de culture après 21 jours d'incubation

Souches isolées	Caractéristiques	Milieux de culture						
		Glu-Asp	Spo-Agar	ISP1	ISP2	ISP4	ISP5	ISP7
Souche 142	1 <sup>ère</sup> apparition	5 j	5j	7 j	5 j	7 j	7j	Très faible croissance
	Masse sporale	++ blanche	++ blanche	+/-	++ blanche	+ blanche	+/-	
	Mycélium primaire	++ Jaune claire	++ Jaune claire	+ crème	++ Jaune-olive	+ crème	++ Jaune claire	
	Mycélium secondaire	++ gris	++ gris	+ blanc	++ gris	+ blanc	+ blanc	
Souche 20	1 <sup>ère</sup> apparition	5 j	7 j	7 j	5 j	7j	7 j	Très faible croissance
	Masse sporale	+ blanche	++ blanche	+/-	++ blanche	-	-	
	Mycélium primaire	++ crème	++ jaune	++ crème	++ jaune	++ crème	++ crème	
	Mycélium secondaire	++ blanc	++ blanc	++ blanc	++ blanc	++ blanc	++ blanc	
Souche 524	1 <sup>ère</sup> apparition	5 j	5 j	6 j	5 j	6j	6 j	Très faible croissance
	Masse sporale	+ blanche	+ blanche	+/-	++ blanche	-	-	
	Mycélium primaire	++ crème	++ jaune	++ crème	++ jaune-claire	++ crème	++ crème	
	Mycélium secondaire	++ blanc	++ blanc	++ blanc	++ blanc	++ blanc	++ blanc	
Souche 6554	1 <sup>ère</sup> apparition	4 j	6 j	7 j	4 j	7j	7 j	Très faible croissance
	Masse sporale	+ blanche	++ blanche	-	++ blanche	-	-	
	Mycélium primaire	++ crème	++ crème	+ crème	++ jaune-claire	+ crème	+ crème	
	Mycélium secondaire	++ blanc	++ blanc	+ blanc	++ blanc	+ blanc	+ blanc	
Souche 1326	1 <sup>ère</sup> apparition	5 j	7 j	7 j	5 j	7j	7 j	Très faible croissance
	Masse sporale	+ blanche	++ blanche	+/-	++ blanche	-	-	
	Mycélium primaire	+ crème	+ jaune	++ crème	++ jaune	+ crème	+ crème	
	Mycélium secondaire	+ blanc	+ blanc	+ blanc	+ blanc	+ blanc	+ blanc	

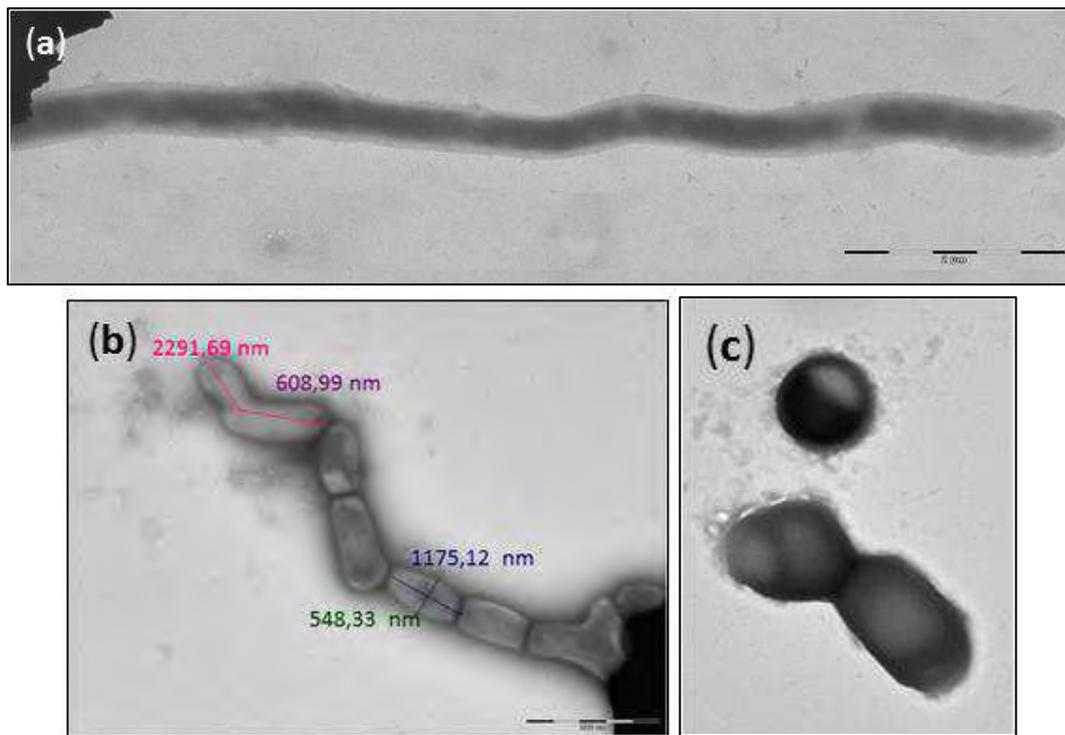
**Tableau 16** (suite) : caractères culturels des huit isolats appartenant au genre *Nocardioopsis* sur les différents milieux de culture après 21 jours d'incubation

Souches isolées	Caractéristiques	Milieux de culture						
		Glu-Asp	Spo-Agar	ISP1	ISP2	ISP4	ISP5	
<b>Souche 5339</b>	1 <sup>ère</sup> apparition	4 j	4 j	7 j	4 j	5 j	5 j	Très faible croissance
	Masse sporale	+	++	-	++	+	+	
	Mycélium primaire	++	++	+	++	++	++	
	Mycélium secondaire	++	++	+/-	++	+	+ blanc	
<b>Souche 4</b>	1 <sup>ère</sup> apparition	4 j	6 j	6 j	4 j	4 j	4 j	Très faible croissance
	Masse sporale	+	+	+/-	+	+	+/-	
	Mycélium primaire	++	++	++ vert-brun	++	++	++	
	Mycélium secondaire	+	+	+	+	+	+	
<b>Souche 1486</b>	1 <sup>ère</sup> apparition	3 j	3 j	3 j	3 j	3 j	3 j	Très faible croissance
	Masse sporale	+/-	++	+/-	+/-	+/-	+/-	
	Mycélium primaire	++	++	++	++	++	++	
	Mycélium secondaire	++	++	+/-	++	+/-	+	

L'observation microscopique montre un mycélium de substrat long, bien développé, et très ramifié alors que le mycélium aérien est long et modérément ramifié (figure 15). Au début de la sporulation, il est plus ou moins en forme de zig-zag (figures 15-c ; 16-a). Il se divise alors en longs segments qui se subdivisent ensuite en petites spores en forme ovale à allongée de tailles irrégulières (0,3-0,5 × 1,0-2,0 μm). Les spores sont lisses et immobiles (figures 16 b et c).



**Figure 15** : observation microscopique des mycélias des isolats appartenant au genre *Nocardiopsis* après coloration de Gram (microscope modèle Leica 2000, programme Leica application 3.3.0) G x100 (technique des lamelles) : (a) isolat **1326** ; (b) isolat **6554** ; (c) isolat **1486** ; (d) isolat **142** ; (e) isolat **04** ; (f) isolat **5339**.



**Figure 16** : photomicrographies électroniques à transmission par coloration négative : (a) montrant un segment de mycélium de l'isolat **04**, la barre représente 5 µm ; (b) montrant des spores de l'isolat **1486** en forme ovale de tailles irrégulières, la barre représente 200 nm ; (c) montrant des spores isolées de surfaces lisses.

### 3-1-4 Étude physiologique

Les résultats des tests physiologiques sont résumés dans le tableau 17. Les souches se développent à des températures optimales entre 30 et 35° C. Les températures extrêmes de culture étant 5 et 45 °C sauf pour les trois isolats 04, 1486 et 142 où nous avons noté une température extrême de 37° C.

Les isolats 5339 et 1486 sont modérément halotolérants (10 % de NaCl) alors que la croissance de la plupart des isolats est inhibée à 6% de NaCl. L'étude de la croissance à différentes valeurs de pH à révéler que l'isolat 142 est alcalophile (pH 8 à 12), alors que l'isolat 04 est neutrophile (pH 7 à 8), tandis que le reste des isolats montrent une croissance à un intervalle de pH plus large (pH 4 à 9).

Toutes les souches sont sensibles aux lysozymes et elles ne poussent pas en présence de CO<sub>2</sub>, sauf pour les isolats 04 et 1485 qui tolèrent 2 % et 5 % de CO<sub>2</sub> respectivement.

Les caractéristiques physiologiques des souches, déterminées, sont en parfaite corrélation avec celles décrites dans les études bibliographiques. En effet La famille regroupe des souches à différentes exigences de température, de salinité et d'alcalinité pour leur croissance. Elle comprend des thermotolérantes et des thermophiles, des halotolérantes et modérément halophiles, ainsi que des souches alcalophiles ou alcalotolérantes ce qui les rends très utiles en biotechnologie et en médecine (Kroppenstedt et Evtushenko, 2006).

**Tableau 17** : caractères physiologiques des huit isolats appartenant au genre *Nocardiopsis*

caractères	Isolats							
	20	524	1326	6554	04	5339	1486	142
NaCl (%)	0-5	0-5	0-5	0-5	0-5	0-10	0-10	0-8
pH	6-9	4-9	5-9	4-9	7-8	6-8	5-10	8-12
T °C max.	45	45	45	45	37	45	37	37
CO <sub>2</sub> (%)	0	0	0	0	2	0	5	0
Lysozyme (µg/ml)	50	50	50	50	25	50	50	25

## 3-2 Le genre *Murinocardiopsis*

### 3-2-1 Étude phylogénétique de la souche 5110

Les résultats du BLAST des séquences du gène rRNA 16S montrent que l'isolat 5110 est affilié au genre *Murinocardiopsis* (tableau 13).

Mu.ri.no.car'di.op'sis. est un nom féminin formé par la composition de deux mots : « *murus* » qui signifie en français le mur et « *Nocardiopsis* » qui est le nom d'un genre bactérien ; *Murinocardiopsis* signifie un organisme semblable à *Nocardiopsis* isolé d'un mur. Ce genre est l'un des cinq genres de la famille *Nocardiopsaceae*.

L'isolat 5110 partage un pourcentage d'identité égale à 98,94 % avec l'espèce *Murinocardiopsis flavida* (tableau 13), qui représente l'espèce type et l'unique espèce du genre *Murinocardiopsis*. Ce genre bactérien a été proposé, en 2010, par Kämpfer *et al.*, sur l'arbre phylogénétique, les deux souches se placent sur la même ligne phylogénétique avec un bootstrap de 99% (figure 13).

Cet arbre permet de mieux visualiser l'affiliation de la souche 5110. Les alignements des séquences d'ADNr sont réalisés par CLUSTAL W 1.8 (Thompson *et al.*, 1994). L'arbre est construit en utilisant le logiciel Mega (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) version 5 (Tamura *et al.*, 2011) à partir de Neighbor-Joining en utilisant le test de « bootstrap » (nombres sur les branches) de 1000 répliques en utilisant la correction de Kimura à deux paramètres (Kimura, 1980) qui repose sur l'hypothèse que les transitions se produisent à des taux plus élevés que les transversions : le poids des transversions est double par rapport à celui des transitions.

### 3-2-2 Pouvoir pathogène

L'isolat 5110 a été isolé du crachat d'un homme adulte admis au service de pneumologie (annexe 6). À ce jour, *Murinocardiopsis* n'est pas reconnu comme genre regroupant des souches pathogènes. En effet l'espèce *Murinocardiopsis flavida* est représentée par les deux souches 14-Be-013T et 02-Gi-014. Elles sont toutes les deux isolées des murs. La souche 14-Be-013T a été isolée à partir d'un papier peint d'un mur de maison (à Berlin, en Allemagne) colonisé par les moisissures. La souche 02-Gi-014, a été isolée à partir d'un matériau isolant pour un mur de maison (à Giessen, en Allemagne) fortement colonisés par les moisissures.

**Tableau 18** : caractères cultureux de l'isolat 5110 sur les différents milieux de culture après 7, 14 et 21 jours

Durée d'incubation	Caractéristiques	Milieux de culture						
		Glu-Asp	Spo-Agar	ISP1	ISP2	ISP4	ISP5	ISP7
<b>7 jours</b>	1 <sup>ère</sup> apparition	7	7	6	7	-	-	-
	Masse sporale	-	-	-	-	-	-	-
	Mycélium primaire	Blanc	Crème	Crème	Crème	-	-	-
	Mycélium secondaire	-	-	-	-	-	-	-
<b>14 jours</b>	Degrés de croissance	++	+	++	++	+/-	+/-	+/-
	Masse sporale	-	+/-	+/-	-	-	-	-
	Mycélium primaire	++ blanc	+ crème	++ crème	++ crème	+/- neutre	+/- crème	-
	Mycélium secondaire	-	+/- crème	+ crème	+ crème	-	-	-
<b>21 jours</b>	Degrés de croissance	+	++	++	++	+/-	+/-	
	Masse sporale	-	+/- Jaune-claire	++ Jaune-claire	+/- Jaune-claire	-	-	+/- pas de pigment mellanoïde
	Mycélium primaire	++ blanc	++ jaune	++ crème	++ jaune	+/- neutre	+/- crème	
	Mycélium secondaire	-	++ jaune	++ crème	++ crème	-	+/- crème	

### 3-2-3 Étude morphologique de la souche 5110

Les analyses morphologiques sont importantes en taxonomie microbienne, elles sont généralement faciles à étudier et sont bien significatives vu que les critères morphologiques dépendent de l'expression de gènes qui sont souvent génétiquement stables.

Huit milieux de cultures ont été utilisés : Milieux ISP1, ISP2, ISP4, ISP5, ISP7, la gélose au sang, le milieu Bennett, le milieu sporulation agar et le milieu glucose asparagine. Ces différents milieux sont généralement utilisés pour les bactéries actinomycètes du genre *Streptomyces* (Shirling et Gottlieb, 1966).

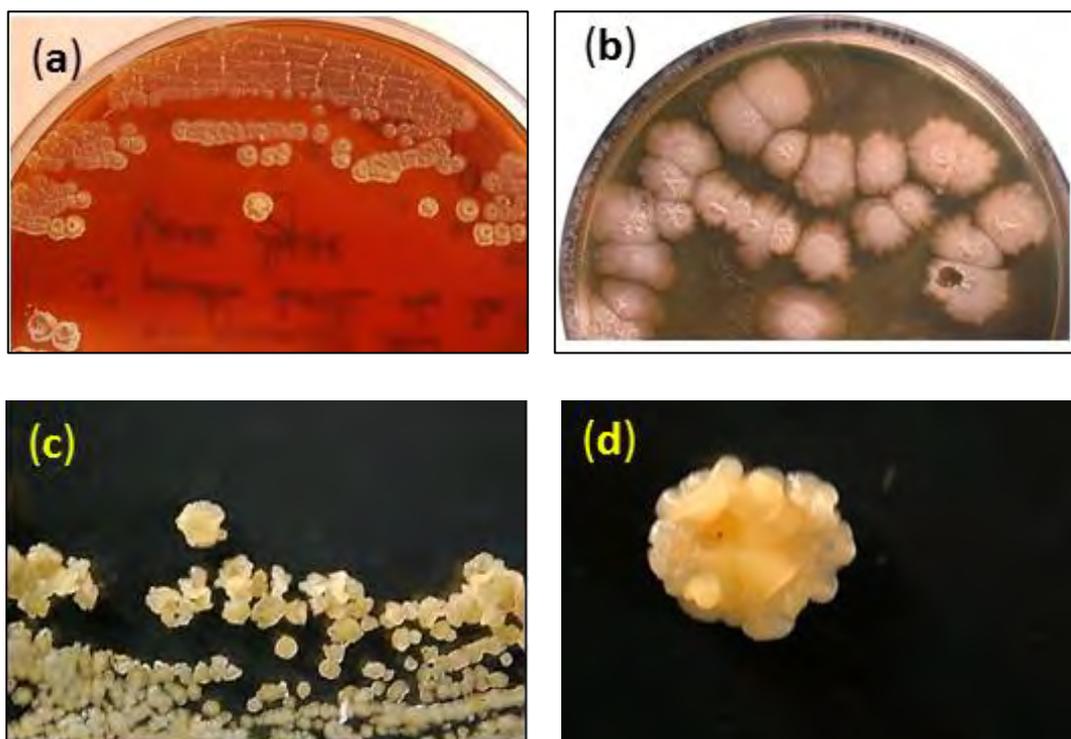
Sur le milieu Bennett, l'isolat 5110 se développe lentement et forme des piles irrégulières de colonies crème et opaque. Les colonies surélevées de contour irrégulier croissent avec une texture de surface érodée. Elles adhèrent fermement au milieu où elles forment une légère dépression. Elles sont difficiles à mettre en suspension et restent intactes lorsque nous essayons d'en faire un étalement.

Après ensemencement sur les différents milieux de culture, l'isolat 5110 apparaît très lentement, plus de 10 jours d'incubation pour la plupart des milieux. Les colonies se développent avec différents degrés de croissance allant d'une croissance faible à une croissance abondante (tableau 18). La souche ne produit aucun pigment diffusible. L'aspect des colonies est très influencé par la composition des milieux (figure 17).

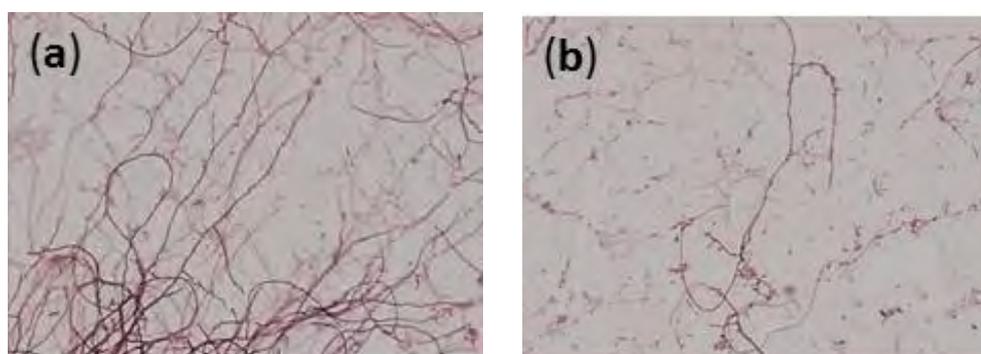
Sur la gélose au sang, les colonies de 2 à 5 mm de diamètre sont rondes à bords irréguliers, de couleur crème et forme des cratères d'aspect corné (figure 17).

Sur le milieu sporulation agar (figure 17), la souche forme des colonies de 1 à 5 mm de diamètre à contour irrégulier, empilées en colonnes cannelées avec un développement très important du mycélium aérien, de couleur jaune. La souche développe après une longue période d'incubation (supérieure à 40 jours) une faible masse sporale de couleur blanche.

L'observation microscopique au grossissement x100 a révélé la présence de longs et fins filaments de substrat enchevêtrés très ramifiés à coloration de Gram positive et des filaments aériens très fins et peu ramifiés (figure 18).



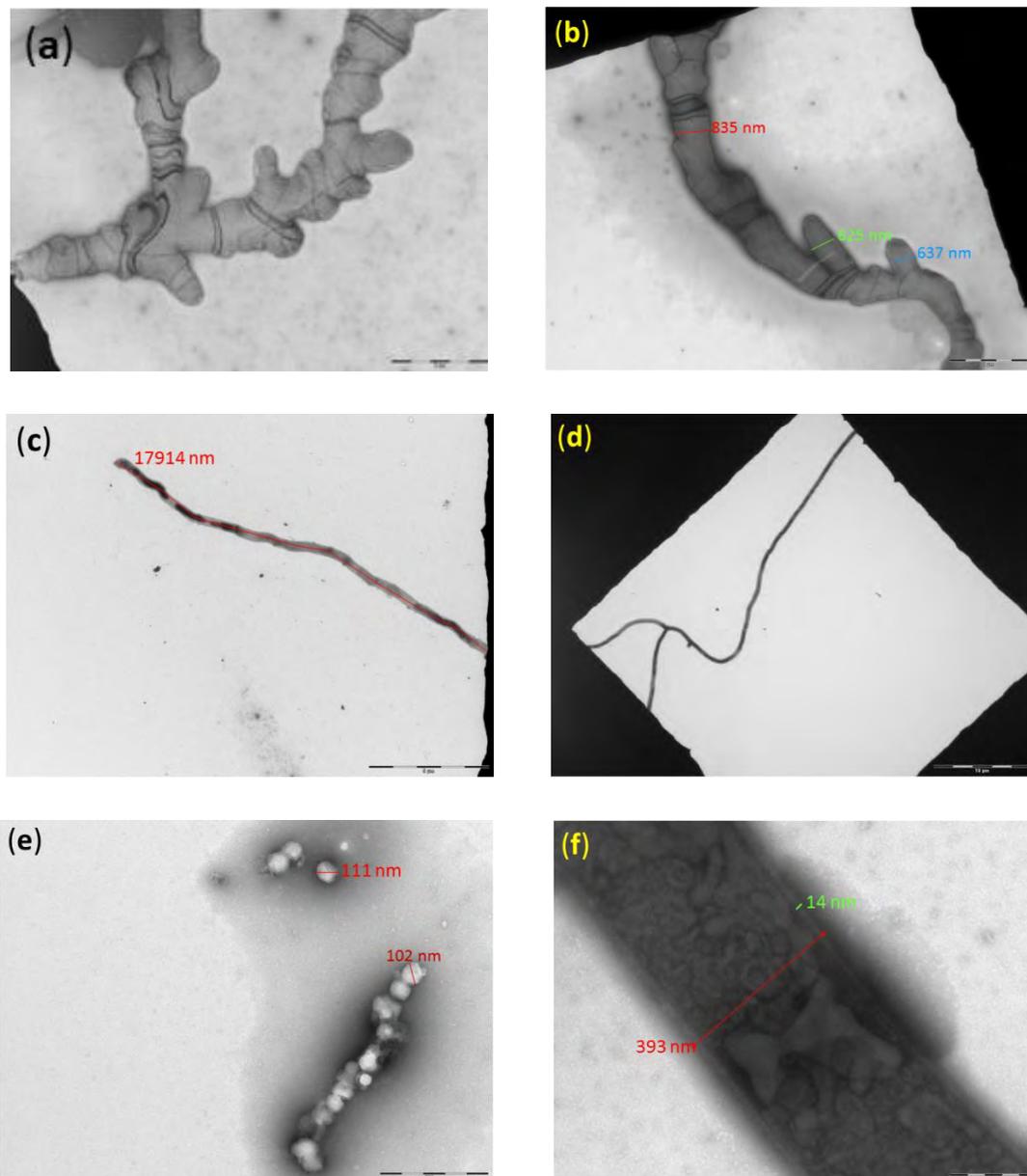
**Figure 17** : photographies des cultures de l'isolat **5110** (a) culture de 30 jours sur la gélose au sang, (b) culture de 30 jours sur le milieu glucose asparagine, (c) culture de 21 jours sur le milieu sporulation agar.



**Figure 18** : L'isolat **5110** en microscopie optique après coloration de Gram (microscope modèle Leica 2000, programme Leica application 3.3.0) grandissement x100 (technique des lamelles, culture sur le milieu *ISP2*). **a**: mycélium du substrat ; **b**: mycélium aérien.

Les observations en microscopie électronique à transmission ont également permis de mettre en évidence la présence de mycélia cloisonnés et très ramifié (figure 19). Ces derniers se présentent sous forme de filament de diamètre irrégulier (Figure 19).

Par contre le mycélium secondaire est long non cloisonné, peut ramifier de 393 à 486 nm de diamètre avec une paroi de 14 nm d'épaisseur (figure 19).



**Figure 19** : photomicrographies électroniques à transmission par coloration négative de l'isolat 5110. (a et b) montrant les cloisons et les ramification du mycélium du substrat, les barres représentent 2  $\mu\text{m}$ . (c et d) montrant le mycélium aérien qui est long, non cloisonné et peut ramifié, les barres représentent 5 et 10  $\mu\text{m}$  respectivement. (e) montrant des spores isolées et d'autres en chaîne de formes arrondies, la barre représente 500 nm. (f) montrant les dimensions de la paroi cellulaire, la barre représente 200 nm.

### 3-2-4 Étude physiologique de la souche 5110

La souche 5110 se développe dans une gamme de température entre 5 et 40°C avec un maximum entre 28 et 30°C. Elle tolère 10 % de NaCl et montre une croissance à pH entre 4 et 9. Elle peut croître dans une atmosphère enrichie de 2,5 % de CO<sub>2</sub> mais pas à 5 % de CO<sub>2</sub> ni en anaérobiose. Elle est également sensible aux lysozymes.

### 3-2-5 Étude chimiotaxonomique de la souche 5110

La chimiotaxinomie est un test d'une grande importance dans la taxinomie des actinomycètes vu que chaque genre possède une composition spécifique en glycolipides en lipides polaire, en ménaquinone et en acides gras. Pour la classification et l'identification des actinomycètes, trois sortes de lipides sont généralement recherchées : les acides gras à longue chaîne, les ménaquinones et les phospholipides (Minnikin et Goodfellow, 1981).

L'analyse de ses constituants pour l'isolat 5110 a été effectuée par l'équipe du Dr. Susanne Verbarq du DSMZ (service d'identification de la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Allemagne.) selon les techniques de Kuykendall *et al.*, (1988) ; Miller, (1982) et Bligh et Dyer, (1959).

#### 3-2-5-1 Les phospholipides

L'analyse des phospholipides a montré la présence de phosphatidyl choline (PC), de diphosphatidyl glycérol (DPG), de phosphatidyl glycérol (PG), de phospholipides non identifiés (PL) et deux glycolipides non identifiés (GL) dans les parois cellulaires de l'isolat 5110 (figure 20). La phosphatidylmethyl éthanolamine, retrouvée dans la plupart des espèces des genres *Nocardiosis* et *Thermobifida* mais pas chez les espèces des genres *Streptomonospora*, *Haloactinospora* ou *Marinactinospora*, n'a pas été détectée. Par contre la souche 5110 contient un phospholipide inconnu et un glycolipide inconnu avec des valeurs de R<sub>f</sub> similaires qui sont supérieures à celle du diphosphatidyl glycérol et un autre glycolipide inconnu avec une valeur de R<sub>f</sub> similaire à celle de la phosphatidyl choline. En plus la souche 5110 ne contient pas de phosphatidyl inositol au contraire de la souche *Murinocardiosis flavida*. A ce propos, il est à noter que la composition des membranes cellulaires en phospholipides a permis de diviser les actinomycètes en 5 types (Lechevalier *et al.*, 1977) :

- Type P I, il se distingue par l'absence de phospholipides azotés tels que la phosphatidyl éthanolamine (PE) et la phosphatidyl choline (PC). Ex: *Spirillospora*, *Actinomadura*.
- Type P II, il est caractérisé par la présence de la PE. Ex: *Streptomyces Saccharothrix*, *Nocardia*, *Amycolatopsis*, *Spirillospora*.
- Type P III, présence de la PC. Ex : *Nocardiopsis*, *Saccharopolyspora*.
- Type P IV, présence de PE et de phospholipides contenant de la glucosamine (PG). Ex : *Streptosporangium*, *Planomonospora*, *Saccharothrix*.
- Type PV, présence de PG et de phosphatidyl glycérol. Ex : *Oerskovia*, *Cellulomonas*, *Promicromonospora*.

Ainsi, nous pouvons conclure que la paroi de la souche 5110, est une paroi des actinomycètes de type PII et du genre et conforme à celle du genre *Murinocardiopsis* mais différente de celle de l'espèce *Murinocardiopsis flavida*.

### **3-2-5-2 Les acides gras**

Les acides gras constituent les éléments essentiels des lipides cellulaires chez les bactéries et leur proportion majeure est localisée au niveau des membranes cellulaires (Kroppenstedt, 1985). En se basant sur la composition cellulaire en acides gras, les actinomycètes se divisent en trois groupes majeurs :

- type à acides gras iso et anteiso : c'est la composition en acide gras la plus rencontrée chez les bactéries à coloration de Gram positive et plusieurs genres d'actinomycètes ont ce type de composition (Okami *et al.*, 1968).
- type à chaînes linéaires mono-insaturées : les chaînes longues 16 :1 et 18 :1 sont les acides gras dominants dans ce type. Généralement, les chaînes sont branchées à des acides 10-méthyliques et en particulier l'acide 10-méthyl octadécanoïque (Suzuki, 1988).
- type complexe : dans ce type, la composition en acides gras est constituée non seulement par des acides iso et anteiso mais aussi par des acides gras à chaîne linéaire monoinsaturée et des acides 10-méthyliques.

Le profil des acides gras de la souche 5110 (tableau 19) présente des acides gras dominants : iso-C<sub>16:0</sub> (25,95 %), suivi de l'anteiso-C<sub>17:0</sub> (12,83 %) et de C<sub>18:1 ω9c</sub> (17,28 %). Ces acides gras et leur pourcentage de présence dans la paroi de cette souche sont semblables à ceux de la bactérie de *Murinocardiopsis flavida* sp. nov., la paroi de cette dernière possède une composition en acides gras comme suit : iso-C<sub>16:0</sub> (24.4 %), anteiso-C<sub>17:0</sub> (18.0 %) et C<sub>18:1 ω9c</sub> (24.5 %) (Kämpfer *et al.*, 2010).

Les acides gras mineurs présents dans la paroi de la souche 5110 sont : l' iso-C<sub>14:0</sub> (2,26 %), l' anteiso-C<sub>15:0</sub> (8,5%), le C<sub>16:0</sub> (5,24 %), l' iso-C<sub>17:0</sub> (1,68 %), le C<sub>17:1 ω8c</sub> (8,90 %), le C<sub>17:0</sub> (1,37 %), le 10-methyl C<sub>17:0</sub> (1,64 %), l' iso-C<sub>18:0</sub> (0,50 %), le C<sub>18:0</sub> (1,60 %) et le 10-methyl C<sub>18:0</sub> (2,40 %), comparables à ceux de la souche *Murinocardiopsis flavida* dont la paroi est constituée des acides gras suivants : l' iso-C<sub>14:0</sub> (1.4 %), l' anteiso-C<sub>15:0</sub> (6.2 %), le C<sub>16:0</sub> (4.3 %), l' iso-C<sub>17:0</sub> (1.0 %), le C<sub>17:1 ω8c</sub> (5.3 %), le C<sub>17:0</sub> (0.9 %), le C<sub>16:1 ω6c</sub> (2.5 %), , le 10-methyl C<sub>17:0</sub> (1.6 %), l' iso-C<sub>18:0</sub> (1.0 %), le C<sub>18:0</sub> (3.5 %) et le 10-methyl C<sub>18:0</sub> (3.8 %) . La différence de la composition de la paroi en acide gras de la souche 5110 et *Murinocardiopsis flavida* réside dans le fait que le C<sub>16:1 ω6c</sub> présent dans la paroi de *Murinocardiopsis flavida* avec un pourcentage de (2.5 %) alors qu'il est absent chez la souche 5110, par contre cette dernière elle possède dans sa paroi le C<sub>16:1 ω7c</sub> (5,81 %), l' iso C<sub>15:0</sub> (1,80 %), le C<sub>15:0</sub> (1,11 %), le 10-methyl C<sub>16:0</sub> (0,76 %), le C<sub>14:0</sub> (0,44 %), et l' anteiso-C<sub>13:0</sub> (0,27 %) absents chez *Murinocardiopsis flavida*.

D'après ces données, nous pouvons conclure que la paroi de la souches 5110 est de type iso et ante-iso caractéristique de la plupart des actinomycètes (Okami *et al.*, 1968). De plus, la paroi de la souche étudiée a une composition en acides gras du genre *Murinocardiopsis* mais elle est différente de celle de la souche *Murinocardiopsis flavida*.

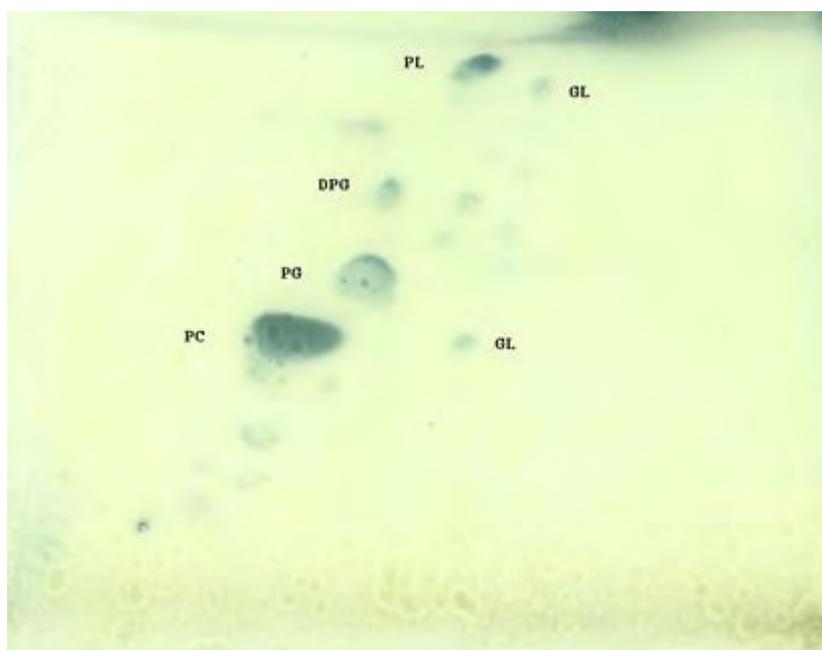
### 3-2-5-3 Les menaquinones

La membrane de la souche 5110 contient le MK-11(H<sub>6</sub>), le MK-11(H<sub>8</sub>), le MK-12(H<sub>6</sub>) et le MK-12(H<sub>8</sub>) à des proportions, respectives, de 25,9 : 23,3 : 2,7 : 2,3 (tableau 19) qui ne sont pas présentes chez la souche 14-Be-013T. La membrane de cette dernière contient les MK-12(H<sub>2</sub>) avec un pourcentage de 12% alors qu'elles sont complètement absentes chez la souche 5110. La présence de MK-10(H<sub>4</sub>) chez la souche 14-Be-013T comme la plus importante ménaquinone avec un rapport de 33 alors

qu'elle est présente chez la souche 5110 comme composant minoritaire avec un rapport inférieur à 2 %.

Les résultats de cette confrontation ont révélé que les deux souches (5110 et *Murinocardiopsis flavida*) sont très différentes.

Comme nous venons de le développer par les études morphologiques et chimiotaxonomiques, nous pouvons conclure que la souche étudiée est bien une actinomycète appartenant au genre *Murinocardiopsis*. Ces données confirment en réalité les résultats obtenus lors des travaux antérieurs se rapportant à la détermination et l'analyse de la séquence nucléotidique des gènes ARN 16S de cette souche.

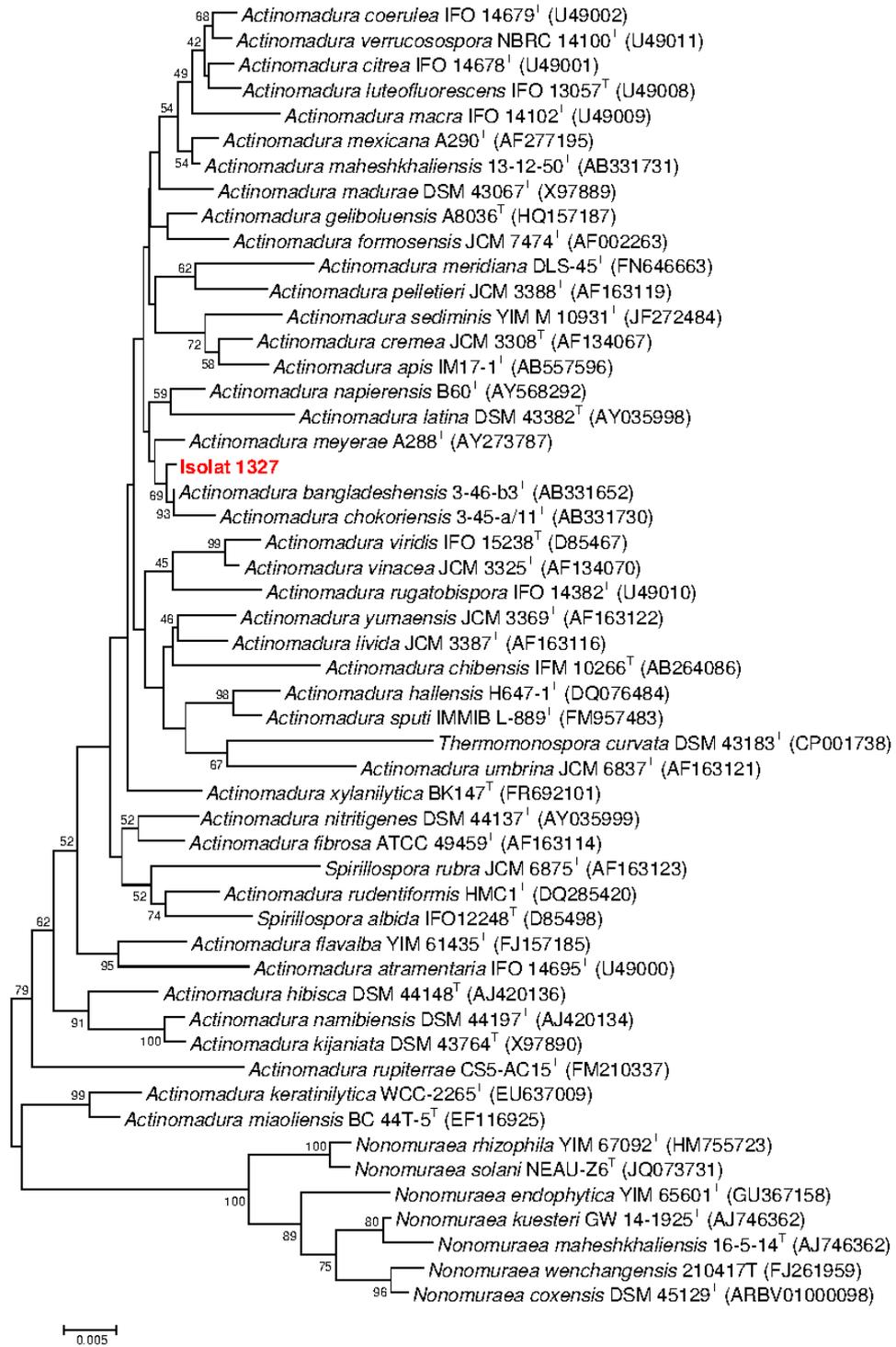


**Figure 20** : chromatographie bidimensionnelle sur couche mince de gel de silice des lipides polaires extraits de l'isolat 5110. DPG (Diphosphatidyl glycérol), PG (Phosphatidyl glycérol), PC (Phosphatidyl cholin), PL (Phospholipids non identifié), GL (Glycolipid non identifié).

D'après le tableau 19 et en adoptant une approche polyphasique c'est-à-dire les résultats de l'analyse moléculaire, chimiotaxonomiques, culturels, microscopique et physiologiques de la souche 5110 nous permettent de conclure que notre isolat est différent de *Murinocardiopsis flavida* et représente une nouvelle espèce de ce genre.

