



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département : Microbiologie

قسم : الميكروبيولوجيا

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Microbiologie Générale et Biologie Moléculaire des

Microorganismes

Intitulé :

Étude morphologique et phylogénétique d'une souche actinomycétale

Présenté et soutenu par : **Tamine Imene**
Kikaia Amira

Le : 01 /07/2015

Jury d'évaluation :

Président du jury : BOUZERAIEB Latifa (Maître assistante A - UFM Constantine).

Rapporteur : OULMI Lamia (Maître de Conférence B - UFM Constantine).

Examineur : HECINI Abla (Maître de Conférence B – Univ Constantine 3).

Année universitaire
2014 - 2015

Table des matières

Remerciements	
Dédicaces	
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Résumé	

Introduction.....	1
-------------------	---

Étude bibliographique

1/ Généralité sur les actinomycètes.....	3
2/ Le genre <i>Nocardiopsis</i>	4
2-1 Définition du genre.....	4
2-2 Morphologie cellulaire	4
2-3 Caractères culturels.....	5
2-4 Conditions de croissance.....	5
2-5 Caractères biochimiques.....	6
2-6 Pathogénicité.....	7
2-7 Ecologie.....	7
2-8 Sensibilité aux antibiotiques.....	8
3/ La Taxonomie phylogénétique	8

Matériel et Méthodes

1/ Le matériel biologique.....	11
1-1 Mise en culture de la souche N18.....	11
2/ L'étude morphologique de la souche N18.....	11
2-1 L'étude de la macromorphologie de la souche N18.....	11
2-2 L'étude de la micromorphologie de la souche N18.....	11
3/ Étude phylogénétique de la souche actinomycétale.....	12
3-1 Résultats de séquençage.....	13
3-2 Correction et assemblage des chromatogrammes.....	13
3-3 Comparaison avec les banques de séquences.....	13
3-4 Alignement multiple des séquences.....	14
3-5 Construction des arbres phylogénétiques.....	14
3.5.1 La méthode UPGMA (Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Mean).....	14
3.5.2 La méthode du "Neighbor-Joining" (NJ).....	14
3.5.3 La méthode du maximum de parcimonie.....	15

Résultats et discussion

1/ Étude morphologique de la souche N18.....	17
1-1 Étude macromorphologique de la souche N18.....	17
1-2 Étude micromorphologique de la souche N18.....	17

2/ Étude phylogénétique de la souche actinomycétale.....	19
2-1 Correction et assemblage des chromatogrammes.....	19
2-2 Comparaison avec les banques de séquences.....	20
2-3 L'arbre phylogénétique.....	21
Conclusion et perspectives.....	27
Références bibliographiques.....	29
Annexes	

Remerciements

Ce travail a été réalisé au laboratoire de biologie moléculaire du département de microbiologie de la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université des Frères Mentouri Constantine.

Nous tenons à remercier notre chère encadreuse Mme Kitouni Oulmi Lamia, pour avoir accepté la responsabilité de ce travail malgré ses nombreuses obligations, pour ses précieux conseils, sa confiance et son aide durant toute la période du travail.

Nous remercions très vivement, Mme Bouzeraieb Latifa. (Maître assistante A - UFM Constantine) qui nous a fait l'honneur de présider notre jury.

Nos remerciements s'adressent également à Mme Hecini Abla (Maître de Conférence B – Université Constantine 3) d'avoir accepté d'examiner ce modeste travail.

Un remerciement spécial à Mr Kitouni Mahmoud qui nous a porté son aide pour finaliser ce travail.

Un grand remerciement pour tous nos enseignants pour leurs contributions dans notre cursus universitaire, dans le département de Microbiologie, Université des Frères Mentouri Constantine.

DEDICACES

En termes d'amour et de fidélité, je dédie ce mémoire,

A ma très chère mère

Tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et prier pour moi.

Ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études. Que Dieu te préserve et te garde pour moi.

A mon très cher papa

Aucune dédicace ne saurait exprimer réellement mon profond amour, mon respect et l'estime que j'ai pour vous. Que Dieu vous protège.

A mon très cher frère Ramzi, son épouse Yasmine et sa petite fille Douaa.

A ma très chère sœur Rofia, son mari Cherif et sa fille Assil.

A mon très cher frère Nassim.

A tous mes oncles, tantes, cousins et cousines surtout : Sonia et Nadia et à ma grand-mère .

A tous mes amies intimes : Amina , Rihana , Sara, Houda , Abir et Lydia et surtout a ma chère sœur Oumaima. A mon binôme Amira.

A ma promotion 2015 MGBMM et a tous ceux qui m'aiment et me connaissent.

Imene

DEDICACES

J'adresse en premier lieu au Dieu tout puissant et miséricordieux qui m'éclaire le bon chemin et tout ce qui me semble sombre et flou et qui m'a donné la force et la patience d'accomplir ce modeste travail.

Je dédie ce travail :

*A celle qui m'a toujours comblé par son amour et ces sacrifices, qui m'a consenti et m'a soutenue aux moments les plu difficiles de ma vie, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie à ma chère « **Maman** » que je porte dans la prunelle de mes yeux et je chérisse du plus profond de mon cœur.*

*A celui qui été là toujours prés de moi pour me soutenir et m'offrir tous les moyens pour accomplir tous mes souhaits et atteindre tous mes rêves à mon cher « **Papa** » que je porte son respect dans le fond de mon cœur.*

A mon très cher époux qui m'a encouragé, 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 ma très chère sœur Djihene et ses trois petites magnifiques fleurs.

A mes frères Ryad, Borhene et sa femme Ryme.

A toute ma famille et surtout ma très chère tante Hadda.

A mes beaux parents, mes belles sœurs et mon beau frère.

A toutes mes amies : Hiba, Sara, Fella et Imene.

AMIRA

Liste des abréviations

A	Adénine
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARNr	Acide Ribonucléique Ribosomique
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
C	Cytosine
G	Guanine
ISP	International Streptomyces Project
Méso-DAP	Meso-diaminopimelic acid
NCBI	National Center For Biotechnology Information
PCR	Polymerase Chain Reaction
RDP	Ribosomal Database Project
T	Thymine
w/v	Weight / volume

Liste des figures

Figure 1 : Principes du séquençage selon la méthode de Sanger.....	13
Figure 2 : Photographies des cultures de la souche N18 sur le milieu ISP2.....	18
Figure 3 : Examen en microscopie optique Gx100 de la souche N18 après coloration de Gram.....	18
Figure4 : Capture d'écran d'un chromatogramme brut de l'amorce 800f.....	19
Figure 5 : Capture d'écran de la vérification de la concordance du contig.....	19
Figure 6 : Capture d'écran du fichier bloc note regroupant la séquence consensus d'ADNr 16S de la souche N18 et les séquences des 30 espèces type du genre <i>Nocardiopsis</i>	22
Figure 7 : Arbre selon la méthode des distances (Neighbor-joining) montrant la position phylogénétique de la souche N18 parmi les 30 espèces type représentatives du genre <i>Nocardiopsis</i>	23
Figure 8 : Arbre selon la méthode du Minimum Evolution montrant la position phylogénétique de la souche N18 parmi les 30 espèces type représentatives du genre <i>Nocardiopsis</i>	24
Figure9 : Arbre selon la méthode du Maximum Likelihood montrant la position phylogénétique de la souche N18 parmi les 30 espèces type représentatives du genre <i>Nocardiopsis</i>	25

Liste des tableaux

Tableau 1 : Différents caractéristiques biochimiques du genre <i>Nocardiopsis</i>	6
Tableau 2 : Les caractères cultureux de la souche N18 sur le milieu ISP2 après 7, 15 et 21 jours d'incubation.....	17
Tableau 3 : Les pourcentages de similarité entre la séquence de l'ADNr 16S de la souche N18 et les séquences des 30 espèces type du genre <i>Nocardiopsis</i>	21
Tableau 4 : La comparaison des caractères morphologiques de la souche N18 et l'espèce <i>Nocardiopsis alba</i>	26

Résumé

Les actinomycètes sont des bactéries à coloration de Gram positive. Ubiquitaires, elles vivent à l'état de saprophyte dans le sol.

L'étude est réalisée sur une souche actinomycétale référencée N18 récupérée de la collection du laboratoire de Biologie Appliquée et Santé.

L'identification de la bactérie N18 a été établie par une approche polyphasique (informations phénotypique, génotypique et phylogénétique).

L'examen morphologique a permis d'apprécier le bon développement mycélien des colonies sur le milieu gélosé ISP2 et de déterminer, grâce à la technique des lamelles, la structure microscopique particulière de la bactérie actinomycétale. En effet, la souche N18 présente de longs filaments à coloration de Gram positive, ramifiés, plus ou moins enchevêtrés et qui se fragmentent en éléments bacillaire de longueurs variables.

L'étude phylogénétique, basée sur l'analyse bioinformatique des séquences du gène codant pour la sous unité 16S de l'ARNr, a permis de classer la souche N18 dans le phylum des Actinobacteria, à la famille des *Nocardiopsaceae* et de l'affilier au genre *Nocardiopsis* et plus exactement à l'espèce *Nocardiopsis alba*.

Mots clés : Actinomycètes , *Nocardiopsis*, Phylogénie, ARNr 16S.

Abstract

Actinomycetes are Gram positive stain. Ubiquitous, they live saprophyte in the soil.

The study is performed on a strain actinomycetale referenced N18 from the collection of Applied Biology and Health laboratory.

The identification of the strain N18 was established by a polyphasic approach (phenotypic, genotypic and phylogenetic stadys).

Morphological examination was used to assess the proper mycelial development of colonies on the agar medium ISP2 and determine, through the technique of the lamellae, the particular microscopic structure of the actinomycetale bacteria. In fact, the N18 strain has long filaments in positive Gram stain, branched, more or less intertwined and fragmented into bacillary elements of varying lengths.

The phylogenetic study, based on bioinformatics analysis of gene sequences encoding the 16S unit of rRNA, allowed to classify the N18 strain in the phylum Actinobacteria, to the family of *Nocardiopsaceae* and affiliated to *Nocardiopsis* genus and more specifically to the specie *Nocardiopsis alba*.

Keywords: Actinomycetes, *Nocardiopsis*, phylogeny, 16S rRNA.

الملخص

الأكتينومييسات بكتيرية موجبة الغرام تتواجد في كل الاوساط الطبيعية حيث أنها تكون بنسبة عالية في التربة. الدراسة تم إجرائها على سلالة أكتينومييساتية تحت رقم N18 تم جلبها من مخبر البيولوجية التطبيقية و الصحة. التعرف على البكتيريا N18 أنشئ بعد دراسات مظهرية, وراثية, و فيلوجينية. الدراسة المورفولوجية سمحت باظهار النمو الخيطي للمستعمرات فوق الوسط الغذائي ISP2, و سمحت بتحديد البنية المجهرية الخاصة للبيكتيريا الأكتينومييساتية وذلك بفضل تقنية الشريحة. السلالة N18 أعطت خيوط طويلة موجبة الغرام, متفرعة و متشابكة و التي تنقسم إلى عناصر عصوية ذات أطوال مختلفة. الدراسة الفيلوجينية المعتمدة على التحليل المعلوماتي لوحداث الحين المشفر للتحمت وحدة S16 للحمض الريبوزومي, سمحت بتصنيف السلالة N18 في شعبة Actinobacteria, في عائلة *Nocardiopsaceae* و انتسابها إلى الجنس *Nocardiopsis* و بالتحديد الى النوع *Nocardiopsis alba*.

