

ISABELLE HARVEY

**SÉLECTION DE TESTS DISCRIMINANTS POUR L'IDENTIFICATION
RAPIDE DES ACTINOMYCÈTES THERMOPHILES IMPLIQUÉS DANS
L'ALVÉOLITE ALLERGIQUE EXTRINSÈQUE**

Mémoire
présenté
à la Faculté des études supérieures
de l'Université Laval
pour l'obtention
du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

Médecine expérimentale
FACULTÉ DE MÉDECINE
UNIVERSITÉ LAVAL

MAI 1999



National Library
of Canada

Acquisitions and
Bibliographic Services

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque nationale
du Canada

Acquisitions et
services bibliographiques

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

Our file Notre référence

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-41920-7

Canada

RÉSUMÉ

L'alvéolite allergique extrinsèque (AAE) est une inflammation pulmonaire pouvant être causée par 4 actinomycètes thermophiles : *Saccharopolyspora rectivirgula*, *Saccharomonospora viridis*, *Thermoactinomyces sacchari* et *T. vulgaris*. Les actinomycètes sont reconnus comme étant des bactéries difficiles à identifier sur les bases conventionnelles, c'est pourquoi l'analyse de restriction d'ADN ribosomal amplifié (ARDRA) s'avère une alternative rapide et précise. Nous avons donc, dans un premier temps, effectué certains tests biochimiques et validé l'utilisation d'ARDRA pour identifier les espèces ATCC susceptibles de causer l'AAE puis ARDRA a été appliquée à 50 souches environnementales provenant de scieries québécoises. Les résultats obtenus ont montré que la combinaison de certains tests biochimiques permettait de sélectionner préférentiellement une espèce plutôt qu'une autre mais c'est avec ARDRA que l'identification des individus potentiellement dangereux se fait vraiment. En effet, en digérant l'ADNr 16S des souches à l'aide des enzymes *Taq^αI* et de *HhaI*, les patrons de restriction obtenus ont permis d'identifier à l'espèce les actinomycètes responsables de l'AAE. La présente étude pourra donc s'appliquer à divers milieux hautement contaminés et à risque pour le développement de l'AAE.

Isabelle Harvey, B.Sc.

Auteure

Dr Yvon Cormier, MD

Directeur

AVANT-PROPOS

Telle une orchidée chétive,
sous les bons soins du jardinier
s'épanouit.

Tel un oisillon nouveau né
à voler doit s'initier,
sans filets.

J'ai lu,
j'ai appris,
j'ai compris,
j'ai réalisé et mon devoir, accompli.

À tous ceux et celles qui de près ou de loin m'ont aidé
le présent ouvrage, je le leur dédit.

Mille Mercis

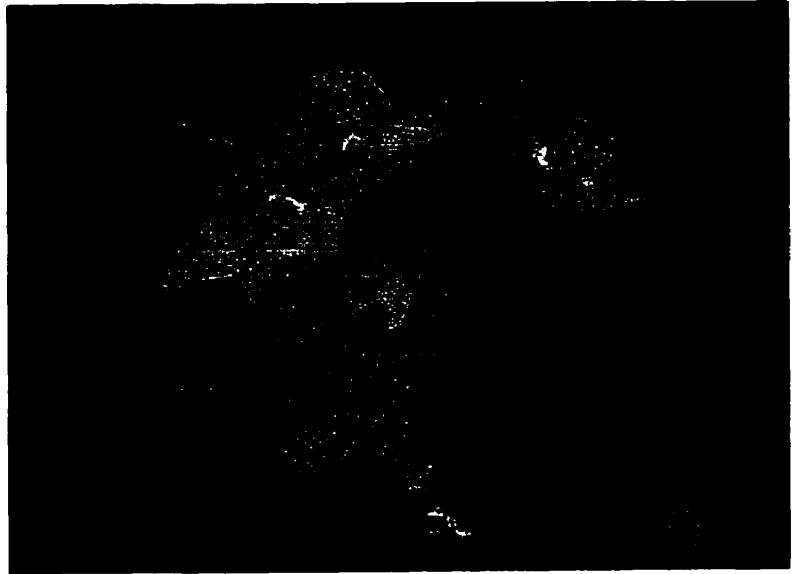


TABLE DES MATIÈRES

| | |
|---|-------------|
| RÉSUMÉ | II |
| AVANT-PROPOS | III |
| TABLE DES MATIÈRES | IV |
| LISTE DES ABBRÉVIATIONS | VIII |
| LISTE DES FIGURES | X |
| LISTE DES TABLEAUX | XIV |
| CHAPITRE 1 | 1 |
| INTRODUCTION | 1 |
| 1.1 Introduction générale | 1 |
| 1.2 Alvéolite allergique extrinsèque | 2 |
| 1.2.1 Généralités | 2 |
| 1.2.2 Classification clinique | 2 |
| 1.2.3 Physiopathologie de l'AAE | 3 |
| 1.2.4 Lavage bronchoalvéolaire | 4 |
| 1.2.5 Recherche d'anticorps | 5 |
| 1.2.6 Traitements | 5 |
| 1.3 Actinomycètes | 6 |
| 1.3.1 Découverte, historique et généralités des actinomycètes | 6 |
| 1.3.2 Isolement des actinomycètes dans l'air | 8 |
| 1.3.3 Actinomycètes thermophiles impliqués dans l'AAE | 9 |

| | |
|---|-----------|
| | V |
| 1.3.3.1 Description de <i>Saccharopolyspora rectivirgula</i> | 10 |
| 1.3.4.2 Description de <i>Saccharomonospora viridis</i> | 12 |
| 1.3.4.3 Description des <i>Thermoactinomyces sacchari</i> et <i>T. vulgaris</i> | 13 |
| 1.4 Taxonomie bactérienne, utilisation de l'ARN ribosomal 16S | 15 |
| CHAPITRE 2 | 17 |
| OBJECTIFS DE RECHERCHE | 17 |
| CHAPITRE 3 | 19 |
| MATÉRIEL ET MÉTHODES | 19 |
| 3.1 Actinomycètes thermophiles ciblés dans l'AAE | 19 |
| 3.1.1 Actinomycètes thermophiles pouvant causer l'AAE | 19 |
| 3.1.2 Actinomycètes thermophiles provenant de l'environnement | 20 |
| 3.2 Mesures des propriétés physiologiques | 20 |
| 3.2.1 Mesure de la température optimale de croissance | 20 |
| 3.3 Mesures des propriétés biochimiques | 21 |
| 3.3.1 Croissance en présence de NaCl | 22 |
| 3.3.2 Décomposition de la caséine | 23 |
| 3.3.3 Hydrolyse de la tributyrine | 23 |
| 3.3.4 Hydrolyse de la tyrosine, de la xanthine et de l'hypoxanthine | 23 |
| 3.3.5 Hydrolyse de l'esculine et de l'arbutine | 24 |
| 3.3.6 Hydrolyse de l'amidon | 24 |
| 3.3.7 Présence de DNAses | 25 |
| 3.3.8 Résistance à la novobiocine | 25 |
| 3.3.9 Résistance au lysozyme | 26 |
| 3.3.10 Résistance des spores à la chaleur | 26 |

| | |
|---|-----------|
| 3.4 Analyse génétique | 26 |
| 3.4.1 Extraction de l'ADN génomique des actinomycètes thermophiles impliqués dans l'AAE | 27 |
| 3.4.2 Extraction de l'ADN génomique des actinomycètes thermophiles en provenance de l'environnement | 28 |
| 3.4.3 Amplification de l'ADN ribosomal 16S des souches d'actinomycètes | 29 |
| 3.4.4 Purification des produits PCR | 31 |
| 3.4.5 Digestions enzymatiques et analyse des fragments de restriction des produits PCR | 32 |
| 3.4.6 Clonage des fragments d'ADN des souches TS 27349, TV 43649/1 et TV 15734 | 32 |
| 3.4.7 Analyse des clones positifs | 33 |
| 3.4.8 Vérification de l'insert par mini-préparation d'ADN plasmidique (miniprep) | 33 |
| 3.4.9 Purification de l'insert | 34 |
| 3.4.10 Séquençage et analyse des séquences des souches TS 27349, TV 43649/1 et TV 15734 | 35 |
| | |
| CHAPITRE 4 | 36 |
| | |
| RÉSULTATS | 36 |
| | |
| 4.1 Analyses physiologiques et biochimiques des actinomycètes thermophiles provenant d'ATCC | 36 |
| 4.1.1 Températures optimales de croissance | 36 |
| 4.1.2 Tests biochimiques | 37 |
| | |
| 4.2 Séquences d'une partie des gènes codant pour l'ARNr 16S des actinomycètes thermophiles responsables de l'AAE | 41 |
| 4.2.1 <i>S. reactivirgula</i> et <i>S. viridis</i> | 41 |
| 4.2.2 <i>T. sacchari</i> et <i>T. vulgaris</i> | 41 |
| | |
| 4.3 Analyses génétiques des diverses souches d'actinomycètes thermophiles | 48 |

| | |
|---|------------|
| 4.3.1 Amplification et purification des séquences d'ADNr 16S des actinomycètes thermophiles | 48 |
| 4.3.2 Analyse des patrons de restriction de l'ADNr 16S amplifié pour les souches en provenance d'ATCC | 50 |
| 4.3.2.1 Discrimination entre <i>Saccharopolyspora</i> et <i>Saccharomonospora</i> | 50 |
| 4.3.2.2 Discrimination entre <i>Thermoactinomyces sacchari</i> et <i>T. vulgaris</i> | 52 |
| 4.3.3 Analyse schématique des patrons de restriction obtenus avec <i>Taq</i> ^α I et <i>Hha</i> I sur les souches provenant des 17 scieries québécoises | 53 |
| CHAPITRE 5 | 63 |
| DISCUSSION | 63 |
| BIBLIOGRAPHIE | 73 |
| ANNEXE A | 89 |
| ANNEXE B | 90 |
| ANNEXE C | 91 |
| ANNEXE D | 92 |
| ANNEXE E | 93 |
| ANNEXE F | 96 |
| ANNEXE G | 112 |

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

| | |
|-------|---|
| AAE | alvéolite allergique extrinsèque |
| ADN | acide désoxyribonucléique |
| ADNr | acide désoxyribonucléique ribosomal |
| ARDRA | analyse de restriction d'ADN ribosomal amplifié |
| ARN | acide ribonucléique |
| ARNr | acide ribonucléique ribosomal |
| ATCC | « American Type and Culture Collection » |
| DAP | acide diaminopimélique |
| EDTA | éthylène diamine tétraacétate |
| ELISA | « enzyme linked immunosorbant assay » |
| ETOH | éthanol |
| GCG | « Genetics Computer Group » version 9.1 |
| G+C | guanine + cytosine |
| LBA | lavage bronchoalvéolaire |
| L-BA | « Luria-Bertani agar » |
| L-BB | « Luria-Bertani broth » |
| LFRFA | analyses des fragments de restriction à basse fréquence |
| MA | macrophage alvéolaire |
| MK | ménaquinone |
| N | « nutrient agar » |
| NEB | « New England Biolabs » |
| N+G1% | « nutrient agar/broth + 1%glucose » |
| O/N | « over night » |
| pb | paires de bases |
| PCR | réaction en chaîne de la polymérase |
| PEG | polyéthylène glycol |
| PM | poids moléculaire |
| PRA | analyse aléatoire de la PCR |
| RFLP | polymorphisme de longueur des fragments de restriction |

| | |
|--------|--|
| RT-PCR | réaction en chaîne de la polymérase suite à une transcriptase inverse de l'ARN |
| SR | <i>Saccharopolyspora rectivirgula</i> |
| SV | <i>Saccharomonospora viridis</i> |
| TBE | Tris-borate / EDTA |
| TE | Tris-EDTA |
| TS | <i>Thermoactinomyces sacchari</i> |
| TSA | « tryptic soy agar » |
| TSB | « tryptic soy broth » |
| TV | <i>Thermoactinomyces vulgaris</i> |
| U | unité(s) |
| W | watts |

LISTE DES FIGURES

| | |
|--|-----------|
| Figure 1 : Séquence des gènes codant pour l'ADNr 16S de <i>Thermoactinomyces sacchari</i> 27349..... | 43 |
| Figure 2 : Séquence des gènes codant pour l'ADNr 16S de <i>Thermoactinomyces vulgaris</i> 43649..... | 44 |
| Figure 3 : Séquence des gènes codant pour l'ADNr 16S de <i>Thermoactinomyces vulgaris</i> 15734..... | 45 |
| Figure 4 : Alignement multiple des séquences d'ADNr 16S de <i>Thermoactinomyces vulgaris</i> 15734 et 43649/1 ainsi que <i>T. sacchari</i> 27349..... | 47 |
| Figure 5 : Vérification des amplifications de l'ADNr 16S obtenues par la PCR des actinomycètes thermophiles ATCC sur gel d'agarose 1%..... | 49 |
| Figure 6 : Purification par "QIAquick gel extraction kit" des ADNr 16S amplifiés des actinomycètes thermophiles en provenance de l'environnement sur gel d'agarose 1%..... | 49 |
| Figure 7 : Représentation schématique de la digestion enzymatique avec <i>Taq^αI</i> des gènes codant pour l'ARNr 16S des actinomycètes thermophiles ATCC..... | 51 |
| Figure 8 : Représentation schématique de la digestion enzymatique avec <i>HhaI</i> des gènes codant pour l'ARNr 16S des actinomycètes thermophiles ATCC..... | 52 |
| Figure 9 : Représentation schématique de la digestion enzymatique avec <i>Taq^αI</i> des gènes codant pour l'ARNr 16S des souches d'actinomycètes ATCC et environnementales..... | 55 |
| Figure 10 : Représentation schématique de la digestion enzymatique avec <i>HhaI</i> des gènes codant pour l'ARNr 16S des souches d'actinomycètes ATCC et environnementales..... | 55 |
| Figure 11 : Représentation schématique de la digestion enzymatique avec <i>Taq^αI</i> des gènes codant pour l'ARNr 16S des souches d'actinomycètes ATCC et environnementales..... | 56 |

- Figure 12 : Représentation schématique de la digestion enzymatique avec *HhaI* des gènes codant pour l'ARNr 16S des souches d'actinomycètes ATCC et environnementales..... 56**
- Figure 13 : Représentation schématique de la digestion enzymatique avec *Taq^αI* des gènes codant pour l'ARNr 16S des souches d'actinomycètes ATCC et environnementales..... 57**
- Figure 14 : Représentation schématique de la digestion enzymatique avec *HhaI* des gènes codant pour l'ARNr 16S des souches d'actinomycètes ATCC et environnementales..... 57**
- Figure 15 : Représentation schématique de la digestion enzymatique avec *Taq^αI* des gènes codant pour l'ARNr 16S des souches d'actinomycètes ATCC et environnementales..... 58**
- Figure 16 : Représentation schématique de la digestion enzymatique avec *HhaI* des gènes codant pour l'ARNr 16S des souches d'actinomycètes ATCC et environnementales..... 58**
- Figure 17 : Représentation schématique de la digestion enzymatique avec *Taq^αI* des gènes codant pour l'ARNr 16S des souches d'actinomycètes ATCC et environnementales..... 59**
- Figure 18 : Représentation schématique de la digestion enzymatique avec *HhaI* des gènes codant pour l'ARNr 16S des souches d'actinomycètes ATCC et environnementales..... 59**
- Figure 19 : Représentation schématique de la digestion enzymatique avec *Taq^αI* des gènes codant pour l'ARNr 16S des souches d'actinomycètes ATCC et environnementales..... 60**
- Figure 20 : Représentation schématique de la digestion enzymatique avec *HhaI* des gènes codant pour l'ARNr 16S des souches d'actinomycètes ATCC et environnementales..... 60**
- Figure 21 : Représentation schématique de la digestion enzymatique avec *Taq^αI* des gènes codant pour l'ARNr 16S des souches d'actinomycètes ATCC et environnementales..... 61**

- Figure 22 : Représentation schématique de la digestion enzymatique avec *HhaI* des gènes codant pour l'ARNr 16S des souches d'actinomycètes ATCC et environnementales..... 61**
- Figure 23 : Originaux des gels d'agarose 3% de la figure 7 des gènes codant pour l'ARNr 16S des actinomycètes thermophiles ATCC digérés avec *Taq^αI* 96**
- Figure 24 : Original de la figure 8 du gel d'agarose 3% des gènes codant pour l'ARNr 16S des des actinomycètes ATCC digérés avec *HhaI*..... 97**
- Figure 25 : Originaux des gels d'agarose 3% de la figure 9 des gènes codant pour l'ARNr 16S des actinomycètes environnementaux et ATCC digérés avec *Taq^αI*..... 98**
- Figure 26 : Originaux des gels d'agarose 3% de la figure 10 des gènes codant pour l'ARNr 16S des actinomycètes environnementaux et ATCC digérés avec *HhaI*..... 99**
- Figure 27 : Original du gel d'agarose 3% de la figure 11 des gènes codant pour l'ARNr 16S des actinomycètes environnementaux et ATCC digérés avec *Taq^αI*..... 100**
- Figure 28 : Original du gel d'agarose 3% de la figure 12 des gènes codant pour l'ARNr 16S des actinomycètes environnementaux et ATCC digérés avec *HhaI*..... 101**
- Figure 29 : Original du gel d'agarose 3% de la figure 13 des gènes codant pour l'ARNr 16S des actinomycètes environnementaux et ATCC digérés avec *Taq^αI*..... 102**
- Figure 30 : Originaux des gels d'agarose 3% de la figure 14 des gènes codant pour l'ARNr 16S des actinomycètes environnementaux et ATCC digérés avec *HhaI*..... 103**
- Figure 31 : Original du gel d'agarose 3% de la figure 15 des gènes codant pour l'ARNr 16S des actinomycètes environnementaux et ATCC digérés avec *Taq^αI*..... 104**

- Figure 32 : Original du gel d'agarose 3% de la figure 16 des gènes codant pour l'ARNr 16S des actinomycètes environnementaux et ATCC digérés avec *HhaI*..... 105**
- Figure 33 : Original du gel d'agarose 3% de la figure 17 des gènes codant pour l'ARNr 16S des actinomycètes environnementaux et ATCC digérés avec *Taq^I*..... 106**
- Figure 34 : Originaux des gels d'agarose 3% de la figure 18 des gènes codant pour l'ARNr 16S des actinomycètes environnementaux et ATCC digérés avec *HhaI*..... 107**
- Figure 35 : Original du gel d'agarose 3% de la figure 19 des gènes codant pour l'ARNr 16S des actinomycètes environnementaux et ATCC digérés avec *Taq^I*..... 108**
- Figure 36 : Originaux des gels d'agarose 3% de la figure 20 des gènes codant pour l'ARNr 16S des actinomycètes environnementaux et ATCC digérés avec *HhaI*..... 109**
- Figure 37 : Original du gel d'agarose 3% de la figure 21 des gènes codant pour l'ARNr 16S des actinomycètes environnementaux et ATCC digérés avec *Taq^I*..... 110**
- Figure 38 : Originaux des gels d'agarose 3% de la figure 22 des gènes codant pour l'ARNr 16S des actinomycètes environnementaux et ATCC digérés avec *HhaI*..... 111**

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|---|----|
| Tableau I : Liste des actinomycètes thermophiles ciblés en provenance d'ATCC | 19 |
| Tableau II : Qualification de la croissance optimale des souches d'actinomycètes thermophiles d'ATCC à différentes températures | 39 |
| Tableau III : Réponses des actinomycètes thermophiles d'ATCC aux différents tests biochimiques | 40 |
| Tableau IV : Pourcentage d'identité entre les séquences des gènes codant pour l'ADNr 16S des souches d'actinomycètes thermophiles provenant d'ATCC* | 42 |
| Tableau V : Longueurs théoriques des fragments de restriction générés par <i>Taq^{II}</i> et <i>HhaI</i> calculées à partir des séquences nucléotidiques connues des actinomycètes thermophiles pouvant induire l'AAE..... | 54 |
| Tableau VI : Classification des souches d'actinomycètes thermophiles* provenant des 17 scieries québécoises | 62 |
| Tableau VII : Liste des divers types d'alvéolite allergique extrinsèque et de leurs agents causals..... | 89 |

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

1.1 Introduction générale

La dernière décennie a été marquée par l'intérêt croissant des études tournées vers les expositions de l'homme à son environnement car certains milieux sont responsables de problèmes de santé touchant les personnes exposées. L'explication sous-jacente veut que l'atmosphère que nous respirons soit bien plus que de l'air; en effet, c'est plutôt un mélange complexe de gaz et de particules de natures diverses (plantes, algues, insectes, spores de champignons et de moisissures, protéines, gouttelettes, poussières), auxquelles s'ajoutent des composantes virales et bactériennes. Les poumons sont donc constamment bombardés par un flot d'antigènes provenant de l'extérieur. L'alvéolite allergique extrinsèque (AAE) est une maladie inflammatoire pulmonaire qui peut justement être induite par des agents microbiologiques aux pouvoirs antigéniques tels les spores de moisissures et de bactéries thermophiles. Au Québec par exemple, à chaque année, 3 producteurs laitiers sur 1000 développent le poumon du fermier, l'une des principales formes d'AAE.¹

L'AAE est souvent causée par des microorganismes provenant de la matière organique en décomposition, microorganismes connus sous le nom d'actinomycètes thermophiles. Les principaux actinomycètes thermophiles associés à des formes d'AAE sont *Saccharopolyspora rectivirgula*, *Saccharomonospora viridis*, *Thermoactinomyces sacchari* et *T. vulgaris*.² Ces bactéries sont classifiées selon des caractères morphologiques difficiles à analyser car ils sont très fins et ils nécessitent généralement une expertise élaborée. En plus de la complexité à les identifier sur des bases morphologiques, l'utilisation de méthodes classiques d'identification basées sur l'aspect des colonies ou la réponse biochimique des bactéries à un environnement donné ne sont pas suffisamment précises. C'est pourquoi d'autres approches plus reproductibles et faisant appel à l'utilisation des séquences nucléotidiques doivent être développées afin d'optimiser l'identification de microorganismes susceptibles de causer des problèmes de santé

chez l'homme.³⁻⁵ Ces outils précis et rapides, appliqués aux actinomycètes thermophiles obtenus suite à des échantillonnages environnementaux vont permettre de qualifier les actinomycètes de l'environnement de plusieurs milieux de travail à risques, actinomycètes susceptibles d'induire le développement de l'AAE. Cet aspect microbiologique constitue par le fait même le but de la présente étude.

1.2 Alvéolite allergique extrinsèque

1.2.1 Généralités

L'AAE, aussi appelée pneumopathie d'hypersensibilité, résulte d'expositions répétées à des antigènes extérieurs qui causent une réaction immune localisée surtout au niveau des alvéoles, là où se font les échanges aériens du poumon. Les agents qui peuvent provoquer cette inflammation du parenchyme sont très divers et petits (de l'ordre de 1 à 5 μm) et peuvent comprendre les spores de moisissures et d'actinomycètes,⁶ des allergènes organiques tels les protéines animales ainsi que des agents chimiques comme le di-isocyanate de toluène et le sulfate de sodium.⁶ Le premier cas d'AAE a été diagnostiqué en 1932 par Campbell et collaborateurs, mais il fallut attendre quelques années avant de bien comprendre ce qu'englobait ce terme. Maintenant, il existe au-delà de 50 formes d'AAE reliées à l'occupation. Parmi celles-ci, on retrouve le poumon du fermier (première AAE diagnostiquée et la plus étudiée), la bagassose, la maladie du champignoniste, le poumon des humidificateurs et la maladie de l'éleveur d'oiseaux (AAE la plus répandue) (**annexe A**). Les méthodes diagnostiques, les moyens de prévention et la thérapie à appliquer sont identiques ou similaires pour toutes les formes de cette maladie.⁶

1.2.2 Classification clinique

L'AAE peut se présenter sous 3 formes cliniques, une forme aiguë, réversible si l'exposition est de courte durée et intermittente, une forme subaiguë si l'exposition est continue mais brève et finalement, une forme chronique lorsque l'exposition à l'agent responsable s'étend

sur plusieurs années. La réaction correspondant à la phase aiguë survient habituellement de 4 à 6 heures après le contact avec l'antigène et consiste en une affection ressemblant à la grippe, caractérisée par de la fièvre accompagnée de frissons, d'une sensation de malaise et de myalgie. Les symptômes pulmonaires sont plutôt constitués de dyspnée, d'une impression d'oppression dans la poitrine et d'une toux non productive. L'examen physique peut révéler, en plus de la fièvre, de la tachypnée, de la cyanose et des râles crépitants dans le poumon.⁷ Lorsqu'il n'y a plus de contact avec l'antigène, les symptômes disparaissent et tout revient à la normale. La forme subaiguë, quant à elle, est plus insidieuse; souvent on n'y retrouve pas les symptômes de la phase aiguë mais d'autres signes faisant leur apparition comme une augmentation de la dyspnée à l'effort, une plus grande fatigue, de l'anorexie, de la toux et une perte de poids.⁷ À ce moment, les râles crépitants du poumon sont plus importants. Pour l'AAE chronique, causée par une exposition continue à de faibles doses d'antigènes, les séquelles sont irréversibles et prennent plusieurs mois avant le début des vrais problèmes qui consistent en une toux chronique et une dyspnée à l'effort augmentées de même qu'en une fatigue et perte de poids accrue. Les risques d'emphysème et de fibrose pulmonaire sont alors très élevés.⁸ Aucune prédisposition génétique à cette maladie n'a encore été reconnue.⁶ Il semblerait que les fumeurs soient moins enclins à développer une alvéolite en raison d'une modification de l'état fonctionnel de leurs macrophages alvéolaires (MA).²

1.2.3 Physiopathologie de l'AAE

Les symptômes ou signes cliniques de l'AAE peuvent ressembler à ceux de plusieurs autres maladies pulmonaires notamment l'oedème pulmonaire, le cancer pulmonaire de type bronchioloalvéolaire, le syndrome toxique de la poussière organique et certaines pneumoconioses.⁹ On reconnaît cependant l'AAE à la présence de lésions tissulaires granulomateuses (cellules épithéliales agglomérées) constituées d'infiltrats de cellules inflammatoires mononuclées.⁷ À l'aide de biopsies bronchiques, on remarque, au plan histopathologique, un infiltrat de cellules mononucléaires à prédominance lymphocytaires mais aussi composé de plasmocytes (lymphocytes B matures, différenciés, synthétisant et sécrétant des anticorps) et d'histiocytes (macrophages tissulaires immobiles) à cytoplasmes spumeux. Ceci

caractérise principalement l'AAE au niveau des septa alvéolaires.^{10; 11} Au fur et à mesure que la maladie progresse, la présence des granulomes devient plus marquée et on peut les retrouver alors dans 70% des biopsies bronchiques.¹¹ Ces granulomes sont caractéristiques des phases aiguës et chroniques de l'AAE. Ils apparaissent généralement dans les 3 premières semaines et nécessitent plus de 12 mois pour se résorber.⁷ La résolution de ces derniers est parfois accompagnée d'un remplacement fibreux qui peut mener au résultat final qu'est la fibrose pulmonaire. La fibrose causée par l'exposition à l'antigène peut donc résulter aussi bien d'expositions répétées à de larges quantités d'antigènes (phase aiguë / subaiguë) qu'à des expositions prolongées à de faibles quantités d'antigènes (phase chronique de la maladie).

1.2.4 Lavage bronchoalvéolaire

Le lavage bronchoalvéolaire (LBA) est une autre technique souvent utilisée qui permet cette fois-ci d'observer l'activité chimiotactique autour des sites d'inflammation de l'AAE. Suite à une exposition à un antigène donné, le LBA par la suite recueilli, révèle la présence des neutrophiles en plus de celle des MA et des lymphocytes. En effet, lorsque l'antigène est reconnu par un anticorps, une attraction chimiotactique des polynucléaires neutrophiles en provenance du sang au niveau des alvéoles aurait lieu⁶ et ces facteurs chimiotactiques se retrouveraient alors dans le liquide de lavage.^{12; 13} Ces neutrophiles sont directement reliés à l'inhalation de l'antigène et une semaine après cette exposition, leur niveau est de nouveau revenu à la normale.¹⁴ L'usage du LBA a démontré une augmentation marquée du pourcentage de lymphocytes, lesquels peuvent représenter jusqu'à 80% de la population des cellules totales récupérées; ce qui reflète bien l'infiltration inflammatoire des lymphocytes de l'interstice et des alvéoles.^{15; 16} C'est ainsi que la présence d'une lymphocytose alvéolaire est caractéristique de l'AAE. Toutefois, la lymphocytose peut non seulement être représentative de l'AAE mais peut aussi représenter d'autres maladies pulmonaires telles la sarcoïdose, la pneumonie interstitielle lymphocytaire et la tuberculose miliaire.⁸ Ce qui caractérise surtout cette lymphocytose est la prédominance des lymphocytes T, principalement des cellules suppressives / cytotoxiques CD8⁺¹⁷ dont le rôle principal serait de contrôler l'inflammation au niveau local.¹⁸ En effet, par rapport aux lymphocytes T, CD4⁺, le ratio CD4 / CD8 retrouvé dans l'AAE est inférieur à 1.⁹ Les MA, quant à eux, peuvent relarguer

diverses cytokines telles l'IL-1 α (un médiateur important de l'inflammation et de la fibrose)¹⁹ et le TNF- α (une cytokine proinflammatoire),²⁰ ils contribuent ainsi à l'augmentation de la réponse inflammatoire chez les personnes exposées.^{21; 22}

1.2.5 Recherche d'anticorps

Afin d'aider au diagnostic de l'AAE, il est possible de mesurer dans le sérum ou le LBA des anticorps spécifiques, tels les IgG et IgA, dirigés envers l'agent causal de la maladie. Virtuellement, tout les patients atteints d'AAE ont des anticorps dirigés contre le matériel offensant dans le sérum et parfois aussi dans le LBA. Il existe plusieurs méthodes afin de mettre en évidence cette présence d'anticorps notamment l'« enzyme linked immunosorbant assay » (ELISA) et ses variantes, l'immunofluorescence indirecte des antigènes dans les tissus, la fixation du complément, les radioimmunoessais et l'immunobuvardage de type occidental.^{9; 23} En effet, une préparation antigénique des sources probables au développement de la maladie permet de voir si il y a présence d'anticorps spécifiques chez la personne concernée. C'est ainsi que l'on peut dire si l'AAE est causée par des microorganismes tels les actinomycètes thermophiles (*Saccharopolyspora rectivirgula*, *Saccharomonospora viridis*, *Thermoactinomyces vulgaris* et *T. sacchari*) et des moisissures (*Penicillium* sp., *Alternaria* sp. ou *Trichosporon beigelii*) ou bien encore par des protéines animales. Cependant, selon la méthode employée pour la préparation antigénique, les résultats obtenus peuvent varier. N'étant pas standardisé, il est difficile de dire qu'un résultat négatif est vraiment négatif. Il n'est d'ailleurs pas possible de vérifier si l'antigène utilisé est bien celui pour lequel le patient réagit. Un résultat négatif n'exclut cependant pas le diagnostic de l'AAE.⁹

1.2.6 Traitements

Les traitements disponibles pour soulager les personnes atteintes d'AAE sont peu nombreux et le plus efficace reste toujours le retrait définitif du milieu d'où provient l'allergène. Alternativement, la prise de corticostéroïdes pour les cas sévères aidera à réduire les effets

néfastes de l'allergène sans toutefois réparer les dommages causés depuis le début de la maladie ni prévenir des séquelles à long terme.²⁴ Par contre, si la personne en phase aiguë n'est plus en contact avec l'allergène (changement de milieu ou port d'un masque adapté), les symptômes se résorberont spontanément⁷ et les anticorps disparaîtront dans les 3 années à venir.²⁵

1.3 Actinomycètes

1.3.1 Découverte, historique et généralités des actinomycètes

Les bactéries thermophiles ont été observées pour la première fois en 1879 dans l'eau de la Seine.²⁶ Il fallu cependant attendre jusqu'en 1898 avant que ne soient décrits les premiers actinomycètes thermophiles. Les souches se caractérisaient alors par la présence d'une vraie ramification, par la formation de spores à l'extrémité des filaments, de même que par l'absence d'organes spéciaux de fructification. Les hypothèses voulaient, en ces temps-là, qu'en réponse à l'influence de l'environnement, les actinomycètes aient perdu leurs organes spéciaux de fructification et soient devenus des formes latentes de diverses mucédinées supérieures, c'est à dire, des formes dormantes (spores), issues d'organismes macroscopiques tels des champignons.²⁶ C'est pourquoi les gens ont longtemps considéré les actinomycètes comme étant des microorganismes intermédiaires entre le règne des champignons et celui des bactéries. Aujourd'hui, il est bien connu que ce sont des bactéries dépourvues de membrane nucléaire, contrairement aux eucaryotes dont le matériel génétique est compris dans un noyau entouré d'une enveloppe nucléaire. Ceci démontre bien l'appartenance des actinomycètes aux procaryotes plutôt qu'aux eucaryotes. À ce jour, il existe au delà d'une quarantaine de genres et près de 400 espèces d'actinomycètes répertoriées.²⁷

Les actinomycètes sont donc des bactéries aérobies, à Gram-positif, ayant la capacité de former des spores asexuées (conidiospores ou sporangiospores) et des hyphes ramifiés, habituellement non fragmentés. Comme les autres bactéries à Gram-positif, leur paroi est constituée d'une épaisse couche de peptidoglycane qui joue un important rôle dans le maintien de la rigidité cellulaire ainsi que dans la protection physique de la membrane sous-jacente.