**Tableau 19 :** quelques caractéristiques phénotypiques, physiologiques et chimiotaxonomiques qui différencient la souche 5110 de *Murinocardiopsis flavida*

Characteristic	Isolat 5110	<i>Murinocardiopsis flavida</i>
Mycelium aérien	+	-
Mycélium du substrat	+	+
Température de croissance (C°)		
- optimale de croissance	28-30	28
- Maximum toléré	40	34
pH de croissance	4-9	5-9
Tolérance à NaCl (%)	0-10	0-11
Croissance en présence du CO <sub>2</sub> (%)	0-2,5	ND
Sensibilité au lysozyme	+	ND
Chimiotaxonomie :		
-Menaquinones dominants	MK-11(H <sub>6</sub> ), MK-11(H <sub>8</sub> ), MK-10(H <sub>8</sub> ), MK-10(H <sub>6</sub> ), MK-11(H <sub>4</sub> ), MK-12(H <sub>6</sub> )	MK-10(H <sub>4</sub> ), MK-11(H <sub>4</sub> ), MK-12(H <sub>2</sub> )
	MK-12(H <sub>8</sub> )	MK-10(H <sub>8</sub> )
-Acides gras dominants (>10 %)	iso-C <sub>16:0</sub> , anteiso-C <sub>17:0</sub> , C <sub>18:1</sub> ω9c	iso-C <sub>16:0</sub> , anteiso-C <sub>17:0</sub> , C <sub>18:1</sub> ω9c
-Lipides polaires	PC, DPG, PG, PL, GL	PC, PG, PI, DPG, PL1, PL2, GL



**Figure 21** : arbre selon la méthode des distances (Neighbor-Joining) construit d’après l’analyse des séquences du gène qui code pour l’ARNr 16S en utilisant le logiciel Mega (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) version 5 (Tamura *et al.*, 2011) montrant la position phylogénétique de l’isolat **1327** parmi les espèces du genres *Actinomadura*. La matrice des distances est calculée selon le modèle Kimura à 2 paramètres (Kimura, 1980). Les valeurs mentionnées à l’origine des nœuds représentent les pourcentages supérieurs à 40 % de 1000 bootstrap. 0,005 représente le nombre de substitution par position de nucléotide.-

### 3-3 Le genre *Actinomadura*

#### 3-3-1 Etude phylogénétique de la souche 1327

Les résultats du BLAST des séquences du gène rRNA 16S montrent que l'isolat 1327 est affilié au genre *Actinomadura* (tableau 13).

ac.ti.no.ma.du'ra. « *actis* » « *actinos* » qui signifie rayons ; « *Madura* » *madura*, nom d'une province en inde ; donc *Actinomadura* se référant au premier agent étiologique de la maladie « pied de *madura* ». Le genre *Actinomadura* proposé par Lechevalier et Lechevalier en 1970 est le troisième genre de la famille *Thermomonosporaceae* (Trujillo et Goodfellow, 2012).

Pour élucider la position phylogénétique de l'isolat 1327, un arbre phylogénétique non enraciné a été construit par la méthode des distances Neighbor-Joining (NJ) (Saitou et Nei, 1987) à l'aide du logiciel Mega version 5 (Tamura *et al.*, 2011) (figure 21). L'isolat 1327 occupe le même clade qu'*Actinomadura bangladeshensis*, *Actinomadura meyeri* A288<sup>T</sup> (AY273787) et *Actinomadura chokoriensis*, il occupe une ligne phylogénétique indépendante. Si nous nous référons aux pourcentages d'identités, Il semble plus proche de l'espèce *Actinomadura meyeri* (99,51 %) que les espèces *Actinomadura geliboluensis* (98,98 %), *Actinomadura chokoriensis* (98,91 %) et *Actinomadura bangladeshensis* (98,45 %) (tableau 13).

Encore pour mieux cerner l'affiliation de la souches 1327 aux espèces connues du genre *Actinomadura*, des calculs de distance génétique entre les séquences des gènes d'ARN ribosomiaux ont été entrepris selon le test de Kimura. Le résultat de cette étude est représenté dans le tableau 20. Les distances génétiques qui séparent l'isolat 1327 des souches de références sont variables. La souche 1327 semble être plus liée à *Actinomadura bangladeshensis* avec une distance de 0,00157 qu'à *Actinomadura meyeri*, *Actinomadura geliboluensis* et *Actinomadura chokoriensis* et ceci malgré le fait que la séquence du gène d'ARNr soit similaire à 99,51 %, 98,98 % et 98,91 avec celles des trois espèces précédentes respectivement.

Tableau 20 : matrice des distances calculées à partir des séquences de l'ARNr 16S des bactéries du genre *Actinomadura*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
[1] <i>A. coerulea</i>																					
[2] <i>A. keratinolytica</i>	0.0371																				
[3] <i>A. xyloxylytica</i>	0.0151	0.0338																			
[4] <i>A. hallensis</i>	0.0248	0.0313	0.0207																		
[5] <i>A. seifimnis</i>	0.0207	0.0363	0.0224	0.0280																	
[6] <i>A. rudentiformis</i>	0.0256	0.0288	0.0224	0.0289	0.0240																
[7] <i>A. rufiterae</i>	0.0454	0.0354	0.0429	0.0362	0.0446	0.0313															
[8] <i>A. chibensis</i>	0.0305	0.0387	0.0272	0.0272	0.0338	0.0330	0.0396														
[9] <i>A. meyerae</i>	0.0127	0.0305	0.0135	0.0175	0.0159	0.0184	0.0362	0.0223													
[10] <i>A. rapierensis</i>	0.0159	0.0330	0.0119	0.0207	0.0199	0.0192	0.0371	0.0223	0.0095												
[11] <i>A. mexicana</i>	0.0087	0.0346	0.0119	0.0223	0.0191	0.0240	0.0420	0.0288	0.0111	0.0127											
[12] <i>A. maheshkhaliensis</i>	0.0055	0.0330	0.0103	0.0207	0.0167	0.0216	0.0412	0.0264	0.0087	0.0119	0.0032										
[13] <i>A. cremea</i>	0.0167	0.0338	0.0159	0.0264	0.0111	0.0232	0.0429	0.0313	0.0151	0.0151	0.0151	0.0127									
[14] <i>A. yunnanensis</i>	0.0191	0.0338	0.0151	0.0167	0.0248	0.0232	0.0379	0.0199	0.0127	0.0151	0.0167	0.0135	0.0207								
[15] <i>A. livida</i>	0.0167	0.0329	0.0159	0.0248	0.0264	0.0354	0.0199	0.0143	0.0151	0.0143	0.0127	0.0151	0.0103	0.0297							
[16] <i>A. meridiana</i>	0.0240	0.0446	0.0297	0.0354	0.0273	0.0281	0.0496	0.0305	0.0199	0.0248	0.0224	0.0215	0.0281	0.0297	0.0297						
[17] <i>A. bangladeshensis</i>	0.0135	0.0305	0.0127	0.0183	0.0167	0.0159	0.0338	0.0207	0.0055	0.0079	0.0119	0.0095	0.0143	0.0143	0.0127	0.0183					
[18] <i>A. citrea</i>	0.0055	0.0379	0.0135	0.0256	0.0215	0.0264	0.0445	0.0297	0.0135	0.0151	0.0047	0.0047	0.0175	0.0183	0.0175	0.0232	0.0143				
[19] <i>A. pellettieri</i>	0.0207	0.0379	0.0232	0.0289	0.0216	0.0232	0.0396	0.0280	0.0175	0.0199	0.0191	0.0167	0.0175	0.0183	0.0143	0.0199					
[20] <i>A. geliboluensis</i>	0.0135	0.0289	0.0135	0.0175	0.0175	0.0216	0.0379	0.0223	0.0055	0.0111	0.0119	0.0095	0.0167	0.0143	0.0143	0.0183					
[21] <i>A. lafina</i>	0.0280	0.0404	0.0224	0.0297	0.0273	0.0265	0.0429	0.0297	0.0175	0.0151	0.0232	0.0240	0.0248	0.0256	0.0256	0.0256	0.0199				
[22] <i>A. macra</i>	0.0119	0.0421	0.0207	0.0297	0.0240	0.0273	0.0462	0.0329	0.0175	0.0215	0.0151	0.0143	0.0224	0.0264	0.0231	0.0256	0.0159	0.0111	0.0224	0.0183	0.0280
[23] <i>A. chakarjensis</i>	0.0175	0.0346	0.0167	0.0223	0.0207	0.0200	0.0379	0.0248	0.0095	0.0119	0.0159	0.0135	0.0183	0.0183	0.0167	0.0224	0.0039	0.0183	0.0183	0.0103	0.0191
[24] isolat_1327	0.0135	0.0321	0.0143	0.0199	0.0159	0.0167	0.0346	0.0223	0.0135	0.0079	0.0119	0.0135	0.0143	0.0143	0.0175	0.0016	0.0143	0.0151	0.0151	0.0151	0.0151
[25] <i>A. apis</i>	0.0191	0.0272	0.0208	0.0297	0.0143	0.0159	0.0354	0.0338	0.0175	0.0183	0.0175	0.0151	0.0079	0.0232	0.0215	0.0306	0.0167	0.0200	0.0184	0.0273	
[26] <i>A. luteofluorescens</i>	0.0063	0.0371	0.0143	0.0248	0.0224	0.0265	0.0454	0.0305	0.0127	0.0159	0.0087	0.0055	0.0183	0.0175	0.0167	0.0272	0.0135	0.0055	0.0224	0.0135	0.0281
[27] <i>A. nitrigenes</i>	0.0183	0.0272	0.0159	0.0240	0.0264	0.0175	0.0370	0.0305	0.0151	0.0159	0.0175	0.0159	0.0232	0.0191	0.0215	0.0297	0.0151	0.0207	0.0273	0.0151	0.0256
[28] <i>A. rugatobispora</i>	0.0191	0.0363	0.0215	0.0272	0.0256	0.0240	0.0412	0.0321	0.0183	0.0159	0.0223	0.0199	0.0232	0.0256	0.0207	0.0305	0.0151	0.0199	0.0183	0.0199	0.0280
[29] <i>A. albida</i>	0.0289	0.0321	0.0224	0.0305	0.0298	0.0135	0.0371	0.0380	0.0240	0.0216	0.0232	0.0248	0.0248	0.0272	0.0256	0.0355	0.0184	0.0297	0.0281	0.0224	0.0298
[30] <i>A. curvata</i>	0.0421	0.0421	0.0380	0.0306	0.0388	0.0421	0.0446	0.0396	0.0363	0.0396	0.0388	0.0371	0.0355	0.0355	0.0322	0.0429	0.0338	0.0421	0.0380	0.0355	0.0455
[31] <i>A. verrucosospora</i>	0.0039	0.0363	0.0143	0.0240	0.0215	0.0240	0.0445	0.0296	0.0119	0.0151	0.0095	0.0063	0.0175	0.0183	0.0159	0.0231	0.0127	0.0063	0.0215	0.0127	0.0272
[32] <i>A. fibrosa</i>	0.0135	0.0280	0.0143	0.0256	0.0224	0.0151	0.0379	0.0338	0.0167	0.0175	0.0127	0.0095	0.0175	0.0191	0.0199	0.0297	0.0159	0.0143	0.0232	0.0167	0.0281
[33] <i>A. formosensis</i>	0.0135	0.0330	0.0175	0.0248	0.0200	0.0216	0.0454	0.0288	0.0119	0.0135	0.0103	0.0095	0.0175	0.0207	0.0175	0.0191	0.0127	0.0183	0.0087	0.0240	
[34] <i>A. madurae</i>	0.0135	0.0346	0.0143	0.0240	0.0183	0.0184	0.0379	0.0272	0.0103	0.0119	0.0103	0.0111	0.0159	0.0183	0.0183	0.0216	0.0087	0.0127	0.0191	0.0111	0.0191
[35] <i>A. viridis</i>	0.0207	0.0346	0.0191	0.0200	0.0256	0.0248	0.0387	0.0297	0.0199	0.0215	0.0183	0.0167	0.0231	0.0183	0.0159	0.0321	0.0175	0.0199	0.0240	0.0207	0.0305
[36] <i>A. flavalba</i>	0.0264	0.0289	0.0199	0.0264	0.0272	0.0297	0.0354	0.0207	0.0199	0.0231	0.0207	0.0248	0.0223	0.0256	0.0330	0.0223	0.0256	0.0297	0.0232	0.0313	
[37] <i>A. nitidulensis</i>	0.0354	0.0079	0.0305	0.0313	0.0354	0.0321	0.0321	0.0354	0.0280	0.0288	0.0330	0.0313	0.0346	0.0329	0.0321	0.0454	0.0272	0.0363	0.0363	0.0256	0.0362
[38] <i>A. umbriina</i>	0.0355	0.0463	0.0298	0.0281	0.0289	0.0355	0.0429	0.0297	0.0265	0.0281	0.0339	0.0314	0.0297	0.0281	0.0240	0.0363	0.0256	0.0347	0.0330	0.0281	0.0355
[39] <i>A. rubra</i>	0.0363	0.0387	0.0305	0.0413	0.0372	0.0232	0.0454	0.0387	0.0289	0.0347	0.0322	0.0372	0.0355	0.0338	0.0297	0.0257	0.0355	0.0322	0.0305	0.0380	
[40] <i>A. namibiensis</i>	0.0330	0.0280	0.0289	0.0346	0.0273	0.0256	0.0330	0.0396	0.0256	0.0232	0.0313	0.0289	0.0272	0.0346	0.0346	0.0388	0.0248	0.0338	0.0338	0.0273	0.0322
[41] <i>A. spiti</i>	0.0264	0.0329	0.0223	0.0071	0.0232	0.0248	0.0321	0.0264	0.0159	0.0264	0.0159	0.0232	0.0240	0.0346	0.0175	0.0240	0.0175	0.0240	0.0167	0.0248	
[42] <i>A. atramentaria</i>	0.0280	0.0305	0.0272	0.0297	0.0338	0.0363	0.0404	0.0420	0.0272	0.0280	0.0313	0.0305	0.0346	0.0321	0.0305	0.0404	0.0288	0.0289	0.0338	0.0272	0.0371
[43] <i>A. vinacea</i>	0.0215	0.0338	0.0175	0.0175	0.0248	0.0240	0.0363	0.0248	0.0167	0.0167	0.0183	0.0175	0.0232	0.0167	0.0135	0.0297	0.0143	0.0207	0.0215	0.0175	0.0256
[44] <i>A. kifoniata</i>	0.0321	0.0289	0.0289	0.0346	0.0273	0.0265	0.0338	0.0412	0.0256	0.0240	0.0313	0.0289	0.0272	0.0346	0.0346	0.0397	0.0240	0.0330	0.0355	0.0281	0.0330
[45] <i>A. hibica</i>	0.0273	0.0256	0.0207	0.0306	0.0313	0.0207	0.0338	0.0371	0.0340	0.0224	0.0265	0.0232	0.0289	0.0240	0.0281	0.0421	0.0248	0.0281	0.0355	0.0256	0.0338
[46] <i>A. rhozophila</i>	0.0573	0.0430	0.0540	0.0616	0.0557	0.0447	0.0522	0.0608	0.0506	0.0523	0.0557	0.0531	0.0574	0.0574	0.0582	0.0591	0.0498	0.0582	0.0558	0.0506	0.0608
[47] <i>A. kuestieri</i>	0.0600	0.0523	0.0540	0.0625	0.0626	0.0540	0.0633	0.0608	0.0524	0.0523	0.0583	0.0557	0.0609	0.0574	0.0582	0.0651	0.0515	0.0609	0.0618	0.0490	0.0634
[48] <i>A. maheshkhaliensis</i> (2)	0.0634	0.0557	0.0600	0.0677	0.0660	0.0557	0.0649	0.0688	0.0575	0.0582	0.0617	0.0591	0.0625	0.0686	0.0625	0.0686	0.0566	0.0643	0.0653	0.0541	0.0695
[49] <i>A. endophlytica</i>	0.0590	0.0514	0.0565	0.0616	0.0608	0.0488	0.0632	0.0660	0.0506	0.0531	0.0574	0.0548	0.0591	0.0573	0.0599	0.0660	0.0514	0.0599	0.0627	0.0498	0.0643
[50] <i>A. wenchangensis</i>	0.0608	0.0549	0.0574	0.0669	0.0661	0.0540	0.0607	0													



### 3-3-2 Pouvoir pathogène

Le genre *Actinomadura* est formé de cinquante-deux espèces (Kim *et al.*, 2012). Elles semblent être répandues dans le sol, tandis que *A. pelletieri* n'a été trouvée que dans des échantillons cliniques. Selon Trujillo et Goodfellow (1997), le genre *Actinomadura* comporte trois souches très répandues comme pathogène pour l'homme : *A. latina*, *A. madurae* et *A. pelletieri* (Borriello *et al.*, 2005).

La souche 1327 a été isolée d'un crachat d'une femme adulte admise au service de pneumologie (annexe 6).

Les membres du genre sont mieux connus comme agents causaux d'actinomycétomes (McNeil et Brown, 1994 ; Yassin *et al.*, 2011). Le sol est le réservoir d'infection ; Ces infections sont courantes dans les régions tropicales et subtropicales. Elles sont principalement causées par *Actinomadura madurae* et *A. pelletieri*. Dans ces zones, il est une habitude courante de marcher pieds nus, l'exposition de la peau à des épines et des éclats sur le sol ; par conséquent, l'infection naturelle semble être plus fréquente. Autres sites du corps humain peuvent également être affectés comme le dos, la tête, les genoux, les bras et le cou. Au Mexique, le dos est la deuxième partie du corps la plus commune à l'infection (Martha et Trujillo, 2011). L'organisme produit une collagénase qui joue un grand rôle dans sa pathogénicité (McNeil 1992).

Selon l'évaluation des risques biologiques de ces agents biologiques infectieux, la DSMZ les classe dans le groupe de risque N° 2. (Les agents biologiques du groupe 2 sont susceptibles de provoquer une maladie chez l'homme et représente un danger pour le travailleur ; mais leur dissémination est peu probable et il existe une prophylaxie ou un traitement efficace).

*Actinomadura* devrait également être considéré comme agents responsables des infections non-mycétomiques telles que la pneumonie. Le premier cas a été signalé en 1990 par Mc Neil *et al.*,. Ils rapportaient que *A. madurae* représentait 11,5% des actinomycètes aérobies isolées à partir d'échantillons cliniques reçu au laboratoire des actinomycètes du CDC (Center for Disease Control and Prevention, Etats-Unis). La majorité des isolats (57,1%) sont à partir des crachats ou des liquides de lavage broncho-alvéolaire, 31,0 % des blessures et 2,5 % à partir de prélèvements de sang et de cerveau. Cette étude a été réalisée entre Octobre 1985 et Février 1988 et les chercheurs ont prouvé l'implication de ces germes dans des pneumonies ou des bronchites (McNeil *et al.*, 1990).

**Tableau 21** : caractères cultureux de l'isolat 1327 sur les différents milieux de culture après 7, 14 et 21 jours à 37 °C

Durée d'incubation	Caractéristiques	Milieux de culture						
		Glu-Asp	Spo-Agar	ISP1	ISP2	ISP4	ISP5	ISP7
7 jours	1 <sup>ère</sup> apparition	4 jours	4 jours	4 jours	4 jours	5 jours	5 jours	+/- Pas de pigment mélanoidé
	Masse sporale	-	-	-	-	-	-	
	Mycélium primaire	+	+	+	++	+/-	+/-	
	Mycélium secondaire	-	-	-	+	-	+/-	
14 jours	Degrés de croissance	+	+++	+	+++	+/-	+	+/- Pas de pigment mélanoidé
	Masse sporale	-	-	-	-	-	-	
	Mycélium primaire	+	++	+	++	+/-	+	
	Mycélium secondaire	-	+	-	+	-	+/-	
21 jours	Degrés de croissance	+	+++	++	+++	+/-	+	+++
	Masse sporale	-	+/-	-	+/- Crème-jaune	-	-	+/-
	Mycélium primaire	+	++ Crème-jaune	+	+++ Crème	+/- Neutre	+	++ Crème
	Mycélium secondaire	-	+++ Crème	-	+	-	+/- Blanc	+/- Blanc

Hanafy *et al.*, ont effectué une étude similaire au Japon dans la période 1996–2004. Ils ont pu isolés 21 souches appartenant au genre *Actinomadura* et identifiées comme *A. pelletieri*, *A. chibensis*, *A. crema* et *A. nitritigenes*. Toutes ces souches ont été isolées à partir de crachats ou de lavage broncho-alvéolaire de patients atteints d'infections pulmonaires ou qui étaient soupçonnés ayant des infections liées (Hanafy *et al.*, 2006).

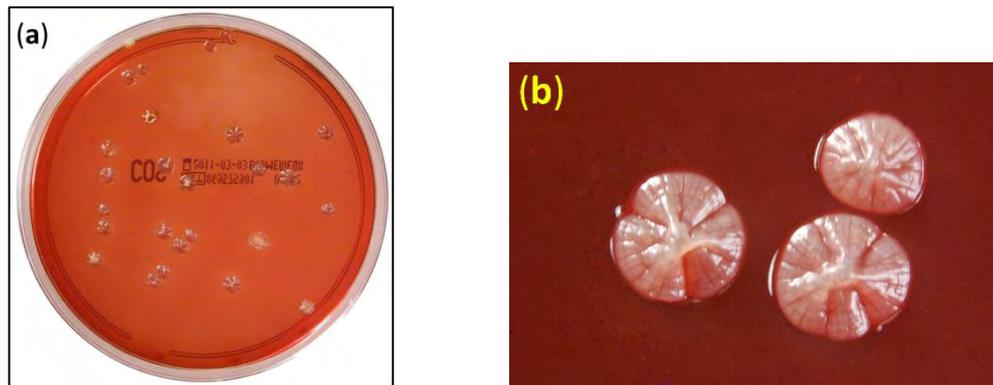
En 2011, Yassin *et al.*, ont pu isolé *Actinomadura sputi* à partir d'un crachat d'un homme âgé de 64 ans soupçonné d'être infecté par *Mycobacterium tuberculosis*.

En Europe, seuls cinq cas d'infections non mycétomiques à *Actinomadura* ont été signalés, causé par *Actinomadura sp.*, *A. madurae*, *A. Sputi* et *A. meyeræ* (Bonnet *et al.*, 2011).

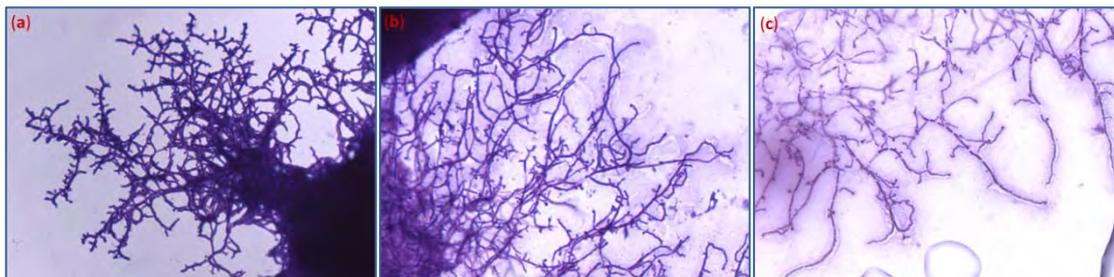
### **3-3-3 Étude morphologique de la souche 1327**

Sur les différents milieux utilisés, la culture de l'isolat 1327 (tableau 21) se développe lentement (plus de 10 jours d'incubation) et forme des colonies très incrustées dans la gélose à centre mamelonné surélevé qui s'abaisse en pente jusqu'à un bord de contour irrégulier. Les colonies sont de 2 à 5 mm de diamètre, sèche de couleur crème et opaque. Les colonies surélevées et creusées de plis irréguliers et profonds croissent avec une texture de surface en cuir cartilagineuse. Elles adhèrent fermement au milieu où elles forment une légère dépression (figure 22). Elles restent intactes lorsqu'on essaie d'en faire un étalement et difficile à mettre en suspension. Après une très longue période d'incubation (2 mois) les colonies sont couvertes d'une légère couche sporale en jaune claire.

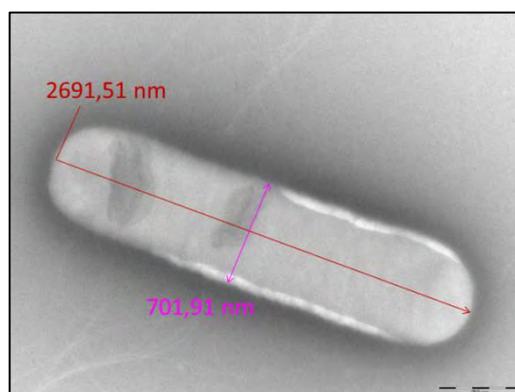
L'observation microscopique au grossissement x 100 a révélé la présence de longs filaments très ramifiés à coloration de Gram positive (figure 23). Le mycélium primaire apparaît dense très ramifié et non fragmenté contrairement au mycélium aérien qui est moins dense et moins ramifié. Après une incubation prolongée, le mycélium secondaire présente des fragmentations en éléments bacillaires appelés les arthrospores. L'examen en microscopie électronique montre que la surface de ces spores est lisse d'une taille aux alentours de 2 µm x 0,7 µm et non mobiles (figure 24).



**Figure 22** : photographies d'une culture de l'isolat 1327, sur la gélose au sang âgée de 21 jours, montrant la taille et l'aspect cartilagineux des colonies



**Figure 23** : L'isolat 1327 en microscopie optique après coloration de Gram (microscope modèle Leica 2000, programme Leica application 3.3.0) grandissement x100 (technique des lamelles, culture sur le milieu *ISP2*). **a** : mycélium du substrat (15 jours d'incubation) ; **b** : mycélium du substrat (21 jours d'incubation) ; **c** : mycélium aérien (21 jours d'incubation).



**Figure 24** : photomicrographies électroniques en transmission par coloration négative de l'isolat 1327. La barre représente 500 nm.

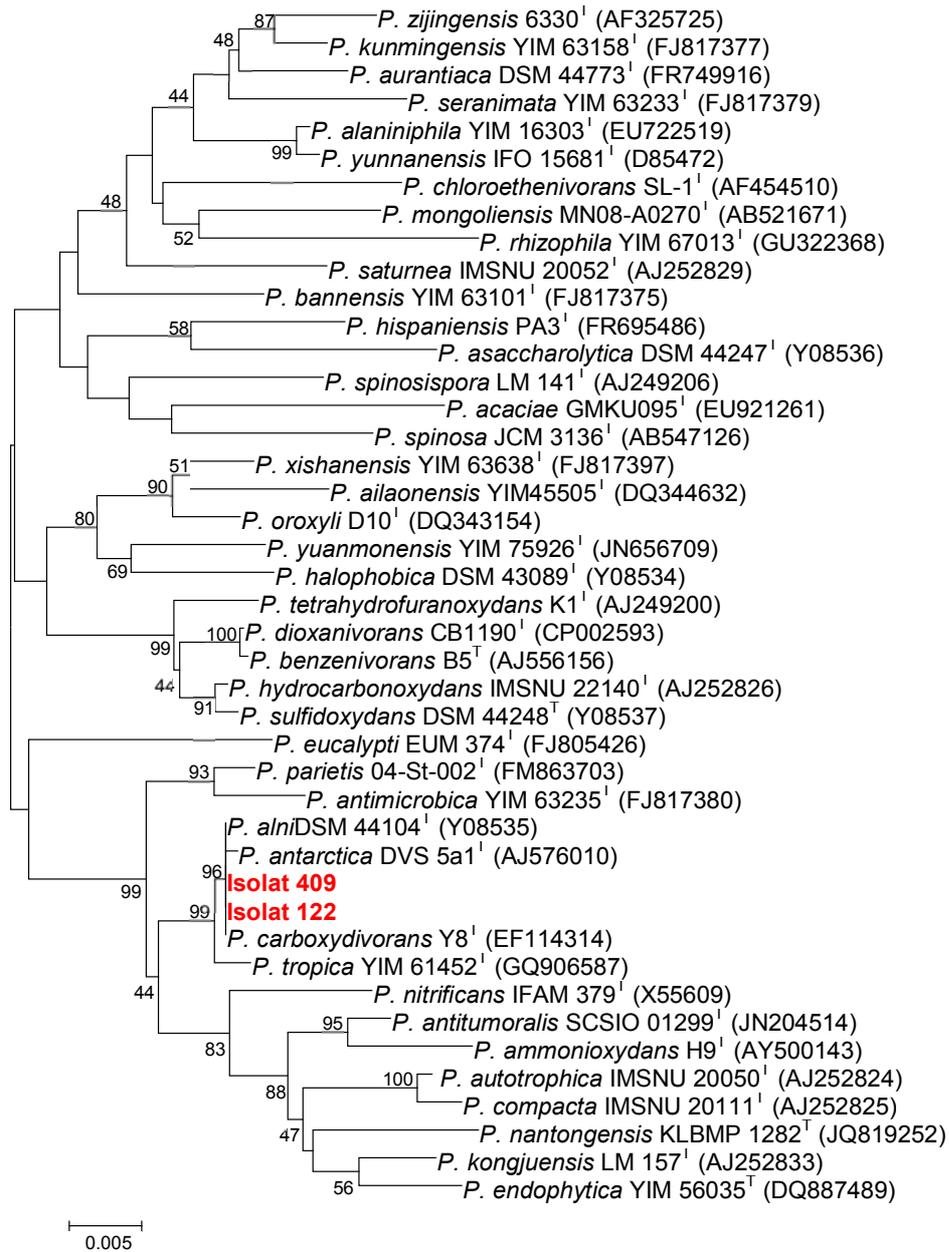
### 3-3-4 Étude physiologique de la souche 1327

La souche 1327 se développe dans une gamme de température entre 10 et 45°C avec un maximum entre 35 et 37°C. Elle tolère 4% de NaCl et montre une croissance à pH entre 5 et 9. Elle peut croître dans une atmosphère enrichie de 2,5 % de CO<sub>2</sub> mais pas à 5% de CO<sub>2</sub> ni en anaérobiose. Elle est sensible aux lysozymes.

La souche 1327 partage plusieurs caractères (tableau 22) et se différencie des souches *A. bangladeshensis*, *A. meyerii* et *A. chokoriensis* par plusieurs autres caractères morphologiques et physiologiques. C'est ce qui ne nous permet pas d'apparenter l'isolat 1327 à l'une des trois espèces ou de conclure qu'il s'agit d'une nouvelle espèce. Pour confirmer cette seconde conclusion, il faut déterminer d'autres caractères physiologiques et biochimiques, analyser la composition chimique de la paroi de la souche 1327, amplifier des gènes de ménage des quatre souches ou éventuellement réaliser une hybridation entre l'ADN de l'isolat 1327 et celui des trois espèces d'*Actinomadura*.

**Tableau 22 :** Quelques caractéristiques phénotypiques, physiologiques et chimiotaxonomiques qui différencient la souche 1327 des espèces proches du genre *Actinomadura*

Caractéristiques	Isolat 1327	<i>A. meyerii</i>	<i>A. chokoriensis</i>	<i>A. bangladeshensis</i>
Mycélium aérien	Peu abondant Crème	Peu abondant claire	blanc	Rose pâle blanc
Mycélium du substrat	Crème	Jaune- crème	Crème- brun	Jaune clair beige clair
Température de croissance (C°)				
- intervalle de croissance	10-45	25-45	20-45	20-45
- Maximum toléré	45	45	45	45
pH de croissance	5-9	7-9	5-9	5-9
Tolérance à NaCl (%)	0-4	ND	0-4	0-4
Croissance en présence du CO <sub>2</sub> (%)	0-2,5	ND	ND	ND
Sensibilité au lysozyme	S	ND	ND	ND



**Figure 25** : arbre selon la méthode des distances (Neighbor-Joining) construit d’après l’analyse des séquences du gène qui code pour l’ARNr 16S en utilisant le logiciel Mega (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) version 5 (Tamura *et al.*, 2011) montrant la position phylogénétique des isolats **122** et **409** parmi les espèces du genre *Pseudonocardia*. La matrice des distances est calculée selon le model Kimura à 2 paramètres (Kimura, 1980). Les valeurs mentionnées à l’origine des nœuds représentent les pourcentages supérieurs à 40 % de 1000 bootstrap. 0,005 représente le nombre de substitution par position de nucléotide.

### 3-4 Le genre *Pseudonocardia*

#### 3-4-1 Etude phylogénétique des isolats 122 et 409

L'analyse phylogénétique (figure 25) a confirmé que les isolats 122 et 409 sont des membres du genre *Pseudonocardia*. Ils forment un clade distinct avec *Pseudonocardia alni* (99,93% de similarité des séquences du gène ARNr 16S), *Pseudonocardia carboxydivorans* (99,80 %) et *Pseudonocardia antarctica* (99,46 %) avec une forte valeur de bootstrap. Les Souches 122 et 409 ont montré des similitudes relativement plus faibles de 98,90% avec *Pseudonocardia tropica*. Des similarités de séquences beaucoup plus faibles ont été trouvées avec toutes les autres espèces reconnues du genre *Pseudonocardia* (tableau 13).

Le mot *Pseu.do.no.car'di.a.* est formé de deux substantifs « *pseudês* » faux ou pseudo; « *Nocardia* » nom d'un genre bactérien. Donc *Pseudonocardia* est un nom féminin qui désigne un organisme faux nocardia (Huang et Goodfellow, 2012).

Proposé par Henssen (1957), le genre *Pseudonocardia* avec ses 53 espèces reconnus (Kim *et al.*, 2012), est le genre type de la famille *Pseudonocardiaceae* (Huang et Goodfellow, 2012).

#### 3-4-2 Pouvoir pathogène

Les bactéries du genre *Pseudonocardia* ont été principalement isolées à partir des cultures d'enrichissement, de matières végétales et des sols, mais elles ont également été isolées à partir d'autres habitats, y compris l'air, le matériel clinique, les sédiments marins et côtiers, les composts et les boues. Leur rôle dans les habitats naturels est pratiquement inconnu (Huang et Goodfellow, 2012).

Les deux souches 122 et 409 sont isolées de liquides de ponction de cavités normalement stériles. La souche 122 est isolée d'un liquide pleural d'une malade adulte admise au service des maladies gastrique. La souche 409 est isolée d'une ascite d'une malade adulte admise au service de pneumologie (annexe 6).

Il n'existe aucune preuve définitive que les souches de *Pseudonocardia* ont un rôle comme agents pathogènes cliniques ou vétérinaires. *Pseudonocardia autotrophica* a parfois été isolée à partir de matériaux cliniques et peut être un pathogène opportuniste de sujets immunodéprimés. En outre, des souches appartenant au genre

*Pseudonocardia* ont été associée à des maladies allergiques au Koweït (Huang et Goodfellow, 2012).

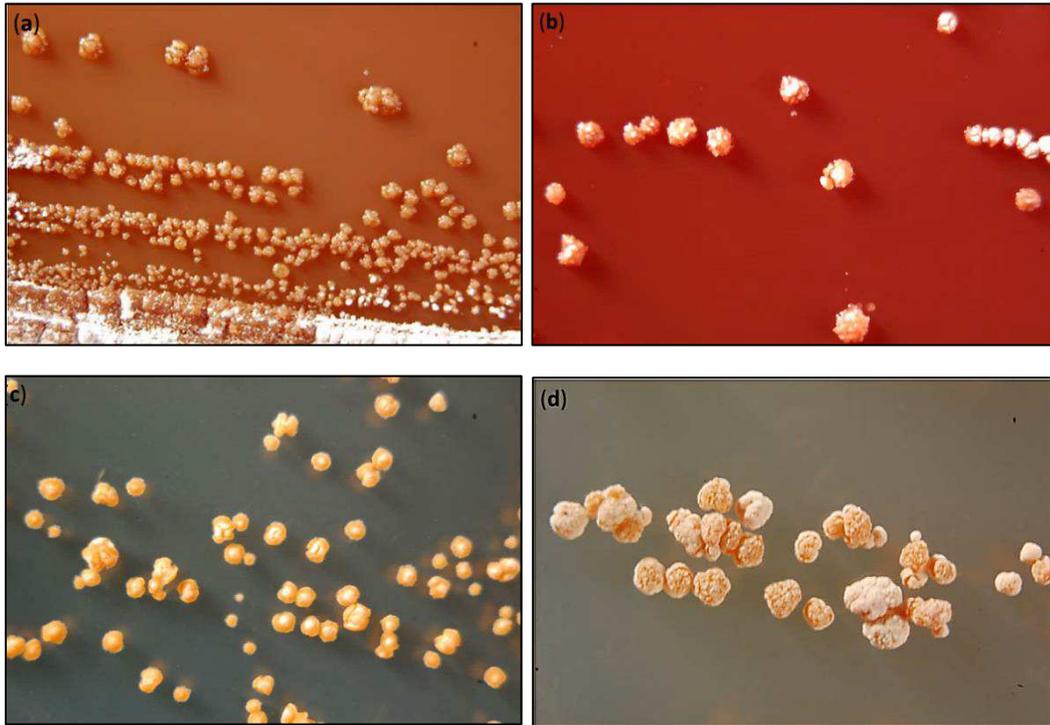
### 3-4-3 Etude morphologique

L'examen des cultures des isolats 122 et 409 a révélé le bon développement des colonies à 35°C sur tous les milieux utilisés (tableau 23). Les colonies sont de 0,5 à 3mm de diamètre, formées d'une condensation d'hyphes en dôme. La surface des colonies est grumeleuse d'aspect en choux fleur. La couleur des mycéliums est jaune à brun. Cette couleur est influencée par le milieu de culture. Après sporulation, les colonies sont couvertes d'une poudre blanche (figure 26).

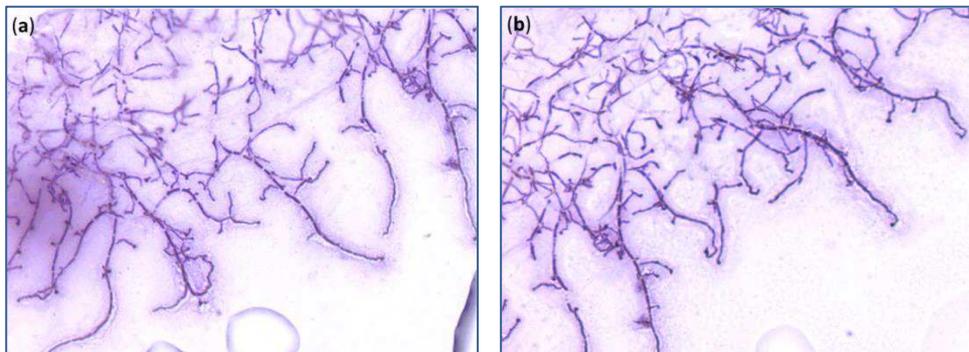
**Tableau 23 :** caractères culturaux des isolats 122 et 409 appartenant au genre *Pseudonocardia* sur les différents milieux de culture après 21 jours d'incubation

Souches isolées	Caractéristiques	Milieux de culture						
		Glu-Asp	Spo-Agar	ISP1	ISP2	ISP4	ISP5	ISP7
Souche 122	1 <sup>ère</sup> apparition	3 jours	3 jours	5 jours	4 jours	5 jours	5 jours	Très faible croissance
	Masse sporale	++ ocre	++ blanche	+/-	++ blanche	++ ocre	++ blanche	
	Mycélium primaire	++ brun	++ marron	+ beige	++ orange	+ beige	++ orange	
	Mycélium secondaire	++ orange	++ orange	+ blanc	++ orange	+ blanc	+ orange	
Souche 409	1 <sup>ère</sup> apparition	3 jours	3 jours	3 jours	3 jours	3 jours	3 jours	Très bonne croissance pas de pigment
	Masse sporale	+/- blanche	++ blanche	+/-	++ blanche	++ blanche	+ blanche	
	Mycélium primaire	++ orange	++ brun	+ crème	++ orange-brun	+ neutre	++ orange	
	Mycélium secondaire	++ orange	++ orange	+/-	++ orange	+/-	+/- orange	

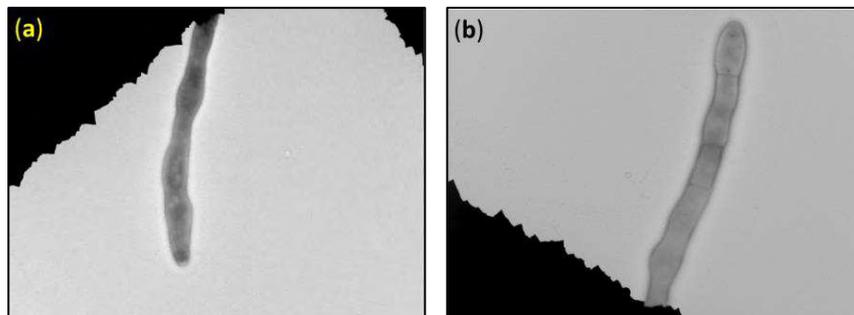
L'examen microscopique a révélé la présence des hyphes extensifs qui varient dans le diamètre et le degré de ramification. Les photos de la figure 27 montrent des hyphes segmentés, souvent en forme de zig-zag. Ils ont tendance à former des gonflements apicaux ou intercalaires (figure 28). Nous avons également noté la présence de cloisonnement au niveau des fragments mycéliens.