الكلمات المفتاحية :

الأكتينومييسات, *Nocardiopsis*, الفيلوجيني, الحمض الريبوزومي S16.

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.

Les actinomycètes sont des bactéries à croissance lente et très difficiles à étudier. Leur identification morphologique nécessite une combinaison de techniques bactériologique et mycologique. Généralement, les méthodes d'identification accessibles à un très grand nombre de laboratoires sont des méthodes dites conventionnelles et reposent essentiellement sur des études phénotypiques et/ou biochimiques des actinomycètes. Le pouvoir discriminant de ces méthodes reste limité et présente un délai d'identification relativement long. En plus elles ne permettent que très rarement une détermination plus fine que celle du genre et de l'espèce.

L'identification s'avère cependant particulièrement difficile, elle repose sur des bases chimiotaxonomiques et biochimiques de haute technicité réservées aux laboratoires de référence tels que : la composition de la paroi cellulaire en glucides, en acide aminés, en lipides.

Au cours des dix dernières années, d'autres méthodes de caractérisation et d'identification bactérienne ont été développées, il s'agit de méthodes génotypiques qui utilisent des techniques de biologie moléculaire. Leur pouvoir de discrimination est généralement élevé par rapport aux techniques phénotypiques. Ce type d'identification est largement utilisé par de nombreux organismes et laboratoires à travers le monde à cause de leur fiabilité.

L'objectif principal de notre travail consiste en l'identification d'une souche actinomycétale par des techniques macro et micromorphologique couplée à une analyse bioinformatique de la séquence du gène ADNr 16S suivie d'une analyse phylogénétique.

Notre travail est structuré en 3 parties.

Une première partie représente la recherche bibliographique, qui aborde une généralité sur les actinomycètes et leurs différentes propriétés, ensuite une description du genre *Nocardioopsis* et à la fin des notions sur la phylogénie.

Une deuxième partie pratique expose l'étude morphologique (macroscopique et microscopique) de la souche actinomycétale, suivie d'une étude phylogénétique basée sur l'analyse bioinformatique des séquences d'ADNr 16S.

Une troisième partie qui retrace et discute les résultats obtenus au cours de cette étude, et qui se termine par une conclusion et perspectives.

1/ Généralités sur les Actinomycètes

Les actinomycètes sont des bactéries à coloration de Gram positive (Sanglier et Trujillo, 1997), riche en GC, leur coefficient de Chargaff (G+C %) est supérieur à 55 %, généralement compris entre 60 et 75 % (Chun *et al.*, 1997). Elles sont capables de former des filaments ou hyphes ramifiés habituellement non fragmentés et des spores asexuées.

Leur croissance 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). Cela explique leur dénomination étymologique «Actinomycètes» qui provient de deux substantifs grecs «*Aktis*» qui veut dire rayon et «*mykes*» qui veut dire champignon, donc « champignons à rayons » ou « champignons rayonnant » (Gottlieb, 1973).

Les actinomycètes forment un réseau ramifié d'hyphes qui se développent à la fois à la surface du substrat et à l'intérieur de ce dernier pour former un mycélium végétatif. De nombreuses actinomycètes ont également un mycélium aérien qui se dresse au-dessus du substrat et qui forme à l'extrémité des filaments, des spores asexuées à paroi fine (Prescott *et al.*, 2003).

Les bactériologistes considèrent les actinomycètes comme des bactéries tandis que les mycologistes les considèrent comme des champignons (Gottlieb, 1973).

Ce problème est résolu et ce groupe de microorganismes est définitivement classé parmi les bactéries (Becker *et al.*, 1965 ; Lechevalier et Lechevalier, 1981). Toutefois, leurs propriétés chimiques, physiologiques, immunologiques les rangent sans ambiguïté parmi les procaryotes. Ainsi, leur paroi cellulaire ne renferme ni chitine ni cellulose mais du peptidoglycane, et leur cytologie est celle des bactéries. Leur analyse génomique a par la suite confirmé cette classification (Stackebrandt, 1997). Ainsi, les similarités morphologiques des actinomycètes et des champignons apparaissent plutôt liées au fait que ces microorganismes colonisent des écosystèmes voisins (en particulier le sol), et ont donc développé au cours de l'évolution des modes de reproduction, de dissémination et de croissance voisins.

Les actinomycètes sont répandus dans l'environnement. La plupart des espèces

sont chimioorganotrophes, aérobies, mésophiles et croissent de façon optimale dans la gamme de pH entre 5,0 et 9,0 avec une croissance optimale à la neutralité (Williams et Wellington, 1982 ; Goodfellow et Williams, 1983).

2/ Le genre *Nocardiopsis*

2-1 Définition du genre

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

Ce genre a été proposé en 1976 par Mayer sur la base des caractéristiques chimiotaxonomiques et morphologiques.

Le genre *Nocardiopsis* est le genre type de la famille *Nocardiopsaceae*, qui comprend également trois autres genres : *Haloactinospora* (Tang *et al.*, 2008), *Streptomonospora* (Cui *et al.*, 2001) et *Thermobifida* (Zhang *et al.*, 1998).

Cette famille appartient au sous ordre Streptosporangineae, de l'ordre Actinomycetales, de la sous classe Actinobacteridae, de la classe Actinobacteria et du phylum Actinobacteria (Goodfellow et Trujillo, 2012).

Actuellement, le genre *Nocardiopsis* contient 30 espèces différentes reconnues, dont *Nocardiopsis dassonvillei* proposée par Brocq-Rousseu (1904) comme espèce type du genre (Hozzein et Trujillo 2012).

2-2 Morphologie cellulaire

Les bactéries du genre *Nocardiopsis* sont des bactéries filamenteuses. Sur un milieu gélosé, elles ont l'aptitude de former un mycélium primaire appelé mycélium végétatif bien développé et largement ramifié, qui se fragmente facilement en bâtonnets ou en éléments coccoïdes dont chacun devient un centre de croissance et donne naissance à de nouveaux fragments. Les bactéries de ce genre produisent également un mycélium aérien composé de filaments longs, moyennement ramifiés et dressés sur le mycélium du substrat et qui donne à la colonie un aspect poudreux, velouté, compact ou en chou-fleur (Hozzein et Trujillo, 2012).

Le mycélium aérien est généralement plus épais et moins ramifié que le mycélium du substrat, il est souvent pigmenté et enfermé dans une enveloppe externe hydrophobe (Prescott *et al.*, 2003). Chez quelques souches de *Nocardiosis* le mycélium aérien peut ne pas être visible à l'œil nu, et nécessite une observation attentive sous le microscope.

Le mycélium du substrat est aérobic facultatif. Par contre, le mycélium aérien est aérobic strict (Silvey et Roach, 1975).

L'initiation de la sporulation est fréquemment caractérisée par la formation d'hyphe torsadés dont l'observation à fort grossissement révèle un arrangement en zigzag des spores en développement. Les spores ont une surface lisse, de formes allongées et enfermées dans une enveloppe fibrillaire. Elles peuvent se diviser par la suite en petits éléments de taille irrégulière par formation de paroi transversale (Williams *et al.*, 1974).

2-3 Caractères culturaux

Les membres du genre *Nocardiosis* ont tendance à se développer abondamment sur des milieux de cultures complexes comme le milieu Czapeck dox Agar, le milieu nutritif Agar (Waksman, 1961b), le milieu glucose-extrait de levure-Extrait de Malt-agar (Athalye *et al.*, 1981), le milieu Bennett et les milieux gélosés de l'*International Streptomyces Project (ISP)* (Shirling and Gottlieb, 1966).

2-4 Conditions de croissance

La plus part des espèces du genre *Nocardiosis* se développent à une température variant entre 10°C et 40°C avec une température optimale de croissance entre 28°C et 30°C. De nombreuses espèces sont considérées comme thermotolérantes à cause de leurs capacité de croitre à des température variant entre 45°C et 50°C comme : *Nocardiosis baichengensis*, *Nocardiosis chromatogenes* et *Nocardiosis composta* (Chun *et al.*, 2000 ; Kämpfer *et al.*, 2002 ; Li *et al.*, 2006). Ces trois mêmes espèces sont aussi capables de tolérer des concentrations en NaCl jusqu'à 20% (p/v), elles sont halotolérantes.

D'autres sont halophiles dont la croissance est conditionnée par la présence d'NaCl en concentration plus au moins importante et une concentration optimale de 10% à 15% (p/v) comme : *Nocardiosis halophila*, *Nocardiosis kunsanensis*, et

Nocardiosis Salina (Al-Tai and Ruan, 1994 ; Chun *et al.*, 2000 ; Li *et al.*, 2003a, 2004) .

La majorité des souches du genre *Nocardiosis* sont caractérisées par leur comportement alcaliphile, car elles préfèrent des conditions alcalines douces et certaines peuvent même croître à un pH égal à 13 (Chen *et al.*, 2009 ; Hozzein *et al.*, 2004 ; Zhang *et al.*, 2008).

2-5 Caractères biochimiques

Les principales caractéristiques biochimiques du genre *Nocardiosis* sont présentées dans le tableau 1.

Tableau 1. Différentes caractéristiques biochimiques du genre *Nocardiosis* (Hozzein and Trujillo, 2012 ; Grund et Kroppenstedt, 1990).

Caractéristiques	<i>Nocardiosis</i>
Type de la paroi cellulaire	III ^a
Acide diaminopimélique	Méso-DAP
Composition en sucre	- ^a
Rhamnose	-
Phospholipides ^c	
Type	III ^d
PC	+
PME	+
PG	+
DPG	+
Lyso-PE	-
Acide mycolique	-
Ménaquinones majeures	MK-10 (H ₄ ,H ₆ ,H ₈)
Acide gras	
Type	3d ^b
iso-16:0-2-OH	-
anteiso-17:0	+
18:1-cis9	+
18:0-10Me	+
G+C%	64-76
Croissance en présence du NaCl%	0-20
Sensibilité au lysozyme	Sensible

^aselon la classification de Lechevalier et Lechevalier (1970).

^bselon la classification de Kroppenstedt (1985).

^cPC ,phosphatidylcholine ; PME, phosphatidylmethylethanolamine ; PG, phosphatidylglycérol ; DPG, diphosphatidylglycérol ; Lyso-PE, lyso-phosphatidylethanolamine.

^dselon la classification de Lechevalier *et al.* (1977).

(+) : Présence , (-) : Absence.

2-6 Pathogénicité

Comme la plupart des actinomycètes pathogènes, les espèces du genre *Nocardioopsis* sont des agents 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 humaines.

L'espèce *Nocardioopsis dassonvillei* est impliquée dans les infections de la peau (Philip et Roberts, 1984 ; Singh *et al.*, 1991) et les infections broncho-pulmonaires (Bernatchez et Lebreux, 1991 ; Gugnani *et al.*, 1998 ; Mordarska *et al.*, 1998) ainsi que dans les maladies respiratoires et les conjonctivites. Cette espèce a été également récupérée à partir d'échantillons de sang (Beau *et al.*, 1999).

Le premier cas de mycétome causé par *Nocardioopsis dassonvillei* a été publié par SindhuPhak *et al.*, (1985), qui ont pu isoler à plusieurs reprises des souches de *N.dassonvillei* à partir des nodules au niveau d'une jambe d'un homme âgé de 39 ans. Après 2 ans Ajello *et al.*, (1987) confirment la présence de *Nocardioopsis dassonvillei* dans des cas d'actinomycétomes cité dans Hozzein et Trujillo., (2012).

