

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

Université Mentouri Constantine

Faculté des Sciences

Département des Sciences de la Nature et de la Vie

N° d'ordre : **94 / Mag / 2006**

N° de série : **007 / SN / 2006**

Mémoire

Présenté pour l'obtention

**Du Diplôme de Magister
En Biochimie et Microbiologie appliquées**

Par

Lamia Aouar

Thème

**Mise en évidence des actinomycètes aérobies pathogènes impliqués
dans les infections traitées au service des maladies infectieuses du
CHU de Constantine. Etude des caractéristiques culturelles des
souches isolées et purifiées**

Soutenu-le : 10/06/2006

Devant le jury:

Président : Mr. Bousseboua H.	Prof. Univ. Constantine
Rapporteur : Mr. Boulahrouf A.	Prof. Univ. Constantine
Examineurs : Mr. Dalichaouch M.	Prof. Faculté de Médecine
Mr. Hamidechi M. A	M.C. Univ. Constantine

ANNEE UNIVERSITAIRE : 2005- 2006

Remerciements

Ce travail a été réalisé, sous la direction de Monsieur le Professeur A. Boulahrouf, au laboratoire de génie microbiologique et applications, département des Sciences de la Nature et de la Vie, faculté des sciences, Université Mentouri Constantine.

Je tiens à exprimer mes remerciements à Monsieur Abderrahmane Boulahrouf (Professeur à l'université Mentouri Constantine), qui, par ses encouragements et ses fructueux conseils, m'a apporté une aide précieuse dans la réalisation de ce travail.

Que Messieurs les Professeurs Mokhtar Dalichaouach et Ahmed Aouati, qui m'ont facilité l'accès au service infectieux du CHU, trouvent ici l'expression de mes remerciements.

Je remercie Monsieur Hacène Bousseboua (Professeur à l'université Mentouri Constantine) de m'avoir fait l'honneur de présider le jury.

Mes remerciements vont également aux : Professeur Mokhtar Dalichaouch (Professeur à la Faculté de Médecine) et Mohamed Abdelhafid Hamidechi (Maître de conférences à l'Université Mentouri Constantine) d'avoir accepté de participer à ce jury.

Je ne saurais oublier :

- Melle Habiba Zerizer, Melle Faiza Boughachiche et Melle Sihem Reghioua pour leurs conseils.
- Mr. Noredine Kacem Chaouche (Maître de conférences à l'Université Mentouri Constantine) que je tiens à remercier pour son aide.
- Tout le personnel du corps médical et paramédical du service des maladies infectieuses au CHU de Constantine, pour la collecte des prélèvements.

Liste des abréviations

ADN_r: acide désoxyribonucléique ribosomal
ARN_r: acide ribonucléique ribosomal
C.H.U: centre hospitalo-universitaire
C.M.V: cyto-mégalo-virus
C.R.P : C. réactive protéine
G.B: globule blanc
D.A.P: acide 2,6-diaminopimélique
D.D.B: dilatation de bronches
D.D.N: date de naissance
I.S.P: "International *Streptomyces* Project"
K.M: Kinyoun modifié
L.B.A: lavage broncho-alvéolaire
L.C.R: liquide céphalorachidien
N.S.P: non spécifié
ONPG: orthonitrophényl-bêta-D-galactopyranoside
O.R.L.: oto-rhino-laryngologie
B.P.C.O : broncho-pneumopathie chronique obstructive
V.I.H: virus de l'immunodéficience humaine
V.Z.V: Virus Zona-Varicelle
Z.N: Ziehl Neelson
Z.N.M: Ziehl Neelson modifié

CaCO₃ : carbonate de calcium
FeSO₄ 7H₂O : sulfate de fer sept fois hydraté
HCl : acide chlorhydrique
K₂HPO₄ : phosphate dipotassique
KH₂PO₄ : phosphate monopotassique
MgSO₄ 7H₂O : sulfate de magnésium sept fois hydraté
MnCl₂ 4H₂O : chlorure de manganèse quatre fois hydraté
NaCl : chlorure de sodium
NH₄Cl: chlorure d'ammonium
(NH₄)₂ SO₄ : sulfate d'ammonium
ZnSO₄ 7H₂O : sulfate de zinc sept fois hydraté

Liste des tableaux

Tableau 1: les caractères physiologiques des principaux actinomycètes aérobies pathogènes
(Mariat et Sebald, 1990)

Tableau 2 : les espèces de *Nocardia* impliquées dans les infections humaines (Roth *et al.*, 2003)

Tableau 3 : répartition géographique des agents étiologiques des actinomycétomes (Raoult, 1998)

Tableau 4 : examen direct, après coloration, des 102 prélèvements

Tableau 5 : aspect macroscopique des colonies, à bordure filamenteuse, prélevées

Tableau 6: répartition des souches actinomycétales purifiées par rapport à la nature du milieu
d'isolement

Tableau 7: répartition des souches actinomycétales purifiées par rapport à la nature du prélèvement

Tableau 8 : aspect macroscopique des souches actinomycétales purifiées

Tableau 9 : aspect microscopique des souches actinomycétales purifiées

Liste des figures

- Figure 1:** les différentes formes des chaînes de spores (Shirling et Gottlieb, 1966)
- Figure 2:** les classes morphologiques de *Streptomyces olindensis* cultivé en milieu liquide (Pamboukian *et al.*, 2002)
- Figure 3:** la classification hiérarchique de la classe *Actinobacteria* basée sur l'analyse phylogénétique de l'ADNr / ARNr 16S (Garrity *et al.*, 2004)
- Figure 4:** la micromorphologie des genres *Nocardia*, *Actinomadura* et *Streptomyces* (Mansour, 2003).
- Figure 5:** le pied de Madura (Raoult, 1998)
- Figure 6:** enquête épidémiologique des cas d'infection par actinomycètes
- Figure 7:** le protocole d'isolement des actinomycètes aérobies à partir du crachat et du pus
- Figure 8:** identification des souches actinomycétales pures
- Figure 9:** le type respiratoire aérobie strict des souches (cas de la souche PC43b)
- Figure 10:** la production des pigments solubles
- Figure 11:** la souche PC40 au microscope optique grandissement x 100 (techniques des lamelles)
- Figure 12:** distribution des actinomycètes aérobies par rapport à l'âge
- Figure 13:** distribution des actinomycètes aérobies par rapport au sexe
- Figure 14:** distribution des actinomycètes aérobies par région (lieu d'habitation)

SOMMAIRE

Introduction	1
Bibliographie	3
1- Propriétés générales des actinomycètes	3
1.1- Morphologie.....	6
1.2- Physiologie et écologie.....	6
2- Classification des actinomycètes	7
2.1- La classe <i>Actinobacteria</i>	7
2.2- Les genres et les espèces de l'ordre des <i>Actinomycetales</i>	9
2.2.1- Caractères morphologiques.....	9
2.2.2- Caractères chimiotauxonomiques.....	9
2.2.3- Les acides nucléiques.....	10
3- Actinomycètes aérobies pathogènes	10
4- caractères cultureux et physiologiques des actinomycètes aérobies pathogènes	12
5- Maladies provoquées par les actinomycètes aérobies pathogènes	14
5.1- La nocardiose	14
5.1.1- Généralités.....	14
5.1.2- Epidémiologie.....	14
5.1.3- Manifestations cliniques.....	16
5.1.4- Traitement.....	16
5.2- L'actinomycétome	18
5.2.1- Généralités.....	18
5.2.2- Epidémiologie.....	19
5.2.3- Traitement.....	19
Matériel et méthodes	20
1- Isolement des actinomycètes aérobies	21
1.1- La population étudiée.....	21
1.2- Collecte et transport des prélèvements.....	21
1.3- Préparation des prélèvements.....	23
1.4- Examen direct après coloration des prélèvements.....	23
1.5- Mise en culture.....	23
1.5.1- Ensemencement direct.....	24

1.5.2- Ensemencement après enrichissement.....	24
1.6- Purification et conservation des souches.....	24
1.6.1- Prélèvement des colonies.....	24
1.6.2- Culture sur milieu sélectif.....	24
1.6.3- Morphologie microscopique.....	25
1.7- Détermination du type respiratoire.....	25
1.8- Détermination de la température optimale de la croissance.....	25
2- Identification présomptive des souches isolées et purifiées.....	26
2.1- Caractères cultureux.....	27
2.1.1- Aspect macroscopique.....	27
2.1.2- Aspect microscopique.....	28
2.2 - L'acido-alcoolol résistance et tests biochimiques.....	28
2.2.1- L'acido-alcoolol résistance.....	28
2.2.2- Tests biochimiques.....	30
3- Etude Statistique.....	30
Résultats et discussions.....	31
1- Isolement des souches d'actinomycètes aérobies.....	31
2- Identification présomptive des souches isolées et purifiées.....	40
3- Etude statistique.....	57
Conclusion et perspectives.....	60
Références bibliographiques.....	63

Annexes

INTRODUCTION

L'ordre des *Actinomycetales* rassemble certaines bactéries filamenteuses ramifiées. Les filaments des actinomycètes peuvent s'assembler sous forme de mycélium rudimentaire ou au contraire bien développé, avec ou sans hyphes aériens. Les actinomycètes ressemblent aux champignons (eumycètes) auxquels ils furent longtemps rattachés. Ils présentent néanmoins certaines caractéristiques des bactéries, notamment au niveau de leur paroi qui renferme parfois des énantiomères de l'acide diaminopimélique (*meso*-DAP et LL-DAP) constituant du peptidoglycane, et jamais de chitine ou de cellulose. Leur organisation cellulaire est de type procaryote. Ils sont sensibles à certains antibactériens mais pas aux antifongiques. Les actinomycètes sont subdivisés en deux groupes physiologiques selon la nature oxydative ou fermentaire de leur métabolisme.

Parmi les actinomycètes aérobies pathogènes, le genre *Nocardia* revêt une importance médicale particulière, de même que certains genres apparentés, tels que *Corynebacterium*, *Dietzia*, *Gordonia*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus* et *Tsukamurella* (Georghiou et Blacklock, 1992 ; Garrity *et al.* 2004). Les bactéries du genre *Nocardia* sont ubiquistes. Les infections qu'elles provoquent, résultent généralement de l'inhalation des bactéries et/ou de la contamination d'une plaie. Leur prolifération dans l'organisme est à l'origine d'une infection granulomateuse et suppurative, localisée ou disséminée : **la nocardiose**. Elle affecte principalement les sujets immunodéprimés, bien que l'observation de cas en l'absence de facteur prédisposant ne soit pas exceptionnelle. **L'actinomycétome** fréquemment observé en zone tropicale, constitue un cas particulier d'atteinte cutanée et sous-cutanée, et dû à diverses espèces d'actinomycètes (*Nocardia*, *Actinomadura* et *Streptomyces*).

Les Streptomyces figurent parmi les actinomycètes aérobies et sont largement distribués dans l'environnement. À l'exception principale de *S. somaliensis* qui a été identifié comme un des agents étiologiques de l'actinomycétome en Arabie Saoudite, au Nigeria, au Niger, en Somalie, au Soudan et aux États-Unis (Borelli et Middelveen, 1986), ces bactéries sont classiquement considérées comme des saprophytes, et l'évaluation de leur rôle en pathologie humaine est difficile. Malgré le nombre important d'espèces, seulement trois d'entre elles sont habituellement citées en pathologie humaine : *S. paraguayensis*, *S. griseus*, *S. somaliensis*. La place de pathogène opportuniste des *Streptomyces* tend à se préciser devant le nombre croissant d'infections systémiques rapportées dans la littérature (péritonite, péricardite chronique, septicémie, abcès du cerveau, endocardite, surinfection de plaie et pneumonie).

En raison de la nature et de la gravité des infections dont elles sont responsables, l'identification rapide et précise de ces bactéries est impérative. Dans les pays en voie de développement, 50% des décès sont dus aux maladies infectieuses où les affections pulmonaires, en particulier, la tuberculose, sont très répandues, les actinomycètes aérobies pathogènes sont négligés ou mal identifiés (**Perry *et al.*, 2004**)

L'objectif principal de cette étude est d'évaluer **la prévalence des actinomycètes usuels** (à l'exception des mycobactéries) **responsables d'infections chez l'homme**. Sur le plan microbiologique, elle portera essentiellement **sur la détection, l'isolement et l'identification présomptive d'actinomycètes aérobies pathogènes** : *Streptomyces*, *Nocardia*, *Tsukamurella*, *Rhodococcus*, *Gordonia* *etc.* les patients principalement concernés par cette étude seront les malades hospitalisés au Centre-Hospitalo-Universitaire de Constantine. Tous les malades feront l'objet d'une enquête épidémiologique reposant sur le renseignement d'un formulaire qui sera systématiquement complété, afin qu'une analyse globale puisse être réalisée.

BIBLIOGRAPHIE

1- Propriétés générales des actinomycètes

1.1- Morphologie

Morphologiquement, les actinomycètes peuvent être classés en deux groupes. Le premier : se compose d'organismes qui ne présentent pas de caractéristiques morphologiques particulières et forment seulement une masse de filaments ramifiés (mycélium). Le second : comprend les organismes qui sont morphologiquement plus complexes que le premier (Lechevalier, 1985).

Les colonies formées par les actinomycètes sur des milieux solides présentent différents aspects macroscopiques qui peuvent être regroupés en trois types :

- des colonies poudreuses habituellement couvertes d'hyphes aériens fermement attachés au milieu
- des colonies pâteuses rugueuses ou lisses qui peuvent être facilement détachées des milieux solides
- des colonies exemptes de mycélium de substrat et se composent d'hyphes aériens attachés au milieu par des crampons.

Les différents genres d'actinomycètes peuvent sporuler soit en morcelant certaines hyphes pour former des conidies, un peu plus résistantes aux conditions hostiles que les hyphes, soit en produisant des endospores (*Thermoactinomyces*) hautement résistantes à la chaleur et autres adversités. Ces endospores sont semblables à celles des *Bacillus*. D'autres genres d'actinomycètes sporulent en produisant des sporanges qui peuvent contenir des spores mobiles à l'aide de flagelles (*Actinoplanes*) ou des spores immobiles tel que le genre *Streptosporangium* (Kalakoutskii et Agre, 1976).

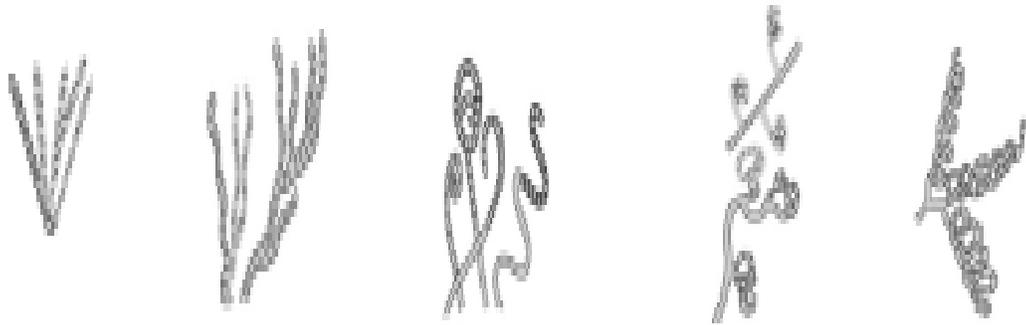
Les spores peuvent, selon les genres, être produites isolément (*Micromonospora*), deux à deux longitudinalement (*Microbispora*), en courtes chaînes (*Actinomadura*), en longues chaînettes (*Streptomyces*). Les chaînettes de spores peuvent être ramifiées ou non, droites, flexibles ou en spirales. De plus, elles peuvent être rayonnantes autour d'hyphes sporophores (figure 1).

Il existe d'autres structures morphologiques: les sclérotés et les synnemas (corémies) qui sont présentes, respectivement, chez les *Chainia* et les *Actinosynnema*.

Simples

Droites (R) Flexibles (F) Spires compactes (S) Spires ouvertes (S) Boucles ouvertes, ou spires étendues
 Rectinaculum-
 Apertum(RA)

Verticillés



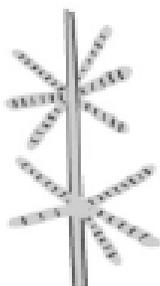
Monoverticille sans spires

Monoverticille avec spires

Biverticille sans spires

Biverticille avec spires

Fig



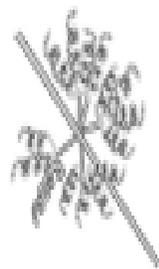
entes for.
 ilieb (196)



e sp



ycètes



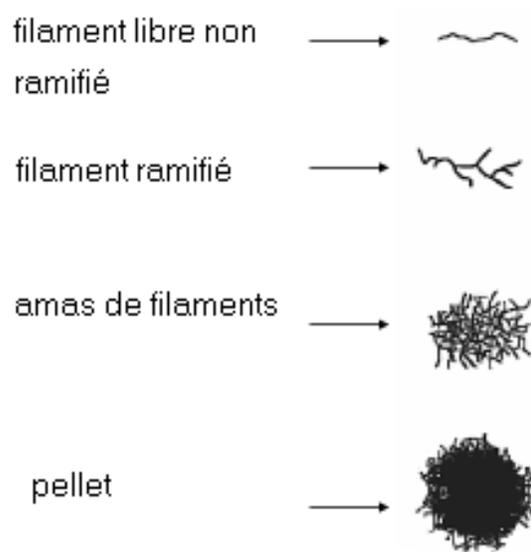


Figure 2: les classes morphologiques de *Streptomyces olindensis* cultivé en milieu liquide
(Pamboukian *et al.*, 2002)

La majorité des actinomycètes cultivés sur milieu solide forment un mycélium de substrat et un mycélium aérien. Néanmoins, il existe des groupes qui ne forment qu'un mycélium de substrat poussant à la surface et dans le milieu de culture ou un mycélium aérien dont les hyphes sont attachés au milieu par des crampons (Holdfasts). Les différences entre le mycélium aérien et celui de substrat chez le genre *Streptomyces* sont en nombre de six :

- le mycélium aérien est légèrement plus épais
- il est habituellement de couleur foncée (à cause des pigments insolubles)
- il est moins ramifié
- ne montre presque aucune tendance à pénétrer le milieu
- sa couche aérienne est hydrophobe
- il forme des spores par fragmentation (**Kalatouskii et Agre, 1976**).

En culture liquide et sans agitation, les hyphes formés après la germination des spores montent en surface pour croître en contact de l'air (**Keulen et al., 2003**). Cependant, en milieu liquide avec agitation, il n'y a pas de formation du mycélium aérien ni de spores. Les *Streptomyces* forment d'abord des filaments libres, qui se ramifient et s'agrègent pour former enfin les pellets (**figure 2**). Ces dernières sont composées d'une masse dense d'hyphes enroulés généralement en forme sphérique, les cellules au centre sont privées de nutriment, ainsi, les pellets augmentent donc de taille seulement par la croissance des cellules à la surface de la sphère (**Reichl et al., 1992; Tamura et al., 1997**).

1.2- Physiologie et écologie

Physiologiquement et écologiquement, il existe deux groupes d'actinomycètes. En premier lieu, les formes fermentatives, anaérobies strictes ou facultatives, illustrées par le genre *Actinomyces*. Ces organismes sont des saprophytes obligés des cavités naturelles de l'homme et des animaux supérieurs et ils ne sont jamais retrouvés dans le sol (**Mariat et Sebald, 1990**). En second lieu, les formes oxydatives, aérobies, tels que les *Streptomyces* où le sol est leur réservoir principal et à partir duquel elles sont disséminées, en particulier dans l'air. Dans ce dernier, les spores sont considérées comme des contaminants (**Reponen et al., 1998**). Les *Streptomyces* disséminés dans les eaux douces et salées, s'adaptent en formant des spores résistantes caractérisées soit par une psychrophilie, soit par une halophilie ou par une barotolérance (**Mincer et al., 2002 ; Zaitlin et al., 2003**). Certains genres

d'actinomycètes ont été isolés à partir des composts, tel que *Thermoactinomyces* (lacey, 1997 ; Song *et al.*, 2001).

En général, les actinomycètes sont des chimoorganotrophes utilisant une grande variété de sources d'énergie y compris les polymères complexes. Mais plusieurs espèces sont capables aussi de croissance chimioautotrophique utilisant l'oxydation de l'hydrogène comme source d'énergie et le gaz carbonique comme source de carbone (Mariat et Sebald, 1990). Certains actinomycètes sont capables de se développer à des températures élevées et de produire des enzymes actives dans des conditions acides (Ensign *et al.*, 1993). Quelques espèces d'actinomycètes sont des symbiotes de plantes (Larpen et Larpen-Gourgaud, 1985). Le genre *Frankia* s'intègre aux racines, fixe l'azote et joue un rôle dans la protection des plantes contre les pathogènes (Sardi *et al.*, 1992 ; Thirupl *et al.*, 2001).

2- Classification des actinomycètes

Selon la classification du "Taxonomic Outline of The Procaryotes, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology", seconde édition 2004 (Garrity *et al.*, 2004), Le **Phylum *Actinobacteria*** (bactéries à Gram positif et G +C % élevé) est constitué d'une seule classe dénommée également "*Actinobacteria*". Celle-ci a été décrite par Stackebrandt *et al.* (1997).

2.1- La classe "*Actinobacteria*"

En 1997, Stackebrandt *et al.* proposent une nouvelle classification hiérarchique des actinomycètes qui repose uniquement sur l'analyse des séquences des ARNr 16S et des gènes codant pour les ARNr 16S. Donc, ils ont décrit une nouvelle classe, qui se définit comme un ensemble de souches présentant plus de 80 % de similitude dans la séquence des ARNr 16S ou de l'ADNr 16S et possédant un résidu adénine à la position 906 et un résidu adénine ou cytosine à la position 955 (à l'exception des sous classes *Rubrobacteridae* et *Spherobacteridae* où l'on trouve un résidu uracile à la position 955).

Cette proposition ne change pas les descriptions courantes des espèces et des genres. En effet, leur classification est basée sur des caractéristiques morphologiques, chimiotaxonomiques ou physiologiques, a été vérifiée pendant ces 20 dernières années, et il s'est avéré qu'elle est en accord avec le regroupement phylogénétique basé sur l'ADNr/ARNr 16S (Stackebrandt *et al.*, 1997).

Classe *Actinobacteria*

S/Cl	<i>Acidimicrobidae</i>	<i>Rubrobacteridae</i>	<i>Coriobacteridae</i>	<i>Sphaerobacteridae</i>	<i>Actinobacteridae</i>
------	------------------------	------------------------	------------------------	--------------------------	-------------------------

S/Cl	<i>Actinobacteridae</i>				
Ordres	<i>Bifidobacteriales</i>		<i>Actinomycetales</i>		

Ordre *Actinomycetales*

S/O <i>Actinomycineae</i>	S/O <i>Micrococcineae</i>	S/O <i>Corynebacterineae</i>	S/O <i>Micromonosporineae</i>	S/O <i>Propionibacterineae</i>
Famille <i>Actinomycetaceae</i>	Familles <i>Micrococcaceae</i> <i>Bogoriellaceae</i> <i>Rarobacteraceae</i> <i>Sanguibacteraceae</i> <i>Brevibacteriaceae</i> <i>Cellulomonadaceae</i> <i>Dermabacteraceae</i> <i>Dermatophilaceae</i> <i>Dermacoccaceae</i> <i>Intrasporangiaceae</i> <i>Jonesiaceae</i> <i>Microbacteriaceae</i> <i>Beutenbergiaceae</i> <i>Promicromonosporaceae</i>	Familles <i>Corynebacteriaceae</i> <i>Dietziaceae</i> <i>Gordoniaceae</i> <i>Mycobacteriaceae</i> <i>Nocardiaceae</i> <i>Tsukamurellaceae</i> <i>Williamsiaceae</i>	Famille <i>Micromonosporiaceae</i>	Familles <i>Propionibacteriaceae</i> <i>Nocardioidaceae</i>
S/O <i>Pseudonocardineae</i>	S/O <i>Streptomycineae</i>	S/O <i>Streptosporangineae</i>	S/O <i>Frankinea</i>	S/O <i>Glycomycineae</i>
Familles <i>Pseudonocardiaceae</i> <i>Actinozynnemataceae</i>	Famille <i>Streptomycetaceae</i>	Familles <i>Streptosporangiaceae</i> <i>Nocardiopsaceae</i> <i>Thermomonosporaceae</i>	Familles <i>Frankiaceae</i> <i>Geodermatophilaceae</i> <i>Microsphaeraceae</i> <i>Sporichthyaceae</i> <i>Acidothermaceae</i> <i>Kineosporiaceae</i>	Famille <i>Glycomycetaceae</i>

S/Cl: sous classe, **S/O:** sous ordre

Figure 3: la classification hiérarchique de la classe *Actinobacteria* basée sur l'analyse phylogénétique de l'ADNr / ARNr 16S (Garrity *et al.*, 2004)

La classe des *Actinobacteria* est divisée en 5 sous-classes (**figure 3**) : *Acidimicrobidae*, *Rubrobacteridae*, *Coriobacteridae*, *Sphaerobacteridae* et *Actinobacteridae*. Chacune de ces sous classes est constituée d'un ou de plusieurs ordres eux-mêmes constitués d'une ou de plusieurs familles. Dans la sous-classe des *Actinobacteridae*, **l'ordre des Actinomycetales** est subdivisé en 10 sous-ordres : *Actinomycineae*, *Micrococcineae*, *Corynebacterineae*, *Micromonosporineae*, *Propionibacterineae*, *Psuedonocardineae*, *Streptomycineae*, *Streptosporangineae*, *Frankinea* et *Glycomycineae* (**Stackebrandt et al., 1997; Labeda et Kroppenstedt, 2000 ; Stackebrandt et Schumann, 2000**).