**Figure 26** : photographies des cultures âgées de 21 jours des isolats 122 et 409 montrant l'aspect caractéristique des colonies et la masse sporale (poudre blanche). (a) l'isolat 122 sur la gélose au sang, (b) l'isolat 409 sur la gélose au sang, (c) l'isolat 122 sur sporulation agar, (d) l'isolat 409 sur sporulation agar.



**Figure 27** : photographies des isolats 122 (a) et 409 (b) en microscopie optique après coloration de Gram G x100 (technique des lamelles)



**Figure 28** : photomicrographies électroniques en transmission par coloration négative montrant les hyphes avec les gonflements apicaux ou intercalaires. (a) de l'isolat 122, (b) de l'isolat 409.

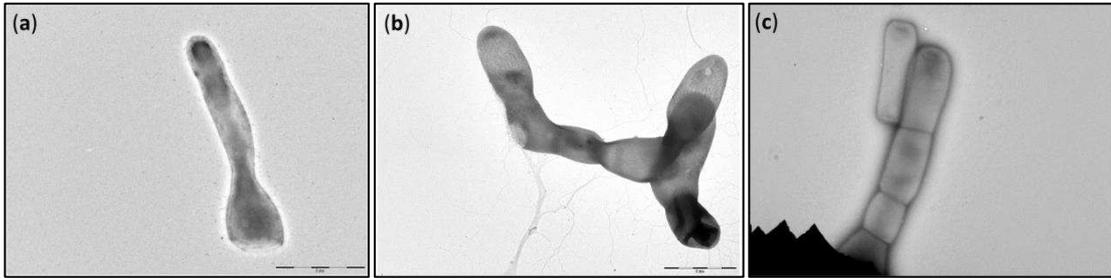
La microscopie électronique a montré que les spores sont à paroi lisse et varient fortement en taille, mais sont généralement de 0,5 à 1µm de large par 1,5 à 4,5µm de long. Les spores se forment par bourgeonnement successif acropète, par cloisonnement basipète (fragmentation) et par la formation de spores de longueur irrégulière le long des hyphes sénescents ce qui est en parfaite concordance avec la description de Lechevalier *et al.*, 1986 ; Henssen, 1989 ; Henssen et Schnepf, 1967 Huang et Goodfellow, 2012). Nous avons également noté la présence de cloisonnement au niveau des fragments mycéliens (figures 29 et 30).

D'autre part, la microscopie électronique a montré que la paroi des mycélium est composé de deux couches : une couche interne d'épaisseur uniforme, et une couche externe dense d'épaisseur irrégulière (figure 31) ce qui corrobore les observations de Henssen *et al.*,(1981, 1983).

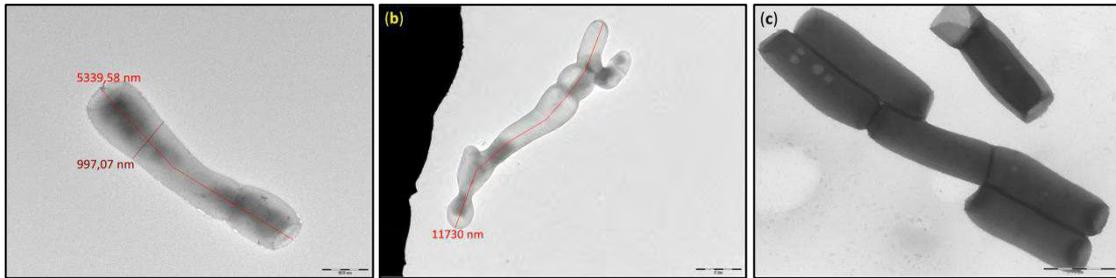
### **3-4-2 Etude physiologique**

Les souches 122 et 409 se développent dans une gamme de température entre 20 et 37°C avec un maximum entre 25 et 30°C et elles résistent à 100 µg/ml de lysozymes. Elles montrent une croissance à pH entre 6 et 12. La souche 122 tolère 7 % de NaCl et peut croître sous une atmosphère enrichie de 2,5 % et 5 % de CO<sub>2</sub> mais pas en anaérobiose alors que la souche 409 tolère 8 % de NaCl et ne peut croître sous atmosphère enrichie en CO<sub>2</sub> ni en anaérobiose.

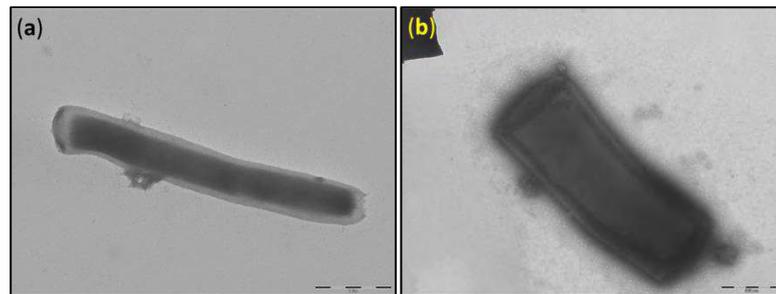
En conclusion, l'analyse des séquences d'ADNr 16S a permis d'assigner les isolats 122 et 409 au genre *Pseudonocardia*. Cependant, dans la taxonomie bactérienne, des études de caractérisation chimique et l'hybridation ADN-ADN sont nécessaires pour confirmer ou non l'appartenance d'un isolat donné à une espèce d'un genre donné. Par conséquent, les deux isolats (122 et 409) doivent être examinés et comparés chimiquement à l'ensemble des quatre espèces les plus proches du genre *Pseudonocardia* pour éclaircir leurs identités.



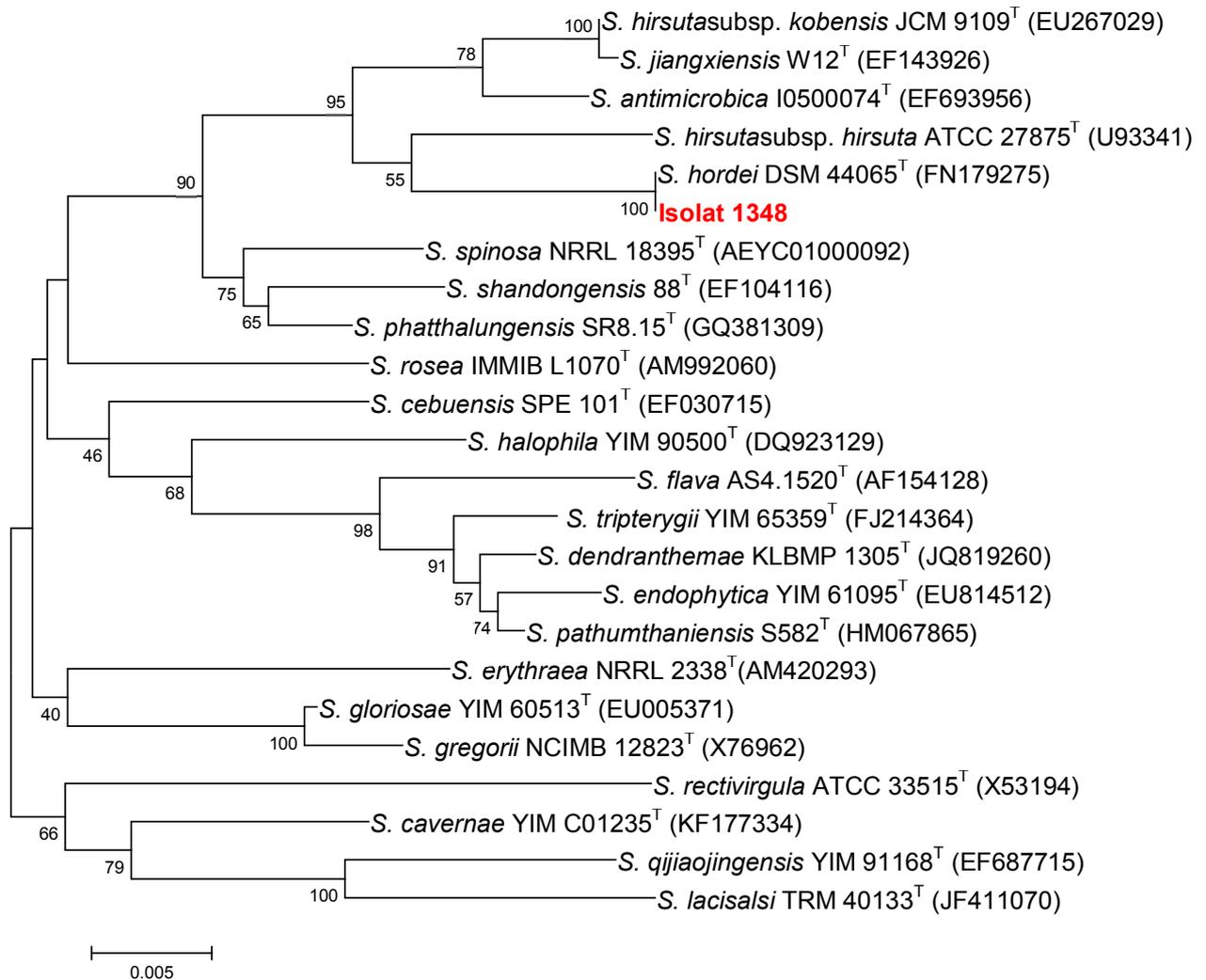
**Figure 29** : photomicrographies électroniques en transmission par coloration négative de l'isolat 122. (a) montrant un fragment de mycélium de diamètres irrégulier, (b) montrant le bourgeonnement des hyphes (c) montrant la fragmentation du mycélium par cloisonnement en éléments rectangulaire de taille variables. La barre représente 2  $\mu\text{m}$ .



**Figure 30** : photomicrographies électroniques en transmission par coloration négative de l'isolat 409. (a) montrant des fragments de mycélium de diamètres irrégulier, (b) montrant le bourgeonnement des hyphes, (c) montrant la fragmentation du mycélium par cloisonnement en éléments rectangulaire de taille variables. La barre représente 2  $\mu\text{m}$ .



**Figure 31** : photomicrographies électroniques en transmission par coloration négative montrant les deux couches de la paroi cellulaire. (a) de l'isolat 122, (b) de l'isolat 409. La barre représente 2  $\mu\text{m}$ .



**Figure 32** : arbre selon la méthode des distances (Neighbor-Joining) construit d’après l’analyse des séquences du gène qui code pour l’ARNr 16S en utilisant le logiciel Mega (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) version 5 (Tamura *et al.*, 2011) montrant la position phylogénétique de l’isolat **1348** parmi les espèces du genre *Saccharopolyspora*. La matrice des distances est calculée selon le modèle Kimura à 2 paramètres (Kimura, 1980). Les valeurs mentionnées à l’origine des nœuds représentent les pourcentages supérieurs à 40 % de 1000 bootstrap. 0,005 représente le nombre de substitution par position de nucléotide.

### 3-5 Le Genre *Saccharopolyspora*

#### 3-5-1 Etude phylogénétique de la souche 1348

L'arbre de la figure 32 permet de visualiser l'affiliation de la souche 1348. Cet arbre est construit après alignements des séquences d'ADNr par le logiciel CLUSTAL W 1.8 (Thompson *et al.*, 1994). L'arbre est construit en utilisant le logiciel Mega (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) version 5 (Tamura *et al.*, 2011) à partir de Neighbor-Joining en utilisant le test de « bootstrap » (nombres sur les branches) de 1000 répliques en utilisant la correction de Kimura à deux paramètres (Kimura, 1980). Sur l'arbre phylogénétique, la souche 1348 se place sur la même ligne phylogénétique que la souche *Saccharopolyspora hordei* avec un bootstrap de 100 % (figure 32), ce qui confirme le résultat du BLAST de la séquence de l'isolat 1348 avec les séquences disponibles au niveau de Genbank. Au fait, ce dernier a assigné l'isolat en question à *Saccharopolyspora hordei* avec un pourcentage de 100 % (tableau 13).

Le genre *Saccharopolyspora* a été proposé en 1975 par Lacey et Goodfellow, *sac.cha.ro.po.ly.spo'ra.* est un nom féminin formé par la composition de trois mots : « *Saccharum* » qui signifie en français le nom générique de la canne à sucre, « *polus* » nombreux et « *spora* » spores. Donc, *Saccharopolyspora* signifie un organisme isolé de la canne à sucre et présentant de nombreuses spores ; *hordei*, « *hordeum* », signifie en français l'orge, en se référant à l'origine de l'isolement de la souche.

#### 3-5-2 Pouvoir pathogène

La souche 1348 a été isolée d'un pus ganglionnaire d'une malade âgée de 67 ans non admise au centre hospitalo-universitaire (traitement ambulatoire) (annexe 6).

Le genre *Saccharopolyspora* avec ses vingt-et-une espèces publiées (Kim et Goodfellow, 2012) n'est pas connu pour causer des infections, bien que *Saccharopolyspora rectivirgula* est le principal agent causal des alvéolites allergiques extrinsèques connu sous le nom de poumon de fermier (Campbell, 1932 ; Pepys *et al.*, 1963 ; Borriello *et al.*, 2005). Cette maladie, qui est largement répandue en Chine, en Europe, au Japon et aux Etats-Unis, est causée par l'inhalation de grandes quantités de spores présentes dans les poussières organiques. Les patients sont généralement exposés à ces poussières au cours de leur activité professionnelle ou de leurs activités de loisir (Lacey, 1981). Selon Fredrik Pettersson *et al.*, 2014, l'espèce *Saccharopolyspora rectivirgula* est souvent présente en concentrations élevées dans l'air dans les étables où

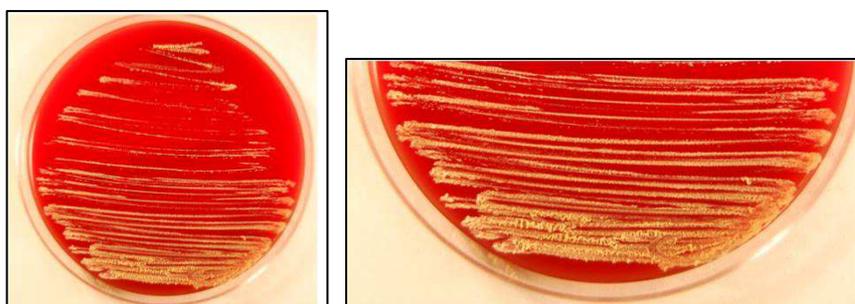
le foin humide est stocké. Le même auteur explique que cette maladie peut se développer en une maladie chronique et entraîner des lésions pulmonaires irréversibles et même la mort.

Les spores de *Saccharopolyspora hordei* sont également présentes en grand nombre dans les magasins de céréales et peuvent être impliqués en tant qu'agent d'alvéolite allergique extrinsèque (Lacey et Crook, 1988).

En 2009, Yassin a pu isoler à partir d'un lavage bronchique d'un patient âgé de 45 ans avec un carcinome pulmonaire une nouvelle espèce nommée *Saccharopolyspora rosea*.

### 3-5-3 Étude morphologique de la souche 1348

L'isolat 1348 cultive bien sur tous les milieux utilisés (tableau 24). Les colonies sont caractéristiques de *Saccharopolyspora hordei*. Elles sont fines, incolores à couleur légèrement chamois, arrondis ou froissées. Le mycélium du substrat est bien développé par contre le mycélium aérien est très peu développé. Il est souvent produit en touffes dans les parties les plus anciennes des cultures. Sur la gélose au sang, les colonies sont punctiformes, de couleur crème à jaune claire et non hémolytique (figure 33).



**Figure 33** : photographies d'une culture de l'isolat 1348, sur la gélose au sang âgée de 15 jours, montrant la taille punctiforme et l'aspect froissé des parties dans de la culture.

L'examen microscopique a révélé la présence d'un mycélium primaire cloisonné bien développé, largement ramifié, fragmenté en éléments en forme de bacille d'environ  $1,2 \times 0,6 \mu\text{m}$  (figure 34), le plus souvent dans les parties anciennes de la colonie et rarement près des marges de croissance. Les micrographies électroniques à transmission montrent également des spores typiquement couvertes par une gaine lisse, avec des spores adjacentes souvent séparés par un segment vide d'hyphe (figure 35) caractère observé également chez *Saccharopolyspora hordei* (Kim et Goodfellow, 2012) *Saccharopolyspora hirsuta* (Lacey et Goodfellow, 1975).

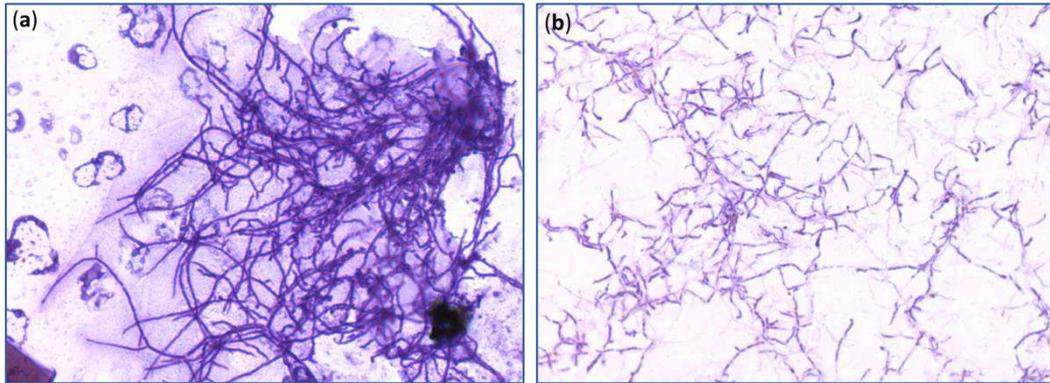
Le mycélium aérien de 0,5 à 0,7 µm de diamètre, droit ou en spirale, présente de courtes chaînes de spores en forme de crochet souvent avec un aspect perlé. Le microscope électronique à transmission montre que les spores sont sphériques d'environ 800 nm de diamètre et de surface lisse (figure 36).

**Tableau 24 :** caractères culturels de l'isolat 1348 sur les différents milieux de culture après 7, 14 et 21 jours

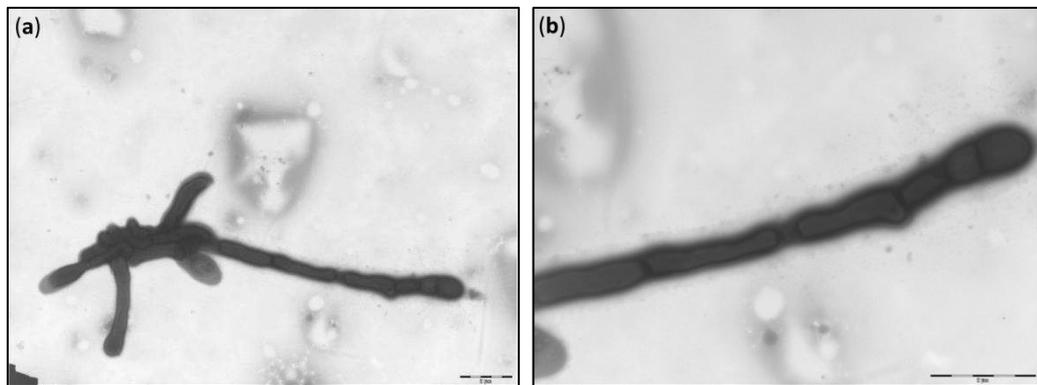
Durée d'incubation	Caractéristiques	Milieux de culture						
		Glu-Asp	Spo-Agar	ISP1	ISP2	ISP4	ISP5	ISP7
7 jours	1 <sup>ère</sup> apparition	7	7	6	7	-	-	-
	Masse sporale	-	-	-	-	-	-	-
	Mycélium primaire	neutre	neutre	neutre	Crème	neutre	-	-
	Mycélium secondaire	-	-	-	-	-	-	-
14 jours	Degrés de croissance	++	+	++	++	+/-	+/-	+/-
	Masse sporale	-	+/-	-	+/-	-	-	-
	Mycélium primaire	++ neutre	+ crème	++ crème	++ crème	+/- neutre	+/- neutre	-
	Mycélium secondaire	-	+/- crème	+/- crème	+ crème	-	-	-
21 jours	Degrés de croissance	++	+	++	++	+/-	+/-	
	Masse sporale	+/-	+/-	-	+/-	-	-	+/-
	Mycélium primaire	++ neutre	+ crème	++ crème	++ crème	+/- neutre	+/- neutre	-
	Mycélium secondaire	-	+/- crème	+/- crème	+ crème	-	-	-

### 3-5-4 Étude physiologique de la souche 1348

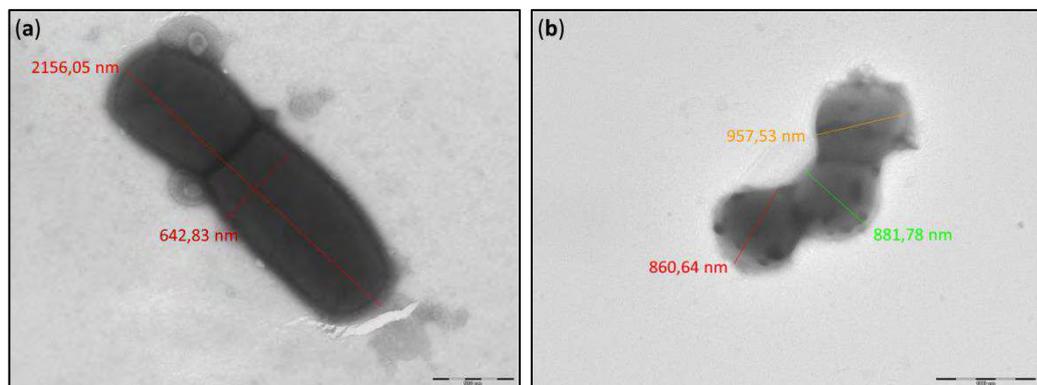
La souche 1348 se développe dans une gamme de température entre 25 et 55°C avec un maximum entre 30 et 37°C. Elle tolère 13 % de NaCl et montre une croissance à pH entre 5 et 9. Elle peut croître dans une atmosphère enrichie de 2,5 % et 5% de CO<sub>2</sub> mais pas en anaérobiose. Elle est également sensible aux lysozymes.



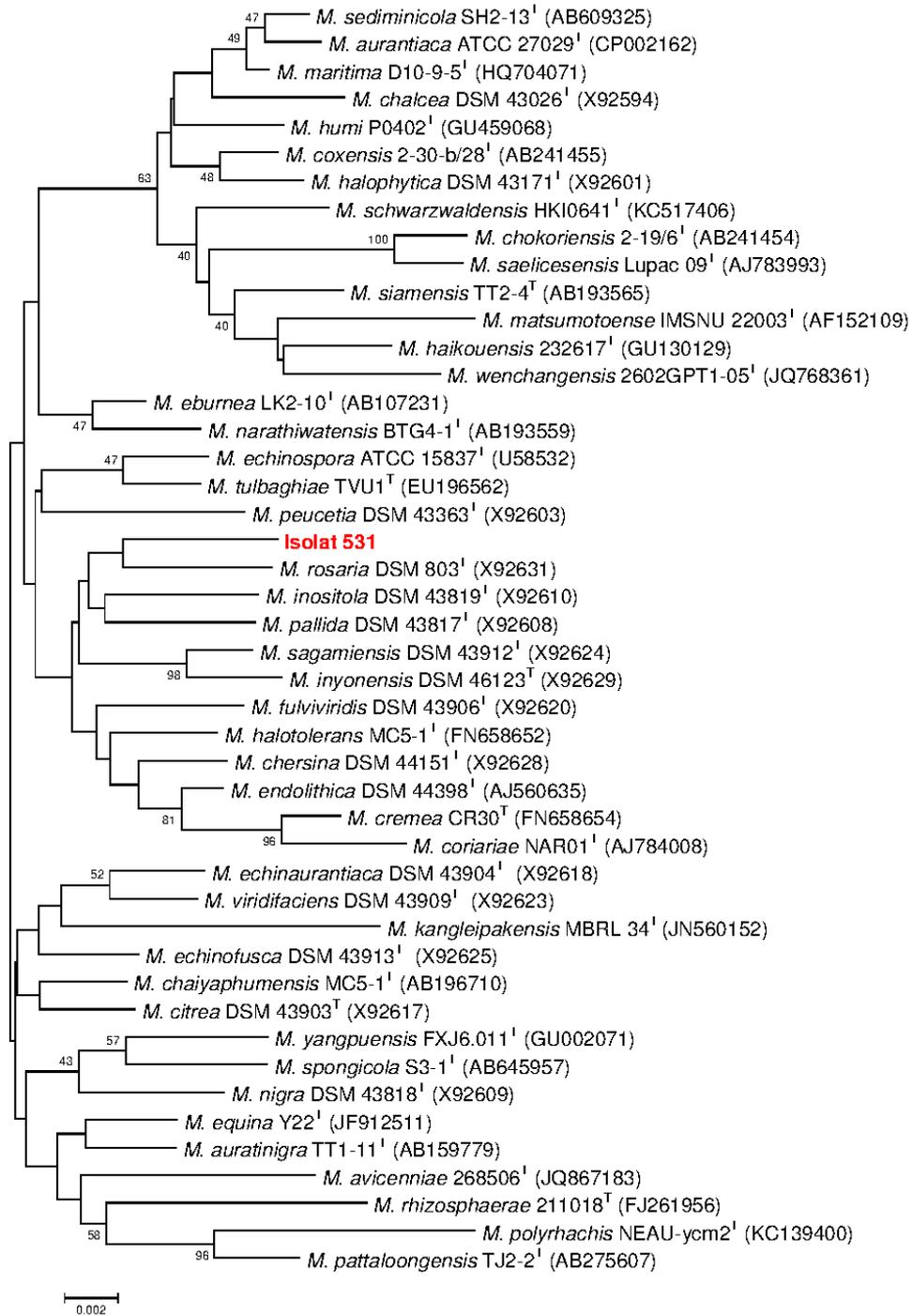
**Figure 34 :** l'isolat 1348 en microscopie optique après coloration de Gram (microscope modèle Leica 2000, programme Leica application 3.3.0) grandissement x100 (technique des lamelles, culture sur le milieu *ISP2*). **(a) :** mycélium après 7 jours d'incubation ; **(b) :** mycélium fragmenté en éléments bacillaires (21 jours d'incubation).



**Figure 35 :** photomicrographies électroniques en transmission par coloration négative de l'isolat 1348 montrant **(a et b)** des fragments de mycélium avec des spores adjacentes séparés par un segment vide d'hyphe et couvertes par une gaine lisse. La barre représente 2  $\mu$ m. La barre représente 500 nm.



**Figure 36 :** photomicrographies électroniques en transmission par coloration négative de l'isolat 1348. **(a) :** montre un fragment de mycélium (2158,05 nm x 642,03 nm) cloisonné en deux parties inégales ; **(b)** montre une courte chaîne de spores sphériques d'environ 800 nm de diamètre et de surface non lisse. La barre représente 1000 nm.



**Figure 37** : arbre selon la méthode des distances (Neighbor-Joining) construit d’après l’analyse des séquences du gène qui code pour l’ARNr 16S en utilisant le logiciel Mega (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) version 5 (Tamura *et al.*, 2011) montrant la position phylogénétique de l’isolat **531** parmi les espèces du genre *Micromonospora*. La matrice des distances est calculée selon le modèle Kimura à 2 paramètres (Kimura, 1980). Les valeurs mentionnées à l’origine des nœuds représentent les pourcentages supérieurs à 40 % de 1000 bootstrap. 0,002 représente le nombre de substitution par position de nucléotide.

### 3-7 Le genre *Micromonospora*

#### 3-7-1 Étude phylogénétique de la souche 531

L'analyse moléculaire de la séquence nucléotidique du gène de l'ARNr 16S a révélé l'appartenance de l'isolat 531 au genre *Micromonospora*. Ce genre bactérien proposé par Ørskov en 1923 est le genre type de la famille *Micromonosporaceae* qui comporte 32 espèces (Genilloud, 2012).

*Mi-cro-mono'spo-rae'* est un mot latin qui veut dire « *Mikros* » petit ou microscopique « *Monos* » unique ou Solitaire et « *Spora* » spore en biologie. Ainsi, *Micromonospora* est un nom féminin qui signifie petite spore unique (organisme) (Genilloud, 2012).

La souche 531 est apparentée aux membres du genre *Micromonospora*. Le pourcentage de similitude est compris entre 98,90 et 98,02 % avec les séquences 16S des ADN ribosomiaux des souches *Micromonospora eburnea*, *M. rosaria*, *M. agamiensis*, *M. echinaurantiaca*, *M. inositola*, *M. narathiwatensis*, *M. pallida*, *M. auratinigra*, *M. inyonensis*, *M. chaiyaphumensis*, *M. endolithica*, *M. pattaloongensis*, *M. tulbaghiaie*, *M. halotolerans*, *M. spongicola*, *M. viridifaciens*, *M. citrea*, *M. chersina*, *M. fulviviridis* et *M. equina* (tableau 13).

L'arbre phylogénétique (figure 37) construit à partir des séquences de plus de 1400 nucléotides du gène de l'ARNr 16S montre que la souche 531 se place sur la même ligne phylogénétique que *Micromonospora rosaria* (Horan et Brodsky, 1986).

#### 3-7-2 Pouvoir pathogène

La souche 531 a été isolée du liquide pleural d'une patiente admise au service de la médecine interne (annexe 6).

Selon McNeil et Brown la présence des bactéries de ce genre dans les prélèvements clinique est très rare. Sur les 366 isolats actinomycétales identifiés au CDC (*Centers for Disease Control and Prevention Actinomycete Laboratory*) durant 29 mois d'étude, seulement six ont été identifiées comme appartenant au genre *Micromonospora*.

Certaines espèces de *Micromonospora* sont supposées dans les maladies de l'homme et de l'animal, mais leurs descriptions et leurs implications aux symptômes de

la maladie restent inconnues et non concluantes. *Micromonospora gallica* a été isolée à partir d'hémocultures, *Micromonospora caballi* a été isolé à partir d'un cas d'actinomycose cutanée chez un cheval (Sykes, 1973) et *Micromonospora sp.* a été identifiée chez un patient souffrant de pneumonie d'étiologie inconnue (Gugnani *et al.*, 1998).

En effet les bactéries de ce genre ne sont pas bien reconnues comme pathogène ou isolées de prélèvements clinique. Par contre elles sont très expérimentées comme productrice des métabolites secondaires tels que les antibiotiques et les enzymes (Genilloud, 2012).

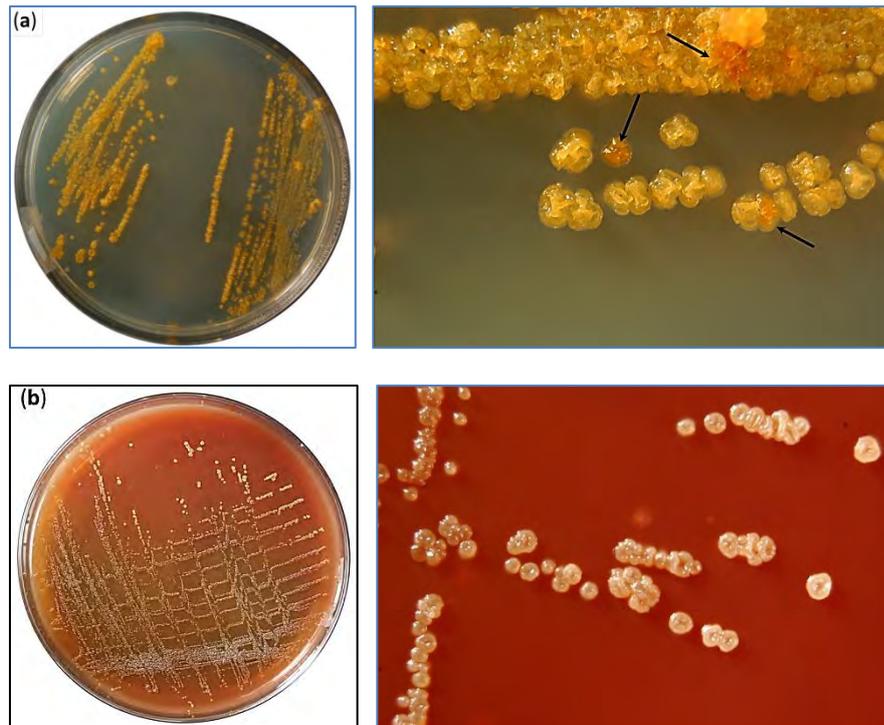
Ainsi, leur impact sur la médecine est considérable, elles sont aux côté du genre *Streptomyces*, les plus grand producteurs d'antibiotiques les plus connus. Les *Micromonospora*, produit les aminosides, la gentamicine et la netamicine. Elles produisent également des antibiotiques anti-tumoraux (lomaiviticins A et B, tetrocarcine A, le complexe LL-E33288, etc.) et des antibiotiques anthracyclines. En outre, *Micromonospora lupini*, produit l'anthraquinone, les lupinacidines A et B, qui ont une activité anti-tumorale. D'autres molécules biologiquement actives synthétisées par les espèces du genre *Micromonospora* sont la vitamine B12 et les composés antifongiques (Hirsch et Valdés, 2009)

### **3-7-3 Étude morphologique de la souche 531**

L'isolat 531 se cultive parfaitement sur tous les milieux utilisés (tableau 25). Les colonies, ayant l'apparence d'une graine de noix, sont de petites tailles (1 à 3 mm de diamètre). La couleur des colonies jeunes est jaune pâle à orange clair devenant orange foncé à bronze avec l'âge (Figure 38).

Après une longue durée d'incubation la sporulation apparait et confère aux colonies la couleur marron et l'aspect muqueux et brillant ce qui est corroboré par la description de (Genilloud, 2012). Nous avons même repérés des zones de sporulation distinctes sur la surface des colonies correspondant à une production de spores accumulés dans ces zones.

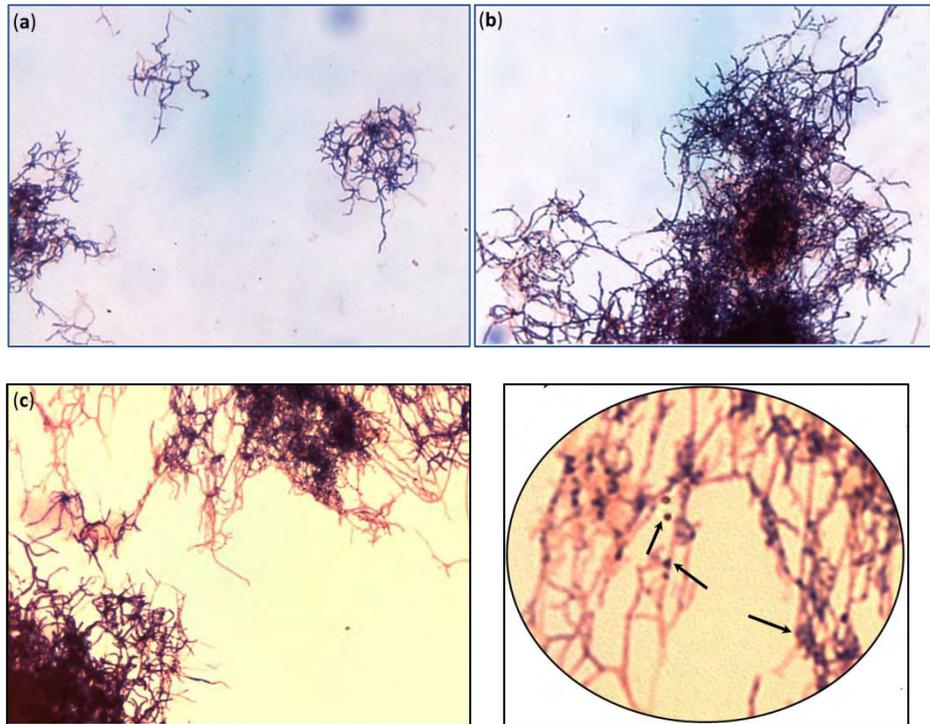
Sur le milieu gélose au sang, les colonies sont de 0,5 à 2 mm de diamètre, blanches, irrégulières et entassées. Elles ont un aspect caractéristique et ressemblent à la couronne d'une molaire (figure 38). Nous remarquons également une hémolyse partielle (alpha-hémolyse) qui apparait après 7 jours d'incubation.



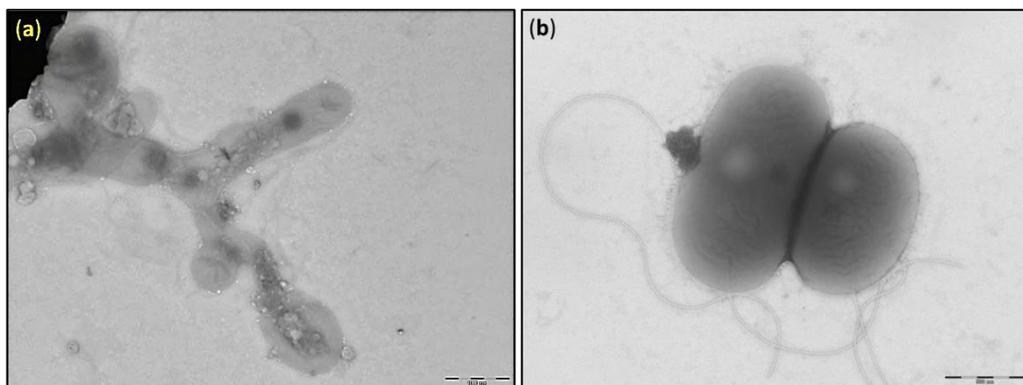
**Figure 38** : photographies des cultures de l'isolat 531. **(a)** culture de 15 jours sur le milieu sporulation agar, les flèches représentent les zones de sporulation de couleur marron et d'aspect muqueux et brillant ; **(b)** culture de 15 jours sur le milieu gélose au sang.

L'examen microscopique a révélé le bon développement d'un mycélium primaire ramifié et cloisonné de 0,25 à 0,6 $\mu$ m de diamètre. Le mycélium aérien apparaît sans branchements (figure 39).

La microscopie électronique montre la présence de spores uniques produites par des sporophores courts, souvent groupés en amas avec un développement sympodial. Les sporanges avec les sporangiospores se forment à l'extrémité des hyphes (figure 40). Il y a tout d'abord un épaississement de la paroi de l'extrémité de l'hyphe en renflement. L'hyphe continue de croître à l'intérieur et va ainsi former le sporange (Vobis, 1992). Les spores sont formées individuellement sur les deux branches latérales courtes du mycélium du substrat. Elles sont mobiles, de forme ovale, avec un diamètre de 0,7 à 1,5 $\mu$ m, et une surface lisse (Figure 40).