2-7 Ecologie

L'habitat naturel des souches du genre *Nocardioopsis* est le sol (Wang *et al.*, 1999 ; Xu *et al.*, 1998). En 2005, Zitouni *et al.*, ont isolé 86 souches à partir des échantillons de sol collectés du Sahara algérien dont 54 isolats appartenant au genre *Nocardioopsis*. D'autres nouvelles espèces *Nocardioopsis* ont été isolées à partir du sol égyptien par Hozzein et ses collègues (Hozzein and Goodfellow, 2008 ; Hozzein *et al.*, 2004).

Les bactéries du genre *Nocardioopsis* ont été aussi isolées à partir d'autres sources y compris : les déchets de coton et de foin (Lacey, 1977), les sédiments profonds (Zhang and Zeng, 2008), le glacier de l'Antarctique (Abyzov *et al.*, 1983), les ovaires de poisson-globe (Wu *et al.*, 2005), les environnements intérieurs (Peltola *et al.*, 2001), et les installations de compostage (Kämpfer *et al.*, 2002).

L'abondance du genre *Nocardioopsis* dans les habitats marins est également découverte (Sabry *et al.*, 2004 ; Schumacher *et al.*, 2001 ; Shin *et al.*, 2003).

2-8 Sensibilité aux antibiotiques

Très peu d'études ont été réalisées sur la sensibilité aux antibiotiques des souches *Nocardiopsis*. Yassin *et al.*, (1993) révèlent que la souche *Nocardiopsis lucentensis* est résistante à la lincomycine (128 µg/ml), la pénicilline G (128 µg/ml), la gentamicine (64 µg/ml), la streptomycine (64 µg/ml) et la néomycine (4 µg/ml), mais elle est sensible à la rifampicine (128 µg/ml).

En 1994, Al-Tai and Ruan ont rapportent que l'espèce *Nocardiopsis halophila* est sensible à l'érythromycine, à la novobiocine et chloramphénicol. Par contre, elle est résistante à l'amoxicilline, la lacéphalexine et à l'oxacilline.

3/ Taxonomie phylogénétique

La phylogénie est une nouvelle approche de classification bactérienne, qui désigne le développement évolutif d'une espèce. L'avènement de phylogénie moléculaire est à l'origine d'une avancée scientifique majeure datant de la fin des années 1970.

L'introduction de la phylogénie basée sur l'analyse de séquences d'acides nucléiques en systématique microbienne a permis une classification des microorganismes en terme d'évolution et une clarification des lignées phylogénétiques entre elles et des niveaux taxonomiques c'est-à-dire espèces, genres, familles etc. (Pace, 1997).

L'analyse phylogénétique consiste à évaluer les divergences entre plusieurs séquences : plus le nombre des substitutions entre deux séquences est élevé, plus la probabilité que ces deux séquences aient un ancêtre commun est faible. L'arbre phylogénétique est une représentation des résultats obtenus.

Cette approche taxonomique a permis une grande avancée dans la classification des actinomycètes.

L'outil informatique dans la taxonomie bactérienne

Les ARN ribosomiques sont considérés depuis longtemps comme des chronomètres moléculaire, qui jouent un rôle majeur dans l'étude de la phylogénie et de la taxonomie bactérienne.

Un certain nombre de critères définissent le parfait chronomètre moléculaire. En premier lieu, un chronomètre moléculaire doit être distribué universellement dans le

groupe d'organismes choisi pour l'étude, ceci pour faciliter la comparaison entre les organismes. Ensuite, la molécule choisie doit être fonctionnellement homologue chez chaque organisme ; des molécules aux fonctions distinctes n'auraient pas des séquences comparables. En troisième lieu, il est crucial que les molécules aient dans leurs séquences des régions conservées afin d'en permettre l'alignement pour l'analyse. Finalement, la séquence de la molécule choisie doit refléter l'ensemble des changements évolutifs de l'organisme (Madigan et Martinko, 2007).

Le gène codant l'ARN ribosomal 16S a d'abord été utilisé à la fin des années 1980 par Carl Woese comme outil d'étude de l'évolution bactérienne (Woese, 1987).

L'ARN ribosomal (ARNr) 16S est le constituant ARN de la petite sous-unité ribosomale du 30S des procaryotes. Le gène codant l'ARN ribosomal 16S est présent dans l'ensemble des espèces bactériennes en un nombre variable de copies (Petti, 2007 ; Woese, 1987), il est composé d'environ 1500 nucléotides et constitué de sept régions hautement conservées tout en contenant de courtes séquences signature spécifiques de genre et parfois d'espèces et de neuf régions hypervariables (Chakravorty *et al.*, 2007). Ces caractéristiques particulières font de ce gène une cible intéressante.

La puissance de l'ARNr 16S comme un outil phylogénétique et taxonomique repose sur leur caractères spécifiques tel que : la présence universelle chez tout le monde vivant, le rôle clé dans la traduction d'ARNm en protéines et sa structure mosaïque qui contient des séquences conservées et d'autres variables. Leur structure évolue très lentement au cours du temps, vraisemblablement en raison de leur rôle critique et constant dans la physiologie bactérienne.

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% à 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.

Il existe une énorme base de données de séquences d'ARNr, le projet RDP (**Ribosomal Database Project**) qui contient une collection de plus de cent mille séquences. Cette base de données est disponible sur internet <http://rdp.cme.msu.edu/html>. Outre les séquences du gène ARNr 16S elle contient des

informations phylogénétiques, des séquences nouvellement établies et de nombreuses autres données (Madigan et Martinko, 2007). Il suffit, dès lors, pour une souche bactérienne d'établir la séquence de son gène codant pour l'ARN 16S et de le confronter à la banque de données pour situer sa position taxonomique.

1°/ Le matériel biologique

L'étude est réalisée sur une souche actinomycétale référencée N18. La souche est récupérée de la collection du laboratoire de biologie appliquée et santé auprès de Mme KITOUNI-OULMI L.

1-1 Mise en culture de la souche N18

La revivification de la souche N18 a été effectuée sur le milieu gélosé extrait de levure-extrait de malt-agar (**ISP2**) [Difco™ ISP Medium Réf 277010 Becton, Dickinson and Company] (annexe 1).

L'ensemencement de la souche N18 a été réalisé en surface par la technique des stries et les cultures sont incubées à 30°C jusqu'à l'apparition d'une bonne biomasse.

2°/ L'étude morphologique de la souche N18

2-1 Étude de la macromorphologie de la souche N18

Les caractères macromorphologiques et culturels sont déterminés sur le milieu spécifique gélosé ISP2 (annexe 1) (Shirling et Gottlieb, 1966), le milieu est coulé 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. Il est ensuiteensemencé 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 mycéliums sur ce 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 est réalisée en même temps.

2-2 Étude de la micromorphologie de la souche N18

L'observation *in situ* de la morphologie des 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 le milieu gélosé ISP2, de manière à former un angle d'environ 45 degrés. À l'aide d'un ensemencement une faible quantité de la culture a été prélevée aseptiquement et déposée contre la lamelle en contact avec le milieu nutritif.

Après 7 jours d'incubation à 30° C, la lamelle est retirée délicatement de la gélose, et subit une coloration de Gram. Elle est ensuite déposée sur une lame avec une goutte de lactophénol puis examinée au microscope (Gx100).

3°/ Étude phylogénétique de la souche actinomycétale

L'extraction de l'ADN génomique de la souche N18 a été réalisée par Madame Kitouni-Oulmi L., à l'aide de l'automate EZ1 BioRobot de QIAGEN selon le protocole d'extraction avec EZ1 Advanced XL Sample & Assay Technologies. Pour se faire, une suspension cellulaire est préparée dans 100 µl d'eau à qualité biologie moléculaire BioRad, à laquelle sont ajoutés 100 µl de tampon de protéinase K et 20 µl de protéinase K.

L'amplification génique (PCR) de l'ADNr 16S a été effectuée à l'aide du couple d'amorce **fd1** et **rp2** (annexe 2). L'amplification est réalisée dans un thermocycleur (Applied biosystems, 2720 thermal cycler).

Le séquençage du produit de PCR a été effectué en utilisant les amorces 536f, 536r, 800f, 800r, 1050f et 1050r (annexe 2). Il a été réalisé selon la méthode décrite par Sanger *et al.* (1977) adaptée par le kit de séquençage « BigDye Terminator » (AppliedBiosystem).

La technique de Sanger modifiée est fondée sur le principe de la synthèse enzymatique de l'ADN à séquencer en présence de désoxyribonucléotides triphosphate (dNTP) et d'inhibiteurs d'élongation de l'ADN polymérase : les di-désoxyribonucléotides (ddNTP) (qui ont un atome d'hydrogène à la place du groupement OH sur le carbone 3' du ribose).

La réaction de séquençage se faisant dans quatre tubes différents en présence de 4 types de ddNTP (ddATP, ddGTP, ddCTP et ddTTP) marqués à l'aide de fluorophores différents pour chaque ddNTP. Lorsqu'un ddNTP est incorporé dans le brin d'ADN au cours de synthèse au lieu d'un dNTP, l'ADN polymérase ne peut plus continuer sa polymérisation, donc l'élongation du brin d'ADN s'arrête dans l'endroit où le ddNTP a été incorporé. L'émission de fluorescence est mesurée à quatre longueurs d'ondes correspondant aux quatre fluorophores. À la fin de la réaction, on obtient des

fragments de taille différente repérés individuellement dans le mélange (Lamoril *et al.*, 2008).

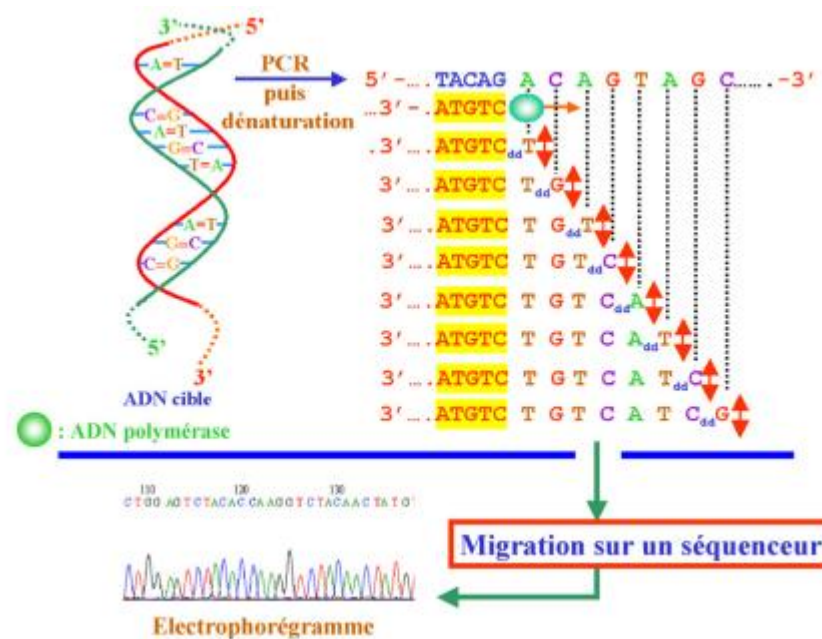


Figure 1 : principes du séquençage selon la méthode de Sanger (Lamoril *et al.*, 2008).

Enfin, c'est le séquenceur automatique (ABI-3130xL Genetic Analyser) qui a permis l'analyse des réactions de séquences.