Certains groupes, tels les nocardobactéries, ont une paroi cellulaire très riche en lipides et en cires de 60 à 90 carbones appelées acides mycoliques. Ces acides sont des acides gras complexes et leur présence ainsi que celle d'autres lipides à l'extérieur du peptidoglycane rendent les bactéries positives à la coloration de Ziehl Neelsen (acido-alcool-résistantes).²⁸ Pour les actinomycètes, il existe 4 types principaux de paroi identifiables selon 3 caractéristiques issues de la composition et de la structure du peptidoglycane.²⁸ C'est également selon le type de paroi que l'on peut séparer les genres les uns des autres et former des groupes dans la classification classique des microorganismes. L'analyse des lipides est au autre élément qui, tout comme le type de paroi cellulaire, fournit des informations de valeur dans la classification et l'identification microbienne. En effet, une classe de lipides terpéniques, les quinones respiratoires ou isopréniques, ont un potentiel considérable comme marqueurs taxonomiques. Il existe 2 genres majeurs de quinones respiratoires chez les bactéries soit les ménaquinones (mieux connues sous le nom de vitamine K₂) et les ubiquinones (aussi appelées coenzyme Q).²⁹ La classification bactérienne repose donc sur les degrés de saturation et la longueur de leurs chaînes latérales.

Outre leur paroi cellulaire caractéristique, les actinomycètes possèdent des structures cellulaires également uniques à ce groupe. En effet, le nombre de spores et la façon dont elles sont formées, la capacité des actinomycètes à produire des hyphes aériens ou non, la couleur des colonies et l'odeur dégagée par les espèces sur un milieu de culture donné sont autant de tests simples à réaliser pour identifier sommairement quelques-unes de ces bactéries. De plus, la morphologie coloniale est souvent représentative de la morphologie microscopique. Du mycélium aérien peut quelque fois être observé et les colonies sont souvent incrustées dans la gélose dû à la pression du mycélium de substrat.

Les membres des actinomycètes vivant une existence saprophytique peuvent être retrouvés avec une fréquence plus ou moins élevée dans la plupart des niches écologiques, le sol ayant la plus haute densité de population. Numériquement, ils sont moins prédominants que les autres bactéries mais bien plus que pour les moisissures.³⁰ Toutefois, les actinomycètes sont en général plus nombreux que presque tous les autres groupes bactériens considérés individuellement. Ils sont ubiquitaires et on les retrouve entre autre dans l'eau, le sol, l'air, le compost, les systèmes d'air climatisé, la poussière de maison, le foin et la cane à sucre.³¹ Leur

nombre varie beaucoup selon le milieu où l'on se situe. Il n'est pas rare de retrouver dans un sol fertile, peu importe son pays de provenance, jusqu'à 5×10^6 propagules / grammes (g) de sol.³⁰ Ce sont également eux qui sont responsables en grande partie de l'odeur si caractéristique de la terre en raison de la production de géosmine (*ge*, terre; *osme*, odeur), un mélange de composés tel l'acide acétique, l'acétaldéhyde, l'alcool éthylique, l'alcool isobutylique et l'ammoniaque.^{30; 32} Plusieurs actinomycètes sont capables de produire des antibiotiques qui vont agir sur d'autres microorganismes aussi présents dans le sol. Une compilation des sources microbiennes des antibiotiques découverts dans le sol aux États-Unis et au Japon entre les années 1953 et 1970 a révélé que 85% des antibiotiques produits étaient originaires d'actinomycètes (seulement 5% étaient issus d'autres types bactériens) et 11% provenaient des moisissures.³⁰

Outre les désordres respiratoires allergiques (AAE) pouvant être causés par une exposition aux spores d'actinomycètes thermophiles issues de matériels organiques en décomposition tel le compost (maladie du champignoniste) ou bien le foin moisi (poumon du fermier), d'autres espèces d'actinomycètes peuvent être nuisibles à la santé de l'humain, notamment *Nocardia asteroides* qui peut provoquer des nocardioses ou encore *Dermatophilus congolensis* qui est l'agent responsable de la dermatophilose.²⁸

1.3.2 Isolement des actinomycètes dans l'air

Puisque l'air sert de voie de transport des actinomycètes jusqu'aux poumons, depuis plusieurs années, on procède à l'échantillonnage de l'air afin de pouvoir quantifier ces bactéries. Les cultures d'actinomycètes peuvent donc être obtenues de diverses manières. Avant l'approfondissement des connaissances en physique de l'échantillonnage, la technique d'échantillonnage utilisée consistait à laisser un vase de pétri contenant un milieu de culture approprié ouvert, à l'air libre, pendant un temps déterminé puis de le refermer et de l'incuber à température requise. Les résultats obtenus n'étaient alors pas quantifiables ni très représentatifs de la réalité. Avec l'arrivée des nouvelles technologies, les techniques d'échantillonnage se sont multipliées et développées. Il existe maintenant divers échantillonneurs reposant sur des principes tout aussi différents.³³ Certains de ceux-ci, basés sur un principe d'impaction, rendent possible la

quantification des microorganismes de l'air.³⁴ En effet, l'échantillonneur d'Andersen avec ses orifices critiques, pour milieux solides, et les barboteurs en milieux liquides, tel l'AGI-30, reposent sur un volume précis d'air aspiré à une vitesse donnée.³⁵ Avec de simples calculs, il est par la suite possible de déterminer le nombre de microorganismes par mètre cube d'air pour chacun des échantillonneurs. L'incubation des milieux solides (choisis en fonction des microorganismes recherchés) ou des dilutions des milieux liquides, étalées sur des milieux solides, se fait selon les températures de croissance des microorganismes recherchés. Il n'est pas rare de retrouver plusieurs dizaines de milliers actinomycètes / m³ d'air dans certains environnements tels les fermes laitières.^{36; 37}

1.3.3 Actinomycètes thermophiles impliqués dans l'AAE

Parmi les antigènes fréquemment rencontrés dans les diverses formes d'AAE, on retrouve les spores d'actinomycètes thermophiles. Pour être considérées thermophiles, ces espèces doivent pouvoir croître à des températures d'au moins 50°C.^{31; 38} Ces spores dans l'environnement ont été retrouvées jusqu'à des concentrations de plus de 10⁷ spores / m³ d'air.³⁹ Leur dimension varie de 1 à 2 µm et grâce à leur petite taille, leur pouvoir de pénétrance dans le poumon est très élevé. Il n'est pas rare d'en retrouver au niveau des alvéoles^{13; 39} et leur persistance peut alors être de longue durée.⁴⁰

Quatre espèces d'actinomycètes thermophiles recensées dans la littérature sont capables d'occasionner une AAE (**annexe B**).^{25; 41; 42} Le poumon du fermier, principal représentant de l'AAE, est surtout causé par *Saccharopolyspora rectivirgula* mais *Thermoactinomyces vulgaris* et *Saccharomonospora viridis* sont également aptes à provoquer cette maladie.^{41; 43} *T. vulgaris* pour sa part peut également être retrouvé dans certains humidificateurs²³ alors que *T. sacchari*, surtout retrouvé dans la pulpe d'extrait de cane à sucre, est l'agent responsable de la bagassose.⁴²

Les actinomycètes ont été groupés dans des ordres ou genres tels : *Bifidobacterium*, *Propionibacterium* et *Actinomycetales*. Il y a 4 familles distinctes qui composent l'ordre des *Actinomycetales* (*Pseudonocardiaceae*, *Mycobacteriaceae*, *Streptomyetaceae* et

Corynebacteriaceae) et c'est selon l'aspect du mycélium puis des spores que les organismes sont classifiés. La famille des *Pseudonocardiaceae* est la famille où sont classés *S. rectivirgula* et *S. viridis*.⁴⁴ En effet, une fois la maturité du mycélium atteinte, à un moment ou un autre au cours de son développement, la présence d'hyphes branchées obtenues par septation est observable. Les *T. vulgaris* et *T. sacchari* pour leur part ne sont pas membres des 3 ordres ou genres ci-haut mentionnés. En raison de la particularité de leurs spores à être très résistantes à la chaleur, ils font plutôt partie des actinobactéries soient les actinomycètes thermophiles regroupés sous le nom de *Thermoactinomyces*.

1.3.3.1 Description de *Saccharopolyspora rectivirgula*

Saccharopolyspora rectivirgula (*Saccharum*, nom générique pour la canne à sucre; *polys*, plusieurs; *spora*, graines; *Saccharopolyspora*, plusieurs spores provenant de la canne à sucre; *rectus*, droit; *virgula*, brindille; *rectivirgula*, brindille droite)⁴⁵ fut autrefois connu sous les noms de *Thermopolyspora polyspora*,⁴⁶ *Micropolyspora rectivirgula*, *M. faeni*⁴⁷ et *Faenia rectivirgula*.⁴⁸ L'espèce se caractérise principalement par un mycélium de substrat (mycélium se retrouvant dans le milieu de culture et constituant la structure végétative de la bactérie, c'est la structure sur laquelle reposent les spores lorsqu'elles sont présentes) bien développé, branché et septé de 0,5 à 0,8 µm de diamètre. La croissance de ce microorganisme est plutôt lente et sur milieu de culture TSA (tryptic soy agar), elle donne de petites colonies cratériformes, orange-brun à orange-jaune et de formes filamenteuses. De couleur rosé ou blanc, le mycélium aérien (mycélium retrouvé à la surface du milieu de culture et comportant généralement les spores) est plutôt rare mais lorsque présent, il a pour point de départ le mycélium de substrat et son diamètre varie alors de 0,8 à 1,2 µm. Le mycélium aérien est cependant favorisé par l'ajout de 5% NaCl dans le milieu de culture. Quelques souches de *S. rectivirgula* produisent un pigment orange diffusant dans la gélose sur certains milieux comme du TSA.

Les spores de *S. rectivirgula* sont généralement en courtes chaînes de moins de 5 spores mais il arrive que parfois des chaînes de 20 spores ou plus soient observées.⁴⁹ La formation des spores se fait de manière dite basipétale,^{47; 50} par extractions subséquentes des portions du

sporophore (mycélium spécial branché duquel les spores sont produites).⁵¹ La région apicale du sporophore est premièrement séparée par une paroi transversale puis son volume augmente et la paroi épaisse graduellement mais inégalement (le processus d'épaississement de la paroi semble originaire de la paroi transversale). Par la suite, d'autres spores se développent de la même manière mais on ne connaît pas encore quel stimulus est responsable de la production d'une seule spore ou bien d'une chaîne de spores.⁵¹ Les spores peuvent être présentes tant sur le mycélium aérien que sur celui du substrat. Leur résistance à la chaleur est cependant faible car à une température supérieure à 70°C, elles ne sont plus capables de germination. Leurs formes varient de rondes à ovales, leur aspect est lisse, leur paroi a 70-100 nm d'épaisseur et leur diamètre varie entre 0,7 et 1,5 µm. La paroi cellulaire des spores et du mycélium est recouverte de 3 couches de membrane plasmique limitant le cytoplasme dans lequel des granules ribosomiaux étroitement serrés peuvent être vus par microscopie électronique.⁵¹

Les températures de croissance pour *S. rectivirgula* varient de 30 à 63°C avec une zone de croissance optimale située entre 50 et 55°C.⁵² On considère cet organisme comme étant un thermophile facultatif ou eurithermal. Les hyphes de *S. rectivirgula* ont cependant tendance à s'autolyser si l'incubation à 55°C ou à température de la pièce se poursuit trop longtemps.⁴⁹ Les cellules sont aussi sensibles à la présence de lysozyme. Ce dernier a pour effet d'hydrolyser la partie polyosidique des peptidoglycanes composant la paroi,⁵³ ce qui conduit à la perte de l'intégrité de la membrane et au relargage du matériel intracellulaire dans le milieu. Le changement de pH induit par la protéolyse des moisissures qui survient dans les foins fraîchement coupés dont le pH est à l'origine bas (5,5 - 6,5) favoriserait pour sa part la colonisation des actinomycètes comme *S. rectivirgula*.⁴⁹ Finalement la zone de pH où la croissance de ce microorganisme peut avoir lieu se situe entre 6,0 et 8,3.⁵⁴

La paroi cellulaire de *S. rectivirgula*, analysée par hydrolyse acide suivie d'une chromatographie en couche mince, est dite de type IV, c'est à dire qu'en plus du *méso*-DAP, on y retrouve 2 sucres majeurs, le galactose et l'arabinose; de l'acide glutamique, de l'alanine, du glucosamine et de l'acide muramique complètent les constituants de cette paroi.⁵⁵ Les bactéries aérobies à Gram-positif ont cependant remplacé l'ubiquinone par une ménaquinone comme accepteur d'électrons.⁵⁶ *S. rectivirgula* ne fait pas exception et ses ménaquinones majeures sont

tétrahydrogénées avec 9 unités d'isoprènes mais des ménaquinones hexa- et octahydrogénées sont aussi retrouvées (MK-9(H₄, H₆, H₈)).⁵⁷ Le ratio G+C (guanine + cytosine) des actinomycètes est très élevé par rapport aux bactéries en général et varie de 66 à 74 mol%⁵⁸ ce qui est confirmé par le ratio G+C de *S. reactivigula* qui est de 70,4 mol%.

1.3.4.2 Description de *Saccharomonospora viridis*

Saccharomonospora viridis (*sacchar*, sucre; *monos*, seul, solitaire; *spora*, graine, une spore; *Saccharomonospora*, le sucre (contenant un) uni-sporulé (organisme); *viridis*, vert),⁵⁹ comme son nom l'indique, produit principalement des spores uniques de couleur vertes sur le mycélium aérien. Autrefois connu sous les noms de *Thermoactinomyces viridis*⁶⁰ puis *Thermomonospora viridis*,⁶¹ le genre *Saccharomonospora* fut finalement créé pour accommoder les actinomycètes monosporulés comme *S. viridis*. Le mycélium aérien de *S. viridis* possède un diamètre d'environ 0,5 µm, il est généralement abondant mais peut parfois être absent chez certaines souches. Lorsque les colonies sont cultivées à des températures supérieures à 30-35°C, le mycélium aérien est de couleur blanc puis, à la longue, il prend une teinte gris-vert à vert foncé. La pigmentation verte peut aussi survenir sur le mycélium végétatif et diffuser dans le milieu environnant. Les colonies qui n'ont pas de mycélium aérien et qui ne sont pas pigmentées peuvent cependant produire un léger pigment brun soluble dans la gélose.⁵⁹ Le mycélium végétatif pour sa part est abondamment branché et, la plupart du temps, non septé. Les spores de *Saccharomonospora* sont des microconidies terminales qui sont libérées à la suite de la lyse de la cellule qui les supporte. Il est possible de les retrouver sur des hyphes végétatifs et par paires ou en courtes chaînes sur le mycélium aérien. Elles sont de forme ovale, mesurent de 0,9-1,1 à 1,2-1,4 µm et elles sont formées à l'extrémité de sporophores simples, non branchés, et de longueur variable. Leur surface est verruqueuse et lorsqu'elles sont exposées à une température de 70°C, elles sont rapidement tuées.

Les températures de croissance de *S. viridis* indiquent que cet organisme est modérément thermophile. En effet, les cellules n'ont pas de difficultés à pousser à 50°C mais aux alentours de 60°C, il n'y a pas ou peu de croissance. La production de mycélium aérien et la sporulation chez

certaines souches est meilleure lorsque la température varie près de 40-45°C. Quelques souches sont même capables de croître sous les 30°C.⁵⁹ La zone de pH où le développement de *Saccharomonospora* peut se faire se situe entre 7,0 et 10,0. De plus, la présence de 3% NaCl (poids / volume) dans le milieu de culture n'inhibe en rien la croissance de cette bactérie. La thermoviridine, un antibiotique servant à inhiber la croissance de certaines bactéries à Gram-positif, est produite par les souches de *S. viridis*.⁶⁰

La paroi cellulaire de *S. viridis* contient du *méso*-DAP associé à du galactose et de l'arabinose, ce qui en fait une paroi de type IV tout comme chez *S. reactivirgula*. Les ménaquinones de 10 ou 11 unités d'isoprènes sont absentes de l'enveloppe cellulaire mais cette dernière contient tout de même de bonnes quantités de MK-9(H₄).⁶² Le ratio G+C des cellules de *S. viridis* se situe aux alentours de 74-75 mol%.⁶³

1.3.4.3 Description des *Thermoactinomyces sacchari* et *T. vulgaris*

Les *Thermoactinomyces vulgaris* et *T. sacchari* (*Thermo* pour chaud; *actis*, *actinos* pour rayon; *myces* pour champignons; *Thermoactinomyces*, champignons en rayons qui aiment la chaleur; *vulgaris*, commun; *saccharum*, nom générique pour la canne à sucre; *sacchari*, de la canne à sucre)⁶⁴ comme leur nom l'indique nécessitent de la chaleur pour croître; c'est pourquoi on les cultive aux alentours de 55°C mais ces espèces sont toutefois capables de se développer entre 35 et 58°C. Les *Thermoactinomyces* sont favorisés par un réchauffement spontané des températures au-dessus de 70°C, menant bien souvent à la production de plus de 10⁷ spores / g de poids sec.⁶⁴ Cependant la croissance peut être limitée lorsque l'aération est restreinte. Les colonies sont généralement de formes irrégulières, plates, légèrement ridées, d'apparence poudreuses dans le cas de *T. vulgaris* et comportent habituellement du mycélium aérien blanc ou crème. Cependant, pour *T. sacchari*, le mycélium aérien est souvent transparent et les colonies ne ressemblent généralement pas à des colonies typiques d'actinomycètes.⁶⁴

Les *Thermoactinomyces* ont un mycélium basal bien développé, branché et septé de 0,4 à 0,8 µm de diamètre. Le mycélium aérien, issu du mycélium du substrat, a pour sa part un

diamètre de 0,5 à 1,0 μm . Il apparaît premièrement verticalement à ce dernier puis, dans la plupart des espèces, il forme un réseau relâché avec la majorité des hyphes sur le substrat. Ces derniers ont un diamètre de 0,3 à 0,6 μm et la paroi les entourant a une épaisseur de 22 nm; ce qui est comparable aux autres bactéries à Gram-positif. Le cytoplasme est entouré d'une membrane plasmique de 10 nm d'épaisseur qui comporte les mésosomes (structures en forme de tubes convolutés ou de vésicules résultant de l'invagination des membranes cytoplasmiques) de 0,1 à 0,3 μm de diamètre. Le matériel génétique pour sa part se présente sous forme d'un filament axial et des ribosomes d'environ 12 nm de diamètre sont généralement présents.⁶⁴

Les hyphes aériens des *Thermoactinomyces* sont hydrophobes et peuvent s'autolyser déposant ainsi les spores sur la surface de l'agar mais l'autolyse se fait beaucoup plus rapidement chez *T. sacchari* que chez *T. vulgaris*. Les spores sont formées séparément tant sur le mycélium aérien que basal, elles peuvent être sessiles ou encore sur de courts sporophores de plus de 3 μm de longueur dans le cas de *T. sacchari* et d'environ 1 μm chez *T. vulgaris*.⁴² Leur formation est endogène ce qui en fait de vraies endospores telles celles produites par les bactéries du genre *Bacillus*. Les spores sont donc sphériques avec un diamètre variant de 0,5 à 1,5 μm et leur surface est ridée, un peu comme une crête, de façon à donner en microscopie électronique des formes pentagonales ou hexagonales. La rigidité de leur contour est caractéristique, ce qui serait expliqué par la forme pentagonale de ces dernières.⁶⁵ Le développement synchronisé des spores ne peut être obtenu chez les actinomycètes comme c'est le cas pour les autres bactéries en raison du développement des hyphes de la colonie avec les cellules d'âges différents ainsi que les spores à diverses étapes de maturation dans plusieurs parties de la colonie.⁶⁶ Les premières étapes de la formation des endospores de *T. vulgaris* surviennent avec les hyphes aériens. Pendant le développement, la spore est déplacée envers la paroi de l'hyphe et elle mature éventuellement dans une sporange externe au filament de l'hyphe.⁶⁵ La germination des spores de *T. vulgaris* peut être visible en 6,5 heures^{64; 67} alors que celle des spores de *T. sacchari* peut se faire aussi rapidement que 3 heures mais généralement elle nécessite beaucoup plus de temps.⁶⁶ Les spores de *T. sacchari* sont très semblables à celles de *T. vulgaris*.

La paroi cellulaire des *Thermoactinomyces* est dite de type III, elle est donc composée de peptidoglycanes contenant le *méso*-DAP mais aucun sucre n'y est associé. Les ménaquinones

sont non saturées et comportent de 7 à 9 unités isopréniques.⁶² Tout comme les endospores bactériennes du genre *Bacillus* (une bactérie à Gram-positif qui a des spores très résistantes à la chaleur), les spores des *Thermoactinomyces* contiennent de l'acide dipicolinique à une concentration de 6,5 à 7% (poids / poids), ce qui est inférieur à la concentration retrouvée dans les spores de *Bacillus*.⁶⁸ Cet acide, probablement situé dans la partie centrale de la spore, est un composé unique qui est retrouvé exclusivement chez les cellules non végétatives et il pourrait jouer un rôle dans la résistance des spores à la chaleur.⁶⁹ De grandes quantité d'ions calcium et magnésium sont également associées à la présence de cet acide dans la spore. Les endospores des thermoactinomycètes peuvent rester viables dans le sol pendant de nombreuses décennies.^{64; 70} Le pourcentage de G+C des *Thermoactinomyces* varie de 52,0 à 54,8 mol%,³⁸ ce qui est inférieur à celui des autres actinomycètes mais nettement plus près de celui des *Bacillus* sp.. On considère un ratio de G+C élevé lorsque ce dernier est >55% et G+C bas lorsque <50%. *T. vulgaris* pour sa part est considéré comme faisant partie des actinomycètes en dépit de l'évidence que ce taxon est très apparenté au genre *Bacillus*.^{64; 71; 72}

1.4 Taxonomie bactérienne, utilisation de l'ARN ribosomal 16S

La microbiologie traditionnelle a établi une taxonomie fondée principalement sur les caractères biochimiques et morphologiques des espèces comme la forme et la couleur des colonies de même que la présence de diverses enzymes. Pour la majorité des bactéries, ces tests d'identification sont précis et avantageux alors que pour d'autres, notamment les actinomycètes, ils ont un faible pouvoir dans la classification. Ceci vient du fait que lors de la classification des espèces, les actinomycètes n'ont pas été regroupés sur ces bases biochimiques. Il est alors possible que l'on puisse observer une variabilité très grande entre une espèce donnée de même que parmi certaines espèces d'actinomycètes. De plus, les actinomycètes sont reconnus comme ayant une morphologie variable; la classification sur ces principes demeure fragile et l'identification en est par le fait même difficile. C'est pourquoi l'utilisation des tests de classification classiques a un faible pouvoir et que l'utilisation d'autres tests de classification tels les tests génétiques doit être appliquée afin de pouvoir caractériser plus précisément ces espèces.

La taxonomie bactérienne change très rapidement; de plus en plus, la classification des espèces repose sur des relations évolutives plutôt que sur la ressemblance générale de ces espèces.⁷³ Le concept d'horloge évolutive veut qu'un constituant évolue par mutations successives à une vitesse à peu près constante qui est déterminée par des contraintes sélectives nécessairement inégales d'une protéine à une autre.⁷⁴⁻⁷⁶ L'utilisation de la biologie moléculaire, plus particulièrement la détermination des séquences de protéines et d'acides nucléiques obtenues grâce au séquençage, permet entre autre d'effectuer la classification de divers organismes. Pour se faire, la macromolécule visée se devait d'être ubiquitaire, c'est à dire se retrouver dans toutes les espèces et y avoir le même rôle, être génétiquement stable, hautement conservée et évoluer lentement. Le choix s'est alors porté en faveur de l'acide ribonucléique ribosomal 16S (ARNr 16S). Chez les procaryotes, les ribosomes sont formés de 2 sous-unités de tailles différentes; la plus grande sous-unité est appelée sous-unité 50S alors que la plus petite est la 30S et c'est à cette dernière sous-unité qu'appartient le 16S. La notion de « S » fait référence à l'unité de Svedberg, une mesure de la constante de sédimentation des particules.²⁸

La structure générale des gènes codant pour l'ARNr 16S est hautement conservée chez tous les êtres vivants et sa séquence, d'une longueur d'environ 1540 paires de bases (pb), présente à la fois des zones qui sont presque invariables et d'autres qui ont évoluées plus rapidement.⁷⁷ L'alignement des séquences d'ARN 16S des bactéries les unes aux autres démontre des portions invariables ou peu variables qui ne sont pas exactement les mêmes d'un groupe à l'autre. La majorité des principaux groupes bactériens possède une ou des séquences nucléotidiques caractéristiques que l'on nomme des séquences signatures oligonucléotidiques.⁷⁷ Ces séquences signatures sont spécifiques à des oligonucléotides qui apparaissent chez la plupart ou chez tous les membres d'un groupe bactérien. Elle sont pour ainsi dire propres à ce groupe et de ce fait, absentes chez les autres ensembles même si ces derniers sont très apparentés au groupe cible. C'est pourquoi l'ARNr 16S se veut être un des outils idéal à employer pour identifier spécifiquement les actinomycètes thermophiles impliqués dans l'AAE.

CHAPITRE 2

OBJECTIFS DE RECHERCHE

Divers environnements de travail dont des tourbières, des scieries, des poulaillers et des composteurs pourraient éventuellement provoquer un problème d'AAE chez les personnes exposées. Les analyses d'air provenant de ces environnements hautement contaminés sont souvent effectuées afin d'évaluer l'exposition à des spores d'actinomycètes qui sont des bactéries difficiles et fastidieuses à identifier par les techniques conventionnelles. L'objectif principal de cette étude est de mettre au point une analyse de restriction de l'acide désoxyribonucléique (ADN) ribosomal amplifié (ARDRA) sur des souches d'actinomycètes acquises de l'« American Type and Culture Collections » (ATCC) et pouvant être impliquées dans le développement de l'AAE afin de compléter les tests biochimiques qui fournissent une identification sommaire et permettent seulement la sélection des genres d'intérêt. De plus, cette analyse génétique sera appliquée à des échantillons environnementaux afin d'identifier rapidement les différents actinomycètes thermophiles en provenance de l'environnement qui pourraient justement être impliqués dans l'AAE. À ce jour, il n'existe pas de moyen de différenciation entre ces actinomycètes et les autres, non reconnus comme dommageables pour la santé. C'est pourquoi une méthode conservée et reproductible telle celle faisant appel à l'utilisation de l'ADNr 16S doit être employée.

Afin d'identifier les actinomycètes thermophiles impliqués dans l'AAE, les tests biochimiques présélectionnés permettront d'établir une première sélection parmi toutes les souches isolées de l'environnement. Comme le pouvoir de discrimination de ces tests est faible, les actinomycètes environnementaux répondant comme les actinomycètes ATCC seront tous testés avec l'essai génétique et les souches dont les longueurs des fragments d'ADNr 16S correspondront à celles des actinomycètes ATCC seront par le fait même identifiées.

En résumé, de manière à sélectionner les bons tests et enzymes discriminants, des actinomycètes thermophiles ATCC reconnus comme faisant parties de 4 espèces possiblement

impliquées dans l'AAE sont employés lors de la réalisation des différents tests. Ceci permet d'établir les critères qui serviront à faire la discrimination entre les souches. Par la suite, seules les enzymes de restriction retenues avec ARDRA seront vérifiées sur l'ADNr 16S des souches environnementales issues d'un milieu de travail donné (scieries québécoises) en vue de n'utiliser à l'avenir que les tests biochimiques discriminant pour faire une première sélection des souches puis les tests génétiques pour parvenir à cibler les souches à risque pour causer l'AAE. Les résultats obtenus devraient alors être applicables, sans distinction, à divers environnements où le développement de l'AAE est potentiel.

CHAPITRE 3

MATÉRIEL ET MÉTHODES

3.1 Actinomycètes thermophiles ciblés dans l'AAE

3.1.1 Actinomycètes thermophiles pouvant causer l'AAE

Le **tableau I** présente les diverses souches d'actinomycètes thermophiles provenant de chez ATCC et suspectées comme pouvant induire l'AAE.

Tableau I : Liste des actinomycètes thermophiles ciblés en provenance d'ATCC

| SOUCHES | No ACCESSION ATCC* | NOM EMPLOYÉ | PROVENANCE |
|--------------------------|---------------------------|--------------------|----------------------------|
| <i>Saccharopolyspora</i> | 15347 | SR 15347/2 | foin moisi, Angleterre |
| <i>rectivirgula</i> (SR) | 29034 | SR 29034 | foin moisi |
| | 33515 | SR 33515 | sol, ex-URSS |
| <i>Saccharomonospora</i> | 15386 | SV 15386 | tourbe, Irlande |
| <i>viridis</i> (SV) | 15735 | SV 15735 | sol, France |
| | 15736 | SV 15736 | sol, France |
| <i>Thermoactinomyces</i> | 27349 | TS 27349 | cane à sucre |
| <i>sacchari</i> (TS) | 27375 | TS 27375 | cane à sucre, Îles Trinité |
| | 27376 | TS 27376 | cane à sucre, Îles Maurice |
| <i>Thermoactinomyces</i> | 43649 | TV 43649/1 | - |
| <i>vulgaris</i> (TV) | 43649 | TV 43649/2 | - |
| | 15733 | TV 15733 | champ de betteraves |
| | 15734 | TV 15734 | sol |
| | 21364 | TV 21364 | sol |

* Les souches types des espèces sont en gras

3.1.2 Actinomycètes thermophiles provenant de l'environnement

Un total de 117 souches environnementales ont été isolées à partir d'échantillonnages d'air effectués entre les années 1996 et 1997 dans 17 scieries réparties à travers le Québec.³⁷ L'ADN génomique a pu être extrait à partir de 75 de ces souches alors que pour 55 souches, l'ADNr 16S a pu être obtenu suite à l'amplification par la réaction en chaîne de la polymérase (PCR).

3.2 Mesures des propriétés physiologiques

Comme *T. sacchari* nécessite du glucose pour croître, pour chacun des tests biochimiques et de croissance de cette espèce, 1% de D-glucose (1%G (Sigma, St-Louis, MO)) est ajouté à tout les milieux de culture utilisés quels qu'ils soient. De façon à éviter l'évaporation trop rapide des milieux de culture, des sacs « Ziploc » ont été utilisés pour conserver l'humidité lors des incubations à 52°C pendant plus de 7 jours. De plus, afin de standardiser les tests car les actinomycètes sont reconnus comme possédant une morphologie variable, les différents tests ont tous été effectués à partir d'un inoculum initial provenant d'une même culture mère (2^e passages sur TSA ou N+1%G) de la souche conservée en gélose inclinées sur TSA ou N+1%G.

3.2.1 Mesure de la température optimale de croissance

Les actinomycètes sont tout d'abord inoculés sur des pétris de TSA (Difco, Détroit, MI) pour *S. reactivigula*, *S. viridis* et *T. vulgaris* et de Nutrient (nutrient agar (N) (Difco)) +1% glucose (Sigma) (N+1%G) pour *T. sacchari* avant d'être incubés 4 jours à 52°C de façon à stimuler la croissance des souches. Lorsque leur croissance est abondante, un bon inoculum visible à l'œil nu est transféré dans du « tryptic soy broth » (TSB (Difco)) ±1%G et les échantillons sont incubés pour 4 autres jours à 52°C. Pendant ce temps, une vérification de la pureté des bouillons est faite et des tubes en pente de TSA ou de N±1%G sontensemencés en

triplicata, avec 100 μL de bouillon de cultures avant d'être incubés pour 7 jours à 25, 37, 45, 52 et 60°C. Une observation de la croissance est réalisée au bout de 2, 4 et 7 jours et l'intensité de la croissance est quantifiée de 0 (pas de croissance), 1 (croissance faible), 2 (croissance moyenne à bonne croissance) à 3 (croissance optimale ou tapis bactérien uniforme). Comme chaque souche est comparée avec elle-même, dans le cas d'un tapis bactérien non uniforme, c'est selon l'espace occupé par la croissance que la quantification est réalisée; la notation maximale est alors considérée inférieure à 3.

En raison de contraintes physiques, il n'était pas possible de tester toutes les températures en même temps, les températures 37, 45 et 52°C ont donc été effectuées en parallèle alors que les températures 25 et 60°C ont été testées subséquemment mais également en parallèle. Afin de vérifier la reproductibilité des résultats, la souche SV 15736 a été reprise à 25°C de même que la souche TV 43649/1 à 37 et 52°C. De cette façon, malgré les délais, il a été possible de comparer et de relier la quantité de croissance pour les souches aux diverses températures.

3.3 Mesures des propriétés biochimiques

Certains microorganismes produisent des enzymes capables d'hydrolyser de grosses molécules complexes qui peuvent être rencontrées dans l'environnement. De telles molécules sont trop grosses pour pouvoir pénétrer d'elles-mêmes dans la cellule, c'est pourquoi les microorganismes doivent posséder des outils efficaces, les enzymes, qui vont leur permettre, via l'utilisation de perméases (protéines qui sont situées dans la membrane cytoplasmique et qui médient le passage des nutriments à travers la membrane), d'assimiler et d'utiliser ce substrat. Ces enzymes sont généralement extracellulaires et dégradent leurs substrats respectifs en les hydrolysant. Il existe plusieurs classes d'enzymes dont entre autres les carbohydrases, les lipases et les protéases. La première classe hydrolyse des polysaccharides comme l'amidon, un polymère assez long composé d'unités glucose. L'enzyme sert alors à libérer les unités de glucose de façon à ce que la cellule puisse les utiliser ultérieurement comme source d'énergie. La deuxième classe d'enzyme, les lipases, hydrolyse les composés tels les triglycérides, comme la tributyrine, une molécule formée par l'attachement de 3 molécules d'acides gras à une molécule de glycérol et

finalement, la troisième classe d'enzymes, les protéases, hydrolyse les protéines comme la caséine.