2.2- Les genres et les espèces de l'ordre Actinomycetales

La définition des genres et des espèces se fonde sur un ensemble de caractères morphologiques et chimiotaxonomiques.

2.2.1- Caractères morphologiques

Les principaux critères morphologiques correspondent à la présence, l'abondance et la disposition des hyphes du mycélium du substrat ou du mycélium aérien. Ainsi que la présence des spores, leur nombre, leur mobilité, leur forme, leur position sur les hyphes, la présence de sclérotés, de sporanges ou de synnémata.

2.2.2- Caractères chimiotaxonomiques

La composition de la paroi cellulaire en acides aminés, glucides et lipides constituent le principal caractère utilisé en chimiotaxonomie.

- Acides aminés de la paroi

Les *Streptomyces* et genre apparentés contiennent la forme LL-DAP (acide 2,6-diaminopimélique) contrairement à l'ensemble des autres *Actinomycétales*.

- Glucides

Les glucides de la paroi cellulaire permettent une séparation en quatre groupes majeurs. Le spectre de sucres A (arabinose + galactose) est caractéristique des genres *Nocardia* et *Saccharopolyspora*. Le spectre glucidique B (madurose) est présent chez les genres *Actinomadura* et *Streptosporangium*. Les *Streptomyces* et genres apparentés ne synthétisent aucun glucide en quantité caractéristique (spectre C). Il en est de même pour les genres *Thermomonospora* et les *Thermoactinomyces*. La présence de xylose et d'arabinose (spectre D) est caractéristique des *Actinoplanes* et du genre *Micromonospora*.

- Acides gras

Les acides gras les plus communs, chez les actinomycètes appartiennent soit au groupe de molécules comportant de 12 à 20 atomes de carbone, soit au groupe des acides mycoliques à 20-90 atomes de carbone. La présence d'acides mycoliques est caractéristique des genres tels que *Nocardia*, *Mycobacterium* et *Rhodococcus*.

2.2.3- Les acides nucléiques

Les déterminations portent sur le pourcentage de guanine et cytosine, sur le spectre obtenu par électrophorèse des fragments de l'ADN (obtenus par la digestion par les enzymes de restriction), sur le taux d'hybridation ADN - ADN ou ADN - ARN et sur la séquence de l'ARNr 16S. Une différence de plus de 10 % indique que deux souches sont sans relation. Au-delà de 70 % de similitude (l'hybridation ADN-ADN), deux souches sont considérées comme appartenant à la même espèce. Le séquençage de l'ARNr 16S, constitue un outil précieux pour déterminer le degré de relation entre souches, espèces et genres (**Larpen et Larpen-Gourgaud, 1985 b**).

3- Actinomycètes aérobies pathogènes

Ils peuvent provoquer deux maladies importantes chez l'homme: l'actinomycétome et la nocardiose. Tandis que l'actinomycétome est le plus souvent provoqué par *Nocardia brasiliensis*, *Actinomyadura madurae*, *Actinomyadura pelletieri* et *Streptomyces somaliensis*. Dans la nocardiose, l'agent impliqué est surtout, *Nocardia asteroides* (**Pirouz et al., 1999**). L'évolution des deux maladies est lente et insidieuse, et peut aboutir à des lésions spectaculaires des tissus mous et des os. Dans la nocardiose, les filaments bactériens se rencontrent sous forme libre. Cependant dans l'actinomycétome, on trouve des grains constitués de filaments agrégés. La couleur et la taille des grains peuvent orienter le diagnostic histologique (**Beaman et Beaman, 1994**). *Nocardia asteroides* et *Nocardia brasiliensis* sont les deux espèces d'actinomycètes les plus fréquemment isolées dans un laboratoire clinique (**Wallace et al., 1995**). La virulence des souches de *Nocardia* sp. est liée à:

§ L'adhésion, la pénétration et la croissance à l'intérieure des cellules hôtes (**Ogata and Beaman, 1992**)

§ La neutralisation de l'acidification phagosomale et l'inhibition de la fusion phagosome – lysosome

§ La croissance à l'intérieure des cellules phagocytaires (**Beaman et Beaman, 1994**).



- a- le mycélium fragmenté de *Nocardia*
 b- les courtes chaînes du genre *Actinomadura*
 c- les longues chaînes du genre *Streptomyces*

Figure 4 : la micromorphologie des genres *Nocardia*, *Actinomadura* et *Streptomyces*
 (Mansour, 2003)

Tableau 1: les caractères physiologiques des principaux actinomycètes aérobies pathogènes
 (Mariat et Sebald, 1990)

Propriétés physiologiques	Actinomycètes aérobies pathogènes				
	<i>Actinomadura madurae</i>	<i>Actinomadura pelletieri</i>	<i>streptomyces somaliensis</i>	<i>Nocardia brasiliensis</i>	<i>Nocardia asteroides</i>
Temperature optimale de crissance	37 °C	37 °C	37 °C	30-37 °C	30-37 °C
Decomposition de					
Caséine	+	+	+	+	-
Hypoxantine	+	+	-	+	-
Xantine	-	-	-	-	-
Tyrosine	+	+	+	+	-
Urée	-	-	-	+	+
Acide à partir					
arabinose	+	-	-	-	-
xylose	+	-	-	-	-
rhamnose	+	-	-	-	f
tréhalose	+	+	-	•	•
adonitol	+	-	-	+	-
inositol	f	-	-	+	-
mannitol	+	-	-	+	-
utilisation de la paraffine	-	-	-	+	+
$\text{NO}_3^- \longrightarrow \text{NO}_2^-$	+	+	-	+	+
Activités protéolytiques	+	+	+		-

+, f, - : résultat positif, faiblement positif, négatif, • pas de données.

Les souches virulentes d'*Actinomadura madurae* produisent une collagénase qui joue un rôle important dans la pathogénicité (Mc Neil et Brown, 1994). Les espèces appartenant au genre *Streptomyces* induisent la production d'importants médiateurs inflammatoires comme l'acide nitrique et les cytokines. Leurs spores sont capables de stimuler des macrophages pulmonaires, entraînant des réactions inflammatoires qui endommagent ensuite le tissu (Reponen *et al.*, 1998 ; Jussila *et al.*, 2001).

La détection des actinomycètes pathogènes dans les produits pathologiques se fait par la mise en évidence des filaments ramifiés caractéristiques de ces bactéries dans le produit pathologique. Dans les actinomycétomes, il faut prélever du pus chargé de grains si possible à l'intérieur d'une fistule non ouverte. La couleur et la taille des grains peuvent orienter le diagnostic. Les agents étiologiques sont divisés en deux groupes. Le premier renferme les agents d'actinomycétomes à grains visibles à l'œil nu: *A. madurae* (grains blancs), *A. pelletieri* (grains rouges), *S. somaliensis* (grains durs et jaunes). Le second renferme les actinomycétomes à petits grains invisibles à l'œil nu, dus à *N. brasiliensis* surtout, mais parfois à *N. asteroides* (Simonet, 1991).

Leur culture est obtenue sur des milieux classiques tels que Bennet et Sabouraud (Mariat et Sebald, 1990). Il est fortement recommandé de laisser en culture les prélèvements au moins 2 semaines avant que tout résultat définitif ne soit rendu, afin de diminuer le risque d'un faux diagnostic négatif (Coker *et al.*, 1992). Ainsi, le pourcentage de positivité des cultures peut passer de 30 % en 48 heures d'incubation à 50% après 5 jours (Simpson *et al.*, 1982).

4- Caractères cultureux et physiologiques des actinomycètes aérobies pathogènes

- *Nocardia asteroides*

Cette espèce est caractérisée par la formation d'un mycélium primaire (de substrat), fragmentée habituellement en éléments bacilliformes ou coccoïdes (**figure 4**). Le mycélium aérien peu important, produisant dans quelques cas de courtes chaînes de spores. Les jeunes filaments ramifiés ont une morphologie caractéristique en zigzag. Les colonies formées par cette espèce sont d'aspect variable. Deux aspects macroscopiques principaux s'observent sur gélose de Sabouraud.

- La colonie peut être plate ou légèrement surélevée. La surface mamelonnée peut être recouverte d'un court duvet blanchâtre du mycélium aérien qui masque la couleur de la colonie. Le revers de la colonie est dans les tons jaune-orangé à brun.
- La colonie est finement cérébriforme ou sillonnées, le pigment varie du beige au jaune orangé, au brun jaune ou même au jaune rosé passant par tous les intermédiaires.

Les filaments de *N. asteroides* sont à coloration de Gram positive. Ils présentent une acido-alcool-résistance partielle quand ils sont colorés par des méthodes à différenciation douce (**Marit et Sebald, 1990**). Les caractères physiologiques de cette espèce sont mentionnés dans le **tableau 1**.

- ***Nocardia brasiliensis***

Sur le milieu de Sabouraud ou le milieu de Bennett, les colonies sont bien développées et la plupart des souches donnent des colonies surélevées. Cependant, La fragmentation du mycélium est moins prononcée que celui de *N. asteroides*, ce qui se traduit par une consistance plus dure des colonies. L'acido-alcool-résistance des cellules de *N. brasiliensis* est du même type que celle de *N. asteroides*. Les caractères physiologiques de cette espèce qui est douée d'un potentiel enzymatique plus développé que *N. asteroides* figurent dans le **tableau 1**.

- ***Actinomadura madurae* et *Actinomadura pelletieri***

Ces deux espèces sont toutes deux responsables de l'actinomycétome. Leur mycélium de substrat est très ramifié et le mycélium aérien est plus ou moins abondant. De courtes chaînettes souvent enroulées à leurs extrémités peuvent être observées sur le mycélium aérien (**figure 4**). Sur gélose Sabouraud, les colonies sont caractéristiques bien que variable à l'intérieur de la même espèce (**Mariat et Sebald, 1990**). Les souches du genre *Actinomadura* sont non acido-alcool-résistantes. Les propriétés physiologiques signalées dans le **tableau 1** distinguent les deux espèces.

- ***Streptomyces somaliensis***

Les filaments du mycélium de substrat sont longs et ramifiés, pratiquement non fragmentés. De longues chaînes de spores sont observées sur le mycélium aérien qui est très abondant (**figure 4**). Sur gélose Sabouraud les colonies deviennent cérébriformes ou plissées et surélevées. Le revers de la colonie est jaune ocre. Les filaments de *Streptomyces somaliensis* sont à coloration de Gram positive, non acido-alcool-résistants. Les propriétés physicochimiques de cette souche sont résumées dans le **tableau 1**.

5- Maladies provoquées par les actinomycètes aérobies pathogènes

5.1- La nocardiose

5.1.1- Généralités

La nocardiose est une maladie infectieuse provoquée par les espèces appartenant au genre *Nocardia*. L'infection peut être, pulmonaire, cérébrale, cutanée ou disséminée (**Beaman et Beman, 1994; Conville et al., 2004**). Ces infections sont surtout contractées par inhalation, plus rarement par voie digestive ou cutanée (**Avril et al, 1992; Saubolle et Sussland, 2003**).

C'est une infection opportuniste observée chez des patients immunodéprimés (**Holtz et al., 1985; Lerner, 1996**). Elle peut être associée à d'autres pathologies opportunistes comme l'aspergillose (**Holt et al., 1993**), la pneumocystose (**Perschak et al, 1991**). Une corticothérapie au long cours est le facteur prédisposant majeur (**Curry 1980 ; Presant et al. 1973**), mais aussi, les traitements immunosuppresseurs lors de transplantation d'organes, les cancers et les collagénoses (**Filice, 1993**).

Bien que la nocardiose soit considérée, le plus souvent, en tant qu'infection acquise par communauté, des manifestations nosocomiales ont été rapportées chez les patients immunodéprimés. Généralement, cette transmission aérienne nosocomiale a lieu dans les hôpitaux faisant l'objet de travaux de réfection ce qui a permis d'évoquer une transmission par les poussières dégagées dans l'environnement (**Sahathvan et al.,1991 ; Stevens, 1981**). Une transmission inter-humaine a pu être mise en évidence notamment chez un patient présentant une nocardiose urinaire (**Houang et al., 1980**).

5.1.2- Epidémiologie

La nocardiose a été décelée dans la plupart des régions du monde (**Kano et al., 2002**). En France, 150 à 250 cas de nocardiose sont diagnostiqués chaque année (**Boiron et al., 1992**). Aux États-Unis et dans d'autres pays, la nocardiose est habituellement identifiée en tant qu'infection sporadique, acquise par communauté, bien qu'il y ait eu quelques rapports des manifestations nosocomiales (**Cox et Huges, 1975 ; Presant et al., 1973 ; Beaman et al., 1976**). Elle paraît présenter une prédilection à peine supérieure pour les hommes que pour les femmes. Tous les âges peuvent être concernés, mais plus de 50 % des sujets sont entre 45 et 60 ans (**Boiron, 1998**).

Tableau 2: les espèces de *Nocardia* impliquées dans les infections humaines d'après **Roth et al. (2003)**

<p>Généralement associées avec les infections</p>	<p>Rarement associées avec les infections</p>
<p><i>Nocardia asteroides</i> <i>Nocardia brasiliensis</i> <i>Nocardia farcinica</i> <i>Nocardia nova</i></p>	<p><i>Nocardia otitisdiscaviarum</i> <i>Nocardia pseudobrasiliensis</i> <i>Nocardia abscessus</i> <i>Nocardia africana</i> <i>Nocardia brevicatena</i> <i>Nocardia carnea</i> <i>Nocardia paucivorans</i> <i>Nocardia transvalensis</i> <i>Nocardia veterana</i></p>

Treize espèces ont été impliquées dans des infections humaines (**tableau 2**). Récemment, *Nocardia arthritidis*, une nouvelle espèce pathogène isolée chez un patient présentant l'arthrite rhumatoïde au Japon (**Kageyama et al., 2004 a**). Aussi, *Nocardia kruczakiae* et *Nocardia asiatica* ont été isolées, respectivement, par **Conville et al. (2004)** et **Kageyama et al., (2004 b)**, chez des patients présentant la nocardiose.

5.1.3- Manifestations cliniques

Le poumon est atteint dans 60 à 80 % des cas (**Filice, 1993**). *Nocardia asteroides* est la cause la plus commune de **la nocardiose pulmonaire**, elle est à l'origine d'au moins de 80% des cas (**Brown et Mc Neil, 2003**). Le système nerveux central représente la localisation métastatique la plus fréquente (44 %). **La nocardiose cérébrale** peut avoir des signes cliniques comme elle peut être silencieuse (**Bross et Gordon, 1991**). **La nocardiose cutanée primitive** résulte d'une inoculation traumatique des microorganismes dans la peau par l'intermédiaire d'une épine, d'une piqûre d'insecte. Leur croissance reste localisée et se limite à la formation d'un abcès cutané et/ou sous-cutané. **La nocardiose lymphocutanée** est produite après dissémination à partir d'un foyer cutané primaire, par voie lymphatique. Cette forme clinique est appelée aussi forme sporotrichoïde de la nocardiose cutanée. **La nocardiose cutanée secondaire** résulte de la dissémination par voie hématogène à partir d'un foyer, le plus souvent pulmonaire. Cette infection s'observe principalement chez les immunodéprimés et se présente soit sous forme d'abcès sous-cutanés uniques ou multiples qui peuvent se fistuliser (**Freland et al., 1995**).

À côté des atteintes cérébrales et cutanées, presque tous les autres organes peuvent être atteints, de façon secondaire. Les divers organes atteints sont : la plèvre et la paroi thoracique (8 % de cas), l'œil (3%), les ganglions lymphatiques (3 %) et d'autres localisations (10 %) comme le pancréas, le cœur, les articulations, les reins, la rate, les intestins, le péritoine, la thyroïde, la cavité buccale et la trachée (**Beaman et al., 1976**).

5.1.4- Traitement

La majorité des souches est résistante à la vancomycine, au chloramphénicol, à l'érythromycine et à la clindamycine. La plupart des souches de *Nocardia* sont résistantes aux pénicillines par production d'une β -lactamase inhibée par l'acide clavulanique (**Kitzis et al., 1985; Ambaye et al., 1997**). Cependant, la grande majorité des souches est sensible



Figure 5: le pied de Madura (**Raoult, 1998**)

Tableau 3 : la répartition géographique des agents étiologiques des actinomycétomes (**Raoult, 1998**)

microorganismes	Répartition géographique
<i>Actinomadura madurae</i>	cosmopolite
<i>Actinomadura pelletieri</i>	Afrique
<i>Nocardia brasiliensis</i>	Amérique du Sud et Amérique du Nord
<i>Nocardia asteroides</i>	cosmopolite
<i>Nocardia otitidiscaviarum</i>	Afrique du Sud, Inde
<i>Streptomyces somaliensis</i>	Afrique de l'Est, Moyen-Orient, Amérique centrale

aux sulfamides, surtout le sulfaméthoxazole dont l'action peut être renforcée par le triméthoprime (Collins, 1988). La durée de l'antibiothérapie, de six à douze mois, est conditionnée par la localisation, la sévérité de l'infection et le statut immunitaire du malade (Collins, 1988; Lerner, 1996).

5.2- L'actinomycétome

5.2.1- Généralités

C'est une infection sous-cutanée chronique due aux actinomycètes aérobies : *Noardia sp*, *Actinomadura madurae*, *Actinomadura pelletieri* et *Sreptomyces somaliensis*. L'homme s'infecte par inoculation directe des microorganismes sous la peau au cours d'un traumatisme cutané ou après piquûre par des épines souillées. Son évolution est lente et progressive (Sy et al., 2003).

Elle est localisée le plus souvent aux membres inférieurs. En effet, dans les zones rurales surtout où les ouvriers travaillent avec les pieds nus, elle provoque dans ce cas ce qu'on appelle "le pied de Madura" (figure 5). Cependant, elle peut se présenter dans divers emplacements du corps tels que le bras, le dos et la nuque (Abd El Bagui et al., 2003; Lum et Vandmal, 2003).

Elle débute par un nodule sous-cutané indolore, qui augmente lentement de taille et peut devenir purulent et nécrotique. Du pus peut s'écouler des fistules qui se forment. Une inflammation granulomateuse se produit avec tuméfaction des régions environnantes. L'actinomycétome reste généralement localisé mais peut s'étendre à travers les tissus. Avec le temps une ostéomyélite destructive peut s'installer (Freland et al., 1995).

La prédominance des agents étiologiques varie d'une région à une autre (tableau 3). En effet, en Amérique du sud et en Amérique du Nord, *Nocardia brasiliensis* est la principale cause des actinomycétomes, cependant en Afrique, *S. somaliensis* est l'espèce prédominante (Raoult, 1998). Récemment, *Streptomyces albus* et *Nocardia mexicana* ont été isolés à partir d'un actinomycétome, respectivement, par Martin et al., (2004) et Rodriguez-Nava et al. (2004).

5.2.2- Epidémiologie

Les actinomycétomes sont des affections endémiques essentiellement rencontrées en Afrique, en Asie, en Amérique centrale et en Amérique du Sud. Il existe des cas sporadiques en Afrique du Nord (**Raoult, 1998**). Les hommes sont plus fréquemment atteints que les femmes à peu près 4 hommes pour une femme. La maladie étant habituellement observée pendant la période la plus active de la vie, entre 20 et 40 ans (**Mariat et Sebald , 1990**).

En Inde, 94 cas d'actinomycétomes ont été diagnostiqués en 1980. Ce nombre a presque doublé en 1990 (**Maiti et Bandyopadhyay, 2002**). Au Mexique une étude a montré que sur une période de 30 années (1956-1985) ; 2015 cas d'actinomycétome ont été enregistrés, avec une moyenne de 70 cas par an. Plus de 75 % de malades sont de sexe masculin, leur âge varie de 16 à 40 ans. La plupart des cas se sont produits chez les ouvriers et chez les femmes au foyer en zone rurale (**Lopez Martinez et al., 1992**).

5.2.3- Traitement

Le traitement de l'actinomycétome est avant tout chirurgical avec drainage et nettoyage des lésions infectieuses. Parfois, une amputation peut être nécessaire en cas de lésions très évoluées. Une antibiothérapie prolongée, à base de sulfamides, est généralement établie en complément au traitement chirurgical (**Simonet, 1991 ; Carey et al., 2001 ; McNeil et al., 1990**).

MATERIEL
&
METHODES

1- Isolement des souches à Gram positif et à aspect mycélien

1.1- La population étudiée

La population étudiée est de 102 patients hospitalisés dans le service des maladies infectieuses, au niveau du CHU de Constantine. Les patients visés sont ceux qui paraissent présenter soit les symptômes de la nocardiose et/ou de l'actinomycétome, soit des facteurs favorisants tels que la tuberculose, les pneumopathies, le diabète et la corticothérapie au long cours. Une fiche de renseignement accompagne les prélèvements des patients concernés. Elle est remplie par le médecin traitant (**figure 6**).

1.2- Collecte et transport des prélèvements

Ils sont effectués selon les recommandations de **Raoult (1998)** et **Martin *et al.* (2004)**

Ø Expectoration (crachat)

Le prélèvement est effectué, à jeun, dans l'heure suivant le lever et après un rinçage bucco-dentaire. Le crachat est recueilli dans un pot stérile étanche. Il est nécessaire d'expliquer au patient la nécessité d'obtenir du mucus bronchique par un effort de toux (et non de la salive).

Ø Tubage gastrique (crachat)

Il est utilisé pour les patients incapables de cracher. Ils sont réalisés au lever, à jeun, pour que les expectorations dégluties pendant la nuit soient prélevables. Le prélèvement se fait par aspiration du liquide gastrique à l'aide d'une sonde lubrifiée introduite par la bouche ou par le nez. Ce prélèvement est réalisé par le personnel du corps paramédical.

Ø Prélèvement du pus

Il est réalisé par un écouvillonnage quand l'abcès est ouvert. Il consiste, d'abord, à nettoyer la périphérie de la plaie par de l'eau physiologique, puis, repérer les traces purulentes qui devront être échantillonnées. En leur absence, le prélèvement devra être effectué au fond de la plaie qui est peu accessible aux contaminants. On réalise deux écouvillons, un pour l'examen direct après coloration et l'autre pour la culture. Quand l'abcès est fermé le pus est recueilli par seringue, après désinfection de la peau à l'alcool.