3-1 Résultats de séquençage

Les résultats du séquençage ont été récupérés sous forme de chromatogrammes auprès de Madame Kitouni-Oulmi L.

3-2 Correction et assemblage des chromatogrammes

Les électrophorégrammes bruts obtenus sous le format Chromas ont été vérifiés un par un et corrigés manuellement par le logiciel chromas Pro 1.5 (Technesium Pty Ltd, Tewantin Australie).

Les couples des séquences sens/anti-sens ont fait l'objet d'un alignement multiple et progressif avec le même logiciel chromas Pro 1.5 pour vérifier la concordance des données et établir une séquence consensus d'ADNr 16S sous le format FASTA.

3-3 Comparaison avec les banques de séquences

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) qui cherche les segments similaires entre une séquence requête (ou séquence «query») et l'ensemble des séquences présentes dans la banque nucléique. Cette comparaison permet d'établir le pourcentage d'identité de la souche N18 avec les espèces les plus proches pour déterminer l'affiliation phylogénétique.

3-4 Alignement multiple des séquences

L'alignement multiple des séquences est une tâche cruciale en biologie moléculaire. Il permet d'analyser des séquences d'ADN ou de protéines et déterminer les régions homologues entre les séquences. L'alignement multiple est utilisé dans la construction des arbres phylogénétiques (Benlahrache, 2007).

Les séquences de l'ADNr 16S des 30 espèces type du genre *Nocardiosis* ont été récupérées de la banque de données **Ribosomal Database Project** (RDP).

L'alignement des séquences est effectué à l'aide du logiciel ClustelX 2.0.12.

3-5 Construction des arbres phylogénétiques

Plusieurs méthodes sont disponibles pour la construction d'arbres phylogénétiques :

3.5.1. La méthode UPGMA (Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Mean)

C'est une méthode simple utilisée pour construire des arbres phylogénétiques lorsque les séquences ne sont pas trop divergentes. Cette méthode repose sur la théorie de l'horloge moléculaire qui suppose que tous les individus issus de parents communs subissent le même taux de mutation au cours de leur évolution (substitutions, délétions et insertions).

3.5.2. La méthode du "Neighbor-Joining" (NJ)

Développée par Saitou et Nei (1987), est la méthode la plus couramment utilisée en microbiologie. C'est une méthode de distance basée sur le nombre moyen de substitutions nucléotidiques entre des séquences prise deux à deux.

Contrairement à la méthode UPGMA, la méthode NJ autorise des taux de mutations différents donc des longueurs de branches inégales car elle ne suppose pas l'existence d'une horloge moléculaire.

La méthode NJ tente de corriger UPGMA puisqu'elle suppose que les caractères des taxons évoluent indépendamment les uns des autres.

Différentes corrections ont été proposées pour tenter de corriger cette méthode comme :

- **La correction de Kimura (Kimura, 1980)**

C'est un modèle de correction à deux paramètres, 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. Le modèle de Kimura fut rapidement adopté à la communauté scientifique.

3-5-3 La méthode du maximum de parcimonie

La méthode de parcimonie est la plus simple sur le plan théorique (Fitch, 1971). Elle permet de réduire au maximum le nombre de substitutions nécessaires pour obtenir la topologie final, c'est-à-dire l'arbre le plus parcimonieux qui présente le moins de mutations possibles. Cette méthode est valable pour les séquences très proche (Belahreche, 2007)

Contrairement aux deux méthodes précédentes, cette méthode permet d'obtenir différentes topologies d'arbres phylogénétiques. Quel que soit la topologie la longueur des branches séparant deux organismes est proportionnelle à leur distance évolutive.

Une autre différence avec les méthodes de distance est que l'on n'utilise pas la totalité des sites dans la séquence mais uniquement les sites dits informatifs (c.à.d. qui vont tendre à favoriser un ou plusieurs arbres par rapport aux autres) (Luchetta, 2005).

Dans notre travail, les arbres phylogénétiques ont été construit avec le programme Mega version 5.05 (Tamura *et al.*, 2011) suivant trois méthodes : la méthode des distances (Neighbor-Joining) (Saitou et Nei, 1987), la méthode du Minimum Evolution et la méthode du Maximum Likelihood, dans le but de confirmer la position taxonomique de la souche N18.

On utilisant comme modèle de correction, le modèle Kimura à deux paramètres (Kimura, 1980) pour la méthode Neighbor-Joining et Maximum likelihood. 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 réplication.

1°/ Étude morphologique de la souche N18

1-1 Étude macromorphologique de la souche N18

Les colonies de la souche N18 apparaissent après cinq jours d'incubation à 30°C. Elles sont rondes bien délimitées surélevées à contour irrégulier, d'une taille de un à quatre millimètre de diamètre et de couleur beige opaque. Les colonies sont très incrustées dans la gélose, sèches, à surface lisse et présentent des sillons radiaires (figure 2). Leur morphologie est typique à celle des bactéries appartenant à la classe des Actinobacteria, et l'ordre des Actinomycétales.

Le mycélium de substrat se développe lentement en surface et pénètre dans la gélose, puis donne naissance à un mycélium aérien.

Après 15 jours d'incubation, les mycélia sont bien développés, d'une couleur beige avec une production d'une masse sporale de couleur blanche.

Après 21 jours, le mycélium primaire et le mycélium aérien sont bien abondant toujours d'une couleur beige recouvert d'une poudre grise dû à la maturation de la masse sporale (tableau 2).

Les colonies ne produisent aucun pigment diffusible.

Tableau 2: Les caractères culturels de la souche N18 sur le milieu ISP2 après 7, 15 et 21 jours d'incubation.

	Mycélium primaire		Mycélium secondaire		Masse sporale	Pigment diffusible
	Croissance	Couleur	Croissance	Couleur		
7 jours	Bonne	Beige	Bonne	Beige	Blanche	Absence
15 jours	Bonne	Beige	Bonne	Beige	Blanche	Absence
21 jours	Abondante	Beige	Abondante	Beige	Grise	Absence

1-2 Étude micromorphologique de la souche N18

Après coloration de Gram, l'examen microscopique à l'objectif d'immersion (G x100) a révélé la présence des filaments à coloration de Gram positive.

Le mycélium de substrat de la souche N18 apparait sous forme d'amas formé de filaments courts, très ramifié, très enchevêtré et fragmentés en éléments bacillaires.

En outre, le mycélium aérien formé de longs filaments diffus, très fins, moyennement ramifiés, fragmentés en bâtonnet et colorés de couleur violette moins accentuée (figure 3).

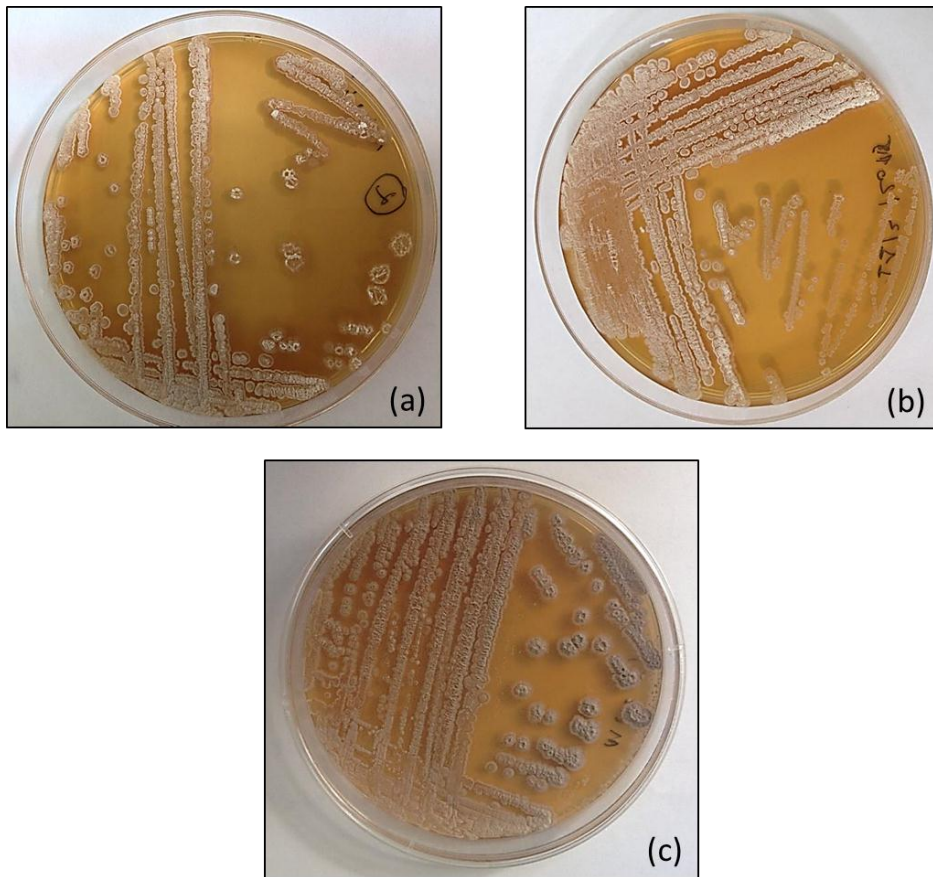


Figure 2 : Photographies des cultures de la souche N18 sur le milieu ISP2 après 7 jours (a) 15 jours (b) et 21 jours (c) d'incubation à 30°

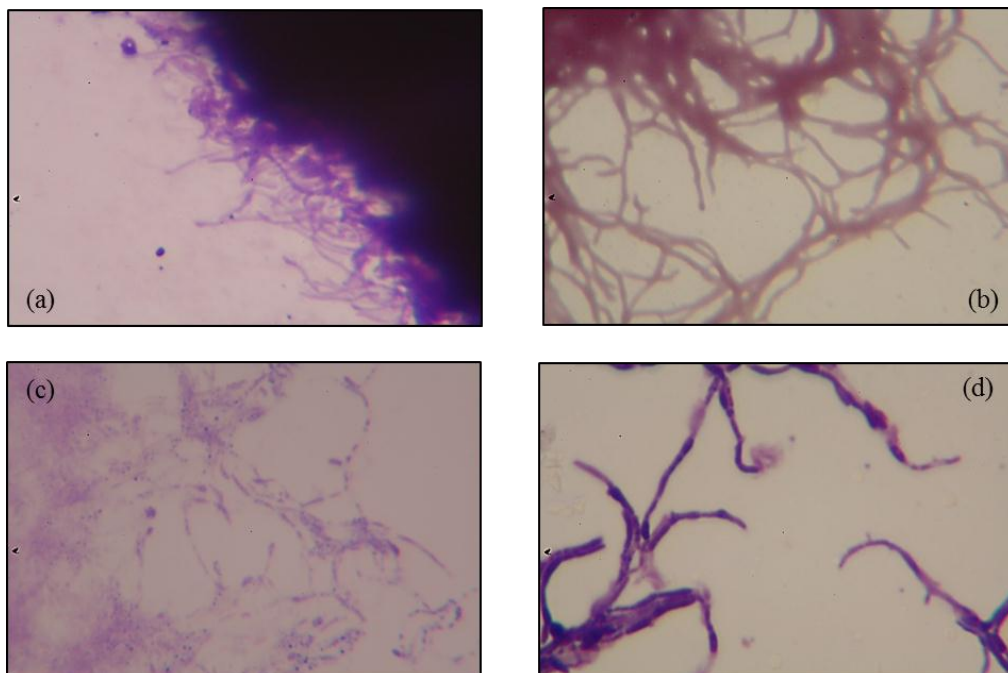


Figure 3 : Examen en microscopie optique Gx100 de la souche N18 après coloration de Gram du mycélium primaire (a, b) et du mycélium secondaire (c,d) par la technique des lamelles (microscope modèle Optech muni d'une caméra Canon).