Afin de mesurer les propriétés biochimiques des microorganismes en réponse à diverses conditions de stress cellulaire, plusieurs composés peuvent être ajoutés dans les milieux de croissance et influencer le développement des cultures. L'ajout de sel dans le milieu de culture affecte premièrement la pression osmotique, c'est à dire que pour un microorganisme donné, afin de conserver l'équilibre dans la concentration des solutés, les molécules d'eau auront tendance à passer au travers de la membrane semi-perméable vers l'endroit où la concentration en sel est la plus élevée. Ce passage et perte des molécules d'eau déshydrate et contracte la cellule, entraînant la mort de celle-ci. Dans un deuxième temps, le sel peut servir d'agent dénaturant pour certaines protéines. En effet, de hautes concentrations de sel tendent à dénaturer des protéines en perturbant la structure tertiaire de ces dernières; structure essentielle à l'activité enzymatique. Par ailleurs, la présence d'un antibiotique dans le milieu tel la novobiocine, inhibera ou non la croissance d'une bactérie sensible à cet antibiotique. La plupart des antibiotiques agissent selon un principe d'inhibition de la synthèse des protéines et ce sont généralement les ribosomes de la cellule procaryote qui en sont la cible.⁶⁹ Finalement, d'autres substances tel le lysozyme catalysent le clivage hydrolytique de polysaccharides complexes situés dans la paroi cellulaire de certaines familles de bactéries. Ils sont considérés comme étant des agents bactéricides capables de lyser les parois cellulaires des bactéries sensibles à leur action.⁵⁶

3.3.1 Croissance en présence de NaCl

À partir d'une culture en pente des souches, en triplicata, les cellules sont récupérées dans un volume final de 1 mL de TSB (Difco). Des pétris de TSA (Difco) ± 7 ou 10% NaCl (BDH, Toronto, Can) et de N+1%G ± 7 ou 10% NaCl sont inoculés en triplicata en une strie centrale. Au bout de 7, 14 et 21 jours, la croissance est notée de - (pas de croissance) à +++ (croissance optimale) selon l'aspect du tapis bactérien; à savoir si oui ou non il est complet (+++) ou éparé (1/2+ à ++) et la présence de mycélium aérien est aussi observée (M) ou non (0).

3.3.2 Décomposition de la caséine

Ce test est réalisé conformément à la méthode proposée par Gordon et collaborateurs.⁷⁸ Cinquante grammes de lait écrémé (Nestlé, Don Mills, Ont) sont dissout dans 500 mL d'eau distillée puis le tout est autoclavé (Castle, Rochester, N-Y) pour 15 minutes à 115°C avant d'être refroidi à 55°C. Pendant ce temps, 10g d'agar (Difco) sont ajoutés à 500 mL d'eau distillée puis autoclavés 15 minutes à 121°C. Lorsque l'agar est aussi refroidi à 55°C, les 2 solutions sont combinées puis réparties en pétris. L'ensemencement en triplicata se fait, à partir du même inoculum liquide que le test pour vérifier la croissance en présence de NaCl, en deux stries parallèles dont l'une doit perforer la gélose. L'observation de l'hydrolyse, au bout de 7, 14, 21 et 28 jours, se caractérise par la présence ou l'absence d'une zone claire autour de la croissance (+ ou -).

3.3.3 Hydrolyse de la tributyrine

Des pétris de tributyrine agar (Oxoid, Basingstoke, Hants, Angleterre) sont inoculés en duplicata, à partir des même cellules de départ que le test effectué pour vérifier la croissance en présence de NaCl, de façon à obtenir des colonies isolées. L'apparition d'une zone d'hydrolyse autour de la colonie est observée (+ ou -) suite à 7 et 14 jours d'incubation.

3.3.4 Hydrolyse de la tyrosine, de la xanthine et de l'hypoxanthine

La méthode qui est préconisée ici est celle de Gordon et collaborateurs⁷⁸ à l'exception du milieu de culture de base utilisé qui est celui proposé par Kurup et Fink.⁷⁹ La L-tyrosine (Difco, Détroit, MI) et l'hypoxanthine (ICN, Claveland, Ohio) sont utilisées, dans 100 mL d'eau distillée, à une concentration de 5% (poids / volume) alors que la xanthine (ICN, Aurora, Ohio) l'est à 4% (poids / volume). Ces solutions sont autoclavées 15 minutes à 115°C pour la xanthine et l'hypoxanthine et à 121°C pour la tyrosine avant d'être combinées chacune à 900 mL de TSA ou N+1%G stériles préparés comme si le volume d'eau distillée était de 1 L. Les milieux sont

ensuite coulés sous agitation constante, de façon à obtenir une répartition uniforme des poudres et ainsi être d'apparence opaque, puis inoculés, à partir du même bouillon riche en cellules que le test effectué pour vérifier la croissance en présence de NaCl, en 2 stries dont l'une doit perforer la gélose. La présence d'un halo clair autour de la croissance est considérée comme un résultat positif (+). Par contre, pour une absence de halo accompagnée ou non de production de pigment brun, le résultat est interprété comme étant négatif (-). Les observations se font suite à 7, 14, 21 et 28 jours d'incubation.

3.3.5 Hydrolyse de l'esculine et de l'arbutine

Un gramme d'esculine (Sigma, St-Louis, MO) ou d'arbutine (ICN, Aurora, Ohio) est combiné à 0,5 g de citrate ferrique-17% Fe (ICN, Claveland, Ohio) puis à 1 L de TSA ou de N+1%G.⁷⁹ La stérilisation est faite de manière standard et les pétris ainsi obtenus sont inoculés à partir d'une anse de culture provenant du 1mL de cellules de départ (le même que pour le test de vérification de la croissance en présence de NaCl) de sorte à obtenir des colonies isolées La présence d'un halo brun / noir autour de la colonie, vérifiée au bout de 7, 14 et 21 jours, indique l'hydrolyse de l'esculine ou de l'arbutine.

3.3.6 Hydrolyse de l'amidon

L'hydrolyse de l'amidon se fait selon ce que Gordon et Mihm ont proposé.⁸⁰ Dix grammes d'amidon de pomme de terre (Difco) sont dissout dans 100 mL d'eau distillée puis ajoutés à 900 mL de TSA ou N+1%G (quantité nécessaire de milieu pour 1L ajouté à 900 mL d'eau distillée) avant que le tout soit stérilisé. Les pétris sont par la suiteensemencés avec un écouvillon à partir du même milieu liquide que pour les autres tests en une strie en « Z ». La révélation d'une zone claire d'hydrolyse se fait aux jours 7, 14, 21 et 28 grâce à une solution de Gram / iodine ((1 g d'iode (Fisher, Fair Lawn, New Jersey)) et 2 g d'iodure de potassium (KI (Fisher, Nepean, Ont)) dissous dans 300 mL d'eau distillée) qui doit inonder la surface du pétri.

Une zone claire indique la présence d'une hydrolyse alors que l'apparition d'une couleur bleue signifie que l'amidon n'a pas été hydrolysé.

3.3.7 Présence de DNAses

Ce test est fait en utilisant comme milieu de culture le DNase test agar (Difco). Les cellules proviennent de l'échantillon initial concentré réalisé au point 3.3.1 et sont inoculées en 1 strie centrale sur les pétris. Au bout de 7 et 14 jours, les pétris sont inondés avec 10 mL d'une solution de HCl 1N (Fisher, Nepean, Ont) pendant 15 minutes. Une zone claire autour de la croissance indique l'absence de sels d'acides nucléiques à précipiter sous l'action du HCl (Fisher) (résultat positif (+)).

3.3.8 Résistance à la novobiocine

Les souches sont mises en forme sur TSA ou N+1%G puis un inoculum est prélevé et déposé dans du TSB±1%G et incubé pour 4 jours à 52°C. La vérification de la résistance à la novobiocine est faite selon le protocole proposé par Kurup et collaborateurs.⁷⁹ Une solution de novobiocine (Sigma, St-Louis, MO) à 10 mg/mL d'eau (11 mg/mL si la novobiocine est à 90%) est stérilisée à travers un filtre de 0,22 µm (Millipore, Bedford, MA) puis mélangée à du TSB±1%G stérile pour donner une concentration finale de 30 µg/mL. Le TSB±1%G et le TSB/novobiocine±1%G sont par la suite aliquotés dans des tubes stériles à raison de 5 mL / tube. L'inoculation se fait à partir d'aliquats de 100 µL de culture fraîche déposés chacun dans 3 tubes avec novobiocine et 3 tubes sans antibiotique de sorte à suivre l'état de la croissance en parallèle au bout de 7 et 14 jours. Une sensibilité à l'antibiotique résultera en une absence de croissance ou une croissance très faible contrairement au témoin sans novobiocine.

3.3.9 Résistance au lysozyme

Les souches sont cultivées tout d'abord sur pétri comme pour le test de résistance à la novobiocine puis dans du TSB+7% glycérol (Difco, Détroit, MI) $\pm 1\%G$. Tel que proposé par Kurup et Fink,⁷⁹ Korn-Wendish⁶³ et Gordon,⁸¹ une solution de lysozyme (ICN, Aurora, Ohio) à 100 mg/mL est préparée dans du HCl (Fisher) 0,01 N et stérilisée par filtration (0,22 μm (Millipore, Bedford, MA)). Du TSB $\pm 1\%G$ contenant 7% glycérol (Difco) est aliquoté en 5 mL dans des tubes en verre de manière stérile puis la solution de lysozyme est ajoutée stérilement au restant de milieu à raison de 5 mL de lysozyme / 95 mL de milieu et le tout est réparti en 5 mL dans de nouveaux tubes de verre. Cent μL de la culture en présence de glycérol (Difco) sont ensemencés en triplicata dans des tubes avec et sans lysozyme de façon à suivre la croissance des souches en parallèle. L'état de la croissance est évalué après 7, 14, 21 et 28 jours.

3.3.10 Résistance des spores à la chaleur

Des cultures liquides pures sont inoculées en milieu TSB $\pm 1\%G$ et incubées 7 jours à 52°C à partir de pétri de TSA ou N+1%G suite à 5 jours de croissance à 52°C. Les croissances obtenues sont alors aliquotées à raison de 6 mL total répartis en 5 tubes de verre. Par la suite, 100 μL de culture est prélevé puis strié sur TSA ou N+1%G après que les tubes contenant les cellules aient séjourné 0, 10, 30, 60 et 120 minutes dans un bain-marie à 100°C. La présence de croissance sur les pétris est par la suite observée ou non (+ ou -) au bout de 7 et 14 jours d'incubation.

3.4 Analyse génétique

L'ADN génomique des actinomycètes provenant d'ATCC (Rockville, Md) est purifié de telle sorte qu'il soit possible de le séquencer si le besoin s'en présente alors que pour les actinomycètes en provenance de l'environnement l'ADN est extrait de manière plus standard.

Comme il est très difficile de compter le nombre de cellules au départ ou de prendre une densité optique des actinomycètes car les cellules croissent souvent en agrégats et forment des filaments sans qu'aucune bactérie à l'exception des spores et du mycélium ne soit apparente au microscope optique (observations personnelles), les actinomycètes sont tous cultivés dans un volume de 40 mL de TSB sous agitation constante pendant 5 à 7 jours à 52°C jusqu'à ce que la turbidité du milieu soit élevée. Les cellules sont ensuite concentrées par centrifugations à 10000 g en 4 à 5 microtubes de 1,5 mL (Sarstedt, Montréal, Québec) sans surnageant et congelées à -20°C jusqu'à utilisation.

3.4.1 Extraction de l'ADN génomique des actinomycètes thermophiles impliqués dans l'AAE

L'extraction de l'ADN génomique des souches d'actinomycètes provenant de chez ATCC se fait à l'aide de colonnes d'affinité « Qiagen genomic-tip 20/G », selon le protocole fourni par Qiagen (Chatsworth, CA). Un tube de 1,5 mL contenant un culot de cellules est décongelé et, conformément au protocole fourni par le « Qiagen genomic DNA handbook », les cellules sont resuspendues dans le tampon #B1 (50 mM EDTA, 50 mM Tris / HCl, 0,5% Tween[®]-20, 0,5% Triton[®]X-100, pH 8,0) contenant 200 µg/mL de RNase A. Deux mg/ml de lysozyme (Boehringer Mannheim, Mannheim, Allemagne) et 0,9 mg/ml de protéinase K (Boehringer Mannheim, Mannheim, Allemagne) sont par la suite ajoutés avant que le tout ne subisse 3 cycles de congélation / décongélation en glace sèche / éthanol puis soit soniqué à 50 Watts pendant 1 minute (Cole Parmer, Chicago, Il). Les cellules sont alors incubées à 37°C pour 45 min et le tampon #B2 (3 M GuHCl, 20% Tween-20, pH 5,5) est ajouté selon le volume requis du « Qiagen genomic DNA handbook ». Une 2^e incubation de 45 min, à 50°C cette fois-ci, est effectuée puis les cellules sont passées sur colonnes « Qiagen genomic-genomic-tip 20/G » (Qiagen, Chatsworth, CA) selon le protocole du fournisseur. Le but de cette purification étant d'obtenir de l'ADN génomique de grande qualité sans l'utilisation du phénol ou du chloroforme afin de pouvoir éventuellement effectuer du séquençage sur les gènes codant pour l'ADNr 16S de ces souches. Le principe de la colonne d'affinité est de lier l'ADN assez fortement pour permettre aux protéines non retenues d'être éliminées lors de la purification tout en permettant à l'ADN de

se décrocher lors de l'étape d'éluion. L'ADN élué est par la suite récupéré par précipitation dans 0,7 volume d'isopropanol (Fisher, Nepean, Ont) et si il ne précipite pas de façon à ce que l'on puisse le recouvrer à l'aide d'une tige de verre recourbée, l'échantillon est mis à -20°C pendant au moins 5 min avant d'être centrifugé à 15000 g dans une centrifugeuse clinique à température de la pièce pendant 14 min. L'ADN ainsi obtenu est séché à l'air libre 10 min pour enlever les restants d'isopropanol puis resuspendu dans un volume de Tris-EDTA 1M, pH 8,0 variant de 250 à 500 µL selon la quantité d'ADN observé à l'œil nu. La quantité d'ADN récupéré est par la suite déterminée spectrophotométriquement (Spectronic 1201, Milton Roy, Philadelphia, PA) à une longueur d'onde de 260 nm et la pureté de ce dernier est déterminée à l'aide du ratio de longueurs d'ondes 260 / 280 nm. Les échantillons sont alors ajustés entre eux avec de l'H₂O stérile afin d'avoir toujours la même concentration d'ADN dans un volume donné soit 67,57 ng / µL puis ils sont congelés à -20°C jusqu'à utilisation.

3.4.2 Extraction de l'ADN génomique des actinomycètes thermophiles en provenance de l'environnement

L'extraction est faite selon une combinaison de 2 protocoles : le premier provient d'une communication personnelle (Dr Michel Pelletier : préparation d'ADN génomique de *Streptococcus salivarius*) et le second est tiré de l'article de Yoon et collaborateurs.⁸² Deux tubes de 1,5 mL contenant le culot de cellules sont décongelés puis les cellules sont lavées dans 0,01 M Tris-HCl, pH 8,0 en reformant le culot par centrifugation à 10000 g pendant 5 min à température pièce. Une fois le surnageant enlevé, les cellules sont resuspendues dans 0,02 M Tris-HCl, pH 8,0 contenant 50% de polyéthylène glycol (PEG) 3400 PM (poids moléculaire) dilué à 24% dans l'H₂O. Une sonication d'1 min à 50 watts (W) est alors faite (Cole Parmer, Chicago, Il) puis le tout est incubé à 37°C pour 1 h. Les cellules ainsi brisées par la sonication et celles qui sont toujours entières sont récupérées par centrifugation à 30000 g (rotor T-865, Sorvall, Dupont, Mandel Scientific, St-Laurent, QC) à 4°C pendant 15 minutes. Par la suite, elles sont resuspendues dans 1 volume d'une solution 0,1 M Tris-HCl, pH 8,0, 1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 0,1 M EDTA et incubées 15 min à 37°C. Trois cycles de congélation / décongélation en glace sèche / éthanol sont ensuite effectués suivi d'une extraction au phénol : chloroforme :

isoamylalcool (25 : 24 : 1) (Sigma, St-Louis, MO) et d'une autre extraction au chloroforme (Fisher, Nepean, Ont) seul réalisée dans le but d'enlever les restants de phénol s'il y a lieu. La phase aqueuse est récupérée par 5min de centrifugation à 15000 g dans une centrifugeuse clinique (à cette étape, les protéines dénaturées par l'extraction au phénol : chloroforme : isoamylalcool sont retrouvées à l'interface de la préparation). L'ADN contenu dans la phase aqueuse est alors précipité dans 1 volume d'isopropanol (Fisher, Nepean, Ont) et redissout dans 1 M Tris-EDTA, pH 8,0. L'ARN est par la suite enlevé de la préparation en digérant l'ADN pendant 1h à 52°C avec 20 µg/mL de RNase A (Boehringer Mannheim, Mannheim, Allemagne). Les protéines qui pourraient éventuellement rester dans la préparation sont digérées par l'ajout de 100 µg/mL de protéinases K (Boehringer Mannheim, Mannheim, Allemagne) mais l'incubation est faite cette fois-ci durant 1 h à 37°C. Une nouvelle précipitation à l'isopropanol (Fisher) est réalisée mais 2 volumes d'isopropanol sont utilisés pour récupérer l'ADN présent dans l'échantillon. Tout comme pour les souches ATCC, si l'ADN n'est pas visible à l'œil nu, les tubes sont mis à -20°C pendant au moins 5 min avant d'être centrifugés à 15000 g dans une centrifugeuse clinique à température pièce pour 14 min. Les culots d'ADN sont alors mis à sécher à l'air ambiant 10 min puis resuspendus dans 1 M Tris-EDTA, pH 8,0. L'ADN est dosé à 260 nm et la pureté est vérifiée par le ratio 260 / 280 nm (Spectronic 1201) avant que les échantillons ne soient congelés à -20°C jusqu'à utilisation.

3.4.3 Amplification de l'ADN ribosomal 16S des souches d'actinomycètes

La PCR se fait selon la méthode proposée par McVeigh⁸³ avec les mêmes oligonucléotides car ces derniers ont été optimisés afin de recouvrir sélectivement les séquences d'ADNr 16S des actinomycètes en général. De plus, la longueur du fragment amplifié est suffisamment longue pour effectuer des digestions enzymatiques et bien voir les longueurs des produits de digestion en résultant. Le premier oligonucléotide, l'ACT283F (5'-GGGTAGCCGCCUGAGAGGG) correspond aux positions 283 à 302 des gènes codant pour l'ARNr 16S de *Escherichia coli* et le second, l'ACT1360R (5'-CTGATCTGCGATTACTAGCGACTCC), correspond aux positions complémentaires 1360 à

1336 des gènes codant pour l'ARNr 16S de *E. coli*.⁸⁴ La longueur du fragment amplifié par ces derniers équivaut à environ 1050-1100 paires de bases (pb).

La réaction de la PCR est faite dans un volume total de 50 µL contenant 200 ng d'ADN génomique auxquels sont ajoutés 50 pmol de chacun des oligonucléotides, 100 µM de déoxynucléosides triphosphates (Pharmacia, Baie d'Urfé, Ont) et 0,3 unité (U) de *Taq* DNA polymérase (Boehringer Mannheim, Mannheim, Allemagne). Le tampon utilisé selon les recommandations du fabricant est celui fourni de façon standard avec l'enzyme. Le milieu réactionnel est ensuite recouvert avec 30 µL de cire liquide (Fisher, Nepean, Ont) afin de prévenir l'évaporation lors de la dénaturation des échantillons. La réaction de la PCR est faite dans un Robocycler Gradient 96 (Stratagene, La Jolla, CA). Un « hot start » est utilisé pour éviter l'appariement non spécifique des amorces sur l'ADN.^{85; 86} Le programme de la PCR s'effectue comme suit :

Programme de la PCR utilisé

| Nombre de cycles | Cycle | Caractéristiques |
|------------------|-------------------------|------------------|
| 1 | « hot start » | 95°C / 2 min |
| 10 | Dénaturation | 94°C / 1 min |
| | appariement des amorces | 68°C / 30 sec |
| | Élongation | 72°C / 2 min |
| 20 | Dénaturation | 92°C / 30 sec |
| | appariement des amorces | 68°C / 30 sec |
| | Élongation | 72°C / 2,5 min |
| 1 | élongation finale | 72°C / 5 min |

Pour les actinomycètes en provenance d'ATCC, une dizaine de PCR sont effectuées pour chaque souche donnée puis l'ensemble des PCR obtenues est combiné afin de réduire les effets possibles des biais individuels dans les tubes réactionnels, biais causés lors des amplifications. Quant aux souches environnementales, le « pool » de produits PCR est effectué sur 3 réactions seulement. Huit μL des produits des réactions de la PCR sont vérifiés par électrophorèse en présence de 0,045 M Tris-borate / 0,001 M EDTA (TBE) sur gel d'agarose 1% (Gibco BRL, Grand Island, NY) contenant 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de bromure d'éthidium (Fisher, Fair Lawn, New Jersey) et le restant des réactions PCR est conservé à -20°C .

3.4.4 Purification des produits PCR

La purification n'est faite que lorsque les « pools » de PCR démontrent plus d'une bande amplifiée pour une espèce donnée ou lorsque les amorces de la réaction PCR doivent être enlevées. Le produit des réactions PCR est appliqué sur un gel d'agarose 1% (Gibco BRL, Grand Island, NY) et le tout est migré jusqu'à ce que la bande recherchée soit bien séparée des autres bandes. La bande située vers 1050 pb est alors découpée du gel puis purifiée par « QIAquick gel extraction kit » selon le protocole fourni par Qiagen (Qiagen, Chatsworth, CA). Trois volumes de tampon #QG sont alors ajoutés par poids de la bande excisée (1 mg = 1 μL) puis la bande est dissoute grâce à une incubation de 10 min à 50°C avec agitation aux 2-3 min. L'échantillon est alors appliqué à raison de 800 μL maximum / centrifugation à une colonne « QIAquick spin » placée dans un tube à récolte de 2 mL. Une première centrifugation de 1 min à 15000 g est faite puis lorsque tout l'échantillon a été appliqué à la colonne, un lavage de cette dernière est effectué avec 750 μL de tampon #PE contenant de 96 à 100% d'ETOH et une autre centrifugation d'1 min à 15000 g est réalisée. Après avoir vidé le tube à récolte de 2 mL, une nouvelle centrifugation d'1 min à 15000 g est exécutée afin d'enlever toute trace possible d'éthanol contenu dans le tampon #PE. La colonne est alors placée dans un microtube de 1,5 mL (Sarstedt, Québec, Canada) et l'ADN est élué à l'aide de 30 μL de 1 M Tris-EDTA, pH 8,0, laissé en contact avec l'ADN 1 minute avant que la dernière centrifugation d'1 min à 15000 g ne soit faite. La purification de la bande d'ADN est alors vérifiée par électrophorèse dans du tampon TBE sur gel

d'agarose 1% (Gibco BRL, Grand Island, NY) contenant 0,5 µg / mL de bromure d'éthidium (Fisher) puis conservée à -20 °C jusqu'à utilisation.

3.4.5 Digestions enzymatiques et analyse des fragments de restriction des produits PCR

Les digestions enzymatiques se font selon les recommandations des fournisseurs d'enzymes de restriction dans le tampon fourni avec l'enzyme pour un volume final de 25 µL. Les enzymes utilisées pour étudier le polymorphisme de la longueur des fragments de restriction (RFLP) sont *AccI*, *AvaI*, *BsmFI*, *BssKI*, *DpnI*, *DdeI*, *EcoRI*, *FokI*, *HhaI*, *MseI*, *Sau96I*, *Taq^αI* (New England Biolabs (NEB), Mississauga, ON), *AluI*, *BamHI*, *EcoRII*, *HinfI*, *RsaI* (Gibco BRL, Grand Island, NY), *BanII*, *PstI*, *PvuII*, *XhoI* (Boehringer Mannheim, Mannheim, Allemagne), *HindIII* et *MluI* (Pharmacia, Baie d'Urfé, Ont). La quantité d'ADN par réaction est déterminée qualitativement selon l'intensité des « pools » de PCR non digérées sur gels d'agarose 1% (Gibco BRL, Grand Island, NY).

3.4.6 Clonage des fragments d'ADN des souches TS 27349, TV 43649/1 et TV 15734

Le clonage est réalisé à l'aide du « TOPO TA cloning kit » d'Invitrogen (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) conformément au protocole fourni par la compagnie. La réaction de « TOPO-cloning » est faite à partir de 1 µL de réaction PCR conservée à -20°C (mais ne datant pas de plus de 3 semaines) et de 1 µL de PCR[®]-TOPO vecteur, dans un volume final de 5 µL. La ligation du fragment PCR et du vecteur est faite pendant 5 min à température de la pièce puis les tubes sont mis sur glace. Pendant ce temps, un tube de « One shot[™] cells » par ligation est dégelé sur glace puis 2 µL de 0,5 M β-mercaptoéthanol sont ajoutés aux cellules compétentes ainsi que 2 µL de la réaction de « TOPO-cloning ». Les cellules compétentes sont alors incubées sur glace 30 min avant de subir un choc thermique à 42°C pendant 30 sec qui va permettre au vecteur de

pénétrer la cellule. Les cellules compétentes sont ensuite remises sur glace 2 min pour permettre aux pores de ces mêmes cellules de se refermer et d'emprisonner le vecteur à l'intérieur. Le milieu de culture « SOC », fourni par Invitrogen, est par la suite ajouté aux cellules à raison de 250 μL par réaction de clonage. Les cellules sont alors incubées 30 min à 37°C sous agitation constante avant que 100 μL ne soit inoculé sur des boîtes de pétri de milieu Luria-Bertani agar (L-BA) contenant 50 $\mu\text{g/ml}$ d'ampicilline et que le tout ne soit finalement incubé toute la nuit (O/N) à 37°C.

3.4.7 Analyse des clones positifs

Suite à la transformation des cellules compétentes, cinq colonies sont prélevées au hasard et ensemencées dans 2 mL de bouillon Luria-Bertani (L-BB) contenant 50 $\mu\text{g/ml}$ d'ampicilline. L'incubation est faite sous agitation constante à 37°C pendant 8 à 16 heures. Passé ce laps de temps, les cultures sont aliquotées en 2 fois 1 mL puis centrifugées à 10000 g dans une centrifugeuse clinique à 4°C afin de faire culotter les cellules. Le surnageant est retiré et 1 tube de cellules est congelé à -20°C alors que l'autre tube va servir à vérifier si il y a bel et bien eu insertion du fragment désiré.

3.4.8 Vérification de l'insert par mini-préparation d'ADN plasmidique (miniprep)

Cette vérification se fait conformément au protocole proposé par Sambrook et collaborateurs.⁸⁷ Les cellules provenant du tube qui n'a pas été congelé à l'étape précédente sont resuspendues dans 100 μL d'une solution, à pH 8,0, composée de 25 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA et 50 mM glucose. Une seconde solution contenant 0,2 N NaOH et 1% SDS est ajoutée au tube puis ce dernier est agité par inversions. Une dernière solution de 3 M potassium, 5 M acétate est combinée au tube de cellules puis mélangée par inversions avant que le tout ne soit incubé sur glace 15 min. Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation à 15000 g dans une centrifugeuse clinique à 4°C puis une purification au chloroforme (Fisher, Nepean, Ont) est

réalisée. L'ADN double brins est précipité à l'aide d'un volume d'isopropanol puis le culot ainsi obtenu est rincé à l'aide d'ETOH 70% froid. Suite à l'évaporation de l'ETOH, l'ADN est resuspendu dans 50 µL de 1 M Tris-EDTA (TE), pH 8,0 et conservé jusqu'à utilisation à -20°C.

L'analyse de l'insertion du fragment d'ADN est faite à partir d'une digestion enzymatique à *EcoRI* de 2,5 µL d'ADN ci-haut purifié pour donner un volume final de 20 µL. La vérification de la digestion se fait par une électrophorèse dans du tampon TBE sur un gel d'agarose 1% (Gibco BRL, Grand Island, NY) contenant 0,5 µg / mL de bromure d'éthidium (Fisher, Fair Lawn, New Jersey) et si le fragment s'est bien inséré, un fragment correspondant à la longueur de l'insert devrait être visible sur le gel.

3.4.9 Purification de l'insert

La purification est faite selon le protocole proposé par le « QIAprep spin miniprep kit protocol » (Qiagen, Chatsworth, CA). Le culot de cellules congelé correspondant à l'autre moitié du 2 mL ayant servi à la préparation des minipreps est resuspendu dans 250 µL de tampon #P1 contenant 1 mg/mL de RNase A puis 250 µL de tampon #P2 sont ajoutés. Le tube est ensuite inversé doucement de 4 à 6 fois et 350 µL de tampon #N3 sont ajoutés avant que le tout soit immédiatement mélangé par inversions de 4 à 6 fois encore puis centrifugé 10 min à 15000 g dans une centrifugeuse clinique. Le surnageant obtenu est alors ajouté à une « QIAprep spin column » contenue dans un tube à collection de 2 mL puis centrifugé 30 à 60 sec avant que la phase liquide ne soit jetée. La colonne est lavée en ajoutant 750 µL de tampon #PE contenant 96-100% ETOH et le tout est centrifugé à 15000 g de 30 à 60 sec. La phase liquide est jetée puis la colonne est encore une fois centrifugée à 15000 g pendant 1 min afin de bien enlever le tampon résiduel. Finalement, l'ADN est élué dans un microtube (Sarstedt, Québec, Canada) de 1,5 mL à l'aide de 50 µL d'H₂O à pH compris entre 7,0 et 8,5 puis, après 1 min, le tout est centrifugé à 15000 g dans une centrifugeuse clinique pour 1 min. L'ADN est finalement dosé au spectrophotomètre (Spectronic 1201) à 260 et 280 nm et congelé à -20°C jusqu'à utilisation.

3.4.10 Séquençage et analyse des séquences des souches TS 27349, TV 43649/1 et TV 15734

Les ADN ont été ajustés à 100 µg/µL dans de l'H₂O et sont envoyés séquençer automatiquement sur les 2 brins une première fois par le service de séquençage automatique de l'Université Laval (Université Laval, Ste-Foy, Qc). Dans un deuxième temps, à partir des séquences ainsi obtenues, des oligonucléotides conservés ont été synthétisés (Medicorp, Montréal, Québec) afin de confirmer le premier séquençage. Ces oligonucléotides sont ACT18F (5'-TCCGGAATTATTGGGCGT) et ACT19R (5'-GGTAAGGTTCTTCGCGTTG). Les ADN, ajustés comme précédemment, ont une fois de plus été séquencés automatiquement sur les 2 brins par le service de séquençage automatique de l'université Laval (Université Laval, Ste-Foy, Québec). L'assemblage et l'analyse des séquences sont ultérieurement faits à l'aide du logiciel du « Genetics Computer Group » (GCG) version 9.1.

CHAPITRE 4

RÉSULTATS

4.1 Analyses physiologiques et biochimiques des actinomycètes thermophiles provenant d'ATCC

4.1.1 Températures optimales de croissance

La température est un facteur très important lorsqu'il est question de culture de microorganismes, c'est pourquoi il est avantageux de connaître les limites de température de croissance de ces derniers. L'utilisation de différents milieux de culture s'avère également utile afin d'optimiser leur croissance. Les souches d'actinomycètes thermophiles ont donc été cultivées respectivement sur TSA, N et N+1%G à des températures variant de 25 à 60°C. D'après le **tableau II**, la croissance optimale qualifiée selon l'étendue du tapis bactérien, pour les diverses souches de *S. reactivirgula* sur les différents milieux, se situe aux environs de 37 à 60°C sauf en ce qui concerne la souche type de l'espèce (SR 33515) dont la croissance, moins abondante, est meilleure à des températures comprises entre 37 et 52°C. Les souches de *Saccharomonospora* pour leur part sont capables de produire un pigment vert entre 37 et 52°C sur N±1%G mais leur quantité de croissance est moins uniforme que celle des *Saccharopolyspora*. Le SV 15736 est la seule souche, parmi les actinomycètes thermophiles sélectionnés, à être capable de croître à 25°C, son optimum de croissance se situant alors entre 25 et 52°C sur milieu TSA et entre 37 et 45°C sur les autres milieux. Quant à *T. sacchari*, c'est l'unique espèce étudiée à donner moins de rendement mais cependant, la présence de glucose dans le milieu de culture favorise son développement. Dans le cas des *T. vulgaris*, TV 21364 croît très bien de 52 à 60°C et ce, peu importe le milieu de culture utilisé. La souche TV 15734 préfère les milieux faibles en sucres et sa température optimale de croissance varie de 37 à 52°C. Quant à TV 15733, elle n'a donné que peu de croissance aux températures 45 à 60°C et ce, indifféremment des milieux employés; du moment où il n'y a pas eu de sucre ajouté. Finalement, les 2 souches de TV 43649 croissent

mieux vers les 37-60°C mais c'est à 52°C que, peu importe le milieu employé, leur croissance est optimale.