**Figure 39** : l'isolat 531 en microscopie optique après coloration de Gram (Gx100 technique des lamelles). (a) : culture de 7 jours ; (b) : culture de 15 jours ; (c) : culture de 21 jours (les flèches indiquent les sporanges).



**Figure 40** : photomicrographies électroniques à transmission par coloration négative de l'isolat 531. (a) photomicrographie montrant des sporanges avec des sporophores courts. La barre représente 1000 nm ; (b) photomicrographie montrant deux spores flagellées de forme ovale. La barre représente 500 nm.

### 3-7-4 Étude physiologique de la souche 531

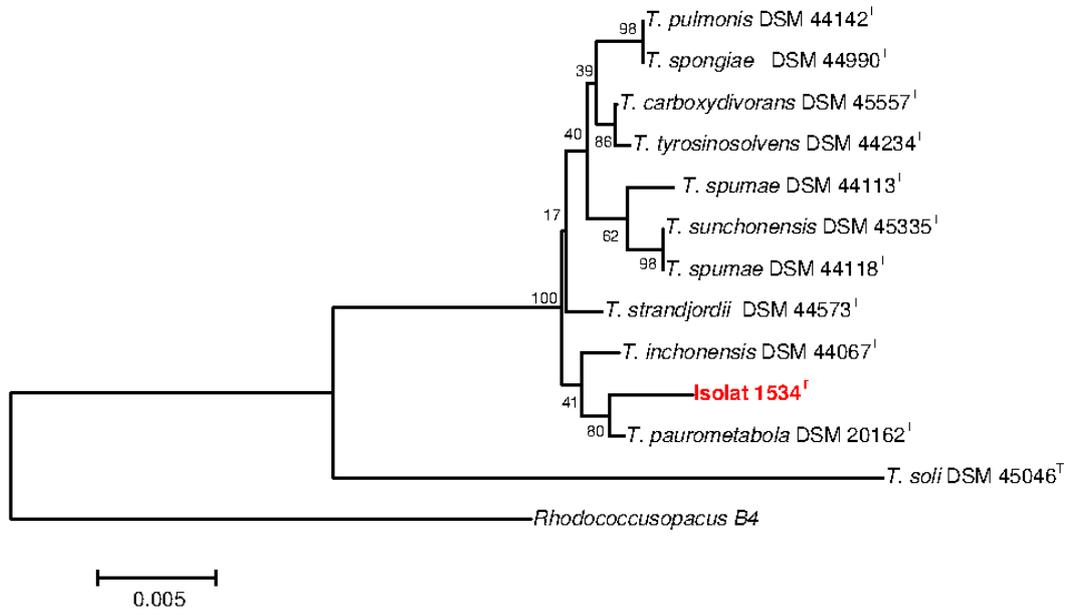
La souche 531 se développe dans une gamme de température entre 20 et 40°C avec un maximum entre 28 et 37°C. Elle tolère 3 % de NaCl et montre une inhibition de croissance à pH inférieur à 5. Elle ne peut pas croître dans une atmosphère enrichie de CO<sub>2</sub> ni en anaérobiose. Elle est également sensible aux lysozymes.

**Tableau 25** : caractères culturels de l'isolat 531 sur les différents milieux de culture après 7, 14 et 21 jours à 37 °C

Durée d'incubation	Caractéristiques	Milieux de culture						
		Glu-Asp	Spo-Agar	ISP1	ISP2	ISP4	ISP5	ISP7
7 jours	1 <sup>ère</sup> apparition	3 jours	3 jours	3 jours	3 jours	3 jours	5 jours	+/-Pas de pigment mélanoidé
	Masse sporale	-	-	-	-	-	-	
	Mycélium primaire	+ orange	+/- jaune	++ jaune	++ jaune	+ neutre	+/-	
	Mycélium secondaire	+ orange	+/- jaune	++ jaune	++ orange	-	-	
14 jours	Degrés de croissance	++	++	++	++	+	+/-	+/-Pas de pigment mélanoidé
	Masse sporale	-	orange-brun	-	-	-	-	
	Mycélium primaire	++ orange	++ jaune	++ jaune	++ jaune	+ neutre	+ neutre	
	Mycélium secondaire	++ orange	++ orange	++ jaune	++ orange	-	-	
21 jours	Degrés de croissance	++	++	++	++	+	+/-	+/- Pas de pigment mélanoidé
	Masse sporale	-	orange-brun	-	-	-	-	
	Mycélium primaire	++ Orange	++ Jaune	++ Jaune	++ Jaune	+ Neutre	+ Neutre	
	Mycélium secondaire	++ Orange	++ Orange	++ Jaune	++ Orange	-	-	

Il a été montré que plusieurs espèces du même genre avec des pourcentages élevés de similarités de leurs séquences des gènes ARNr 16S (>99%), présentaient de faibles valeurs d'hybridation ADN-ADN (Peltola *et al.*, 2001; Schippers *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2009; Fang *et al.*, 2011; Hamedi *et al.*, 2011). Stackebrandt et Ebers (2006) ont également démontré que les souches présentant une similarité inférieure à 98,7% des séquences du gène ARNr 16S ont toujours des valeurs de réassociation d'ADN-ADN inférieures à 70%. La souche 531 partage une

identité de seulement 98,84 % avec *Micromonospora rosaria* d'une part et diffère de cette dernière par plusieurs caractères notamment la production de pigments mélanoides ainsi que la couleur du mycélium sur différents milieux de culture, la forme des spores en microscopie électronique ce qui nous permet de conclure qu'il s'agit d'une nouvelle espèce du genre *Micromonospora*.



**Figure 41** : arbre selon la méthode des distances (Neighbor-Joining) construit d’après l’analyse des séquences du gène qui code pour l’ARNr 16S en utilisant le logiciel Mega (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) version 5 (Tamura *et al.*, 2011) montrant la position phylogénétique de l’isolat **1534** parmi les espèces du genre *Tsukamurella*. La matrice des distances est calculée selon le modèle Kimura à 2 paramètres (Kimura, 1980). Les valeurs mentionnées à l’origine des nœuds représentent les pourcentages supérieurs à 40 % de 1000 bootstrap. 0,005 représente le nombre de substitution par position de nucléotide.

### 3-8 Le genre *Tsukamurella*

#### 3-8-1 Étude phylogénétique de l'isolat 1534

L'étude phylogénétique a révélé l'appartenance de l'isolat 1534 au genre *Tsukamurella*. Le genre *Tsukamurella* (Tsu.ka.mu.rel'la) proposé en 1988 par Collins *et al.*, est un nom féminin baptisé en l'honneur du célèbre microbiologiste japonais, Michio Tsukamura (Collins *et al.*, 1988).

L'isolat 1534 partage des pourcentages d'identité allant de 99,10 à 99,45 % avec les espèces *Tsukamurella pulmonis*, *Tsukamurella tyrosinosolvans*, *Tsukamurella inchonensis*, *Tsukamurella strandjordii* et *Tsukamurella paurometabola* (tableau13). Un arbre phylogénétique enraciné a été construit par la méthode des distances Neighbor-Joining (NJ) (Saitou et Nei, 1987) à l'aide du logiciel Mega version 5 (Tamura *et al.*, 2011) (figures 41) pour déterminer l'emplacement phylogénétique de l'isolat 1534.

L'isolat 1534 semble être apparenté à *Tsukamurella paurometabola* car il occupe la même ligne phylogénétique que cette espèce mais avec une valeur de bootstrap faible (80 %).

#### 3-8-2 Pouvoir pathogène

La souche 1534 a été isolée à partir d'un crachat d'une malade adulte admise au service de pneumologie (annexe 6).

Les bactéries du genre *Tsukamurella* sont des bactéries telluriques qui se trouvent naturellement dans le sol, les boues et les arthropodes (punaise de lit : *Cimex lectularis*). Elles sont rarement pathogènes pour l'homme et sous des conditions bien spéciales. (McNeil et Brown 1994, Liu *et al.*, 2011)

Les informations sur les infections humaines attribuées aux *Tsukamurella* sont rares et tendent à être des rapports uniques sur des cas isolés (Rey *et al.*, 1997 ; Borriello *et al.*, 2005). Ces mêmes auteurs suggèrent que les infections à *Tsukamurella* sont sporadiques, acquises dans la collectivité, et même d'origine nosocomiale. Cependant, les infections causées par ces germes peuvent ne pas être enregistrées et que les souches incriminées peuvent être soit omises ou mal identifiées dans les laboratoires de diagnostic bactériologique non spécialisés (Alcaide *et al.*, 2004 ; Stanley *et al.*, 2006).

En plus, ce genre bactérien partage de nombreuses caractéristiques microbiologiques avec les genres proches, y compris la morphologie des colonies, la

lente croissance et la faible acido-alcool résistance, qui peut conduire au diagnostic de *Corynebacterium*, *Rhodococcus*, *Nocardia*, *Gordonia* ou même de *Mycobacterium spp.* (Liu *et al.*, 2011).

En effet une étude rétrospective, sur une période de 12 ans, a été réalisée par l'équipe du laboratoire de bactériologie de NTUH (National Taiwan University Hospital, Taipei, Taiwan) au cours de laquelle, seulement, dix souches ont été identifiées comme appartenant au genre *Tsukamurella*, initialement identifiées comme appartenant au genre *Rhodococcus*. Les résultats obtenus montrent que *T. tyrosinosolvans* (n = 6) est l'espèce prédominante, suivie par *T. spumae* (n = 3) et *T. pulmonis* (n = 1). La kératite était le type d'infection le plus commun (n = 3), suivie par l'infection du sang liée au cathéter (n = 2). Un des patients atteints de bactériémie est décédé (Liu *et al.*, 2011).

Les présentations cliniques les plus fréquentes causés par les espèces du genre *Tsukamurella* chez l'homme sont des infections cutanées, des méningites, des infections pulmonaire et des infections du sang associées aux instruments, y compris la bactériémie liée au cathéter, en particulier du cathéter veineux central (Lai, 1993 ; Maertens *et al.*, 1998 ; Schwartz *et al.*, 2002 ; Sheridan *et al.*, 2003 ; Liu *et al.*, 2011). Des chercheurs ont démontré la capacité de ces bactéries à provoquer une péritonite associée à la dialyse péritonéale continue ambulatoire (Shaer et Gadegbeku, 2001 ; Liu *et al.*, 2011), une infection de la prothèse de genou (Larkin *et al.*, 1999), abcès du cerveau (Liu *et al.*, 2011), une pneumonie cavitaires chez un sidéen (Alcaide *et al.*, 2004), et des infections oculaires (Liu *et al.*, 2011).

La plupart des infections à *Tsukamurella* se produisent chez les sujets immunodéprimés, en particulier ceux ayant une maladie pulmonaire chronique sous-jacente. La majorité des cas rapportés dans la littérature ont été attribués à *T. paurometabola*. Le premier cas documenté d'une infection à *Tsukamurella* a été faite par Tsukamura et Kawakami (1982) qui ont isolé en plusieurs reprises une souche de *Tsukamurella paurometabola* d'une infection pulmonaire chez un homme immunocompétent âgé de 50 ans. Par la suite, des souches de *T. paurometabola* ont été associées à des cas de bactériémie (Jones *et al.*, 1994 ; Lai, 1993 ; Shapiro *et al.*, 1992), de méningite mortelle (Prinz *et al.*, 1985), de ténosynovite nécrosante avec plusieurs abcès sous-cutanés (Tsukamura *et al.*, 1988), et dans plusieurs infections cutanées (Granel *et al.*, 1996).

**Tableau 26** : caractères cultureux de l'isolat 1534 sur les différents milieux de culture après 7, 14 et 21 jours à 37 °C

Durée d'incubation	Caractéristiques	Milieux de culture						
		Glu- Asp	Spo- Agar	ISP1	ISP2	ISP4	ISP5	ISP7
7 jours	1 <sup>ère</sup> apparition	48 h	48h	24 h	24 h	4 jours	48 h	
	Masse sporale	-	-	-	-	-	-	+/- Pas de pigment mélanoïde
	Mycélium primaire	+/-	+/-	+ blanc	+ crème	+ crème	+ crème	
	Mycélium secondaire	-	-	-	-	-	-	
14 jours	Degrés de croissance	+	++	+	++	+	+	
	Masse sporale	-	-	-	-	-	-	+/- Pas de pigment mélanoïde
	Mycélium primaire	+ saumon	++ beige	+ blanc	++ saumon	+ crème	+ crème	
	Mycélium secondaire	-	-	-	-	-	-	
21 jours	Degrés de croissance	+	++	+	++	+	+	
	Masse sporale	-	-	-	-	-	-	+/- Pas de pigment mélanoïde
	Mycélium primaire	+ orange	++ saumon	+ blanc	++ saumon	+ crème	+ crème	
	Mycélium secondaire	-	-	-	-	-	-	

Des cas de bactériémie liée au cathéter ont été attribués à *Tsukamurella pulmonis* et *Tsukamurella tyrosinosolvans* (Elshibly *et al.*, 2005 ; Maertens *et al.*, 1998 ; Schwartz *et al.*, 2002 ; Sheridan *et al.*, 2003). En effet *Tsukamurella pulmonis* a été isolée pour la première fois d'un crachat d'une personne âgée souffrante de pneumonie chronique.

Cette malade a été décrite comme étant guérie d'une tuberculose pulmonaire, et éventuellement d'une infection avec une autre mycobactérie (Yassin *et al.*, 1996). *Tsukamurella inchoensis* est également été signalée comme origine des infections pulmonaires (Yassin *et al.*, 1995, 1996, 1997).

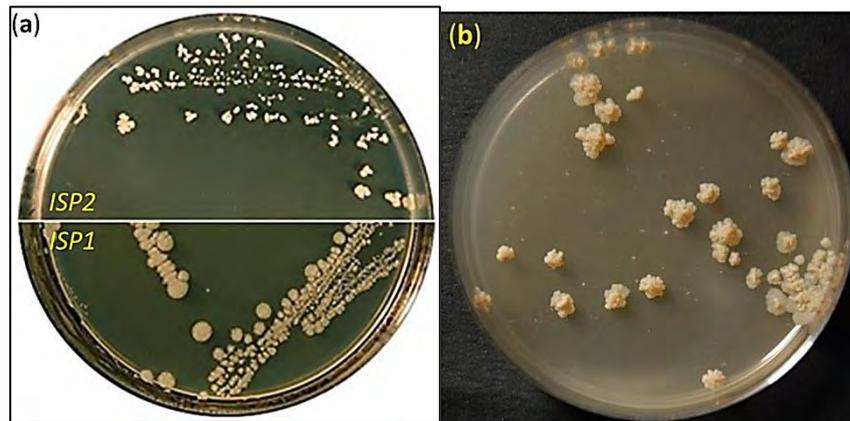
*Tsukamurella strandjordii* a été isolée à partir de cultures de sang d'un enfant atteint de leucémie myéloïde aiguë (Kattaret *et al.*, 2001). Des souches de *Tsukamurella* ayant des propriétés phénotypiques similaires à celles de *Tsukamurella pulmonis* et *Tsukamurella tyrosinosolvans* ont été signalées comme agents causal de conjonctivite (Woo *et al.*, 2003).

### **3-8-3 Étude morphologique de la souche 1534**

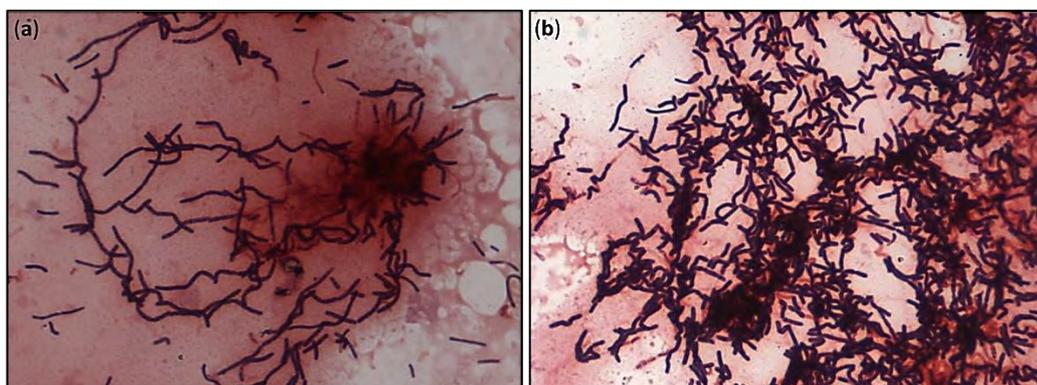
L'isolat 1534 se développe bien à 37°C et donne des colonies plates, superficielles non incrustées dans la gélose, de couleur crème à orange, circulaires de 0,5 à 2 mm de diamètre, avec un bord régulier et parfois rhizoïde (figure 42). La surface est sèche mais facile à émulsionner. Les colonies rugueuses sont produites après une incubation prolongée de sept jours. Ces colonies sont cérébriformes et ne produisent pas des hyphes aériens ni de spores (tableau 26). Dans une atmosphère enrichie en CO<sub>2</sub>, les cultures de l'isolat 1534 miment ceux des mycobactéries.

L'examen microscopique a révélé la présence de bâtonnets droits à légèrement incurvés (0,5-0,8 x 1-5 microns) à bouts arrondis, isolés, en paires ou en amas et présentant parfois des branchements rudimentaires, à coloration de Gram positive, non mobiles, non sporulés (figures 43 et 44).

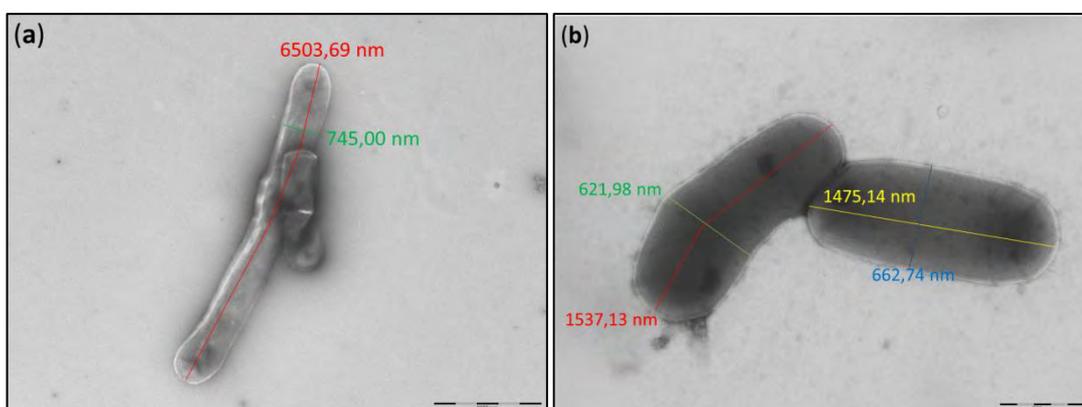
Les cellules ont tendance à former de courtes tiges qui dans les étapes ultérieures de croissance se fragmente en parties qui se séparent en bacilles et se développe indépendamment.



**Figure 42** : photographies montrant les cultures de l'isolat 1534 âgée de 21 jours. (a) culture sur *ISP1* et *ISP2* à 30°C en aérobiose ; (b) culture sur le milieu *ISP2* à 37°C sous atmosphère enrichie de 2,5% de CO<sub>2</sub>.



**Figure 43** : l'isolat 1534 en microscopie optique après coloration de Gram (G x100, technique des lamelles). (a) culture de 7 jours ; (b) : culture de 15 jours.



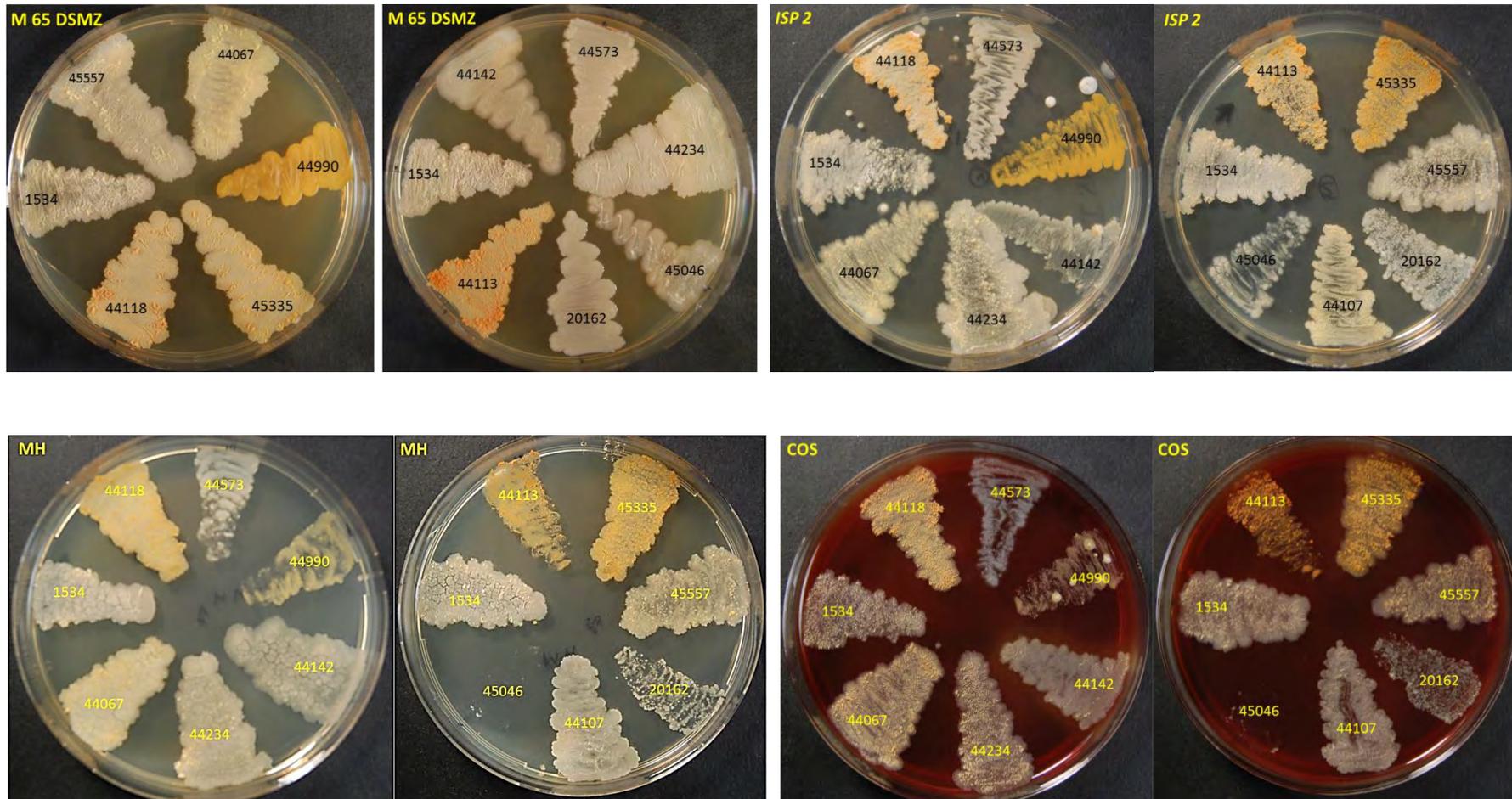
**Figure 44** : photomicrographies électroniques à transmission par coloration négative de l'isolat 1534. (a) un fragment de mycélium, la barre représente 2 µm ; (b) une paire de bâtonnets à bouts arrondis, la barre représente 500 nm.

### 3-8-4 Étude physiologique de la souche 1534

La souche 1534 se développe dans une gamme de température entre 10 et 45°C avec un maximum entre 30 et 37° C. Elle tolère 7,5 % de NaCl et montre une croissance à pH entre 6 et 9. Elle pousse bien sous atmosphère enrichie à 2,5% de CO<sub>2</sub> mais pas à 5% de CO<sub>2</sub> ni en anaérobiose. Elle est résistante au lysozyme.

La culture de la souche 1534 a été comparée aux cultures des onze espèces type du genre *Tsukamurella* (figure 45). L'aspect macromorphologique de l'isolat 1534 est différent de celui de la souche *Tsukamurella paurometabola* (DSMZ 20162), Cette dernière ne donne jamais de colonie de couleur orange ou rouge (Goodfellow et Kumar 2012) alors que l'isolat 1534 donne des colonies oranges sur le milieu glucose asparagine et saumon sur le milieu sporulation agar. D'après Goodfellow et Kumar (2012), la combinaison des caractères phénotypiques peuvent distinguer les différentes espèces du genre. Des études antérieures (Woo *et al.*, 2003) ont montré que le séquençage du gène de l'ARNr 16S peut être utilisé pour l'identification de *Tsukamurella* au niveau du genre, mais pas au niveau de l'espèce. Le GC% est de 68,4 % pour *Tsukamurella paurometabola* alors qu'il est de 71 % pour l'isolat 1534 (Oulmi *et al.*, 2012). Ce qui nous permet de conclure qu'il s'agit peut-être d'une nouvelle espèce du genre.

Malgré le succès de l'utilisation des séquences du gène ADNr 16S pour l'identification de la plupart des espèces bactériennes, il existe des genres dans lesquels les séquences du gène de l'ARNr 16S ont été jugées pas assez discriminantes pour l'identification de certaines espèces. Dans de telles circonstances, des séquences de gènes essentiels autres que le gène de l'ARNr 16S, comme *groEL*, se sont révélés utiles pour distinguer les espèces qui ne peuvent pas être différenciées par le séquençage du gène de l'ARNr 16S (Goh *et al.*, 1996 ; Ringuet *et al.*, 1999).



**Figure 45** : l'aspect des cultures de l'isolat 1534 et les espèces type du genre *Tsukamurella* sur différents milieux de culture.

20162 : *Tsukamurellapaurometabola*, 44067 : *T. inchonensis*, 44142: *T. pulmonis*, 44234 : *T. tyrosinosolvans*, 44573 : *T. strandjordii*, 45335 : *T. sunchonensis*, 44113 : *T. spumae*, 44118 : *T. pseudospumae*, 44990 : *T. spongiae*, 45557 : *T. carboxydivorans*, 45046 : *T. soli*, 44107 : *Rhodococcus wratislaviensis*.

## 4°/ Mise au point des protocoles rapides pour les analyses de routine au laboratoire clinique

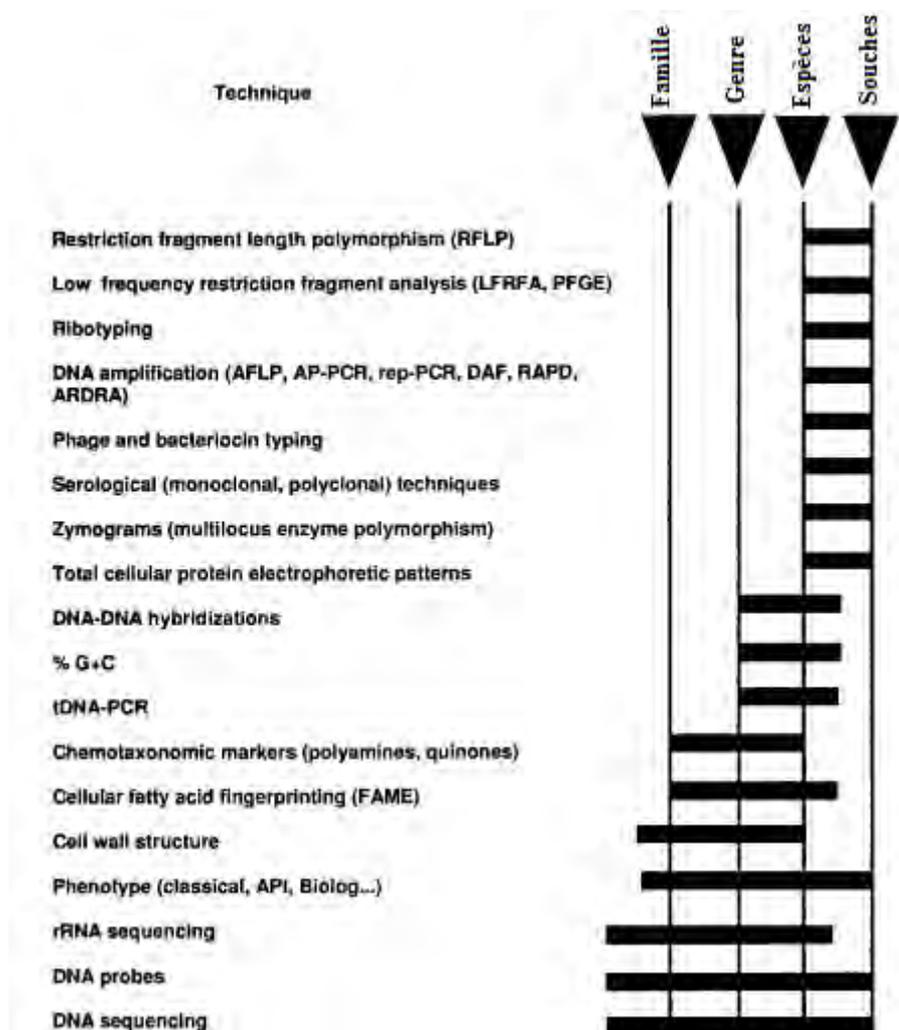
### 4-1 Etude phylogénétique par MLST de l'isolat 1534

Les informations sur les infections humaines attribuées à *Tsukamurella* sont rares ce qui suggère que ses infections sont sporadiques, acquises dans la collectivité ou d'origine nosocomiale. Cependant, les infections causées par *Tsukamurella* peuvent être méconnues ou que les souches incriminées peuvent être soit omises ou mal identifiées dans les laboratoires de diagnostic (Alcaide *et al.*, 2004 ; Stanley *et al.*, 2006). Elles posent ainsi un problème de diagnostic clinique, bactériologique et par la suite un problème thérapeutique. Nous soulignons alors l'intérêt du diagnostic biologique et l'identification du microorganisme qui peuvent influencer la conduite thérapeutique.

L'identification précise des espèces du genre *Tsukamurella* par des méthodes phénotypiques est très difficile. Les caractéristiques microbiologiques de *Tsukamurella*, la morphologie sur les milieux de culture, la croissance lente et la faible acido-alcoolrésistance, peuvent conduire au diagnostic de *Corynebacterium*, *Rhodococcus*, *Nocardia*, *Gordonia*, ou certaines espèces de *Mycobacterium*. Depuis une vingtaine d'année, le développement d'outils de génotypage moléculaire, a considérablement enrichi les études de taxonomie des procaryotes. Cependant l'analyse de la séquence ARNr 16S trouve ses limites dans la distinction de certaines espèces, y compris les espèces du genre *Tsukamurella*, en raison des petites différences dans la séquence du gène de l'ARNr 16S de différentes espèces *Tsukamurella* (Patrick *et al.*, 2003 ; Wang-Huei *et al.*, 2009).

L'hybridation quantitative ADN/ADN reste l'outil de référence pour la détermination spécifique d'une nouvelle souche bactérienne par rapport à la souche de référence la plus proche en phylogénie ARNr 16S. Le seuil admis est de 70% au niveau des hybridations ADN/ADN (Stackebrandt *et al.*, 2002). Aujourd'hui de nombreuses techniques de typage moléculaire plus ou moins discriminantes (Figures 46) sont disponibles pour des études de taxonomie (Vandamme *et al.*, 1996 ; Thompson *et al.*, 2004 a). Les dernières avancées en terme de taxonomie des procaryotes ont montré le pouvoir très discriminant du typage de séquence en multiloci ou MLST (pour *Multi-Locus Sequence Typing*) développé dans cette étude, une méthode de typage simple et relativement facile à mettre en œuvre, basée sur le

séquençage de plusieurs gènes de ménage (Maiden *et al.*, 1998 ; Stackebrandt *et al.*, 2002). Aujourd'hui les taxonomistes s'accordent à privilégier une approche polyphasique combinant plusieurs techniques comme l'hybridation ADN/ADN, le séquençage de l'ARNr 16S ou la MLST et le phénotypage.

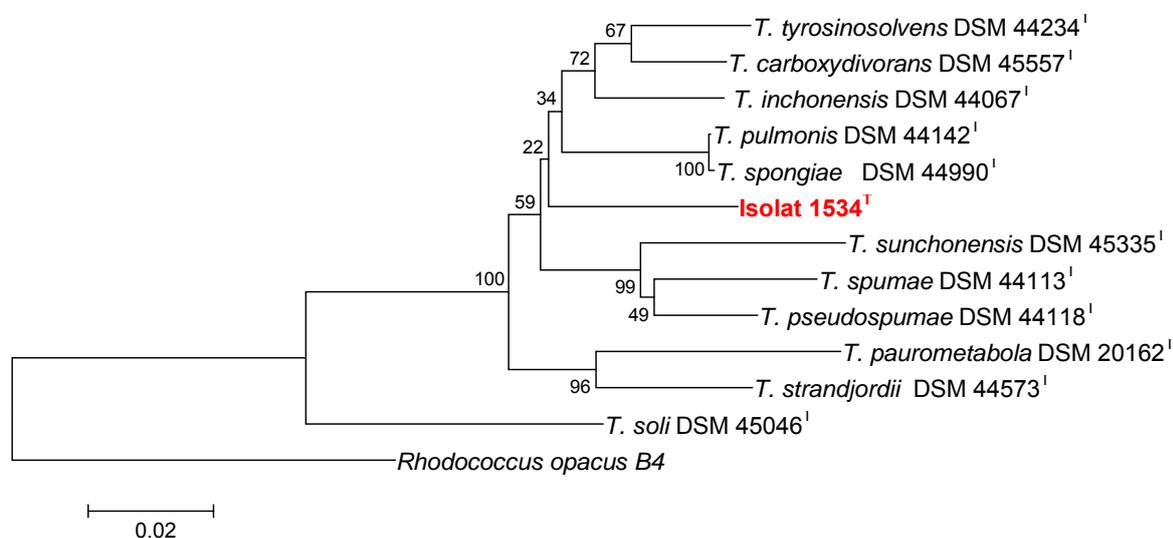


**Figure 46 :** résolution taxonomique des outils de typage les plus couramment utilisés (Vandamme *et al.*, 1996)

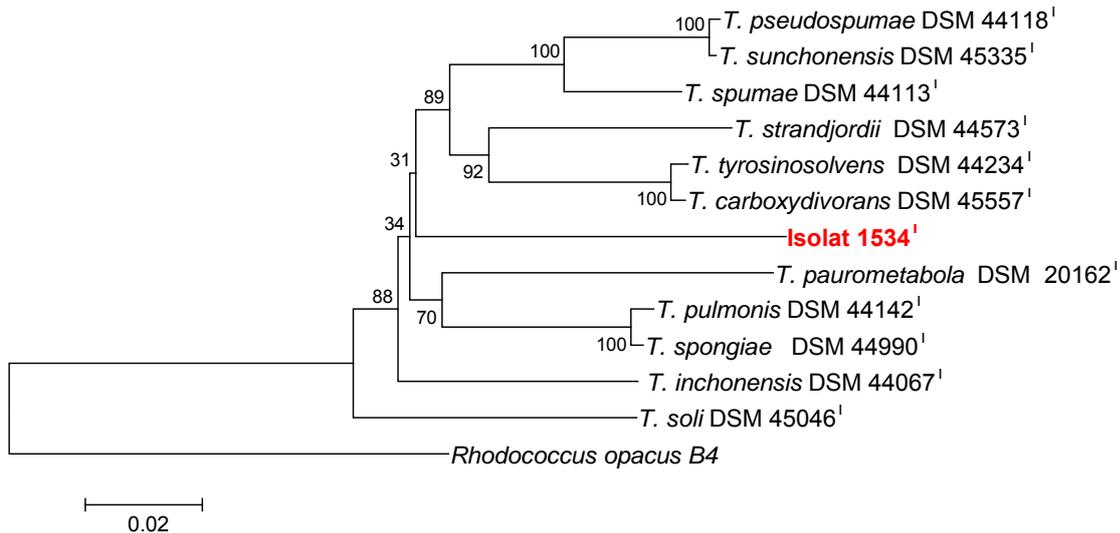
Des arbres phylogénétiques ont été construits à partir de l'analyse des séquences des quatre gènes ainsi que des séquences concatémérisées des quatre gènes totalisant 7788 pb (figures 47a-e). On obtient un minimum de 91% d'homologie entre les séquences nucléotidiques concatémérisées des 11 espèces de *Tsukamurella* étudiées et l'isolat 1534. Le gène présentant le plus de polymorphisme en séquence nucléotidique est le gène *ftsZ* avec au minimum 90% de similarité contre 89% pour *lepA*, 92% pour *rpoA*, 93% pour *rpoB*, et 99% pour *ARNr* 16S (tableau 27).

**Tableau 27** : alignement MLST et pourcentages d'identité

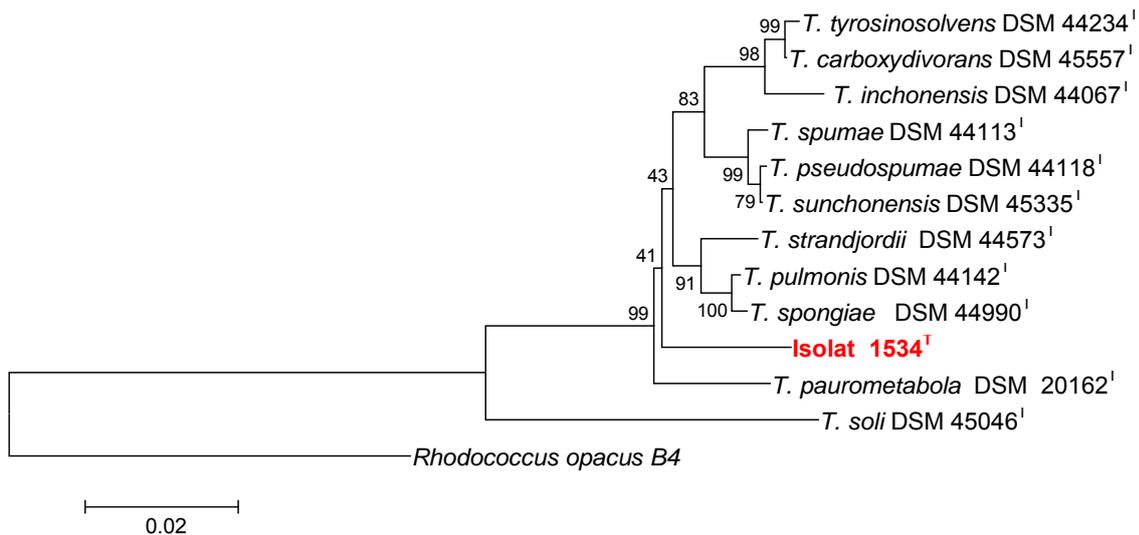
Description	<i>ADNr</i> 16S	<i>ftsZ</i>	<i>lepA</i>	<i>rpoA</i>	<i>rpoB</i>	Concatémer
<i>Tsukamurella</i> sp. 1534	100	100	100	100	100	100
<i>T. paurometabola</i>	99	92	89	96	93	94
<i>T. inchonensis</i>	99	95	90	96	94	95
<i>T. spumae</i>	99	93	90	97	94	94
<i>T. tyrosinosolvans</i>	99	94	89	96	95	94
<i>T. strandjordii</i>	99	93	89	96	93	94
<i>T. soli</i>	96	90	89	92	90	91
<i>T. sunchonensis</i>	99	92	89	97	94	94
<i>T. carboxydivorans</i>	99	94	89	96	94	94
<i>T. pulmonis</i>	99	95	90	97	94	94
<i>T. pseudospumae</i>	99	94	89	97	95	94
<i>T. spongiae</i>	99	95	90	97	94	94
<i>R. opacus</i> B4	95	85	83	86	87	87



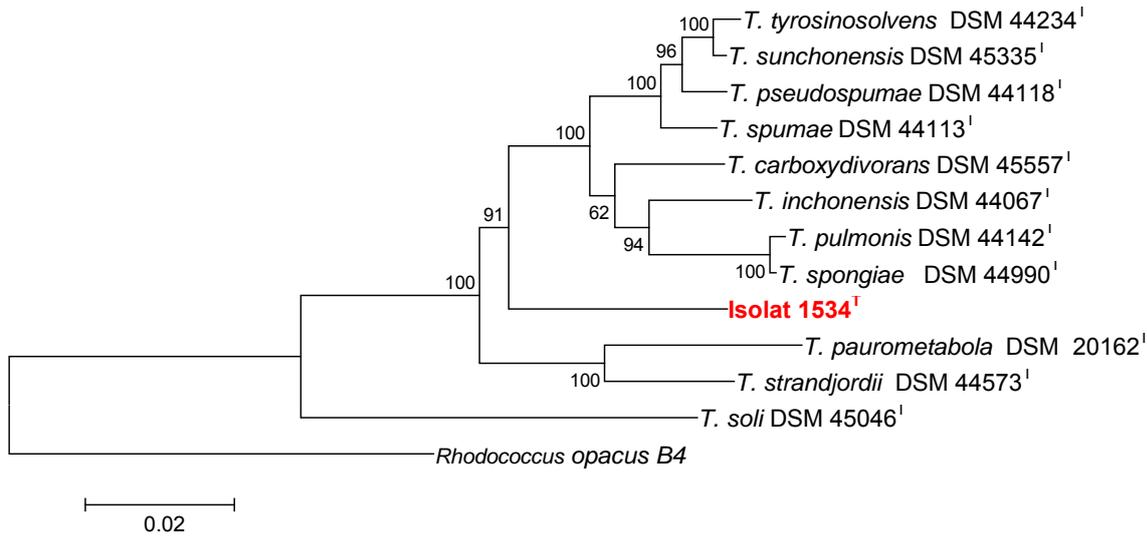
**Figure 47-a** : arbre selon la méthode des distances (Neighbor-Joining) construit d'après l'analyse des séquences du gène qui code pour la protéine *ftsZ* en utilisant le logiciel Mega (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) version 5 (Tamura *et al.*, 2011) montrant la position phylogénétique de l'isolat 1534 parmi les espèces du genre *Tsukamurella*. La matrice des distances est calculée selon le modèle Kimura à 2 paramètres (Kimura, 1980). Les valeurs mentionnées à l'origine des nœuds représentent les pourcentages supérieurs à 40 % de 1000 bootstrap. 0,02 représente le nombre de substitution par position de nucléotide.