>souche N18

```
TAGAGTTTGTCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAG
CGGTAAGGCCCTTCGGGGTACACGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGCAACCTG
CCCCTGACTCTGGGATAAGCGGTGGAAACGCCGTCTAATACCGGATACGACCTTCCGCC
TCATGGTGGAGGGTGGAAAGTTTTTTCGGTCAGGGATGGGCTCGCGGCCTATCAGCTTG
TTGGTGGGGTAACGGCCTACCAAGGCGATTACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGG
CCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTGCGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTG
CGCAATGGGCGAAAGCCTGACGCAGCGACGCCGCGTGGGGGATGACGGCCTTCGGGTG
TAAACCTCTTTTACCACCAACGCAGGCTCCGGGTCTCTCGGGTTGACGGTAGGTGGG
GAATAAGGACGGCTACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGTTCGAGCGTTGTC
CGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCGTGTGCGCTCTGCTGTGAAAGACCG
GGGCTTAACTCCGGTTCTGCAGTGGATACGGGCATGCTAGAGGTAGGTAGGGGAGACTG
GAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGC
GGGTCTCTGGGCCTTACCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCATGACGAGCGAACAGGATTAG
ATACCCTGGTAGTCCATGCGAAACGTTGGGCGCTAGGTGTGGGGACTTTCACGGTTTC
CGCGCCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAAC
TCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGTTGCTTAATTCGACGCAA
CGCGAAGAACCTTACCAAGGTTTGACATCACCCGTGGTCCTGTAGAGATACAGGGTCAT
TTAGTTGGGGGGTGACAGGTGGTGCATGGCTGTGCTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGG
GTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTTCCATGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGGA
CTCATGGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCAT
GCCCCTTATGTCTTGGGCTGCAAACATGCTACAATGGCCGGTACAATGGGCGTGCATA
CCGTAAGGTGGAGCGAATCCCTTAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTC
GACCCCATGAAGGTGGAGTCGCTAGTAATCGCGGATCAGCAACGCCGCGGTGAATACGT
TCCCGGGCCTTGTTACACACCGCCCGTCTCGTCTGAAAGTTCGGCACCACCCGAAACTTG
CGGCCTTACCCTTCGGGGAGGGAGTGAGTGAAGGTGGGGCTGGCGATTGGGACGAAGTC
GTAACAAGGTAGCCGTA
```

2-2 Comparaison avec les banques de séquences

La comparaison de la séquence de l'ADNr 16S de la souche N18 avec celles disponibles au niveau de la banque de données NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) (Benson *et al.*, 2013) en utilisant le programme BLAST (Benson *et al.*, 2013) nous a permis de déterminer la position taxonomique exacte de la souche N18.

Les résultats du BLAST confirment l'appartenance de notre bactérie au phylum Actinobacteria, au genre *Nocardiosis*, de la famille *Nocardiosaceae*.

Les similitudes des séquences des ADNr 16S de la souche N18 avec les espèces du genre *Nocardiosis* sont mentionnées dans le tableau 3.

Tableau 3 : Les pourcentages de similarité entre la séquence de l'ADNr 16S de la souche N18 et les séquences des 30 espèces type du genre *Nocardiopsis*.

Nom des espèces	% de similitude	N° d'accèsion
<i>Nocardiopsis alba</i>	99%	NR_026340.1
<i>Nocardiopsis dassonvillei</i>	98%	NR_074635.1
<i>Nocardiopsis aegyptia</i>	98%	NR_025589.1
<i>Nocardiopsis exhalans</i>	98%	NR_112745.1
<i>Nocardiopsis ganjiahuensis</i>	98%	NR_042849.1
<i>Nocardiopsis lucentensis</i>	98%	NR_026342.1
<i>Nocardiopsis metallicus</i>	98%	NR_025517.1
<i>Nocardiopsis prasina</i>	98%	NR_044906.1
<i>Nocardiopsis synnemataformans</i>	98%	NR_029343.1
<i>Nocardiopsis valliformis</i>	98%	NR_042848.1
<i>Nocardiopsis alkaliphila</i>	97%	NR_042798.1
<i>Nocardiopsis halotolerans</i>	97%	NR_025422.1
<i>Nocardiopsis kunsanensis</i>	97%	NR_112747.1
<i>Nocardiopsis listeri</i>	97%	NR_026341.1
<i>Nocardiopsis umidischolae</i>	97%	NR_025653.1
<i>Nocardiopsis tropica</i>	97%	NR_024957.1
<i>Nocardiopsis composta</i>	96%	NR_112748.1
<i>Nocardiopsis litoralis</i>	96%	NR_116374.1
<i>Nocardiopsis quinghaiensis</i>	96%	NR_044303.1
<i>Nocardiopsis salina</i>	96%	NR_025768.1
<i>Nocardiopsis trehalosi</i>	96%	NR_024958.1
<i>Nocardiopsis xinjiangensis</i>	96%	NR_025095.1
<i>Nocardiopsis potens</i>	95%	NR_116914.1
<i>Nocardiopsis rosea</i>	95%	NR_043030.1
<i>Nocardiopsis arabia</i>	95%	NR_044080.1
<i>Nocardiopsis baichengensis</i>	95%	NR_043033.1
<i>Nocardiopsis gilva</i>	95%	NR_043029.1
<i>Nocardiopsis halophila</i>	95%	NR_025519.1
<i>Nocardiopsis chromatogenes</i>	94%	NR_043032.1
<i>Nocardiopsis rhodophaea</i>	93%	NR_043031.1

Il en ressort que la souche N18 partage un pourcentage d'identité égale à 99% seulement avec l'espèce *Nocardiopsis alba*.

2.3 L'arbre phylogénétique

L'analyse informatique des séquences d'ADNr 16S des 30 espèces type du genre *Nocardiopsis* est obtenues à partir de la banque de données **Ribosomal Database**

Project (figure 6) et de celle de la souche N18, nous a permis de construire trois arbres phylogénétiques non enracinés par trois méthodes : Neighbor-Joining (NJ) (Saitou et Nei,1987) , la méthode du Minimum Evolution, la méthode du Maximum Likelihood à l'aide du logiciel Mega (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) version 5 (Tamura *et al.*, 2011).

Figure 6 : Capture d'écran du fichier bloc note regroupant la séquence consensus d'ADNr 16S de la souche N18 et les séquences des 30 espèces type du genre *Nocardioopsis*.

```
>soucheN18|
TAGAGTTTGATCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCTGTCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAAGGCCCTTCGGGGTACACGAGCGGGGAAC
GTGCATGGCTGTCTCAGCTCCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCCATGTTGCCAGCACGTAATGGTG
>N.dassonvillei DSM 40465T
cgctggcggcgctgcttaacacatgcaagtcgagcggtaagggccttcgggggtacacgagcggcgaacgggtgagtaaacacgtgagcaacctgc
tgctcgtgagatggtgggtaagtcggcgaacgagcgaacccttgttccatggtgccagcacgtaaatggtggggactcatgggagactgcccg
>N.prasina DSM 43845T
cgctggcggcgctgcttaacacatgcaagtcgagcggtaagggccttcgggggtacacgagcggcgaacgggtgagtaaacacgtgagcaacctgc
gtgtcgtgagatggtgggtaagtcggcgaacgagcgaacccttgttccatggtgccagcacgtaaatggtggggactcatgggagactgcccg
>N.lucentensis DSM 44048T
cgctggcggcgctgcttaacacatgcaagtcgagcggtaagggccttcgggggtacacgagcggcgaacgggtgagtaaacacgtgagcaacctgc
tgctcgtgagatggtgggtaagtcggcgaacgagcgaacccttgttccatggtgccagcacgtaaatggtggggactcatgggagactgcccg
>N.alba DSM 43377T
cgctggcggcgctgcttaacacatgcaagtcgagcggtaagggccttcgggggtacacgagcggcgaacgggtgagtaaacacgtgagcaacctgc
gtgtcgtgagatggtgggtaagtcggcgaacgagcgaacccttgttccatggtgccagcacgtaaatggtggggactcatgggagactgcccg
>N.listeri DSM 40297T
cgctggcggcgctgcttaacacatgcaagtcgagcggtaagggccttcgggggtacacgagcggcgaacgggtgagtaaacacgtgagcaacctgc
cgtgtcgtgagatggtgggtaagtcggcgaacgagcgaacccttgttccatggtgccagcacgtaaatggtggggactcatgggagactgccc
>N.halophila DSM 44494T
cctggctcaggagcaacgctggcggcgtgcttaacacatgcaagtcgagcggtaagggccttcgggggtacacgagcggcgaacgggtgagtaa
catggctgctgagctcgtgtcgtgagatggtgggtaagtcggcgaacgagcgaacccttgttccatggtgccagcacgtaaatggtgggg
>N.halotolerans DSM 44410
cctggctcaggagcaacgctggcggcgtgcttaacacatgcaagtcgagcggtaagggccttcgggggtacacgagcggcgaacgggtgagtaa
ggctgctgagctcgtgtcgtgagatggtgggtaagtcggcgaacgagcgaacccttgttccatggtgccagcacgtaaatggtggggact
>N.metallicus R2A
caggacgaacgctggcggcgtgcttaacacatgcaagtcgagcggtaagggccttcgggggtacacgagcggcgaacgggtgagtaaacacgtga
cgtcagctcgtgtcgtgagatggtgggtaagtcggcgaacgagcgaacccttgttccatggtgccagcacgtaaatggtggggactcatagg
>N.valliformis HBUM 20028
ggcgtgcttaacacatgcaagtcgagcggtaagggccttcgggggtacacgagcggcgaacgggtgagtaaacacgtgagcaacctgcccctgac
tgagatggtgggtaagtcggcgaacgagcgaacccttgttccatggtgccagcacgtaaatggtggggactcataggagactgcccgggtca
>N.ganjiahuensis AY336513
ggcgtgcttaacacatgcaagtcgagcggtaagggccttcgggggtacacgagcggcgaacgggtgagtaaacacgtgagcaacctgcccctga
tgagatggtgggtaagtcggcgaacgagcgaacccttgttccatggtgccagcacgtaaatggtggggactcataggagactgcccgggtca
>N.aegyptia DSM 44442
cgctggcggcgctgcttaacacatgcaagtcgagcggtaagggccttcgggggtacacgagcggcgaacgggtgagtaaacacgtgagcaacctgc
tgctcgtgagatggtgggtaagtcggcgaacgagcgaacccttattccatggtgccagcacgtaaatggtggggactcatgggagactgcccg
>N.synnemataformans DSM 44143
cgctggcggcgctgcttaacacatgcaagtcgagcggtaagggccttcgggggtacacgagcggcgaacgggtgagtaaacacgtgagcaacctgc
ggcccgcacaagcggcggagcatgttgccttaattcgacgcaacgcgaagaacctaccaggtttgacatcacccctggactcgcagagatgt
>N.kunsanensis AF195412
cgctggcggcgctgcttaacacatgcaagtcgagcggtaagggccttcgggggtacacgagcggcgaacgggtgagtaaacacgtgagcaacctgc
gctgggaatgagcagatcaggaggaacaccggcggcgaacggccttacctgacgctgagggcgaagcagcagcgggtagc
>N.xinjiangensis AF251709
agagttgatcctggctcaggacgaacgctggcggcgtgcttaacacatgcaagtcgagcggtaagggccttcgggggtacacgagcggcgaac
gggtggtgcatggctgctcagctcgtgctgagatggtgggtaagtcggcgaacgagcgaacccttgttccatggtgccagcacgtaagt
>N.composta AF360734
ggcgtgcttaacacatgcaagtcgagcggtaagggccttcgggggtacacgagcggcgaacgggtgagtaaacacgtgagcaacctgcccctga
agatggtgggtaagtcggcgaacgagcgaacccttgttccatggtgccagcacgtaaatggtggggactcatgggagactgcccgggtcaac
>N.alkaliphila DSM44657
```

Les arbres phylogénétiques représentés sur les figures 7, 8, 9 présentent la même topologie. Ils nous ont permis d'évaluer la position taxonomique de la souche N18 parmi toutes les espèces type du genre *Nocardioopsis*. Sur les trois arbres la souche N18 semble être apparentée à l'espèce *Nocardioopsis alba* car elle occupe la même ligne phylogénétique que cette espèce avec des valeurs de bootstrap élevés, 99% pour la première et la deuxième représentation et 94% pour la troisième.