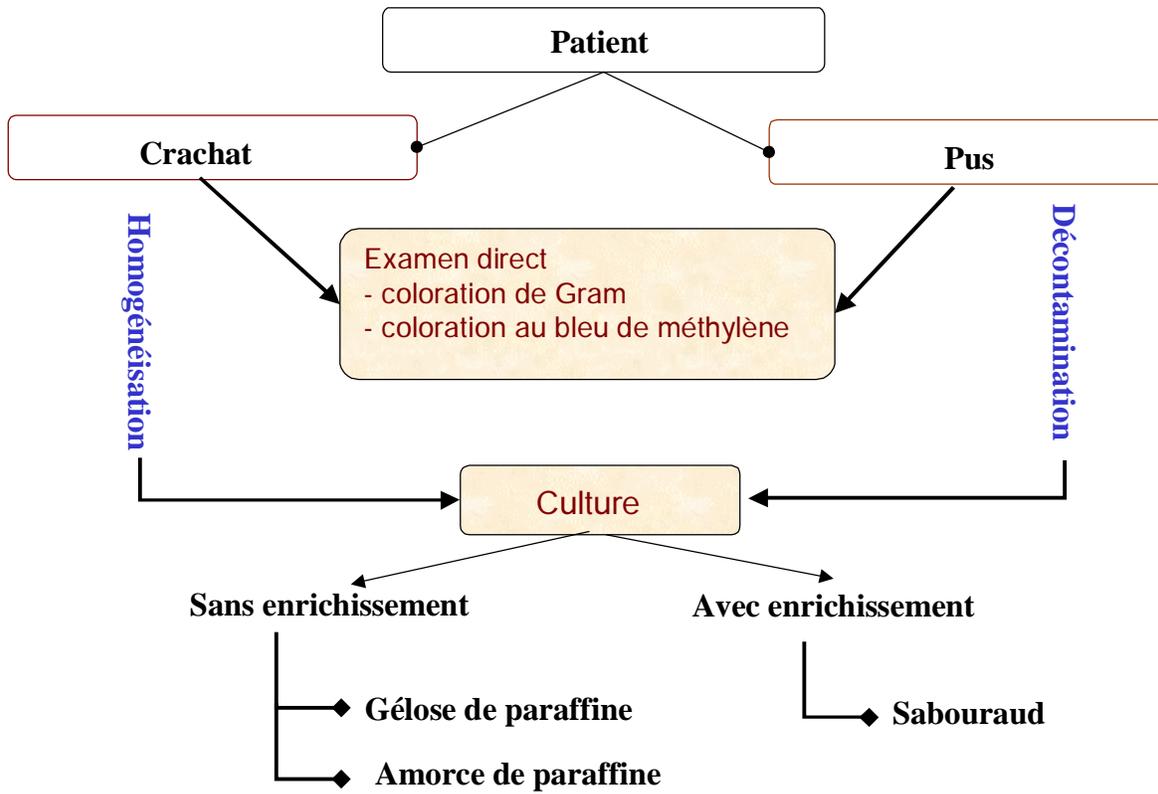


Figure 7 : le protocole d'isolement des actinomycètes aérobies à partir du crachat et du pus.

Après la collecte, les prélèvements sont acheminés, immédiatement, au laboratoire dans une glacière. Ils sont analysés dès l'arrivée au laboratoire, dans le cas contraire, ils sont placés dans un réfrigérateur à +4°C.

1.3- Préparation des prélèvements

La préparation des prélèvements est réalisée selon les recommandations de **Singh et al. (1987)**, **Ayyar et al. (1992)** et **Tendolkar et al. (1998)**.

Ø Homogénéisation et fluidification des crachats

Cette opération est réalisée par l'agitation au vortex en présence de billes en verre. Elle permet de libérer les microorganismes retenus dans les filaments du mucus.

Ø Décontamination du pus

On ajoute au pus du KOH à 10%. Ce mélange est agité au vortex pendant quelques secondes.

1.4- L'examen direct des prélèvements après coloration

Coloration au bleu de méthylène

Les frottis sont examinés à l'objectif (x 40) pour apprécier la présence des mycètes et des levures.

Coloration de Gram

La coloration différentielle de Gram d'un prélèvement multibactérien permet de déceler les formes morphologiques des différentes bactéries. Cet examen est fait sur des frottis minces préparés à partir des prélèvements, séchés puis fixés avec le méthanol. Ils sont examinés avec un objectif à immersion (**Tendolkar et al., 1998**).

1.5- Mise en culture

Après préparation des prélèvements (**figure 7**), et dans un but d'isoler les actinomycètes, chaque échantillon est cultivé sur les milieux : Sabouraud, gélose à la paraffine et amorce de paraffine (**annexe 1**). Tous les milieux ensemencés sont incubés à 37 °C en aérobiose pendant 3 à 4 semaines.

1.5.1- Ensemencement direct

La gélose à la paraffine (PA)

C'est un milieu sélectif qui favorise principalement la croissance des espèces du genre *Nocardia*. Mais aussi la croissance des *Streptomyces* sp. et des *Mycobacterium* sp. (Shawar *et al.*, 1990; Ayyar *et al.*, 1992).

L'amorce de paraffine (Paraffine Baiting)

Nocardia asteroides, contrairement aux autres actinomycètes aérobies, est la seule souche capable de croître sur ce milieu qui ne contient que de la paraffine solide inclinée comme source de carbone. 2 ml de l'échantillon est ajouté à un tube contenant de la paraffine et 5 à 7 ml du bouillon de McClung exempt de carbone (**annexe 1**) (Singh *et al.*, 1987).

1.5.2- Ensemencement après enrichissement

Avant l'ensemencement sur **gélose Sabouraud**, l'échantillon est incubé de 1 à 4 jours dans un milieu d'enrichissement liquide CFB (**voir annexe 1**) qui permet la multiplication des actinomycètes aérobies par rapport à la flore totale (Singh *et al.*, 1987; Maiti *et al.*, 2003).

1.6- Purification et conservation des souches isolées

1.6.1- Prélèvement des colonies

Après la période d'incubation, les colonies sont examinées à l'aide d'une loupe binoculaire et celles qui présentent un aspect caractéristique à celui des actinomycètes sont prélevées à l'anse, et sont mises en suspension dans un peu d'eau physiologique contenue dans un tube à hémolyse.

1.6.2- Culture sur milieu sélectif

Les colonies prélevées sont ensemencées en stries sur le milieu amidon-caséine (**voir annexe 1**) additionné d'antibiotiques (la nystatine 50 µg/l et l'acide nalidixique 10µg/ml). Cette opération est répétée, autant de fois que nécessaire, jusqu'à obtention d'une souche pure (Takizawa *et al.*, 1993; Oskay *et al.*, 2004). Une coloration de Gram est faite à chaque fois, pour contrôler la pureté des souches.

Les souches pures obtenues sont cultivées sur le milieu Glucose Asparagine (**annexe 1**), pendant deux semaines, puis entretenues à 5-10°C et stockées à -20°C en suspension dans du glycérol à 10% (**Cavalla et Éberlin, 1994 ; Mansour, 2003**).

1.6.3- Morphologie microscopique

Elle est réalisée par la technique des lames. Les souches sontensemencées dans des milieux gélosés fondus maintenus à 45° C et repartis dans des tubes. 1 ml de chaque milieu est prélevé aseptiquement à l'aide d'une pipette, est déposé sur une lame stérile. La gélose une fois solidifiée est couverte d'une lamelle. Ces lames sont incubées sous atmosphère humide à 28°C. Elles sont examinées au microscope optique à 4, 7 et 14 jours (**Gordon et Smith 1954 ; Williams et Cross, 1971; Oskay et al., 2004**). La présence des deux mycéliums aériens et/ou de substrat est notée.

1.7- Détermination du type respiratoire

Elle a été effectuée selon les recommandations de **Guiraud (1998)**. La gélose profonde viande foie (VF) répartie en tube (**voir annexe 1**) est régénérée par un chauffage de 30 minutes au bain-marie bouillon. Puis elle est refroidie jusqu'à 45°C etensemencée à l'aide d'une pipette Pasteur qui est plongée au fond du tube, puis remontée en décrivant une spire, de façon àensemencer uniformément le milieu sur toute la hauteur. Après refroidissement et solidification, le milieu est mis à incuber à 35 ° C pendant 21 jours.

1.8- Détermination de la température optimale de la croissance

Le milieu utilisé pour déterminer la température optimale de croissance est le milieu de Sporulation Agar (**annexe 1**). Les boîtesensemencées sont incubées à différentes températures: 25, 35, 45 et 50°C pendant 2 semaines (**Mc Neil, 1994; Chun et al., 1998**).

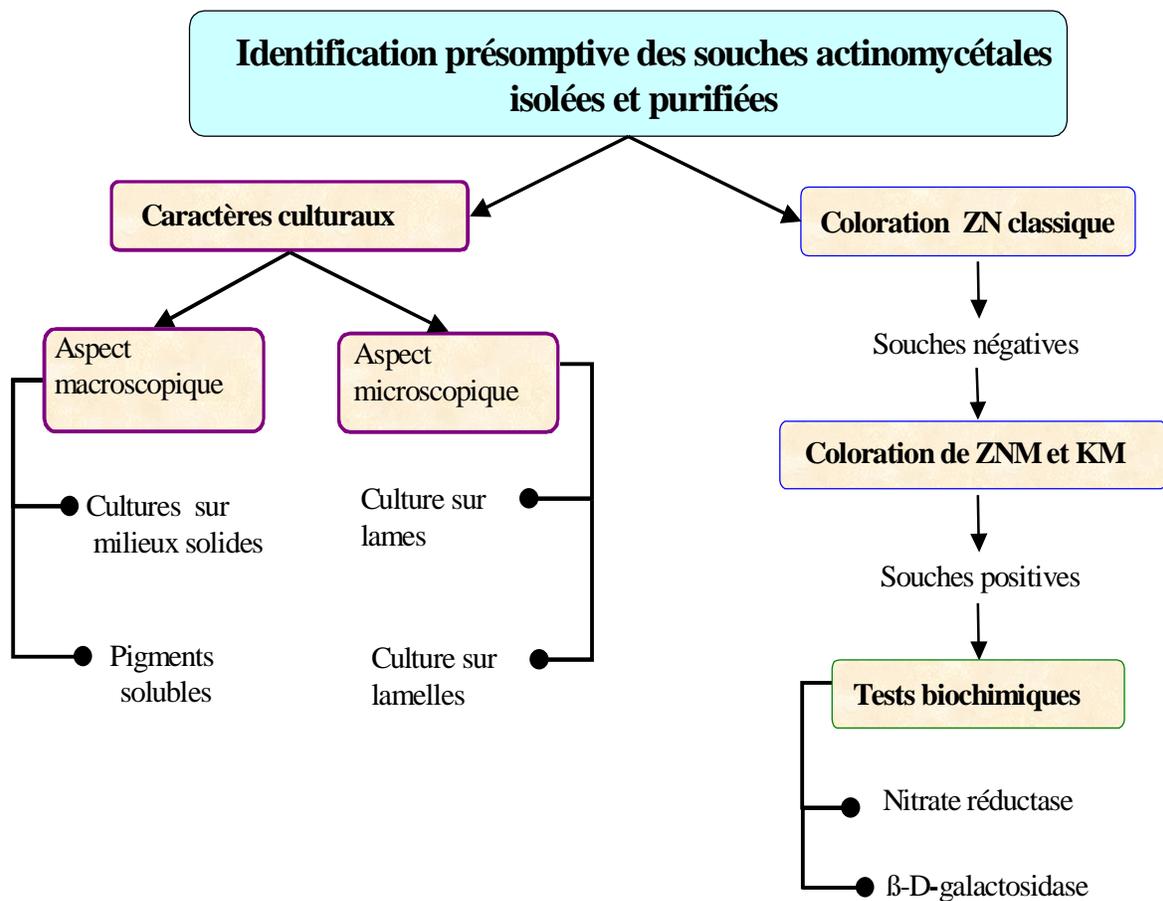


Figure 8 : identification présumptive des souches actinomycétales pures

ZN (Ziehl Neelsen), ZNM (Ziehl Neelsen modifiée), KM (Kinyoun modifiée)

2- Identification présomptive des souches isolées et purifiées

Elle est basée sur les caractères cultureux et l'acido-alcool-résistance (**figure 8**).

2.1- Caractères cultureux

2.1.1- Aspect macroscopique

L' inoculum est préparé selon le protocole de **Shirling et Gottlieb (1966)**. Pour les souches qui n'ont pas encore produit de spores, des fragments de mycélium de substrat sont transférés dans un tube contenant (3 ml) d'eau distillée stérile ; ensuite, ces fragments sont écrasés stérilement à l'aide d'une tige en verre. Si les spores sont formées, une suspension sporale très trouble est préparée en raclant la surface de la colonie. Les suspensions d'inoculum sont préparées à chaque essai.

- **Culture sur les milieux "International Streptomyces Project " (ISP)**

Les milieux ISPS₂ ; ISP₃ ; ISP₄ ; ISP₅ (**voir annexe 1**) sont refroidis à environ 50°C puis distribués aseptiquement dans les boîtes de Pétri stériles. Ces boîtes sont incubées pendant 24 heures à 28°C afin de sécher la surface de la gélose et de contrôler la stérilité. Puis, elles sont inoculées par des suspensions sporales à raison de 2 à 4 gouttes par boîte. L'aspect macroscopique des colonies est observé tous les 7, 14 et 21 jours comme le préconisent **Shirling et Gottlieb (1966)** ; **Mocheva et al., (2002)** et **Oskay et al., (2004)**.

- **Culture sur le milieu Agar blanc (TWA)**

Chaque souche est cultivée, d'abord, dans le bouillon de glucose (**annexe 1**), puis ces cultures servent d'inoculum pour le milieu Agar blanc TWA (**annexe 1**). La croissance et l'aspect des colonies, la formation des hyphes et des spores sont examinés à 5, 10 et 15 jours d'incubation à 28° C (**Berd, 1973**; **Mishra et al., 1980**; **Mc Neil et Brown, 1994**).

- **Détermination de la couleur du mycélium du substrat**

La couleur du mycélium de substrat est déterminée selon la méthode décrite par **Shirling et Gottlieb (1966)**. Une parcelle de la gélose est découpée à partir des cultures matures, puis déposée sur un support désinfecté au préalable. L'excès de la gélose est éliminé par une lame de rasoir et la couleur est notée.

- **Pigments mélanoides**

Les milieux ISP₆ et ISP₇ (**annexe 1**) en gélose inclinée sont ensemencés en surface pour mettre en évidence les pigments mélanoides produits par les actinomycètes. Un tube non ensemencé sert de témoin. L'observation de la couleur brune noire caractéristique des pigments mélanoides se fait au 2^{ème} jour et au 4^{ème} jour, en comparant les tubes ensemencés avec le témoin (**Shirling et Gottlieb, 1966; Mocheva et al., 2002**).

- **Pigments autres que mélanoides**

Si les pigments solubles autres que le brun-noir sont produits sur n'importe quel milieu, leurs couleurs sont notées, puis, leur sensibilité au changement de pH est testée par l'addition d'une goutte d'une solution de NaOH 0,05 N ou d'une solution HCl 0,05 N. Après 10 à 15 minutes, le changement de la coloration est noté (**Shirling et Gottlieb, 1966**).

2.1.2- Aspect microscopique

- **Technique des lames**

Celle-ci a été décrite dans le paragraphe " Morphologie microscopique " de la page 25.

- **Technique des lamelles**

Cette technique a été décrite par **Williams et Cross (1971)** et **Liu et al. (2005)**. Une partie d'une colonie isolée est broyée stérilement avec une tige en verre, puis introduite dans 3 à 4 gouttes d'eau distillée et déposée sur une lamelle fermement fixée au milieu ISP₂ (**voir annexe 1**) et faisant un angle de 45°. Les boîtes sont ensuite incubées à 30°C. Après 7, 14 et 21 jours d'incubation les lamelles sont retirées puis déposées sur une lame et observées sous microscope (x 100).

2.2 – L'acido-alcoolo-résistance et tests biochimiques

2.2.1- L'acido-alcoolo-résistance

La technique de **Gordon et Smith (1954)** a été employée pour la préparation des frottis des souches actinomycétales purifiées. Les frottis sont préparés à partir des cultures de 5 jours d'incubation sur le milieu GSEA (**voir annexe 1**). Ils sont ensuite fixés par du méthanol à froid.

- **Coloration de Ziehl-Neelsen (ZN)**

Les frottis sont recouverts de fuschine de Ziehl à chaud, émission de vapeur sans ébullition, pendant 10 minutes. Il sont lavés à l'eau distillée, puis décolorés pendant 5 minutes par le décolorant de ZN (**annexe 1**). Ensuite les frottis sont lavés à l'eau distillée, séchés et observés à l'objectif à immersion (x 100). Les cellules des mycobactéries qui sont acido-alcoolo-résistantes apparaissent en rouge vif, alors que celles des autres actinomycètes aérobies prennent la coloration du bleu de méthylène (**Larpent et Larpent – Gourgaud, 1985 b; Hamid et al., 2001**).

- **Coloration de ZN modifiée (ZNM)**

Elle est réalisée selon le protocole de **Gordon et Smith (1954)**. Les frottis sont immergés dans une solution de carbolfuschine (**voir annexe 1**) puis chauffés pendant 5 minutes. Les lames sont ensuite lavées à l'eau, décolorées par l'acide-alcool (**annexe 1**), lavées à l'eau, et enfin contre colorées avec le bleu de méthylène. Les actinomycètes acido-alcoolo-résistants partiels apparaissent en rose. La coloration de Ziehl-Neelsen modifiée (ZNM) met en évidence l'acido-alcoolo-résistance partielle des *Nocardia* et genres apparentés.

- **Coloration de Kinyoun modifiée**

Cette coloration a été décrite par **Georg et al. (1961)** et **Del Mar Thomas et al. (2005)**. Elle permet, d'une part, de mettre en évidence l'acido-alcoo-résistance partielle des *Nocardia* et genres apparentés, d'autre part, de distinguer les *Streptomycetes* parmi les autres actinomycètes non acido-alcoolo-résistants (**Mc Neil et Brown, 1994**).

Les frottis sont d'abord colorés avec la carbolfuschine à froid (**voir annexe 1**) pendant 5 minutes. Ensuite, ils sont lavés brièvement (3 à 5 secondes) avec de l'éthanol 50%, puis complètement rincés avec de l'eau de robinet. La décoloration est faite avec de l'acide sulfurique 1% pendant 2 minutes, suivi d'un rinçage à l'eau. La contre coloration est réalisée avec le bleu de méthylène pendant 1 minute. Enfin, les frottis sont lavés, séchés et observés à l'objectif à immersion. Comme pour la coloration de ZNM les souches acido-alcoolo-résistantes partielles apparaissent sous forme de filaments roses et bleus et les *Streptomycetes* sp. apparaissent sous forme de filaments bleus et cocci roses.

2.2.2- Tests biochimiques

- **Test Bêta-Galactosidase**

Cette activité enzymatique a été recherchée par l'utilisation de disques ONPG selon le protocole de **Flores *et al.* (1990)**. Les souches actinomycètes pures sont d'abord cultivées sur la gélose à la cervelle et au cœur de veau (**voir annexe 1**) pendant 5 jours. A partir de ces cultures, une suspension épaisse est préparée dans 0,5 ml d'eau distillée et dans laquelle un disque ONPG est introduit. Après une incubation de 18 heures à 35°C, le développement d'une couleur jaune est noté.

- **La réduction des nitrates**

10 ml de bouillon nutritif (**annexe 1**) contenant 0,1% de nitrate de potassium sont ensemencés et incubés à 30°C. Aux 5^{ème}, 10^{ème}, 14^{ème} jours d'incubation, 3 gouttes de chacun des réactifs de Griess I et II sont ajoutées à 1 ml de culture. La réduction des nitrates en nitrites est mise en évidence par l'apparition d'une coloration rouge. En l'absence de cette coloration, quelques milligrammes de poudre de zinc sont alors ajoutés, s'il y a :

- apparition de la coloration rouge: les nitrates du milieu ne sont pas réduits par la souche (**résultat négatif**).
- absence de coloration: les nitrates sont réduits au-delà du stade des nitrites (**résultat positif**) (**Gordon et Smith, 1953**).

3- Etude statistique

Elle a été réalisée par :

- le test de O'Quigley, pour la comparaison de plusieurs pourcentages quand les effectifs théoriques sont faibles.
- le test de Student, pour la comparaison de deux proportions observées (effectué par le Logiciel Statitcf version 5.0)

RESULTATS
&
DISCUSSIONS

1- Isolement des actinomycètes

1.1- Examen direct des 102 prélèvements

Les cent deux prélèvements collectés de janvier à juillet 2005 sont constitués de soixante-dix huit échantillons de crachat et de vingt-quatre échantillons de pus. Les échantillons de crachat ont été recueillis par expectoration (soixante et onze) et par tubage gastrique (sept) pour les malades ne pouvant pas cracher. Les prélèvements ont été répartis en neuf groupes.

Les observations de l'examen direct des cent deux prélèvements après coloration sont rassemblées dans le **tableau 4**. Elles montrent que les prélèvements du pus (groupe A et B) contiennent des cocci à Gram positif disposés en amas et que ceux du groupe A contiennent en plus des levures et des leucocytes.

Tous les prélèvements de crachat contiennent des cocci à Gram positif disposés en chaînettes. Les prélèvements du groupe D et du groupe G contiennent des mycètes et ceux du groupe E, F et H révèlent la présence des cellules épithéliales.

Les fins filaments à Gram positif, les bacilles à Gram positif, les cocci à Gram négatif et les coccobacilles à Gram négatif sont observés, respectivement, dans les prélèvements des groupes C, E, G et F.

1.2- Prélèvements des colonies actinomycétales

Trois milieux de culture ont étéensemencés par les 102 prélèvements et après 21 jours d'incubation à 28°C, les colonies présentant l'aspect macroscopique (bord filamenteux) caractéristique des actinomycètes sont prélevées. Ainsi, 20 et 12 colonies ont été prélevées, respectivement, de la gélose à la paraffine et du milieu Sabouraud. Aucun développement microbien n'a été observé sur le milieu amorce de paraffine.

Tableau 4 : examen direct, après coloration, des 102 prélèvements

Groupe	N° du prélèvement	Nature du prélèvement	Coloration de Gram (x 100)	Coloration au bleu de méthylène (x 40)		
				Présence de		
				Levures	Mycètes	Autres
A	2-9-22-24-33-34- 35-65-85-50	P	Cocci à Gram positif disposées en amas	+	-	L
B	6-8-15-23-32-36- 37-50-60-69-70- 72-1-83	P	Cocci à Gram positif disposées en amas	-	-	-
C	5-21-31-44-46- 102-27	Cr	Cocci à Gram positif disposées en chaînettes et fins filaments à Gram positif	-	-	-
D	25-45-64-39-73- 78-92-94	Cr	Cocci à Gram positif disposées en chaînettes	-	+	-
E	3-38-40-42-43-51- 52-57-66-68-63	Cr	Cocci à Gram positif disposées en chaînettes et bacilles à Gram positif	-	-	C.E
F	7-12-14-17-18-19- 20-30-45-47-86- 87-89-91-100-101	Cr	Cocci à Gram positif disposées en chaînettes et coccobacilles à Gram négatif	-	-	C.E
G	11-28-41-99-82- 54-49-60-81-75	Cr	Cocci à Gram positif disposées en chaînettes et cocci à Gram négatif	-	+	-
H	62-59-56-26-10- 77-90-80	Cr	Cocci à Gram positif disposées en chaînettes et cocci à Gram positif disposées en amas	-	-	C.E
I	67-93-95-58-16- 61-74-55-98-96- 53-4-79-88-84-29- 76-97	Cr	Cocci à Gram positif disposées en chaînettes.	-	-	-

Cr: crachat; P : pus ; L : leucocytes; C.E : cellules épithéliales

Tableau 5 : aspect macroscopique des colonies, à bordure filamenteuse, prélevées

Milieu d'isolement	Nature du prélèvement	N° du prélèvement	Nombre de colonies prélevées	L'aspect macroscopique des colonies
Gélose à la paraffine	C _r	3	1	couleur rouge brun, plate
	C _r	5	1	couleur blanche, plate
	C _r	21	4	couleur rose, grise, blanche et beige, plates
	P	22	1	couleur beige, plate
	C _{rt}	31	1	couleur grise, plate
	C _r	27	1	couleur blanche, légèrement surélevée
	C _r	38	1	couleur beige, plate
	C _r	40	2	couleur grise, plate
	C _r	41	1	couleur rose, surélevée
	C _{rt}	42	1	couleur beige, plate
	C _{rt}	43	2	couleur beige et grise, plates
	C _r	44	1	couleur grise, légèrement surélevée
	C _r	60	1	couleur grise, plate
	C _r	63	1	couleur grise, légèrement surélevée
C _r	68	1	couleur grise, plate	
Sabouraud	C _r	46	3	couleur beige, crème et grise, plates
	C _r	51	1	couleur blanche, plate
	C _r	52	1	couleur beige, plate
	C _r	53	1	couleur beige, plate
	C _r	57	1	couleur beige, plate
	C _r	66	1	couleur brun noir, plate
	C _r	75	1	couleur blanche, surélevée
	C _r	83	1	couleur blanche, surélevée
	C _r	100	1	couleur blanche, légèrement surélevée
	C _r	102	1	couleur blanche, beige, plates

C_r : crachat ; C_{rt} : Crachat recueilli par tubage gastrique ; P : pus.