4.1.2 Tests biochimiques

Grâce à la combinaison de certains tests biochimiques effectués pendant une période comprise entre 14 et 28 jours (**tableau III**), on peut discriminer les espèces les une des autres. Cependant, les tests biochimiques n'ont pas tous le même pouvoir discriminant. En effet, toutes les souches ATCC ont démontré des résultats positifs aux tests de décomposition de la caséine et de la tributyrine de même qu'à la production de DNAses par les cultures. La décomposition de l'esculine est effectuée par toutes les souches sauf les souches de *T. vulgaris* autre que la souche type. *S. rectivirgula* est la seule espèce, avec la souche type de *T. vulgaris* à ne pouvoir hydrolyser l'amidon en composés plus simples. La séparation de l'arbutine pour sa part est possible chez 2 souches de *S. rectivirgula* et chez les *Thermoactinomyces* (sauf encore une fois les souches de *T. vulgaris* autres que la souche type). Ces tests très variables dans une espèce donnée ou conservés parmi toutes les espèces cibles ne sont, par le fait même, pas utilisables pour la caractérisation de souches d'actinomycètes thermophiles pouvant être impliquées dans l'AAE.

Par contre, une combinaison de tests biochimiques précis rend la discrimination entre les souches ATCC possible. La décomposition de la xanthine ou de l'hypoxanthine sont en effet 2 tests qui vont donner des résultats positifs uniquement avec les souches de *S. rectivirgula*. Afin de choisir les souches de *S. viridis*, l'ajout de 7% NaCl dans le milieu de culture ainsi que la présence de mycélium aérien sera à ce moment utile pour mettre en évidence les souches de *S. viridis* qui devraient croître mais ne pas produire de mycélium aérien. Contrairement à ces dernières, les souches de *S. rectivirgula* produiront du mycélium aérien visible et ce, même si leur croissance est possible en présence de 7 ou 10% NaCl. La présence de lysozyme dans le milieu de culture inhibera la croissance de toutes les espèces à l'exception des *T. vulgaris*. Tel que prévu, seuls les thermoactinomycètes avec leurs endospores sont résistants à 100°C et ce, pour une période allant jusqu'à 30 minutes. Passé ce temps, les endospores de certaines souches seront inactivées. De façon à sélectionner les souches de *T. sacchari*, l'emploi de novobiocine à

30 µg/mL permettra aux thermoactinomycètes de croître tout en empêchant le développement des autres espèces. Par la suite, selon les résultats de croissance obtenus en présence de lysozyme et ceux en présence de novobiocine, on devrait pouvoir retracer les *T. sacchari* et les *T. vulgaris* dans un échantillon de souches donné.

Tableau II : Qualification de la croissance optimale des souches d'actinomycètes thermophiles d'ATCC à différentes températures

| SOUUCHE | TEMPÉRATURE DE CROISSANCE ¹ | | | | | | | | | | | | | | |
|------------------------|--|---|-------|------|----------------|----------------|----------------|----------------|-------|------|---|-------|------|---|-------|
| | 25°C | | | 37°C | | | 45°C | | | 52°C | | | 60°C | | |
| | TSA | N | N+G1% | TSA | N | N+G1% | TSA | N | N+G1% | TSA | N | N+G1% | TSA | N | N+G1% |
| <i>S. rectivirgula</i> | 0 | 0 | 0 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| 15347/2 | 0 | 0 | 0 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| 29034 | 0 | 0 | 0 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| 33515 | 0 | 0 | 0 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 1 | ½ | ½ |
| <i>S. viridis</i> | 0 | 0 | 0 | 3 | 1 | 0 | 3 ^P | 1 ^P | 1 | 3 | 3 | 3 | ½ | ½ | ½ |
| 15386 | 0 | 0 | 0 | 3 | 3 ^P | 3 ^P | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 2 | 3 |
| 15735 | 0 | 0 | 0 | 2 | 2 ^P | 2 | 2 | 2 ^P | 2 | 2 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| 15736 | 2 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>T. sacchari</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 2 | ½ | ½ | ½ | 0 | 0 | 0 |
| 27349 | 0 | 0 | 0 | 0 | ½ | ½ | ½ | ½ | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 | 1 | 2 |
| 27375 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 | 1 | ½ | 2 |
| 27376 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 | 1 | ½ | 2 |
| <i>T. vulgaris</i> | 0 | 0 | 0 | 2 | 1 | ½ | 3 | 2 | 1 | 3 | 3 | 3 | 2 | 1 | ½ |
| 43649/1 | 0 | 0 | 0 | 3 | 2 | 1 | 2 | 3 | ½ | 3 | 3 | 3 | 3 | 2 | 1 |
| 43649/2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | ½ | 1 | 0 | ½ | 1 | 1 | 1 | ½ | 0 |
| 15733 | 0 | 0 | 0 | 2 | 2 | ½ | 2 | 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 1 | 1 | ½ |
| 15734 | 0 | 0 | 0 | 2 | 2 | ½ | 2 | 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 1 | 1 | ½ |
| 21364 | 0 | 0 | 0 | 2 | 3 | 3 | 2 | 2 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |

¹ Pas de croissance = 0, peu de croissance = ½, croissance faible = 1, bonne croissance = 2, croissance optimale = 3

^P Production de pigments

Tableau III : Réponses des actinomycètes thermophiles d'ATCC aux différents tests biochimiques

| TEST BIOCHIMIQUE | NOMBRE DE SOUCHES POSITIVES ¹ | | | | |
|---|--|---|--|--|--|
| | <i>Saccharopolobyspora rectivirgula</i> 3 souches | <i>Saccharomonospora viridis</i> 3 souches | <i>Thermoactinomyces sacchari</i> 3 souches | <i>Thermoactinomyces vulgaris</i> 5 souches | |
| Croissance en présence de NaCl 7% ⁵ | 3/M | 3/0 | 0/0 | 0/0 | |
| Croissance en présence de NaCl 10% ⁵ | 3/M | 3/0 | 0/0 | 0/0 | |
| Décomposition de la caséine | 3 | 3 | 3 | 5 | |
| tributyryne | 3 | 3 | 3 | 5 | |
| tyrosine | 3 | 3 | 0 | 3 ⁴ | |
| xanthine | 3 | 0 | 0 | 0 | |
| esculine | 3 | 3 ² | 3 | 2 ⁴ | |
| hypoxanthine | 3 | 0 | 0 | 0 | |
| Hydrolyse de l'amidon | 0 | 3 | 3 | 3 ⁴ | |
| Production de DNAses | 3 | 3 | 3 | 5 | |
| Résistance à la novobiocine 30 µg/mL | 0 | 0 | 2 ³ | 5 | |
| Résistance au lysozyme | 0 | 0 | 0 | 5 | |
| Résistance à la chaleur à 100°C | | | | | |
| 10 minutes | 0 | 0 | 2 ³ | 5 | |
| 30 minutes | 0 | 0 | 2 ³ | 5 | |
| 60 minutes | 0 | 0 | 2 ³ | 4 | |
| 120 minutes | 0 | 0 | 1 ³ | 3 | |
| Séparation de l'arbutine | 2 | 0 | 3 | 2 ⁴ | |

¹ nombre de souches totales étudiées par espèce

² les souches sont très peu positives

³ seulement 2 souches sur 3 ont poussé

⁴ seulement les souches types de l'espèce = 2⁴; à l'exception des souches types de l'espèce = 3⁴

⁵ /M = mycélium aérien présent; /0 = absence de mycélium

4.2 Séquences d'une partie des gènes codant pour l'ARNr 16S des actinomycètes thermophiles responsables de l'AAE

4.2.1 *S. reactivirgula* et *S. viridis*

Les séquences des gènes codant pour l'ADNr 16S de *Saccharomonospora viridis* 15386 (no accession GeneBank : Z38021), et de *Saccharopolyspora reactivirgula* 33515 (no accession GeneBank : X53194), ont été publiées respectivement par Embley⁴⁴ et par Kim,⁸⁸ elles sont présentées aux **annexes C et D**. L'identité entre ces séquences, calculée selon l'algorithme de Smith and Waterman,⁸⁹ est de 94,423% (**tableau IV**).

4.2.2 *T. sacchari* et *T. vulgaris*

D'après les séquences obtenues des gènes codant pour l'ADNr 16S du TS 27349 (no accession GeneBank : AF089890), du TV 43649/1 (no accession GeneBank : AF089891), et du TV 15734 (no accession GeneBank : AF089892), (**figures 1, 2 et 3**), le pourcentage d'identité entre les souches TV 43649/1 et TS 27349 est de 96,8% (**tableau IV**). Cette même identité, entre les souches TS 27349 et TV 15734 est de 96,0% alors qu'entre les souches TV 15734 et TV 43649/1, elle passe à 95,7%. Ce qui tend à dire que la souche TV 43649 est plus près génétiquement des souches de *T. sacchari* que de celles des autres *T. vulgaris*. L'alignement parallèle des 3 souches de *Thermoactinomyces* de la **figure 4**, montre bien les différences de nucléotides présentes dans les séquences, différences qui ont servi à calculer ces pourcentages d'identité, de même que les zones plus conservées des gènes codant pour l'ADNr 16S. De plus, il met en évidence la présence de 24 pb supplémentaires dans la séquence d'ADNr 16S des *Thermoactinomyces sacchari* et de *T. vulgaris* 43649 (vers 175 pb). Le même alignement mais comportant en plus les séquences du *Saccharopolyspora* et du *Saccharomonospora* est présenté à l'**annexe E** et encore une fois, l'insertion de nucléotides chez les *Thermoactinomyces* vers 170 pb met en évidence, parmi ces 5 souches, une zone variable de 28 pb de longueur. Il est à noter qu'en raison de la disponibilité du matériel, ce n'est pas la souche type de

Thermoactinomyces sacchari qui a été séquencée mais un autre spécimen également isolé de la canne à sucre.

Tableau IV : Pourcentage d'identité entre les séquences des gènes codant pour l'ADNr 16S des souches d'actinomycètes thermophiles provenant d'ATCC*

| Souches et No accession GeneBank | | SR 33515 X53194 | SV 15386 Z38021 | TS 27349 AF089890 | TV 43649/1 AF089891 | TV 15734 AF089892 |
|-------------------------------------|----------|--------------------|--------------------|----------------------|------------------------|----------------------|
| SR 33515 | X53194 | 100,0 | 94,4 | 84,6 | 84,3 | 84,9 |
| SV 15386 | Z38021 | | 100,0 | 83,4 | 82,8 | 83,1 |
| TS 27349 | AF089890 | | | 100,0 | 96,8 | 96,0 |
| TV 43649/1 | AF089891 | | | | 100,0 | 95,7 |
| TV 15734 | AF089892 | | | | | 100,0 |

*Pourcentage calculé selon l'algorithme de Smith and Waterman⁸⁹ par le programme « bestfit » de GCG (9.1).

Longueur totale : 1077 pb

```

1   GGGTAGCCGG CCTGAGAGGG TGATCGGCCA CACTGGGACT GAGACACGGC
51  CCAGACTCCT ACGGGAGGCA GCAGTAGGGA ATTTTCCGCA ATGGGCGCAA
101 GCCTGACGGA GCAACGCCGC GTGAGTGAGG ACGGCCTTCG GGTTGTAAAA
151 CTCTGTTCTT GGGGAAGAAC CCTTCCGAGG CGAACAGCCT CGGAAGTTGA
201 CGGTACTION CAA GGAGAAAGCC CCGGCTAACT ACGTGCCAGC AGCCGCGGTA
251 ATACGTAGGG GCGGAGCGTT ATCCGGAATT ATTGGGCGT,A AAGCGCGCGC
301 AGGCGGCCGA TTAAGTCAGG TGTGAAAGGC TCGGGCTCAA CCGCAGGGCG
351 GCACCTGAAA CTGGTCGGCT TGAGTGCAGG AGAGGGGAGT GGAATTCCCG
401 GTGTAGCGGT GGAATGCGTA GAGATCGGGA GGAACACCAG TGGGGAAGGC
451 GGCTCTCTGG CCTGTAAGT ACCTGAGGC GCGAAAGCGT GGGGAGCAAA
501 CAGGATTAGA TACCCTGGTA GTCCACGCCG TAAACGATGA GTGCTAGGTG
551 TTGGGGGGTT CCCCCCTCAG TGCCGAAGGT AACCCATTAA GCACTCCGCC
601 TGGGGAGTAC GGCCGCAAGG CTGAAACTCA AAGGAATTGA CGGGGGCCCG
651 CACAAGCGGT GGAGCATGTG GTTTAATTTCG AAG,CAACGCG AAGAACCCTTA
701 CCAGGGCTTG ACATCCCGCT GACCGCTCCA GGGATGGAGC CTCCCTTCGG
751 GGCAGCGGTG ACAGGTGGTG CATGGTTGTC GTCAGCTCGT GTCGTGAGAT
801 GTTGGGTTCA GTCCCGCAAC GAGCGCAACC CTTATCGCCA GTTGCCAGCA
851 TTTCGGATGG GCACTCTGGC GAGACAGCCG GTGAAAGCCG GAGGAAGGTG
901 GGGATGACGT CAAATCATCA TGCCCCTTAT GTCCTGGGCT ACACACGTGC
951 TACAATGGCC AGTACAAAGG GAAGCGAACC CGCGAGGGGG AGCCAATCCC
1001 AAAAAACTGG TCTCAGTTCG GATCGCAGGC TGCAACTCGC CTGCGTGAAG
1051 CCGGAGTCGC TAGTAATCGC AGATCAG

```

Figure 1 : Séquence des gènes codant pour l'ADNr 16S de *Thermoactinomyces sacchari* 27349. La séquence obtenue a été reconfirmée sur les 2 brins à l'aide de 2 oligonucléotides (soulignés) dirigés en sens contraire et situés vers le milieu de la séquence. Par la suite, les séquences ont été alignées manuellement puis assemblées à l'aide du logiciel « assemble » de GCG (9.1) et déposées dans GeneBank sous le numéro d'accèsion : AF089890.

Longueur totale : 1078 pb

```

1   GGGTAGCCGG CCTGAGAGGG TGATCGGCCA CACTGGGACT GAGACACGGC
51  CCAGACTCCT ACGGGAGGCA GCAGTAGGGA ATTTTCCGCA ATGGGCGAAA
101 GCCTGACGGA GCAACGCCGC GTGAGTGAGG ACGGCCTTCG GGTGTGAAAA
151 CTCTGTTCTT GAGGAAGAAT TCCTTCCAGG CGAACAGCCT GGAAGGTTGA
201 CGGTACTION CAA GGAGAAAGCC CCGGCTAACT ACGTGCCAGC AGCCGCGGTA
251 ATACGTAGGG GCGGAGCGTT ATCCGGAATT ATTGGGCGT,A AAGCGTGCGC
301 AGGCGGCTGA TTAAGTCAGG TGTGAAAGGC TCGCGCTCAA CCGCAGAGCG
351 GCACCTGAAA CTGGTCAGCT TGAGTGCAGG AGAGGGGAGC GGAATTCCCG
401 GTGTAGCGGT GGAATGCGTA GAGATCGGGA GGAACACCAG TGGCGAAGGC
451 GGCTCTCTGG CCTGTAACTG ACGCTGAGGC GCGAAAGCGT GGGGAGCAAA
501 CAGGATTAGA TACCCTGGTA GTCCACGCCG TAAACGATGA GTGCTAGGTG
551 TTGGGGGGCT ACGCCCCTCA GTGCCGAAGG TAACCCATTA AGCACTCCGC
601 CTGGGGAGTA CGGCCGCAAG GCTGAAACTC AAAGGAATTG ACGGGGGCCC
651 GCACAAGCGG TGGAGCATGT GGTTTAATTC GAAG,CAACGC GAAGAACCTT
701 ACCAGGGCTT GACATCCCGC TGACCCCTCC AGAGATGGAG GTTTCCTTCG
751 GGACAGCGGT GACAGGTGGT GCATGGTTGT CGTCAGCTCG TGTCGTGAGA
801 TGTTGGGTTC AGTCCCGCAA CGAGCGCAAC CCTTGTCGTT AGTTGCCAGC
851 ATTTCCGGATG GGCACCTCTAA CGAGACAGCC GGTGAAAGCC GGAGGAAGGT
901 GGGGATGACG TCAAATCATC ATGCCCTTA TGTCCTGGGC TACACACGTG
951 CTACAATGGC TGGTACAAAG GGCAGCGAAC CCGCGAGGGG GAGCCAATCC
1001 CAAAAGCCA GTCTCAGTTC GGATCGCAGG CTGCAACTCG CCTGCGTGAA
1051 GCCGGAGTCG CTAGTAATCG CAGATCAG

```

Figure 2 : Séquence des gènes codant pour l'ADNr 16S de *Thermoactinomyces vulgaris* 43649. La séquence obtenue a été reconfirmée sur les 2 brins à l'aide de 2 oligonucléotides (soulignés) dirigés en sens contraire et situés vers le milieu de la séquence. Par la suite, les séquences ont été alignées manuellement puis assemblées à l'aide du logiciel « assemble » de GCG (9.1) et déposées dans GeneBank sous le numéro d'accèsion : AF089891.

Longueur totale : 1052 pb

```

1   GGGTAGCCGG CCGGAGAGGG TGATCGGCCA CACTGGGACT GAGACACGGC
51  CCAGACTCCT ACGGGAGGCA GCAGTAGGGA ATTTTCCGCA ATGGGCGAAA
101 GCCTGACGGA GCAATGCCGC GTGAGTGATG ACGGCCTTCG GGTTGTAAAA
151 CTCTGTTCTG AAGGAAGAAG TTCTGACGGT ACTTCAGGAG AAAGCCCCGG
201 CTAACTACGT GCCAGCAGCC GCGGTAATAC GTAGGGGGCG AGCGTTATCC
251 GGAATTATTG GGCGT,AAAGC GCGCGCAGGC GGTCATTTAA GTCAGGTGTG
301 AAAGGCTGCG GCTCAACCGC AGAGCGGCAC CTGAAACTGG ATGACTTGAG
351 TGCAGGAGAG GAGAGCGGAA TTCCCGGTGT AGCGGTGGAA TCGGTAGAGA
401 TCGGGAGGAA CACCAGTGGC GAAGGCGGCT CTCTGGCCTG TTTCTGACGC
451 TGAGGCGCGA AAGCGTGGGG AGCAAACAGG ATTAGATAACC CTGGTAGTCC
501 ACGCCGTAAA CGATGAGTGC TAGGTGTCGG GGGGTCCTAC CCTCGGTGCC
551 GAAGGTAACC CATTAAGCAC TCCGCCTGGG GAGTACGGCC GCGAGGCTGA
601 AACTCAAAGG AATTGACGGG GGCCCGCACA AGCGGTGGAG CATGTGGTTT
651 AATTCGAAG,C AACGCGAAGA ACCTTACCAG GGCTTGACAT CCCGCTGACC
701 GCTCCAGAGA TGGAGCTTCC CTTCGGGGCA GCGGTGACAG GTGGTGCATG
751 GTTGTGTCGA GCTCGTGTCG TGAGATGTTG GGTTCACTCC CGCAACGAGC
801 GCAACCCTTA TCGCTAGTTG CCAGCATTCA GTTGGGCACT CTAGCGAGAC
851 AGCCGGTGAA AGCCGGAGGA AGGTGGGGAT GACGTCAAAT CATCATGCCC
901 CTTATGTCCT GGGCTACACA CGTGCTACAA TGGCCGGTAC AATGGGTCGC
951 CAACCCGCGA GGGGGAGCTA ATCCCACAAA ACCGGTCTCA GTTCGGATCG
1001 CAGGCTGCAA CTCGCCTGCG TGAAGCCGGA GTCGCTAGTA ATCGCAGATC
1051 AG

```

Figure 3 : Séquence des gènes codant pour l'ADNr 16S de *Thermoactinomyces vulgaris* 15734. La séquence obtenue a été reconfirmée sur les 2 brins à l'aide de 2 oligonucléotides (soulignés) dirigés en sens contraire et situés vers le milieu de la séquence. Par la suite, les séquences ont été alignées manuellement puis assemblées à l'aide du logiciel « assemble » de GCG (9.1) et déposées dans GeneBank sous le numéro d'accèsion : AF089892.

Longueur totale : 1083 pb

ts-2 GGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGTATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCT
tv1-2 GGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGTATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCT
tv15734 GGGTAGCCGGCCGGAGAGGGTGTATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCT

ts-2 ACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATTTTCCGCAATGGGCGCAAGCCTGACGGAGCAACGCCGC
tv1-2 ACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATTTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGC
tv15734 ACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATTTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATGCCGC

ts-2 GTGAGTGAGGACGGCCTTCGGGTTGTAAAACCTCTGTTCTTGGGGAAGAACCCTTCCGAGG
tv1-2 GTGAGTGAGGACGGCCTTCGGGTTGTAAAACCTCTGTTCTTGAGGAAGAATTCCTTCCAGG
tv15734 GTGAGTGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAAACCTCTGTTCTGAAGGAAGAAGTTC-----

ts-2 CGAACAGCCTCGGAAGTTGACGGTACTCAAGGAGAAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGC
tv1-2 CGAACAGCCTGGAAGGTTGACGGTACTCAAGGAGAAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGC
tv15734 -----TGACGGTACTTCAGGAGAAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGC

ts-2 AGCCGCGGTAATACGTAGGGGCGAGCGTTATCCCGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGC
tv1-2 AGCCGCGGTAATACGTAGGGGCGAGCGTTATCCCGAATTATTGGGCGTAAAGCGTGCGC
tv15734 AGCCGCGGTAATACGTAGGGGCGAGCGTTATCCCGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGC

ts-2 AGGCGGCCGATTAAGTCAGGTGTGAAAGGCTGCGGCTCAACCGCAGGGCGGCACCTGAAA
tv1-2 AGGCGGCTGATTAAGTCAGGTGTGAAAGGCTGCGGCTCAACCGCAGAGCGGCACCTGAAA
tv15734 AGGCGGTCATTTAAGTCAGGTGTGAAAGGCTGCGGCTCAACCGCAGAGCGGCACCTGAAA

ts-2 CTGGTCGGCTTGAGTGCAGGAGAGGGGAGTGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGTA
tv1-2 CTGGTCAGCTTGAGTGCAGGAGAGGGGAGCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGTA
tv15734 CTGGATGACTTGAGTGCAGGAGAGGAGAGCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGTA

ts-2 GAGATCGGGAGGAACACCAGTGGGGAAGGCGGCTCTCTGGCCTGTAAGTACGCTGAGGC
tv1-2 GAGATCGGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGCCTGTAAGTACGCTGAGGC
tv15734 GAGATCGGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGCCTGTTTCTGACGCTGAGGC

ts-2 GCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGA
tv1-2 GCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGA
tv15734 GCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGA

ts-2 GTGCTAGGTGTTGGGGGG-TTCCCC--CTCAGTGCCGAAGGTAACCCATTAAGCACTC
tv1-2 GTGCTAGGTGTTGGGGGGCTACGCC--CTCAGTGCCGAAGGTAACCCATTAAGCACTC
tv15734 GTGCTAGGTGTCGGGGGG-TCCTACC--CTCGGTGCCGAAGGTAACCCATTAAGCACTC

ts-2 CGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAG
tv1-2 CGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAG
tv15734 CGCCTGGGGAGTACGGCCGCGAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAG

```

ts-2          CGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGGCTTGACATCC
tv1-2        CGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGGCTTGACATCC
tv15734      CGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGGCTTGACATCC
*****

ts-2          CGCTGACCGCTCCAGGGATGGAGCCTCCCTTCGGGGCAGCGGTGACAGGTGGTGCATGGT
tv1-2        CGCTGACCCCTCCAGAGATGGAGGTTCCCTTCGGGACAGCGGTGACAGGTGGTGCATGGT
tv15734      CGCTGACCGCTCCAGAGATGGAGCTTCCCTTCGGGGCAGCGGTGACAGGTGGTGCATGGT
***** * *****

ts-2          TGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTTCAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTTATC
tv1-2        TGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTTCAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTTATC
tv15734      TGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTTCAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTTATC
***** **

ts-2          GCCAGTTGCCAGCATTTTCG-GATGGGCCTCTGGCGAGACAGCCGGTG-AAAGCCGGAGG
tv1-2        GTTAGTTGCCAGCATTTTCG-GATGGGCCTCTAACGAGACAGCCGGTG-AAAGCCGGAGG
tv15734      GCTAGTTGCCAGCA-TTCA-GTTGGGCCTCTAGCGAGACAGCCGGTG-AAAGCCGGAGG
* ***** ** * *****

ts-2          AAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGTCCTGGGCTACACACGTGCTACA
tv1-2        AAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGTCCTGGGCTACACACGTGCTACA
tv15734      AAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGTCCTGGGCTACACACGTGCTACA
*****

ts-2          ATGGCCAGTACAAAGGGAAGCGAACCCGCGAGGGGGAGCCAATCCCAAAAACCTGGTCTC
tv1-2        ATGGCTGGTACAAAGGCGAGCGAACCCGCGAGGGGGAGCCAATCCCAAAAAGCCAGTCTC
tv15734      ATGGCCGGTACAATGGGTCGCCAACCCGCGAGGGGGAGCTAATCCCAAAAACCGGTCTC
***** ***** ** ** *****

ts-2          AGTTCGGATCGCAGGCTGCAACTCGCCTGCGTGAAGCCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGAT
tv1-2        AGTTCGGATCGCAGGCTGCAACTCGCCTGCGTGAAGCCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGAT
tv15734      AGTTCGGATCGCAGGCTGCAACTCGCCTGCGTGAAGCCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGAT
*****

ts-2          CAG
tv1-2        CAG
tv15734      CAG
***

```

Figure 4 : Alignement multiple des séquences d'ADNr 16S de *Thermoactinomyces vulgaris* 15734 et 43649/1 ainsi que *T. sacchari* 27349. ts-2 = *Thermoactinomyces sacchari* 27349; tv1-2 = *Thermoactinomyces vulgaris* 43649/1; tv15734 = *Thermoactinomyces vulgaris* 15734. L'alignement optimal a été calculé et obtenu à l'aide du programme « pileup » de GCG (9.1) et représenté par le logiciel CLUSTAL X (1.64b). Le symbole « * » indique les nucléotides conservés dans la comparaison des souches alors que les séquences soulignées sont les oligonucléotides ayant servi à reconfirmer les séquences.

4.3 Analyses génétiques des diverses souches d'actinomycètes thermophiles

4.3.1 Amplification et purification des séquences d'ADNr 16S des actinomycètes thermophiles

L'ADNr 16S amplifié par la PCR donne parfois plus d'un produit d'amplification (**figure 5**). De façon à uniformiser les résultats ultérieurs, une purification des produits PCR multiples sur gel d'agarose est effectuée, tant dans le cas des souches environnementales que pour celles provenant d'ATCC. La **figure 6** montre la qualité de la purification obtenue à partir d'échantillons environnementaux ayant plus d'une bande suite à la PCR.

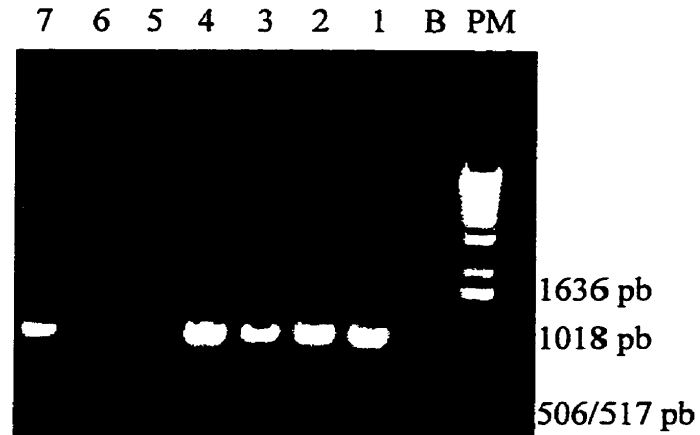


Figure 5 : Vérification des amplifications de l'ADNr 16S obtenues par la PCR des actinomycètes thermophiles ATCC sur gel d'agarose 1%. PM : marqueur de poids moléculaire; B : PCR sans ADN (blanc); lignes 1 à 3 : *Saccharopolyspora rectivirgula*, souches 15734, 29034 et 33515; lignes 4 à 6 : *Saccharomonospora viridis*, souches 15386, 15735 et 15736; ligne 7 : *Thermoactinomyces sacchari*, souche 27349.

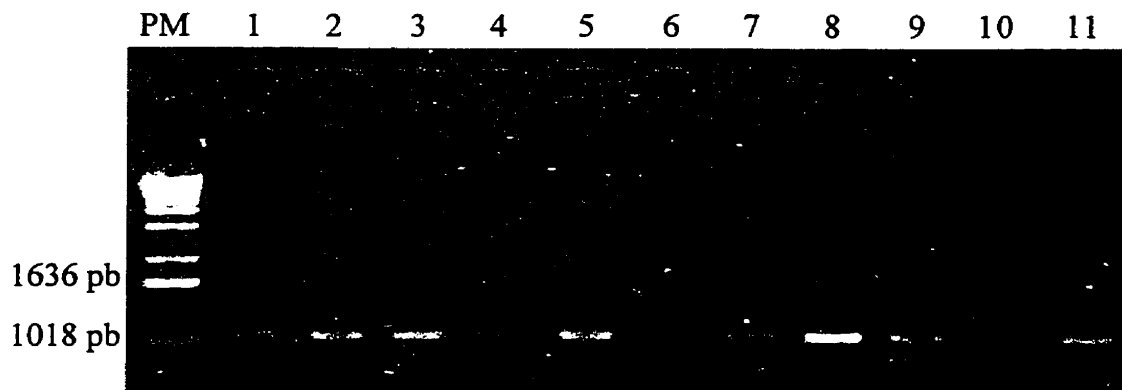


Figure 6 : Purification par "QIAquick gel extraction kit" des ADNr 16S amplifiés des actinomycètes thermophiles en provenance de l'environnement sur gel d'agarose 1%. PM : marqueur de poids moléculaire; lignes 1 à 11 inclusivement: PCR des souches d'actinomycètes environnementaux purifiées (souches # N-14, N-37, N-44, N-57, N-75, N-61, T-15, T-28, T-40, T-45 et N-14)

4.3.2 Analyse des patrons de restriction de l'ADNr 16S amplifié pour les souches en provenance d'ATCC

Afin de vérifier si au moins 2 microorganismes sont similaires ou non, l'utilisation d'enzymes de restriction générant des coupures à des sites précis sur l'ADN de ces microorganismes s'avère être un moyen simple et rapide pour différencier ceux-ci tout en ne requérant que peu d'ADN amplifié sur une courte longueur de pb. Parmi la panoplie d'enzymes employées, plusieurs n'avaient pas de site de restriction dans la partie d'ADNr 16S amplifié des actinomycètes ATCC, notamment *AccI*, *BamHI*, *DpnI*, *HindIII*, *MluI*, *PstI*, *PvuII*, et *XhoI*. Par ailleurs, d'autres enzymes donnaient des longueurs de fragments de restriction non conservées chez les diverses souches d'une espèce donnée (*AluI*, *AvaI*, *BsmFI*, *DdeI*, *FokI* et *MseI*). D'autres fois encore, les patrons obtenus ne permettaient pas la discrimination entre certaines de ces espèces (*EcoRI*, *HinfI*, *RsaI* et *Sau96I*). Parfois même, le nombre de fragment obtenu était trop élevé pour permettre une différenciation (*BanII*, *BssKI* et *EcoRII*). Cependant, la multitude d'enzymes connues fait en sorte que les chances de ne pas trouver au moins une enzyme discriminante sont faibles.

4.3.2.1 Discrimination entre *Saccharopolyspora* et *Saccharomonospora*

La digestion du fragment amplifié des souches de *Saccharomonospora* et de *Saccharopolyspora* avec *Taq^αI* (coupe à : T \oplus CGA) permet de différencier ces espèces l'une de l'autre. La **figure 7** montre la différence entre les patrons de restriction de ces espèces et la conservation des patrons entre les autres souches soit les *Thermoactinomyces* sp.. Les thermoactinomycètes pour leur part sont conservés dans leurs sites de restriction lorsque l'enzyme *Taq^αI* est employée; c'est pourquoi, pour ces souches, l'utilisation d'une autre enzyme de restriction soit *HhaI* (coupe à : GCG \oplus C) s'avère nécessaire afin de les discriminer (**figure 8**).

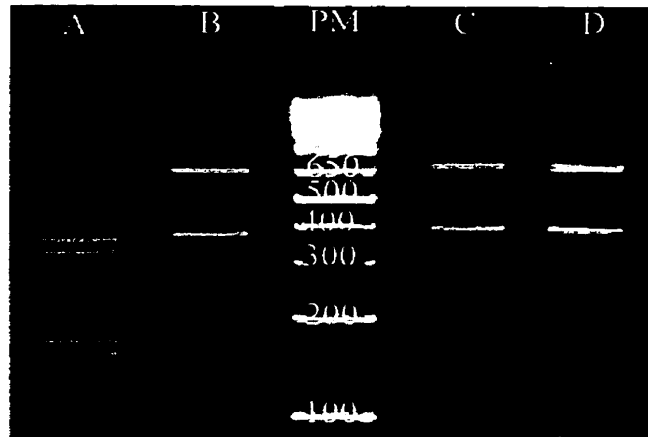


Figure 7 : Représentation schématique de la digestion enzymatique avec *Taq*^αI des gènes codant pour l'ARNr 16S des actinomycètes thermophiles ATCC. A : *Saccharopolyspora rectivirgula* (359, 327, 176 et 160 pb); B : *Saccharomonospora viridis* (659 et 359 pb); PM : marqueur de poids moléculaire; C : *Thermoactinomyces sacchari* (678 et 399 pb); D : *T. vulgaris* (654-679 et 399 pb). Voir gel original en annexe F, figure 23.