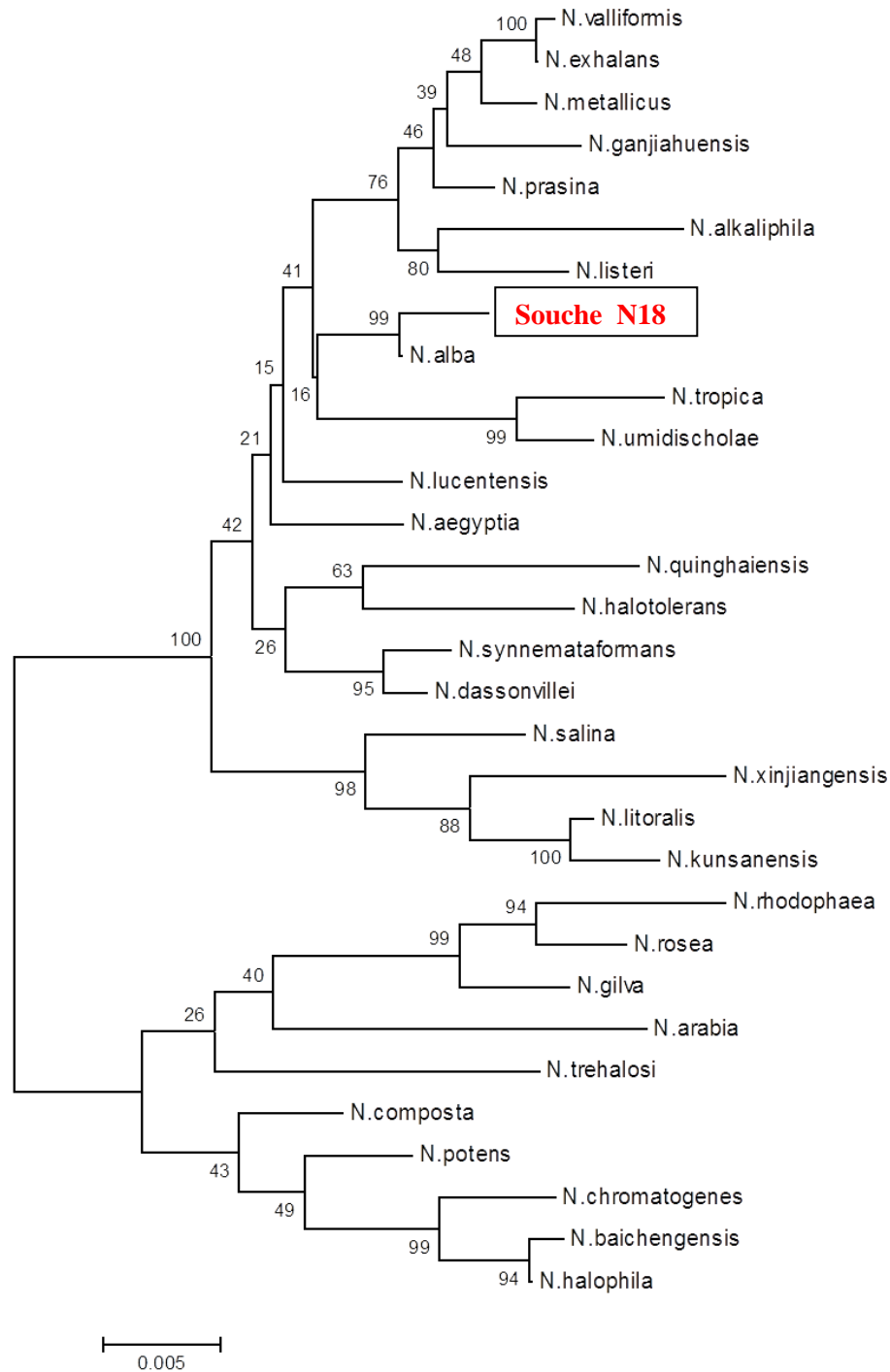


Figure 7 : Arbre selon la méthode des distances (Neighbor-joining) construit d’après l’analyse de séquences du gène qui code pour l’ADNr 16S en utilisant le logiciel Mega (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) version 5 (Tamura *et al.*, 2011) montrant la position phylogénétique de la souche N18 parmi les 30 espèces type représentatives du genre *Nocardia*.

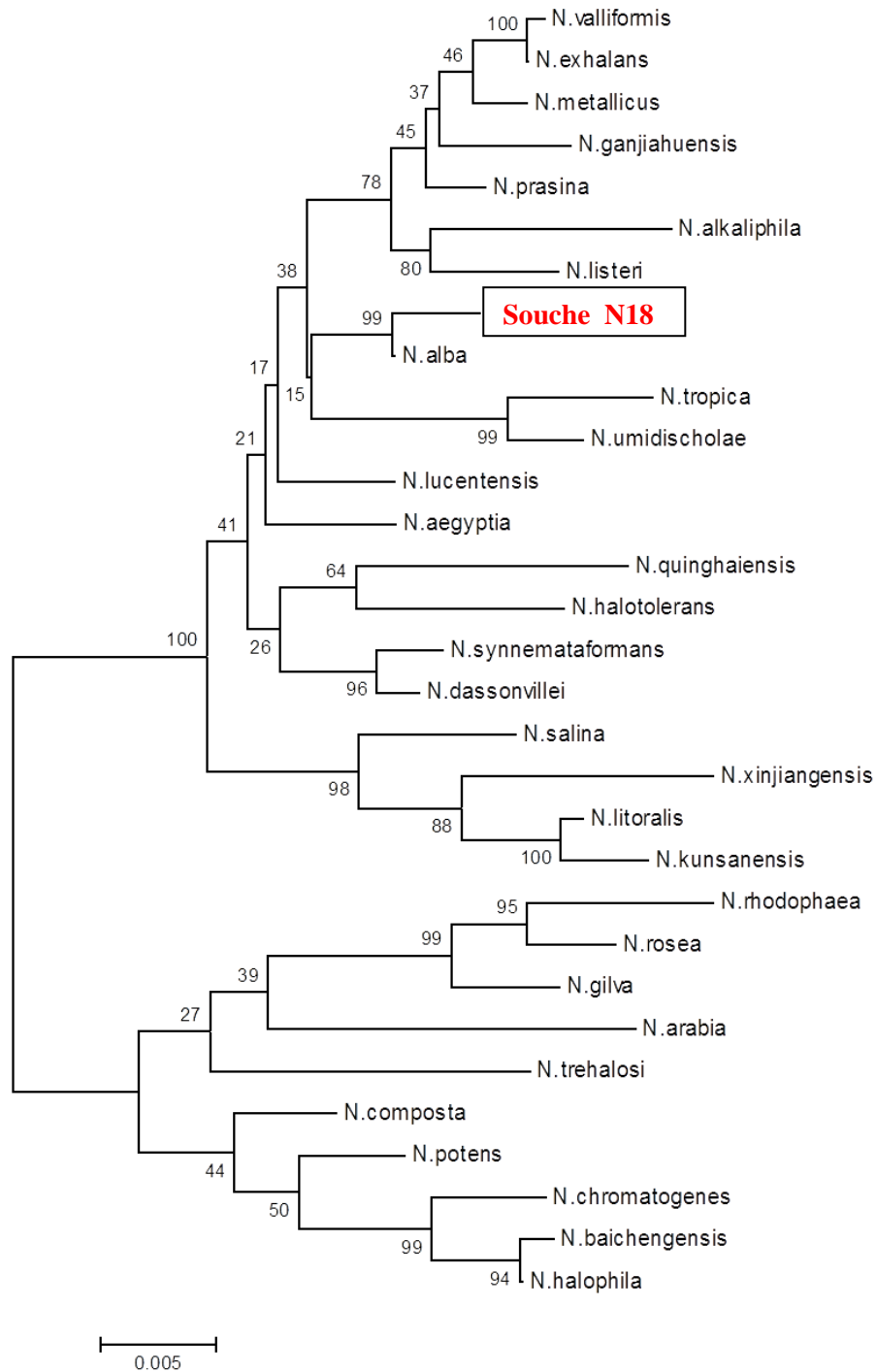


Figure 8 : Arbre selon la méthode du Minimum Evolution construit d’après l’analyse de séquences du gène qui code pour l’ADNr 16S en utilisant le logiciel Mega (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) version 5 (Tamura *et al.*, 2011) montrant la position phylogénétique de la souche N18 parmi les 30 espèces type représentatives du genre *Nocardia*.