1.3- Aspect macroscopique des colonies prélevées

Les observations rassemblées dans le **tableau 5** montrent l'aspect macroscopique des trente-deux colonies prélevées, ceci par rapport au milieu d'isolement et au type de prélèvement. Toutes les colonies prélevées proviennent des échantillons de crachat, à l'exception d'une seule.

1.4- Purification des colonies prélevées

Les colonies prélevées ont été purifiées par ensemencement en stries sur le milieu amidon-caséine additionné d'antifongique et d'antibactérien. Sur les trente-deux colonies prélevées et purifiées, seulement vingt souches développent un mycélium de substrat et un mycélium aérien, et trois souches développent uniquement un mycélium de substrat. Ainsi, vingt-trois souches sont retenues comme étant actinomycétales, sur trente-deux colonies prélevées et purifiées.

L'utilisation du milieu amidon-caséine additionné de la nystatine à 50 µg/ml et de l'acide nalidixique à 10 µg/ml, a permis d'éliminer les espèces fongiques et les bactéries à Gram négatif. Le mélange d'antibiotiques s'est avéré efficace pour la purification des colonies prélevées. Il a été utilisé pour la purification des souches Actinomycétales isolées des sols arides (**Zerizer, 2004**). Aussi, **Williams et Davies (1965)** ont testé l'action de la nystatine sur les actinomycètes, ils ont constaté que cet antifongique n'altère pas leur croissance même en augmentant sa concentration jusqu'à 100µg/ml. **Suzuki et al. (1999)** ont trouvé que les actinomycètes peuvent résister à l'acide nalidixique jusqu'à une concentration de 10µg/ml, au-delà de cette concentration la croissance de certains genres peut être diminuée.

Les souches sont notées ainsi : PC3, PC21a, PC21b, PC21c, PC21d, PP*22, PC31, PC38, PC40, PC42, PC43a, PC43b, PC44, SC46a, SC46b, SC51, SC52, SC57, PC63, SC66, PC68, SC46c, SC102 (**annexe 2**).

(S : Sabouraud ; P : paraffine ; P* : pus ; Numéro du prélèvement ; a, b, c, d : correspondent respectivement à la 1^{ère}, 2^{ème}, 3^{ème} et la 4^{ème} souche isolée du même prélèvement).

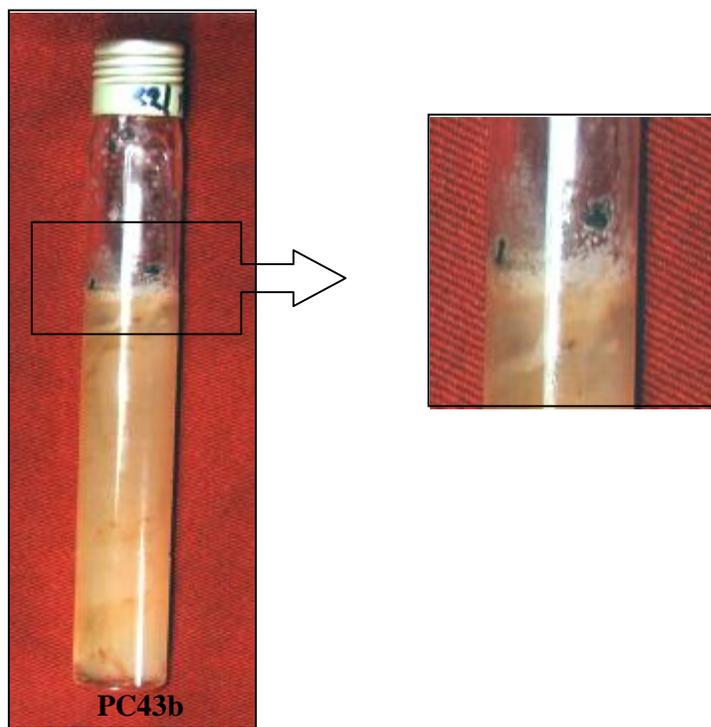


Figure 9: le type respiratoire aérobie strict des souches (cas de la souche PC43b)

Tableau 6 : répartition des souches actinomycétales purifiées par rapport à la nature du milieu d'isolement

Milieux	Nombre de souches isolées	Nombre de prélèvements examinés	Fréquences
Gélose à la paraffine	14	102	13.75 %
Milieu Sabouraud	9		8.82 %
Amorce de paraffine	0		0 %

Tableau 7 : répartition des souches isolées par rapport à la nature du prélèvement

Nature du prélèvement	Nombre de souches isolées	Nombre de prélèvements examinés	Fréquences
Crachat	18	71	25.35 %
Tubage gastrique	4	7	57.14 %
Pus	1	24	4.16 %

1.5-Type respiratoire et température optimale de croissance des souches actinomycétales

La totalité des souches actinomycétales purifiées poussent à la surface du milieu viande-foie et sont toutes, donc, aérobies strictes (**figure 9**). Toutes ces souches se développent à des températures comprises entre 20 et 50 °C, avec un optimum situé entre 25 et 37 °C. Les souches présentant un optimum de croissance à 25 °C sont : PC21a, PC21c, PC21d, PC31, PC38, PC40, PC42, PC43a, PC43b, PC44, SC46a, SC46b, SC52, SC57, PC63, PC68 et celles ayant un optimum de croissance à 35 °C sont : PC3, PP*22, SC46c, SC51, SC102, PC21b, SC66.

1.6- Effet de la nature du milieu et du prélèvement sur la fréquence d'isolement des souches actinomycétales

Le nombre de souches isolées, à partir des trois milieux, est rapporté dans le **tableau 6**. La gélose à la paraffine a permis l'isolement de quatorze souches actinomycétales pour neuf sur le milieu Sabouraud. Aucune souche n'a été isolée du milieu amorce de paraffine. La comparaison des deux proportions de souches isolées sur Sabouraud et la gélose à la paraffine, par le test de Student, a révélé une valeur calculée de $t = 1,25$. La différence observée n'est pas significative au seuil de 5 %.

Les fréquences d'isolement obtenues, par rapport à la nature du prélèvement, figurent dans le **tableau 7**. Les valeurs calculées, du test de Student pour les trois types de prélèvements, comparées deux à deux, sont respectivement de $t = 4,47$ (pus - crachat), $t = 3,53$ (pus - tubage gastrique) et $t = 3,07$ (crachat-tubage gastrique). Les différences observées, deux à deux, sont significatives entre ces trois prélèvements au seuil de 5%.

1.7- Discussion

Les leucocytes observés, dans certains prélèvements du pus, sont probablement impliqués dans la réaction inflammatoire induite par les bactéries virulentes. **Carriere et al. (1999)** ont énuméré des leucocytes, dont 90 % sont des polynucléaires neutrophiles, sur un frottis du pus, contenant des filaments ramifiés à Gram positif. Les cellules épithéliales sont, probablement, détachées de l'épithélium respiratoire lors des efforts fournis par le patient pour s'expectorer.

Soixante-dix huit prélèvements de crachat examinés contiennent tous des cocci à Gram positif disposées en chaînettes. **Skinner et Car (1974)** et **Riou et Courtiou (1990)** ont rapporté que dans les expectorations, les cocci à Gram positif disposées en chaînettes

correspondent aux Streptocoques. Ces bactéries sont les plus abondantes et les plus constantes dans la salive. Cependant, **Del Mar Thomas et al. (2005)** ont pu isoler, à partir d'un brossage bronchique, *Williamsia muralis* (actinomycète aérobie) et des cocci à Gram positif disposés en amas, qui sont des staphylocoques. Les cocci à Gram négatif en diplocoques observées peuvent être assignées aux espèces du genre *Nesseria*, qui sont en général moins abondantes mais constantes et qui peuvent être, également, isolées du rhinopharynx des porteurs sains. Les cocci à Gram positif disposés en amas ne sont observés que dans les 24 prélèvements du pus. Les coccobacilles à Gram négatif peuvent être rapprochés morphologiquement des *Haemophilus* puisque d'après **Dabernat et Sanson-le Pors (1990)**, les *Haemophilus* font partie de la flore normale des muqueuses, des voies respiratoires supérieures et de la cavité buccale de l'homme. Au niveau des voies respiratoires supérieures, les *Haemophilus* représentent 11 % de la flore pharyngée d'un adulte normal.

Les actinomycètes aérobies pathogènes se cultivent facilement sur les milieux ordinaires (Sabouraud et Bennett). Mais Leur isolement, à partir des sites non stériles (pus, expectoration et tubage gastrique), nécessite l'utilisation des milieux sélectifs, tels que, les milieux à la paraffine, ou un enrichissement dans un milieu liquide avant la mise en culture (**Mc Neil et Brown, 1994**). Dix-sept prélèvements se sont révélés positifs en actinomycètes, ce qui correspond à une prévalence de 16,66 %. Trente-deux colonies ont été prélevées des milieux d'isolement et, après purification seulement, vingt-trois souches ont été retenues comme appartenant à la classe des actinomycètes. En effet, selon **Georghiou et Blacklock (1992)** comme pour les Mycobactéries, les produits pathologiques peuvent être relativement pauvres en actinomycètes aérobies. Cependant, deux prélèvements (**tableau 4, groupe C**) ont présenté des filaments fins à Gram positif caractéristiques des actinomycètes ; mais, après culture, ils se sont révélés négatifs en actinomycètes aérobies. Selon **Beytout (1990)**, il semble que ces filaments correspondent aux actinomycètes anaérobies appartenant à la flore commensale de la bouche. **Saubolle et Sussland (2003)** ont rapporté que 78 % des infections à *Nocardia* ont été détectées par la coloration de Gram des produits pathologiques. Cette coloration est la plus sensible pour visualiser et reconnaître les espèces de *Nocardia* dans un prélèvement clinique. Aussi, **Ou et An (1987)** considèrent que la coloration de Gram positive des frottis, préparés des crachats, combinée aux signes cliniques peut servir d'un diagnostic présumptif pour la nocardiose pulmonaire **en attendant les résultats de la culture et l'identification par un laboratoire spécialisé.**

L'absence des filaments à Gram positif, dans l'examen direct des prélèvements (**groupe D**) qui se sont révélés positifs après la mise en culture, est peut être due à leur fragmentation suite au procédé d'étalement, notamment pour *Nocardia* et genres apparentés où le mycélium peut se fragmenter spontanément en éléments bacillaires et coccoïdes.

Notre étude a montré que le milieu Sabouraud et la gélose à la paraffine, utilisés pour l'isolement, n'influencent pas la fréquence d'isolement puisqu'ils donnent le même rendement. Cependant, selon **Shawar et al. (1990)**, la gélose à la paraffine donne un bon rendement, car, elle permet non seulement la croissance de *Nocardia asteroides* mais aussi de *N. brasiliensis*, *N. otitiscavitum*, de *Streptomyces* sp., de *Mycobacterium chelonae* et de *M. fortuitum*. L'absence de la croissance des actinomycètes dans l'amorce de paraffine peut être due à l'absence de *Nocardia asteroides*, car selon **El Nakeeb et Lechevalier (1963)** ce milieu favorise seulement la croissance de *N. asteroides*. En effet, **Singh et al. (1987)** ont isolé du crachat 67 souches de *Nocardia asteroides* avec le milieu amorce de paraffine, pour trente souches seulement avec le milieu de Sabouraud. Il se peut aussi, que ce soit le temps d'incubation de 3 semaines, qui n'était pas suffisant, puisque selon **Singh et al. (1987)** et **Ayyar et al. (1992)** les tubes doivent être incubés plus de 4 semaines.

La température optimale de croissance de nos souches se situe entre 25 et 37 °C. **McNeil et Brown (1994)** ont observé la croissance des actinomycètes aérobies isolées des prélèvements cliniques à 25°C, 35°C et 45°C. Ils ont constaté que la majorité des *Streptomyces* sp. donnent une bonne croissance à 25° C. Cependant, pour la majorité des *Nocardia* sp., l'optimum de croissance est à 35°C.

Tableau 8 : aspect macroscopique des souches pures

Souches	Milieux	Aspect de la colonie	Couleur du mycélium aérien	Couleur du mycélium de substrat
PC 3	ISP ₂	-	-	-
	ISP ₃	En pic, marge plate, lisse, poudreuse	gris	rouge brun
	ISP ₄	En dôme, lisse, pâteuse	-	orange
	ISP ₅	En dôme, plissée, cartilagineuse	-	rouge brun
	TWA	Plate, lisse, poudreuse	gris	beige
PC 21 a	ISP ₂	En dôme, marge plate plissée, poudreuse	rose/blanc	rose
	ISP ₃	En dôme, plissée, poudreuse	rose	rose
	ISP ₄	En dôme, lisse, poudreuse	rose	rose- brun
	ISP ₅	En dôm, marge plate, plissées poudreuse	rose	beige rosé
	TWA	Plate, lisse, pâteuse	blanc	rose- brun
PC 21 b	ISP ₂	Plate, pâteuse cérébriforme	blanc	beige
	ISP ₃	plate, lisse, poudreuse	blanc	beige
	ISP ₄	Plate, lisse, poudreuse	blanc/crème	beige
	ISP ₅	Plate, lisse, petite poudreuse	blanc	jaune /orange
	TWA	Plate, lisse, pâteuse	blanc	beige
PC 21 c	ISP ₂	plate, lisse, pâteuse	blanc	beige
	ISP ₃	Plate, lisse, pâteuse	blanc	beige
	ISP ₄	Plate, lisse, pâteuse	blanc	beige
	ISP ₅	Plate, lisse, pâteuse	blanc	beige
	TWA	Plate, lisse, duveteuse	blanc	crème
PC 21 d	ISP ₂	En pic, marge plate, plissée, duveteuse	rose	rouge rosé
	ISP ₃	En pic, marge plate, plissée, duveteuse	gris	beige
	ISP ₄	En pic, marge plate, plissée, poudreuse	rose pale	rose
	ISP ₅	En pic, marge plate, plissée, poudreuse	rose blanc	rose orange
	TWA	Plate, lisse, duveteuse	blanc	rose orange
PP* 22	ISP ₂	Plate, finement plissée, poudreuse	blanc	beige
	ISP ₃	Plate, finement plissée, poudreuse	blanc	crème
	ISP ₄	Plate, finement plissée, poudreuse	blanc	beige
	ISP ₅	Plate, finement plissée, poudreuse	blanc	crème
	TWA	Plate, lisse, poudreuse	blanc	beige
PC 31	ISP ₂	En pic, plissée, poudreuse	rose	rouge brun
	ISP ₃	En pic, finement plissée, poudreuse	blanc	beige
	ISP ₄	En pic, plissée, duveteuse	rose	rouge brun
	ISP ₅	En pic, marge plate, plissée poudreuse	orange	beige
	TWA	Plate, lisse, duveteuse	rose	crème
PC 38	ISP ₂	En dôme, plissée, poudreuse	blanc	Jaune orange
	ISP ₃	En dôme, plissée, poudreuse	blanc	Jaune
	ISP ₄	En dôme, marge plate, cérébriforme	blanc	brun
	ISP ₅	En pic, membranaire, pâteuse	-	jaune
	TWA	Plate, membranaire, pâteuse	-	jaune

ISP : International *Streptomyces* Project ; TWA : Tap water Agar (Agar blanc)

2- Identification présumptive des souches isolées et purifiées

2.1- Caractères cultureux

2.1.1- Aspect macroscopique

Les souches peuvent être réparties en deux groupes en fonction de leur vitesse de croissance. Les colonies des souches PC31, SC42, PC40, PC38, PC21a, PC21d, PC63, PC43b, SC46b, SC46a, SC52, PC21c, SC66, PC68 et SC57, apparaissent après 1 à 2 jours d'incubation. Les souches à croissance relativement lente sont : PP*22, PC43a, SC46c, PC44, PC21b, PC3, SC51 et SC102, leurs colonies requièrent 2 à 5 jours d'incubation pour apparaître.

La majorité des souches donnent une bonne croissance sur les différents milieux utilisés, excepté la souche PC3 qui n'a pas poussé sur le milieu ISP₂. Les souches SC51 et SC102 présentent une mauvaise croissance sur tous les milieux, cependant leur culture sur la gélose à l'extrait de sol et au glycérol a donné une bonne croissance. Sur le milieu Agar blanc (TWA) toutes les souches développent des colonies plates, par contre sur les milieux ISP₂ ISP₃ ISP₄ ISP₅, les colonies sont surélevées. Cette élévation est en pic ou en dôme avec toujours des marges plates sinuées (**tableau 8**). Pour toutes les souches, les premiers signes de croissance consistent en l'apparition de colonies pâteuses. Mais, après 7 jours d'incubation, l'observation des colonies permet de diviser les souches en deux groupes : le premier regroupe les colonies pâteuses, alors que le second réunit les colonies duveteuses ou légèrement poudreuses.

Au 14^{ème} jour, la majorité des souches donnent des colonies poudreuses de couleur blanchâtre ou mélangée avec d'autres couleurs (rose, gris, beige). Cet aspect est particulier pour les souches développant un mycélium aérien. Les colonies des souches SC51, SC102 et SC66 sont pâteuses. Ces souches pâteuses peuvent être classées dans les genres *Corynebacterium*, *Dietzia*, *Gordonia*, *Mycobacterium*, *Micromonospora*, *Rhodococcus* et *Tsukamurella*.

Suite du tableau 8

Souches	Milieux	Aspect de la colonie	Couleur du mycélium aérien	Couleur du mycélium de substrat
PC 40	ISP ₂	En dôme, finement plissée, légèrement poudreuse	beige	beige
	ISP ₃	En dôme, marge plate et translucide, poudreuse	gris	translucide
	ISP ₄	En dôme, marge plate et translucide, poudreuse	gris	crème
	ISP ₅	En dôme, marge plate et translucide, poudreuse	blanc /gris	crème
	TWA	En dôme, marge plate et translucide, poudreuse	gris	translucide
SC 42	ISP ₂	En pic, plissée, pâteuse	blanc	brun
	ISP ₃	En dôme, lisse, poudreuse	blanc	beige
	ISP ₄	En pic, marge plate, légèrement plissée	blanc	brun
	ISP ₅	Plate, lisse, pâteuse	-	jaune
	TWA	En pic, marge plate, légèrement plissée	blanc	brun
PC 43 a	ISP ₂	Plate, membranaire, plissée	blanc	crème
	ISP ₃	En pic, marge plate, lisse, poudreuse	beige	beige
	ISP ₄	En dôme, légèrement plissée, poudreuse	beige	brun
	ISP ₅	En dôme, légèrement plissée, poudreuse	beige	rouge brun
	TWA	Plate, lisse, poudreuse	blanc	rose brun
PC 43 b	ISP ₂	En pic, marge plate, cérébriforme, poudreuse	rose	rose brun
	ISP ₃	En dôme, lisse poudreuse	blanc/gris	crème
	ISP ₄	En dôme, légèrement plissée poudreuse	gris/rose	rose
	ISP ₅	En pic, marge plate, finement plissée, pâteuse	orange	crème
	TWA	Plate, lisse, duveteuse	blanc/gris	crème
PC 44	ISP ₂	En dôme, membranaire, plissée, pâteuse.	blanc	brun
	ISP ₃	En dôme, marge plate, cérébriforme, poudreuse	beige	beige
	ISP ₄	En dôme, légèrement plissée, poudreuse.	beige	brun
	ISP ₅	En dôme, membranaire, plissée, poudreuse	beige	brun
	TWA	plate, finement plissée, poudreuse	blanc	brun
SC 46 a	ISP ₂	En dôme, marge plate, plissée, poudreuse	blanc/gris	beige
	ISP ₃	En pic, plissée, poudreuse	gris	beige
	ISP ₄	En pic, membranaire, duveteuse	blanc	beige
	ISP ₅	En pic, cérébriforme, poudreuse	blanc/gris	beige
	TWA	Plate, finement plissée, duveteuse	blanc/gris	crème
SC 46 b	ISP ₂	En pic, plissée, poudreuse	rose	rouge brun
	ISP ₃	En pic, légèrement plissée, poudreuse	blanc	beige
	ISP ₄	En pic, plissée, duveteuse	rose	rouge brun
	ISP ₅	En pic, marge plate, plissée poudreuse	orange	beige
	TWA	Plate, lisse, duveteuse	rose	crème
SC 46 c	ISP ₂	Légèrement surélevée, membranaire, plissée, pâteuse	blanc	brun
	ISP ₃	En dôme, marge plate, cérébriforme, poudreuse	beige	beige
	ISP ₄	Plate, légèrement plissée, poudreuse	beige	brun
	ISP ₅	Plate, membranaire, plissée, poudreuse	beige/blanc	brun
	TWA	Légèrement surélevée, finement plissée, poucreuse	blanc	brun

(-) : absence ; ISP : International *Streptomyces* Project ; TWA : Tap water Agar (Agar blanc)

Sur les milieux ISP, au 21^{ème} jour d'incubation, pratiquement toutes les souches apparaissent pigmentées, c'est la maturation des cultures. Pour quelques souches, la masse de spores est si importante, au point qu'elle peut tomber dans le couvercle de la boîte de Pétri lors de l'incubation. La surface de toutes les colonies est lisse, plissée, cérébriforme ou membranaire.

L'observation du revers de la colonie, après élimination de l'excès de l'Agar, permet de déterminer la couleur du mycélium de substrat. En effet, pour toutes les souches, ce mycélium est pigmenté soit en crème, jaune, brun ou en rose, mais pour la souche SC 66 il est brun noir.

Après maturation des souches à aspect poudreux, cinq souches conservent leur coloration blanchâtre et quinze souches apparaissent colorées. Cette coloration est probablement due à la production de pigments par les spores. Selon la couleur des spores, il est possible de définir 4 séries:

Rose (PC21a, PC31, SC46b)

Grise (PC3, PC21d, SC57, PC40, PC43b, SC46a, PC63)

Beige (PC43a, PC44, SC46c, PC68, SC52)

Blanche (PC21b, PC21c, PP*22, PC38, SC42)

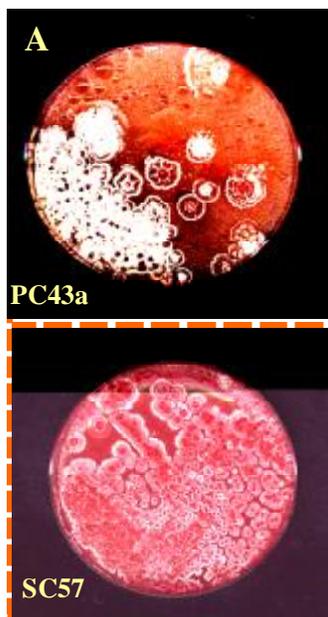
Ces séries sont caractéristiques des *Streptomyces* et genres apparentés, des *Maduromyces*, des *Pseudonocardia* et genres apparentés et de *Nocardia*.