4.3.2.2 Discrimination entre *Thermoactinomyces sacchari* et *T. vulgaris*

À l'aide de l'enzyme *HhaI*, il est possible de différencier les 2 espèces de *Thermoactinomyces* avec 3 patrons de bandes différents (**figure 8**); la souche type de *T. vulgaris* étant considérée comme unique. Par le fait même, il est également possible de faire la différence entre *Saccharopolyspora rectivirgula* et *Saccharomonospora viridis* souche 15386. Toutefois, entre les autres souches de *S. viridis* (**figure 8**, échantillon B1) et celles de *S. rectivirgula*, la similitude des patrons de restriction de plus de 200 pb est plus élevée et l'utilisation de l'enzyme *Taq^oI* se révèle être presque inévitable pour faire la distinction entre ces deux espèces.

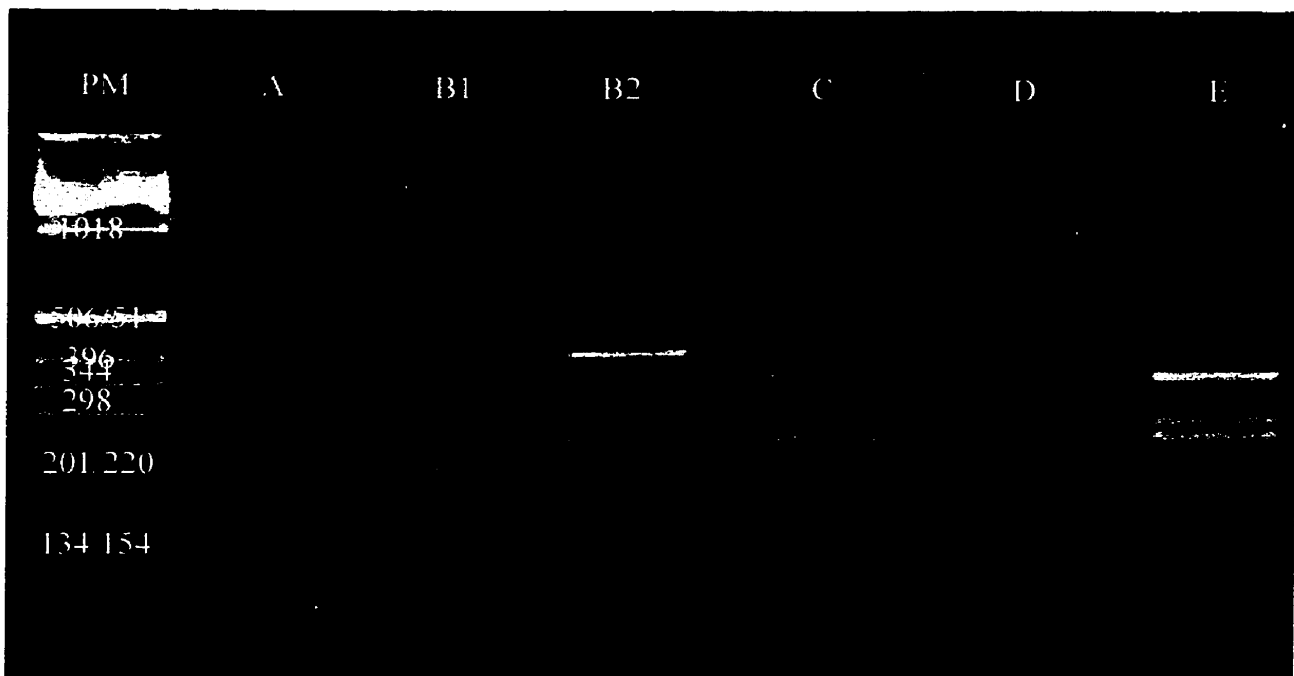


Figure 8 : Représentation schématique de la digestion enzymatique avec *HhaI* des gènes codant pour l'ARNr 16S des actinomycètes thermophiles ATCC. PM : marqueur de poids moléculaire; A : *Saccharopolyspora rectivirgula*, souches 15347, 29034 et 33515 (312, 254, 230, 125 et 71 pb); B1 : *Saccharomonospora viridis*, souches 15735 et 15736 (300, 254, 230, 125 et 89 pb); B2 : *Saccharomonospora viridis*, souche 15386 (397, 254, 230 et 125 pb); C : *Thermoactinomyces sacchari*, souches 27349, 27375 et 27376 (344, 252, 198 et 182 pb); D : *T. vulgaris*, souche 43649 (345, 299, 252 et 182 pb); E : *T. vulgaris*, souches 15733, 15734 et 21364 (344, 271, 251 et 182 pb). Voir gel original en annexe F, figure 24.

4.3.3 Analyse schématique des patrons de restriction obtenus avec *Taq*^αI et *Hha*I sur les souches provenant des 17 scieries québécoises

L'ADN des souches environnementales a été digéré en parallèle avec *Taq*^αI et avec *Hha*I. Les limites imposées par le matériel expérimental ont fait en sorte que les figures impaires (**figures 9, 11, 13, 15, 17, 19 et 21**) correspondent aux ADN digérés avec *Taq*^αI alors que les figures paires (**figures 10, 12, 14, 16, 18, 20 et 22**) correspondent à ces mêmes ADN mais digérés cette fois-ci avec *Hha*I. Le **tableau V** présente un résumé écrit des diverses longueurs des fragments de restriction obtenus pour les actinomycètes provenant de l'ATCC alors que le **tableau VI** présente les longueurs des fragments de restriction obtenus pour les actinomycètes issus de l'environnement et ce, avec les 2 enzymes utilisées. L'**annexe F (figures 23 à 38)**, pour sa part, montre les gels originaux des digestions enzymatiques des ADNr 16S des actinomycètes ATCC et en provenance de l'environnement qui ont servi à effectuer la représentation schématique réalisée à l'aide du logiciel Adobe® Photoshop® (4.0.1). Plusieurs ADN de souches environnementales, notamment N-7, N-11, N-34, N-39, N-40, N-56, T-3, T-13, T-19, T-21 et T-56 ont donné avec *Taq*^αI un patron de restriction identique à celui de *S. viridis* alors qu'à l'aide de *Hha*I, les patrons obtenus étaient différents de cet organisme. Ceci indique la possibilité d'obtenir des faux positifs de *Saccharomonospora viridis* avec la digestion avec *Taq*^αI. Toutefois, les essais réalisés avec les 2 enzymes éliminent cette possibilité. À l'aide de ces digestions subséquentes, sur l'ADN des 50 souches environnementales d'actinomycètes, 15 souches de *Thermoactinomyces vulgaris*, 8 souches de *Saccharopolyspora rectivirgula*, 2 souches de *Saccharomonospora viridis* et 1 souche de *T. sacchari* ont été repérées.

Dans les représentations schématiques, la digestion avec *Hha*I permet de bien faire la différence entre les souches de *Thermoactinomyces*. Lorsque la digestion de l'ADN de ces mêmes souches est effectuée avec l'enzyme *Taq*^αI, le patron de restriction obtenu est commun pour tous les *Thermoactinomyces* et l'échantillon est alors appelé « T » pour *Thermoactinomyces* sp.. Dans le cas où l'identification peut être plus précise, l'échantillon porte un nom plus détaillé et si un patron de restriction ne correspond pas à ceux attendus, celui-ci est appelé « AU » pour autre. Finalement, les longueurs de fragments de restriction inférieures à 90 pb n'ont pas été

considérées lors la discrimination des souches tant environnementales que chez celles provenant d'ATCC.

Tableau V : Longueurs théoriques des fragments de restriction générés par *Taq*^αI et *Hha*I calculées à partir des séquences nucléotidiques connues des actinomycètes thermophiles pouvant induire l'AAE.

| Souches et No accession GeneBank | Longueurs des fragments nucléotidiques (pb) générés par** | |
|-------------------------------------|---|---------------------------|
| | <i>Hha</i> I | <i>Taq</i> ^α I |
| SR 33515 X53194 | 312, 254, 230, 125, 87 et 54 | 359, 327, 176 et 160 |
| SV 15386 Z38021* | 396, 254, 230, 125 et 53 | 659, 359 et 40 |
| TS 27349 AF089890 | 344, 252, 198, 182, 97, 2 et 2 | 678 et 399 |
| TV 43649/1 AF089891 | 345, 299, 252 et 182 | 679 et 399 |
| TV 15734 AF089892 | 344, 271, 251, 182, 2 et 2 | 654 et 398 |

* La digestion des souches ATCC SV 15735 et SV 15736 avec *Hha*I (**figure 8**) démontre la présence d'un site de restriction supplémentaire générant des fragments de 300, 254, 230, 125, 96 et 53 pb.

** Les longueurs sont calculées à l'aide du logiciel « mapsort » de GCG (9.1).

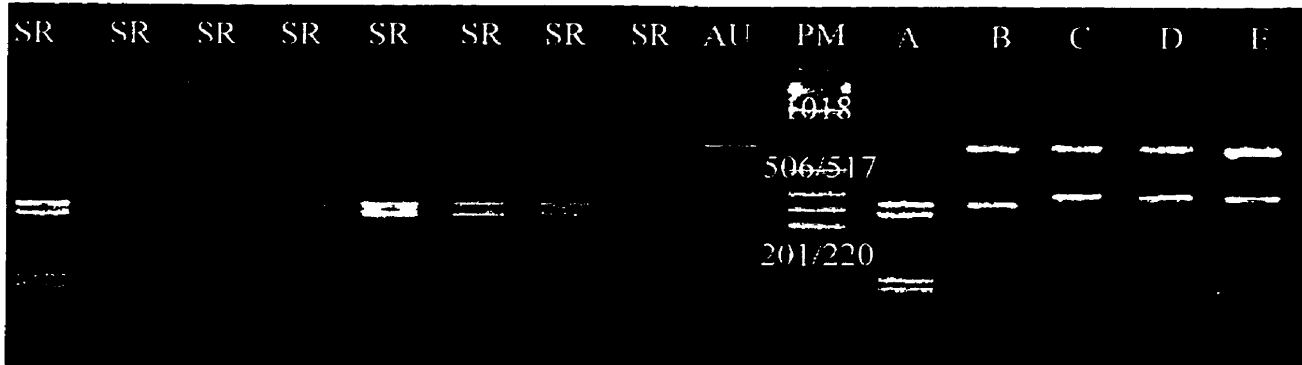


Figure 9 : Représentation schématique de la digestion enzymatique avec *Taq*^qI des gènes codant pour l'ARNr 16S des souches d'actinomycètes ATCC et environnementales. SR : idem à *Saccharopolyspora rectivirgula* (souches # N-27, N-37, N-49, N-64, T-8, T-15, T-20 et T-40); AU : autre (souche # N-7 (voir digestion avec *Hha*I à la figure 10)); PM : marqueur de poids moléculaire; A : *Saccharopolyspora rectivirgula*; B : *Saccharomonospora viridis*, souches 15735 et 15736; C : *Thermoactinomyces sacchari*; D : *T. vulgaris*, souche 43649; E : *T. vulgaris*, souches 15733, 15734 et 21364. Voir gel original en annexe F, figure 25.

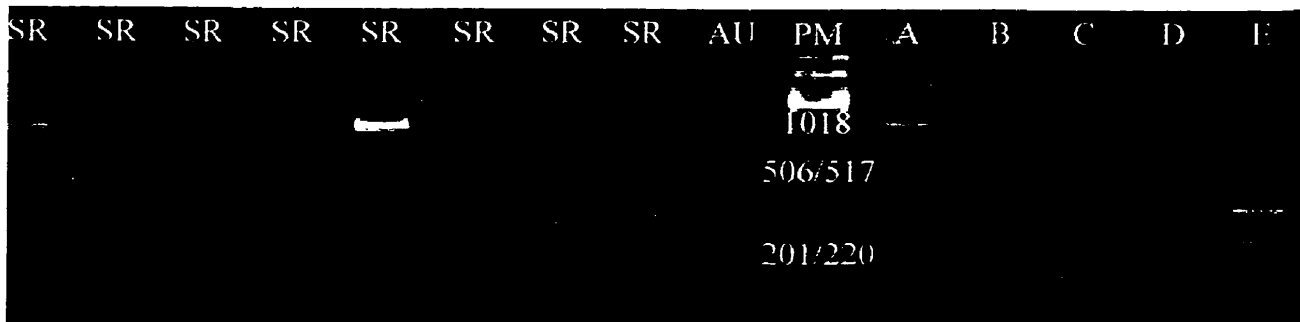


Figure 10 : Représentation schématique de la digestion enzymatique avec *Hha*I des gènes codant pour l'ARNr 16S des souches d'actinomycètes ATCC et environnementales. SR : idem à *Saccharopolyspora rectivirgula* (souches # N-27, N-37, N-49, N-64, T-8, T-15, T-20 et T-40); AU : autre (souche # N-7); PM : marqueur de poids moléculaire; A : *Saccharopolyspora rectivirgula*; B : *Saccharomonospora viridis*, souches 15735 et 15736; C : *Thermoactinomyces sacchari*; D : *T. vulgaris*, souche 43649; E : *T. vulgaris*, souches 15733, 15734 et 21364. Voir gel original en annexe F, figure 26.



Figure 11 : Représentation schématique de la digestion enzymatique avec *Taq*^{HI} des gènes codant pour l'ARNr 16S des souches d'actinomycètes ATCC et environnementales. PM: marqueur de poids moléculaire; A: *Saccharopolyspora rectivirgula*; B: *Saccharomonospora viridis*, souches 15735 et 15736; C: *Thermoactinomyces sacchari*; D: *T. vulgaris*, souche 43649; E: *T. vulgaris*, souches 15733, 15734 et 21364; T: idem à *Thermoactinomyces* sp. (souches # N-48, N-58 et N-83); SV: idem à *Saccharomonospora viridis* souche 15386 (souche # T-26 (voir **figure 8**)); AU: autre (souche # T-45). Voir gel original en **annexe F, figure 27**.



Figure 12 : Représentation schématique de la digestion enzymatique avec *Hha*I des gènes codant pour l'ARNr 16S des souches d'actinomycètes ATCC et environnementales. PM: marqueur de poids moléculaire; A: *Saccharopolyspora rectivirgula*; B: *Saccharomonospora viridis*, souches 15735 et 15736; C: *Thermoactinomyces sacchari*; D: *T. vulgaris*, souche 43649; E: *T. vulgaris*, souches 15733, 15734 et 21364; TV1: idem à *Thermoactinomyces vulgaris*, souche 43649 (souches # N-48, N-58 et N-83); SV1: idem à *Saccharomonospora viridis*, souche 15386 (souche # T-26); AU: autre (souche # T-45). Voir gel original en **annexe F, figure 28**.



Figure 13 : Représentation schématique de la digestion enzymatique avec *Taq*^αI des gènes codant pour l'ARNr 16S des souches d'actinomycètes ATCC et environnementales. PM : marqueur de poids moléculaire; AU : autre (souche # T-56 (voir digestion avec *Hha*I à la figure 14)); T : idem à *Thermoactinomyces* sp. (souches # N-18, N-21, N-32, N-38, N-55, N-57, N-60 et N-61); A : *Saccharopolyspora rectivirgula*; B : *Saccharomonospora viridis*, souches 15735 et 15736; C : *Thermoactinomyces sacchari*; D : *T. vulgaris*, souche 43649; E : *T. vulgaris*, souches 15733, 15734 et 21364. Voir gel original en annexe F, figure 29.



Figure 14 : Représentation schématique de la digestion enzymatique avec *Hha*I des gènes codant pour l'ARNr 16S des souches d'actinomycètes ATCC et environnementales. PM : marqueur de poids moléculaire; AU : autre (souche # T-56); TVI : idem à *Thermoactinomyces vulgaris*, souche 43649 (souche # N-18, N-21, N-32, N-38, N-55, N-57, N-60 et N-61); A : *Saccharopolyspora rectivirgula*; B : *Saccharomonospora viridis*, souches 15735 et 15736; C : *Thermoactinomyces sacchari*; D : *T. vulgaris*, souche 43649; E : *T. vulgaris*, souches 15733, 15734 et 21364. Voir gel original en annexe F, figure 30.

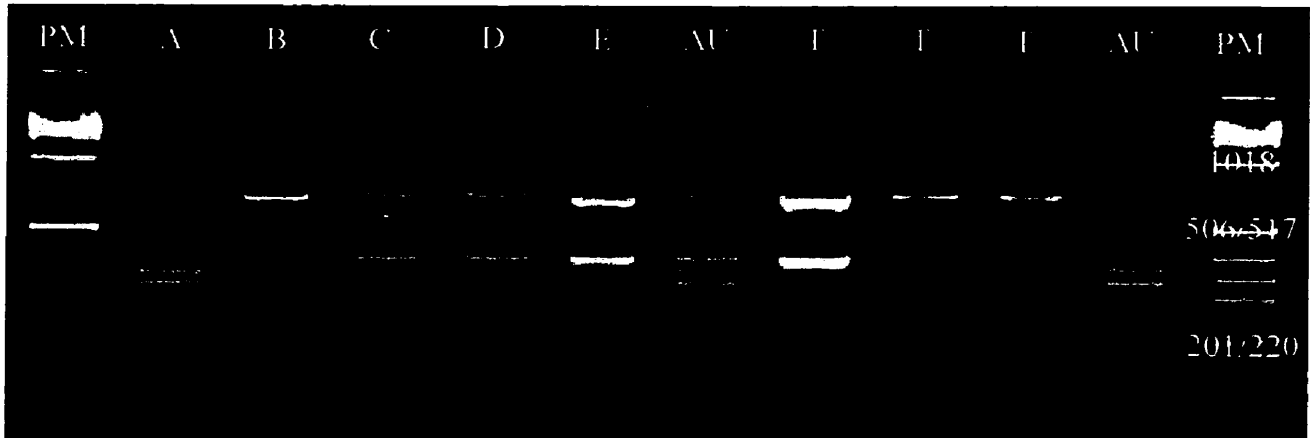


Figure 15 : Représentation schématique de la digestion enzymatique avec *Taq*^αI des gènes codant pour l'ARNr 16S des souches d'actinomycètes ATCC et environnementales. PM : marqueur de poids moléculaire; A : *Saccharopolyspora rectivirgula*; B : *Saccharomonospora viridis*, souches 15735 et 15736; C : *Thermoactinomyces sacchari*; D : *T. vulgaris*, souche 43649; E : *T. vulgaris*, souches 15733, 15734 et 21364; AU : autre (souches # N-62 et T-28); T : idem à *Thermoactinomyces* sp. (souches # N-72, N-78 et T-12). Voir gel original en annexe F, figure 31.

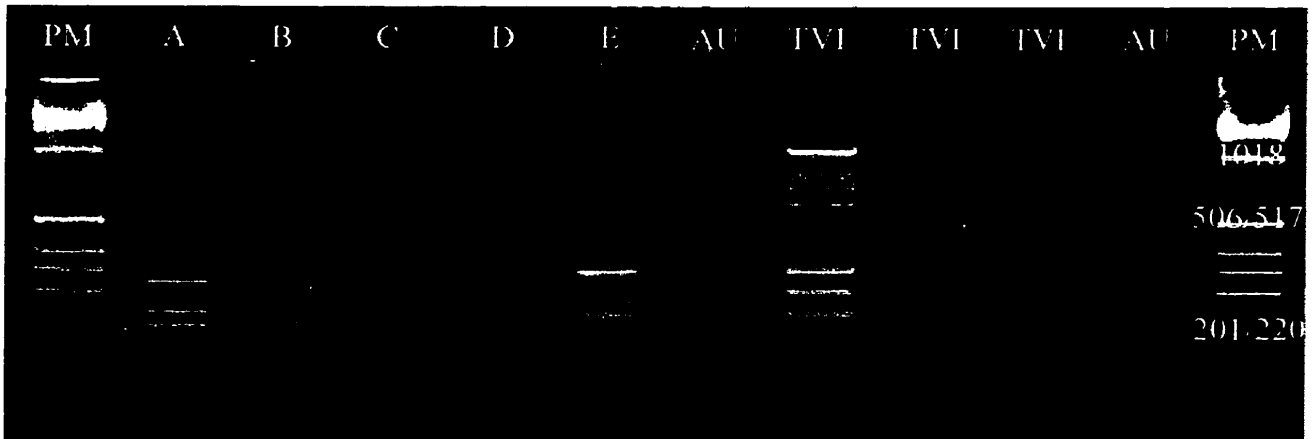


Figure 16 : Représentation schématique de la digestion enzymatique avec *Hha*I des gènes codant pour l'ARNr 16S des souches d'actinomycètes ATCC et environnementales. PM : marqueur de poids moléculaire; A : *Saccharopolyspora rectivirgula*; B : *Saccharomonospora viridis*, souches 15735 et 15736; C : *Thermoactinomyces sacchari*; D : *T. vulgaris*, souche 43649; E : *T. vulgaris*, souches 15733, 15734 et 21364; AU : autre (souches # N-62 et T-28); TV1 : idem à *Thermoactinomyces vulgaris*, souche 43649 (souches # N-72, N-78 et T-12). Voir gel original en annexe F, figure 32.

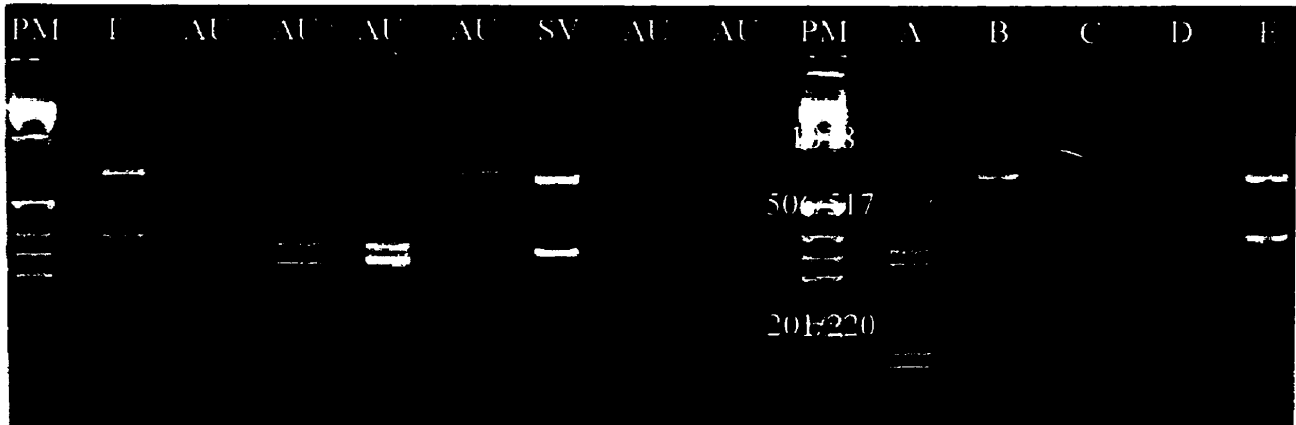


Figure 17 : Représentation schématique de la digestion enzymatique avec *Taq*^αI des gènes codant pour l'ARNr 16S des souches d'actinomycètes ATCC et environnementales. T : idem à *Thermoactinomyces* sp. (souche # T-32); AU : autre (souches # N-11, N-14, N-16, N-34, N-39 et N-40 (voir digestion avec *Hha*I à la figure 18)); SV1 : idem à *Saccharomonospora viridis*, souche 15386 (souche # N-36); PM : marqueur de poids moléculaire; A : *Saccharopolyspora rectivirgula*; B : *Saccharomonospora viridis*, souches 15735 et 15736; C : *Thermoactinomyces sacchari*; D : *T. vulgaris*, souche 43649; E : *T. vulgaris*, souches 15733, 15734 et 21364. Voir gel original en annexe F, figure 33.

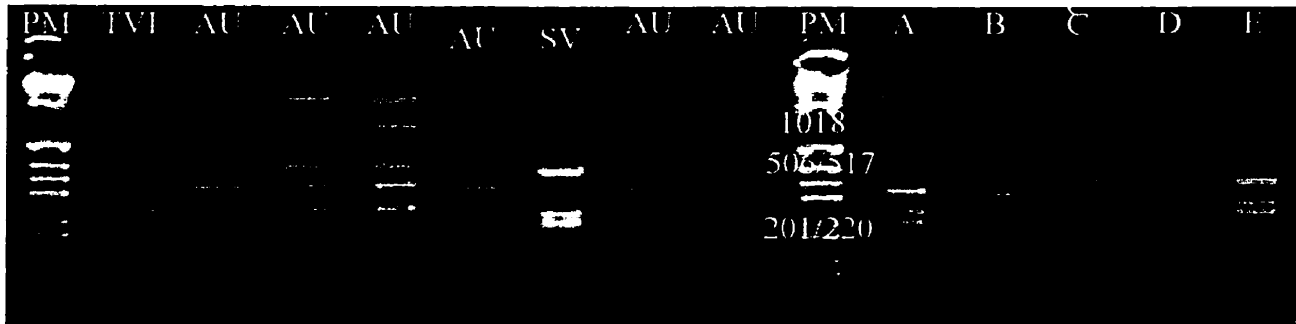


Figure 18 : Représentation schématique de la digestion enzymatique avec *Hha*I des gènes codant pour l'ARNr 16S des souches d'actinomycètes ATCC et environnementales. PM : marqueur de poids moléculaire; TV1 : idem à *Thermoactinomyces vulgaris*, souche 43649 (souches # T-32); AU : autre (souches # N-11, N-14, N-16, N-34, N-39 et N-40); SV1 : idem à *Saccharomonospora viridis*, souche 15386 (souche # N-36); A : *Saccharopolyspora rectivirgula*; B : *Saccharomonospora viridis*, souches 15735 et 15736; C : *Thermoactinomyces sacchari*; D : *T. vulgaris*, souche 43649; E : *T. vulgaris*, souches 15733, 15734 et 21364. Voir gel original en annexe F, figure 34.

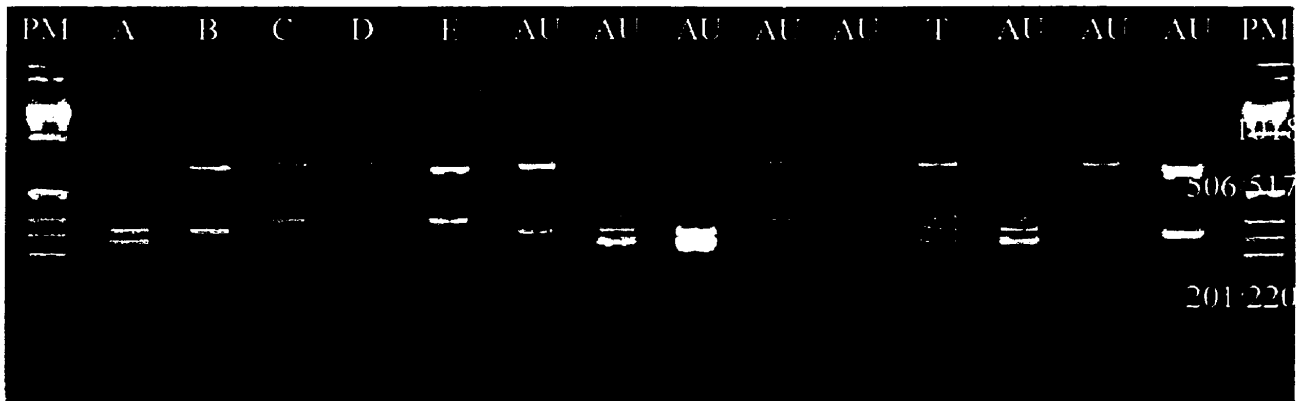


Figure 19 : Représentation schématique de la digestion enzymatique avec *Taq*^oI des gènes codant pour l'ARNr 16S des souches d'actinomycètes ATCC et environnementales. PM : marqueur de poids moléculaire; A : *Saccharopolyspora rectivirgula*; B : *Saccharomonospora viridis*, souches 15735 et 15736; C : *Thermoactinomyces sacchari*; D : *T. vulgaris*, souche 43649; E : *T. vulgaris*, souches 15733, 15734 et 21364; AU : autre (souches # N-56, N-68, N-69, N-75, N-77, N-82, T-3 et T-13 (voir digestion avec *Hha*I à la figure 20)); T : idem à *Thermoactinomyces* sp. (souche # N-79). Voir gel original en annexe F, figure 35.

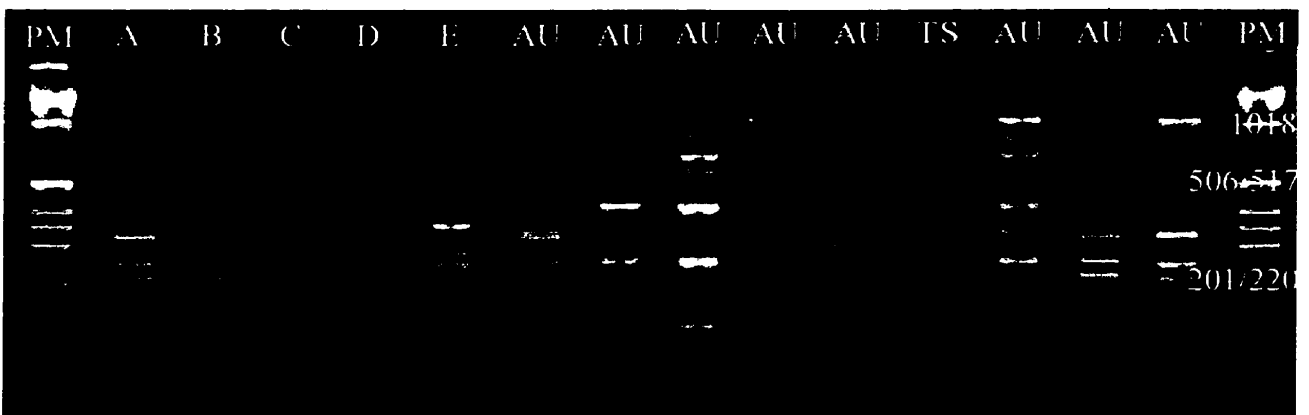


Figure 20 : Représentation schématique de la digestion enzymatique avec *Hha*I des gènes codant pour l'ARNr 16S des souches d'actinomycètes ATCC et environnementales. PM : marqueur de poids moléculaire; A : *Saccharopolyspora rectivirgula*; B : *Saccharomonospora viridis*, souches 15735 et 15736; C : *Thermoactinomyces sacchari*; D : *T. vulgaris*, souche 43649; E : *T. vulgaris*, souches 15733, 15734 et 21364; AU : autre (souches # N-56, N-68, N-69, N-75, N-77, N-82, T-3 et T-13); TS : idem à *Thermoactinomyces* sp. (souche # N-79). Voir gel original en annexe F, figure 36.

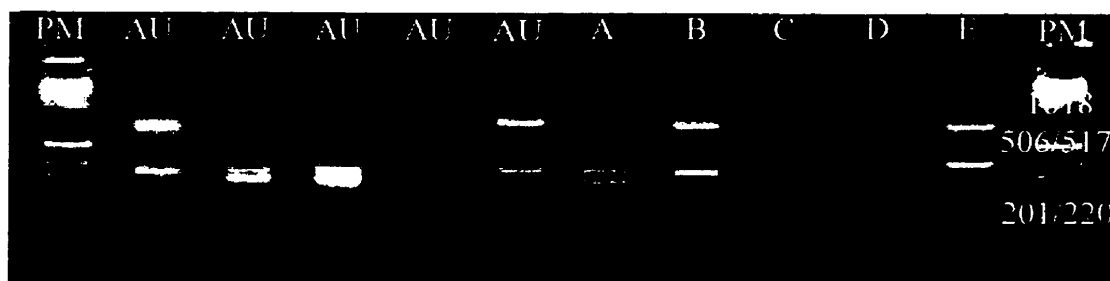


Figure 21 : Représentation schématique de la digestion enzymatique avec *Taq*^{AI} des gènes codant pour l'ARNr 16S des souches d'actinomycètes ATCC et environnementales. PM : marqueur de poids moléculaire; AU : autre (souches # T-21, T-63, T-65, N-9 et T-19 (voir digestion avec *Hha*I à la figure 22)); A : *Saccharopolyspora rectivirgula*; B : *Saccharomonospora viridis*, souches 15735 et 15736; C : *Thermoactinomyces sacchari*; D : *T. vulgaris*, souche 43649; E : *T. vulgaris*, souches 15733, 15734 et 21364. Voir gel original en annexe F, figure 37.

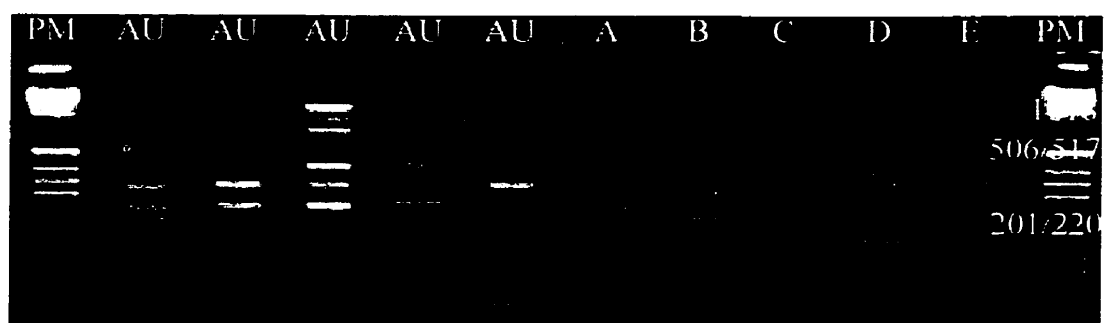


Figure 22 : Représentation schématique de la digestion enzymatique avec *Hha*I des gènes codant pour l'ARNr 16S des souches d'actinomycètes ATCC et environnementales. PM : marqueur de poids moléculaire; AU : autres (souches # T-21, T-63, T-65, N-9 et T-19); A : *Saccharopolyspora rectivirgula*; B : *Saccharomonospora viridis*, souches 15735 et 15736; C : *Thermoactinomyces sacchari*; D : *T. vulgaris*, souche 43649; E : *T. vulgaris*, souches 15733, 15734 et 21364. Voir gel original en annexe F, figure 38.