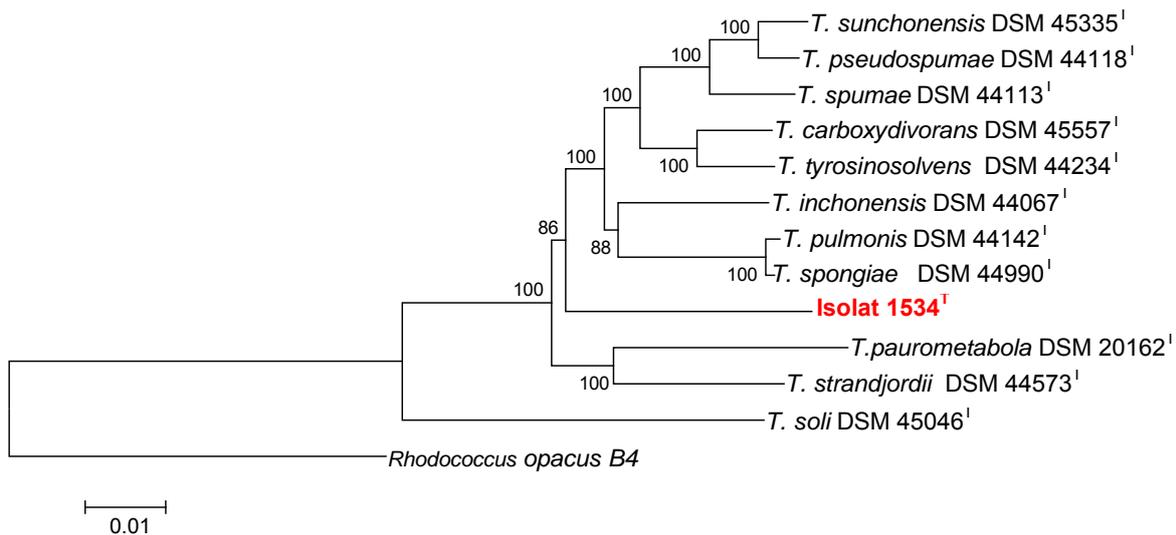
**Figure 47-b :** arbre selon la méthode des distances (Neighbor-Joining) construit d'après l'analyse des séquences du gène qui code pour le *lepA* en utilisant le logiciel Mega (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) version 5 (Tamura *et al.*, 2011) montrant la position phylogénétique de l'isolat 1534 parmi les espèces du genres *Tsukamurella*. La matrice des distances est calculée selon le modèle Kimura à 2 paramètres (Kimura, 1980). Les valeurs mentionnées à l'origine des nœuds représentent les pourcentages supérieurs à 40 % de 1000 bootstrap. 0,02 représente le nombre de substitution par position de nucléotide.



**Figure 47-c :** arbre selon la méthode des distances (Neighbor-Joining) construit d'après l'analyse des séquences du gène qui code pour le *rpoA* en utilisant le logiciel Mega (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) version 5 (Tamura *et al.*, 2011) montrant la position phylogénétique de l'isolat 1534 parmi les espèces du genres *Tsukamurella*. La matrice des distances est calculée selon le modèle Kimura à 2 paramètres (Kimura, 1980). Les valeurs mentionnées à l'origine des nœuds représentent les pourcentages supérieurs à 40 % de 1000 bootstrap. 0,02 représente le nombre de substitution par position de nucléotide.



**Figure 47-d :** arbre selon la méthode des distances (Neighbor-Joining) construit d'après l'analyse des séquences du gène qui code pour le *rpoB* en utilisant le logiciel Mega (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) version 5 (Tamura *et al.*, 2011) montrant la position phylogénétique de l'isolat 1534 parmi les espèces du genres *Tsukamurella*. La matrice des distances est calculée selon le modèle Kimura à 2 paramètres (Kimura, 1980). Les valeurs mentionnées à l'origine des nœuds représentent les pourcentages supérieurs à 40 % de 1000 bootstrap. 0,02 représente le nombre de substitution par position de nucléotide.



**Figure 47-e :** arbre selon la méthode des distances (Neighbor-Joining) construit d'après l'analyse des concatémères des séquences des gènes *16S rRNA*, *ftsZ*, *lepA*, *rpoA* et *rpoB* en utilisant le logiciel Mega (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) version 5 (Tamura *et al.*, 2011) montrant la position phylogénétique de l'isolat 1534 parmi les espèces du genres *Tsukamurella*. La matrice des distances est calculée selon le modèle Kimura à 2 paramètres (Kimura, 1980). Les valeurs mentionnées à l'origine des nœuds représentent les pourcentages supérieurs à 40 % de 1000 bootstrap. 0,01 représente le nombre de substitution par position de nucléotide.

D'après le comité adhoc pour la re-évaluation de la définition d'espèce bactérienne (Stackebrandt *et al.*, 2002), un minimum de cinq gènes est nécessaire pour l'étude par MLST des relations inter et intra-spécifiques. Ces gènes doivent être situés aux niveaux de loci chromosomiques différents. Cependant, Cooper et Feil (2004) considèrent que le nombre de gènes à prendre en compte dépend de la longueur séquencée de chaque gène et du degré de variabilité génétique des souches bactériennes à caractériser. Nous notons, cependant, que pour la plupart des espèces bactériennes documentées, quatre à huit gènes suffisent amplement en MLST pour apprécier le degré de variabilité génétique de l'espèce, avec un pouvoir de résolution suffisant. Dans cette étude en MLST, quatre gènes différents ont été séquencés. Les séquences des gènes étudiés sont supérieures ou égales à 932 pb : 1485 pb pour l'ARNr 16S, 932 pb pour *ftsZ*, 1722 pb pour *lepA*, 1046 pb pour *rpoA* et 2920 pb pour *rpoB*. Enright et Spratt (1999) estiment que pour la plupart des bactéries pathogènes, une taille des fragments de gènes étudiés en MLST comprise entre 400 et 500 pb est suffisante dans des études épidémiologiques impliquant des phénomènes de mortalité.

D'après les arbres phylogénétiques construits à partir des séquences des quatre gènes de ménage ainsi que l'arbre construit à partir de la séquence concatémérisée, l'isolat 1534 occupe une ligne phylogénétique indépendante ce qui nous permet de conclure à ce niveau de l'étude qu'il s'agit d'une nouvelle espèce du genre *Tsukamurella*.

Enfin, nous pouvons conclure que grâce aux amorces que nous avons choisies, ainsi que les programmes de PCR mis au point par nos soins pour l'amplification de ces gènes (*ftsZ*, *lepA*, *rpoA* et *rpoB*), nous sommes arrivés à amplifier et à séquencer les quatre gènes. Les séquences obtenues nous ont permis de distinguer l'isolat 1534 des autres espèces du genre *Tsukamurella* ainsi que les autres espèces entre elles. Le gène *ftsZ* est très discriminant à lui tout seul entre les espèces de *Tsukamurella*. Par conséquent nous recommandons l'approche MLST pour différencier entre les espèces d'actinomycètes pathogènes, notamment les bactéries du genre *Tsukamurella*.

## 4-2 Profilage des espèces type du genre *Tsukamurella* par MALDI-TOF et validation d'une banque

Devant soit la lourdeur soit le coût des nouvelles techniques de diagnostic disponibles dans les laboratoires de microbiologie, l'identification phénotypique demeure la règle, malgré son délai de réponse et son manque de robustesse. Le développement d'une technique alternative plus rapide et plus fiable, utilisable par tous les laboratoires de routine et sur toutes les bactéries, était toujours attendu.

La spectrométrie de masse (MS : Mass Spectrometry), grâce à son pouvoir de résolution très élevé, est considérée comme une technique pouvant être utile à l'identification microbienne, à la taxonomie, et à l'analyse de la composition de la cellule bactérienne. C'est une technique physique d'analyse permettant de détecter et d'identifier des molécules d'intérêt par mesure de leur masse, et de caractériser leur structure chimique. Cette nouvelle technologie permet de réaliser très rapidement et à moindre coût un diagnostic d'espèce sur des colonies de bactéries ou de champignons isolées sur des milieux de culture solides.

La spectrométrie de masse utilisée dans cette étude est celle de type *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation Time Of Flight Mass Spectrometry* (MALDI-TOF/MS). L'objectif de cette partie d'étude est d'étudier la capacité des profils spectraux bactériens MALDI-TOF/MS à distinguer et caractériser rapidement les différentes espèces du genre *Tsukamurella*. Les études réalisées sur l'identification des *Tsukamurella* par spectrométrie de masse sont rares car ce groupe de bactéries est beaucoup moins étudié que les autres groupes pour des raisons pratiques.

MALDI-TOF/MS est basée sur l'ionisation des échantillons. Un échantillon couvert d'une matrice ionisante est bombardé par un laser. En étant désorbées de la plaque inerte, les particules ionisables sont accélérées dans un champ électrique en leur imprimant un temps de vol dans un tube où un vide est maintenu. La molécule désorbée est projetée vers un détecteur. Son temps de vol est proportionnel à sa masse ( $m$ ) et sa charge ( $z$ ).

Les informations issues de la spectrométrie de masse se présentent sous forme de spectres d'absorption. L'obtention d'un spectre moyen et représentatif s'effectue après avoir réalisé un nombre prédéfini de tirs laser sur la surface qu'occupe l'analyte.

Ainsi, un spectre représentant une souche est en fait la somme du nombre prédéfini au préalable dans l'acquisition des spectres accumulés et moyennés.

Un total de 12 souches du genre *Tsukamurella* ont été analysés par MALDI-TOF MS. L'isolat 1534 et les onze espèces types du genre *Tsukamurella* de la collection DSM.

Toutes les souches ont été cultivées dans les mêmes conditions. Sur le milieu de Bennett, les spectres de masse contiennent plus de pics. Nous avons utilisé dans une étude préliminaire le milieu ISP2, sporulation agar et la gélose au sang. Nous avons opté pour le milieu Bennett qui a donné les meilleurs spectres. La reproductibilité des spectres MALDI-TOF/MS est un facteur important qui a été abordé dans un certain nombre d'études (Camara et Hays, 2007 ; Saenz *et al.*, 1999).

Nous avons remarqué que le temps de culture des souches doit être minimal et permet une analyse des colonies suffisamment développées sans que les cultures ne soient vieillissantes ou les géloses desséchées.

Dans cette étude, les spectres ont été obtenus après inactivation des cultures pour éviter tout risque de contamination (contamination du personnel du laboratoire ou matériel surtout que certains d'entre eux ont déjà été jugés responsable d'infection mais de niveau de biosécurité 1 ou 2), l'éthanol a été utilisé à cette fin. Nous avons craint également que l'utilisation de l'éthanol pourrait nuire à la qualité des spectres parce que l'éthanol précipite les protéines. Mais ce problème est surmonté par l'incorporation des étapes de lavage par de l'eau avant extraction selon les recommandations de Bruker.

Briser la paroi de la cellule (ajout des billes de verre avec agitation) était une autre étape cruciale qui a facilité l'extraction des protéines cellulaire. En effet, nous avons déjà observé que la perturbation de la paroi cellulaire des *Tsukamurella* était fort nécessaire à leur détection moléculaire appropriée. Ce fut aussi le cas pour la détection des mycobactéries, un autre groupe de procaryotes avec une paroi cellulaire rigide, en utilisant une approche moléculaire ou MALDI-TOF MS (El Khechine *et al.*, 2011).

La préparation des échantillons utilisant une extraction protéique nécessite quelques étapes de centrifugation ainsi que des solvants comme l'acide formique, l'acétonitrile ou dans d'autres protocoles le TFA. Tous ces éléments, même s'ils demeurent rapides par rapport aux méthodes conventionnelles, demandent tout de même un temps de pré-analyse important, pour cela nous avons essayé de procéder

autrement, en déposant directement les bactéries intactes sur la plaque cible pour évaluer cette technique. Un premier test de la méthode du dépôt direct de l'échantillon (smear) a été réalisé d'abord sur trois souches, l'isolat 1534, *T. paurometabola* et *T. inchonensis*. Le test n'a pas permis d'avoir de bon résultat. En effet, pour qu'un dépôt direct donne une bonne identification, la quantité déposée ne doit pas dépasser certaines valeurs ( $10^9$  UFC), car cela nuit à l'ionisation de l'échantillon et la richesse du spectre. Ainsi une fine quantité bien étalée d'une manière homogène est assez suffisante pour donner un spectre riche. Mais ça n'a pas été le cas avec les bactéries du genre *Tsukamurella* qui sont difficile à mettre en suspension, en effet la culture reste grumeleuse et le milieu reste limpide et par conséquent difficile à étalé sur la cible MALDI.

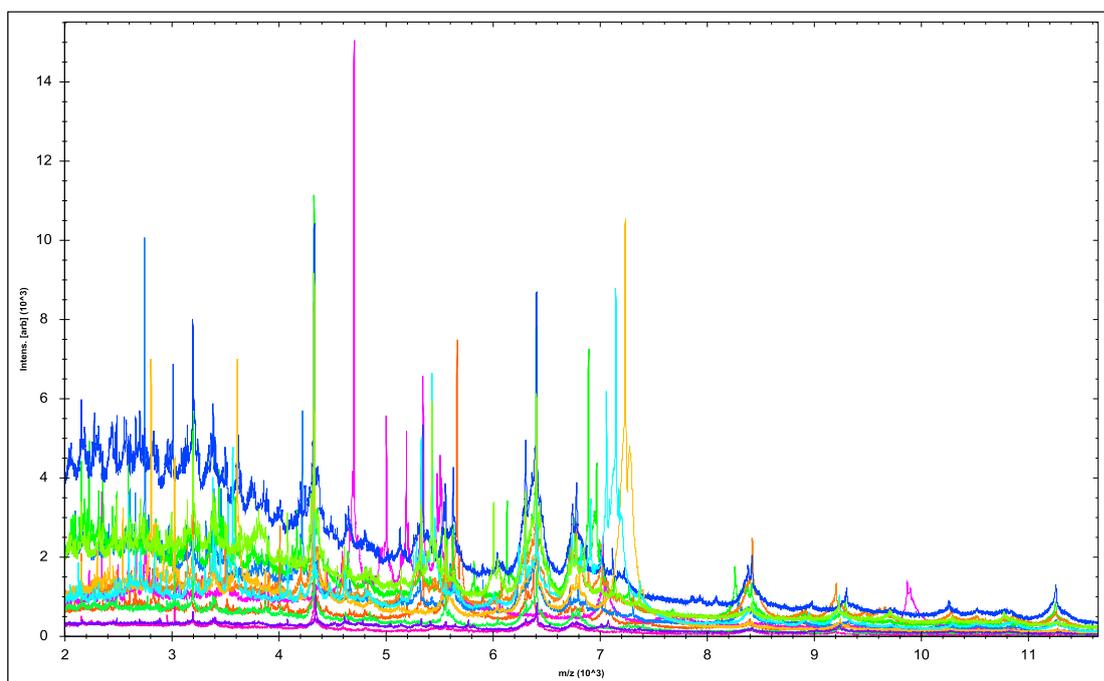
Ce test a montré qu'une telle technique (smear) pourrait facilement être applicable dans la routine pour l'analyse des bactéries courantes mais pas pour ceux appartenant au genre *Tsukamurella*. Le laboratoire de bactériologie de l'hôpital de la Timone Marseille utilise la technique de dépôt direct pour l'analyse des bactéries courantes sauf les mycobactéries qui ont un protocole spécifique.

Certaines bactéries comme *Nocardia*, *Bacillus*, principalement des bactéries à coloration de Gram positive etc. nécessitent le recours à une extraction protéique.

Pour chaque souche étudiée, six séries (différentes séries de cultures) de huit dépôts sont effectués *sur la cible MALDI*. La qualité du dépôt est un facteur déterminant lors de la réalisation d'une identification des *Tsukamurella* par spectrométrie de masse MALDI-TOF et nécessite une certaine expertise de l'opérateur.

L'acquisition automatique des spectres est réalisée en utilisant le logiciel Flex Control TM (Bruker Daltonics). Le transfert direct des données vers le logiciel Flex Analysis TM (Bruker Daltonics) permet de visualiser les fichiers des spectres.

Les spectres ont été enregistrés en mode linéaire positif pour la gamme de masse de 2000 à 20000 Da (paramètres : source d'ions 1(ISI), 20 kV ; IS2, 18,5 kV; lentille, 7 kV). Les spectres ont été obtenus après 675 coups à une puissance de laser variable. Le temps d'acquisition était entre 30 secondes à 1 minute de chaque cible. Pour chaque spectre, un maximum de 100 pics ont été pris en compte.



**Figure 48 :** les douze différents profils (supers spectres) des 12 souches du genre *Tsukamurella* représentés en différentes couleur (MALDI BioTyper™ 2.0). Les rapports masse/charge (m/z) se trouvent en abscisse. En ordonnée, est représenté le nombre d'ions produits pour chaque espèce.

Pour l'identification, l'analyse et la classification des spectres, le logiciel MALDI BioTyper (version 2.0, Bruker) est utilisé. Ce dernier offre trois approches différentes : MSP (Main Spectra Projection) qui retient tous les spectres avec un bruit de fond égal à 0,1% et PCA (Principal Component Analysis) utilisé pour la classification des bactéries soit en dendrogrammes, soit en deux ou en trois dimensions et qui ne retient que les 70 pics majoritaires avec un bruit de fond égal ou supérieur à 1% ; et enfin CCI (Component Correlation Index) qui est une méthode statistique pour l'analyse des relations entre les spectres et calcule le taux de similarité des spectres, ce taux qui se traduit par un nombre logarithmique entre 0 et 3. Quand ce taux est entre 1,7 et 3, nous pouvons déduire qu'il s'agit de spectres identiques au sein de la même espèce et quand ce nombre est en dessous de 1,7 les spectres sont différents et il s'agit de deux espèces différentes (Bruker).

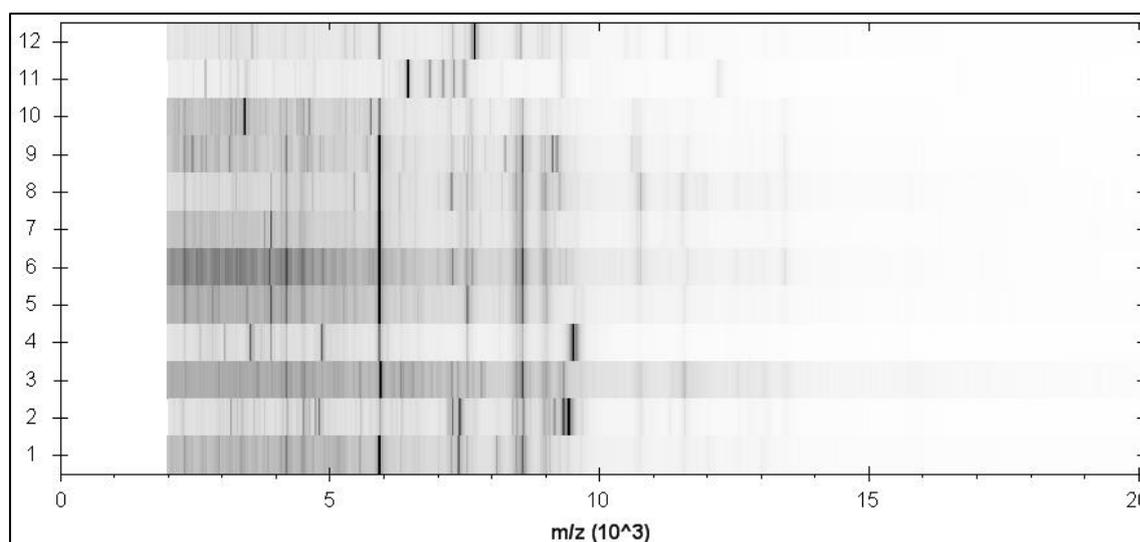
L'identification d'un spectre inconnu est réalisée à l'aide d'un algorithme de reconnaissance utilisant les positions de pics, leurs intensités autant que leurs fréquences d'apparition. Les 48 spectres obtenus pour chaque souche issus de différents dépôts sont traités pour déterminer les 24 meilleurs spectres qui serviront de spectres références pour chaque souche étudiée. Un super spectre est le profil moyen qui est obtenu après la mesure de ces 24 spectres sélectionnés. Le logiciel génère automatiquement les listes des pics à partir de tous les spectres et extrait les pics typiques qui sont présents dans les spectres d'une seule espèce.

Le "matching score", basé sur les masses identifiées et la corrélation de leurs intensités, est généré et utilisé pour classer les résultats. Toutes les souches testées ont donné un profil protéique visible avec un score d'identification de 2,5 à 2,9. Dans tous les cas, les témoins négatifs ont donné soit des pics non détectables ou des profils faibles qui n'ont pas été interprétés par le système et les contrôles positifs ont donné les profils protéiques attendus. Les spectres de protéines obtenus dans cette étude, à partir des onze souches types de référence ainsi que l'isolat clinique 1534, sont représentés dans la figure 48. Les profils moyens obtenus pour les douze souches étudiées sont reproductibles et très différents dans leur composition en pics et dans l'importance relative de chaque pic (figure 48).

Une seconde approche a été réalisée. Elle est basée sur la transformation des spectres de masse en pseudogel qui représente le profil spectral d'une souche donnée par des bandes dont chacune représente un pic ou  $m/z$ .

La représentation en GelView affiche les spectres bruts de l'ensemble des fichiers des spectres chargés disposés en pseudo-gel. L'axe de gauche affiche le numéro des spectres des souches étudiées. L'intensité du pic est exprimée par un code système d'échelle de gris.

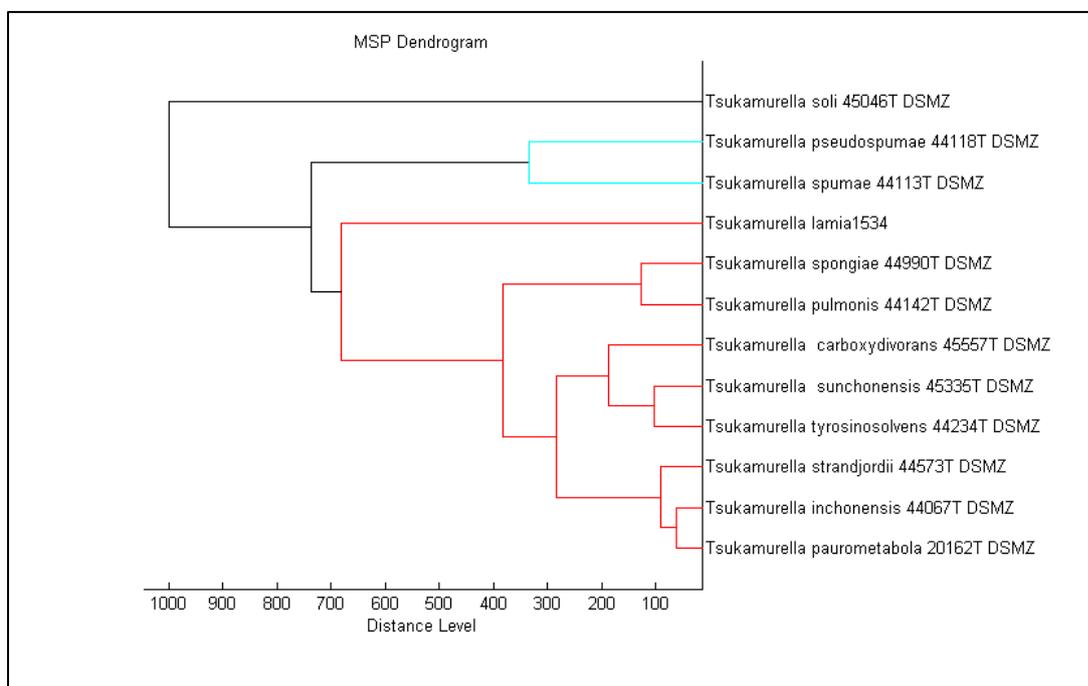
La présentation des résultats sous forme de pseudogel (figure 49) illustre bien la différence entre les profils spécifiques à l'espèce pour toutes les souches types référencée du genre *Tsukamurella* ainsi que l'isolat 1534 testées par spectrométrie de masse. La figure 49 montre les différences entre les spectres que ce soit au niveau du nombre total de pics ou au niveau de l'intensité de ces derniers. De plus, la vue de gel permet la mise en évidence des différences du profil protéique numéro douze de l'isolat 1534 avec le profil protéique numéro neuf de *T. paurometabola* DSM 20162<sup>T</sup>.



**Figure 49 :** vue en pseudogel (MALDI BioTyper<sup>TM</sup> 2.0) des douze profils protéique (super spectres) représentant les espèces type du genre *Tsukamurella* numéroté de un à onze et le spectre de l'isolat 1534 (numéro 12)

**1,** *T. sunchonensis* DSM 45335<sup>T</sup>; **2,** *T. pseudospumae* DSM 44118<sup>T</sup>; **3,** *T. spumae* DSM 44113<sup>T</sup>; **4,** *T. carboxydivorans* DSM 45557<sup>T</sup>; **5,** *T. tyrosinosolvans* DSM 44234<sup>T</sup>; **6,** *T. inchonensis* DSM 44067<sup>T</sup>; **7,** *T. pulmonis* DSM 44142<sup>T</sup>; **8,** *T. spongiae* DSM 44990<sup>T</sup>; **9,** *T. paurometabola* DSM 20162<sup>T</sup>; **10,** *T. strandjordii* DSM 44573<sup>T</sup>; **11,** *T. soli* DSM 45046<sup>T</sup>; **12** isolat 1534.

Les listes des pics dérivées à partir des super spectres peuvent être utilisées pour l'identification, aussi bien que pour la génération d'un dendrogramme de classification. Le score obtenu dans ce contexte est utilisable pour la production d'arbres de la famille et l'analyse de la relation des individus (figure 50). Cette approche permet une véritable comparaison entre les profils protéique des bactéries étudiées.



**Figure 50 :** dendrogramme de classification des 12 souches du genre *Tsukamurella* réalisé par le logiciel MALDI BioTyper™ 2.0 de Bruker.

Le dendrogramme basé sur les profils de spectre de masse MALDI-TOF des douze souches du genre *Tsukamurella* a montré une capacité de produire des empreintes qui sont spécifiques à l'espèce. En outre, avec MALDI BioTyper™ 2.0 et selon les paramètres choisis, nous avons observé une discrimination considérable entre l'isolat 1534 de la souche *T. paurometabola* DSM 20162<sup>T</sup>. Nous avons confirmé encore une fois qu'il s'agit bien d'une nouvelle espèce du genre *Tsukamurella*.

Les Profils des spectres ont été déposés (le 10 Juillet 2012) dans la base de données interne du MALDI-TOF du C.H.U. Hôpital de La Timone. Cette base de données locale complète parfaitement la base de données Daltonics Bruker original (3769 bactéries mis à jour le 15 Mars, 2012). Le protocole d'ajout doit être strict, afin d'éviter toute erreur, nous avons vérifié l'absence de croisement avec d'autres spectres ou spectres moyen. En effet, seule deux espèces du genre *Tsukamurella* sont présentes en spectres moyens dans la base de donnée de Bruker correspondant à *T. paurometabola* et *T. inchonensis*. Les bases doivent tenir compte de l'évolution de la

taxonomie. Tout taxon inclus dans la base doit être comparé aux autres taxons déjà présents afin d'éviter les confusions et garder la capacité de distinction entre deux taxons donnés.

Les bases de données disponibles sont constamment élargies pour couvrir non seulement les micro-organismes d'importance clinique, mais aussi les micro-organismes d'origine vétérinaire, industrielle, agricole ou d'origine environnementale (Munoz *et al.*, 2011). Une base de données complète et représentative est une condition essentielle pour une identification précise des isolats par spectrométrie. Une mise à jour fréquente de cette base avec des spectres de souches de référence et des souches isolées dans des laboratoires de diagnostic de routine peut avoir une incidence significative sur les performances d'identification MALDI-TOF.

Dans ce travail, nous avons donc élargi la base de données en ajoutant dix autres spectres moyens MALDI-TOF MS correspondants à 10 espèces différentes pour avoir un total de 12 spectres moyens pour toutes les espèces du genre *Tsukamurella* et augmenter la qualité de discrimination entre les différentes espèces du genre sans difficultés. Nous avons également déposé les 288 spectres de référence à raison de 24 spectres référence différents représentant chaque espèce sachant que pour une identification par MALDI-TOF MS exacte et précise de bactéries cultivées, il est nécessaire d'avoir une banque de plus de 10 spectres de référence (Seng *et al.*, 2009).

Nous avons également évalué l'utilisation de routine du MALDI-TOF MS pour l'identification des isolats de bactéries appartenant au genre *Tsukamurella* à partir d'échantillons de patients suspects d'infection par ce groupe bactérien sachant que ce groupe de bactéries est traditionnellement, pour des raisons pratiques, beaucoup moins étudié que les autres groupes.

Les résultats de cette étude préliminaire montrent que la SM MALDI-TOF est une technique rapide, de réalisation très aisée, nécessitant peu de réactifs. À partir d'une culture pure, l'identification d'une espèce peut être obtenue en moins de deux heures. Cela est d'autant plus satisfaisant que l'identification des bactéries du genre *Tsukamurella* pour lesquelles il est nécessaire d'avoir recours à la biologie moléculaire complétée parfois par la chimiotaxonomie pour confirmation. Ce gain de temps et de réactifs sera plus apprécié dans les unités traitant de gros volumes de prélèvements.

## 5° Séquençage du génome de la souche *Tsukamurella* 1534

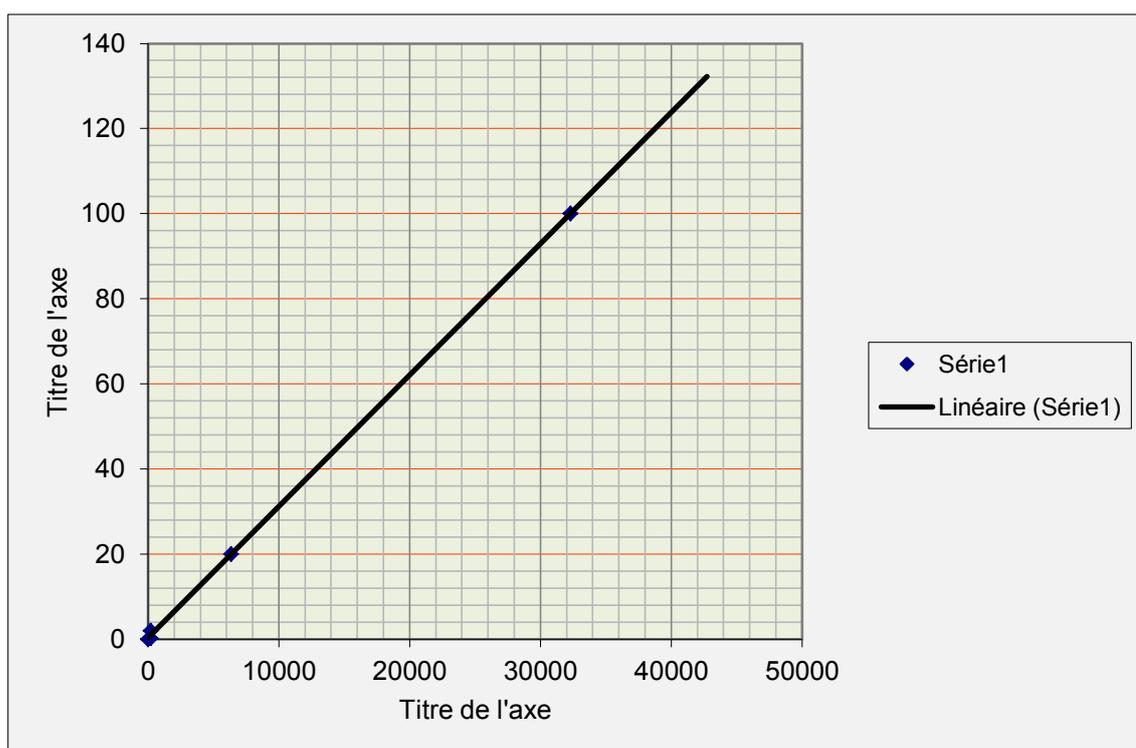
Le projet de séquençage du génome de la souche *Tsukamurella* 1534 est le deuxième projet après le séquençage du génome complet de *Tsukamurella paurometabola*. Il a été réalisé au mois de Mai 2012 en collaboration avec les équipes URMITE, UM63 CNRS 7278, IRD 198 et INSERM 1095, Faculté de Médecine, Marseille, France.

La technologie utilisée dans le séquençage du génome de la souche 1534 est celle de 454 Roche. Il s'agit de l'une des trois technologies de séquençage à haut débit qui dominent actuellement le marché : 454 (Roche), Solexa (Illumina) et SOLiD (Sequencing by Oligo nucleotide Ligation and Detection). Elles se démarquent les unes des autres par les chimies qui les constituent. Elles se décomposent cependant toutes en 4 grandes étapes principales : la préparation des banques d'ADN simple brin, une amplification par PCR, les cycles de réactions de séquençage, la prise d'image après chacun de ces cycles pour déterminer le nucléotide correspondant, puis l'analyse des données.

Le premier des séquenceurs de nouvelle génération a été commercialisé par 454 Life Sciences en 2005, depuis racheté par Roche, mais la plateforme est toujours connue sous le nom générique de 454.

Cette technique de séquençage de 454 Roche permet de traiter avec un seul instrument, plus de 20 millions de bases nucléotidiques par cycle de quatre heures. En effet, cette technique ne nécessite pas de clonage (donc gain de temps et d'argent), et permet une lecture directe de la séquence obtenue après le séquençage. Une seule machine (GSFLX) génère en fait, avec plus de 99% d'exactitude, autant de données que 100 séquenceurs capillaires à haut débit (El Fahime et Ennaji, 2007). Cette technologie avec sa plus grande taille de lecture et sa grande précision la rend appropriée au séquençage *de novo*.

Pour réaliser un séquençage de génome complet, il est nécessaire de l'avoir en petits fragments faciles à séquencer. Deux à trois banques composées de fragments d'ADN génomique doivent être réalisées. Dans notre étude, pour la préparation des banques d'ADN, nous avons opté pour la combinaison entre deux techniques : la première, dite méthode globale couramment désignée sous le nom de « *shotgun* » et



**Figure 51** : courbe étalon pour le dosage spectrofluorimétrique de l'ADN.

la seconde, appelée « *3Kb paired-end* ». Entre les deux banques, les fragments divergent aussi bien en taille qu'en localisation sur le génome. Toutefois, il est nécessaire que l'ADN génomique extrait soit de bonne qualité. Pour cela nous avons cultivée la souche 1534 sur le milieu *ISP2* et nous avons récolté une biomasse cellulaire suffisamment développée.

L'extraction d'ADN a été réalisée selon un protocole qui a prouvé son efficacité dans les travaux antérieurs. Briser la paroi de la cellule (par ajout des billes de verre avec agitation) suivi d'une digestion enzymatique par la protéinase K et finir par une concentration et une purification de l'ADN avec le kit QIAmp (Qiagen) étaient des étapes cruciales qui ont facilité l'extraction de l'ADN génomique de bonne qualité et amélioré amplement le rendement. En effet, nous avons déjà observé que la perturbation de la paroi cellulaire des actinomycètes était forte nécessaire à leur détection moléculaire appropriée. Pour ces raisons, nous avons opté pour la combinaison entre les trois techniques. Ce protocole d'extraction a été utilisé par plusieurs auteurs pour le séquençage des génomes de différentes bactéries appartenant à différents genres : *Alistipes senegalensis*, *Aeromicrobium massiliense*, *Bacillus timonensis*, *Brevibacterium senegalense*, *Cellulomonas massiliensis*, *Kurthia massiliensis* etc. (Mishra *et al.*, 2012 ; Ramasamy *et al.*, 2012 ; Kokcha *et al.*, 2012a ; Kokcha *et al.*, 2012b ; Lagier *et al.*, 2012 ; Roux *et al.*, 2012)

Pour le dosage de la concentration de l'ADN double brin dans les éluats, nous avons choisi une technique spectrofluorimétrique avec le PicoGreen comme réactif. Le principe de cette méthode repose sur l'utilisation d'une molécule fluorescente (le PicoGreen) se fixant spécifiquement sur l'ADN double brin. Les valeurs de la fluorescence obtenues sont comparées à la gamme étalon (figure 51). La linéarité de cette courbe étalon avec une valeur du coefficient de détermination  $r^2$  égale à 0,9997 permet un dosage précis des faibles concentrations. Les concentrations obtenues dans cette analyse sont de 63,3 ng/μl pour le premier éluat et 56,4 ng/μl pour le deuxième, ce qui constitue un bon rendement.

Cette méthode est très utilisée pour la quantification de l'ADN double brin dans des procédures de biologie moléculaire notamment pour la production des banques génomiques (Lagier *et al.*, 2012 ; Roux *et al.*, 2012). Elle est utilisée pour pallier au manque de précision du dosage spectrophotométrique (absorbance à 260 nm) pour les

faibles concentrations ainsi que pour contourner les inconvénients majeurs de la méthode de l'absorbance notamment la grande contribution relative du signal des acides nucléiques simples brins et d'autres contaminants, tels que les nucléotides, et les protéines. Le réactif PicoGreen contourne ces contributions de substances perturbatrices en présentant un maximum d'émission à 530 nm lorsqu'il est lié spécifiquement à l'ADN double brin.