Des gouttelettes d'eau sont déposées à la surface des colonies, elles apparaissent après la maturation du mycélium aérien. Elles sont différentes de celles dues à l'humidité (condensation lors de l'incubation) du fait qu'elles sont pigmentées et ne sont présentes que sur le mycélium aérien. Pour la souche PC 43a, PC31 et SC46b ces gouttelettes sont de couleur orange, pour la souche PC21a elles sont rouges.

Suite du tableau 8

Souches	Milieux	Aspect de la colonie	Couleur du mycélium aérien	Couleur du mycélium de substrat
SC 51	GSEA	En pic, plissée, membranaire, pâteuse	-	beige
SC 52	ISP ₂	En dôme, finement plissée, duveteuse	blanc	crème
	ISP ₃	En dôme, lisse, poudreuse	gris verdâtre	jaune
	ISP ₄	En dôme, lisse, poudreuse	gris verdâtre	brun
	ISP ₅	En pic, plissée, pâteuse	-	jaune
	TWA	Plate, finement plissée, duveteuse	blanc	crème
SC 57	ISP ₂	En pic avec marge plate, plissée, duveteuse	rose	rouge rosé
	ISP ₃	En pic avec marge plate, plissée, duveteuse	gris	beige
	ISP ₄	En pic avec marge plate, plissée, poudreuse	rose pale	rose
	ISP ₅	En pic avec marge plate, plissée, poudreuse	rose/ blanc	rose orange
	TWA	Plate, lisse, duveteuse	blanc	rose orange
PC 63	ISP ₂	En dôme avec marge plate, plissée, poudreuse	blanc/gris	beige
	ISP ₃	En pic, plissée, poudreuse	gris	beige
	ISP ₄	En pic, membranaire, duveteuse	blanc	beige
	ISP ₅	En pic, cérébriforme, poudreuse	blanc/gris	beige
	TWA	Plate, finement plissée, duveteuse	blanc/gris	crème
SC 66	ISP ₂	Légèrement surélevée, lisse, pâteuse	-	brun noir
	ISP ₃	Légèrement surélevée, lisse, pâteuse	-	brun noir
	ISP ₄	Légèrement surélevée, lisse, pâteuse	-	orange brun
	ISP ₅	Légèrement surélevée, lisse, pâteuse	-	Brun noir
	TWA	Légèrement surélevée, lisse, pâteuse	-	orange brun
PC 68	ISP ₂	Plate, lisse, pâteuse	beige	crème
	ISP ₃	Plate, lisse, poudreuse	blanc	brun
	ISP ₄	Plate, lisse, poudreuse	beige	brun
	ISP ₅	Plate, lisse, poudreuse	blanc	crème
	TWA	Plate, lisse, poudreuse	beige	crème
SC 102	GSEA	En dôme (chou-fleur), pâteuse	-	crème

(-) : Absence ; ISP : International *Streptomyces* Project ; TWA : Tap water Agar (Agar blanc) ;
GSEA : Glycérol soil extract Agar (Agar à l'extrait de sol et au glycérol)



A : les pigments autres que mélanoides

B : les pigments mélanoides (souche PC40)

Figure 10: la production des pigments solubles

Tableau 9 : aspect microscopique des souches actinomycétales purifiées

Souches	Mycélium de substrat		Mycélium aérien							
	Fragmentation	Sporulation	La forme des chaînes de spores				La longueur des chaînes de spores		La forme de la spore	
			R	F	S	RA	< 20	> 20	cylindrique	arrondie
PC3	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+
PC21a	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-
PC21b	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+
PC21c	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-
PC21d	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-
PP*22	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+
PC31	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-
PC38	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-
SC40	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-
PC42	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-
PC43a	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-
PC43b	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+
PC44	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+
SC46a	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+
SC46b	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+
SC46c	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+
SC51	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SC52	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-
SC57	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-
PC63	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-
SC66	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
PC68	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-
SC102	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

R: chaîne de spores droites, F: flexible, S: spirale, RA : boucle ouverte (retinaculum-apertum)

2.1.2- Pigments solubles

Les souches PC21a, PC21d, SC43b, SC57, élaborent un pigment, de couleur rouge ou rouge brun, qui diffuse dans tous les milieux de culture utilisés. Dans les milieux ISP₂, ISP₄, ISP₅ les souches PC31, SC46b, SC66, PC38, SC42, PC44, SC46c, PC43a et SC 52 produisent un pigment orange qui, dans l'Agar blanc, prend la coloration violette . Cependant, les souches PC21b et PP*22, PC43a produisent un pigment orange dans les milieux ISP₂ et ISP₄, et jaune dans le milieu ISP₃ et ISP₅ et TWA (**figure 10 A**). Les souches PC3, PC21c, PC68, PC63, SC51, SC102 et SC46a ne produisent aucun pigment soluble. Les pigments oranges, violets, rouges et rouges brun sont sensibles au changement du pH, en milieu basique, la couleur vire vers le bleu, tandis qu'elle devient jaune en milieu acide. Cependant, le pigment jaune résiste aux modifications du pH.

Les pigments mélanoïdes ne sont produits que par six souches seulement. Ces pigments sont produits dans les milieux ISP₆ et ISP₇ pour les souches SC42 et PC44 et seulement sur ISP₆ pour les souches PC43a, PC38, SC52 et PC40 (**figure 10 B**).

2.2- Aspect microscopique

Les observations de l'étude microscopique sont rassemblées dans le **tableau 9**. Après 7 jours d'incubation, les lamelles sont retirées de la gélose et déposées sur une lame, puis observées au microscope optique. Il apparaît que toutes les souches développent un mycélium de substrat, qui est fragmenté pour les souches : PC3, PC21b, PP*22, PC43a, PC 44, SC 46c, SC51 et SC102. De cette fragmentation, il résulte soit des formes coccoïdes, soit des formes bacillaires. Pour les autres souches, ce mycélium se présente sous forme de longs filaments ramifiés dépourvus de septums. Seule, la souche SC66 porte des spores sur le mycélium de substrat.

L'observation des lamelles, retirées de la gélose après 14 jours d'incubation, montre que toutes les souches, à l'exception des souches SC51, SC102 et SC66, développent un mycélium aérien. Ce mycélium est épais, plus foncé et moins ramifié que le mycélium de substrat.

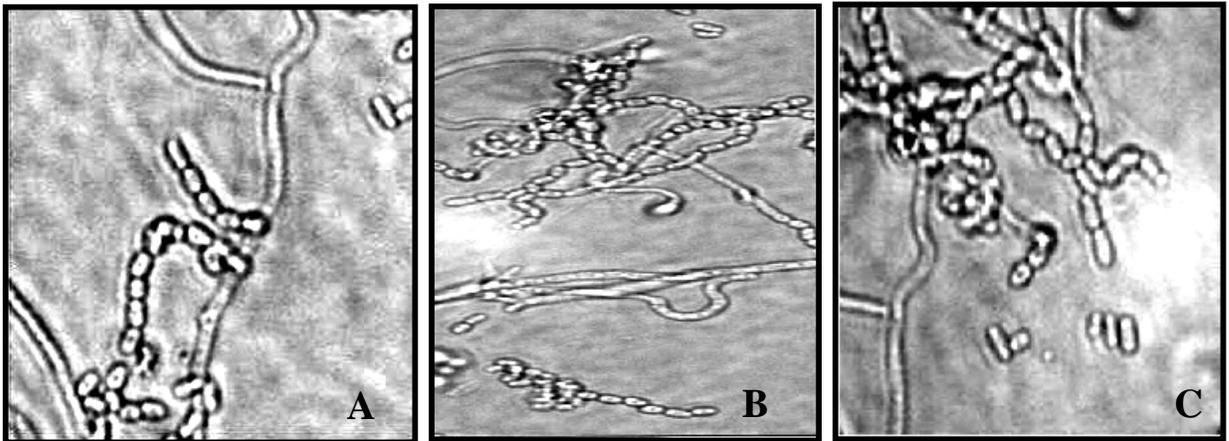


Figure 11: la souche PC40 en microscope optique grandissement x 100 (technique des lamelles)

A- l'érection du mycélium aérien

B- les chaînes de spores droites, spirales et en crochet

C- la forme cylindrique des spores

Il est peu abondant pour les souches PC3, PC44, SC46c et PC21b et très abondant pour les autres souches (**figure 11 A**)

Les chaînes de spores se forment par septation du mycélium aérien. Elles sont droites à flexibles pour les souches PC21b, PC42, PC44, SC46c et PP*22. Les souches PC21a, PC31, PC38 PC43a, PC43b, SC46a, PC40, SC 46b, PC63, PC68, PC21c, SC52 forment des chaînes de spores droites (R), en spirale (S) et en forme de crochet (RA). Pour les chaînes spirales le nombre de spire varie de 2 à 6 (**figure 11 B**). Seule la forme en crochet (RA) caractérise les chaînes de spores des souches PC21d et SC57.

Sur les vingt souches, développant un mycélium aérien, dix-huit souches forment des chaînes de spores où le nombre de spores est supérieur à 20 à l'exception des souches PC21d et SC 57 où le nombre de spores est inférieur à ce nombre. L'observation au microscope optique (X100) des spores montre qu'elles sont de forme arrondie ou cylindrique (**tableau 9, figure 11 C**).

2.3- Coloration et tests biochimiques

Après la coloration de ZN classique aucune souche n'apparaît sous forme de filaments rouges caractéristiques des mycobactéries qui sont acido-alcool-résistantes. **Donc, nos souches actinomycétales pures n'appartiennent pas au genre *Mycobacterium***. Les souches PC3, PC21b, PP*22, SC46c, SC51, et SC102 présentent des filaments roses après la coloration de ZNM et un mélange de filaments et de bacilles roses et bleus après la coloration de KM. Elles sont, donc, des souches **acido-alcool-résistantes partielles**. En outre, ce dernier type de coloration permet de différencier les *Streptomyces* des autres genres **non acido-alcool-résistants**. Ainsi, les souches PC21a, PC42, PC31, PC38, PC40, PC43a, PC43b, PC44, SC46a, SC46b, SC52, SC57, PC63 et PC68, qui apparaissent sous forme de filaments bleus et cocci roses, appartiennent au genre *Streptomyces*.

Selon **Grosset et al., 1990** cette coloration est due à la présence des acides mycoliques situés dans la partie externe de la paroi des mycobactéries. Les acides mycoliques sont d'énormes molécules d'acides gras ramifiés. Ils sont rencontrés chez les mycobactéries avec leur forme la plus complexe et la plus longue, 60 à 90 atomes de carbone. Leurs groupements carboxyles libres forment avec la fuschine des complexes, qui constituent une barrière

hydrophobe résistant à l'action conjointe des acides dilués et de l'alcool, et emprisonnent ainsi la fuschine à l'intérieur du corps bactérien. Mais l'utilisation de variantes de coloration plus douce (ZNM et KM) permet au genre *Nocardia* et aux genres apparentés de conserver la coloration de la fuschine. Les acides mycoliques sont présents chez *Nocardia* avec 40 à 60 atomes de carbone ; chez *Tsukamurella* avec 64 à 78 atomes de carbone ; chez *Gordonia* avec 48 à 66 atomes de carbone ; chez *Rhodococcus* avec 34 à 52 atomes de carbone et chez *Corynebacterium diphtheriae* avec 22 à 36 atomes de carbone.

Les six souches acido-alcool-résistantes partielles, à l'exception des souches SC51 et SC102, développent un mycélium aérien et réduisent les nitrates en nitrites. Elles sont, toutes, β -D galactosidase positive.

2.4- Discussion

L'étude des caractéristiques morphologiques macroscopiques et microscopiques des souches actinomycétales est largement utilisée pour caractériser les genres des actinomycètes. Par exemple, la présence ou l'absence des spores sur le mycélium de substrat ou la formation de sporanges, permettent de différencier plusieurs genres. Ainsi, la morphologie, la coloration des colonies, la présence ou l'absence d'hyphes aériens fournissent une indication sur le genre (**Bergey's Manual of Determinative Bacteriology ; Saubolle et Sussland , 2003**)

Les souches PC31, SC42, PC40, PC38, PC21a, PC21d, PC63, PC43b, SC46b, SC46a, SC52, PC21c, SC66, PC68 et SC57, développent des colonies après 48 heures d'incubation. C'est une caractéristique des **actinomycètes à croissance rapide**. En effet, **Nodwel et Losick (1998)** ont constaté que la colonie de *Streptomyces coelicolor*, érige des hyphes aériens en 24 heures. Ces souches à croissance rapide peuvent être, donc, rapprochées du genre *Streptomyces* et autres genres ne produisant pas les acides mycoliques. En revanche, la période de 2 à 5 jours est requise pour **les actinomycètes à croissance relativement lente**, ce qui est le cas dans cette étude des souches PP*22, PC43a, SC46c, PC21b, PC44, PC3, SC51 et SC102. Dans les études de **Carriere et al. 1999** et **Saubolle et Sussland (2003)**, les colonies visibles de *Nocardia* apparaissent après 3 à 7 jours d'incubation. Selon **Perry et al.(2004)**, les actinomycètes produisant les acides mycoliques dans leur paroi, se développent lentement à cause de l'hydrophobicité de ces acides qui forment un obstacle à l'absorption des nutriments solubles. **Fiss et Brooks (1991)** ont rapporté que les actinomycètes produisant les acides mycoliques sont *Nocardia* , *Gordonia*, *Rhodococcus*, *Tsukamurella*, mais aussi les

mycobactéries atypiques à croissance rapide qui présentent les mêmes caractéristiques morphologiques que *Nocardia* et genres apparentés.

La croissance pour toutes les souches purifiées débute par la formation d'un mycélium très ramifié et pâteux dans le milieu et aussi à la surface de la gélose, c'est le mycélium de substrat. Les souches SC102, SC51 et PC66 conservent leur aspect pâteux même après maturation. D'après l'aspect microscopique, les souches SC102 et SC51 forment un mycélium de substrat fragmenté qui caractérise les genres *Actinomyces*, *Oerskovia*, *Jonesia*, *Gordonia*, *Rhodococcus* et *Tsukamurella*. Considérant que : toutes les souches isolées sont aérobies strictes, et les genres *Actinomyces*, *Oerskovia* et *Jonesia* sont anaérobies ; ces deux souches ne peuvent être classées que dans les genres *Gordonia*, *Rhodococcus* et *Tsukamurella*. Cependant, la souche PC66 forme les colonies pâteuses pigmentées en noir et présente un mycélium de substrat portant des spores, ces deux caractéristiques permettent de la rapprocher du genre *Micromonospora*.

Le mécanisme de la morphogenèse a fait l'objet d'une étude réalisée par **Sprusansky et al. (2003)** et **Kim et al. (2005)** sur *S. coelicolor*. Il s'est avéré qu'une fois les sources nutritionnelles du milieu sont épuisées, il y a libération de petites molécules à partir du mycélium de substrat. La libération de ces signaux chimiques déclenche un programme d'expression de gènes, démontré par l'apparition d'un mycélium aérien. À l'exception de trois souches (SC102, SC51 et PC66), toutes les autres souches forment un mycélium aérien issu du mycélium de substrat, et ceci à partir du 3^{ème} et 7^{ème} jour d'incubation pour les souches, respectivement, à croissance rapide et à croissance relativement lente.

La masse du mycélium aérien diffère d'un milieu à un autre pour la même souche. Il semble que la composition du milieu est impliquée dans le développement d'hyphes aériens. Sur cette base **Vijgenboom et Keijer (2001)** ont rapporté que la disponibilité des ions cuivriques dans le milieu est importante pour le développement du mycélium aérien pour *Streptomyces coelicolor*. La sporulation de nos souches diffère d'un milieu à un autre. Elle est très importante sur les milieux ISP. La composition des milieux pourrait être responsable de cette différence.

Sur l'ensemble de quinze souches à croissance rapide, assignées dans un premier temps aux actinomycètes dépourvus d'acides mycoliques, les souches PC21a, PC31, PC38, PC43a, PC43b, SC46a, PC40, SC46b, PC63, PC68, PC21c, PC52, forment des chaînes de spores de

plusieurs formes; spirales (2 à 6 spires), droites et flexibles. Ces formes sont typiques des *Streptomyces* selon **Myadoh et al. (2001)**. A cela s'ajoute la forme cylindrique des spores qui selon **Ezra et al. (2004)** caractérise exclusivement les *Streptomyces*. Les souches PC21d et SC57 peuvent être classées dans le genre *Actinomadura*, d'après leurs courtes chaînes de spores en forme de crochet. Parmi nos huit souches à croissance relativement lente, seules les souches PC43a, PC44, PC21b, SC46c, PP*22, PC3 présentent un mycélium de substrat et un mycélium aérien fragmenté en éléments bacillaires. Cette caractéristique permet de les rapprocher au genre *Nocardia*, plutôt qu'aux autres genres d'actinomycètes à croissance relativement lente et dépourvus du mycélium aérien.

Sur l'ensemble de vingt-trois souches, quinze seulement produisent des pigments solubles, qui diffèrent d'un milieu à l'autre. Ces pigments sont élaborés pendant la maturation du mycélium aérien. **Thompson et al. (2002)** ont rapporté que les actinomycètes sont dotés d'un programme de morphogenèse de la colonie coordonné avec l'excrétion des molécules bioactives. Ces dernières sont le plus souvent des antibiotiques pigmentés. Leur élaboration est une réponse à un déséquilibre du métabolisme ou à l'arrêt de la croissance.

Les pigments oranges et/ou jaunes (PC21b et PP22, PC43a), oranges et/ou violets (PC31, SC46b, PC38, SC66, SC42, PC44, SC46c et SC52) rouges et/ou rouges brun (PC21a, PC21d, SC43b, SC57) produits par les souches Actinomycétales isolées, peuvent être des substances bioactives, et ceci d'après **Margalith (1992)** qui rapporte que les actinomycètes produisent des métabolites bioactifs pigmentés. Ils peuvent être soit des phénazines (rouge brun), des prodigiosines (rouge) ou caroténoïdes (jaune ou orange). les prodigiosines sont des pigments rouges élaborés par *Streptomyces sp*, *Actinomadura madurae*, *Actinomadura pelleteri*, les pigments oranges sont produits par plusieurs espèces de *Streptomyces*. Alors que les phénazines sont des pigments rouges bruns sécrétés par *Nocardia*, *Micromonospora*, *Streptomyces*, *Streptoverticillium* et *Streptosporangium*. **Horinouchi et Beppu (1994)** ont rapporté aussi que la streptomycine produite par *Streptomyces griseus* est un pigment jaune. Puisque les pigments produits par la même souche diffèrent parfois d'un milieu à un autre, la composition du milieu pourrait être responsable de cette différence. Il semble que la biosynthèse d'un pigment est conditionnée par un substrat approprié indispensable. **Bruheim et al. (2002)** ont étudié la production de l'actinorhodine par *Streptomyces lividans*, ils ont trouvé qu'elle nécessite la présence de glucose.

D'autre part, il est possible que certains pigments de couleur foncée masquent les autres pigments de couleur plus claire qui sont produits simultanément. Notamment, **Omura et al. (2001)** ont rapporté que le génome de *Streptomyces overmitilis* code pour 25 métabolites secondaires (mélanine, caroténoïdes, siderophores etc.). **Bentley et al. (2002)**, ont montré qu'en plus des prodigiosines et l'actinorhodine, 18 métabolites secondaires (terpène, géosmine etc.) sont également produits par *Streptomyces coelicolor*.

Les pigments rouges, rouge brun, oranges et violets sont sensibles aux modifications de pH (acide et/ou basique), contrairement au pigment jaune, qui résiste à ces modifications. Selon **Cavalla et Éberlin, (1994)** les actinomycètes produisent des pigments qui peuvent être ou non sensibles aux changements de pH. Aussi, **Bruheim et al., (2002)** ont trouvé que la couleur de l'actinorhodine, produit par *S. lividans* dépend du pH et peut donc se présenter comme pigment bleu ou rouge.

D'après **Larpent et Larpent-gourgaud (1985)** les gouttelettes d'eau observées sur les colonies des souches PC21a, PC31, SC46b et PC43a sont des gouttelettes de sudation. En plus, vu qu'elles ont la même couleur que celle du milieu, il peut s'agir donc du même pigment, qui est probablement hydrophiles. **Thompson et al. (2002)** ont montré que les gouttelettes d'eau bleues, apparues sur les colonies de *S. coelicolor*, contiennent de l'actinorhodine, antibiotique diffusé également dans le milieu.

Seules les souches SC42 et PC44 secrètent un pigment brun noir dans les milieux ISP₆ et ISP₇, qui est la mélanine, cela signifie qu'elles sont dotées d'un système de phénolase. Il s'agit, dans ce cas, d'une tyrosinase. Puisque selon **Margalith (1992)**, la biosynthèse de la mélanine se fait par la voie de Raper-Mason avec la tyrosine comme substrat. La tyrosinase catalyse la réaction d'oxydation de la tyrosine en DOPA (dihydroxyphénylalanine) et en dopaquinone. Après une série de réaction d'auto-oxydation, le produit final est l'acide 5,6 dihydroxyindol coloré en jaune, qui se condense pour donner la mélanine caractérisée par la couleur brun noir.

La production des pigments mélanoïdes est une caractéristique très importante pour les actinomycètes, **Shirling et Gottlieb (1972)** l'ont considérée comme une clé pour la classification des *Streptomyces*. Par ailleurs, les pigments mélanoïdes sont impliqués dans la virulence des souches comme il a été établi par **Polak (1989)** concernant les moisissures. Il a trouvé que les souches de *Cryptococcus neoformis* productrices de pigments mélanoïdes sont

plus virulentes que les mutants albinos. Cette virulence est due à la mélanine présente dans la paroi, et qui agit comme une barrière contre les cellules immunitaires activées. **Lindholm et al. (1997)** ont rapporté que les souches de *Streptomyces scabies* isolées des lésions de la patate douce ne sont pathogènes que si elles produisent des pigments mélanoïdes.

Les pigments bruns produits par les souches PC43a, PC40, SC52 et PC38 uniquement dans le milieu ISP₆ sont considérés comme des pigments voisins de la mélanine. **Margalith (1992)** et **Mizukami et al. (2000)** ont rapporté que les pigments bruns noirs produits par les actinomycètes dans le milieu ISP₆ sans donner de résultat positif dans le milieu ISP₇ ne sont pas de la mélanine, mais des pigments voisins de la mélanine. Par contre, **Shirling et Gottlieb (1966)** les considèrent comme des pigments mélanoïdes.

L'utilisation des milieux d'isolement ordinaires, qui ne favorisent pas la croissance des mycobactéries, nous a permis d'atteindre notre objectif. Néanmoins, les mycobactéries à croissance rapide peuvent y pousser en 3 à 4 jours d'incubation (**Guillard, 1991**). En effet, **Fiss et Brooks (1991)** ont isolé différents genres d'actinomycètes et des mycobactéries à croissance rapide des produits pathologiques des transplantés d'organes. Ainsi, pour mettre en évidence la présence des éventuels mycobactéries atypiques (autres que *Mycobacterium tuberculosis*) à croissance rapide et qui peuvent être confondues avec certaines espèces du genre *Nocardia*, la coloration de ZN classique a été utilisée. Il s'est avéré qu'aucune souche n'est acido-alcool-résistante. Ce résultat négatif n'exclue pas les souches appartenant aux genres *Nocardia* et genres apparentés et qui sont qualifiées comme acido-alcool résistantes partielles. **Hamid et al. (2001)** ont inoculé les expectorations sur le milieu Lowenstein-Jensen, les colonies obtenues ne prennent pas la coloration de ZN classique, mais après identification complète, ces souches ont été assignées au genre *Nocardia*. Pour cela, il existe plusieurs variantes de coloration, plus douces, pour mettre en évidence les souches acido-alcool-résistantes partielles dont deux ont été utilisées dans cette étude.