Tableau VI : Classification des souches d'actinomycètes thermophiles* provenant des 17 scieries québécoises

| Souches environnementales** | Longueurs fragments digérés <i>Taq</i> ^α I (pb) | Longueurs fragments digérés <i>Hha</i> I (pb) | Actinomycète ciblé correspondant |
|---|--|---|---|
| N-27 _{s7} , N-37 _{s2} , N-49 _{s4} , N-64 _{s10} , T-8 _{s6} , T-15 _{s7} , T-20 _{s1} , T-40 _{s10} | 160-176-327-359 | 230-254-312 | <i>Saccharopolyspora rektivirgula</i> |
| N-18 _{s6} , N-21 _{s6} , N-32 _{s1} , N-38 _{s2} , N-48 _{s4} , N-55 _{s9} , N-57 _{s9} , N-58 _{s9} , N-60 _{s10} , N-61 _{s10} , N-72 _{s13} , N-78 _{s15} , N-83 _{s17} , T-12 _{s6} , T-32 _{s4} | 399-679 | 182-252-299-345 | <i>Thermoactinomyces vulgaris</i> souche 43649 |
| N-36 _{s2} , T-26 _{s1} | 359-659 | 125-230-254-396 | <i>Saccharomonospora viridis</i> souche 15386 |
| N-79 _{s15} | 399-678 | 182-198-252-344 | <i>Thermoactinomyces sacchari</i> |
| N-7 _{s5} , N-11 _{s5} , N-34 _{s2} , N-39 _{s2} , N-40 _{s2} , N-56 _{s9} , T-3 _{s5} , T-13 _{s6} , T-19 _{s7} , T-21 _{s1} | 359-659 | 230-254-334 | Autre |
| T-56 _{s14} *** | 359-659 | 230-254-334 | Autre |
| N-68 _{s11} , N-69 _{s13} | 327-359-398-659 | 90-160-252-425 | Autre |
| N-62 _{s10} | 210-325-362-399-679 | 160-190-260-344 | Autre |
| N-82 _{s17} , T-63 _{s16} , T-65 _{s17} | 327-359 | 165-176-252-344 | Autre |
| T-28 _{s3} | 327-359 | 201-270-425 | Autre |
| N-14 _{s5} , N-16 _{s5} | 327-359 | 160-185-254-334-397 | Autre |
| T-45 _{s11} | 327-359 | 230-254-327 | Autre |
| N-75 _{s14} | 327-399-659 | 182-252-299-345-425 | Autre |
| N-77 _{s15} | 185-399-500 | 182-252-299-345 | Autre |
| N-9 _{s5} | 327-359 | 125-170-271-425 | Autre |

* souches environnementales qui ont été cultivables puis amplifiées par la PCR

** s(x) : scierie no x.³⁷

*** souche morphologiquement différente mais génétiquement identique à N-7, N-11, N-34, N-39, N-40, N-56, T-3, T-13, T-19 et T-21

CHAPITRE 5

DISCUSSION

Le besoin de posséder des tests d'identification pour des bactéries pouvant être nuisibles à la santé se veut une réalité grandissante. En effet, afin d'établir la dose-réponse, d'optimiser le traitement, de prévenir et de prodiguer les meilleurs soins dans des délais raisonnables, de nouvelles méthodes, applications et technologies doivent impérativement voir le jour de manière à mieux répondre à cette nécessité. C'est pourquoi des applications cliniques basées sur des éléments conservés chez les espèces comme l'utilisation de l'ADN sont mises au point pour répondre à ces besoins. Plusieurs agents pathogènes tels des *Corynebacterium*,⁹⁰ *Mycobacterium*⁹¹⁻⁹³ et *Clostridium*,⁴ de même que certains actinomycètes^{94; 95} et bacilles⁹⁶ sont précisément visés par le développement de méthodes d'identification rapides et précises. Jusqu'à tout récemment, les méthodes traditionnelles pour détecter et identifier des microorganismes pouvant être malsains pour l'homme impliquaient uniquement des essais de culture, des essais biochimiques ainsi que des essais immunologiques; tous trois basés sur la caractérisation phénotypique.⁹⁷ Il fallait, de plus, compter plusieurs jours et de nombreux repiquages des souches avant d'obtenir les résultats escomptés. Depuis que la biologie moléculaire a fait son apparition, vers le début des années 1980, les tests de routine commencent lentement à être remplacés par les techniques moléculaires.⁹⁸⁻¹⁰⁰ D'ailleurs, plus les connaissances dans ce domaine progressent, plus les gens oeuvrant en laboratoire médical se tournent vers cette technologie de pointe. Cependant, il ne faut pas perdre de vue que des tests de culture et biochimiques de base seront toujours un bon complément à l'identification de certains microorganismes sur lesquels peu ou pas d'informations génétiques sont disponibles.

Le but de la présente étude consistait à identifier, parmi des souches environnementales d'actinomycètes thermophiles isolées en culture pure, les individus susceptibles d'occasionner l'AAE. Afin d'y parvenir, des tests moléculaires ont été mis au point à l'aide de souches connues d'actinomycètes (sur lesquelles des tests biochimiques ont préalablement été effectués) puis ils ont été appliqués à des souches isolées de l'environnement.

Les tests biochimiques sont généralement utilisés afin de mieux connaître un microorganisme cible; ils permettent soit de caractériser une souche ou bien de l'identifier. Dans le cas présent, ils ont été employés pour tenter de différencier les actinomycètes thermophiles ATCC les uns des autres. Toutefois, appliqués à ces derniers, certains tests se sont révélés inutilisables en raison de l'unanimité de la réponse des souches. Les résultats obtenus démontrent également que l'utilisation des essais biochimiques nécessite plusieurs jours voir plusieurs semaines avant qu'un résultat interprétable ne puisse être obtenu. De plus, il n'y a pas un test plus qu'un autre qui ait un réel pouvoir discriminant sur les souches ATCC d'actinomycètes thermophiles; c'est pourquoi on doit utiliser une combinaison de plusieurs tests afin d'arriver à les discriminer.

Visuellement, il est possible de reconnaître certains actinomycètes ciblés tels *S. rectivirgula* avec sa couleur orangée particulière, *T. sacchari* avec l'autolyse rapide de ses colonies ou encore *T. vulgaris* 43649 avec son abondance de mycélium blanc très facile à essaimer. Toutefois, dans ce dernier cas, il faut être prudent car beaucoup des actinomycètes environnementaux isolés et étudiés des scieries produisaient du mycélium blanc. La vitesse de croissance des souches n'étant pas nécessairement la même d'un individu à l'autre en raison de divers facteurs tel le nombre de cellulesensemencées au départ, le développement de 2 souches similaires peut ne pas s'effectuer à vitesse constante et l'apparence de ces souches pourra, à ce moment, sembler différente. C'est pourquoi, l'utilisation d'éléments conservés comme l'ADNr 16S se révèle très utile pour « lever le doute » pouvant exister avec une souche environnementale donnée.

On a tendance à penser que chaque organisme morphologiquement différent est génétiquement différent et que chaque organisme morphologiquement similaire est génétiquement analogue. Toutefois ceci n'est malheureusement pas toujours vrai. Dans le cas présent, l'essai au hasard de diverses enzymes de restriction coupant généralement de 4 à 5 pb, tout au plus 6 pb, ne s'est pas révélé être la méthode idéale afin de discriminer les souches d'actinomycètes thermophiles ATCC. Certaines de ces souches étaient trop semblables génétiquement, spécialement *T. sacchari* et *T. vulgaris* 43649, alors que d'autres devant être

identiques ne l'étaient pas (*T. vulgaris* 43649 versus *T. vulgaris* 15733, 15734 et 21364). C'est pourquoi le séquençage d'une souche de *Thermoactinomyces sacchari* et de 2 souches de *T. vulgaris* a finalement permis de trouver 2 enzymes discriminantes et conservées parmi toutes les souches ATCC d'actinomycètes thermophiles soit *Taq*^αI et *Hha*I.

Dans le présent essai, le test moléculaire employé a servi à mettre en évidence une partie de tout le potentiel relié à l'utilisation de l'ADNr 16S amplifié. En effet, la combinaison des 2 enzymes de restriction (*Taq*^αI et *Hha*I) a permis de bien cerner, dans un échantillon d'ADN issu de souches d'actinomycètes thermophiles en provenance de l'environnement, quelles souches font parties des 4 espèces d'actinomycètes pouvant être impliquées dans l'AAE. Les tests biochimiques pour leur part ont plutôt mis en évidence la variabilité intra-souche pouvant exister parmi une espèce donnée, ceci n'assurant pas nécessairement une bonne identification des souches à l'étude.

Certaines hypothèses veulent que les microorganismes récupérés dans un échantillon environnemental donné ne représentent qu'une faible proportion (usuellement moins de 1%) des organismes réels contenus dans cet environnement.^{101; 102} On a longtemps supposé que l'utilisation des méthodes traditionnelles (tests biochimiques, chromatographies en phases gazeuses ou liquides des chaînes courtes d'acides gras...) était suffisante pour donner assez d'informations sur une souche bactérienne donnée. Cependant l'avènement de la biologie moléculaire a révolutionné cet adage. Plusieurs remaniements dans le genre de certains microorganismes ont d'ailleurs été effectués en réponse à ce vent nouveau.¹⁰³⁻¹⁰⁵ Les tests conventionnels, utilisés pour l'identification bactérienne, peuvent fréquemment résulter en identifications erronées ou encore, sous-estimer la diversité parmi un genre donné.¹⁰⁶ Par exemple, pour les actinomycètes thermophiles impliqués dans l'AAE, plusieurs auteurs ayant effectué des tests biochimiques sur les souches ont obtenu des résultats souvent contradictoires, le présent ouvrage inclus.^{45; 54; 63; 64; 79; 107; 108} Il existe notamment plusieurs hypothèses possibles pouvant expliquer un tel fait : 1- d'un laboratoire à l'autre, les tests biochimiques n'ont pas été fait nécessairement de façon standard; 2- l'utilisation de milieux de culture légèrement différents peut résulter en un produit final différent (la morphologie pouvant alors varier avec la composition du milieu)⁵⁸ et 3- dépendamment de l'âge des cultures ou du nombre de repiquages

subis, des variations entre des souches identiques peuvent apparaître en réponse à la variabilité intra-souche des espèces.

Grâce à la biologie moléculaire, plusieurs alternatives sont maintenant possibles pour sélectionner un individu préférentiellement à un autre et ce, dans un délai de quelques jours seulement à comparer à quelques semaines avec les méthodes traditionnelles. En réponse aux coûts élevés et aux difficultés techniques d'analyses de réassociations d'ADN, diverses alternatives ont été proposées dont entre autre : patrons électrophorétiques des protéines et des isoenzymes, RFLP, analyses des fragments de restriction à basse fréquence et séquençage partiel de l'ARN ribosomal.¹⁰⁹ Ces nouvelles méthodologies, faisant parfois appel à l'utilisation de la PCR, se sont révélées être sensibles, rapides, et moins laborieuses que les méthodes biochimiques traditionnelles.⁹² La PCR est en effet une technologie couramment utilisée car elle ne requiert pas nécessairement une haute qualité d'ADN pour être réussit.^{110; 111} On peut très aisément amplifier n'importe quelle séquence, du moment où l'assise des amorces utilisées est présente dans l'échantillon. Au lieu d'utiliser l'ADN génomique comme produit de départ pour la PCR, une réaction effectuée avec l'ARNr comme produit de départ et faisant appel à l'emploi de la transcriptase inverse combinée à la PCR (RT-PCR) est possible. Toutefois, en raison de difficulté d'obtention d'ARNr intact des bactéries (les bactéries sont notoirement riches en RNAses), la qualité de l'ARNr peut varier significativement résultant en fluctuations considérables de la quantité d'informations obtenues sur les séquences. C'est pourquoi l'utilisation de l'ADN est préférable pour la PCR car ce dernier est plus facile à obtenir et des quantités minimales sont suffisantes pour les réactions d'amplification.^{112; 113}

Ordinairement, un seul produit d'amplification est obtenu dans les essais de PCR mais il se peut que des molécules chimériques soient générées lorsqu'un fragment d'ADN d'un gène s'apparie avec un patron homologue de la même séquence lors du cycle de synthèse d'ADN subséquent.¹¹⁴ Lorsque des produits d'amplification additionnels sont observés, le gène de l'ADNr 16S recherché est généralement identifié par la longueur du fragment désiré. Le produit de la PCR est par la suite purifié sur gel d'agarose de façon à ne recueillir que l'ADN de bon poids moléculaire pour les analyses ultérieures. Expérimentalement, plusieurs des souches d'actinomycètes thermophiles employées (environ 50 à 60%) ont démontré des patrons de

bandes secondaires avec la PCR (**figure 5**). C'est pourquoi la bande d'intérêt chez ces souches a préalablement été purifiée avant que les digestions enzymatiques ne soient effectuées.

La méthode préconisée ici pour l'identification rapide des actinomycètes thermophiles impliqués dans l'AAE est appelée ARDRA^{90; 93; 115; 116} mais elle peut également être appelée RFLP^{109; 117} et analyse aléatoire de la PCR (PRA).^{92; 95} ARDRA est une méthode hautement reproductible dont les applications techniques permettent entre autre de différencier les microorganismes à un niveau génotypique. Les patrons de bandes obtenus suite à une digestion enzymatique sont simples, c'est-à-dire qu'ils comportent généralement moins de 10 fragments de restriction. Les applications subséquentes sont également très diverses du fait que les amorces utilisées sont complémentaires à des régions bien conservées dans l'ADNr 16S du génome des procaryotes.¹¹⁵ Virtuellement, n'importe quel taxon des eubactéries peut être sujet à des études menées avec ARDRA. Les problèmes techniques inhérents à cette méthode sont limités; l'extraction d'ADN avant d'effectuer la PCR peut facilement être simplifiée, dans la mesure du possible, en raison de la grande spécificité du PCR.

Toutefois, la présence de certains actinomycètes thermophiles résistants au lysozyme a amené l'ajout d'étapes supplémentaires de sonication ainsi que des cycles de congélation / décongélation qui ont dû être effectuées sur les souches tant environnementales que commerciales pour parvenir à les lyser. Le lysozyme a été employé comme agent aidant à la lyse préférentiellement à d'autres agents tel le lysostaphin car il est de routine plus employé avec les actinomycètes^{82; 88} et son pouvoir d'action est connu sur les souches thermophiles ATCC étudiées.^{52; 59; 64} D'autres tests plus simples auraient pu être essayés afin de lyser les cellules, tel bouillir / congeler / bouillir les cellules, mais comme le protocole avait déjà été commencé avec le lysozyme, en vue d'uniformiser les tests, il s'est continué de la même façon qu'au départ. Malgré tout, l'ADN obtenu avec l'utilisation du lysozyme, de la sonication et des cycles de congélation / décongélation a pu être amplifié avec les amorces spécifiques aux actinomycètes⁸³ mais encore là, ce ne sont pas toutes les souches environnementales qui ont donné des résultats concluants. Heuer et collaborateurs ont effectivement éprouvé le même problème lors de leur étude sur les communautés d'actinomycètes.⁸⁵ Ceci peut s'expliquer par la trop grande stringence des conditions d'appariement des amorces. En effet, plus la température

d'appariement sera élevée, moins le mésappariement de bases nucléotidiques sera permis. Tel un couteau à 2 tranchants, d'un côté l'amplification de l'ADNr 16S pour certaines souches est optimisée afin de réduire au minimum les amplifications secondaires, de l'autre, une trop grande température pourra, si l'assise des oligonucléotides est légèrement différente, empêcher l'appariement de ceux-ci. La façon de remédier à la situation aurait été de diminuer la température d'appariement des amorces jusqu'à l'obtention d'une amplification optimale pour l'échantillon concerné. Comme le but de l'étude était de mettre au point une façon efficace de retrouver dans des échantillons environnementaux la présence d'actinomycètes thermophiles responsables de l'AAE, les actinomycètes commerciaux ATCC ayant tous été amplifiés à une température d'appariement d'amorces de 68°C, les souches non amplifiables par la PCR étaient probablement des souches environnementales dont l'homologie des gènes codant pour l'ADNr 16S variait trop avec celle des actinomycètes ATCC ou bien, lors de la PCR, la polymérase a été inhibée par un agent tel l'EDTA à la concentration contenue dans le TE. En contreparties, ayant réussi à amplifier les souches connues provenant de la banque de bactéries, on peut extrapoler que si d'autres souches inconnues mais identiques à celles d'ATCC sont cultivées, les résultats obtenus par la PCR seront également comparables.

Les régions variables des gènes codant pour l'ARNr 16S sont également fréquemment utilisées comme cible pour des amorces d'ADN. Cependant dans certaines situations lorsque des microorganismes sont relativement près les uns des autres, la variation entre les séquences peut être très minime, ce qui nécessite une stringence des conditions plus élevée lorsque des amorces sont utilisées pour détecter le microorganisme d'intérêt.^{97; 118} Shah et Romick ont trouvé qu'en amplifiant une plus grande section des gènes codant pour l'ARNr de l'opéron du ribosome (jusqu'à 3 kpb), l'analyse par RFLP révèle plus d'informations différentes que les polymorphismes de longueur du produit PCR seul.⁹⁷ En effet, plus une séquence est longue, plus élevées sont les chances qu'un polymorphisme survienne et crée ou enlève un site de restriction précis et qu'une enzyme donnée, coupant à divers endroits, ait un ou des sites de plus ou de moins dans cette séquence sans nécessairement que la longueur de la séquence soit vraiment influencée. On ne se serait attendu à moins!

Un des nombreux avantages de la pratique de la PCR lorsqu'une digestion enzymatique doit être faite sur les fragments amplifiés est la possibilité de réduire l'obtention de patrons de bandes trop nombreux pour pouvoir permettre une différenciation entre les souches en ne prenant qu'un gabarit déterminé au lieu de tout l'ADN de départ.⁹⁴ Un autre atout concernant l'utilisation des fragments de restriction générés par la PCR est l'évitement de faibles digestions de l'ADN génomique par certaines endonucléases de restriction en raison de la modification de bases d'ADN (i.e. méthylation).¹¹⁰ De plus, les patrons obtenus par ARDRA démontrent une stabilité accrue en comparaison avec des méthodes dépendantes de l'expression de gène comme les analyses de protéines, d'acides gras, de sucres ou d'isozymes.¹¹⁹ En sus de sa rapidité, l'utilisation de la méthode ARDRA permet une estimation sommaire de la divergence génétique¹¹⁹ mais dans le présent ouvrage, ceci ne s'applique pas. Toutefois, ARDRA n'a permis d'identifier que 50 souches sur les 75 au total dont l'ADN génomique a été extrait et ce, à partir des 117 isolats de départ. Ceci s'explique en partie par la difficulté de repiquer 42 des 117 souches initiales et d'obtenir un produit PCR avec 20 des 75 souches restantes. De plus, 5 souches ont été mises de côté en raison de contaminations survenues au cours des manipulations.

Le pouvoir discriminant, soit l'habileté à distinguer entre des espèces individuelles, peut être calculé, pour l'usage d'une technique comme ARDRA, selon une formule mathématique simple (**annexe G**). Il peut également être comparé avec celui d'autres méthodes de typage en utilisant l'indice de discrimination défini selon Hunter et Gaston.¹²⁰ Ce pouvoir est déterminé par le nombre de patrons différents définis par la méthode à l'étude et les fréquences relatives de ces patrons de bandes. Cet indice, calculé pour les 50 souches environnementales est de 0,86 alors qu'il passe à 0,89 si on y inclut les 13 souches ATCC. Donc si 2 souches sont choisies aléatoirement dans la population, 86 ou 89% des fois ces souches seront de types différents. En prenant les fragments obtenus avec les enzymes de restriction indépendamment l'une de l'autre, l'indice retrouvé est de 0,83 pour les souches environnementales digérées avec *Taq*⁶⁷I et de 0,79 si on y inclut les actinomycètes provenant d'ATCC. Par contre, avec *Hha*I, cet indice est de 0,87 peu importe que le calcul ait été effectué sur 50 ou 63 souches, ce qui tend à dire que l'utilisation de *Hha*I préférentiellement à *Taq*⁶⁷I est meilleure pour la discrimination mais que la combinaison des 2 enzymes s'avère être l'amalgame optimal pour différencier les souches d'actinomycètes thermophiles pouvant être impliquées dans l'AAE. Plusieurs autres études ont démontré la

capacité de l'indice de discrimination mais la comparaison entre les études ne peut se faire uniquement en tenant compte d'un seul test génétique. Par exemple, pour le RFLP effectué sur l'ADN génomique, la valeur de l'indice de discrimination obtenue par Bloom et collaborateurs est de 0,89.¹²¹ Par contre, Jamann et collaborateurs ont obtenu un indice de discrimination de 0,94 pour leur étude effectuée chez *Frankia* en utilisant le PCR-RFLP.¹¹⁹ Cependant, l'étude de Vila résume néanmoins bien la grande diversité qui peut exister entre les différents tests génétiques pour un même échantillon donné.¹¹⁶

Les résultats du présent ouvrage mettent cependant en lumière un problème particulier pour la systématique bactérienne. Une souche de *Thermoactinomyces vulgaris*, la souche type soit TV 43649, n'a pas le même aspect morphologique que les autres membres de cette espèce. L'analyse de l'ADNr 16S a d'ailleurs montré que les différences génotypiques y sont également assez nombreuses. Ces disparités génotypiques sont-elles assez importantes pour demander un transfert de nom de cette souche? De façon à être certain de la différence de cette dernière avec les autres membres de la même espèce, une 2^e souche (TV 43649/2), identique à la souche type, a été commandée chez ATCC et les résultats obtenus avec cette dernière confirment effectivement les premières observations. Comme ATCC garantissent leurs produits comme étant conforme à celui reçu, cela ne peut expliquer la différence retrouvée parmi les *T. vulgaris*.

À ce jour, il est admis que si 2 organismes ont moins de 5 à 15 substitutions nucléotidiques, ils peuvent être considérés identiques dans leur séquence d'ADNr 16S et appartenir à la même espèce.¹²² Une valeur seuil, dans la définition des espèces en bactériologie, déterminée par les comparaisons binaires individuelles (valeur S_{AB}) pour l'identité des séquences d'ADNr 16S⁷² a été fixée à 97% d'homologie;^{123; 124} ce qui tend à dire que la valeur retrouvée pour *T. vulgaris* 43649 ne classerait pas cet actinomycète parmi les *T. vulgaris*, ni les *T. sacchari* mais plutôt dans une espèce à part. Yallop et collaborateurs ont émis l'idée qu'une diversité d'espèces *Thermoactinomyces* plus grande que prévue existe dans des habitats tout aussi divers.¹⁰⁸ Cependant, il serait nécessaire d'utiliser des marqueurs génétiques variables additionnels afin de clarifier les relations interspécifiques et d'investiguer plus en profondeur les relations phylogénétiques intraspécifiques existant dans le genre *Thermoactinomyces*. En général, les patrons de bandes intraspécifiques différents obtenus par ARDRA sont générés par la

présence d'un ou plusieurs sites de restriction supplémentaires sur chacune des copie d'ADNr présentes sur un génome unique.¹¹⁵ Toutefois, avant d'affirmer quoi que ce soit, une étude multiple plus complète, réalisée avec les tests biochimiques et de culture traditionnels de même que les analyses de paroi et composition en sucres, serait nécessaire pour bien clarifier la position de cette souche parmi le genre *Thermoactinomyces*.

De nos jours, la plupart des bactéries d'importance médicale sont aisément identifiables à l'espèce près par des méthodes biochimiques simplifiées telles celles proposées par l'utilisation des galeries d'identification API (BioMérieux, Lyon, France). Pour les actinomycètes thermophiles cependant, en raison de leur température de croissance élevée et de la vitesse de croissance des souches qui nécessite en moyenne de 3 à 7 jours, l'emploi de ces galeries s'avère, dans le cas présent, inutile. La croissance lente des souches et la trop grande température entraînerait un dessèchement rapide des canules et la lecture subséquente des galeries serait impossible. Afin de pouvoir être incubée à 52°C, la galerie API devrait être adaptée en conséquence; c'est à dire que le volume des canules devrait être soit augmenté ou une façon d'éviter l'évaporation trop rapide de celles-ci devrait être mise au point. Toutefois à une température de 37°C, afin d'identifier les actinomycètes aérobies d'importance médicale, le système d'identification de levure ID 32C a pu être utilisé avec succès.¹²⁵ À ce jour, c'est la seule galerie API qui ait donné des résultats vraiment concluants.¹²⁵

L'utilisation de l'hybridation *in situ* en vue de reconnaître spécifiquement les actinomycètes thermophiles responsables de l'AAE est une autre technique rapide et sensible qui pourrait éventuellement permettre une identification de ces espèces et ce, dans des milieux hautement contaminés. Cette technique peut s'effectuer sur des souches bactériennes pures aussi bien qu'en présence de populations mixtes. L'hybridation *in situ* évite l'utilisation de la radioactivité et s'avère être une méthode très puissante pour l'identification directe *in situ* de cellules bactériennes uniques dans des écosystèmes microbiens complexes.¹²⁶

En résumé, l'utilisation des techniques moléculaires se révèle être une avenue plus prometteuse et précise que les tests biochimiques traditionnels. Les 2 enzymes de restriction sélectionnées soient *Taq^αI* et *HhaI* permettent une différenciation facile des souches

d'actinomycètes tant environnementales qu'issues d'ATCC et ce, dans un délai assez court. Les objectifs de cette étude ont donc bien été atteints et les résultats obtenus pourront désormais servir à divers environnements où le risque de développer une AAE est potentiel. Finalement, si l'analyse des séquences des *Thermoactinomyces* a montré la présence d'une insertion de 24 pb dans le cas des *T. sacchari* et *T. vulgaris* 43649, serait-ce suffisant pour expliquer partiellement la différence existant au sein des souches de *T. vulgaris*? Des analyses plus poussées seraient alors nécessaires pour bien comprendre la fonction et le rôle de ces nucléotides supplémentaires dans un gène très conservé comme le ribosome 16S. Mais ceci est une autre histoire...

BIBLIOGRAPHIE

1. Cormier Y, Bélanger J, Durand P: Factors influencing the development of serum precipitins to farmer's lung antigen in Quebec dairy farmers. *Thorax* 1985;40:138-142
2. Cormier Y, Laviolette M: Alvéolite allergique extrinsèque. *Encycl.Med.Chir.*, Elsevier, Paris, 1996;6-039-E-30:1-6
3. Taylor TB, Patterson C, Hale Y, Safranek WW: Routine use of PCR-restriction fragment length polymorphism analysis for identification of mycobacteria growing in liquid media. *J.Clin.Microbiol.* 1997;35:79-85
4. Gurtler V, Wilson VA, Mayall BC: Classification of medically important clostridia using restriction endonuclease site differences of PCR-amplified 16S rDNA. *J.Gen.Microbiol.* 1997;137:2673-2679
5. Steingrube VA, Wilson RW, Brown BA, Jost KC, Jr., Blacklock Z, Gibson JL, Wallace RJ, Jr.: Rapid identification of clinically significant species and taxa of aerobic actinomycetes, including *Actinomadura*, *Gordona*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, and *Tsukamurella* isolates, by DNA amplification and restriction endonuclease analysis. *J.Clin.Microbiol.* 1997;35:817-822
6. Salvaggio JE: Extrinsic allergic alveolitis (hypersensitivity pneumonitis): past, present and future. *Clin.Exp.Allergy* 1997;27:18-25
7. Ando M, Suga M: Hypersensitivity pneumonitis. *Current Opinion in Pulmonary Medicine* 1997;3:391-395

8. Cormier Y, Lacasse Y: Keys to the diagnosis of hypersensitivity pneumonitis: the role of serum precipitins, lung biopsy, and high-resolution computed tomography. *Clin.Pulm.Med.* 1996;3:72-77
9. Schuyler M: Hypersensitivity pneumonitis, in Fishman AP, Elias JA, Fishman JA, Grippi MA, Kaiser LR, Senior RM (eds): *Fishman's pulmonary diseases and disorders*. Toronto, McGraw-Hill, 1998, pp 1087-1097
10. Barrios R, Fortoul TI, Lupi-Herrera E: Pigeon breeder's disease: immunofluorescence and ultrastructural observations. *Lung* 1986;164:55-64
11. Reyes CN, Wenzel FJ, Lawton BR, Emanuel DA: The pulmonary pathology of farmer's lung disease. *Chest* 1982;81:142-146
12. Yoshizawa Y, Ohdama S, Tanoue M, Tanaka M, Ohtsuka M, Uetaka K, Hasegawa S: Analysis of bronchoalveolar lavage cells and fluids in patients with hypersensitivity pneumonitis: possible role of chemotactic factors in the pathogenesis of disease. *Int.Arch.Allergy Appl.Immunol.* 1986;80:376-382
13. Malmberg P, Rask-Andersen A, Rosenhall L: Exposure to microorganisms associated with allergic alveolitis and febrile reactions to mold dust in farmers. *Chest* 1993;103:1202-1209
14. Fournier E, Tonnel AB, Gosset Ph, Wallaert B, Ameisen JC, Voisin C: Early neutrophil alveolitis after antigen inhalation in hypersensitivity pneumonitis. *Chest* 1985;86:563-566
15. Semenzato G, Chilosi M, Ossi E, Trentin L, Pizzolo G, Cipriani A, Agostini C, Zambello R, Marcer G, Gasparotto G: Bronchoalveolar lavage and lung histology: comparative analysis of inflammatory and immunocompetent cells in patients with sarcoidosis and hypersensitivity pneumonitis. *Am.Rev.Respir.Dis.* 1985;132:400-404

16. Toubas D, Prévost A, Deschamps F, Pinon JM: Les alvéolites allergiques extrinsèques d'origine professionnelle. *La Presse Médicale* 1995;24:1391-1396
17. Costabel U, Bross KJ, Marxen J, Matthys H: T-lymphocytosis in bronchoalveolar lavage fluid of hypersensitivity pneumonitis; changes in profile on T-cell subsets during the course of disease. *Chest* 1984;85:514-518
18. Salvaggio JE, Millhollon BW: Allergic alveolitis: new insights into old mysteries. *Respir.Med.* 1993;87:495-501
19. Kaltreider HB: Hypersensitivity pneumonitis. *West.J.Med.* 1993;159:570-578
20. Denis M, Cormier Y, Tardif J, Ghadirian E, Laviolette M: Hypersensitivity pneumonitis: whole *Micropolyspora faeni* or antigens thereof stimulate the release of proinflammatory cytokines from macrophages. *Am.J.Respir.Cell.Mol.Biol.* 1991;5:198-203
21. Tremblay GM, Israel-Assayag E, Sirois P, Cormier Y: Murine hypersensitivity pneumonitis: evidences for the role of eicosanoids and platelet activating factor. *Immunological Investigations* 1993;22:341-352
22. Cormier Y, Tremblay GM, Fournier M, Israel-Assayag E: Long-term viral enhancement of lung response to *Saccharopolyspora rectivirgula*. *Am.J.Respir.Crit.Care Med.* 1994;149:490-494
23. Fink JN, Banaszak EF, Thiede WH, Barboriak JJ: Interstitial pneumonitis due to hypersensitivity to an organism contaminating a heating system. *Annals of Internal Medicine* 1971;74:80-83
24. Kokkarinen JI, Tukiainen HO, Terho EO: Effect of corticosteroid treatment on the recovery of pulmonary function on farmer's lung. *Am.Rev.Respir.Dis.* 1992;145:3-5

25. McNeil MM, Brown J: The medically important aerobic actinomycetes: epidemiology and microbiology. *Clinical Microbiology Reviews* 1994;7:399-417
26. Tsilinsky P: Sur les mucédinées thermophiles. *Annales de l'Institut Pasteur* 1899;500-505
27. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Baltimore, Williams & Wilkins, 1986, pp 2299-2648
28. Prescott L, JP Harley, DA Klein: *Microbiologie*. Bruxelles, De Boeck-Wesmael S.A., 1995, pp 1-1014
29. Collins MD: Isoprenoid quinone analyses in bacterial classification and identification. *Chemical Methods in Bacterial Systematics* 1985;267-287
30. Gottlieb D: General consideration and implications of the actinomycetales, in Sykes G, Skinner FA (eds): *Actinomycetales: characteristics and practical importance*. New York, Academic Press, 1973, pp 1-10
31. Lacey J: Genus *Micropolyspora* Lechevalier,, Solotorovsky and McDurmont 1961, 11, in Williams ST, Sharpe ME, Holt JG, Murray RGE, Brenner DJ, Krieg NR, Moulder JW, Sneath PHA, Staley JT (eds): *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Baltimore, Williams & Wilkins, 1986, pp 1496-1501
32. Gerber NN, Lechevalier HA: Geosmin, an earthy-smelling substance isolated from actinomycetes. *Appl. Microbiol.* 1965;13:935-938
33. *Air sampling instruments for evaluation of atmospheric contaminants*. Cincinnati, Ohio, Am. Conference of Gov. Industrial Hygienists, Inc, 1989, pp 1-612
34. Reponen TA, Gazenko SV, Grinshpun SA, Willeke K, Cole EC: Characteristics of airborne actinomycete spores. *Appl Environ Microbiol* 1998;64:3807-3819