L'amplification clonale (emPCR) des molécules d'ADN simple brin obtenus des deux banques (*shotgun* et *3Kb paired-end*) a généré 482748 microbilles. A partir de ces banques, de nombreux clones sont séquencés puis assemblés.

Le séquenceur utilisé est le *GS FLX pyrosequencer*. L'analyse informatique des images acquises automatiquement durant le séquençage par le logiciel GS Run Browser (Roche), a enregistré des signaux correspondant à 168,2 Mb résultant du séquençage des fragments d'une taille moyenne de 348,5 pb.

À l'aide de logiciels informatiques, les séquences sont alignées et coupées par chevauchement. Ces séquences représentent plusieurs blocs de séquences continus appelées contigs. La combinaison entre les résultats de séquençage des deux banques est très utile pour remettre en ordre et orienter les contigs obtenus les uns par rapport aux autres. La combinaison des deux stratégies de séquençage nous permet également d'éviter les erreurs de séquençage, nous confère une assurance maximal lors de l'ordonnement de contigs, l'étape de « *scaffolding* », et nous augmente la chance de tout séquencer. Malgré cela certaines séquences manquent, ce sont des trous de séquences appelées aussi « *gaps* ». Pour combler ces trous, des amorces de PCR à partir des contigs encadrant le trou sont utilisées pour l'amplification.

Des algorithmes mathématiques (Newbler Assembler, Roche) permettent d'assembler les fragments qui se suivent et de leur attribuer leur véritable emplacement sur le génome. Ainsi, l'assemblage final a permis l'obtention de 42 contigs de tailles supérieur à 1500 pb et un seul contig avec 935 pb. La longueur du plus grand contig est de 513 992 pb (tableau 28). La taille des contigs est très satisfaisante, ce qui signifie que les banques de séquences sont de très bonne qualité et peuvent être utilisées dans les assemblages. Les contigs ont été organisés en quatre *scaffolds*.

**Tableau 28** : les numéros d'accèsions des 42 contigs et leurs tailles en paires de bases

Contigs	N° accession	Taille en pb	Contigs	N° accession	Taille en pb
01	CAJY01000001	139880	22	CAJY01000022	73 914
02	CAJY01000002	76 616	23	CAJY01000023	43 706
03	CAJY01000003	14 710	24	CAJY01000024	31 393
04	CAJY01000004	63 539	25	CAJY01000025	171 816
05	CAJY01000005	<b>513 992</b>	26	CAJY01000026	133 806
06	CAJY01000006	58 225	27	CAJY01000027	<b>5 521</b>
07	CAJY01000007	81 894	28	CAJY01000028	474 972
08	CAJY01000008	38 100	29	CAJY01000029	49 338
09	CAJY01000009	18 916	30	CAJY01000030	192 405
10	CAJY01000010	70 885	31	CAJY01000031	83 758
11	CAJY01000011	21 013	32	CAJY01000032	138 917
12	CAJY01000012	25 144	33	CAJY01000033	228 986
13	CAJY01000013	116 425	34	CAJY01000034	21 856
14	CAJY01000014	33 467	35	CAJY01000035	27 966
15	CAJY01000015	51 676	36	CAJY01000036	164 388
16	CAJY01000016	205 867	37	CAJY01000037	164 364
17	CAJY01000017	189 530	38	CAJY01000038	82 219
18	CAJY01000018	140 474	39	CAJY01000039	76 345
19	CAJY01000019	28 553	40	CAJY01000040	212 361
20	CAJY01000020	143 966	41	CAJY01000041	18 493
21	CAJY01000021	25 689	42	CAJY01000042	30 920

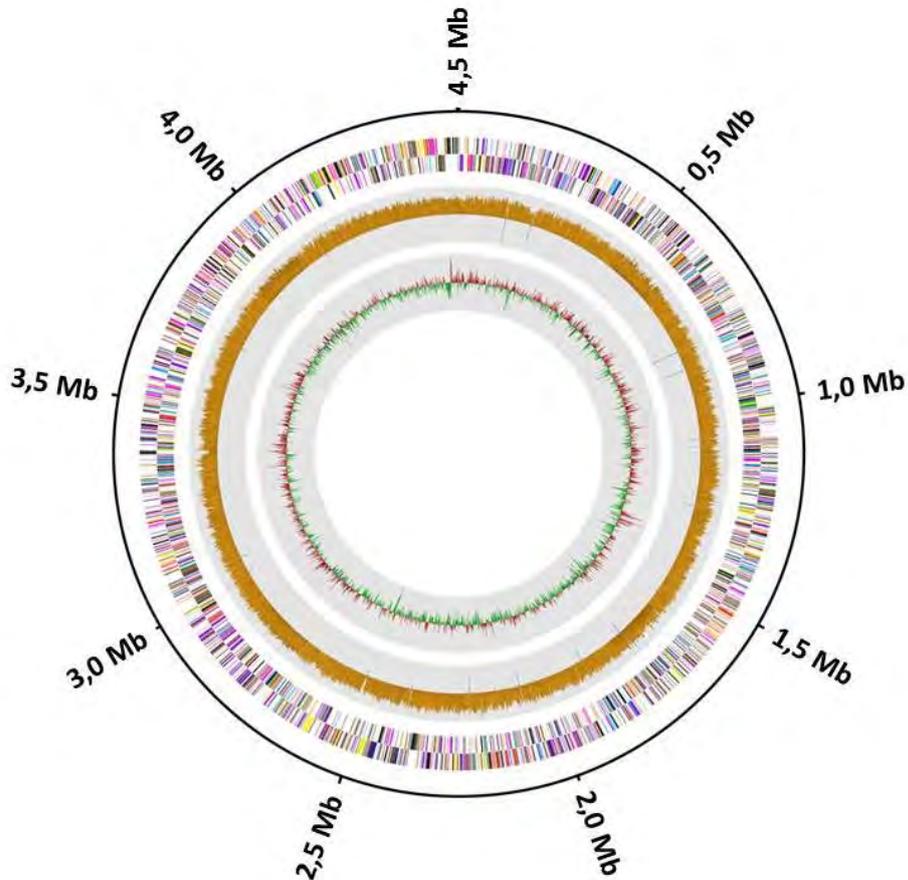
Les propriétés du génome de la souche *Tsukamurella* 1534 sont résumées dans le tableau 29. La taille du génome obtenue est de 4 503 402 pb avec un taux de G+C % égale à 71,1 %.

**Tableau 29** : comparaison entre les données de séquençage des génomes de *Tsukamurella sp.* 1534 et *Tsukamurella paurometabola* 20162<sup>T</sup>.

nom dans EZ taxon	<i>Tsukamurella sp.</i>	<i>Tsukamurella pauromotabola</i>
Souche	1534	DSM 20162 (T)
Project accession	PRJEB87	PRJNA48829
Nom d'origine	<i>Tsukamurella sp.</i> 1534	<i>Tsukamurella pauromotabola</i> DSM 20162
Statut	Assemblé (42 contigs)	Complet (un chromosome et un plasmide)
Taille du génome	4 503 402 pb	4 479 724 pb
GC%	71,1	68,4
CDS	4334	4242
ARNr*	3	6
ARNt	47	48
COG	3875	3025

COG : Cluster of Orthologous Groups families ; CDS : Coding DNA Sequence ; \*Nombre d'opérons de l'ARNr

Le génome de la souche *Tsukamurella* 1534 contient 47 gènes d'ARNt, Trois opérons d'ARNr et 4334 protéines putatives (CDS). 3875 séquences peuvent être attribuées à la famille des COG ce qui représente un pourcentage de 89,4 des séquences codantes (figure 52).



**Figure 52** : carte graphique circulaire du génome de la souche *Tsukamurella* 1534. De l'extérieur vers l'intérieur : des gènes sur le brin sens (COG colorées par catégories), les gènes sur le brin inverse (COG colorées par catégories), Le troisième cercle marque l'opéron des gènes ARNr/ARNt. Le cercle intérieur illustre la teneur en G+C.

La base de données COG (Cluster of Orthologous Groups, (Tatusov *et al.*, 2003)) a été utilisée afin d'affecter une catégorie fonctionnelle à chaque protéine. COG définit 25 catégories, regroupées en 4 grandes familles de fonctions, eux-mêmes répartis dans les 18 catégories fonctionnelles (tableau 30).

Tous les cadres de lecture ouverts, (*Open reading frames/ORF*) situés hors des zones des *gaps*, sont prédits en utilisant Prodigal (<http://prodigal.ornl.gov/>) en utilisant les paramètres par défaut.

**Tableau 30** : nombre de gènes associés aux 18 catégories fonctionnelles de COG

COG	Description	Nombre de gènes	%
J	Traduction, structure du ribosome et biogenèse	156	4,85
K	Transcription	350	10,87
L	Réplication, recombinaison et réparation	120	3,73
D	Contrôle du cycle cellulaire, division cellulaire, séparation des chromosomes	29	0,90
O	Modification post-traductionnelle, protéines turnover, protéines chaperonnes	108	3,36
M	Paroi cellulaire / membrane / biogenèse de l'enveloppe	125	3,88
N	Motilité cellulaire	3	0,09
P	Transport des ions inorganiques et métabolisme	183	5,68
T	Signal des mécanismes de transduction	121	3,76
C	Production et conversion d'énergie	210	6,52
G	Transport et métabolisme des glucides	235	7,30
E	Transport et métabolisme des acides aminés	265	8,23
F	Transport et métabolisme des nucléotides	86	2,67
H	Coenzyme de transport et de métabolisme	144	4,47
I	Transport de lipids	255	7,92
Q	Biosynthèse, transport et catabolisme de métabolites secondaires	106	3,29
R	Fonctions générales prédites	402	12,49
S	Fonctions inconnues	321	9,97
Total		3219	100

Les séquences des protéines bactériennes prédites ont été recherchées dans les bases de données : *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) *Nonredundant* (NR), *UNIPROT* (Magrane, 2011) et *Char-ProtDB* (Madupu *et al.*, 2012) en utilisant l'algorithme BLAST P. Le programme ARAGORN (Laslett et Canback, 2004) a été utilisé pour rechercher des gènes d'ARNt, alors que les ARN ribosomiques ont été trouvés en utilisant RNAmmer (Lagesen *et al.*, 2007) et l'algorithme BLASTn à l'encontre de la base de données *Nonredundant* (NR) de la NCBI.

Les meilleurs résultats du BLAST avec le génome disponible de *T. paurometabola* 20162 DSMZ indiquent que les deux souches partagent 3037 orthologues. Konstantinidis *et al.*, ont proposé que la moyenne d'identité de nucléotides entre les séquences des gènes communs (ANI : pour *Average Nucleotides Identity*) entre deux souches, était une alternative valable à l'hybridation ADN-ADN (Konstantinidis et

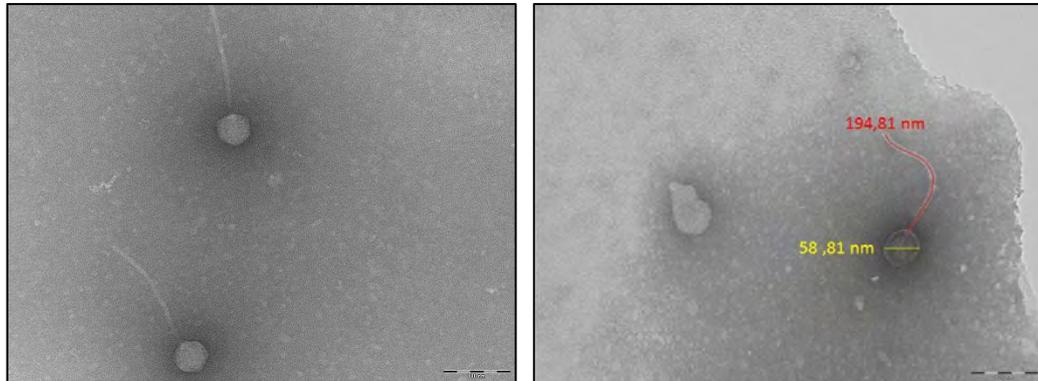
Tiedje, 2005 ; Goris *et al.*, 2007). Ces auteurs ont même proposé qu'une valeur ANI  $\geq$  à 95% entre génomes correspond à une valeur d'hybridation ADN-ADN  $\geq$  à 70% (Goris *et al.*, 2007). En 2009, Richter et Rosselló-Móra (2009) proposent que ANI peut être utilisé comme une alternative à l'hybridation ADN-ADN pour la discrimination entre les espèces, et qu'elle peut être calculée à partir de la comparaison de seulement 20% de la séquence d'un génome donné. La moyenne de l'identité des nucléotides (ANI) calculée comme décrit par Goris *et al.*, (2007) entre *Tsukamurella* 1534 et *T. paurometabola* est de 80,1699 %, cette valeur est inférieure à 95% valeur discriminante entre les espèces d'après les mêmes auteurs. Ce résultat ajouté aux résultats précédents obtenu lors des études morphologique, physiologique ainsi que moléculaire nous permettent de conclure que la souche 1534 est une nouvelle espèce du genre *Tsukamurella*.

À ce jour, la méthode ANI a été utilisé pour décrire plusieurs nouveaux genres et/ou espèces bactériennes, y compris *Burkholderia contaminans* et *Burkholderia lata* (Vanlaere *et al.*, 2009), *Dehalococcoides mccartyi* (Löffler *et al.*, 2012), *Sphaerochaeta globosa* et *S. pleomorpha* (Ritalahti *et al.*, 2012) et *Vibrio caribbeanicus* (Hoffmann *et al.*, 2012). Cependant, Ozen *et al.* (2012) ont annoncé que les résultats de l'ANI ne sont pas compatibles avec la taxonomie actuelle et ne devraient donc pas être utilisés comme un outil unique pour la classification des procaryotes.

Lors de l'examen en microscopie électronique à transmission de la souche 1534 nous avons remarqué que cette dernière était infectée par un bactériophage (figure 53). Malgré l'abondance des bactériophages dans la biosphère seulement deux virus TPA1 et TPA2 ont été décrits (Petrovski *et al.*, 2011). Le serveur de PHAST (Zhou *et al.*, 2011) ainsi que l'application Prophage Finder (Bose et Barber, 2006) ont été utilisés pour identifier les potentiels provirus dans le génome de la souche 1534. Ce dernier héberge bel et bien un élément génétique d'environ 49,4 kb avec un pourcentage de G+C égale à 70%. Il s'agit d'un nouveau virus ou provirus nommé TPA4 (Oulmi *et al.*, 2012).

Un total de 59 cadres de lecture ouverts (ORF) ont été identifiés à partir de TPA4, dont 25 d'entre eux codent pour des protéines qui partagent une identité élevée avec des protéines présentes dans les virus, en particulier ceux des bactéries du genre *Mycobacterium* et spécialement le mycobactériophage Giles. L'annotation préliminaire de TPA4 a été réalisée, et la majorité des gènes putatifs (un total de 35) codent pour des

protéines hypothétiques. Les ORF avec fonction (un total de 24) codent pour des protéines impliquées dans la réplication, comme l'ADN polymérase III, et la recombinaison/intégration et aussi ceux qui sont impliqués dans la morphogenèse du phage.



**Figure 53 :** photomicrographies électroniques à transmission par coloration négative de l'isolat 1534 montrant (a) deux bactériophages à structure complexes (capsides polyédrales et queues), la barre représente 100 nm. (b) les dimensions de la tête et de la queue du bactériophage. La barre représente 100 nm.

D'autres études seront effectuées pour déterminer la nature de TPA4 (provirus ou virus), dont seulement 2 protéines partagent une forte identité avec les protéines de TPA2. L'architecture chimérique de TPA4 suggère la survenue d'événements de transfert génétique au cours de l'évolution de TPA4.

L'objectif principal de ce travail était la mise en évidence de la présence des actinomycètes aérobies dans les prélèvements cliniques. Pour atteindre cet objectif, il convenait dans un premier temps de procéder à l'isolement de bactéries appartenant à cette classe. Des prélèvements différents, au nombre de 3682, ont été étudiés.

Sur 3517 des prélèvements étudiés au départ et après 72 jours de culture sur le milieu L-J et incubation à 37°C, seulement 20 isolats purs ont été identifiés comme appartenant aux actinomycétales, ce qui représente 0,5% des prélèvements étudiés. Les isolats obtenus proviennent tous de prélèvements respiratoires (CRA).

La mise au point par nos soins d'un protocole afin de récupérer un maximum d'espèces actinomycétales aérobies viables et cultivables s'est avéré très efficace pour l'isolement des actinomycètes dits rares présents dans les différents prélèvements et qui ne peuvent être isolées par les méthodes courantes utilisées en microbiologie. Ainsi, Vingt-deux isolats identifiés comme appartenant aux actinomycétales ont pu être isolés et purifiés des 165 prélèvements extra-pulmonaires étudiés dans la deuxième période d'isolement. Ce qui représente un pourcentage de 13,33% des prélèvements étudiés.

Au terme de cette première partie du travail, nous pouvons conclure que la recherche des actinomycètes doit être effectuée indépendamment de la recherche des mycobactéries par ensemencement de milieux adéquats comme le milieu Bennett et dans des conditions physicochimiques appropriées. Elle doit faire l'objet d'une demande spécifique par le clinicien et d'une attention particulière du microbiologiste.

La diversité des actinomycètes isolés et l'identification de quelques souches représentatives ont été établies par une approche polyphasique qui intègre des informations de nature phénotypique, génotypique et phylogénétique puisque aucune de ces souches n'aurait pu être identifiée correctement par l'utilisation d'un seul de ces outils.

Le séquençage de l'ADNr 16S a donné un élan supplémentaire dans la taxinomie et a permis d'établir des relations de parenté entre nos séquences et celles de la base de données Genbank. L'analyse de ces séquences a permis de classer les isolats dans le phylum des *Actinobacteria*, les souches isolées étaient apparentées à des

organismes cultivés des familles des *Nocardiopsaceae*, des *Pseudonocardiaceae*, des *Micromonosporaceae*, des *Tsukamurellaceae* et des *Thermomonosporaceae*.

Elles sont affiliées à sept genres, *Nocardiopsis* (53,33%), *Pseudonocardia* (13,33%), *Murinocardiopsis* (6,66%), *Tsukamurella* (6,66%), *Actinomadura* (6,66%), *Micromonospora* (6,66) et *Saccharopolyspora* (6,66%).

La plupart des infections à actinomycètes ne sont pas correctement et rapidement reconnus, en raison de l'absence de signes cliniques pathognomoniques. Le diagnostic des actinomycètes est basé sur l'examen direct et les cultures conventionnelles. Il s'avère, cependant, particulièrement difficile surtout qu'il repose sur des bases chimiotaxonomiques pour le diagnostic de genre et biochimiques pour le diagnostic de l'espèce.

Aujourd'hui, se sont principalement les techniques de biologie moléculaire qui font évoluer la taxonomie et permettent l'identification des actinomycètes aérobies, mais les techniques classiques restent encore utilisées en routine au laboratoire et apportent des données complémentaires souvent importantes.

Suite à cette étude, il apparaît clairement que les méthodes culturales et moléculaires sont parfaitement complémentaires et nécessaires au diagnostic bactérien. Cependant, l'analyse des séquences des gènes ARNr 16S trouve ses limites dans la distinction de certaines espèces. Les dernières avancées en terme de taxonomie des procaryotes ont montré le pouvoir très discriminant du typage de séquence en multiloci ou MLST développé dans cette étude, une méthode de typage simple et relativement facile à mettre en œuvre, basée sur le séquençage de plusieurs gènes de ménage. L'amplification de quatre gènes (*lepA*, *rpoA*, *rpoB* et *ftsZ*), nous a permis de différencier et de conclure que l'isolat 1534 apparenté à *Tsukamurella paurometabola* est une souche probablement nouvelle, résultat confirmé par une autre nouvelle technique rapide et moins coûteuse que les techniques moléculaires, la spectrométrie de masse.

Dans un souci de faciliter la détection et l'identification des actinomycétales aérobies, nous avons validé et optimisé l'approche en analyse protéomique de la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF pour l'identification et la classification des bactéries du genre *Tsukamurella*. Nous avons, d'une part, optimisé un

nouveau protocole d'extraction protéique et, d'autre part, étudié les capacités du logiciel Biotyper TM comme outil de typage en se basant sur la reproductibilité et la sensibilité des résultats acquis pour la discrimination des souches.

Cette technique a été testée avec succès sur les 12 souches du genre *Tsukamurella*. Elle est en cours de validation pour le genre *Nocardiosis* (49 espèces différentes). Nous recommandons son utilisation comme outil de diagnostic rapide et sa généralisation pour les autres genres des actinomycètes aérobies. Par la suite, il serait intéressant d'élaborer un protocole qui permet une identification directe de ces bactéries à partir des prélèvements cliniques.

Par ailleurs, le séquençage du génome complet de l'isolat 1534 a été réalisé par deux techniques : la méthode *shotgun* et la *3-kb paired-end*. Il s'agit du deuxième génome séquencé du genre *Tsukamurella* et également de la famille *Tsukamurellaceae*. La moyenne de l'identité des nucléotides (ANI) entre *Tsukamurella* 1534 et *T. paurometabola* ajouté aux résultats précédents obtenu lors des études morphologique, physiologique ainsi que moléculaire nous a permis de conclure que la souche 1534 est une nouvelle espèce du genre *Tsukamurella*.

Outre les applications diagnostiques, l'analyse comparative des génomes des différentes espèces permettra d'aborder et de mieux comprendre les caractéristiques évolutives des génomes des *Tsukamurella* et de définir les limites de leur plasticité.

L'étude des gènes de virulence (séquence, régulation, localisation) ouvre, en soi, un champ d'investigation très large des mécanismes d'évolution : la caractérisation de transferts latéraux de ces gènes par des plasmides, phages, îlots de pathogénicité, superintégrons, ou autres éléments génétiques, permettra de mieux comprendre les mécanismes génétiques conduisant à l'émergence de bactéries pathogènes.

- Ajello L., Brown J., Macdonald E. and Head E. (1987).** Actinomycetoma caused by *Nocardiosis dassonvillei*. Arch. Dermatol. 123: 426.
- Alcaide M.L., Espinoza L. and Abbo L. (2004).** Cavitary pneumonia secondary to *Tsukamurella* in an AIDS patient. First case and a review of the literature. J. Infect. 49:17-19.
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers, E.W. and Lipman D.J. (1990)** "Basic local alignment search tool." J. Mol. Biol. 215:403-410.
- Beaman B.L. and Beaman L. (1994).** *Nocardia* species: host–parasite relationships. Clin. Microbiol. Rev. 7: 213–264.
- Beau F., Bollet C., Coton T., Garnotel E. and Drancourt M. (1999).** Molecular identification of a *Nocardiosis dassonvillei* blood isolate. J. Clin. Microbiol. 37: 3366–3368.
- Becker B., Lechevalier M.P. and Lechevalier H.A. (1965).** Chemical composition of cell-wall preparation from strains of various form-genera of aerobic actinomycetes. Appl. Microbiol., 13:236-243.
- Benson D.A., Cavanaugh M., Karsch-Mizrachi I., Lipman D.J., Ostell J. and Sayers E.W. (2013).** Genbank. Nucleic Acids Res. 41; D1: D36–D42.
- Bernatchez H. and Lebreux E. (1991).** *Nocardiosis dassonvillei* recovered from a lung biopsy and a possible cause of extrinsic alveolitis. Clin. Microbiol. Newsl., 6: 47-55.
- Bhuyar G.R., NAgawal G., Jalgaonkar S.V. (2011).** *Streptomyces* septicaemia in a neonate. NJIRM. 2: 60-62
- Bligh E.G. and W.J. Dyer (1959).** A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol. 37: 911-917
- Bonnet E., Flecher X., Paratte S., Argenson J.N., Raoult D. and Fournier P.E. (2011).** *Actinomadura meyeræ* osteitis following wound contamination with hay in a woman in France: a case report. J. Med. Case Rep. 26; 5:32.
- Borriello S.P., Murray P.R. and Funke G. (2005).** Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections: Bacteriology. 10<sup>ème</sup> edition. Hodder Arnold.
- Bose M., Barber R.D. (2006).** Prophage Finder: a prophage loci prediction tool for prokaryotic genome sequences. In Silico Biol. 6:223–227.
- Bouchek-Mechiche K., Gardan L., Normand P. and Jouan B., (2000).** DNA relatedness among strains of *Streptomyces* pathogenic to potato in France: description of three new species, *S. europaeiscabiei* sp. nov. and *S. stelliscabiei* sp. nov. associated with common scab, and *S. reticuliscabiei* sp. nov. associated with netted scab. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 50: 91-99.
- Brocq-Rousseu D. (1904).** Sur un Streptothrix cause de l'alteracion des avoines moisies. Res. Bot. 16: 219–230. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. The Actinobacteria p: 1922. vol. 5. 2<sup>nd</sup> Ed. Springer New York.
- Camara J.E. et Hays F.A. (2007).** «Discrimination between wild-type and ampicillin-resistant *Escherichia coli* by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry,» Anal. Bioanal. Chem. 389(5):1633-8.

- Campbell J.M. (1932).** Acute symptoms following work with hay. *Br. Med. J.* 2: 1141-1144.
- Cavalla M. et Eberlinberlin T., (1994).** Isolement des streptomycètes du sol. L'opéron, XIX, 13-17.
- Chang X., Liu W. and Zhang X-H. (2011).** *Spinactinospora alkalitolerans* gen. nov., sp. nov., an actinomycete isolated from marine sediment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61: 2805–2810
- Chen Y.G., Wang Y.X., Zhang Y.Q., Tang S.K., Liu Z.X., Xiao H.D., Xu L.H., Cui X.L. and Li W.J. (2009).** *Nocardiosis litoralis* sp. nov., a halophilic marine actinomycete isolated from a sea anemone. *Int J Syst Evol Microbiol* 59: 2708–2713.
- Chong B.E., Wall D.B., Lubman D.M. and Flun S.J. (1997)** Rapid profiling of *E. coli* protein up to kDa from whole cell lysate using matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 11: 1900-1908.
- Chun J., Blackall L.L., Kang S., Hah Y.C. and Goodfellow M. (1997).** A proposal to reclassify *Nocardia pinensis* Blackall *et al.* as *Skermania piniformis* gen. Nov., comb. Nov. *Int. J. Syst. Bact.* 47: 127-131.
- Clarridge J.E. (2004).** Impact of 16S *rRNA* gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases, *C. Ain. Microbiol. Rev.* 17: 840-862.
- Collins M.D., Smida J., Dorsch M., and Stackbrandt E. (1988).** *Tsukamurella* gen. nov. Harboring *Corynebacterium paurometabolum* and *Rhodococcus auvantiacus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 38: 385-391.
- Cooper J.E. and Feil E.J. (2004).** Multilocus sequence typing — what is resolved? *Trends Microbiol.* 12: 373 – 377.
- Crawford D.I., Lynch J.M., Whipps J.M. and Ousley M.A. (1993).** Isolation and characterization of actinomycete antagonists of a fungal root pathogen. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 3899-3905.
- Cross T. and Goodfellow M. (1973).** Taxonomy and classification of the actinomycetes. In *Actinomycetales: Characteristics and Practical Importance* (edited by Sykes and Skinner). Academic Press, London, pp. 11–112.
- Cross T., (1989).** The actinomycetes II. Growth and examination of actinomycetes some guidelines. In S. T. WILLIAMS, M. E. SHARPE and J. G. HOLT. (1989). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Volume 4. Williams and Wilkins. Baltimore. p 2340–2343.
- Debarati P., Dipaloke M., Soma M., and Debosmita P. and LIU D. (2011).** Molecular detection of human bacterial pathogens. Edition : Taylor and Francis Group. Chapter 14 p.155-168
- Demain A.L. and Solomon N.A. (1985).** *Biology of industrial micro-organisms.* The Benjamin cummings publishing company, INC. California.
- Desoubaux G., François N., Poulain D., Courcol R., Chandenier J. et Sendid B. (2010).** Spectrométrie de masse MALDI-TOF, un nouvel outil que la mycologie médicale ne peut contourner. Exploration préliminaire d'une application concernant

l'identification de levures isolées dans un CHU français. *Journal de Mycologie Médicale*. Elsevier Masson France 20: 263-267.

**Develoux M. et Chabasse D. (2003)**. Mycoses d'importation. Chapitre 6 : Mycétomes. *Guide Médi. Bio*. Elsevier. p.64–78.

**Devereux R., He S-H., Doyle C. L., Orkland S., Stahl D.A., LeGall J. and Whitman W.B. (1990)**. Diversity and origin of *Desulfovibrio* species: phylogenetic definition of a family. *J Bacteriol* 172: 3609-3619.

**Dijkshoorn L., Ursing B.M. and Ursing J.B. (2000)**. Strain, clone and species: comments on three basic concepts of bacteriology. *J Med. Microbiol.* 49: 397-401.

**Doering-Saad C., Kämpfer P., Manulis S., Kritzman G., Schneider J., Zakrzewska-Czerwinska J., Schrempf H. and Barash I., (1992)**. Diversity among *Streptomyces* strains causing potato scab. *Appl. Environ.l Microbiol.* 58: 3932-3940.

**Dvorak A. and Johnston A. (1999)**. Actinomycetes and Streptomyces. p. 23. New York.

**El Fahime Elmostafa and Ennaji Mly Mustapha (2007)**. Évolution des techniques de séquençage. *Les technologies de laboratoire.* 5 : 4-12.

**El Khe'chine A., Couderc C., Flaudrops C., Raoult D., Drancourt M. (2011)**. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry Identification of Mycobacteria in Routine Clinical Practice *PLoS ONE.* 6: 9, e24720

**Elshibly S., Doherty J., Xu J., McClurg R.B., Rooney P.J., Millar B.C., Shah H., Morris T.C., Alexander H.D. and Moore J.E. (2005)**. Central line-related bacteraemia due to *Tsukamurella tyrosinosolvans* in a haematology patient. *Ulster Med. J.* 74: 43–46.

**Émile C. (2012)**. Application de la spectrométrie de masse au laboratoire de microbiologie. *OptionBio.* 466

**Ensign J.C., Normand P., Burden J. P. and Yallop C.A. (1993)**. Physiology of some actinomycetes genera. *Res. Microbiol.* 144: 657-660.

**Ensign J.C. (1978)**. Formation, properties and germination of actinomycetes spores. *Annu. Rev. Microbiol.* 32: 185-219.

**Eunice J.A. and Prosser J.I. (1983)**. Mycelial growth and branching of *Streptomyces coelicolor*. A3(2) on solid medium. *J. gen. Microbiol.* 129: 2029-2036.

**Exmelin L., Malbruny B., Vergnaud M., Prosvost F., Boiron P. et Morel C. (1996)**. Molecular study of nosocomial nocardiosis outbreak involving heart transplant recipients. *J. Clin. Microbiol.* 34(4): 1014-1016.

**Falk R.H., Dimock F.R. and Sharkey J. (1979)**. Prosthetic valve endocarditis resulting from *Nocardia asteroides*. *Br Heart J* 41(1): 125-127.

**Fang C.Y., Zhang J.L., Pang H.C., Li Y.Y., Xin Y.H. and Zhang Y.B. (2011)**. *Nocardiosis flavescens* sp. nov., a novel actinomycete isolated from marine sediment in China. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61: 2640–2645.

**Fastner J., Erhard M. and Von Döhren H. (2001)**. Determination of oligopeptide diversity within a natural population of *Microcystis spp.* (cyanobacteria) by typing

single colonies by matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 5069-76.

**Fenseleau C. and Demirov P.A. (2001).** Characterisation of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry. *J. Mass. Spectrom. Rev.* 20: 157-171.

**Fleischmann R.D., Adams M.D., White O., Clayton R.A., Kirkness E.F., Kerlavage A.R. et al., (1995)** Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science.* 269: 496-512.

**Floyd M.H., Pieper R.L. and Mertz F.P. (1987).** Sporulation of *Streptomyces roseosporus* in submerged culture. *J. Ind. Microbiol.* 2: 235 – 241.

**Forsyth R.A., Haselbeck R.J., Ohlsen K.L., Yamamoto R.T., Xu H. and Trawick J.D. (2002).** A genome-wide strategy for the identification of essential genes in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* 43: 1387-1400.

**Freney J., Renaud F., Leclercq R. et Riegel P. (2007).** Précis de Bactériologie Clinique. Edition ESKA PARIS

**Fry N.K., Warwick S., Saunders N. A. and Embley, T.M. (1991).** The use of 16S rRNA analyses to investigate the phylogeny of the family *Legionellaceae*. *J. Gen. Microbiol.* 137: 1215-1222.

**Garcia L.S. and Isenberg H.D. (2007).** Clinical Microbiology Procedures Handbook 2nd ed. Volume 2. Washington, D.C.

**Gazenko S.V., Reponen T. A., Grinshpun S. A. and Willeke K. (1998).** Analysis of airborne actinomycete spores with fluorogenic substrates. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 4410-4415.

**Genilloud O. (2012).** Genus *Micromonospora*. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. The *Actinobacteria*. pp: 1039-1057. vol. 5. 2<sup>nd</sup> Ed. Springer New York.

**Gilbert W. and Maxam A. (1973).** The nucleotide sequence of the lac operator. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 70:3581-3612.

**Goh S.H., Potter S., Wood J.O., Hemmingsen S.M., Reynolds R.P. and Chow A. W. (1996).** *HSP60* gene sequences as universal targets for microbial species identification: studies with coagulase-negative staphylococci. *J. Clin. Microbiol.* 34:818–823.

**Goodfellow M. and Williams S.T. (1983).** Ecology of actinomycetes. *Ann. Rev. Microbiol.* 37:189 –216.

**Goodfellow M. and Y. Kumar (2012).** Genus *Tsukamurella*. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. The *Actinobacteria* p: 500-509. vol. 5 2<sup>nd</sup> Ed. Springer New York.

**Gordon R.E. and Horan A.C. (1968).** *Nocardia dassonvillei*, a macroscopic replica of *Streptomyces griseus*. *J. Gen. Microbiol.* 50: 235–240.

**Goris J., Konstantinidis K.T., Klappenbach J.A., Coenye T., Vandamme P. and Tiedje J.M. (2007).** DNA–DNA hybridization values and their relationship to whole genome sequence similarities. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57: 81–91.

**Gottlieb D. (1973).** General consideration and implication of the Actinomycetales. In Actinomycetales characteristics and practical importance. Edited by G. Sykes and F. A. Skinner. Academic Press, London, New York.

- Granel F., Lozniewski A., Barbaud A., Lion C., Dailloux M., Weber M. and Schmutz J.L. (1996).** Cutaneous infection caused by *Tsukamurella paurometabolum*. Clin. Infect. Dis. 23: 839–840.
- Gravet A., Camdessouens-Miehé G., Gessier M., Peluso A.R., Vogelsperger-Fuchs B., Lohmann C. et al., (2011).** The use in routine of mass spectrometry in a hospital microbiology laboratory. Pathol. Biol. 59: 19-25.
- Gravet A. (2010).** Spectrométrie de masse et identification bactérienne, l'expérience du laboratoire de microbiologie du centre hospitalier de Mulhouse. Spectra Biol. 180: 45–50.
- Gugnani H.C., Unaogu C., Provost F. and Boiron P. (1998).** Pulmonary infections due to *Nocardiosis dassonvillei*, *Gordonia sputi*, *Rhodococcus rhodochrous* and *Micromonospora* sp. In Nigeria and literature review. J. Mycol. Med. 8: 21–25.
- Hamedi J., Mohammadipanah F., Pötter G., Spröer C., Schumann P., Göker M. and Klenk H.P. (2011).** *Nocardiosis arvandica* sp. nov., isolated from sandy soil. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 61: 1189–1194.
- Hanafy A., Ito J., Iida S., Kang Y., Kogure T., Yazawa K., Yaguchi T. and Mikami Y. (2006).** Majority of *Actinomadura* clinical isolates from sputa or bronchoalveolar lavage fluid in Japan belongs to the cluster of *Actinomadura cremea* and *Actinomadura nitritigenes*, and the description of *Actinomadura chibensis* sp. Nov. Mycopathologia 162: 281–287
- Hazen K.C. (2007).** Aerobic Actinomycetes. Section 6, In Clinical microbiology procedures handbook 2<sup>nd</sup> ed. Update. ASM Press, Washington USA.
- Healy F.G. and Lambert D.H. (1991).** Relationships among *Streptomyces* spp. causing potato scab. Int. J. Syst. Bacteriol. 41: 479-482.
- Henssen A. (1989).** Genus *Pseudonocardia*. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, pp. 2371–2379. vol. 4. Williams and Wilkins, Baltimore,
- Henssen A., Happachkan C. Renner B. and Vobis G. (1983).** *Pseudonocardia compacta* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 33: 829–836.
- Henssen A., Weise E. Vobis G. and Renner B. (1981).** Ultrastructure of sporogenesis in actinomycetes forming spores in chains. In Actinomycetes pp. 137–146. Fischer-Verlag, Stuttgart,
- Henssen, A. and Schnepf E. (1967).** On the knowledge of thermophilic actinomycetes. Arch. Mikrobiol. 57: 214–231.
- Hernandez-Coronado M.J., Hernandez M., Centenera F., Perez-Leblic M.I., Ball A.S. and Arais M.E., (1997).** Chemical characterization and spectroscopic analysis of the solubilization products from wheat straw produced by *Streptomyces* strains grown in solid-state fermentation. Microbiol., 147: 1359-1367.
- Hirsch A.M. and Valdés M. (2010).** *Micromonospora*: An important microbe for biomedicine and potentially for biocontrol and biofuels. Soil Biol. Bioch. 42: 536–542
- Hirvonen M.R., Nevalainen A., Makkonen M., Monkkonen J. and Savolainen K. (1997).** *Streptomyces* spores from moldy houses induce nitric oxide, TNF $\alpha$  and IL-6 secretion from RAW264.7 macrophage cell line without causing subsequent cell death. Environ. Toxicol. Pharmacol. 3: 57-63.