Après coloration de ZN modifiée, six souches (PC3, PC21b, PP*22, SC46c, SC51, et SC102) apparaissent sous forme de filaments et bacilles roses, donc **acido-alcool-résistantes partielles**. La coloration de KM à froid a confirmé l'acido-alcool résistance partielle des souches PC3, PC21b, PP*22, SC46c, SC51, et SC102. Cette coloration est largement utilisée aux laboratoires cliniques pour la recherche de *Nocardia* et genres apparentés. **Mishra et al. (1980)** l'ont employée pour différencier les *Nocardia* des *Streptomyces*. **Motta et al. (2004)** ont identifié de façon présomptive les *Nocardia* sp. sur des

frottis préparés à partir du pus, examinés après la coloration de KM. La mise en culture du pus a confirmé le résultat de la coloration et la souche isolée a été identifiée comme étant *Nocardia brasiliensis*.

D'après **McNeil et Brown (1994)** les quatorze souches présentant des filaments bleus et cocci roses peuvent être rapprochées du genre *Streptomyces*, sont donc: **non acido-alcool-résistantes**. Pour ces souches les cocci, qui retiennent la coloration rose, sont probablement les spores et considérant que les *Streptomyces* sp. ne contiennent pas d'acides mycoliques, il est probable que la conservation de la coloration rose par les formes coccoïdes est due à la présence de la gaine hydrophobe dans laquelle la fuschine est soluble. Cette solubilité différentielle résiste à l'action de l'acide et de l'alcool dilué. Puisque, selon **Nodwell et Losick (1998)** cette gaine entoure les hyphes aériens des *Streptomyces* sp. et lorsque le mycélium aérien se fragmente les spores se détachent en gardant leur gaine. **Les souches PC21d, SC57 et SC66 présentant des filaments et des cocci bleus, sont donc : non acido-alcool-résistantes** et peuvent être classées avec les autres genres des actinomycètes aérobies autres que *Nocardia*, *Streptomyces*, *Rhodococcus*, *Tsukamurella* et *Gordonia*.

Les caractères cultureux permettant de rapprocher les souches PC21a, PC42, PC31, PC38, PC40, PC43a, PC43b, PC44, SC46a, SC46b, SC52, SC57, PC63 et PC68 au genre *Streptomyces* sont confirmés par la coloration de ZNM et/ou KM. Ces caractères cultureux ont permis de rapprocher, également et dans un premier temps, les souches PC43a et PC44 aux espèces des *Nocardia* et genres apparentés. Mais, ces deux souches sont non acido-alcool résistantes (filaments bleus et cocci roses), de ce fait, elles doivent être, plutôt, rapprocher des *Streptomyces* que des *Nocardia* et genres apparentés. Il est très probable que le mycélium de substrat et le mycélium aérien se sont fragmentés suite au retrait de la lamelle insérée dans la gélose.

les souches acido-alcool-résistantes partielles (PC3, PC21b, SC51 et SC102, PP*22 et SC46c) peuvent être assignées aux genres *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Tsukamurella* et *Gordonia*. La totalité des ces souches sont β -D-galactosidase positive et à l'exception des souches SC51 et SC102, elles développent, toutes, un mycélium aérien et réduisent les nitrate en nitrites. Selon les critères de détermination de **Boiron et al. (1993)** et **Carlloti et al. (1994)**, les souches **PC3, PC21b, PP*22 et SC46c peuvent être assignées au genre *Nocardia***, alors que les souches **SC51 et SC102 doivent être plutôt rapprochées du genre *Tsukamurella***.

La proportion des souches des *Streptomyces* est de 60,86 % (soit quatorze souches sur vingt-trois). Contrairement aux proportions obtenues par l'institut Pasteur de Paris (27%) et par le Center for Disease Control and Prevention à Atlanta (15,14 %) (**Mishra et al.,1980**). Le taux élevé des *Streptomyces*, obtenu dans cette étude peut être dû aux conditions climatiques. L'Algérie est située dans la région subtropicale qui se caractérise par un climat sec qui favorise la dissémination des spores dans l'air à partir du sol, d'autant plus que l'inhalation des spores est la voie principale de la contamination.

Sur le plan clinique, la pathogénicité des *Streptomyces* dans les isolats cliniques n'est pas encore établie. En effet, **Vickers et al. (1992)** les considèrent comme des contaminants. Cependant, **Ekkelenkamp et al. (2004)** ont rapporté que pour les patients hospitalisés, les *Streptomyces* ne doivent pas être considérés comme contaminants, puisque *Streptomyces thermovulgaris* a été déterminé comme étant l'agent étiologique d'une bactériémie. Par ailleurs, une pneumonie à *Streptomyces* a été décrite chez un patient atteint du virus d'immunodéficience humaine par **Dunne et al. (1998)**.

La proportion des souches rapprochée au genre *Nocardia* est de 17,39 % (soit quatre souches sur vingt-trois). La comparaison par le test de Student de cette proportion avec celle de 26,8 % trouvée par **Mc Neil et al. (1990)**, n'a révélé aucune différence significative ($t_{calculé} = 1$) au niveau 5 %.

Sur le plan clinique, la pathogénicité des espèces du genre *Nocardia* est déjà établie. **Patel et al. (2004)** et **Beaman et Beaman (1994)** ont rapporté que les *Nocardia* sont rarement rencontrés en tant que contaminants dans un laboratoire clinique. Elles ne sont pas des constituants de la flore normale de l'homme et **tout isolement doit être considéré comme significatif**. Les souches PC21b, PP*22 et SC46c rapprochées du genre *Nocardia* ont été isolées des patients présentant la tuberculose et déjà soumis à une antituberculothérapie. Donc, Il pourrait s'agir d'une co-infection de nocardiose et de tuberculose. Car **Mc Neil et Brown (1994)** ont mis en évidence chez des patients des infections simultanées à *Nocardia* et à *Mycobacterium tuberculosis*. L'infection à *Nocardia* peut favoriser d'autres infections par les mycobactéries atypiques.

La souche PC3 rapprochée aussi du genre *Nocardia* a été isolée d'un patient suspecté d'avoir une tuberculose, cependant le test cutané à la tuberculine, l'examen direct et la culture sur Lowenstein-Jensen se sont avérés négatifs. **Dans ce cas, cette souche peut être**

incriminée comme étant l'agent responsable de l'infection. Pirouz et al. (1999) ont rapporté que la tuberculose peut être confondue avec la nocardiose, car leurs manifestations cliniques sont similaires. Selon **Saubolle et Sussland (2003)** une corticothérapie est un des facteurs favorisant l'infection par les *Nocardia*. Ce qui est le cas pour la souche PC3, isolée d'un patient soumis à une corticothérapie pendant 6 mois.

Deux souches (SC51 et SC102), soit un taux de 8,69 % ont été rapprochées du genre *Tsukamurella*. La comparaison par le test de Student de cette proportion avec celle 7,04 % obtenue par **Patel et al. (2004)** n'a révélé aucune différence significative ($t_{\text{calculé}} = 1.33$) au niveau 5 %. D'après le **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology** quelques souches de *Tsukamurella* ont été rapportées comme étant les agents responsables des méningites et des infections pulmonaires. **Woo et al. (2003)** ont décrit le premier cas d'une conjonctivite due à *Tsukamurella* sp. **Les patients ayant permis l'isolement des souches SC102 et SC51 présentent, respectivement, les symptômes de la tuberculose et de la fièvre au long cours, sans la mise en évidence de l'agent infectieux.**

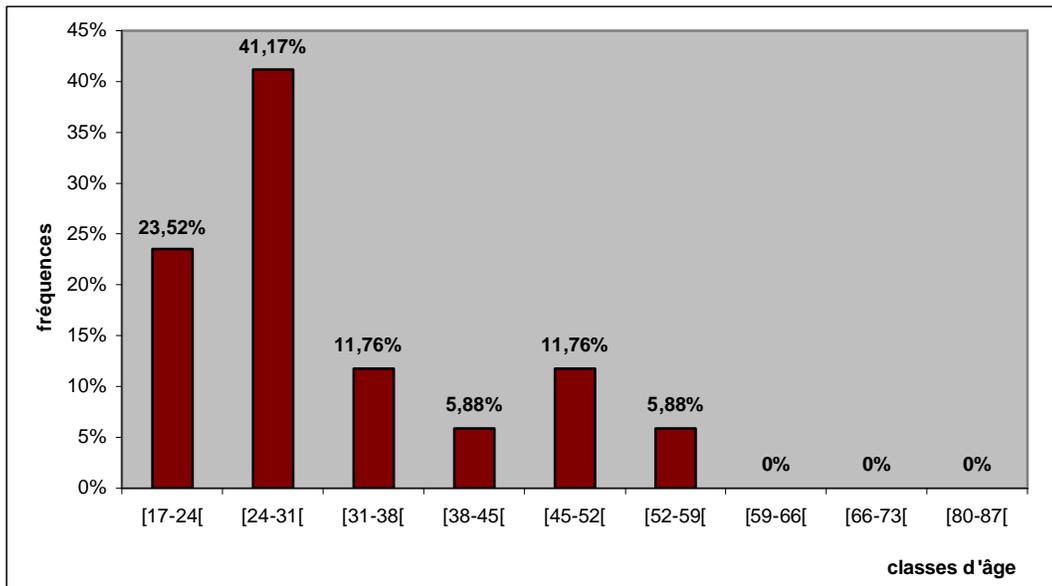


Figure 12 : distribution des actinomycètes aérobies par rapport à l'âge

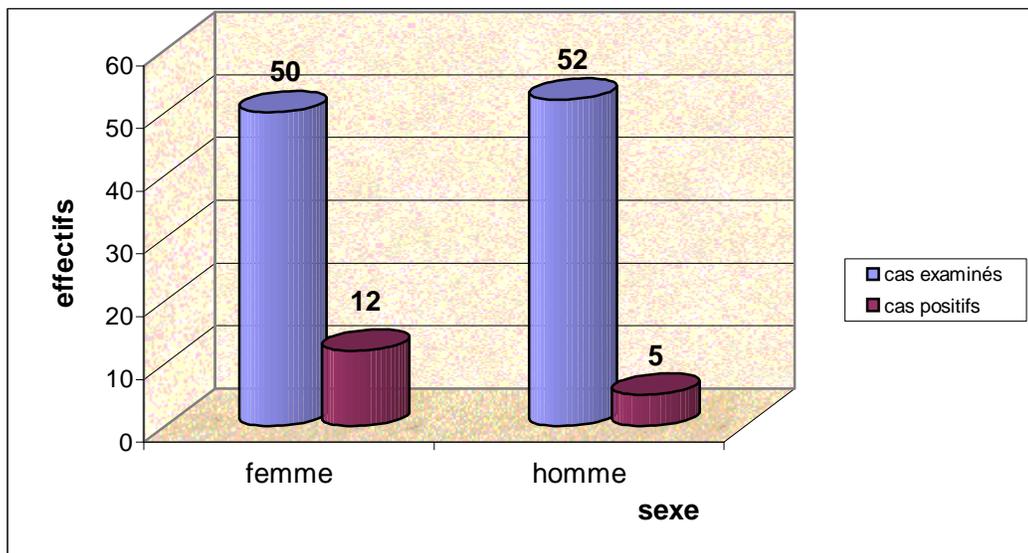


Figure 13 : distribution des actinomycètes aérobies par rapport au sexe

3- Etude statistique

Les actinomycètes pathogènes ont été recherchés à partir d'échantillons de pus, de crachat et du tubage gastrique, prélevés sur cent deux patients adultes, appartenant aux deux sexes et dont l'âge varie de 17 à 81 ans. L'isolement des actinomycètes à partir de ces échantillons a été effectué sur trois milieux différents. Les patients hospitalisés viennent de différentes villes de l'Est Algérien (Setif, Khenchela, Mila, Ain Mlila, Jijel, Batna, Guelma, Biskra, Tebessa, El Oued et Oum El Bouaghi.

Sur les cent deux prélèvements examinés, **dix-sept se sont révélés positifs**, soit une prévalence de **16,66 %**. Cependant, le nombre de souches actinomycétales isolées est de **vingt-trois**.

La distribution par rapport à l'âge est représentée dans la **figure 12**, les patients âgés de 17 à 81 ans ont été repartis en 9 classes d'âge selon la méthode suivante :

$$k = \sqrt{102} = 10,09$$

$$E = 81-17 = 64$$

$$\text{Amplitude (A)} > E / k \rightarrow A > 6,4 \quad (\text{L'amplitude des classes est } 7)$$

La distribution est irrégulière. Le taux le plus élevé est celui de la classe [24 -31[avec 7 cas sur les 17 positifs (41,17 %). Cependant, aucune souche n'a été isolée pour les classes d'âge au-dessus de 59 ans.

La valeur calculée du test d'O'Quigley $z = 11,51$ au seuil 5 % est supérieure à celle de la table. **La différence des fréquences d'isolement par classe d'âge est donc significative.**

Le nombre de cas positifs par rapport au sexe est rapporté dans la **figure 13**. Ces résultats montrent que parmi les 50 prélèvements effectués sur les femmes, 12 sont positifs (24 %), contre 5 cas positifs sur 52 prélèvements effectués sur les hommes (9,61%).

D'après le test de Student $t = 2,05$, cette valeur est donc supérieur à t théorique au seuil 5 %.

La différence selon le test de Student est donc significative montrant ainsi que la présence d'actinomycètes aérobies pathogènes chez les femmes est plus importante que celle observée chez les hommes.

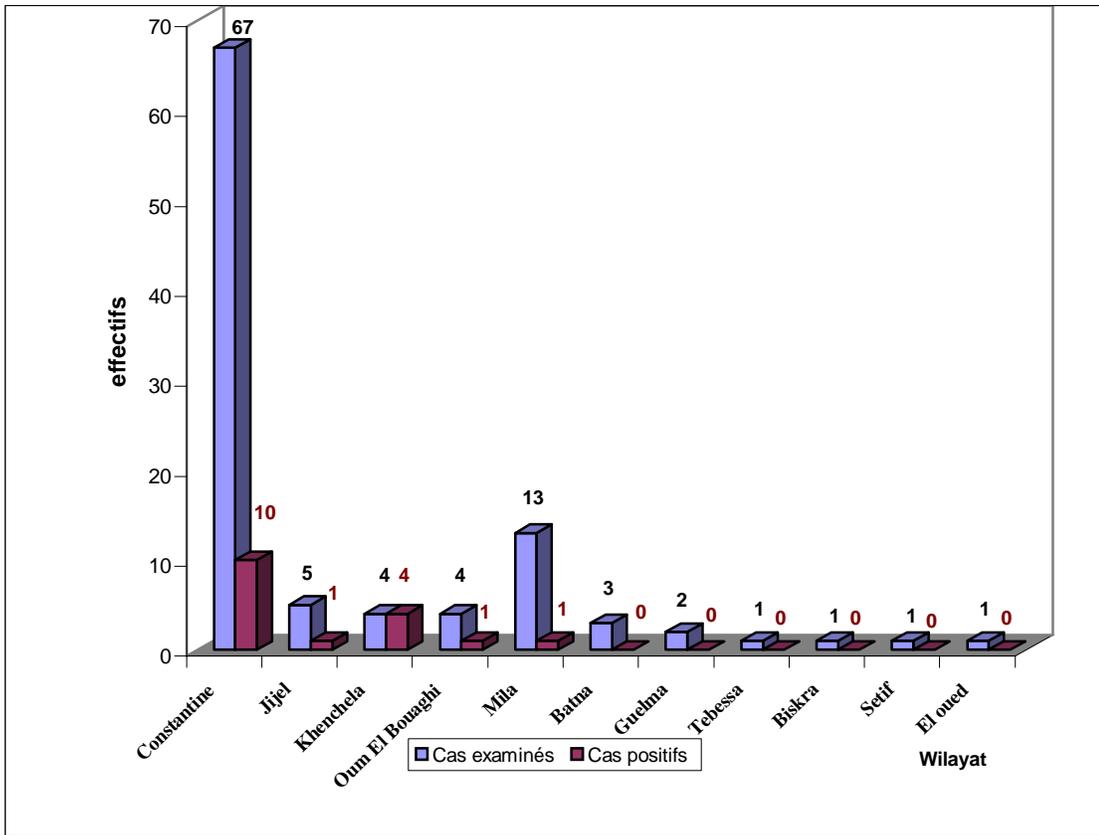


Figure 14 : distribution des actinomycètes aérobies par région (lieu d'habitation)

Le nombre de patients examinés est différent d'une wilaya à une autre. **La figure 14** montre une présence d'actinomycètes dans certaines wilayas et une absence totale dans d'autres. Les wilayat où la présence des actinomycètes a été enregistrée sont : Constantine, Khenchela, Jijel, Oum El Bouaghi et Mila. Parmi ces wilayas, 4 cas examinés provenant de Khenchela sont tous positifs. Seulement 10 cas positifs sur 67 ont été notés dans la wilaya de Constantine. Les taux faibles de distribution sont observés à Jijel (1 cas positif sur 5 examinés), Oum el Bouaghi (1 cas positif sur 4 examinés), et Mila (1 cas positif sur 3 examinés). La valeur calculée du test d'O'Quigley $z = 2,67$ au seuil 5% est supérieure à la valeur théorique. **La différence de distribution par rapport à la région d'habitation est significative.**

Discussion

Les actinomycètes aérobies sont présents à une fréquence de 16,66% chez les malades hospitalisés. Il semble que l'âge des patients est un facteur favorisant les infections à actinomycètes. Ainsi, la majorité des souches (76,45%) proviennent de patients âgés de 17 à 37 ans. Cette distribution est en accord avec celle de **Mariat et Sebald (1990)**, qui rapportent que les infections dues aux actinomycètes aérobies sont constatées pendant la période la plus active de la vie, et que l'actinomycétome est plus fréquent dans la tranche d'âge de 20 à 40 ans.

Par rapport au sexe il y a une prédilection supérieure pour les femmes que pour les hommes contrairement à celle rapporté par **Simonet (1991)** où les actinomycétomes et les infections à *Nocardia* atteignent plus fréquemment les hommes que les femmes. La fréquence d'isolement varie entre les différentes villes de l'Est Algérien où la ville de Khenchela présente le taux le plus élevé.

CONCLUSION
&
PERSPECTIVES

Nos résultats montrent que sur les cent-deux prélèvements examinés; après coloration, douze prélèvements ne présentant pas les filaments ramifiés à Gram positif; se sont révélés positifs en actinomycètes après la mise en culture. En revanche, deux prélèvements n'ont donné aucune souche actinomycétale malgré que leur examen direct était positif.

À partir des cent-deux prélèvements pathologiques ensemencés dans des milieux classiques, trente-deux colonies à bordure filamenteuse ont été prélevées. Après purification, vingt-trois souches ont été retenues comme appartenant à la classe des actinomycètes. Ces souches d'actinomycètes aérobies proviennent de dix-sept prélèvements soit une prévalence de 16,66%.

Les souches à aspect poudreux ont été classées en fonction de la couleur des spores en quatre séries : rose (PC21a, PC31, SC46b), blanche (PC21b, PC21c, PP*22, PC38, SC42), grise (PC3, PC21d, SC57, PC40, PC43b, SC46a, PC63) et beige (PC43a, PC44, SC46c, PC68, SC52). Toutes les souches, à l'exception des PC3, PC21c, PC63, PC68, SC51, SC46a et SC102, diffusent des pigments solubles dans les milieux de culture. Ces derniers sont de couleur rouge, rouge brun, jaune et orange, et ils sont probablement des molécules bioactives. La mélanine est produite par les souches PC42 et PC44, et les souches PC43a, PC40, SC52 et PC38 produisent des pigments voisins de la mélanine.

Sur l'ensemble des vingt-trois souches purifiées et examinées, après la coloration de ZN classique **aucune souche n'est acido-alcolo-résistante**. Cependant, la coloration de ZNM et/ou KM a révélé la présence de souches **acido-alcool-résistantes partielles** (PC3, PC21b, PP*22, SC51, SC46c et SC102). En se basant sur l'aspect macroscopique et microscopique, réduction des nitrates et le test de la β -D galactosidase, **les souches SC51 et SC102 peuvent être rapprochées du genre *Tsukamurella***, tandis que **les souches PC3, PC21b, PP*22 et SC46c peuvent être assignées au genre *Nocardia***.

Parmi les dix-sept souches non acido-alcool-résistantes, La coloration de KM a permis de différencier les *Streptomyces* (PC21a, PC42, PC31, PC38, PC40, PC43a, PC43b, PC44, SC46a, SC44, SC52, SC57, PC63 et PC68) des autres souches.

Ainsi, sur l'ensemble de vingt-trois souches, 14 souches (soit 60,86 %) sont des *Streptomyces*, quatre souches (soit 17,39 %) sont des *Nocardia*, deux souches (soit 8,69 %) sont des *Tsukamurella* et trois souches (soit 13,04 %) non acido-alcool résistantes n'ont pas été identifiées.

La classification des différents types de prélèvements par ordre croissant de fréquence d'isolement des actinomycètes est : le crachat recueilli par tubage (57,14 %) puis celui recueilli par expectoration (25,35%) et enfin le pus (4,16%). En ce qui concerne les milieux d'isolement il s'est avéré que la gélose à la paraffine et le milieu de Sabouraud donnent le même rendement, alors qu'aucune souche n'a pu être isolée sur l'amorce de paraffine.

La fréquence d'isolement des actinomycètes présente une prédilection supérieure pour les femmes (24%) que pour les hommes (9,61%). Elle est aussi importante dans la tranche d'âge entre 17 et 37 ans. Elle varie entre les différentes Wilayat de l'Est Algérien où la wilaya de Khenchela présente le taux le plus élevé.

Sur le plan clinique les souches rapprochées des genres *Nocardia* et *Tsukamurella*, à l'exception des souches PC3 et SC51, ont été isolées des patients présentant la tuberculose et déjà soumis au traitement antituberculeux. Les souches PC38, PC40, SC51 et SC66 ont été isolées des patients avec une fièvre au long cours sans la mise en évidence de l'agent infectieux. **Ces deux derniers résultats montrent clairement la pathogénicité de certaines espèces actinomycétales et leur implication directe dans les infections.**

Cette étude a montré clairement la présence des actinomycètes dans les infections et pour certaines d'entre elles, ils sont les uniques agents infectieux détectés, pour cela :

- il faut poursuivre la recherche de ces bactéries dans une population plus importante et cibler particulièrement les malades à risque
- **les pathologies surveillées** comprendront aussi bien les infections profondes et les infections sous-cutanées chez les patients à risque
- **mettre en place un réseau de surveillance d'infection** à *Nocardia*, à actinomycètes nocardioformes et à *Streptomyces* qui jusqu'à ce jour sont mal suivies (voire pas du tout) dans la région de Constantine et même à l'échelle du pays.

Le nombre de souches cliniques d'actinomycètes aérobies pathogènes isolées a connu une augmentation constante au cours de la dernière décennie. Le développement des thérapeutiques immunosuppressives, l'augmentation du nombre de patients transplantés ou présentant une immunodépression, ainsi qu'une meilleure connaissance de ce cadre nosologique peuvent expliquer ce phénomène. **En raison de la nature** et de la gravité des infections dont elles sont responsables, **l'identification rapide et précise de ces bactéries est**

impérative. Des techniques de biologie moléculaire sont à proposer et à développer telles que :

- la méthode de PCR-RFLP de Steingrube
- l'amplification par PCR des ARN 16S

Il est intéressant de noter que si la connaissance des profils de résistance aux antibiotiques présente un intérêt évident pour le traitement, elle constitue également une aide pour l'identification des différentes espèces. En effet, **Ambaye (1997)** a montré l'existence de profils de résistance caractéristiques de certaines espèces : la sensibilité à l'ampicilline associée à l'érythromycine est par exemple retrouvée pour l'ensemble des souches appartenant à l'espèce *Nocardia nova*.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Abd Bagi M.E., Fahal A.H., Sheik H.E., Abdul Wahab O., Taifoor M.K. and Osmanr E.M. (2003). Pathological fractures in mycetoma. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **97** (5), 582-584.