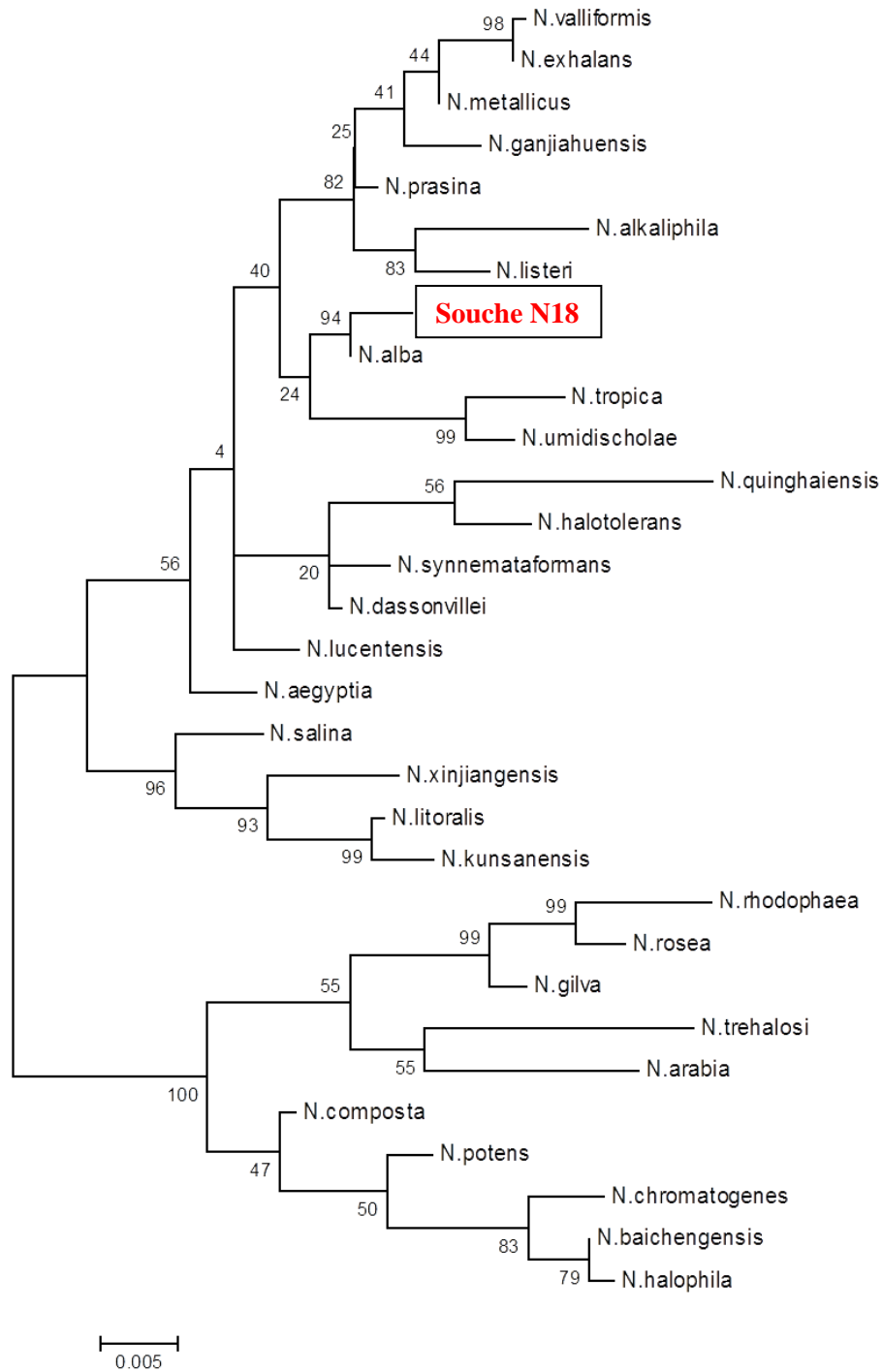


Figure 9 : Arbre selon la méthode du Maximum Likelihood construit d’après l’analyse de séquences du gène qui code pour l’ADNr 16S en utilisant le logiciel Mega (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) version 5 (Tamura *et al.*, 2011) montrant la position phylogénétique de la souche N18 parmi les 30 espèces type représentatives du genre *Nocardioopsis*.

La comparaison des résultats de l'étude morphologique de la souche N18 sont en parfaite corrélation avec les caractères morphologiques de l'espèce *Nocardiopsis alba* mentionnés dans le Bergey's Manuel of Systematic Bacteriology volume cinq (2012) comme c'est mentionné dans le tableau suivant.

Tableau 4 : la comparaison des caractères morphologiques de la souche N18 et l'espèce *Nocardiopsis alba*.

Caractère morphologique	<i>Nocardiopsis alba</i>	Souche N18
Coloration de Gram	Gram positive	Gram positive
Mobilité	Non mobile	Non mobile
Structure cellulaire	Filamenteuse	Filamenteuse
Mycélium de substrat	Bien développé Long fragmenté en éléments bacillaires Dense	Bien développé Long fragmenté en éléments bacillaires Dense
Mycélium aérien	Bien développé Long Moyennement ramifié	Bien développé Long Moyennement ramifié
Les spores	En chaînes recti-flexibles surface lisse	Allongée Non déterminée
Pigment diffusible	Absence	Absence

Les actinomycètes forment un groupe de bactéries à coloration de Gram positive très diversifié et difficile à étudié.

L'organisation des actinomycètes est analogue à celle des champignons auxquels elles étaient longtemps confondues. Mais leur structure cellulaire, leur composition et leur physiologie sont typiquement procaryotiques.

Les propriétés particulières des actinomycètes exigent l'utilisation des techniques de bactériologie et de mycologie pour leurs identifications morphologique.

L'objectif principal de notre travail a été d'apprendre à décrire les cultures actinomycétales, les étudier microscopiquement et surtout les identifier en utilisant l'outil bioinformatique.

L'étude morphologique de la souche actinomycétale sur le milieu de culture solide ISP2 montre que la souche N18 présente un aspect filamenteux, il s'agit de mycélium végétatif et mycélium aérien. Ainsi l'examen microscopique donne une information sur la forme filamenteuse de la bactérie qui est à coloration de Gram positive. Ces critères morphologiques fournissent une indication sur l'appartenance de notre souche au groupe des bactéries filamenteuses actinomycétales.

Sur le plan phylogénétique, l'analyse bioinformatique des séquences du gène codant pour l'ARNr 16S est devenue un outil important dans l'identification bactérienne puisqu'elle fournit des informations sur l'emplacement phylogénétique des espèces.

Cette étude nous a permis d'assigner la souche N18 au genre *Nocardiosis* et plus exactement à l'espèce *Nocardiosis alba*.

Les résultats morphologiques et phylogénétiques confirment l'appartenance de la souche N18 au phylum d'Actinobacteria, au genre *Nocardiosis* et à l'espèce *Nocardiosis alba*.

En perspectives, il serait nécessaire de continuer notre étude en utilisant d'autres techniques d'identification bactérienne comme : les techniques de chimiotaxonomie qui repose sur l'analyse chimique des constituants cellulaires (structure et composition de la paroi, des membranes plasmiques, du peptidoglycane).

Afin de renforcer nos résultats, il est nécessaire d'établir la technique d'hybridation ADN-ADN, parce que les notions apportées par les séquences de l'ADNr 16S seules ne sont pas suffisante pour différencier des souches bactériennes génétiquement trop proches. Cette technique est jusqu'à présent considérée comme la

seule technique discriminante entre les espèces très proche. Elle permet de mettre en évidence les relations de parenté entre des taxons étroitement liés, tels que les espèces. Malgré les qualités et les avantages de la technique d'hybridation ADN-ADN, elle reste une technique lourde, complexe et onéreuse.

- Abyzov, S.S., S.N. Philipova and V.D. Kuznetsov. (1983).** *Nocardiopsis antarcticus*, a new species of actinomycetes, isolated from the ice sheet of the central Antarctic glacier. *Izv. Akad. Nauk SSSR Ser. Biol.* 4: 559–568.
- Ajello, L., J. Brown, E. Macdonald and E. Head. (1987).** Actinomycetoma caused by *Nocardiopsis dassonvillei*. *Arch. Dermatol.* 123: 426. *In Bergey's Manuel of Systematic Bacteriology.* (2012). The actinobacteria, Part 4. Genus *Nocardiopsis*. Second Edition volume five.
- Al-Tai, A.M. and J.S. Ruan. (1994).** *Nocardiopsis halophila* sp. nov., a new halophilic actinomycete isolated from soil. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44: 474–478.
- 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.
- Athalye, M., J. Lacey and M. Goodfellow.(1981).** Selective isolation and enumeration of actinomycetes using rifampicin. *J. Appl. Bacteriol.*51: 289–297. *In bergey's Manuel of Systematic Bacteriology.* (2012). The actinobacteria, Part 4. Genus *Nocardiopsis*. Second Edition volume five.
- Beau, F., C. Bollet, T. Coton, E. Garnotel and M. Drancourt. (1999).** Molecular identification of a *Nocardiopsis 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.
- Benlahrache N. (2007).** Optimisation Multi-Objectif pour l'Alignement Multiple de Séquences. Thèse de Magister. Université Mentouri de Constantine. 125 P.
- 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).** *Nocardiopsis dassonvillei* recovered from a lung biopsy and a possible cause of extrinsic alveolitis. *Clin.Microbiol. Newsl.* 6:47-55.
- Bousseboua H. (2005).** *Eléments de microbiologie.* 2^{ème} édition. P : 161-166.
- Brocq-Rousseu D. (1904).** Sur un *Streptothrix* cause de l'alteracion des avoines moisies. *Res. Bot.* 16: 219–230. *In Bergey's Manuel of Systematic Bacteriology.*(2012). The actinobacteria, Part 4. Genus *Nocardiopsis*. Second Edition volume five.
- Chakravorty, S., Helb, D., Burday, M., Connell, N. & Alland, D. (2007).** A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *J. Microbiol. Methods.* 69, 330-339.
- Chen, Y.-G., Y.-X. Wang, Y.-Q. Zhang, S.-K. Tang, Z.-X. Liu, H.-D. Xiao, L.-H. Xu, X.-L. Cui and W.-J. Li. (2009).** *Nocardiopsis litoralis* sp. nov., a halophilic marine actinomycete isolated from a sea anemone. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*: ijs.0.009704–009700.
- 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.

- Chun, J., K.S. Bae, E.Y. Moon, S.O. Jung, H.K. Lee and S.J. Kim. (2000).** *Nocardiopsis kunsanensis* sp. nov., a moderately halophilic actinomycete isolated from a saltern. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50:1909–1913
- 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.
- Cui, X.L., P.H. Mao, M. Zeng, W.J. Li, L.P. Zhang, L.H. Xu and C.L. Jiang. (2001).** *Streptimonospora salina* gen. nov., sp. nov., a new member of the family *Nocardiopsaceae*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 357–363.
- 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.
- Fitch W. M. (1971).** Towrd defining the course of evolution: minimum change for a specifie tree topology. *Syst. Zool.* 20: 406-416.
- Goodfellow M. and Williams S.T. (1983).** Ecology of the actinomycetes. *Ann. Rev. Microbiol.* 37: 189-216.
- Goodfellow M. and Trujillo M.E. (2012).** In *Bergey's Manuel of Systematic Bacteriology.*(2012). The actinobacteria, Part 4. Genus *Nocardiopsis*. Second Edition volume five.
- 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.
- Grund E. and Kroppenstedt R.M. (1990).** Chemotaxonomy and Numerical Taxonomy of the Genus *Nocardiopsis* Meyer 1976. *Int. J. Syst. Bacteriol.* Vol 40, p. 5-11.
- Gugnani H.C., Unaogu C., Provost F. and Boiron P. (1998).** Pulmonary infections due to *Nocardiopsis dassonvillei*, *Gordonia sputi*, *Rhodococcus rhodochrous* and *Micromonospora* sp. In Nigeria and literature review. *J. Mycol. Med.* 8: 21–25.
- Hozzein, W. N., W.J. Li, M.I. Ali, O. Hammouda, A.S. Mousa, L.H. Xu and C.L. Jiang. (2004).** *Nocardiopsis alkaliphila* sp. nov., a novel alkaliphilic actinomycete isolated from desert soil in Egypt. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 247–252.
- Hozzein W. and Trujillo M. (2012).** In *Bergey's Manuel of Systematic Bacteriology.* (2012). The actinobacteria, Part 4. Genus *Nocardiopsis*. Second Edition volume five.
- Hozzein, W.N. and M. Goodfellow. (2008).** *Nocardiopsis arabia* sp. nov., a halotolerant actinomycete isolated from a sand-dune soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58 : 2520–2524.
- Jukes T. H. and Cantor C. (1969).** Evolution of protein molecules. In *Mammalian Protein Metabolism*, vol. 3, pp. 21-132. Edited by H. N. Munro. New York: Academic

Press.

Kämpfer, P., H.-J. Busse and F. A. Rainey. (2002). *Nocardioopsis compostus* sp. nov., from the atmosphere of a composting facility. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52: 621–627.

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.