- Hoffmann M., Monday S.R., Allard M.W., Strain E.A., Whittaker P., Naum M., McCarthy P.J., Lopez J.V., Fischer M. and Brown E.W. (2012).** *Vibrio caribbeanicus* sp. nov., isolated from the marine sponge *Scleritoderma cyanea*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62: 1736–1743.
- Horan A.C. and Brodsky B.C. (1986).** *Micromonospora rosaria* sp. nov., nom. rev., the rosaramicin producer. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 36: 478–480.
- Houang E.T., Lovett I.S., Thompson F.D., Harrison A.R., Joekes A.M. and Goodfellow M. (1980).** *Nocardia asteroides* infection a transmissible disease. *J. Hosp. Infect.* 1: 31-40.
- Hozzein W. and Trujillo M. (2012).** Genus *Nocardiopsis*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. The Actinobacteria*. p: 1891-1906. Vol. 5, 2<sup>nd</sup> Ed. Springer New York.
- Huang Y. and Goodfellow M. (2012).** Genus *Pseudonocardia*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. The Actinobacteria* p 1305-1322. vol. 5. 2<sup>nd</sup> Ed. Springer New York.
- Hwang B.K., Lim S.W., Kim B.S., Lee J.Y. and Moon S.S. (2001).** Isolation and in vivo and in vitro antifungal activity of phenylacetic acid and sodium phenylacetate from *Streptomyces humidus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 3730-3745.
- Inamadar A.C., Palit A., Peerapur B.V. and Rao S.D. (2004).** Sporotrichoid nocardiosis caused by *Nocardia nova* in a patient infected with human immunodeficiency virus. *Int. J. Dermatol.* 43(11): 824-826.
- Ingrand J. (2012).** La spectrométrie de masse : principales applications en biologie médicale. *Immuno-analyse et biologie spécialisée.* 27: 47-53
- Janda J.M. and Abott S.L. (2007).** 16S *rRNA* gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils and pitfalls. *J Clin. Microbiol.* 45: 2761-4.
- Jones R.S., Fekete T., Truant A.L. and Satishchandran V. (1994).** Persistent bacteremia due to *Tsukamurella paurometabolum* in a patient undergoing hemodialysis: case report and review. *Clin. Infect. Dis.* 18: 830–832.
- Justesen U.S., Holm A., Knudsen E., Andersen L.B., Jensen T.G., Kemp M. et al., (2011).** Species identification of clinical isolates of anaerobic bacteria: a comparison of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry systems. *J. Clin Microbiol.* 49 : 4314-8.
- Kämpfer P., Schäfer J., Lodders N. and Martin K. (2010).** *Murinocardiopsis flavida* gen. nov., sp. nov., an actinomycete isolated from indoor walls. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60: 1729–1734
- Kämpfer P., Kroppenstedt R.M. and Dott W. (1991).** A numerical classification of the genera *Streptomyces* and *Streptoverticillium* using miniaturized physiological tests. *J. Gen. Microbiol.* 137:1831-1891.
- Kapadia M., Rolston K. and Han X.Y. (2007).** Invasive *Streptomyces* Infections. Six Cases and Literature Review. *Am. J. Clin. Pathol.* 127: 619-624
- Karunakaran R., Halim H.A., NG K.P., Hanifah Y.A., Chin E., Jaafar F.L. and S. Abubakar (2011).** *Tsukamurella tyrosinosolvans* intravascular catheter-related

bacteremia in a haematology patient : a case report. *Europ. Rev. Medical Pharmacol. Sci.* 15: 1343-1346

**Katsifas E.A., Giannoutsou E.P. and Karagouni A.D. (1999).** Diversity of streptomycetes among specific Greek terrestrial ecosystems. *Let. Appl. Microbiol.* 29: 48-51.

**Kattar M.M., Cookson B.T., Carlson L.C., Stiglich S.K., Schwartz M.A., Nguyen T.T., Daza R., Wallis C.K., Yarfitz S.L. and Coyle M.B. (2001).** *Tsukamurella strandjordae* sp. nov., a proposed new species causing sepsis. *J. Clin. Microbiol.* 39: 1467–1476.

**Kennedy K.J., Carlos Chung K.H., Bowden F. J., Mews P. J., Pik J.H.T., Fuller J.W. and Chandran K.N. (2007).** A cluster of nocardial brain abscesses. *Surgical Neurology.* 68: 43-9.

**Kim S.B., Lee S.D., Kim S.Y., Oh H.M., Kang S.O. and Hab Y. C., (1996).** Numerical classification of actinomycetes isolated from volcanic soil. *Jour. Microbiol.* 34: 2.105-116.

**Kim B., Sahin N., Minnikin D.E., Zakrzewska-Czerwinska J., Mordarski M. and Goodfellow M., (1999).** Classification of thermophilic streptomycetes, including the description of *Streptomyces thermoalkalitolerans* sp. nov. *Int. J. syst. Bacteriol.* 49:7-17.

**Kim S.G.B. and Goodfellow M. (2012).** Genus *Saccharopolyspora*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. The Actinobacteria.* pp : 1396-1414. Vol. 5, 2<sup>nd</sup> Ed. Springer New York.

**Kim, O.S., Cho Y.J., Lee K., Yoon S.H., Kim M., Na H., Park S.C., Jeon Y.S., Lee J.H., Yi H., Won S., and Chun J. (2012).** Introducing EzTaxon: a prokaryotic 16S *rRNA* Gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62: 716-721.

**Kimura M. (1980).** A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16,111-120.

**Kokcha S., Ramasamy D., Lagier J.C., Robert C., Raoult D. and Fournier P.E. (2012b).** Non-contiguous finished genome sequence and description of *Brevibacterium senegalense* sp. nov. *Stand. Genomic Sci.* 7: 233–245.

**Kokcha, S., Mishra A. K., Lagier J.C., Million M., Leroy Q., Raoult D. and Fournier P.E. (2012a).** Non-contiguous-finished genome sequence and description of *Bacillus timonensis* sp. nov. *Stand. Genomic Sci.* 6: 346–355.

**Konstantinidis K.T. and Tiedje J.M. (2005).** Genomic insights that advance the species definition for prokaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 102: 2567–2572.

**Kroppenstedt R.M. (1985).** Fatty acid and menaquinone analysis of actinomycetes and related organisms. In *Chemical Methods in Bacterial Systematics.* pp. 173–199. Academic Press, London.

**Kroppenstedt R.M. and Evtushenko L.I. (2006).** The Family *Nocardiopsaceae* Chapitre 1.1.14. In *The Prokaryotes A Handbook on the Biology of Bacteria Third Edition* vol. 3. p : 754–795. Springer.

- Kunst F., Ogasawara N., Moszer J., Albertini A.M., Alloni G. et al., (1997).** The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* 390: 249-256.
- Kuykendall L.D., Roy M.A., O'Neill J.J. and Devine T.E. (1988).** Fatty acids, antibiotic resistance, and deoxyribonucleic acid homology groups of *Bradorhizobium japonicum*. *Int. J. Syst. Syst. Bacteriol.* 38: 358-361.
- Lacey J. (1981).** Airborne actinomycete spores as respiratory allergens. *Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. I Abt Suppl.* 11: 243-250.
- Lacey J. and Crook B. (1988).** Fungal and actinomycete spores as pollutants of the workplace and occupational allergens. *Ann. Occup. Hyg.* 32 : 515-533.
- Lacey J. and Goodfellow M. (1975).** A Novel Actinomycete from Sugar-cane Bagasse : *Saccharopolyspora hirsuta* gene et sp. nov. *J. Gen. Microbiol.* 88: 75-85
- Lacey J., (1997).** Actinomycetes in composts. *Ann. Agric. Environ. Med.* 4: 113-121.
- Lagesen K. Hallin P., Rødland E.A., Stærfeldt H-H., Rognes T. and D.W. Ussery (2007).** RNAMmer : consistent and rapid annotation of ribosomal RNA genes. *Nucleic Acids Res.* 35:3100–3108.
- Lagier J.C., Ramasamy D., Rivet R., Raoult D. and Fournier P.E. (2012e).** Non contiguous-finished genome sequence and description of *Cellulomonas massiliensis* sp. nov. *Stand Genomic Sci* 7: 258–270.
- Lai K.K. 1993.** A cancer patient with central venous catheter-related sepsis caused by *Tsukamurella paurometabolum* (*Gordona aurantiaca*). *Clin. Infect. Dis.* 17: 285–287.
- Lai C.C., Wang C.Y., Liu C.Y., Tan C.K., Lin S.H., Liao C.H., Chou C.H., Huang Y.T., Lin H.I. and Hsueh P.R. (2010).** Infections caused by *Gordonia* species at a medical centre in Taiwan, 1997 to 2008. *Clin. Microbiol. Infect.* 16: 1448-1453
- Lamoril J., Ameziane N., Deybach J.-C., Bouizegarène P. et M. Bogard (2008).** Immuno-analyse et biologie spécialisée. Elsevier Masson 23: 260-279
- Larkin J.A., Lit L., Sinnott J., Wills T. and Szentivanyi A. (1999).** Infection of a knee prosthesis with *Tsukamurella* species. *South Med. J.* 92: 831–832.
- Larpent J.P. et Sanglier J.J. (1989).** Biotechnologie des antibiotiques. Masson. Paris.
- Laslett D, Canback B. (2004).** ARAGORN, a program to detect tRNA genes and tmRNA genes in nucleotide sequences. *Nucleic Acids Res.* 32:11–16.
- Laurent F., Rodriguez-Nava V., Freney J., Serrano J. A. et Boiron P. (2007).** *Nocardia* et actinomycètes aérobies apparentés. *Dans Précis de Bactériologie clinique.* p. 1283-1301. Ed ESKA.
- Lay J.O. Jr. (2000).** MALDI-TOF Mass Spectrometry and bacterial taxonomy. *Trens. Anal. Chem.* 19: 507-516.
- Lay J.O. Jr. (2001).** MALDI-TOF Mass Spectrometry of bacteria. *J. Mass. Spectrom. Rev.* 20: 172-194.
- Lechevalier H.A. and M.P. Lechevalier (1981).** Introduction to the order *Actinomycetales*. *In The prokaryotes*, vol. 2. p. 1915-1922. Springer. Verlag, Berlin.

- Lechevalier M.P., Prauser H., Labeda D.P. and Ruan J.S. (1986).** Two new genera of nocardioform actinomycetes, *Amycolata* gen. nov. and *Amycolatopsis* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 36: 29–37.
- Lechevalier H.A. and Lechevalier M.P. (1970a).** A critical evaluation of the genera of aerobic actinomycetes. *In The Actinomycetales.* pp. 395–405. Gustav Fischer Verlag, Jena.
- Lechevalier M. P. and Lechevalier H., (1970).** Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. *Int. j. Syst. Bacteriol.* 20, 435 – 443.
- Lechevalier M.P., de Bièvre C. and Lechevalier H.A. (1977).** Chemotaxonomy of aerobic actinomycetes: phospholipid composition. *Biochem. Ecol. Systems* 5: 249–260.
- Li J., Yang J., Zhu W.-Y., He J., Tian X.-P., Xie Q., Zhang S., and Li W.-J. (2012).** *Nocardiopsis coralliicola* sp. nov., isolated from the gorgonian coral, *Menella praelonga*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62: 1653–1658
- Li, W.-J., Kroppenstedt R. M., Wang D., Tang S.-K., Lee J.-C., Park D.-J., Kim C.-J., Xu L.-H. and Jiang C.-L. (2006).** Five novel species of the genus *Nocardiopsis* isolated from hypersaline soils and emended description of *Nocardiopsis salina* Li et al. 2004. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56: 1089–1096.
- Liegard H. and Landrieu M. (1911).** Un cas de mycose conjunctivale. *Ann. Ocul.* 146: 418–426. *In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (2012). The *Actinobacteria*. vol. 5, 2<sup>nd</sup> Ed. Springer New York.
- Liu C.-Y., Lai C.-C., Lee M.-R., Lee Y.-C., Huang Y.-T., Liao C.-H., Hsueh P.-R. (2011).** Clinical characteristics of infections caused by *Tsukamurella spp.* and antimicrobial susceptibilities of the isolates. *Int. J. Antimicrobial Agents.* 38: 534-537
- Locci R., (1976).** «Developmental micromorphology of actinomycetes». *In : Actinomycetes, the boundary microorganisms.* pp. 170-180. Arai T. Ed., Tokyo.
- Locci R. and Sharples G.P. (1984).** Morphology. *In: «The biology of actinomycetes».* Pp. 165-199. Ac. Press. London.
- Loffler F.E., Yan J., Ritalahti K.M., Adrian L., Edwards E. A., Konstantinidis K.T., Muller J.A., Fullerton H., Zinder S.H. and Spormann A.M. (2012).** *Dehalococcoides mccartyi* gen. nov., sp. nov., obligately organohalide-respiring anaerobic bacteria relevant to halogen cycling and bioremediation, belong to a novel bacterial class, *Dehalococcoidia* classis nov., order *Dehalococcoidales* ord. nov. and family *Dehalococcoidaceae* fam. nov., within the phylum *Chloroflexi*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63: 625–635.
- Lopes A., Coelho R.R, Meirelles M.N.I., Branquinha M.H., and Vermelho A. B. (1999).** Extracellular serine-proteinases isolated from *Streptomyces alboniger*: Partial characterization and effect of aprotinin on cellular structure. *Men. Inst. Oswaldo. Cruz, Rio de Janeiro.* 94: 763-770.
- Ludwig W., Euzéby J. and Whitman W. (2012).** Taxonomic outline of the phylum *Actinobacteria*. *In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, The Actinobacteria.* pp. 29–31. vol. 5. 2<sup>nd</sup> Ed. Springer, New York,
- Madupu R., Richter A., Dodson R.J., Brinkac L., Harkins D., Durkin S., Shrivastava S., Sutton G. and Haft D.**

- (2012). CharProtDB: a database of experimentally characterized protein annotations. *Nucleic Acids Res.* 40(Database issue): D237–D241.
- Maeda T., Takada N., Furushita M. and Shiba T. (2000).** Structural variation in the 16S-23S rRNA intergenic spacers of *Vibrio parahaemolyticus*. *FEMS Microbiol.* 192: 73-77.
- Maertens J., Wattiau P., Verhaegen J., Boogaerts M., Verbist L. and Wauters G. (1998).** Catheter-related bacteremia due to *Tsukamurella pulmonis*. *Clin. Microbiol. Infect.* 4: 51–53.
- Magrane M, Uniport Consortium. (2011).** UniProt Knowledgebase: a hub of integrated protein data. Database (Oxford):bar009.
- Maiden M.C.J., Bygravesdagger J.A., FeilDagger E., Morelli G., Russelldagger J.E., Urwin R., ZhangDagger Q., Zhou J., Zurth K., Caugant D.A., Feaversdagger I.M., Achtman M. and Spratt B.G. (1998).** Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *PNAS.* 95: 3140-3145
- Mandell G.L., Bennett J.E. and Dolin R. (2010).** Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases. 7th ed.
- Marcadé G. (2013).** Tests de diagnostic rapide en bactériologie. Immuno-analyse et biologie spécialisée. Elsevier Masson France 28: 167-173
- Margulies M., Egholm M., Altman W.E., Attiya S., Bader J.S., Bemben L.A., Berka Jan., Braverman M.S. and Chen Y-J. (2005).** Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors.» *Nature* 437: 376-80.
- Mariat F. et M. Sebald (1990).** «Les actinomycètes» *Dans* : Bactériologie médicale. **Le Minor.** Edition Médecine-Science. Flammarion. France.
- Martiny D et Vandenberg O. (2012)** Exploitation de la spectrométrie de masse en microbiologie : une révolution. *Immuno. Anal. Biol. Spec.* 27: 177-84.
- McNeil M.M. and Brown J.M. (1994).** The medically important aerobic Actinomycetes : pidemiology and microbiology. *Clin. Microbiol. Rev.* 7: 357-41.
- McNeil M.M., Brown J. M., Jarvis W.R. and Ajello L. (1990).** Comparison of species distribution and antimicrobial susceptibility of aerobic actinomycetes from clinical specimens. *Rev. Infect. Dis.* 12 : 778-783.
- McNeil M.M., Brown J.M., Scalise G. and Piersimoni C. (1992).** Nonmycetomic *Actinomadura madurae* infection in a patient with AIDS. *J. Clin. Microbiol.* 30: 1008–1010.
- Meyer J. (1976).** *Nocardiopsis*, a new genus of the order Actinomycetales. *Int J Syst Bacteriol* 26 : 487-493.
- Migueluez E.M., Martin C., Hardisson C. and Manzanal M.B., (1993).** Synchronous germination of *Streptomyces antibioticus* spores : Tool for the analysis of hyphal growth in liquid cultures. *FEMS Microbiol. Let.*, 109: 123-130
- Miller, L.T. (1982).** A single derivatization method for bacterial fatty acid methyl esters including hydroxy acids. *J. Clinical Microbiol.* 16: 584-586.
- Minnikin D.E. and Goodfellow M. (1981).** Lipids in the classification of actinomycetes. *Zentralbl. Bakteriol.* 11: 99–109.

- Mishra A.K., Gimenez G., Lagier J.C., Robert C., Raoult D. and Fournier P.E. (2012a).** Non-contiguous finished genome sequence and description of *Alistipes senegalensis* sp. nov. *Stand. Genomic Sci.* 6: 304–314.
- Moiton M.P., Robert D., Bébéar C.M., Neau D., Dugué C., et Ragnaud J.M. (2006).** Aspects cliniques, microbiologiques et thérapeutiques des infections à *Nocardia* sp. au centre Hospitalier universitaire de Bordeaux entre 1993 et 2003. *Méd. Mal. Inf.* 36: 264-9.
- Moore B.S., Trischman J.A., Seng D., Kho D., Jensen P.R. and Fenical W.S., (1999).** Antiinflammatory Depsipeptides from a marine Streptomycetes. *J. Org. Chem.* 64: 1145-1150.
- Mordarska H, Zakrzewska-Czerwinska J., Pasciak M., Szponar B. and Rowinski S. (1998).** Rare, suppurative pulmonary infection caused by *Nocardiosis dassonvillei* recognized by glycolipid markers. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 21: 47-55.
- Mrozek N., Hamizi S., Gourdon F., Laurichesse H., Beytout J. and Lesens O. (2008).** Potential nosocomial disseminated infection due to *Nocardia asteroides* after a prosthesis insertion in an immunocompetent patient. *Rev. Med. Interne.* 29:1034-1037.
- Munoz R., Lopez-Lopez A., Urdiain M. and Anton J. (2011).** Evaluation of MALDI-TOF whole cell profiles to assess the culturable diversity of aerobic and moderately halophilic prokaryotes thriving in solar saltern sediments. *Syst. Appl. Microbiol.* 34: 69-75
- Murray P.R., Heeren R.L. and Niles A.C. (1987).** Effect of decontamination procedurs on recovery of *Nocardia* spp. *J. Clin. Microbiol.* 25: 2010-2011
- O'Donnel A.G., Minnikin D.E. and Goodfellow M. (1985).** Integrated lipid and wall analysis of actinomycetes. *In* : Chemical methods in bacterial systematics. pp 131-143. Ac. Press., London.
- O'Donnel A.G., Minnikin D.E., Goodfellow M. and Parlett J.H. (1982).** The analysis of actinomycetes wall aminoacids by gas chromatography. *FEMS Microbiol. Lett.* 15: 75-78.
- Ogata S., Matsubara H., Tawara Y., Tounaga S. and Hara T., (1992).** Screening of compounds stimulating spore formation au mycelialgrowth of pock-forming plasmid-carring strains in *Streptomyces azureus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37: 652 – 654.
- Okami Y. and Okazaki T., (1978).** Actinomycetes in marine environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 6: 145-152.
- Okami Y., Hamada M. and Ueda N. (1968).** Proceed. of the first Intern. Conference on Culture Collection pp. 457-475. Iizuka H. and Hasegawa T. Edition.
- Omura S., (1992).** The search for bioactive compounds from microorganisms. Springer, Verlag, New York.
- Ørskov J. (1923).** Investigations into the Morphology of the Ray Fungi. Levin and Munksgaard, Copenhagen, Denmark. *In*: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. (2012), The *Actinobacteria*. p. 1234. vol. 5, 2<sup>nd</sup> Ed. Springer, New York.
- Oshiro S, Ohnishi H., Ohta M. and Tsuchimochi H. (2003).** Intraventricular rupture of *Nocardia* brain abscess-case report. *Neurol. Med. Chir. (Tokyo)* 43: 360-363.

- Ottow J.C.G. and Glathe H., (1968).** Rose Bengal-malt extract-agar, a simple medium for the simultaneous isolation and enumeration of fungi and actinomycetes from soil. *Appl. Microbiol.* 16: 170–171.
- Oulmi L., Gorlas A., Gimenez G., Robert C., Boulahrouf A., Raoult D. and Roux V. (2012).** Draft Genome Sequence of *Tsukamurella* sp. Strain 1534. *J. Bacteriol.* 194: 5482-5483
- Ozen A.I., Vesth T. and Ussery D.W. (2012).** From genome sequence to taxonomy a skeptic's view. *In The Prokaryotes*. pp. 209–227. 4<sup>th</sup> Ed, Springer. Berlin:
- Papadopoulos M.C., Abel P.M., Agranoff D., Stich A., Tarelli E., Bell B.A., et al., (2004).** A novel and accurate diagnostic test for human African trypanosomiasis. *Lancet.* 363: 1358-63.
- Peltola J.S.P., Andersson M. A., Kämpfer P., Auling G., Kroppenstedt R.M., Busse H.J., Salkinoja-Salonen M.S. and Rainey F.A. (2001).** Isolation of toxigenic *Nocardiosis* strains from indoor environments and description of two new *Nocardiosis species*, *N. exhalans* sp. nov. and *N. umidischolae* sp. nov. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 4293–4304.
- Pepys J., Jenkins P.A., Festenstein G.N., Gregory P.H., Lacey M.E. and Skinner F.A. (1963).** Farmer's Lung. Thermophilic actinomycetes as a source of "Farmer's Lung Hay" antigen. *Lancet* 2: 607–611. *In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.* (2012), p. 1440. 2<sup>nd</sup> Ed. vol. 5, The *Actinobacteria* Springer, New York,
- Petrovski S., Seviour R.J and Tillett D. (2011).** Genome sequence and characterization of the *Tsukamurella* bacteriophage TPA2. *Appl. Environ. Microbiol.* 77:1389–1398.
- Pettersson B.M.F., Behra P.R.K., Manduva S., Das S., Dasgupta S., Bhattacharya A. and Kirsebom L.A. (2014).** Draft Genome Sequence of *Saccharopolyspora rectivirgula* Genome Announc. 2(1): e01117-13.
- Philip A. and Roberts G.D. (1984).** *Nocardiosis dassonvillei* cellulitis of the arm. *Clin. Microbiol. Newsl.* 6: 14-15.
- Pine L. (1970).** Classification and phylogenetic relationship of microaerophilic actinomycetes. *Int. J. Bacteriol.* 20 : 445-474.
- Pitche P., Napo-Koura G., Kpodzro K. et Tchangai-Wallam K. (1999).** Les mycétomes au Togo, Aspects épidémiologiques et étiologiques des cas histologiquement diagnostiqués. *Méd. Afrique Noire.* 46: 322-325.
- PRAUSER H. (1976).** *Nocardioides*, a new genus of the order *Actinomycetales*. *Int. J. Syst. Bact.* 26, 58-65.
- Prinz G., Ban E., Fekete S. and Szabo Z. (1985).** Meningitis caused by *Gordona aurantiaca* (*Rhodococcus aurantiacus*). *J. Clin. Microbiol.* 22: 472–474.
- Ramasamy D., Kokcha S., Lagier J.C., N'Guyen T.T., Raoult D. and Fournier P.E. (2012).** Genome sequence and description of *Aeromicrobium massilense* sp. nov. *Stand. Genomic Sci* 7: 246–257.
- Reponen T.A., Gazenko S.V., Grinshpun S.A., Willeke K. and Cole E.C., (1998).** Characteristics of airborne actinomycete spores. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3807-3812.

- Rey D., Fraisse P., Riegel P., Piemont Y. and Lang J.M. (1997).** *Tsukamurella* infections. Review of the literature apropos of a case. *Pathol. Biol.* 45: 60-65.
- Richter M. and Rosselló-Móra, R. (2009).** Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 106 : 19126–19131.
- Riegel P. (1998).** Les corynébactéries, aspects bactériologiques et cliniques *Annales de biologie clinique.* 56 : 285-96
- Ringuet H., Akoua-Koffi C., Honore S., Varnerot A., Vincent V., Berche P., Gaillard J. L. and Pierre-Audigier C. (1999).** *hsp65* sequencing for identification of rapidly growing mycobacteria. *J. Clin. Microbiol.* 37: 852–857.
- Ritalahti K.M., Justicia-Leon S.D., Cusick K.D., Ramos-Hernandez N., Rubin M., Dornbush J. and Löffler F.E. (2012).** *Sphaerochaeta globosa* gen. nov., sp. nov. and *Sphaerochaeta pleomorpha* sp. nov., free-living, spherical spirochaetes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62 : 210–216.
- Rodriguez-Nava V., Laurent F., Couble A. et Boiron P. (2007).** Identification phénotypique et moléculaire des bactéries appartenant au genre *Nocardia*. Elsevier Masson SAS.
- Rosselló-Mora R. and Amann R. (2001).** The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.* 25 : 39-67.
- Rouessac F., et al. (2004).** Analyse chimique. Méthodes et techniques instrumentales modernes. 6<sup>ème</sup> Ed. Paris: Dunod Éditeur. *Dans* INGRAND J. Immuno-analyse et biologie spécialisée (2012) 27 : 47-53
- Roux V., El Karkouri K., Lagier J.C., Robert C. and Raoult D. (2012).** Non-contiguous finished genome sequence and description of *Kurthia massiliensis* sp. nov. *Stand. Genomic Sci.* 7:221-232.
- Sadowsky M. J., Kinkel L. L., Bowers J. H. and Schottel J. L. (1996).** Use of repetitive intergenic DNA sequences to classify pathogenic and disease-suppressive *Streptomyces* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 3489-3493.
- Saenz A.J., Petersen C. E., Valentine N. B., Gantt S. L., Jarman K. H., Kinsley M. T. and Wahl K. L. (1999).** «Reproducibility of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for replicate bacterial culture analysis». *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 13:1580-85.
- Sahathevan M., Harvey F.A., Forbes G., O'Grady J., Gimson A., Bragman S., Jensen R., Philpott-Howard J., Williams R., and Casewell M.W. (1991).** Epidemiology, bacteriology and control of an outbreak of *Nocardia asteroides* infection on a liver unit. *J. Hosp. Infect.* 18 Suppl. A: 473-480.
- Saitou N. and Nei M. (1987).** The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 63: 406-425.
- Sanger F., Nicklen S. and Coulson A.R. (1977).** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74 : 5463-7
- Sanglier J.J. et Trujillo M. (1997).** Substances bioactives produites par les actinomycètes et stratégie de sélection de souches. *Bull. Soc. Fr. Microbiol.*, 12, (13).
- Schippers A., Bosecker K., Willscher S., Spröer C., Schumann P. and Kroppenstedt R.M. (2002).** *Nocardiopsis metallicus* sp. nov., a metal-leaching

actinomycete isolated from an alkaline slag dump. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52: 2291–2295.

**Schwartz M.A., Tabet S.R., Collier A.C., Wallis C.K., Carlson L.C., Nguyen T.T., Kattar M.M. and Coyle M.B. (2002).** Central venous catheter-related bacteremia due to *Tsukamurella* species in the immunocompromised host: a case series and review of the literature. *Clin. Infect. Dis.* 35: e72–77.

**Seng P., Drancourt M., Gouriet F. and La Scola B. (2009).** Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin. Infect. Dis.* 49: 543–51.

**Shaer A.J. and Gadegbeku C.A. (2001).** *Tsukamurella peritonitis* associated with continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Clin. Nephrol.* 56: 241–246.

**Shapiro C.L., Haft R.F., Gantz N.M., Doern G.V., Christenson J.C., O'Brien R., Overall J.C., Brown B.A. and Wallace R.J. Jr. (1992).** *Tsukamurella paurometabolum*: a novel pathogen causing catheter-related bacteremia in patients with cancer. *Clin. Infect. Dis.* 14: 200–203.

**Sheng W-H., Huang Y-T., Chang S-C. and Hsueh P-R. (2009).** Brain Abscess Caused by *Tsukamurella tyrosinosolvens* in an Immunocompetent Patient. *J Clin Microbiol*, 47: 1602–1604

**Sheridan S., E.A., Warwick S., Chan A., Dall'Antonia M., Koliou M. and Sefton A. (2003).** *Tsukamurella tyrosinosolvens* intravascular catheter infection identified using 16S ribosomal DNA sequencing. *Clin. Infect. Dis.* 36: e69–70.

**Shirling E.B. and Gottlieb D. (1966).** Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Syst. Bact.*, 16: 313–340.

**Silvey J.K.G. and Roach A.N. (1975).** The taste and odor producing aquatic actinomycetes. *Crit. Rev. Environ. Control.* 5: 233–273.

**Sindhuphak W., Macdonald E. and Head E. (1985).** Actinomycetoma caused by *Nocardiosis dassionvillei*. *Arch. Dermatol.* 121: 1332–1334.

**Soraa N., Arsalane L., Ouhdouch Y. et Louzi L. (2009).** Abces cerebral a *Nocardia* : A propos d'un cas. *Rev Tun Infectiol*, 3, 2, 29 - 33

**Stackebrandt E. (2002).** *Halomonas halocynthiae* sp. nov., isolated from the marine ascidian *Halocynthia aurantium*. *Int J Syst Evol Microbiol* 52, 1767–1772.

**Stackebrandt E. and B.M. Goebel (1994).** Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S *rRNA* sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44: 846–9.

**Stackebrandt E. and Ebers J. (2006).** Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiol Today* 33: 152–155.

**Stanley T., Crothers L., McCalmont M., Xu J., Millar B.C., Goldsmith C.E. and Moore J.E. (2006).** The potential misidentification of *Tsukamurella pulmonis* as an atypical *Mycobacterium* species: a cautionary tale. *J. Med. Microbiol.* 55: 475–478.

**Steingrube V.A., Wilson R.W., Brown B.A., Jost Jr. K.C., Blacklock Z., Gibson J.L. and Wallace Jr. R.J., (1997).** Rapid identification of clinically significant species and taxa of aerobic actinomycetes, including *Actinomadura*, *Gordona*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, and *Tsukamurella* isolates, by DNA amplification and restriction endonuclease analysis. *J. Clin. Microbiol.* 35: 817–822.

- Stevens D.A., Pier A.C., Beaman B.L., Morozumi P.A., Lovett I.S. and Houang E.T. (1981).** Laboratory evaluation of an outbreak of nocardiosis in immunocompromised hosts. *Am. J. Med.* 71: 928-934.
- Suzuki K. (1988).** Cellular fatty acid analysis in actinomycetes taxonomy. *In* "Biology of Actinomycetes" pp: 251-256. 88<sup>th</sup>, Ed. Scientific Societies Press, Tokyo: Japan,
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, and Kumar S (2011).** MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739.
- Tatusov R.L, Natale D.A., Garkavtsev I.V., Tatusova T.A., Shankavaram U.T., Rao B.S., Kiryutin B., Galperin M.Y, Fedorova N.D. and Koonin E.V. (2001).** The COG database: new developments in phylogenetic classification of proteins from complete genomes. *Nucleic Acids Res.* 29(1):22-8.
- Thomas J.A., Soddell J. A., and Kurtböke D. I. (2002).** Fighting foam with phages. *Water Sci. Technol.* 46:511–553.
- Thompson J.D., Higgins D.G. and Gibson T.J. (1994).** Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acid Res* 22: 4673-4680.
- Thompson C.C., Thompson F.L., Vandemeulebroecke K., Hoste B., Dawyndt P. and Swings J. (2004).** Use of recA as an alternative phylogenetic marker in the family Vibrionaceae. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 919-924
- Tian X.-P., Tang S.-K., Dong J.-D., Zhang Y.-Q., Xu L.-H., Zhang S. and Li W.-J. (2009).** *Marinactinospora thermotolerans* gen. nov., sp. nov., a marine actinomycete isolated from a sediment in the northern South China Sea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59: 948-952
- Tindall B.J. (1990 b).** Lipid composition of *Halobacterium lacusprofundi*. *FEMS Microbiol. Letts.* 66: 199-202
- Tindall B.J. (1990a).** A comparative study of the lipid composition of *Halobacterium saccharovororum* from various sources. *Syst. Appl. Microbiol.* 13: 128-130
- Tindall B.J., Sikorski J., Smibert R.M. and Kreig N.R. (2007).** Phenotypic characterization and the principles of comparative systematics. *In* *Methods for General and Molecular Microbiology* 3<sup>rd</sup> Ed. p. 330-393. ASM Press, Washington DC, USA
- Tresner H.D., Hayes J. S. and Backus E. J. (1968).** Differential tolerance of Streptomycetes to sodium chloride as a taxonomic tool. *Appl. Microbiol.* 16: 1134-1136
- Trujillo M. and Goodfellow M.(2012).** Genus *Actinomadura*. *In* *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. The Actinobacteria.* pp. 1940-1959. vol. 5, 2<sup>nd</sup> Ed. Springer New York.
- Trujillo M.E., Actinomadura, In: Molecular detection of human bacterial pathogens.** pp. 13-21. CRC Press Taylor & Francis Group. Boca Raton London New York.
- Trujillo, M.E. and Goodfellow M. (1997a).** Polyphasic taxonomic study of clinically significant actinomadurae including the description of *Actinomadura latina* sp. nov. *Zentralbl. Bakteriologie.* 285: 212–233.

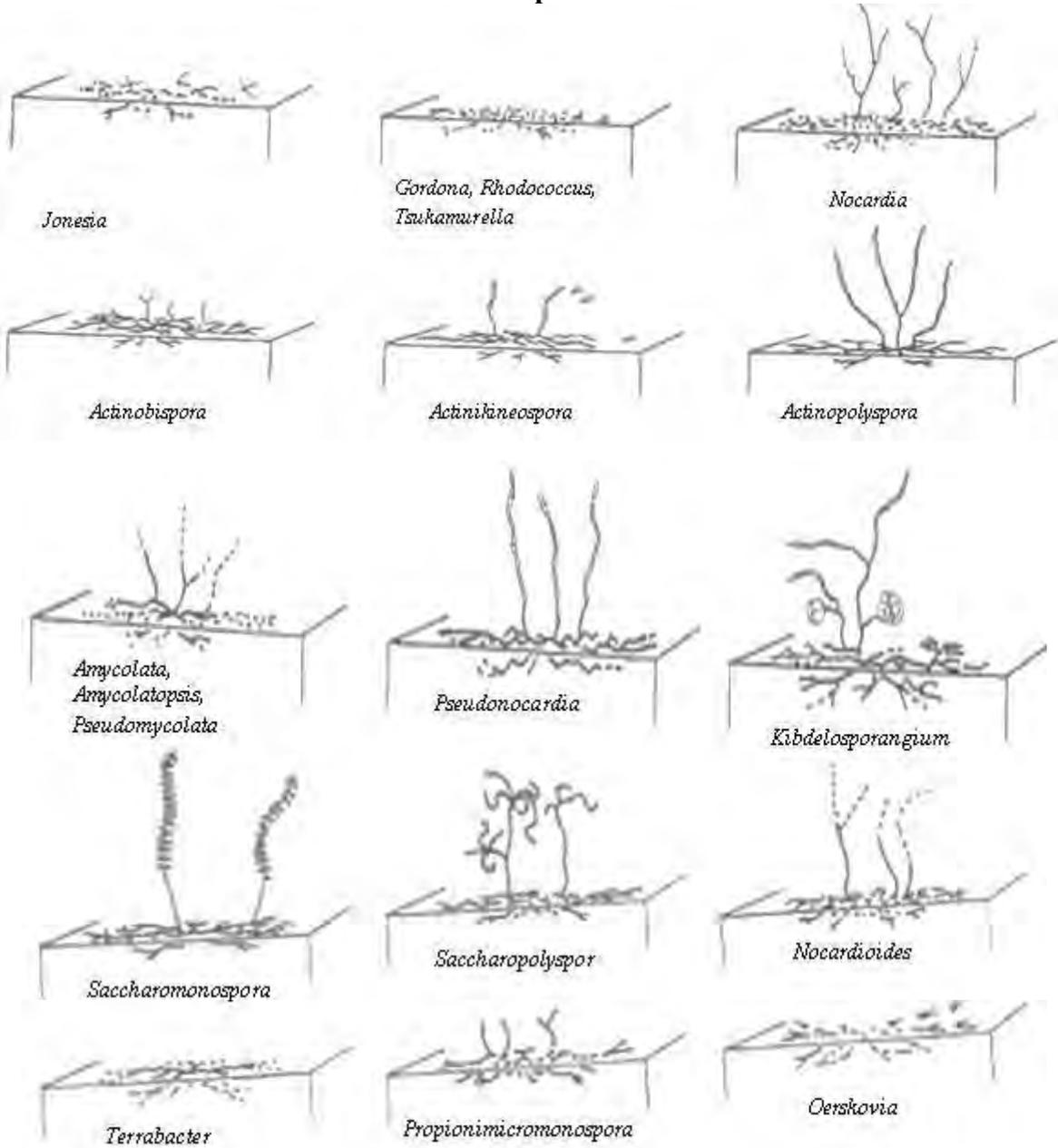
- Tsukamura M. and Kawakami K. (1982).** Lung infection caused by *Gordona aurantiaca* (*Rhodococcus aurantiacus*). J. Clin. Microbiol. 16: 604–607.
- Tsukamura M., Hikosaka K., Nishimura K. and Hara S. (1988).** Severe progressive subcutaneous abscesses and necrotizing tenosynovitis caused by *Rhodococcus aurantiacus*. J. Clin. Microbiol. 26: 201–205.
- Vandamme P., Pot B., Gillis M., de Vos P., Kersters K. and Swings J. (1996).** Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. Microbiol. Rev. 60: 407-438
- Vanlaere E, Baldwin A, Gevers D, Henry D, De Brandt E, et al. (2009).** Taxon K, a complex within the Burkholderia cepacia complex, comprises at least two novel species, *Burkholderia contaminans* sp nov and *Burkholderia lata* sp nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 59:102–111.
- Vercoutter-Edouart A.S., Lemoine J., Le Bourhis X., Louis H., Boilly B., Nurcombe V., et al. (2001).** Proteomic analysis reveals that 14-3-3 sigma is down regulated in human breast cancer cells. Cancer Res. 61: 76-80.
- Vobis G. (1992).** The genus *Actinoplanes* and related genera. In The Prokaryotes, a Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Application, pp. 1029–1060. vol. 2. 2<sup>nd</sup> Ed. Springer Verlag, New York.
- Weisburg W. G., Barns S.M., Pelletier D.A. and Lane D.J. (1991).** 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. J. Bacteriol. 173: 697-703.
- Whitman W.B., Boone D.R., Koga Y. and Keswani J. (2001).** Taxonomy of methanogenic archaea. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. vol. 1. pp. 211-213. Springer. New York.
- Williams S.T., Lanning S. and Wellington E.M.H. (1993).** Ecology of actinomycetes. In: The biology of actinomycetes . pp. 481-528. Academic press, London,
- Woo J-H., Kitamura E., Myouga H. and Kamei Y., (2002).** An antifungal protein from the marine bacterium *Streptomyces* sp. Strain AP77 is specific for *Pythium porphyrae*, a causative agent of red rot disease in *Porphyra* spp. Appl. Environ. Microbiol. 68: 2666-2675.
- Woo P.C.Y., Ngan A.H.Y., Lau S.K.P. and Yuen K.Y. (2003).** *Tsukamurella conjunctivitis*: a novel clinical syndrome. J. Clin. Microbiol. 41: 3368–3371.
- Xu L.-H., Li Q.R. and Jiang C. L., (1996).** Diversity of soil actinomycetes in yunnan, China. Appl. Environ. Microbiol. 62 : 244 - 248.
- Yang R., Zhang L.P., Guo L.G., Shi N., Lu Z. and Zhang X. (2008).** *Nocardiopsis valliformis* sp. nov., an alkaliphilic actinomycete isolated from alkali lake soil in China. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 58: 1542–1546.
- Yassin A.F., Rainey F.A., Burghardt J., Brzezinka H., Schmitt S., Seifert P., Zimmermann O., Mauch H., Gierth D., Lux I. and Schaal K.P. (1997).** *Tsukamurella tyrosinosolvans* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 47: 607–614.
- Yassin A. F., Spröer C., Siering C. and Klenk H.P. (2011).** *Actinomadura sputi* sp. nov., isolated from the sputum of a patient with pulmonary infection. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 60: 149-53.