Ambaye A., Kohner P.C., Wollan P.C., Roberts K.L., Roberts G.D. and Cockerill III F.R. (1997). Comparaison of Agar dilution, broth microdilution, disk diffusion, E-test, and BACTEC radiometric methods for antimicrobial susceptibility testing of clinical isolates of the *Nocardia asteroides* complex. *J. Clin. Microbiol.* **35** (4), 847-852.

Avril J.L., Daberna H., Denis F. and Monteil H. (1992). *Bactériologie Clinique*. Seconde édition, Marketing, Paris. 490-498.

Ayyar S., Tendolkar U. and Deodhar L. (1992). A comparison of three media for isolation of *Nocardia* species from clinical specimens. *J. Postgrad. Med.* **38**, 70-72.

Beaman B.I. and Beaman L. (1994). *Nocardia* species: host parasit relationships. *Clin. Microbiol. Rev.* **7** (2), 13-264.

Beaman B.I., Burnside J., Edwards B. and Causey W. (1976). Nocardial infections in the United States 1972-1974. *J. Infect. Dis.* **134**, 286-289.

Bentley S.D., Chater K.F., Cerdeno-Taraga A. M., Challis G.L., Thomson N.R., James K.D., Harris D.E., Quail M.A., Kieiser H. And Harper D. (2002). Complete genome sequence of the model actinomycetes *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Nat.* **417**, 141-147.

Berd D. (1973). Laboratory identification of clinically important aerobic actinomycetes *J. Clin. Microbiol.* **25** (4), 665-681.

Beytout D. (1990). Écologie bactérienne. *In: Bactériologie Médicale*. Le Minor L. et Véron M. (Eds). Flammarion Médecine-Sciences, Paris. 99-107.

Boiron P. (1996). Mycétome *In: Microbiologie clinique*. Eyquem A. (Ed), Piccin Nuova Libraria, Paris. 152-160.

Boiron P. (1998). Rapport du Centre National de Référence des Mycoses, des Antifongiques et des Actinomycètes. Nuova Libraria, Paris.

Boiron P., Provost F., Chevrier G. and Dupont B. (1992). Review of Nocardial infections in France 1987 to 1992. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **11**, 709-714.

Boiron P., Provost P. and Dupont B. (1993). Méthodes de laboratoire pour le diagnostic de la nocardiose. Institut Pasteur, Paris. 107-126.

Borelli D. and Middelveen M. (1986). Actinomycetoma caused by *Streptomyces somaliensis*. *Arch. Dermatol.* **122**, 1097-1098.

Bross J. F. and Gordon G. (1991). Nocardial meningitis: case report and review. *Rev. Infect. Dis.* **13**, 160-165.

Brown J. M. and McNeil M. M. (2003). *Nocardia, Rhodococcus, Gordonia, Actinomyces*, and other aerobic actinomycetes. In : Manual of clinical microbiology. Murray P. R., Baron E. J., Tenover F. C. and Tenover F. C. (Eds), 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 502-531.

Bruheim P., Sletta H., Bibbo M.J. and D.W. (2002). High-yield actinorhodin production in fed culture by a *Streptomyces lividans* strain overexpressing the pathway-specific activator gene actII-ORF4. *J. Indus. Microbiol. Biotech.* **28**, 103-111.

Carey J., Motyl M. and Perlman D.C. (2001). Catheter-Related Bacteremia due to *Streptomyces* in a Patient Receiving Holistic Infusions. *Emerg. Infect. Dis.* **7 (6)**, 1043-1045.

Carlotti A., Boiron P., Provost P. and Villard J. (1994). *Nocardia* et bactéries apparentées. In: Manuel de Bactériologie clinique. Freney J., Renaud F., Hansen W. et Bollet C., (eds). Vol 2, 2^{ème} édition, 811-831.

Carriere C., Marchandin H., Andrieu J.M., Vandome A. and Perez C. (1999). *Nocardia thyroiditis*: Unusual location of infection. *J. Clin. Microbiol.* **37 (7)**, 2323-2325.

Cavalla M. and Éberlin T. (1994). Isolement des *Streptomyces* du sol L'opéron, XIX, **4**, 13-17.

Chun J., Seong C.N., Bae S.K., Lee K.J., Kang S.O., Goodfellow M. and Hah Y.C. (1998). *Nocardia flavospora* sp.nov. *Inter. J. Syst. Bacteriol.* **48**, 901-905.

Coker R.J., Bignardi G., Horner P., Savage M., Cook T., Tomlinson D. and Weber G. (1992). *Nocardia* infections in AIDS: a clinical and microbiological challenge. *J. Clin. Pathol.* **45**, 841-822.

Collins C.H., Yates M.D. and Uttley H.C. (1988). Presumptive identification of nocardiosis in a clinical laboratory. *J. App. Bacteriol.* **65**, 55-59.

Conville P.S., Fisher S.H., Cartwright C.P. and Witebsky F.G. (2000). Identification of *Nocardia* species by restriction endonuclease analysis of an amplified portion of the 16S rRNA gene. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 158-164.

Conville P.S., Brown J M., Steigerwalt A. G., Lee j. W., Anderson V.L., Fishbain J. T., Holland S. M. and Witebsky F.G. (2004). *Nocardia kruczakiae* sp. nov., a pathogen in immunocompromised patients and a member of the "*N. nova* Complex" *J. Clin. Microbiol.* **42 (11)**, 5139-5145.

Cox F. and Huges W.T. (1975). Contagious and other aspect of nocardiosis in the compromised host. *Pediatrics.* **55**, 135-138.

Curry W. (1980). Human nocardiosis. A clinical review with selected case reports. *Arch. Intern. Med.* **140**, 818-826.

Dabernat H. Sanson -Le-Pors M.J. (1990). *Haemophilus*. *In: Bactériologie Médicale.* Le Minor L. et Véron M. (Eds). Flammarion Médecine-Sciences, Paris. 521-533.

Del Mar Thomas M., Moure R., Saez Nieto J. A., Fojon S., Fernandez A., Diaz M., Villanueva R. and Bou G. (2005). *Williamsia muralis* pulmonary infection. *Emerg. Infect. Dis.* **11 (8)**, 1324-1325.

Dunne E. F., Burman W. J. and Wilson M. L. (1998). *Streptomyces* pneumonia in a patient with human immunodeficiency virus infection: case report and review of the literature on invasive *Streptomyces* infections. *Clin. Infect. Dis.* **27(1)**, 93-96.

Ekkelenkamp M. B., de Jong W., Hustinx W. And Thijsen S. (2004). *Streptomyces thermovulgaris* bacteremia in Crohn's disease patient. *Emerg. Infec. Dis.* **10 (10)**, 2014-2015.

El-Nakeeb M. and Lechevalier H.A. (1963). Selective isolation of aerobic actinomycetes. *Appl. Microbiol.* **11**, 75-77.

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

Ezra D., Castillo U. F., Strobel G. A. (2004). Coronamycins, peptide antibiotics produced by a verticillate *Streptomyces* sp. (MSU-2110) endophytic *Monstera*. *Microbiol.* **150**, 785-793.

Filice G.A. (1993). Nocardiosis. *In: Fungal diseases of the lung.* Sarosi G.A., Davies S.F. (Eds). Raven Press, New York. 191-204.

Fiss E. and Brooks G. F. (1991). Use of a siderophore detection Medium, ethylene glycol degradation, and B-Galactosidase activity in the early presumptive differentiation of *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, and rapidly growing *Mycobacterium* species. *J. Clin. Microbiol.* **29** (7), 1533 -1535.

Flores M., Ford E. G. and Janda J. M. (1990). Value of the O-Nitrophenyl-D-Galactopyranoside test to differentiate among the aerobic actinomycetes *J. Clin. Microbiol.* **28** (9), 2142-2144.

Freland C., Fur C. L., Nemirovsky-Trebucq B., Lelon P. and Boiron P. (1995). Primary cutaneous nocardiosis caused by *Nocardia otitidiscaviarum*: two cases and a review of a literature. *J. Trop. Med. Hyg.* **98**, 395-403.

Gaillard J. L. (1991). Les mycobactéries atypiques. *In : Bactériologie.* Berche P., Gaillard J. L. and Simonet M. (Eds). Flammarion Médecine-Sciences, Paris. 427-433.

Garrity G.M., Bell J.A. and Lilburn T.G. (2004). Taxonomic Outline of the Procaryotes, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Second Edition .Release 5.0, Springer-Verlag, New York. <http://dx.doi.org/10.1007/bergeysoutline200310>.

Georg L.K., Ajello L., McDurmont C. and Hosty T.S. (1961). The identification of *Nocardia asteroides* and *Nocardia brasiliensis*. *Americ. Rev. Resp. Dis* **84**, 337-347

Georghiou P. R. and Blacklock Z.M. (1992). Infection with *Nocardia* species in Queensland. A review of 102 clinical isolates. *Med. J. Aust.* **156**, 692-697.

Gordon R. E and Smith M.M. (1954). Proposed group of characters for the separation of *Streptomyces* and *Nocardia* . J. Bacteriol. **69**, 147-150.

Gordon R. E. and Smith M. M. (1953). Rapidly growing, acid fast bacteria. Species descriptions of *Mycobacterium phlei*. J. Bacteriol. **66**, 41-48.

Grosset J., Boisvert H., Truffort-Pernot C.H. (1990). Mycobactéries. *In*: Bactériologie Médicale. Le Minor L. et Véron M. (Eds). Flammarion Médecine-Sciences, Paris. 965-999.

Guiraud J. P. (1998). Techniques d'analyses microbiologiques. *In* : Microbiologie alimentaire. Dunod, Paris. 232-320.

Hamid L. E., Maldonado L., Eldin G.S.S., Mohamed M.F., Saeed, N.G. and Goodfellow M. (2001). *Nocardia africana* sp. Nov. a new pathogen isolated from patient with pulmonary infections. J. Clin. Microbiol. **39**, 625-630.

Holt J. D., Krieg N. R., Sneath P.H.A., Staly J. T. and Williams S. T. (1994). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9th edition. Williams and Wilkins. Baltimore.

Holt RIG, Kwan J.T.C., Sefton A.M. and Cunningham J. (1993). Successful treatment of concomitant pulmonary nocardiosis and aspergillosis in an immunocompromised renal patient. Euro. J. Clin. Microbiol. Infect Dis. **12**, 110-112.

Holtz H.A., Lavery D.P., Kapila R. (1985). Actinomycetales infection in the acquired immunodeficiency syndrome. Ann. Intern.Med. **102 (2)**, 203-205

Lavery D.P., Holtz H. A. and Kapila R. (1985). *Actinomycetales* infection in the acquired immunodeficiency syndrome. Ann. Intern. Med. **102 (2)**, 203-205.

Horinouchi S. and Beppu T. (1994). A factor as a microbial hormone that controls cellular differentiation and secondary metabolism in *Streptomyces griseus*. Mol. Microbiol. **12**, 859-864.

Houang E.T., Lovett I.S. Thompson F.D., Harisson A.R., Jockes A.M. and Goodfellow M. (1980). *Nocardia asteroides* infection: a transmissible disease. J. Hosp. Infect. **1**, 31-40.

Jussila J., Komulainen H. and Huttunen K. (2001). Inflammatory responses in mice after intratracheal instillation of spores of *Streptomyces californicus* from indoor air of a moldy building. *Toxico. Apli. Pharmaco.* **117**, 61-69.

Kageyama A., Torikoe K., Iwamoto M., Masuyama J.-I., Shibuya Y., Okazaki H., Yazawa k., Minota S., Kroppenstedt R. M. and Mikami Y. (2004 a) *Nocardia arthritidis* sp. nov., a new pathogen isolated from a patient with rheumatoid arthritis in Japan. *J. Clin. Microbiol.* **42(6)**, 2366-2371.

Kageyama A., Poonwan N., Yazawa K., Mikami Y. and Nishimura K. (2004 b). *Nocardia asiatica* sp. nov., isolated from patients with nocardiosis in Japan and clinical specimens from Thailand. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54** , 125-130.

Kalakoutskii L. V. and Agre N. S. (1976). Comparative aspects of development and differentiation in actinomycetes. *Bacteriol. Rev.* **40 (2)**, 469–524.

Kano R., Hattori Y., Murakami N., Mine N., Kashima M., Kroppenstedt R.M., Mizoguchi M. and Hasegawa A. (2002). The first isolation of *Nocardia veterana* from a human mycetoma. *Microbiol. Immunol.* **46(6)**, 409-412.

Keulen G.V., Jonkers H.M., Cloesson D., L. D. and Woston H.A.B. (2003). Differentiation and anaerobiosis in standing liquid cultures of *Streptomyces coelicolor*. *J. Bacteriol.* **185 (4)**, 1455-1458.

Kim D. W., Chater K., Lee K. J. and Hesketh D. (2005). Changes in the extracellular proteome caused by the absence of the *bldA* gene product, a developmentally significant tRNA, reveal a new target for the pleiotropic regulator AdpA in *Streptomyces coelicolor*. *J. Bacteriol.* **187 (9)**, 2957-2966.

Kitzis M.D., Gutmann L. and Acar J.F. (1985). *In-vitro* susceptibility of to 21 β -lactam antibiotics, in combination with three β -lactamase inhibitors, and its relationship to the β -lactamase content. *J. Antimicrob. Chemother.* **15**,23-30.

Labeda D.P. and Kroppenstedt R.M. (2000). Phylogenetic analysis of *Saccharothrix* and related taxa : proposal for *Actinozynnzmataceae* fam. Nov. *Int. J.Syst. Evol. Microbiol.* **50**, 331-336.

Lacey J. (1997). Actinomycetes in composts. *Ann. Agr. Env. Med.* **4**, 113-121.

Larpent J.-P. et Larpent-Gourgaud M. (1985 a). Eléments de Microbiologie. Hermann. Paris. 264

Larpent J.-P. et Larpent-Gourgaud M. (1985 b). Manuel pratique de microbiologie. Hermann. Paris. 157-162

Larpent J. P. et Sanglier J. J. (1989). Biotechnologie des antibiotiques. Masson. Paris. 35-55

Lechevalier M.P. and Lechevalier H. (1985). Biology of actinomycetes not belonging to genus *Streptomyces* In : Biology of industrial microorganisms. The Benjamin Cummings Publishing Company, Inc. 315-316.

Lerner P.I. (1996). Nocardiosis. Clin. Infect. Dis. **22**, 891-905.

Lindholm P., Kortemaa H., Kokkola M., Haahtela K., Salkinoja-Salonen M. and Valkonen J.P.T. (1997). *Streptomyces* spp. Isolated from potato scab lesions under Nordic conditions in Finland. Plant. Dis. **81**, 1317-1322.

Liu Z., Shi Y., Zhang Y., Zhou Z., Lu Z., Li W., Huang Y., Rodríguez C. and Goodfellow M. (2005). Classification of *Streptomyces griseus* (Krainsky 1914) Waksman and Henrici 1948 and related species and the transfer of '*Microstreptospora cinerea*' to the genus *Streptomyces* as *Streptomyces yanii* sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **55**, 1605-1610.

Lopez Martinez R., Mendez Tovar L.J., Lavalle P., Welsh O., Saul A., and Macotella Ruiz E. (1992). Epidemiology of mycetoma in Mexico : study of 2105 cases. Gac. Med. Mex. **128 (4)**, 477-81.

Lum C. A. and Vadmal M. S. (2003). *Nocardia asteroides* mycetoma. Ann. Clin. Labo. Sci. **33**, 329-333.

Maiti P. K. and Bandyopadhyay S. (2002). Epidemiological aspects of mycetoma from a retrospective study of 264 cases in West Bengal. Trop. Med. Int. Health. **7 (9)**, 788-792.

Maiti P. K., Bandyopadhyay D., Dey J. B., Majumdar M. (2003). Mycetoma caused by a new red Grain mycetoma agent in two members of a family. J. Postgrad. Med. **49, (4)** 322-324.

Mansour S.R. (2003). The Occurrence and distribution of soil actinomycetes in Saint Catherine area, South Sinai, Egypt. *Pakist. J. Biol. Sci.* **6 (7)** , 721-728.

Margalith P. Z. (1992). Pigment microbiology. Shapman & Hall. London. 5-114.

Mariat F. et Sebald M. (1990). Actinomycètes *In: Bactériologie Médicale.* Le Minor L. et Véron M. (Eds), 2^{ème} édition, Flammarion. Paris. 935-949.

Martin M. C., Manteca A., Castillo M. L., Vázquez F. and Méndez F. J. (2004). *Streptomyces albus* isolated from a human actinomycetoma and characterized by molecular techniques. *J. Clin. Microbiol.* **42 (12)**, 957-5960.

Martin J. F. (2004). Phosphate control of the biosynthesis of antibiotics and other secondary metabolites is mediated by the PhoR-PhoP system : an unfinished story. *J. Bacteriol.* **186 (16)**, 5197-5201.

McNeil M. M , Brown J. M., Jarvis W.R. and Ajelo L. (1990). Comparison of species distribution and antimicrobial susceptibility of aerobic actinomycetes from clinical specimens. *Rev. Infect. Dis.* **12**,778-783.

McNeil M.M and Brown J. M. (1994). The medically important aerobic actinomycetes: epidemiology and microbiology. *Clin. Microbiol. Rev.* **7 (3)**, 357-417.

Mincer T.J., Jensen P.R., Kauffman C.A. and Fenical W. (2002). Widespread and persistent population of a major new marine actinomycetes taxon in ocean sediments. *Appl. Env. Microbiol.* **68 (10)**, 5005-5011.

Mishra S.K., Gordon R.E. and Barnett D.A. (1980). Identification of *Nocardia* and *Streptomyces* of medical importance. *J. Clin. Microbiol* **11 (6)**, 728-736.

Mizukami T., Masato Ikeda K. R., Miyake K. and Nakano T. (2000). Mechanism of the incidental production of melanin-like pigment during 6-Demethylchlortetracycline production in *Streptomyces aureofaciens*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66 (4)**, 1400-1404.

Mocheva P., Tishkov S., Dimitrova N., Chipeva V. Antonova-Nikolova S. and Bogatzevska N. (2002). Characteristics of actinomycetes from Antarctica *J. Cult. Collect.* **3**, 3-14.

Motta R.L., Vilela R.V.R. and Lambertucci J.R. (2004). Actinomycetoma caused by *Nocardia brasiliensis*. Rev. Soc. Braz. Med. Trop. **37 (3)**, 287-288.

Myadoh S. Tsuchizaki N., Ishikawa J. and Hotta K. (2002). Digital Atlas of Actinomycetes. ([Http://www.nih.go.jp/saj/DigitalAtlas](http://www.nih.go.jp/saj/DigitalAtlas)). Tokyo: The Society for Actinomycetes, Japan.

Nodwell J.R. and Losick R. (1998). Purification of an extracellular signaling molecule involved in production of aerial mycelium by *Streptomyces coelicolor*. J. Bacteriol. **180 (5)**, 1334-1337.

Ogata S.A and Beaman B.L. (1992). Adherence of *Noacrdia asteroides* within the murinr brain. Infec. Immun. **60 (5)**, 1800- 1805.

Omura S., Ikeda H., Ishikawa J. Hanamoto A., Takahashi C., Shinose M., Takahashi Y., Horikawa H., Nakazawa H. and Osonoe T. (2001). Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitillis*: deducing the ability of producing secondary metabolites. Proc. Nati. Acad. Sci. USA. **98**, 12215-12220.

Oskay M., Tamer A. Ü. and Azeri C. (2004). Antibacterial activity of some actinomycetes isolated from farming soils of Turkey. Afric. J. Biotechnol. **3 (9)**, 441-446.

Ou O. and An N. O. (1987). Presumptive diagnosis of pulmonary nocardiosis: value of sputum microscopy. J. Appl. Bacteriol. **63 (1)**, 27-38.

Pamboukian C. R. D., Guimarães L. M. and Facciotti M.C. R. (2002). Applications of image analysis in the characterization of *Streptomyces olindensis* in submerged culture . Braz. J. Microbiol. **33 (1)**, 17-21.

Patel J. B., Wallace J. R. J., Brown-Elliot B. A., Taylor T., Imperatrice C., Leonard D. G. B., Wilson R. W., Mann L., Jost K.C and Nachamkin I. (2004). Sequence-based identification of aerobic actinomycetes. J. Clin. Microbiol. **42 (6)**, 2530-2540.

Perry J.J., Staley J.T. and Lory S. (2004). Microbiologie. Dunod, Pais. 497-498.

Perschak H., Gubler J., Speich R., Russi E. (1991). Pulmonary nocardiosis concurrent with *Pneumocystis carinii* pneumonia in two patients undergoing immunosuppressive therapy. *J. Infect.* **23**, 183-185.

Pirouz T., Karbasian M.A. and Goodfellow M. (1999). Isolation of some aerobic actinomycetes species from the soil of Zahedan County, South-East of Iran. *Irn. J. Med. Sci.* **24**, 65-67.

Polak G. (1989). Melanin as a virulence factor in pathogenic fungi. *Mycoses.* **33**, 215-224.

Presant C.A., Wiernik P.H. and Serpick A.A. (1973). Factors affecting survival in nocardiosis. *Am. Rev. Respir. Dis.* **108**, 1444-1448.

Raoult D. (1998). Dictionnaire des maladies infectieuses. Diagnostic, épidémiologie, répartition géographique, taxonomie, symptomatologie. Elsevier. Paris. 717-769.

Reichl U., King R. and Gilles E. D. (1992). Characterization of pellet morphology during submerged growth of *Streptomyces tendae* by image analysis. *Biotech. Bioeng.* **2**, 164 – 170.

Reponen T. A., Gizenko S. V., Grinshpun S. A., Willeke K. And Cole E. C. (1998). Characteristics of Airborne Actinomycete Spores. *Appl. Environ. Microbiol.* **64 (10)**, 3807-3812.

Riou J.Y. and Courtiou A.L. (1990). *Neisseriaceae. In: Bactériologie Médicale. Le Minor L. et Véron M. (Eds). Flammarion Médecine-Sciences, Paris. 623-643.*

Rodriguez-Nava V., Coble A., Molinard C., Sandoval H., Boiron P. and Laurent F. (2004). *Nocardia mexicana* sp.nov., a new pathogen isolated from human Mycetomas. *J. Clin. Microbiol.* **42 (10)**, 4530-4535.

Roth A., Andrees S., Kroppenstedt R. M., Harmsen D. and Mauch H. (2003). Phylogeny of the genus *Nocardia* based on reassessed 16S rRNA gene sequences reveals under speciation and division of strains classified as *Nocardia asteroides* into three established species and two unnamed taxons. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 851–856.

Sahathevan M., Harvey F. A. H., Forbes G., O'Grady J., Gimson A., Bragman S., Jensen R., Philpott-Howard J., Williams R. and Casewel M.W. (1991). Epidemiology, bacteriology and control of an outbreak of *Nocardia asteroides* infection in a liver unit. J. Hosp. Infect. **18**, 473-480.

Sardi P., Saracchi M., Petrolini B., Borgonovi G.E. and Merli S. (1992). Isolation of endophytic *Streptomyces* strains from surface-sterilized roots. Appl. Env. Microbiol. **58 (8)**, 2691-2693.

Saubolle M. A. and Sussland D. (2003). Nocardiosis: Review of Clinical and Laboratory Experience. J. Clin. Microbiol. **41**, 4497-4501.

Shawar R.M., Moore D.G. and Larocco M. T. (1990). Cultivation of *Nocardia* spp. on chemically defined media for selective recovery of isolates from clinical specimens. J. Clin. Microbiol. **28 (3)**, 508-512.

Shirling E. and Gottlieb D. (1972). Cooperative description of type strains of strains of *Streptomyces*. Intern. J. Syst. **22**, 265-394.

Shirling E.B. and Gottlieb D. (1966). Methods for characterization of *Streptomyces* species. Int. J. Sys. Bacteriol. **16 (3)**, 313-340.