Lacey, J. (1977). The ecology of actinomycetes in fodders and related substrates. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. I. Orig. Suppl.* 6: 161–170. *In* Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. (2012). The actinobacteria, Part 4. Genus *Nocardioopsis*. Second Edition volume five.

Lamoril J., Ameziane N., Deybach J.-C., Bouizegarène P. et M. Bogard (2008). Immuno-analyse et biologie spécialisée. Elsevier Masson 23 : 260-279.

Lechevalier H.A. and Lechevalier M.P. (1981). Introduction to the order *Actinomycetales*. *In* The prokaryotes, vol. 2. P. 1915-1922. Springer. Verlag, Berlin.

Li, M.G., W.J. Li, P. Xu, X.L. Cui, L.H. Xu and C.L. Jiang. (2003a). *Nocardioopsis xinjiangensis* sp. nov., a halophilic actinomycete isolated from a saline soil sample in China. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53:317–321.

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 *Nocardioopsis* isolated from hypersaline soils and emended description of *Nocardioopsis salina* Li et al. 2004. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56: 1089–1096.

Li, W.J., D.J. Park, S.K. Tang, D. Wang, J.C Lee, L.H. Xu, C.J. Kim and C.L. Jiang. (2004). *Nocardioopsis salina* sp. nov., a novel halophilic actinomycete isolated from saline soil in China. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 1805–1809.

Luchetta P., Maurel M.C., Higuét D. et al. (2005). Evolution moléculaire. Dunod. Paris. 232 P.

Madigan M.T. et Martinka J.M. (2007). Biologie des microorganismes. Université carbondale de l'Illinois du sud. Onzième édition. P : 311.

Mordarska H, Zakrzewska-Czerwinska J., Pasciak M., Szponar B. and Rowinski S. (1998). Rare, suppurative pulmonary infection caused by *Nocardioopsis dassonvillei* recognized by glycolipid markers. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 21: 47–55.

Pace N. R., (1997). A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Sci.* 276, 734-740.

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 *Nocardioopsis* strains from indoor environments and description of two new *Nocardioopsis* species, *N. exhalans* sp. nov. and *N. umidischolae* sp. nov. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 4293–4304.

Petti, C. A. (2007). Detection and identification of microorganisms by gene

amplification and sequencing. *Clinical Infectious Diseases* 44, 1108-1114.

Philip A. and Roberts G.D. (1984). *Nocardiosis dassonvillei* cellulitis of the arm. Clin. Microbiol. Newsl. 6: 14–15. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. (2012). The actinobacteria, Part 4. Genus *Nocardiosis*. Second Edition volume five.

Prescott L.M., Harley J.P., and Klein D.A. (2003). Microbiology. De Boeck & Larcier. France. P 537.

Sabry, S.A., N.B. Ghanem, G.A. Abu-Ella, P. Schumann, E. Stackebrandt and R.M. Kroppenstedt. (2004). *Nocardiosis aegyptia* sp. nov., isolated from marine sediment. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54:453–456.

Saitou N. and Nei M. (1987). The neighbor-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 actinomycetes et stratégie de sélection de souches. Bull. Soc. Fr. Microbiol., 12,(13).

Schumacher, R.W., B.L. Harrigan and B.S. Davidson. (2001). Kahakamides A and B, new neosidomycin metabolites from a marine-derived actinomycete. Tetrahedron Lett. 42: 5133–5135.

Shin, J., Y. Seo, H.-S. Lee, J.-R. Rho and S.J. Mo. (2003). A new cyclicpeptide from a marine-derived bacterium of the genus *Nocardiosis*. J. Nat. Prod. 66: 883–884.

Shirling, E.B. and D. Gottlieb. (1966). Methods for characterization of *Streptomyces* species. Int. J. Syst. Bacteriol. 16: 313–340. In bergey's Manual of Systematic Bacteriology.(2012). The actinobacteria, Part 4. Genus *Nocardiosis*. Second Edition volume five.

Silvey J. K. G. and Roach A. N. (1975). The taste and odor producing aquatic actinomycetes. Crit. Rev. Environ. Control. 5: 233-273.

Singh, S.M., J. Naidu, S. Mukerjee and A. Malkani. (1991). Cutaneous infections due to *Nocardiosis dassonvillei* (Brocq-Rousseau) Meyer 1976, endemic in members of a family up to fifth degree relatives. Abstr. PS1.91, p. 85. Presented at the XI Congress of the International Society for Human and Animal Mycology.

Sindhuphak, W., E. Macdonald and E. Head. (1985). Actinomycetoma caused by *Nocardiosis dassonvillei*. Arch. Dermatol. 121: 1332–1334. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. (2012). The actinobacteria, Part 4. Genus *Nocardiosis*. Second Edition volume five.

Stackebrandt, E., F.A. Rainey and N.L. Ward-Rainey. (1997). Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. Int J Syst Evol Microbiol, 47: 479–491.

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.

Tang, S.K., X.P. Tian, X.Y. Zhi, M. Cai, J.Y. Wu, L.L. Yang, L.H. Xu and W.J.

- Li. (2008).** *Haloactinospora alba* gen. nov., sp. nov., a halophilic filamentous actinomycete of the family *Nocardiopsaceae*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58: 2075–2080.
- Waksman, S.A. (1961b).** The Actinomycetes, vol. 2. Classification, identification and descriptions of genera and species. Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 1–363. In *bergey's Manuel of Systematic Bacteriology*. (2012). The actinobacteria, Part 4. Genus *Nocardiopsis*. Second Edition volume five.
- Wang, Y., Z. Zhang, J.S. Ruan and S. Ali. (1999).** Investigations of actinomycete diversity in the tropical rainforests of Singapore. *J. Clin. Microbiol.* 23: 178–187.
- Williams, S. T. et E. Wellington. (1982).** Actinomycetes. *In* *Methodes of soil analysis, Part 2. Chemical and Microbiological Properties. Agronomy monograph N° 9* (Second Edition). Ed., A. L. Page, pp. 969-987, ASA-SSSA. Madison.
- Williams, S.T., G.P. Sharples and R.M. Bradshaw. (1974).** Spore formation in *Actinomadura dassonvillei* (Brocq-Rousseu) Lechevalier and Lechevalier. *J. Gen. Microbiol.* 84: 415–419. *In* *bergey's Manuel of Systematic Bacteriology*. (2012). The actinobacteria, Part 4. Genus *Nocardiopsis*. Second Edition volume five.
- Woese, C. R. (1987).** Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51, 222-270.
- Wu, Z., L. Xie, G. Xia, J. Zhang, Y. Nie, J. Hu, S. Wang and R. Zhang. (2005).** A new tetrodotoxin-producing actinomycete, *Nocardiopsis dassonvillei*, isolated from the ovaries of puffer fish *Fugu rubripes*. *Toxicon* 45: 851–859.
- Xu, L.-H., Y.-Q. Tiang, Y.-F. Zhang, L.-X. Zhao and C.-L. Jiang. (1998).** *Streptomyces thermogriseus*, a new species of the genus *Streptomyces* from soil, lake and hot-spring. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48: 1089–1093.
- 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.
- Yassin, A.F., E.A. Galinski, A. Wohlfarth, K.D. Jahnke, K.P. Schaal and H.G. Trüper. (1993).** A new actinomycete species, *Nocardiopsis lucentensis* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43 : 266–271.
- Zhang, Z., Y. Wang and J. Ruan. (1998).** Reclassification of *Thermomonospora* and *Microtetraspora*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48: 411–422.
- Zhang, J.W. and R.Y. Zeng . (2008).** Purification and characterization of a cold-adapted alpha-amylase produced by *Nocardiopsis* sp. 7326 isolated from Prydz Bay, Antarctic. *Mar. Biotechnol. (NY)* 10 : 75–82.
- Zitouni, A., H. Boudjella, L. Lamari, B. Badji, F. Mathieu, A. Leb-rihi and N. Sabaou. (2005).** *Nocardiopsis* and *Saccharothrix* genera in Saharan soils in Algeria: isolation, biological activities and partial characterization of antibiotics. *Res. Microbiol.* 156: 984–993.

-Site internet:

<http://rdp.cme.msu.edu/html>

www.ncbi.nlm.nih.gov

Annexe 1**Préparation du milieu ISP2**

Extrait de levure	4 g
Extrait de malt	10 g
D-Glucose	4 g
Agar	4 g
Eau distillée qsp	1000 ml

Sous agitation modéré, les ingrédients du milieu ISP2 (sauf l'agar) sont ajoutés un à un dans de l'eau distillée. Le pH du milieu est ajusté à la valeur 7,3 à l'aide d'une solution de NaOH 1N et une solution d'HCl 1N. Le milieu de culture est stérilisé par autoclavage à 120°C pendant 20 min.

Préparation du lactophénol

Phénol aqueux	22 ml
Glycérine	40 g
Acide lactique	20 g
Eau bidistillée	9 ml

Les produits doivent être dissous dans l'ordre indiqué sous agitation modérée.

Le produit est conservé à l'obscurité dans un flacon en verre.

Pour la préparation de la solution de phénol aqueux, 3g de phénol en cristaux sont mis dans de l'eau distillée (qsp 100 ml) sous agitation modéré.

Annexe 2

Les séquences des amorces d'amplification utilisées pour l'étude phylogénique

	Amorces	Séquences
PCR d'amplification du gène ADNr16s	fd1	5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3'
	rp2	5' ACGGCTACCTTGTTACGACTT 3'
BDV1	536f	5' CAGCAGCCGCGGTAATAC 3'
	536r	5' GTATTACCGCGGCTGCTG 3'
	800f	5' ATTAGATACCCTGGTAG 3'
	800r	5' CTACCAGGGTATCTAAT 3'
	1050f	5' TGTCGTCAGCTCGTG 3'
	1050r	5' CACGAGCTGACGACA 3'

Nom : Tammine Kikaia Prénom : Imane Amira	Date de soutenance 01/07/2015
Diplôme : Master Option : Microbiologie Générale et Biologie Moléculaire des Microorganismes	
Intitulé : Étude morphologique et phylogénétique d'une souche actinomycétale	
<p>Résumé</p> <p>Les actinomycètes sont des bactéries à coloration de Gram positive. Ubiquitaires, elles vivent à l'état de saprophyte dans le sol.</p> <p>L'étude est réalisée sur une souche actinomycétale référencée N18 récupérée de la collection du laboratoire de Biologie Appliquée et Santé.</p> <p>L'identification de la bactérie N18 a été établie par une approche polyphasique (informations phénotypique, génotypique et phylogénétique).</p> <p>L'examen morphologique a permis d'apprécier le bon développement mycélien des colonies sur le milieu gélosé ISP2 et de déterminer, grâce à la technique des lamelles, la structure microscopique particulière de la bactérie actinomycétale. En effet, la souche N18 présente de longs filaments à coloration de Gram positive, ramifiés, plus ou moins enchevêtrés et qui se fragmentent en éléments bacillaire de longueurs variables.</p> <p>L'étude phylogénétique, basée sur l'analyse bioinformatique des séquences du gène codant pour la sous unité 16S de l'ARNr, a permis de classer la souche N18 dans le phylum des Actinobacteria, à la famille des <i>Nocardiopsaceae</i> et de l'affilier au genre <i>Nocardiopsis</i> et plus exactement à l'espèce <i>Nocardiopsis alba</i>.</p> <p>Mots clés : Actinomycètes , <i>Nocardiopsis</i>, Phylogénie, ARNr 16S.</p>	
<i>Année universitaire</i> 2014 - 2015	