- Yassin A.F. (2009).** *Saccharopolyspora rosea* sp. nov., isolated from a patient with bronchial carcinoma. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59: 1148-1152
- Yassin A.F., Rainey F.A., Brzezinka H., Burghardt J., Rifai M., Seifert P., Feldmann K. and Schall K.P. (1996).** *Tsukarnurella pulmonis* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteri.* 46 : 429-436.
- Yassin A.F., Rainey F.A., Brzezinka H., Burghardt J., Lee H.J. and Schaal K.P. (1995).** *Tsukamurella inchonensis* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45: 522–527.
- Yassin A.F., Spröer C., Hupfer H., Siering C. and Klenk H.-P. (2009).** *Nocardiopsis potens* sp. nov., isolated from household waste. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59: 2729-2733.
- Zhou Y, Liang Y, Lynch KH, Dennis JJ and Wishart DS. (2011).** PHAST: a fast phage search tool. *Nucleic Acids Res.* 39(Web server issue):W347–W352.
- Zoropogui A. (2011).** Analyse du génome de *Nocardia cyriacigeorgica* GUH-2 : plasticité génétique et métabolisme secondaire d'un pathogène opportuniste. These doctorat. Université Claude Bernard - LYON 1. France

## Groupe 20

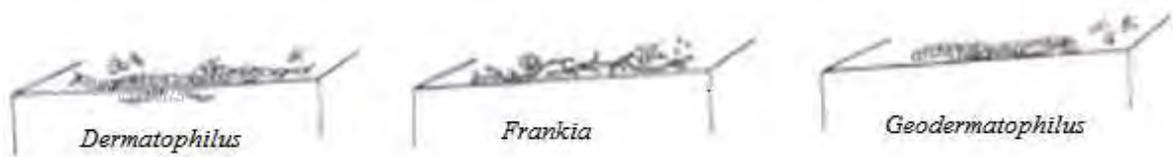


## Groupe 22

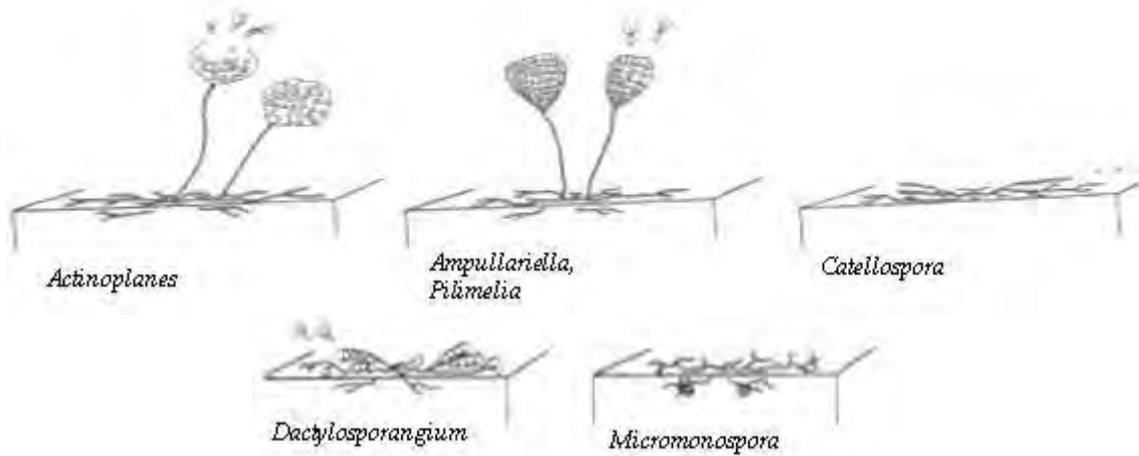


**Figure 3 :** Diagrammes schématiques des mycéliums aérien et de substrat des *Actinomycetales* et autres genres de morphologies similaires (Holt *et al.*, 1994).

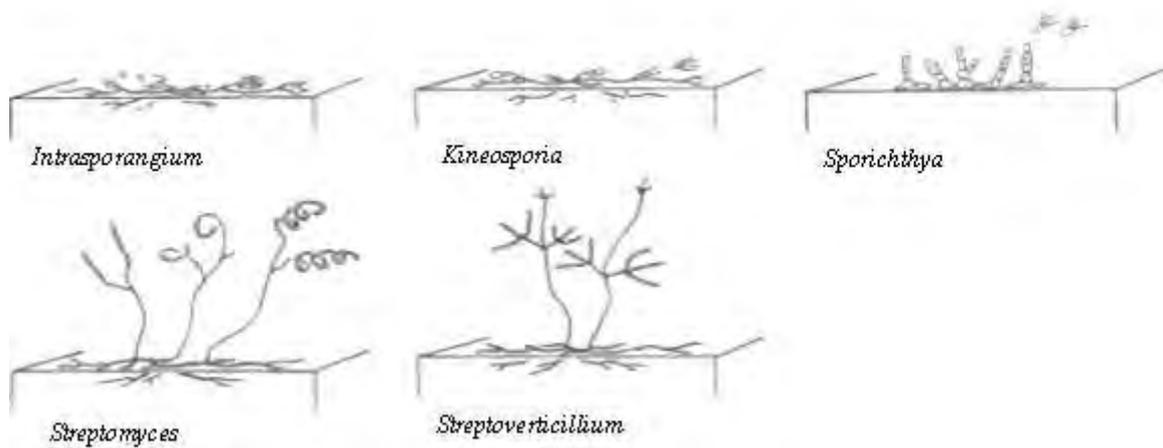
## Groupe 23



## Groupe 24

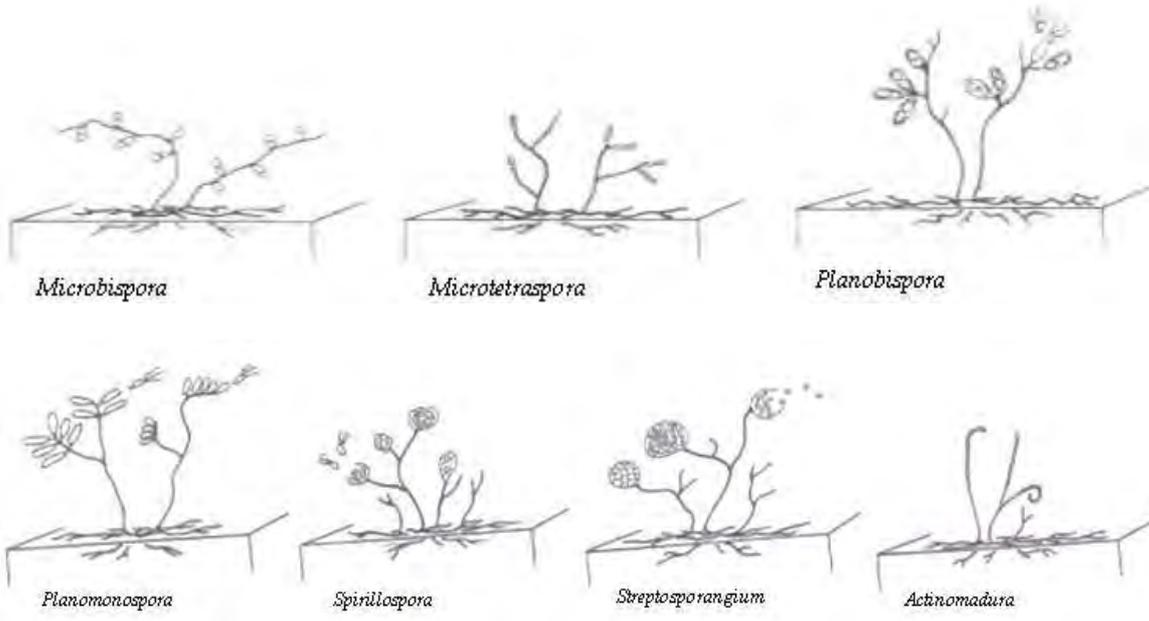


## Groupe 25

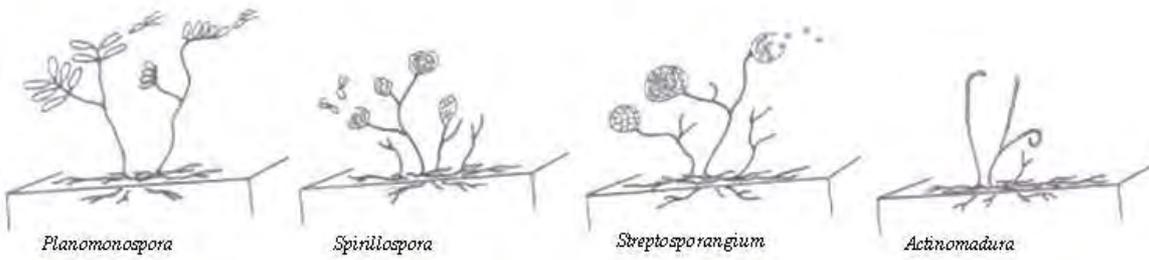


**Figure 3 (Suite) :** Diagrammes schématiques des mycéliums aérien et de substrat des *Actinomycetales* et autres genres de morphologies similaires (Holt *et al.*, 1994).

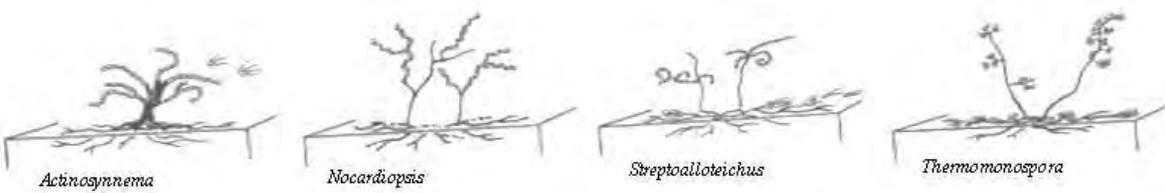
### Groupe 26



### Groupe 26 (suite)



### Groupe 27



**Figure 3 (Suite)** : Diagrammes schématiques des mycéliums aérien et de substrat des *Actinomycetales* et autres genres de morphologies similaires (Holt *et al.*, 1994).

# Taxonomic outline of the phylum *Actinobacteria*

WOLFGANG LUDWIG, JEAN EUZÉBY AND WILLIAM B. WHITMAN

---

All taxa recognized within this volume of the rank of genus and above are listed below. Within each classification, the nomenclatural type is listed first followed by the remaining taxa in alphabetical order. Taxa appearing on the Approved Lists are denoted by the superscript <sup>AL</sup>. Taxa that were otherwise validly published are denoted by the superscript <sup>VP</sup>. Taxa that have not been validly published are presented in quotations. Taxa which were not included in this volume because they were described after the deadline of 1 January 2008 are indicated by an asterick\*.

## Phylum XXVI. “*Actinobacteria*”

### Class I. “*Actinobacteria*”

#### Order I. *Actinomycetales*<sup>AL(T)</sup>

##### Family I. *Actinomycetaceae*<sup>AL</sup>

Genus I. *Actinomyces*<sup>AL(T)</sup>

Genus II. *Actinobaculum*<sup>VP</sup>

Genus III. *Arcanobacterium*<sup>VP</sup>

Genus IV. *Mobiluncus*<sup>VP</sup>

Genus V. *Varibaculum*<sup>VP</sup>

#### Order II. “*Actinopolysporales*”

##### Family I. *Actinopolysporaceae*<sup>VP</sup>

Genus I. *Actinopolyspora*<sup>AL</sup>

#### Order III. *Bifidobacteriales*<sup>VP</sup>

##### Family I. *Bifidobacteriaceae*<sup>VP</sup>

Genus I. *Bifidobacterium*<sup>AL(T)</sup>

Genus II. *Aeriscardovia*<sup>VP</sup>

Genus III. *Alloiscardovia*<sup>VP</sup>

Genus IV. *Gardnerella*<sup>VP</sup>

Genus V. *Metiscardovia*<sup>VP</sup>

Genus VI. *Pariscardovia*<sup>VP</sup>

Genus VII. *Scardovia*<sup>VP</sup>

#### Order IV. “*Catenulisporales*”

##### Family I. *Catenulisporaceae*<sup>VP</sup>

Genus I. *Catenulispora*<sup>VP(T)</sup>

##### Family II. *Actinospicaceae*<sup>VP</sup>

Genus I. *Actinospica*<sup>VP(T)</sup>

#### Order V. “*Corynebacteriales*”

##### Family I. *Corynebacteriaceae*<sup>AL</sup>

Genus I. *Corynebacterium*<sup>AL(T)</sup>

Genus II. *Turicella*<sup>VP</sup>

##### Family II. *Dietziaceae*<sup>VP</sup>

Genus I. *Dietzia*<sup>VP(T)</sup>

##### Family III. *Mycobacteriaceae*<sup>AL</sup>

Genus I. *Mycobacterium*<sup>AL(T)</sup>

##### Family IV. *Nocardiaceae*<sup>AL</sup>

Genus I. *Nocardia*<sup>AL(T)</sup>

Genus II. *Gordonia*<sup>VP</sup>

Genus III. *Millisia*<sup>VP</sup>

Genus IV. *Rhodococcus*<sup>AL</sup>

Genus V. *Skermania*<sup>VP</sup>

- Genus VI. *Smaragdicoccus*<sup>VP</sup>  
 Genus VII. *Williamsia*<sup>VP</sup>  
 Family V. *Segniliparaceae*<sup>VP</sup>  
 Genus I. *Segniliparus*<sup>VP(T)</sup>  
 Family VI. *Tsukamurellaceae*<sup>VP</sup>  
 Genus I. *Tsukamurella*<sup>VP(T)</sup>  
 Order VI. “*Frankiales*”  
 Family I. *Frankiaceae*<sup>AL</sup>  
 Genus I. *Frankia*<sup>AL(T)</sup>  
 Family II. *Acidothermaceae*<sup>VP</sup>  
 Genus I. *Acidothermus*<sup>VP(T)</sup>  
 Family III. *Cryptosporangiaceae*<sup>VP</sup>  
 Genus I. *Cryptosporangium*<sup>VP(T)</sup>  
 Genus *Incerta sedis Fodinicola*<sup>VP</sup>  
 Family IV. *Geodermatophilaceae*<sup>VP</sup>  
 Genus I. *Geodermatophilus*<sup>AL(T)</sup>  
 Genus II. *Blastococcus*<sup>AL</sup>  
 Genus III. *Modestobacter*<sup>VP</sup>  
 Family V. *Nakamurellaceae*<sup>VP</sup>  
 Genus I. *Nakamurella*<sup>VP(T)</sup>  
 Genus II. *Humicoccus*<sup>VP</sup>  
 Genus III. *Saxeibacter*<sup>VP\*</sup>  
 Family VI. *Sporichthyaceae*<sup>VP</sup>  
 Genus I. *Sporichthya*<sup>AL(T)</sup>  
 Order VII. “*Glycomycetales*”  
 Family I. *Glycomycetaceae*<sup>VP</sup>  
 Genus I. *Glycomyces*<sup>VP(T)</sup>  
 Genus II. *Haloglycomyces*<sup>VP\*</sup>  
 Genus III. *Stackebrandtia*<sup>VP</sup>  
 Order VIII. “*Jiangellales*”  
 Family I. *Jiangellaceae*<sup>VP</sup>  
 Genus I. *Jiangella*<sup>VP(T)</sup>  
 Genus II. *Haloactinopolyspora*<sup>VP</sup>  
 Order IX. “*Kineosporiales*”  
 Family I. *Kineosporiaceae*<sup>VP</sup>  
 Genus I. *Kineosporia*<sup>AL(T)</sup>  
 Genus II. *Kineococcus*<sup>VP</sup>  
 Genus III. *Quadrisphaera*<sup>VP</sup>  
 Order X. *Micrococcales*<sup>AL</sup>  
 Family I. *Micrococcaceae*<sup>AL</sup>  
 Genus I. *Micrococcus*<sup>AL(T)</sup>  
 Genus II. *Acaricomes*<sup>VP</sup>  
 Genus III. *Arthrobacter*<sup>AL</sup>  
 Genus IV. *Citricoccus*<sup>VP</sup>  
 Genus V. *Kocuria*<sup>VP</sup>  
 Genus VI. *Nesterenkonia*<sup>VP</sup>  
 Genus VII. *Renibacterium*<sup>VP</sup>  
 Genus VIII. *Rothia*<sup>VP</sup>  
 Genus IX. *Sinomonas*<sup>VP\*</sup>  
 Genus X. *Yaniella*<sup>VP</sup>  
 Genus XI. *Zhihengliuella*<sup>VP</sup>  
 Family II. *Beutenbergiaceae*<sup>VP</sup>  
 Genus I. *Beutenbergia*<sup>VP(T)</sup>  
 Genus II. *Miniimonas*<sup>VP</sup>

Genus III. *Salana*<sup>VP</sup>  
 Genus IV. *Serinibacter*<sup>VP</sup>  
 Family III. *Bogoriellaceae*<sup>VP</sup>  
   Genus I. *Bogoriella*<sup>VP(T)</sup>  
   Genus II. *Georgenia*<sup>VP</sup>  
 Family IV. *Brevibacteriaceae*<sup>AL</sup>  
   Genus I. *Brevibacterium*<sup>AL(T)</sup>  
 Family V. *Cellulomonadaceae*<sup>VP</sup>  
   Genus I. *Cellulomonas*<sup>AL(T)</sup>  
   Genus II. *Actinotalea*<sup>VP</sup>  
   Genus III. *Demequina*<sup>VP</sup>  
   Genus IV. *Oerskovia*<sup>AL</sup>  
   Genus V. *Paraoerskovia*<sup>VP\*</sup>  
   Genus VI. *Tropheryma*<sup>VP</sup>  
 Family VI. *Dermabacteraceae*<sup>VP</sup>  
   Genus I. *Dermabacter*<sup>VP(T)</sup>  
   Genus II. *Brachybacterium*<sup>VP</sup>  
   Genus III. *Devriesea*<sup>VP\*</sup>  
   Genus IV. *Helcobacillus*<sup>VP\*</sup>  
 Family VII. *Dermacoccaceae*<sup>VP</sup>  
   Genus I. *Dermacoccus*<sup>VP(T)</sup>  
   Genus II. *Demetria*<sup>VP</sup>  
   Genus III. *Kytococcus*<sup>VP</sup>  
 Family VIII. *Dermatophilaceae*<sup>AL</sup>  
   Genus I. *Dermatophilus*<sup>AL(T)</sup>  
   Genus II. *Kineosphaera*<sup>VP</sup>  
 Family IX. *Intrasporangiaceae*<sup>VP</sup>  
   Genus I. *Intrasporangium*<sup>AL(T)</sup>  
   Genus II. *Arsenicococcus*<sup>VP</sup>  
   Genus III. *Fodinibacter*<sup>VP\*</sup>  
   Genus IV. *Humibacillus*<sup>VP\*</sup>  
   Genus V. *Humihabitans*<sup>VP</sup>  
   Genus VI. *Janibacter*<sup>VP</sup>  
   Genus VII. *Knoellia*<sup>VP</sup>  
   Genus VIII. *Kribbia*<sup>VP</sup>  
   Genus IX. *Lapillicoccus*<sup>VP</sup>  
   Genus X. *Marihabitans*<sup>VP\*</sup>  
   Genus XI. *Ornithinicoccus*<sup>VP</sup>  
   Genus XII. *Ornithinimicrobium*<sup>VP</sup>  
   Genus XIII. *Oryzihumus*<sup>VP</sup>  
   Genus XIV. *Phycococcus*<sup>VP</sup>  
   Genus XV. *Serinicoccus*<sup>VP</sup>  
   Genus XVI. *Terrabacter*<sup>VP</sup>  
   Genus XVII. *Terracoccus*<sup>VP</sup>  
   Genus XVIII. *Tetrasphaera*<sup>VP</sup>  
 Family X. *Jonesiaceae*<sup>VP</sup>  
   Genus I. *Jonesia*<sup>VP(T)</sup>  
 Family XI. *Microbacteriaceae*<sup>VP</sup>  
   Genus I. *Microbacterium*<sup>AL(T)</sup>  
   Genus II. *Agreia*<sup>VP</sup>  
   Genus III. *Agrococcus*<sup>VP</sup>  
   Genus IV. *Agromyces*<sup>AL</sup>  
   Genus V. *Clavibacter*<sup>VP</sup>  
   Genus VI. *Cryobacterium*<sup>VP</sup>

- Genus VII. *Curtobacterium*<sup>AL</sup>  
 Genus VIII. *Frigoribacterium*<sup>VP</sup>  
 Genus IX. *Frondehabitans*<sup>VP</sup>  
 Genus X. *Glaciibacter*<sup>VP\*</sup>  
 Genus XI. *Gulosibacter*<sup>VP</sup>  
 Genus XII. *Humibacter*<sup>VP</sup>  
 Genus XIII. *Klugiella*<sup>VP\*</sup>  
 Genus XIV. *Labedella*<sup>VP</sup>  
 Genus XV. *Leifsonia*<sup>VP</sup>  
 Genus XVI. *Leucobacter*<sup>VP</sup>  
 Genus XVII. *Microcella*<sup>VP</sup>  
 Genus XVIII. *Microterricola*<sup>VP</sup>  
 Genus XIX. *Mycetocola*<sup>VP</sup>  
 Genus XX. *Okibacterium*<sup>VP</sup>  
 Genus XXI. *Phycicola*<sup>VP</sup>  
 Genus XXII. *Plantibacter*<sup>VP</sup>  
 Genus XXIII. *Pseudoclavibacter*<sup>VP</sup>  
 Genus XXIV. *Rathayibacter*<sup>VP</sup>  
 Genus XXV. *Rhodoglobus*<sup>VP</sup>  
 Genus XXVI. *Salinibacterium*<sup>VP</sup>  
 Genus XXVII. *Schumannella*<sup>VP\*</sup>  
 Genus XXVIII. *Subtercola*<sup>VP</sup>  
 Genus XXIX. *Yonghaparkia*<sup>VP</sup>  
 Family XII. *Promicromonosporaceae*<sup>VP</sup>  
 Genus I. *Promicromonospora*<sup>AL(T)</sup>  
 Genus II. *Cellulosimicrobium*<sup>VP</sup>  
 Genus III. *Isopterocola*<sup>VP</sup>  
 Genus IV. *Myceligenerans*<sup>VP</sup>  
 Genus V. *Xylanibacterium*<sup>VP</sup>  
 Genus VI. *Xylanimicrobium*<sup>VP</sup>  
 Genus VII. *Xylanimonas*<sup>VP</sup>  
 Family XIII. *Rarobacteraceae*<sup>VP</sup>  
 Genus I. *Rarobacter*<sup>VP(T)</sup>  
 Family XIV. *Ruaniaceae*<sup>VP</sup>  
 Genus I. *Ruania*<sup>VP(T)</sup>  
 Genus II. *Haloactinobacterium*<sup>VP</sup>  
 Family XV. *Sanguibacteraceae*<sup>VP</sup>  
 Genus I. *Sanguibacter*<sup>VP(T)</sup>

#### Order XI. "Micromonosporales"

- Family I. *Micromonosporaceae*<sup>AL</sup>  
 Genus I. *Micromonospora*<sup>AL(T)</sup>  
 Genus II. *Actinocatenispora*<sup>VP</sup>  
 Genus III. *Actinoplanes*<sup>AL</sup>  
 Genus IV. *Asanoa*<sup>VP</sup>  
 Genus V. *Catellatospora*<sup>VP</sup>  
 Genus VI. *Catelliglobospora*<sup>VP\*</sup>  
 Genus VII. *Catenuloplanes*<sup>VP</sup>  
 Genus VIII. *Couchioplanes*<sup>VP</sup>  
 Genus IX. *Dactylosporangium*<sup>AL</sup>  
 Genus X. *Hamadaea*<sup>VP\*</sup>  
 Genus XI. *Krasilnikovia*<sup>VP</sup>  
 Genus XII. *Longispora*<sup>VP</sup>  
 Genus XIII. *Luedemannella*<sup>VP</sup>  
 Genus XIV. *Pilimelia*<sup>AL</sup>

Genus XV. *Planosporangium*<sup>VP\*</sup>  
Genus XVI. *Plantactinospora*<sup>VP\*</sup>  
Genus XVII. *Polymorphospora*<sup>VP</sup>  
Genus XVIII. *Pseudosporangium*<sup>VP\*</sup>  
Genus XIX. *Rugosimonospora*<sup>VP\*</sup>  
Genus XX. *Salinispora*<sup>VP</sup>  
Genus XXI. *Spirilliplanes*<sup>VP</sup>  
Genus XXII. *Verrucosispora*<sup>VP</sup>  
Genus XXIII. *Virigisporangium*<sup>VP</sup>

Order XII. “*Propionibacteriales*”

Family I. *Propionibacteriaceae*<sup>AL</sup>

Genus I. *Propionibacterium*<sup>AL(T)</sup>  
Genus II. *Aestuariimicrobium*<sup>VP</sup>  
Genus III. *Brooklawnia*<sup>VP</sup>  
Genus IV. *Friedmanniella*<sup>VP</sup>  
Genus V. *Granulicoccus*<sup>VP</sup>  
Genus VI. *Luteococcus*<sup>VP</sup>  
Genus VII. *Microlunatus*<sup>VP</sup>  
Genus VIII. *Micropruina*<sup>VP</sup>  
Genus IX. *Propionicicella*<sup>VP</sup>  
Genus X. *Propionicimonas*<sup>VP</sup>  
Genus XI. *Propioniferax*<sup>VP</sup>  
Genus XII. *Propionimicrobium*<sup>VP</sup>  
Genus XIII. *Tessaracoccus*<sup>VP</sup>

Family II. *Nocardoidaceae*<sup>VP</sup>

Genus I. *Nocardioides*<sup>AL(T)</sup>  
Genus II. *Actinopolymorpha*<sup>VP</sup>  
Genus III. *Aeromicrobium*<sup>VP</sup>  
Genus IV. *Kribbella*<sup>VP</sup>  
Genus V. *Marmoricola*<sup>VP</sup>

Order XIII. “*Pseudonocardiales*”

Family I. *Pseudonocardiaceae*<sup>VP</sup>

Genus I. *Pseudonocardia*<sup>AL(T)</sup>  
Genus II. *Actinoalloteichus*<sup>VP</sup>  
Genus III. *Actinokineospora*<sup>VP</sup>  
Genus IV. *Actinomycetospora*<sup>VP\*</sup>  
Genus V. *Actinosynnema*<sup>AL</sup>  
Genus VI. *Alloactinosynnema*<sup>VP\*</sup>  
Genus VII. *Allokutzneria*<sup>VP\*</sup>  
Genus VIII. *Amycolatopsis*<sup>VP</sup>  
Genus IX. *Crossiella*<sup>VP</sup>  
Genus X. *Goodfellowiella*<sup>VP</sup>  
Genus XI. *Kibdelosporangium*<sup>VP</sup>  
Genus XII. *Kutzneria*<sup>VP</sup>  
Genus XIII. *Lechevalieria*<sup>VP</sup>  
Genus XIV. *Lentzea*<sup>VP</sup>  
Genus XV. *Prauserella*<sup>VP</sup>  
Genus XVI. *Saccharomonospora*<sup>AL</sup>  
Genus XVII. *Saccharopolyspora*<sup>AL</sup>  
Genus XVIII. *Saccharothrix*<sup>VP</sup>  
Genus XIX. *Sciscionella*<sup>VP\*</sup>  
Genus XX. *Streptoalloteichus*<sup>VP</sup>  
Genus XXI. *Thermocrispum*<sup>VP</sup>  
Genus XXII. *Umezawaea*<sup>VP</sup>

Order XIV. “*Streptomycetales*”

Family I. *Streptomycetaceae*<sup>AL</sup>

Genus I. *Streptomyces*<sup>AL(T)</sup>

Genus *Incertae sedis I. Kitasatospora*<sup>VP</sup>

Genus *Incertae sedis II. Streptacidiphilus*<sup>VP</sup>

Order XV. “*Streptosporangiales*”

Family I. *Streptosporangiaceae*<sup>VP</sup>

Genus I. *Streptosporangium*<sup>AL(T)</sup>

Genus II. *Acrocarpospora*<sup>VP</sup>

Genus III. *Herbidospora*<sup>VP</sup>

Genus IV. *Microbispora*<sup>AL</sup>

Genus V. *Microtetraspota*<sup>AL</sup>

Genus VI. *Nonomuraea*<sup>VP</sup>

Genus VII. *Planobispora*<sup>AL</sup>

Genus VIII. *Planomonospora*<sup>AL</sup>

Genus IX. *Planotetraspota*<sup>VP</sup>

Genus X. *Sphaerisporangium*<sup>VP</sup>

Genus XI. *Thermopolyspora*<sup>VP</sup>

Family II. *Nocardiopsaceae*<sup>VP</sup>

Genus I. *Nocardiopsis*<sup>AL(T)</sup>

Genus II. *Haloactinospora*<sup>VP</sup>

Genus III. *Marinactinospora*<sup>VP\*</sup>

Genus IV. *Streptomonospora*<sup>VP</sup>

Genus V. *Thermobifida*<sup>VP</sup>

Family III. *Thermomonosporaceae*<sup>VP</sup>

Genus I. *Thermomonospora*<sup>AL(T)</sup>

Genus II. *Actinoallomurus*<sup>VP\*</sup>

Genus III. *Actinocorallia*<sup>VP</sup>

Genus IV. *Actinomadura*<sup>AL</sup>

Genus V. *Spirillospora*<sup>AL</sup>

Order *Incertae sedis*

Genus I. *Thermobispora*<sup>VP</sup>

Class II. “*Acidimicrobiia*”

Order I. *Acidimicrobiales*<sup>VP(T)</sup>

Family I. *Acidimicrobiaceae*<sup>VP</sup>

Genus I. *Acidimicrobium*<sup>VP(T)</sup>

Genus II. *Ferrimicrobium*<sup>VP</sup>

Genus III. *Ferrithrix*<sup>VP</sup>

Genus IV. *Ihumatobacter*<sup>VP\*</sup>

Family II. *Iamiaceae*<sup>VP</sup>

Genus I. *Iamia*<sup>VP(T)</sup>

Class III. “*Coriobacteriia*”

Order I. *Coriobacteriales*<sup>VP(T)</sup>

Family I. *Coriobacteriaceae*<sup>VP</sup>

Genus I. *Coriobacterium*<sup>VP(T)</sup>

Genus II. *Adlercreutzia*<sup>VP\*</sup>

Genus III. *Asaccharobacter*<sup>VP\*</sup>

Genus IV. *Atopobium*<sup>VP</sup>

Genus V. *Collinsella*<sup>VP</sup>

Genus VI. *Cryptobacterium*<sup>VP</sup>

Genus VII. *Denitrobacterium*<sup>VP</sup>

Genus VIII. *Eggerthella*<sup>VP</sup>

Genus IX. *Enterorhabdus*<sup>VP\*</sup>  
Genus X. *Gordonibacter*<sup>VP\*</sup>  
Genus XI. *Olsenella*<sup>VP</sup>  
Genus XII. *Paraeggerthella*<sup>VP\*</sup>  
Genus XIII. *Slackia*<sup>VP</sup>

Class IV. “*Nitriliruptoria*”

Order I. *Nitriliruptorales*<sup>VP(T)</sup>

Family I. *Nitriliruptoraceae*<sup>VP</sup>

Genus I. *Nitriliruptor*<sup>VP(T)</sup>

Order II. *Euzebyales*<sup>VP(T)</sup>

Family I. *Euzebyaceae*<sup>VP</sup>

Genus I. *Euzebya*<sup>VP(T)</sup>

Class V. “*Rubrobacteria*”

Order I. *Rubrobacterales*<sup>VP(T)</sup>

Family I. *Rubrobacteraceae*<sup>VP</sup>

Genus I. *Rubrobacter*<sup>VP(T)</sup>

Class VI. “*Thermoleophilia*”

Order I. *Thermoleophilales*<sup>VP(T)</sup>

Family I. *Thermoleophilaceae*<sup>VP</sup>

Genus I. *Thermoleophilum*<sup>VP(T)</sup>

Order II. *Solirubrobacterales*<sup>VP</sup>

Family I. *Solirubrobacteraceae*<sup>VP</sup>

Genus I. *Solirubrobacter*<sup>VP(T)</sup>

Family II. *Conexibacteraceae*<sup>VP</sup>

Genus I. *Conexibacter*<sup>VP(T)</sup>

Family III. *Patulibacteraceae*<sup>VP</sup>

Genus I. *Patulibacter*<sup>VP(T)</sup>

**Traitement des prélèvements polymicrobiens**L'acide sulfurique H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 15% :H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 150 mlH<sub>2</sub>O distillée 850 ml

Stériliser par autoclavage

La soude NaOH à 6% :

NaOH 60 g

H<sub>2</sub>O distillée 1000 ml

Stériliser par autoclavage

La soude NaOH à 4% :

NaOH 40 g

H<sub>2</sub>O distillée 1000 ml

Stériliser par autoclavage

**Recherche de BAAR à l'examen direct****Coloration à l'auramine**

Acide-alcool :

Alcool 90° 1500 ml

H<sub>2</sub>O distillée 500 ml

NaCl 20 g

HCl (acide chloridrique) 20 ml

Auramine :

Auramine 3 g

Acide phéniqué 10 ml

H<sub>2</sub>O distillée 1000 ml

Permanganète de potassium :

KMnO<sub>4</sub> 1 gH<sub>2</sub>O distillée 1000 ml**Coloration de Ziehl-Neelsen**

Phénol :

Phénol 94 g

H<sub>2</sub>O distillée 1000 ml

Acide sulfurique 25% :

H<sub>2</sub>O distillée 750 mlH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 250 ml**Technique de coloration de Ziehl Nelsen (Z.N.) :**

Placer la lame sur un support métallique. Recouvrir le frottis de fuchsine phéniqués de Ziehl. Chauffer doucement jusqu'à émission de vapeurs (sans faire bouillir) pendant 10 min. Eviter la dessiccation des frottis en ajoutant du colorant si besoin. Rejeter le colorant, laver.

Plonger la lame 45 secondes dans un borel rempli d'acide nitrique au 1/3 ou 3 min dans l'acide sulfurique 1/4. Laver à l'eau.

Recouvrir la lame d'alcool à 90 °, 5min. Laver à l'eau.

Recolorer 30 sec avec du bleu de méthylène phéniqué filtré extemporanément.

Laver, sécher, examiner à l'immersion. Les BAAR apparaissent rouges sur fond bleu.

## Milieux de culture

### • Milieu de Bennett

D-Glucose anhydre	10 g
Casaminoacides	2 g
Extrait de levure	1 g
Extrait de viande	1 g
Agar	15 g
Eau distillée	qsp 1000 ml
	PH = 7,3

### • Milieu Sporulation agar

Extrait de levure	1 g
Extrait de viande	1 g
Tryptose	2 g
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	Traces
Glucose	10 g
Agar	15 g
Eau distillée	qsp 1000 ml
	pH = 7,2

### • Milieu Glucose-Asparagine

Glucose	10 g
L-asparagine	0,5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5 g
Agar	15 g
Eau distillée	qsp 1000 ml
	pH = 6,8

### • Milieu 5339 DSMZ :

Caseine peptone	10 g
Extrait de levure	5 g
Agar	13 g
Eau distillée	qsp 1000 ml
	pH = 7,2-7,4

### • Milieu 65 DSMZ :

Glucose	4 g
Extrait de levure	4 g
Extrait de malt	10 g
CaCO <sub>3</sub>	2 g
Agar	12 g
Eau distillée	qsp 1000 ml
	pH = 7,2

• **Milieu ISP<sub>1</sub>**

Tryptone	5g
Extrait de levure	3g
Eau distillée	qsp 1000 ml
pH = 7,0 – 7,1	

• **Milieu ISP<sub>2</sub>**

Extrait de levure	4g
Extrait de malt	10g
D-Glucose	4g
Agar	20g
Eau distillée	qsp 1000 ml
pH = 7,3	

• **Milieu ISP<sub>3</sub>**

Solution d'avoine	1000 ml
Solution saline1	1 ml
pH = 7,2	

• **Milieu ISP<sub>4</sub>**

Amidon soluble	10 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g
MgSO <sub>4</sub> ,7H <sub>2</sub> O	1 g
NaCl	1 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1 g
CaCO <sub>3</sub>	2 g
Solution saline1	1 ml
Eau distillée	qsp 1000 ml
pH = 7,0 – 7,4	

• **Milieu ISP<sub>5</sub>**

Glycérol	10 g
L-asparagine	1 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g
Solution saline1	1 ml
Agar	20 g
Eau distillée	qsp 1000 ml
pH = 7,0 – 7,4	

**• Milieu ISP<sub>7</sub>**

Glycérol	15 g
L-asparagine	1 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5 g
NaCl	0,5 g
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,01 g
Agar	20 g
Eau distillée	qsp 1000 ml
	pH = 7,2-7,4

**Solution d'avoine :**

Grains d'avoine pilés	20 g
Eau distillée	qsp 1000 ml

Faire bouillir pendant 20 min. Filtrer sur gaze et réajuster le volume à 1000 ml avec de l'eau distillée.

**Solution saline 1 :**

FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,1 g
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,1 g
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,1 g
Eau distillée qsp	100 ml

**Solution saline 2 :**

CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,64 g
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,11 g
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,79 g
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,15 g
Eau distillée	100 ml

**N.B :** L'ajustement des pH des milieux de cultures est effectué à l'aide d'une solution de NaOH 1N ou une solution d'HCl 1N selon le cas.

Nom : <b>OULMI</b> épouse <b>KITOUNI</b> Prénom : <b>Lamia</b>	Date de soutenance 22/09/2014
<b>Diplôme : Doctorat en Sciences</b> <b>Option : Biochimie et Microbiologie appliquées</b>	
Intitulé : <b>ÉTUDE DES INFECTIONS CAUSÉES PAR LES ACTINOMYCÈTES          AÉROBIE AUTRES QUE LES MYCOBACTÉRIES DANS LA REGION DE          CONSTANTINE</b>	
<p><b>Résumé</b></p> <p>Les actinomycètes sont des bactéries, à coloration de Gram positive, ubiquitaires. Elles vivent à l'état de saprophyte dans le sol. Bien qu'elles sont rarement rencontrées dans la pratique clinique, elles ont un potentiel important et causent de graves infections humaines.</p> <p>Quarante-deux souches d'actinomycètes aérobies (autres que les mycobactéries) ont été isolées à partir 3682 prélèvements cliniques provenant de malades hospitalisés ou suivis au Centre Hospitalo-Universitaire Benbadis de Constantine. La diversité des actinomycètes isolés et l'identification de quelques souches représentatives ont été établies par une approche polyphasique (informations phénotypique, géotypique et phylogénétique).</p> <p>L'analyse phylogénétique des isolats a permis de les classer dans le phylum des <i>Actinobacteria</i>, familles des <i>Nocardiopsaceae</i>, des <i>Pseudonocardiaceae</i>, des <i>Micromonosporaceae</i> des <i>Tsukamurellaceae</i> et des <i>Thermomonosporaceae</i>. Elles sont affiliées à sept genres différents, <i>Nocardiopsis</i> (53,33%), <i>Pseudonocardia</i> (13,33%), <i>Murinocardiopsis</i> (6,66%), <i>Tsukamurella</i> (6,66%), <i>Actinomadura</i> (6,66%), <i>Micromonospora</i> (6,66) et <i>Saccharopolyspora</i> (6,66%).</p> <p>L'approche en analyse protéomique de la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF a été validée et optimisée pour l'identification et la classification des bactéries du genre <i>Tsukamurella</i>. Grâce à la méthode de typage par <i>MLST</i> et l'amplification de quatre gènes de ménages (<i>lepA</i>, <i>rpoA</i>, <i>rpoB</i> et <i>ftsZ</i>) ainsi que la technique de la spectrométrie de masse nous avons pu conclure que l'isolat 1534 est probablement une nouvelle espèce du genre <i>Tsukamurella</i>. Par ailleurs, le séquençage du génome complet de cet isolat 1534 a été réalisé par deux techniques de séquençage, la méthode <i>shotgun</i> et la <i>3-kb paired-end</i></p>	
<p><b>Mots clés</b> : diagnostic bactériologique, actinomycètes aérobies pathogènes, <i>Nocardiopsaceae</i>, <i>Pseudonocardiaceae</i>, <i>Micromonosporaceae</i>, <i>Tsukamurellaceae</i>, <i>Thermomonosporaceae</i>, , pyroséquençages, MALDI-TOF.</p>	