Simonet M. (1991). *Nocardia* In : Bactériologie. Berche P., Gaillard J. L. and Simonet M. (Eds). Flammarion Médecine-Sciences, Paris. 338-343.

Simpson G.L., Raffin T.A. and Remington J.S. (1982). Association of prior nocardiosis and subsequent occurrence of nontuberculous mycobacteriosis in a defined, immunosuppressed population. J. Infect. Dis. **146**, 211-219.

Singh M., Sandhu R.S., and randhawa H.S. (1987). Comparison of paraffin baiting and conventional culture techniques for isolation of *Nocardia asteroides* from Sputum. J. Clin. Bacteriol. **25 (1)**, 176-177.

Skinner F.A. et Carr J. G. (1974). The normal microflora in man. Academic press, Londres, New-York.

Song J. Weon H. Y., Yoon S. H., Parrk D. S., Go S. G. and Suh J. W. (2001). Phylogenetic diversity of thermophilic actinomycetes and *Thermoactinimycetes* isolated from mushroom composts in Korea based on 16S RNA gene sequence analysis. FEMS Microbiol. Lett. **202**, 97-102.

Sprusansky O., Zhou L., Jordan S., White J. and Westpheling J. (2003). Identification of a new genes involved in Morphogenesis and antibiotic production in *Streptomyces coelicolor*. J. Bacteriol. **185 (20)**, 6147-6157.

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

Stackebrandt E. and Schumann P., (2000). Description of *Bogoriellaceae* fam. Nov., *Dermacocaceae* fam. Nov., *Rarobacteraceae* fam. Nov. and *Sanguibacterceae* fam. Nov. and emandation of some families of the suborder *Micromcoccineae*. Int. J. Syst. Bacteriol. **50**, 1279-1285.

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 S.I, Okuda T. and Komatsubara S. (1999). Selective isolation and distribution of *Sporichthya* strains in soil. Appl. Env. Microbiol. **65 (5)**, 1930-1935.

Sy M.H., Diouf A.G., Diakhate I., Dangou J.M., Dieng M.T., Barberet G., Ndiaye A., Diem C.B., Dansokho A.V. and Seya S. (2003). Ostéite mycétomique et mycétomes osseux. e-mémoire de l'Académie Nationale de Chirurgie **2 (2)**, 11-17.

Takizawa M., Cowell R.R. and Hill R.T. (1993). Isolation and diversity of actinomycetes in the Chesapeake Bay. Appl. Env. Microbiol. **59 (4)**, 997-1002.

Tamura S., Park Y., Toriyama M. and Okabe M. (1997). Change of mycelial morphology in tyrosin production by batch culture of *Streptomyces fradiae* under various shear conditions. J. Ferment. Bioeng. **83**, 523-528.

Tendolkar U.M., Varaiya A., Ahuja A.S., Motwane S.A. and Gogate A. S. (1998). Corneal ulcer caused by *Nocardia asteroides* in a patient with leprosy. J. Clin. Bacteriol. **36** (4), 1154-1156.

Thirupl L., Johsen K. and Winding A. (2001). Succession of indigenus *Pseudomonas spp.* and *Actinomycetes* on barley roots affected by the antagonistic strain *Pseudomonas fluorescens DR54* and the fungicide imazalil. Appl. Env. Microbiol. **67** (3), 1147-1153.

Thompson C. J., Fink D., and Nguyen L. D. (2002). Principles of microbiol alchemy: insights from the *Streptomyces coelicolor* genome sequence. Gen. Biol. **3** (7), 10201-10204.

Vickers R.M., Rihs J. D. and Yu V. (1992). Clinical Demonstration of *Nocardia asteroides* on buffered charcoal-yeast extract media. J. Clin. Microbiol. **30** (1), 227-228.

Vijigenboom E. and Keijser B.J.F. (2001). Copper and the morphological development of *Streptomyces*. In: hand book of copper pharmacology and toxicology. Massaro E. (Ed). Humana Press. 503-525.

Wallace R.J., Brown B.A., Blacklock Z., Ulrich R., Jost K., Brown J.M., McNeil M., Onyi G., Steingrube V. A. and Gibson J. (1995). New *Nocardia* taxon among isolates of *Nocardia brasiliensis* associated with invasive disease. J. Clin. Microbiol. **33** (6), 1528-1533.

Williams S. T. and Davies F. L. (1965). Use of antibiotics for selective isolation and enumeration of actinomycetes in soil. J. Gen. Microbiol. **38**, 251-261.

Williams S.T. and Cross T. (1971). Methods in microbiology. Academic press, Londre. **4**, 295-334.

Woo P. C. Y., Ngan A. H. Y., lau S. K. P. and Yung K. (2003). *Tsukamurella conjunctivis*: a novel clinical syndrome. J. Clin. Microbiol. **41** (7), 3368-3371.

Zaitlin B., Watson S.B., Ridal J., Satchwill T. and Parkinson D. (2003). Actinomycetes in lake Ontario: Habitats and geosmin and MIB production. Peer-reviewe, J. AWWA, **95** (2), 113-118.

Zerizer H. (2004). Identification des *Actinomycetales* isolés de sols arides. Optimisation des milieux de croissance et de sporulation. Thèse de Magister. Faculté des Sciences. Université Mentouri Constantine.

ANNEXES

Annexe 1

Milieux de culture

Bouillon exempt de carbone pour l'enrichissement (CFB)

Sabouraud

Glucose	40 g
Peptone	10 g
Agar	15 g
Eau distillée	1000 ml

pH = 7

Gélose à la paraffine (PA)

Bouillon exempt de carbone	900 ml
Huile de paraffine	100 ml
Agar	17 g

pH = 7,2

L'amorce de paraffine

Bouillon de McClung

NaNO ₃	2 g
K ₂ HPO ₄	0,8 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,5 g
FeCl ₃	0,01 g
MnCl ₂	0,0008 g
ZnSO ₄	0,0002 g
Eau distillée	1000 ml

pH = 7,2

Remplir 60% d'un tube avec de la

paraffine en pellets. Autoclaver pendant 15 minutes à 121 C°. Laisser la paraffine en tube se solidifie en position inclinée. Puis à chaque tube ajouter 2.5 ml du bouillon de McClung.

Gélose viande foie (VF)

Extrait de viande	10 g
Peptone	20 g
Extrait de levure	10 g
Glucose	5 g
Agar	15 g
Eau distillée	1000 ml
pH = 7,6	

Sporulation Agar

Extrait de levure	1 g
Extrait de viande	1 g
Tryptose	2 g
FeSO ₄	trace
Glucose	10 g
Agar	15 g
Eau distillée	1000 ml
pH = 7	

ISP 2

Extrait de levure	4 g
Extrait de malt	10 g
Glucose	4 g
Agar	20 g
Eau distillée	1000 ml
pH = 7,3	

ISP 3

Solution d'avoine*	1000 ml
Solution d'oligo- éléments**	1 ml
Agar	18 g
pH = 7,2	

ISP 4

Amidon soluble	10 g
K ₂ HPO ₄	1 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	1 g
NaCl	1 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	2 g
CaCO ₃	2 g
Agar	20 g
Eau distillée	1000 ml
pH = 7,0 – 7,4	

ISP 5

Asparagine	1 g
Glycérol	10 g
K ₂ HPO ₄	1 g
Solution d'oligo-éléments**	1ml
Agar	20 g
pH = 7,4	

ISP 6

Peptone	15 g
Protéose peptone	5 g
Citrate de fer ammoniacal	0,5 g
Phosphate dipotassique	1 g
Sodium thiosulfate	0,08 g
Extrait de levure	1 g
Agar	15 g
Eau distillée	1000 ml
pH = 7 – 7,2	

ISP 7

Glycérol	15 g
L-tyrosine	0,5 g
L-asparagine	1,0 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,5 g
NaCl	0,5 g
FeSO ₄ 7H ₂ O	0,01 g
Agar	20 g
Eau distillée	1000 ml
pH = 7,2 – 7,4	

Glucose Asparagine

Glucose	10 g
Asparagine	0,5 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
Agar	15 g
Eau distillée	1000 ml
pH = 6	

L'Agar blanc (TWA)

Agar	20 g
Eau de robinet	1000 ml
pH = 7	

Bouillon de glucose

Peptone	5g
Extrait de viande	5 g
Extrait de levure	5 g
Glucose	5 g
Eau distillée	1000 ml
pH = 7,0	

Amidon caséine

Amidon soluble	10 g
Caséine	1 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
Agar	20 g
Eau distillée	1000 ml
pH = 7,0-7,5	

Bouillon nutritif

Peptone	10 g
Extrait de levure	5 g
NaCl	5 g
Eau	1000 ml
pH = 7,2	

Glycérol-extrait de sol (GSEA)

Peptone	5 g
---------	-----

Extrait de viande	3 g
Glycérol	20 g
Extrait de sol ^{***}	150 ml
Agar	15 g
Eau distillée	1000 ml

pH = 7

Gélose au cerveau et au cœur de veau

Protéose peptone	10 g
Infusion de cerveau de veau	12,5 g
Infusion de cœur de bœuf	5 g
NaCl	5 g
Phosphate disodique	2,5 g
Glucose	2 g
Agar	15 g
Eau distillée	1000 ml

PH= 7,4

Solutions et colorants

Solution d'avoine*

Faite bouillir 20g d'avoine dans 1000ml d'eau distillée pendant 20 minutes.

Filtrer à l'aide d'une gaze

Compléter le volume du filtrat à 1000 ml.

Solution d'oligo-éléments**

FeSO ₄ 7 H ₂ O	0,1 g
MnCl ₂ 4 H ₂ O	0,1 g
ZnSO ₄ 7 H ₂ O	0,1 g
Eau distillée	1000 ml

Extrait de sol***

Sol du jardin séché et tamisé	49 g
Eau de robinet	960 ml

Autoclavage à 121°C pendant 1heure.

Après refroidissement le surnageant décanté est filtré, puis stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 20 minutes et conservé à température ambiante.

Décolorant de ZN

Bleu de méthylène	10 g
Alcool éthylique absolu	300 ml
Acide sulfurique à 60°	200 ml
Eau distillée	500 ml

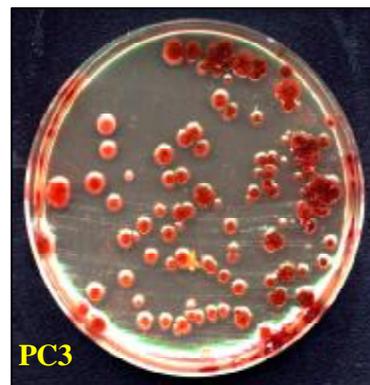
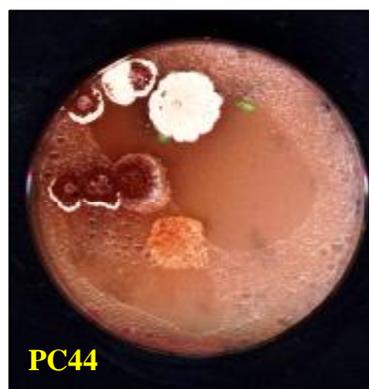
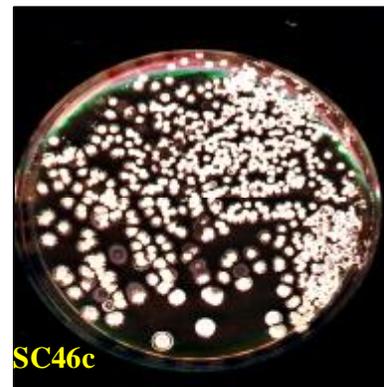
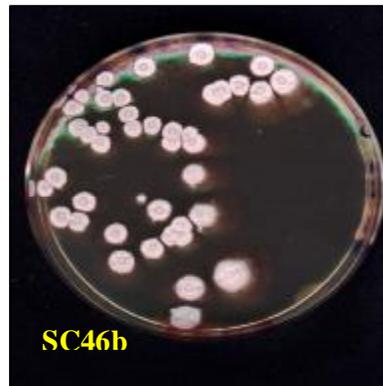
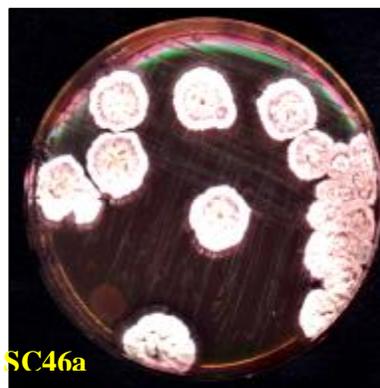
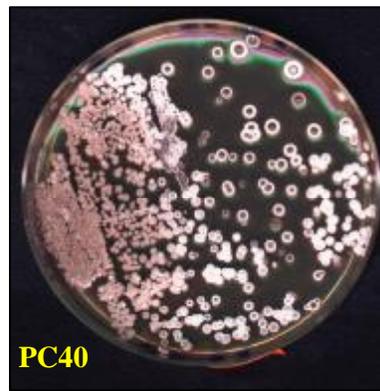
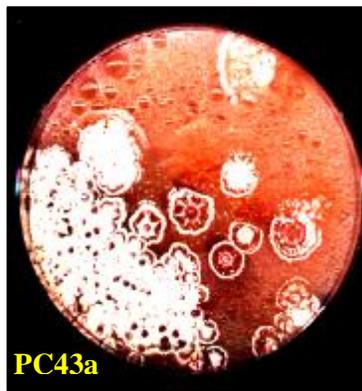
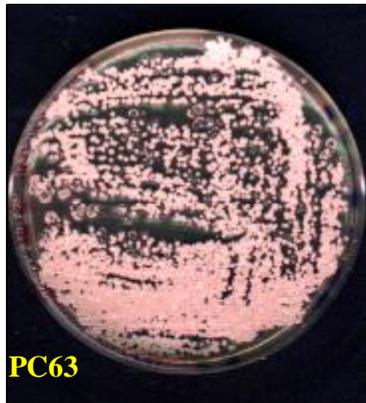
Carbolfuschine

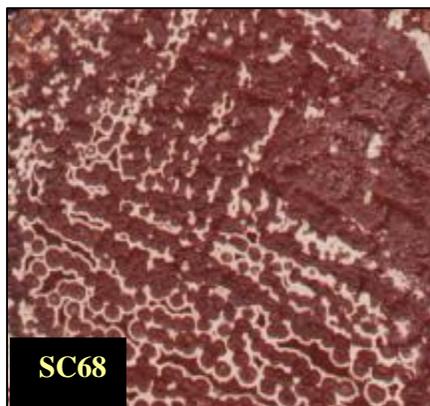
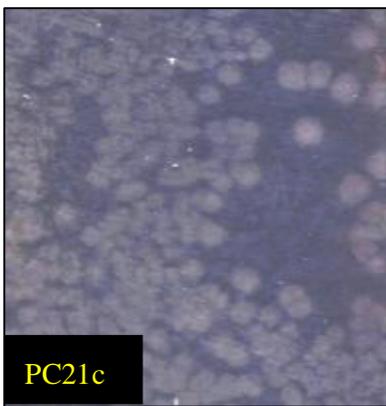
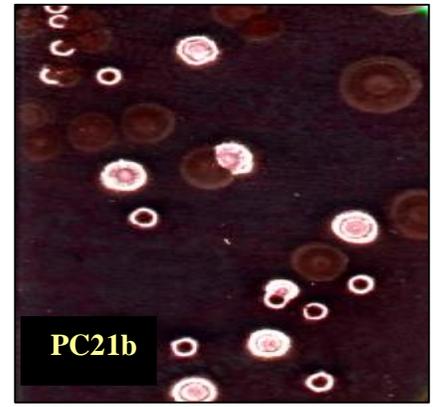
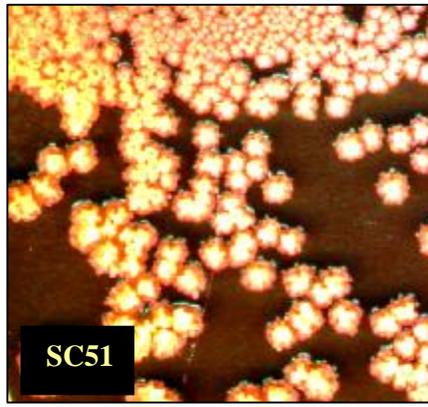
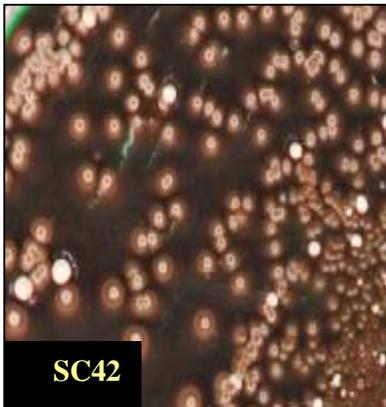
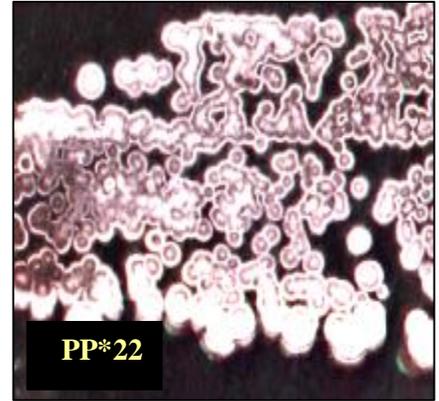
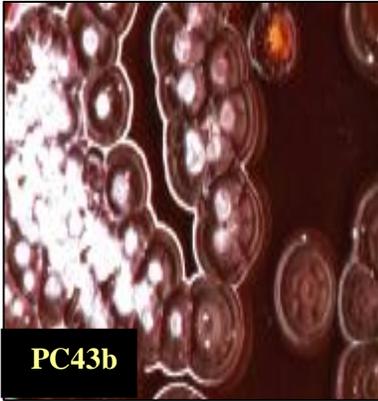
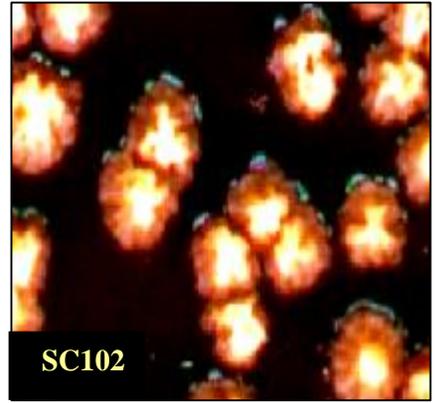
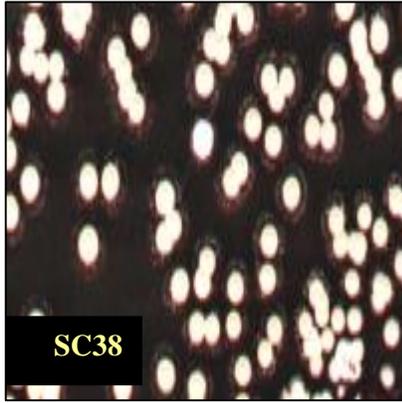
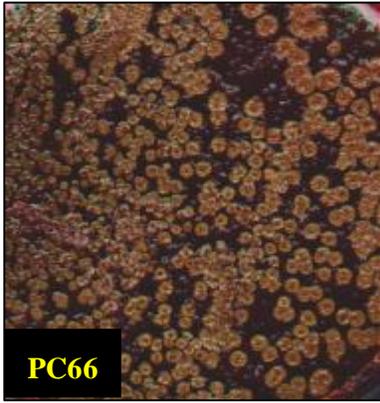
Solution de la fuchsine basique	10ml
Solution de phénol 5 %	90ml

Décolorant de la coloration ZN modifiée

HCl concentré	3 ml
Alcool éthylique 95%	97 ml

Annexe 2 Les vingt-trois souches isolées et purifiées





ملخص

وجود aerobic actinomycete الممرضة تم حصرها في سبعة عشرة عينة من بين 102 تم تحليلها خلال الفترة الممتدة بين جانفي و جويلية 2005 و ذلك بنسبة تقدر بـ: 16,66 % .

تم عزل إثنان و ثلاثون عشيرة تبدي الخصائص المرفولوجية الخارجية لـ: actinomycete . ولكن بعد الفصل في وسط مضاف إليه المضادات الحيوية. ثلاثة و عشرون سلالة فقط تم الإحتفاظ بها لأنها موجبة الغرام و حافة العشيرة ليفية المظهر و بذلك تم نسبها إلى ترتيب *Actinomycetales* . هذه السلالات مصدرها عينات النفث (sputum) (18)، العصارة المعدية (4) و القيح (1) .

الخصائص المرفولوجية سمحت بتصنيف هذه السلالات في 4 مجموعات على حسب لون العشيرة: وردي، بيضاء، رمادية و أسمر فاتح و أظهرت كذلك أن بعض السلالات تنتج مادة الميلانين .

حسب الخصائص المورفولوجية و كذلك المقاومة لفعل حمض - كحول و بعض الإختبارات البيوكيميائية تم نسب أربع عشرة سلالة (60,86%) إلى *Streptomyces* ، أربع سلالات (17,39%) إلى *Nocardia* ، سلالتين (8,69%) إلى *Tsukamurella* و ثلاث سلالات (13,04%) لم يتم تصنيفها.

الكلمات المفتاحية

Aerobic actinomycetes pathogene, *Nocardia* and related genera , *Streptomyces*, *Tsukamurella* ,infection, nocardiosis, actinomycetoma.

Abstract

The presence of the aerobic actinomycetes pathogene was highlighted in seventeen clinical samples among one hundred and one analyzed during the period from January at July 2005, so a total frequency of 16,66%.

Thirty-two colonies with morphological aspect characteristic of actinomycetes were retained. After purification on medium added with antibiotics, twenty three strains with filamentous aspect and Gram positive were regarded as belonging to the order of the Actinomycetales. These strains come from samples of sputum (18), gastric liquid (4) and pus (1).

The morphological and cultural features made it possible to gather the strains in series; pink, white, grey and beige, and to reveal the production of melanin by some strains. Thus, the whole of the morphological and biochemical characteristics and acido-alcohol fastness show that 14 strains are *Streptomyces* (60,86 %), 4 strains are *Nocardia* (17,39 %), 2 strains are *Tsukamurella* (8,69 %) and 3 strains not acido-alcohol fast (13,04 %) not identified.

Key words

Aerobic actinomycetes pathogene, *Nocardia* and related genera , *Streptomyces*, *Tsukamurella*, infections, nocardiosis, actinomycetoma.

Nom : Aouar

Prénom : Lamia

Thème : Mise en évidence des actinomycètes aérobies pathogènes impliqués dans les infections traitées au service des maladies infectieuses du CHU de Constantine. Etude des caractéristiques culturelles des souches isolées et purifiées.

Résumé

La présence des actinomycètes aérobies pathogènes a été mise en évidence dans dix-sept prélèvements cliniques sur cent-deux analysés pendant la période de Janvier à Juillet 2005, soit une prévalence de 16,66%.

Trente-deux colonies, à aspect morphologique caractéristique des actinomycètes, ont été prélevées. Après purification sur milieu additionné d'antibiotiques, vingt-trois souches à Gram positif et à aspect filamenteux ont été retenues comme appartenant à l'ordre des actinomycétales. Ces souches proviennent d'échantillons de crachat (18), de tubage gastrique (4) et de pus (1).

Les caractéristiques morphologiques et culturelles ont permis de regrouper les souches en séries; rose, blanche, grise et beige, et de révéler la production de la mélanine par certaines souches. Ainsi, l'ensemble des caractéristiques morphologiques et biochimiques et l'acido-alcool-résistance montrent que 14 souches (soit 60,86 %) sont des *Streptomyces*, 4 souches (soit 17,39 %) sont des *Nocardia*, 2 souches (8,69 %) sont des *Tsukamurella* et 3 souches non acido-alcool-résistantes non identifiées (soit 13,04 %).

Les mots clés:

Actinomycètes aérobies pathogènes, *Nocardia* et genres apparentés, *Streptomyces*, infection, nocardiose, actinomycétome.

Laboratoire de recherche : laboratoire de génie microbiologique et applications