35. Andersen AA: New sample for the collection, sizing, and enumeration of viable airborne particules. *J.Bacteriol.* 1958;76:471-484
36. Duchaine C, Mériaux A, Brochu G, Bernard K, Cormier Y: *Saccharopolyspora rectivirgula* isolated from Quebec dairy barns: proposed simplified criteria for identification. *J.Med.Microbiol.* 1998;
37. Duchaine C, Mériaux A, Cormier Y: Airborne contaminants in different working sites of Eastern North America sawmills: factors influencing air quality and detailed description of mycological contaminants. *Scandinavian Journal of Work Environment and Health* 1998;
38. Cross T: Thermophilic actinomycetes. *J.Gen.Microbiol.* 1968;50:351-359
39. Katimaa MH, Terho EO, Husman K: Airborne moulds and actinomycetes in the work environment of farmers. *Eu.J.Respir.Dis.Suppl.* 1987;152:91-100
40. Smith SM, Snyder IS, Burrell R: Mitogenic response to *Micropolyspora faeni* cell walls. *J.Allergy Clin.Immunol.* 1980;65:298-304
41. Amner W, Edwards C, McCarthy AJ: Improved medium for recovery and enumeration of the farmer's lung organism, *Saccharomonospora viridis*. *Appl.Environ.Microbiol.* 1989;55:2669-2674
42. Lacey J: *Thermoactinomyces sacchari* sp.nov., a thermophilic actinomycete causing bagassosis. *J.Gen.Microbiol.* 1971;66:327-338
43. Pepys J, Jenkins PA, Festenstein GN, Gregory PH, Lacey J, Skinner FA: Farmer's lung thermophilic actinomycetes as a source of "farmer's lung hay" antigen. *Lancet ii* 1963;607-611

44. Embley TM, Smida J, Stackebrandt E: The phylogeny of mycolate-less wall chemotype IV actinomycetes and description of *Pseudonocardiaceae* fam. nov. *System.Appl.Microbiol.* 1988;11:44-52
45. Goodfellow M, Lacey J, Athalye M, Embley TM, Bowen T: *Saccharopolyspora gregorii* and *Saccharopolyspora hordei*: two new actinomycetes species from fodder. *J.Gen.Microbiol.* 1989;135:2125-2139
46. Corbaz R, Gregory PH, Lacey ME: Thermophilic and mesophilic actinomycetes in mouldy hay. *J.Gen.Microbiol.* 1963;32:449-455
47. Cross T, Maciver AM, Lacey J: The thermophilic actinomycetes in mouldy hay: *Micropolyspora faeni* sp.nov. *J.Gen.Microbiol.* 1968;50:351-359
48. Kurup VP, Agre NS: Transfer of *Micropolyspora rectivirgula* (Krassilnikov and Agre 1964) Lechevalier, Lechevalier, and Becker 1966 to *Faenia* gen. nov. *Int.J.Syst.Bacteriol.* 1983;33:663-665
49. Lacey J: Genus *Faenia* Kurup and Agre 1983, 664 (*Micropolyspora* Lechevalier, Solotorovsky and McDurmont 1961, 11), in Williams ST, Sharpe ME, Holt JG, Murray RGE, Brenner DJ, Krieg NR, Moulder JW, Pfennig N, Sneath PHA, Staley JT (eds): *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Baltimore, Williams & Wilkins, 1984, pp 2387-2392
50. Lechevalier HA, Solotorovsky M, McDurmont C: A new genus on the Actinomycetales: *Micropolyspora* gen. nov. *J.Gen.Microbiol.* 1961;26:11-18
51. Dorokhova LA, Agre NS, Kalakoutskaa LV, Krassilnikov NA: Fine structure of sporulating hyphae and spores in a thermophilic actinomycete, *Micropolyspora rectivirgula*. *J.Microscopie* 1969;8:845-854

52. Lacey J: Genus *Saccharopolyspora* Lacey and Goodfellow 1975, 77, in Williams ST, Sharpe ME, Holt JG, Murray RGE, Brenner DJ, Krieg NR, Moulder JW, Pfennig N, Sneath PHA, Staley JT (eds): *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Baltimore, Williams & Wilkins, 1984, pp 2382-2386
53. Pelmont J: *Enzymes*. Grenoble, Presses Universitaires de Grenoble, 1993, pp 1-605
54. Arden Jones MP, McCarthy AJ, Cross T: Taxonomic and serological studies on *Micropolyspora faeni* and *Micropolyspora* strains from soil bearing the specific epithet *rectivirgula*. *J.Gen.Microbiol.* 1979;115:343-354
55. Becker B, Lechevalier MP, Lechevalier HA: Chemical composition of cell-wall preparations from strains of various form - genera of aerobic actinomycetes. *Appl.Microbiol.* 1965;13:236-243
56. Pelmont J: *Bactéries et environnement: adaptations physiologiques*. Grenoble, Presses Universitaires de Grenoble, 1993, pp 1-899
57. Collins MD, Pirouz T, Goodfellow M: Distribution of menaquinones in actinomycetes and corynebacteria. *J.Gen.Microbiol.* 1977;100:221-230
58. Embley TM: The family pseudonocardiaceae, in *The Prokaryotes*. New-York, Spring-Verlag, 1992, pp 990-1021
59. McCarthy AJ: Genus *Saccharomonospora* Nomura and Ohara 1971c, 899, in Williams ST, Sharpe ME, Holt JG, Murray RGE, Brenner DJ, Krieg NR, Moulder JW, Pfennig N, Sneath PHA, Staley JT (eds): *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Baltimore, Williams & Wilkins, 1986, pp 2402-2404
60. Schuurmans DM, Olson BH, San Clemente CL: Production and isolation of thermoviridin, an antibiotic produced by *Thermoactinomyces viridis* n.sp. *Appl.Microbiol.* 1956;4:61-66

61. Küster E, Locci R: Transfer of *Thermoactinomyces viridis* Schuurmans et al. 1956 to the genus *thermomonospora* as *Thermomonospora viridis* (Schuurmans, Olson and San Clemente) Comb. nov. *International Bulletin of Bacteriological Nomenclature and Taxonomy* 1963;13:213-216
62. Collins MD, Mackillop GC, Cross T: Menaquinone composition of members of the genus *Thermoactinomyces*. *FEMS Microbiology Letters* 1982;13:151-153
63. Korn-Wendisch F, Kempf A, Grund E, Kroppenstedt RM, Kutzner HJ: Transfer of *Faenia rectivirgula* Kurup and Agre 1983 to the genus *Saccharopolyspora* Lacey and Goodfellow 1975, elevation of *Saccharopolyspora hirsuta* subs. *taberi* Labeda 1987 to species level, and emended description of the genus *Saccharopolyspora*. *Int.J.Syst.Bacteriol.* 1989;39:430-441
64. Lacey J, Cross T: Genus *Thermoactinomyces* Tsiklinsky 1899, 501, in Williams ST, Sharpe ME, Holt JG, Murray RGE, Brenner DJ, Krieg NR, Moulder JW, Pfennig N, Sneath PHA, Staley JT (eds): *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Baltimore, Williams & Wilkins, 1984, pp 2574-2585
65. Cross T, Davies FL, Walker PD: *Thermoactinomyces vulgaris* I. Fine structure of the developing endospores, in Baker AN, Gould GW, Wolf J (eds): *Spore research*. New-York, Academic Press, 1971, pp 175-180
66. Lacey J, Doreen AV: Endospores formation and germination in a new *Thermoactinomyces* species, in Baker AN, Gould GW, Wolf J (eds): *Spore research*. New-York, Academic Press, 1971, pp 181-191
67. Gazonko SV, Reponen TA, Grinshpun SA, Willeke K: Analysis of airborne actinomycete spores with fluorogenic substrates. *Appl Environ Microbiol* 1998;64:4410-4415

68. Christensen WB: Urea decomposition as a means of differentiating *Proteus* and *Paracolon* cultures from each other and from *Salmonella* and *Shigella* types. *J.Bacteriol.* 1946;52:461-466
69. Pelczar MJ, ECS Chan, NR Krieg: *Microbiology: concepts and applications*. Toronto, McGraw-Hill, INC., 1993, pp 1-896
70. Blyth W: Farmer's lung disease, in Sykes G, Skinner FA (eds): *Actinomycetales: characteristics and practical importance*. New York, Academic Press, 1973, pp 261-276
71. Park Y-H, Kim E, Yim D-G, Kho Y-H, Mheen T-I, Goodfellow M: Suprageneric classification of *Thermoactinomyces vulgaris* by nucleotide sequencing of 5S ribosomal RNA. *Zbl.Bakt.* 1993;278:469-478
72. Stackebrandt E, Ludwig W, Weizenegger M, McGill TJ, Fox GE, Woese CR, Schubert W, Schleifer K-H: Comparative 16S rRNA oligonucleotide analyses and murein types of round-spore-forming bacilli and non-spore-forming relatives. *J.Gen.Microbiol* 1987;133:2523-2529
73. Embley TM, Stackebrandt E: The molecular phylogeny and systematics of the actinomycetes. *Annu.Rev.Microbiol.* 1994;48:257-289
74. Fitch WM, Margoliash E: Construction of phylogenetic trees, a method based on mutation distances as estimated from cytochrome c sequences is of general applicability. *Science* 1967;155:279-284
75. Ninio J: *Approches moléculaires de l'évolution*. New-York, Collection de biologie évolutive, Masson, 1979, pp 1-131
76. Kimura M: *The neutral theory of molecular evolution*. New-York, Cambridge University-press, 1983, pp 1-367

77. Woese CR: Bacterial evolution. *Microbiol.Rev.* 1987;51:221-271
78. Gordon RE, Barnett DA, Handerhan JE, Hor-Nay Pang C: *Nocardia coeliaca*, *Nocardia autotrophica*, and the nocardin strain. *Int.J.Syst.Bacteriol.* 1974;24:54-63
79. Kurup VP, Fink JN: A scheme for the identification of thermophilic actinomycetes associated with hypersensitivity pneumonitis. *J.Clin.Microbiol.* 1975;2:55-61
80. Gordon RE, Mihm JM: A comparative study of some strains received as *Nocardiae*. *J.Bacteriol.* 1957;73:15-27
81. Gordon RE: Some criteria for the recognition of *Nocardia madurae* (Vincent) Blanchard. *J.Gen.Microbiol.* 1966;45:355-364
82. Yoon J-H, Kim H, Kim S-B, Kim H-J, Kim WY, Lee ST, Goodfellow M, Park Y-H: Identification of *Saccharomonospora* strains by the use of genomic DNA fragments and rRNA gene probes. *Int.J.Syst.Bacteriol.* 1996;46:502-505
83. McVeigh HP, Munro J, Embley TM: Molecular evidence for the presence of novel actinomycete lineages in a temperate forest soil. *J.Ind.Microbiol.* 1996;17:197-204
84. Brosius J, Palmer ML, Kennedy PJ, Noller HF: Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 1978;75:4801-4805
85. Heuer H, Krsek M, Baker P, Smalla K, Wellington EMH: Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Appl.Environ.Microbiol.* 1997;63:3233-3241

86. Chou Q, Russell M, Birch DE, Raymond J, Bloch W: Prevention of pre-PCR mis-priming and primer dimerization improves low-copy-number amplifications. *Nucl.Acids Res.* 1992;20:1717-1723
87. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: *Molecular cloning: a laboratory manual*, NY, Cold Spring Harbor, 1989, pp 1.21-1.52
88. Kim S-B, Yoon J-H, Kim H, Lee SB, Park Y-H, Goodfellow M: A phylogenetic analysis of the genus *Saccharomonospora* conducted with 16S rRNA gene sequences. *Int.J.Syst.Bacteriol.* 1995;45:351-356
89. Smith TF, Waterman MS: Comparison of biosequences. *Advances in Applied Mathematics* 1981;2:482-489
90. Vaneechoutte M, Riegel P, Monteil H, Verschraegen G, De Rouck A, Claeys G: Evaluation of the applicability of amplified rDNA-restriction analysis (ARDRA) to identification of species of the genus *Corynebacterium*. *Res.Microbiol.* 1995;146:633-641
91. Plikaytis BB, Plikaytis BD, Yakrus MA, Butler WR, Woodley CL, Silcox VA, Shinnick TM: Differentiation of slowly growing *Mycobacterium* species, including *Mycobacterium tuberculosis*, by gene amplification and restriction fragment length polymorphism analysis. *J.Clin.Microbiol.* 1992;30:1815-1822
92. Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Böttger EC, Bodmer T: Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J.Clin.Microbiol.* 1993;31:175-178
93. Vaneechoutte M, De Beenhouwer H, Claeys G, Verschraegen G, De Rouck A, Paepe N, Elaichouni A, Portaels F: Identification of *Mycobacterium* species by using amplified ribosomal DNA restriction analysis. *J.Clin.Microbiol.* 1993;31:2061-2065

94. Bowden G, Johnson J, Schachtele C: Characterization of *Actinomyces* with genomic DNA fingerprints and rRNA gene probes. *J.Dent.Res.* 1993;72:1171-1179
95. Wilson RW, Steingrube VA, Brown BA, Wallace RJ, Jr.: Clinical application of PCR-restriction enzyme patterns analysis for rapid identification of aerobic actinomycete isolates. *J.Clin.Microbiol.* 1998;36:148-152
96. Matar GM, Swaminathan B, Hunter SB, Slater LN, Welch DF: Polymerase chain reaction-based restriction fragment length polymorphism analysis of a fragment of the ribosomal operon from *Rochalimaea* species for subtyping. *J.Clin.Microbiol.* 1993;31:1730-1734
97. Shah SA, Romick TL: Subspecies differentiation of *Salmonella* by PCR-RFLP of the ribosomal operon using universal primers. *Letters in Applied Microbiology* 1997;25:54-57
98. Avaniss-Aghajani E, Jones K, Holtzman A, Aronson T, Glover N, Boian M, Froman S, Brunk CF: Molecular technique for rapid identification of mycobacteria. *J.Gen.Microbiol.* 1996;34:98-102
99. Lee D-H, Zo Y-G, Kim S-J: Nonradioactive method to study genetic profiles of natural bacterial communities by PCR-single-strand-conformation polymorphism. *Appl.Environ.Microbiol.* 1996;62:3112-3120
100. Widjoatmodjo MN, Fluit AC, Verhoef J: Rapid identification of bacteria by PCR-single-strand conformation polymorphism. *J.Clin.Microbiol.* 1994;32:3002-3007
101. Pace NR: New perspective on the natural microbial world: molecular microbial ecology. *ASM News* 1996;62:463-470

102. Torsvik V, Goksoyr J, Daae F: High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 1990;56:782-787
103. Warwick S, Bowen T, McVeigh H, Embley TM: A phylogenetic analysis of the family *Pseudonocardiaceae* and the genera *Actinokineospora* and *Saccharothrix* with 16S rRNA sequences and a proposal to combine the genera *Amycolata* and *Pseudonocardia* in an emended genus *Pseudonocardia*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1994;44:293-299
104. Steingrube VA, Brown BA, Gibson JL, Wilson RW, Brown J, Blacklock Z, Jost K, Locke S, Ulrich RF, Wallace RJ, Jr.: DNA amplification and restriction endonuclease analysis for differentiation of 12 species and taxa of *Nocardia*, including recognition of four new taxa within the *Nocardia asteroides* complex. *J. Clin. Microbiol.* 1995;33:3096-3101
105. Koch C, Kroppenstedt RM, Rainey FA, Stackebrandt E: 16S ribosomal DNA analysis of the genera *Micromonospora*, *Actinoplanes*, *Catellatospora*, *Catenuloplanes*, *Couchioplanes*, *Dactylosporangium*, and *Pilimelia* and emendation of the family *Micromonosporaceae*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1996;46:765-768
106. Springer B, Strockman L, Teschner K, Roberts GD, Böttger EC: Two-laboratory collaborative study on identification of mycobacteria: molecular versus phenotypic methods. *J. Clin. Microbiol.* 1996;34:296-303
107. Goodfellow M, Pirouz T: Numerical classification of sporoactinomycetes containing *meso*-diaminopimelic acid in the cell wall. *J. Gen. Microbiol.* 1982;128:503-527
108. Yallop CA, Edwards C, Williams ST: Isolation and growth physiology of novel thermoactinomycetes. *J. Appl. Microbiol.* 1997;83:685-692

109. Lumini E, Bosco M, Fernandez MP: PCR-RFLP and total DNA homology revealed three related genomic species among broad-host-range *Frankia* strains. *FEMS Microbiology Ecology* 1996;21:303-311
110. Vilgalys R, Hester M: Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *J.Bacteriol.* 1990;172:4238-4246
111. Medlin L, Elwood HJ, Stickel S, Sogin ML: The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding regions. *Gene* 1988;71:491-499
112. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel SJ, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988;239:487-491
113. Saiki RK, Scharf SJ, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N: Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985;230:1350-1354
114. Wang GC-Y, Wang Y: Frequency of formation of chimeric molecules as a consequence of PCR coamplification of 16S rRNA genes from mixed bacterial genomes. *Appl.Environ.Microbiol.* 1997;63:4645-4650
115. Vaneechoutte M, Rosseau R, De Vos P, Gillis M, Jansseens D, Paepe N, De Rouck A, Fiers T, Claeys G, Kersters K: Rapid identification of bacteria of the Comamonadaceae with amplified ribosomal DNA-restriction analysis (ARDRA). *FEMS Microbiology Letters* 1992;93:227-234
116. Vila J, Marcos MA, Jimenez De Anta MT: A comparative study of different PCR-based DNA fingerprinting techniques for typing of the *Acinetobacter calcoaceticus-A. baumannii* complex. *J.Med.Microbiol.* 1996;44:482-489

117. Yoon J-H, Lee ST, Kim S-B, Kim WY, Goodfellow M, Park Y-H: Restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S ribosomal DNA for rapid identification of *Saccharomonospora* strains. *Int.J.Syst.Bacteriol.* 1997;47:111-114
118. Barry T, Collieran G, Glennon M, Dunican LK, Gannon F: The 16S/23S ribosomal spacer region as a target for DNA probes to identify eubacteria, in *PCR methods and applications*. New-York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1991, pp 51-56
119. Jamann S, Fernandez MP, Normand P: Typing method for N₂-fixing bacteria based on PCR-RFLP - application to the characterization of *Frankia* strains. *Mol.Ecol.* 1993;2:17-26
120. Hunter PR, Gaston MA: Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J.Clin.Microbiol.* 1988;26:2465-2466
121. Bloom RA, Mullin BC, Tate III RL: DNA restriction patterns and DNA-DNA solution hybridization studies of *Frankia* isolates from *Myrica pensylvanica* (Bayberry). *Appl.Environ.Microbiol.* 1989;55:2155-2160
122. Fox GE, Wisotzkey JD, Jurtshuk P, Jr.: How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *Int.J.Syst.Bacteriol.* 1992;42:166-170
123. Stackebrandt E, Goebel BM: Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int.J.Syst.Bacteriol.* 1994;44:846-849

124. Yoon J-H, Lee ST, Kim S-B, Goodfellow M, Park Y-H: Inter- and intraspecific genetic analysis of the genus *Saccharomonospora* with 16S to 23S ribosomal DNA (rDNA) and 23S to 5S rDNA internally transcribed spacer sequences. *Int.J.Syst.Bacteriol.* 1997;47:661-669
125. Muir DB, Pritchard RC: Use of the BioMerieux ID 32C yeast identification system for identification of aerobic actinomycetes of medical importance. *J.Clin.Microbiol.* 1997;35:3240-3243
126. Shuppler M, Wagner M, Schön G, Göbel UB: *In situ* identification of nocardioform actinomycetes in activated sludge using fluorescent rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Microbiology* 1998;144:249-259

ANNEXE A

Tableau VII : Liste des divers types d'alvéolite allergique extrinsèque et de leurs agents causals

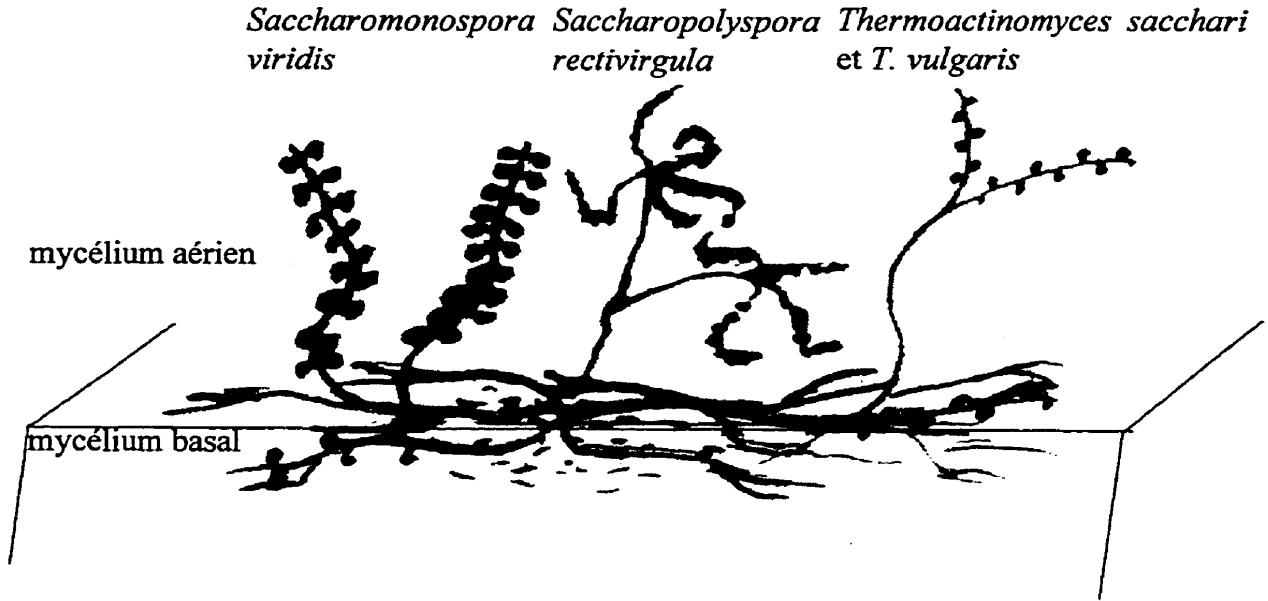
| MALADIES CAUSEES PAR : | SOURCE ANTIGÉNIQUE | ANTIGENE SUSPECTÉ |
|--|--|--|
| Microorganismes | | |
| Poumon du fermier | Foin moisi | Actinomycètes thermophiles : <i>Saccharopolyspora rectivirgula</i> <i>Saccharomonospora viridis</i> <i>Thermoactinomyces vulgaris</i> |
| Bagassose | Cane à sucre (bagasse) moisie | Actinomycètes thermophiles : <i>Saccharopolyspora rectivirgula</i> <i>Thermoactinomyces sacchari</i> <i>T. vulgaris</i> |
| Maladie des champignonnistes | Compost ou champignons | Actinomycètes thermophiles : <i>Saccharopolyspora rectivirgula</i> <i>Thermoactinomyces vulgaris</i> Champignon shiitake <i>Pleurotus ostreatus</i> |
| Poumon des brasseurs de bière | Orge contaminée | <i>Aspergillus favus (flavus)</i> |
| Maladie des écorceurs d'érables | Tronc d'érable contaminé | <i>Cryptosporium corticale</i> |
| Séquoidose | Poussière de bois contaminé | <i>Graphium</i> sp. <i>Pullularia</i> sp. |
| Maladie des travailleurs de pâte à papier | Pulpe de bois contaminé | <i>Alternaria</i> sp. |
| Poumon des humidificateurs | Humidificateurs, déshumidificateurs, climatiseurs contaminés | Actinomycètes thermophiles : <i>T. candidus</i> <i>T. vulgaris</i> <i>Penicillium</i> sp. <i>Cephalosporium</i> sp. Amibes |
| Pneumopathie d'hypersensibilité familiale | Bois contaminé | <i>Bacillus subtilis</i> |
| Poumon du terreau | Terreau | <i>Aspergillus</i> sp. |
| Maladie des laveurs de fromage | Bac à fromage | <i>Penicillium</i> sp. |
| Pneumopathie des copeaux combustibles | Copeaux de bois ou de tourbe contaminés | <i>Penicillium</i> sp. |
| Maladie des tailleurs de bois | Éclats de bois contaminés | <i>Rhizopus</i> sp. <i>Mucor</i> sp. |
| Maladie des toits de chaume | Herbes ou feuilles séchées | <i>Saccharomonospora viridis</i> |
| Maladie des producteurs de thé | Plans de thé | Inconnue |
| Poumon des travailleurs de café | Grains de café | Inconnue |
| Pneumopathie d'hypersensibilité au <i>Streptomyces albus</i> | Engrais contaminé | <i>Streptomyces albus</i> |
| Pneumopathie d'hypersensibilité au <i>Cephalosporium</i> | Sous-sol contaminé (égouts) | <i>Cephalosporium</i> |
| Maladie des saunas | Eau des saunas | <i>Pullularia</i> sp. |
| Maladie des ouvriers de produits détergents | Détergents | <i>Bacillus subtilis</i> Enzymes |
| Maladie des travailleurs du paprika | Poussière de paprika | <i>Mucor stolonifer</i> |
| Pneumopathie d'hypersensibilité des maisons du Japon | Poussières de maison | <i>Trichosporon cutaneum</i> |
| Poumon des pourritures sèches | Bois infesté | <i>Merulius lacrymans</i> |
| Poumon du bois décomposé | Bois contaminé | <i>Leucogyroprana pinastri</i> |
| Pneumopathie d'hypersensibilité de l'office ou la maison | Poussières des systèmes de ventilation ou chauffage | Inconnue (probablement multiple) |

| MALADIES CAUSEES PAR : | SOURCE ANTIGÉNIQUE | ANTIGENE SUSPECTÉ |
|---|----------------------------------|--------------------------------------|
| Microorganismes | | |
| Pneumopathie d'hypersensibilité du climatiseur d'automobile | Poussières du climatiseur | <i>Thermoactinomyces candidus?</i> |
| Maladie des travailleurs du tabac | Moisissures du tabac | <i>Aspergillus</i> sp. |
| Poumon des bains | Moisissures | <i>Cladosporium</i> sp. |
| Poumon de l'eau du robinet | Eau contaminée | Bactérie ou levure |
| Poumon des vigneron | Moisissures sur les raisins | <i>Botrytis cinerea</i> |
| Suberose | Poussière de liège | <i>Penicillium</i> sp. |
| Maladie du bûcheron | Moisissures sur l'écorce | <i>Penicillium</i> sp. |
| Poumon du saxophone | Pièce buccale | <i>Candida albicans</i> |
| Maladie des minotiers et grainetiers | Poussières de grain | <i>Erwinia herbicola</i> |
| Poumon des travailleurs de poissonneries | Poussière de chair de poissons | Inconnue |
| Pneumopathie d'hypersensibilité au salami | Saucisses | <i>Penicillium</i> sp. |
| Poumon du Copte | Linge qui enveloppe les momies | Inconnue |
| Produits animaux | | |
| Maladie des éleveurs de pigeons | Fientes de pigeon | Sérum de pigeons (probablement IgA) |
| Fièvre des canards | Plumes de canards | Protéines de canards |
| Poumon des éleveurs de dindes | Produits de dindes | Protéines de dindes |
| Maladie des colombofiles | Produites d'oiseaux | Protéines aviaires |
| Poumon des oreillers en duvet | Plumes d'oies | Protéines aviaires |
| Pneumopathie d'hypersensibilité des travailleurs de laboratoire | Fouiture de rats | Urine de rats |
| Pneumopathie par inhalation de poudre d'hypophyse | Poudre d'hypophyse | Protéines de pores ou de bovins |
| Pneumopathie d'hypersensibilité des coquillages | Coquilles de moules | Protéines animales |
| Produits d'insectes | | |
| Poumon du meunier | Charançon du blé | <i>Sitophilus granarius</i> |
| Produits chimiques | | |
| Pneumopathie d'hypersensibilité au TDI | Di-isocyanate de toluène | Protéines dénaturées |
| Pneumopathie d'hypersensibilité au TMA | Anhydride trimétallique | Protéines dénaturées |
| Pneumopathie d'hypersensibilité au MDI | Di-isocyanate de diphenylméthane | Protéines dénaturées |
| Poumon de la résine époxy | Résine d'époxy | Anhydride phtalique |
| Pneumopathie d'hypersensibilité au réactif de Pauli | Réactif de Pauli | Sulphonate diamino benzène de sodium |
| Pneumopathie d'hypersensibilité à la fumée de zinc | Fonderies | Complexe zinc-protéine |
| Pneumopathie d'hypersensibilité au zirconium | Tuiles de céramique | Zirconium |

Tableau tiré de l'article de Cormier et Laviollette, 1996²

ANNEXE B

Schéma présentant le mycélium aérien et le mycélium de base des principaux actinomycètes thermophiles pouvant occasionner une AAE.



ANNEXE C

Séquence de l'ADNr 16S de *Saccharopolyspora rectivirgula* 33515

Numéro accession GeneBank : X53194

Contenu en bases : 298 a 336 c 487 g 267 t 39 autres

Les parties soulignées sont externes au fragment amplifié avec les amorces de McVeigh⁸³

1 aacacatgca agtcgaacgc tqaagctctg cccttqtggt qgggtqggtg agtgcgcaac
 61 gggtgagtaa cacgtgggta atctqcccca tactctqgga taacctctgg aaacgmnnc
 121 taataaccgga taqgacattc tcccqcatqg tggggtgtqg aaagtcccgq cggtatqgga
 181 tgggcccgcg qcctatcagc ttgttgggtgq ggtaatggcc taccaagqcg acgacgggta
 241 gccggcctga gagggtgacc ggccacactg ggactgagac acggcccaga ctctacggg
 301 aggcagcagt ggggaatctt gcgcaatggg cgaaagcctg acgcagcaac gccgtgtggg
 361 ggatgacggc tncgggtngt taaccnnttt caccatcgac gaagcctttt ggggtgacgg
 421 taggtgggga agaagcaccg gctaactacg tgccagcagc cgcggtaata cgtaggggtc
 481 gagcgttgte cggatttatt gggcgtaaag agctcgtagg cggtttgteq cgtcggccgt
 541 gaaaacctac agcttaactg tgggcttgcg gtcgatacgg gcagacttga gttcggcagg
 601 ggagactgga attcctgggtg tagcggtgaa atgcgagat atcaggagga acaccgggtg
 661 cgaaggcggg tctctgggcc gatactgacg ctgaggagcg aaagcgtggg gagcgaacag
 721 gattagatac cctggtagtc cacgccgtaa acggtgggcg ctaggtgtgg ggactgggtc
 781 cacggtttcc gtgccgtagc taacgcatta agcgccccgc ctggggagta cggccgcaag
 841 gctaaaactc aaaggaattg acgggggccc gcacaagcgg cggagcatgt ggattaattc
 901 gatgnaacgc gaagaacctt acctgggttt gacatgcaact ngatcgcct agagataggg
 961 ngtcctnngt ggctgggtgca cagggtgtgc atggctgtcg tcagctcgtg tcgtgagatg
 1021 ttgggttaag ncccgcaang agcgcaacce tntnncntg ttgcnagcnn ntntnnnngg
 1081 ggactcnnng gngactgccg gggtnaactc ggaggaagg ggggatgacg tcaagtcac
 1141 atgccctta tgcctagggc ttcacacatg ctacaatggc cggtagacagag ggtggcgaga
 1201 ccgtgaggtg gagcgaatcc cagaaagccg gtctcagttc ggatcgggggt ctgcacctng
 1261 acccctgtaa gtcggagtcg ctagtaatcg cagatcagca atgctgcggt naatacgttc
 1321 ccgggccttg tacacaccgc ncgtcacgtc atgaaagtcg gtaacaccgc aacctatggc
 1381 ccaacccccgt gtgggggagq gqgtngtcga aqgtgggact nqcgatc

ANNEXE D

Séquence de l'ADNr 16S de *Saccharomonospora viridis* 15386

Numéro accession GeneBank : Z38021

Contenu en bases : 326 a 367 c 523 g 274 t

Les parties soulignées sont externes au fragment amplifié avec les amorces de McVeigh⁸³

1 gctcaggacg aacgctqcg gcgtgcttaa cacatgcaag tcqaacgctg aagccctctt
 61 cgggcggtgg atgagtqcg aacgggtgag taacacgtgg gtaatctgcc ctgtactctg
 121 ggataagcct gggaaactgg gtctaatacc qgataggaca cgtaccgca tggggtgctg
 181 tggaaaactt cggcgttaca ggatgagccc gcggcctatc agctaagtgg tggggtgatg
 241 gcctaccaag gcgacgacgg gtagccggcc tgagaggggtg accggccaca ctgggactga
 301 gacacggccc agactcctac gggaggcagc agtggggaat attgcacaat gggcgggaagc
 361 ctgatgcagc gacgcccgtg gggggatgac ggccttcggg ttgtaaacce ctttcgcccc
 421 ggacgaagcg agagtgacgg taccgggaga agaagcaccg gccaaactacg tgccagcagc
 481 cgcggttaata cgtaggggtgc aagcgttgtc cggaattatt gggcgtaaag agctcgtagg
 541 cgggtgtgtc cgtctgcccgt gaaaacctgc ggcttaaccg tgggcgtgcg gtggatacgg
 601 gcacacttga gttcggtagg ggagactgga attcctgggtg tagcgggtgga atgcgcagat
 661 atcaggagga acaccagtgg cgaaggcggg tctctggggc gaaactgacg ctgaggagcg
 721 aaagcgtggg gagcgaacag gattagatac cctggtagtc cacgccgtaa acggtggggc
 781 ctaggtgtgg gatgctgttc acgtgtcccg tgccgtagct aacgcattaa gcgccccgcc
 841 tggggagtac ggccgcaagg ctaaaactca aaggaattga cgggggcccc cacaagcggc
 901 ggagcatgtg gattaattcg atgcaacgcg aagaacctta cctgggtttg acatgactg
 961 gaccggcgta gagatacggc ttcccttgtg gctggtgcac aggtggtgca tggctgtcgt
 1021 cagctcgtgt cgtgagatgt tgggttaagt cccgcaacga gcgcaaccct tgtcccatgt
 1081 tgccagcggg taatgccggg gactcgtggg agactgccgg ggtcaactcg gaggaaggtg
 1141 gggacgacgt caagtcatca tgccccttat gccacgggct tcacacatgc tacaatggcc
 1201 agtacagagg gttgcgagac cgtgaggtgg agcgaatccc ttaaagctgg tctcagttcg
 1261 gatcgtagtc tgcaactcga ctacgtgaag tcggagtcgc tagtaatcgc agatcagca
 1321 ccctgcccgtg aatacgttcc cgggccttgt acacaccgcc cgtcacgtca taaaagtcgg
 1381 taacaccccga aqcccatggc ctaaccccgt caggggaggg agtggtcgaa ggtgggaccg
 1441 gcgattggga cqaagtcgta acaaggtagc cgtaccggaa ggtgcccgtg

ANNEXE E

Alignement de séquences multiple des séquences des gènes codant pour l'ARNr 16S des 5 actinomycètes ciblés dans l'AAE obtenu avec le logiciel CLUSTAL X (1.64b)

```

ts-2          GGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCT
tv1-2          GGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCT
tv15734       GGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCT
sr             GGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCT
sv             GGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCT
*****

ts-2          ACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATTTTCCGCAATGGGCGAAGCCTGACGGAGCAACGCCGC
tv1-2          ACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATTTTCCGCAATGGGCGAAGCCTGACGGAGCAACGCCGC
tv15734       ACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATTTTCCGCAATGGGCGAAGCCTGACGGAGCAATGCCGC
sr             ACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATCTTGCGCAATGGGCGAAGCCTGACGCAGCAACGCCGT
sv             ACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATGCACAATGGGCGAAGCCTGATGCAGCGACGCCGC
*****

ts-2          GTGAGTGAGGACGGCCTTCGGGTTGTAAACTCTGTTCTTGGGGAAGAACCCTTCCGAGG
tv1-2          GTGAGTGAGGACGGCCTTCGGGTTGTAAACTCTGTTCTTGGGGAAGAATTCCTTCCAGG
tv15734       GTGAGTGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACTCTGTTCTGAAGGAAGAAGTTC-----
sr             GTGGGGGATGACGG-CTNCGGGTNGTTAACCNNTTTCACCATCGACGAA-----
sv             GTGGGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCCCTTTCGCCCGGGACGAA-----
*** * ** ***** ** ***** ** ** * * * * * ** ***

ts-2          CGAACAGCCTCGGAAGTTGACGGTACTCAAGGAGAAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGC
tv1-2          CGAACAGCCTGGAAGTTGACGGTACTCAAGGAGAAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGC
tv15734       -----TGACGGTACTTCAGGAGAAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGC
sr             -----GCCTTTTGGGGTACGGTAGGTGGGGAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGC
sv             -----GC----GAGAGTGACGGTACCGGGAGAAGAAGCACCGCCAACACTACGTGCCAGC
*****

ts-2          AGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCGAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGC
tv1-2          AGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCGAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTGCGC
tv15734       AGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCGAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGC
sr             AGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGAGCTCGT
sv             AGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGAGCTCGT
*****

ts-2          AGGCGGCCGATTAAGTCAGGTGTGAAAGGCTGCGGCTCAACCGCAGGGCGGCACCTGAAA
tv1-2          AGGCGGCTGATTAAGTCAGGTGTGAAAGGCTGCGGCTCAACCGCAGAGCGGCACCTGAAA
tv15734       AGGCGGTCAATTAAGTCAGGTGTGAAAGGCTGCGGCTCAACCGCAGAGCGGCACCTGAAA
sr             AGGCGGTTTGTTCGCGTTCGGCCGTGAAAACCTACAGCTTAACTGTGGGCTTGCGGTGCATA
sv             AGGCGGTGTGTTCGCGTCTGCCGTGAAAACCTGCGGCTTAAACCGTGGGCGTGCGGTGGATA
*****

ts-2          CTGGTTCGGCTTGTAGTGCAGGAGAGGGGAGTGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGTA
tv1-2          CTGGTTCAGCTTGTAGTGCAGGAGAGGGGAGCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGTA
tv15734       CTGGATGACTTGTAGTGCAGGAGAGAGCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGTA
sr             CGGGCAGACTTGTAGTTCGGCAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGCA
sv             CGGGCACACTTGTAGTTCGGTAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGCA
* ** ***** * * ** ** * * ***** ***** *****

```

ts-2 GAGATCGGGAGGAACACCAGTGGGGAAGGCGGCTCTCTGGCCTGTAACCTGACGCTGAGGC
 tv1-2 GAGATCGGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGCCTGTAACCTGACGCTGAGGC
 tv15734 GAGATCGGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGCCTGTTTCTGACGCTGAGGC
 sr GATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGA
 sv GATATCAGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGGCCGAAACTGACGCTGAGGA
 * * * * *

ts-2 GCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGA
 tv1-2 GCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGA
 tv15734 GCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGA
 sr GCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGG
 sv GCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGG
 * * * * *

ts-2 GTGCTAGGTGTTGGGGGG--TTCCCC---CTCAGTGCCGAAGGTAACCCATTAAGCACTC
 tv1-2 GTGCTAGGTGTTGGGGGGCTACGCC---CTCAGTGCCGAAGGTAACCCATTAAGCACTC
 tv15734 GTGCTAGGTGTCGGGGGG--TCCTACC---CTCGGTGCCGAAGGTAACCCATTAAGCACTC
 sr GCGCTAGGTGTTGGGGACTGGTTCCACGGTTTCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCC
 sv GCGCTAGGTGTTGGGATGCTGTT-CACGTGTCCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCC
 * * * * *

ts-2 CGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGACAAG
 tv1-2 CGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGACAAG
 tv15734 CGCCTGGGGAGTACGGCCGCGAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGACAAG
 sr CGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGACAAG
 sv CGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGACAAG
 * * * * *

ts-2 CGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGGCTTGACATCC
 tv1-2 CGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGGCTTGACATCC
 tv15734 CGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGGCTTGACATCC
 sr CGGCGGAGCATGTGGATTAATTGATGNAACGCGAAGAACCCTTACCAGGGCTTGACATGC
 sv CGGCGGAGCATGTGGATTAATTGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGGCTTGACATGC
 * * * * *

ts-2 CGCTGACCGCTCCAGGGATGGAGCCTCCCTTCGGGGCAGCGGTGACAGGTGGTGCATGGT
 tv1-2 CGCTGACCCCTCCAGAGATGGAGTTTCCCTTCGGGACAGCGGTGACAGGTGGTGCATGGT
 tv15734 CGCTGACCGCTCCAGAGATGGAGCTTCCCTTCGGGGCAGCGGTGACAGGTGGTGCATGGT
 sr ACTNGATCGCCCTAGAGATAGGGNGTCCCTNGTGGCTGGTG--CACAGGTGGTGCATGGC
 sv ACTGGACC GGCGTAGAGATACGCCTTCCCTTGTGGCTGGTG--CACAGGTGGTGCATGGC
 * * * * *

ts-2 TGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTTCACTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATC
 tv1-2 TGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTTCACTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATC
 tv15734 TGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTTCACTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATC
 sr TGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGNCCCGCAANGAGCGCAACCCTNNTN
 sv TGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATC
 * * * * *

ts-2 GCCAGTTGCCAGCATTTTCG-GATGGGCACTCTGGCGAGACAGCCGGTG-AAAGCCGGAGG
 tv1-2 GTTAGTTGCCAGCATTTTCG-GATGGGCACTCTAACGAGACAGCCGGTG-AAAGCCGGAGG
 tv15734 GCTAGTTGCCAGCA-TTCA-GTTGGGCACTCTAGCGAGACAGCCGGTG-AAAGCCGGAGG
 sr CNNTGTGTCNAGCANNNTNNNNNGGGGACTCNNNGGNGACTGCCGGGGTNAACTCGGAGG
 sv CCAATGTTGCCAGCGGGTAATGCCGGGACTCGTGGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGG
 * * * * *

ts-2 AAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGTCCTGGGCTACACACGTGCTACA
 tv1-2 AAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGTCCTGGGCTACACACGTGCTACA
 tv15734 AAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGTCCTGGGCTACACACGTGCTACA
 sr AAGGTGGGGATGACGTCAGTCATCATGCCCTTATGTCCTAGGGCTTACACATGCTACA
 sv AAGGTGGGGACGACGTCAGTCATCATGCCCTTATGCCAGGGCTTACACATGCTACA
 * * * * *

```

ts-2      ATGGCCAGTACAAAGGAAGCGAACCCGCGAGGGGGAGCCAATCCCAAAAAACTGGTCTC
tv1-2     ATGGCTGGTACAAAGGCAGCGAACCCGCGAGGGGGAGCCAATCCCAAAAAGCCAGTCTC
tv15734   ATGGCCGGTACAATGGGTGCGCAACCCGCGAGGGGGAGCTAATCCACAAAACCGGTCTC
sr        ATGGCCGGTACAGAGGGTGGCGAGACCGTGAGGTGGAGCGAATCCAGAAAAGCCGGTCTC
sv        ATGGCCAGTACAGAGGGTTGCGAGACCGTGAGGTGGAGCGAATCCCTTAAAGCTGGTCTC
          *****

```

```

ts-2      AGTTCGGATCGCAGGCTGCAACTCGCCTGCGTGAAGCCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGAT
tv1-2     AGTTCGGATCGCAGGCTGCAACTCGCCTGCGTGAAGCCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGAT
tv15734   AGTTCGGATCGCAGGCTGCAACTCGCCTGCGTGAAGCCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGAT
sr        AGTTCGGATCGGGGTCTGCACCTNGACCCCGTGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGAT
sv        AGTTCGGATCGTAGTCTGCAACTCGACTACGTGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGAT
          *****

```

```

ts-2      CAG
tv1-2     CAG
tv15734   CAG
sr        CAG
sv        CAG
          ***

```

Où: ts-2 *Thermoactinomyces sacchari* 27349

 tv1-2 *Thermoactinomyces vulgaris* 46349/1

 tv15734 *Thermoactinomyces vulgaris* 15734

 sr *Saccharopolyspora rectivirgula*

 sv *Saccharomonospora viridis* 15386

ANNEXE F

Originaux des gels d'agarose 3% des digestions enzymatiques des souches d'actinomycètes thermophiles environnementales et issues d'ATCC.

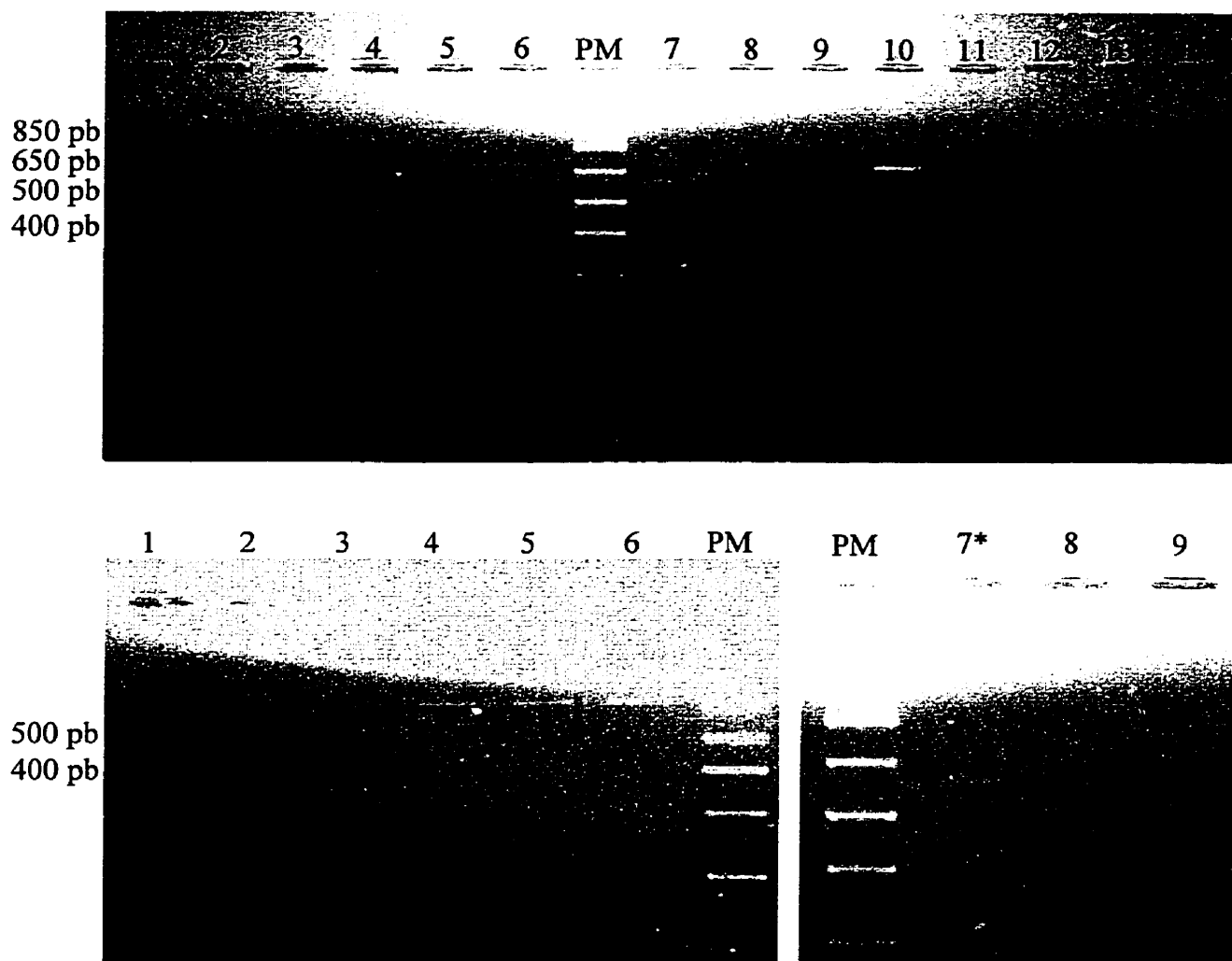


Figure 23 : Originaux des gels d'agarose 3% de la figure 7 des gènes codant pour l'ARNr 16S des actinomycètes thermophiles ATCC digérés avec *Taq*^αI. Lignes 1 à 3 : *Saccharopolyspora rectivirgula*, souches 15347, 29034 et 33515; lignes 4 à 6 : *Saccharomonospora viridis*, souches 15386, 15735 et 15736; PM: marqueur de poids moléculaire; lignes 7 à 9 : *Thermoactinomyces sacchari*, souches 27349, 27375 et 27376; lignes 10 à 14 : *T. vulgaris*, souches 43649/1, 43649/2, 15733, 15734 et 21364.

*La ligne 7 démontre des doublets mais l'échantillon utilisé n'était pas le bon et, après reprise de la digestion avec le bon échantillon, seules les bandes attendues étaient présentes (résultat non présenté).

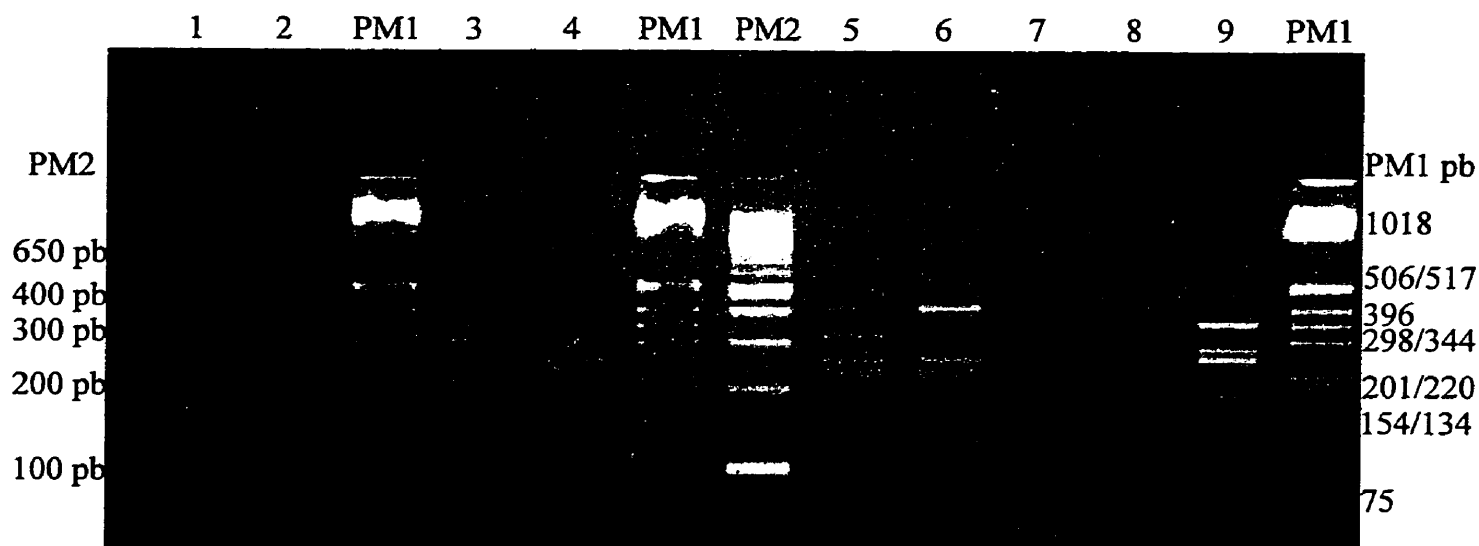


Figure 24 : Original de la figure 8 du gel d'agarose 3% des gènes codant pour l'ARNr 16S des actinomycètes ATCC digérés avec *HhaI*. Lignes 1, 2 et 5: *Saccharopolyspora rectivirgula*, souches 15347, 29034 et 33515; PM1 : marqueur de poids moléculaire de 1 Kpb; lignes 3, 4 et 6 : *Saccharomonospora viridis*, souches 15735, 15736 et 15386; PM2 : marqueur de poids moléculaire de 100 pb; ligne 7 : *Thermoactinomyces sacchari**, souche 27375; lignes 8 et 9 : *T. vulgaris*, souches 43649/1 et 15733.

* Toutes les souches de *Thermoactinomyces sacchari* ont donné le même patron de bandes lors de la digestion à *HhaI* (résultat non présenté).

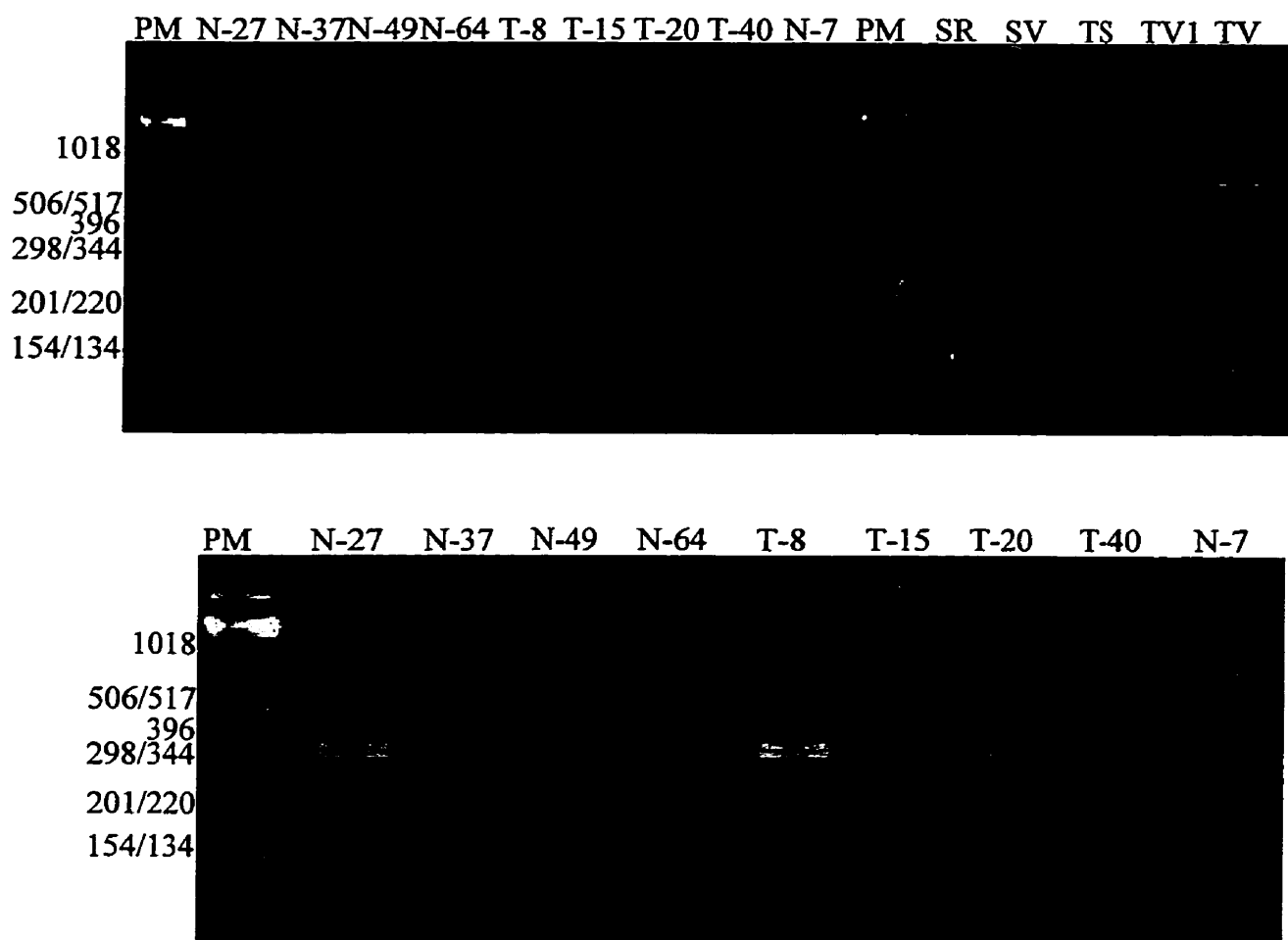


Figure 25 : Originaux des gels d'agarose 3% de la figure 9 des gènes codant pour l'ARNr 16S des actinomycètes environnementaux et ATCC digérés avec *Taq*^αI. PM : marqueur de poids moléculaire; N-27 à N-7 : actinomycètes environnementaux; SR : *Saccharopolyspora rectivirgula*, souche 33515; SV : *Saccharomonospora viridis*, souche 15736; TS : *Thermoactinomyces sacchari*, souche 27375; TV1 : *T. vulgaris*, souche 43649/1; TV : *T. vulgaris*, souche 15733.

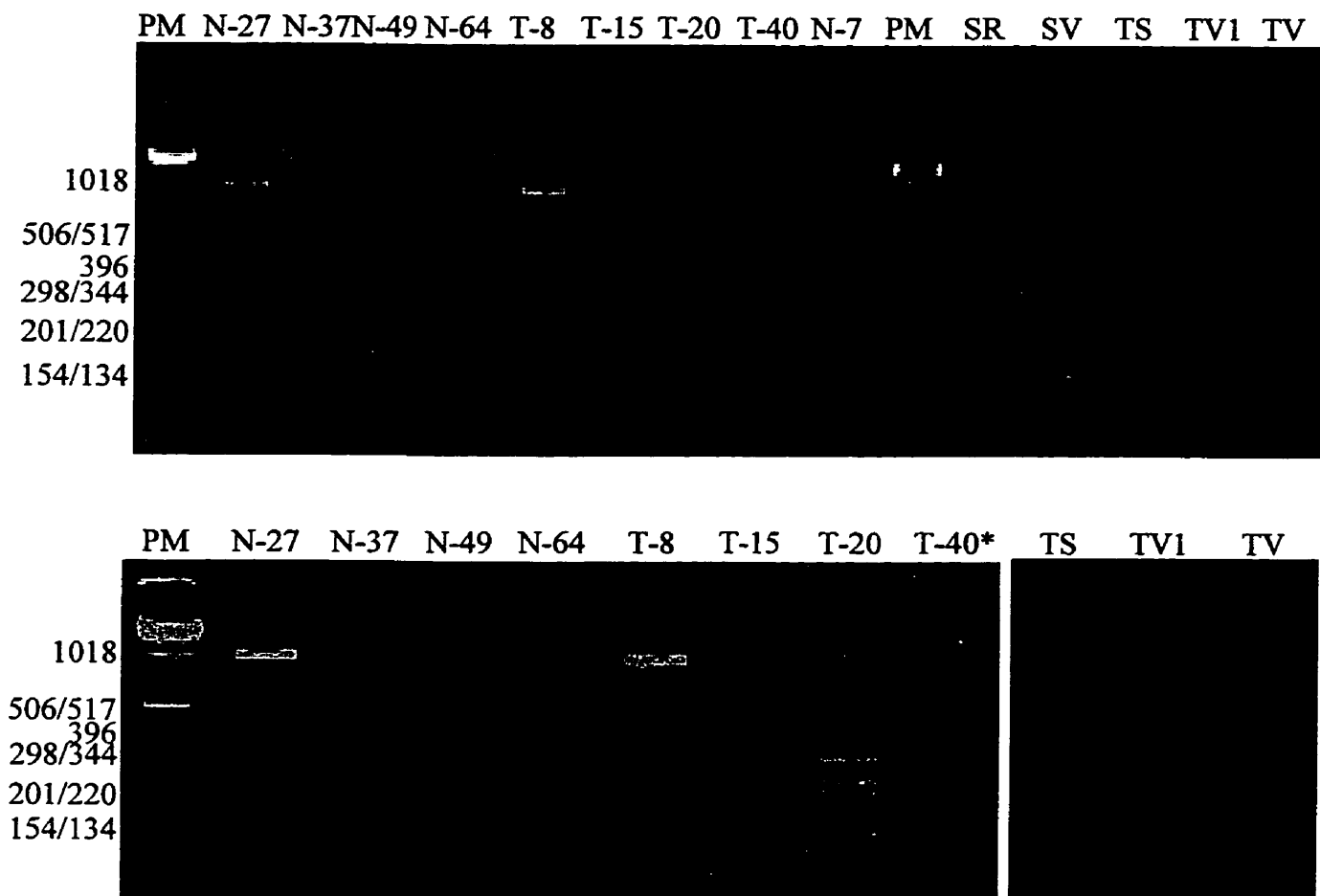


Figure 26 : Originaux des gels d'agarose 3% de la figure 10 des gènes codant pour l'ARNr 16S des actinomycètes environnementaux et ATCC digérés avec *HhaI*. PM : marqueur de poids moléculaire; N-27 à N-7 : actinomycètes environnementaux; SR : *Saccharopolyspora rectivirgula*, souche 33515; SV : *Saccharomonospora viridis*, souche 15736; TS : *Thermoactinomyces sacchari*, souche 27375; TV1 : *T. vulgaris*, souche 43649/1; TV : *T. vulgaris*, souche 15733.

*T-40 n'est pas visible sur ce gel, voir **figure 38**.

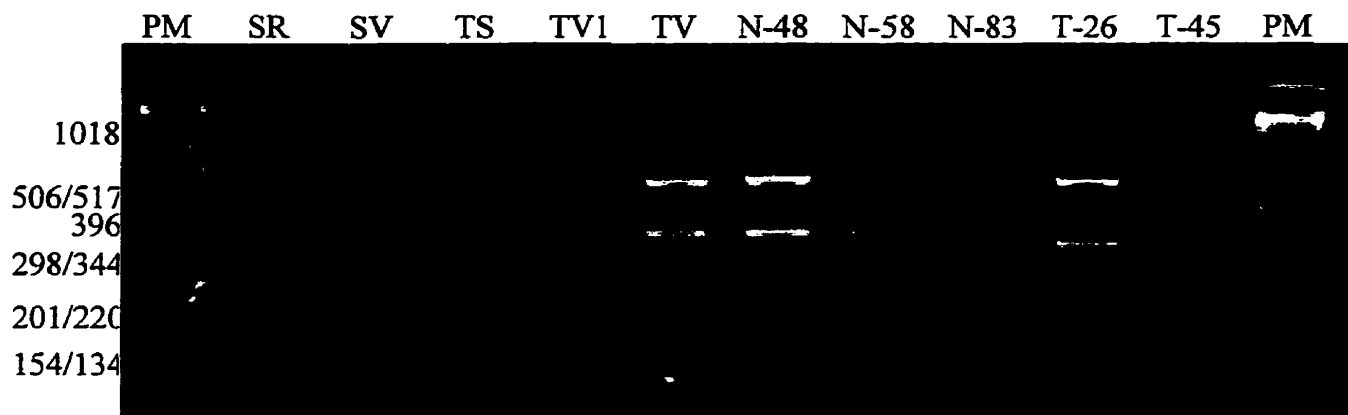


Figure 27 : Original du gel d'agarose 3% de la figure 11 des gènes codant pour l'ARNr 16S des actinomycètes environnementaux et ATCC digérés avec *Taq*^αI. PM : marqueur de poids moléculaire; SR : *Saccharopolyspora rectivirgula*, souche 33515; SV : *Saccharomonospora viridis*, souche 15736; TS : *Thermoactinomyces sacchari*, souche 27375; TV1 : *T. vulgaris*, souche 43649/1; TV : *T. vulgaris*, souche 15733; N-48 à T-45 : actinomycètes environnementaux.

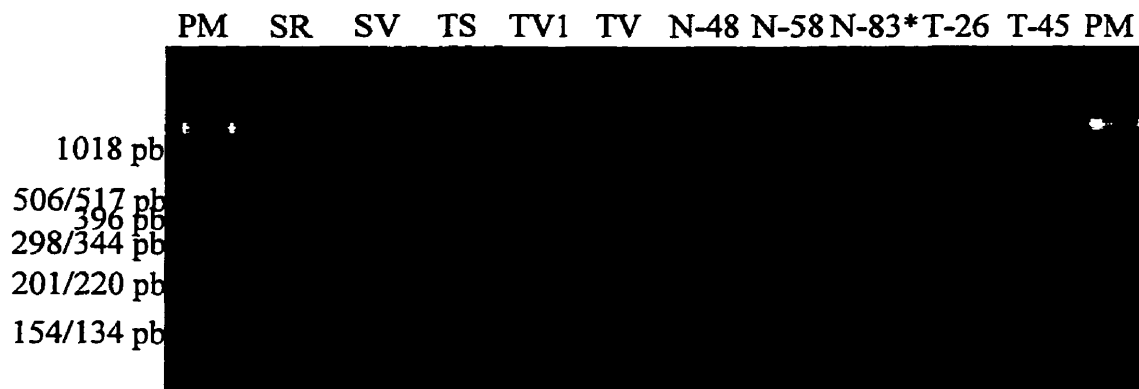


Figure 28 : Original du gel d'agarose 3% de la figure 12 des gènes codant pour l'ARNr 16S des actinomycètes environnementaux et ATCC digérés avec *Hha*I. PM : marqueur de poids moléculaire; SR : *Saccharopolyspora rectivirgula*, souche 33515; SV : *Saccharomonospora viridis*, souche 15736; TS : *Thermoactinomyces sacchari*, souche 27375; TV1 : *T. vulgaris*, souche 43649/1; TV : *T. vulgaris*, souche 15733; N-48 à T-45 : actinomycètes environnementaux. *N-83 voir figure 38.

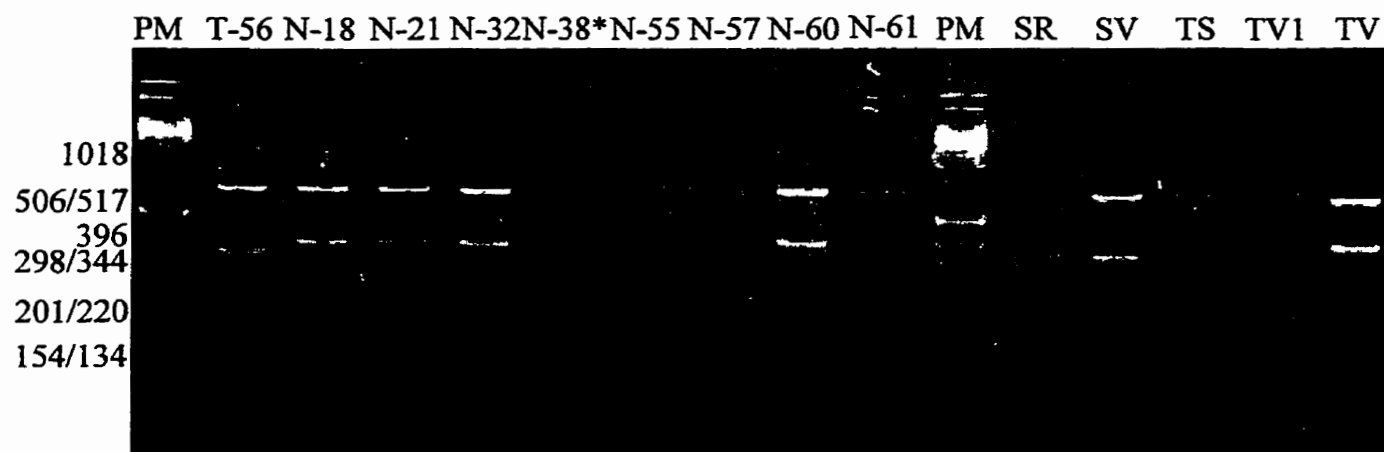


Figure 29 : Original du gel d'agarose 3% de la figure 13 des gènes codant pour l'ARNr 16S des actinomycètes environnementaux et ATCC digérés avec *Taq*^αI. PM : marqueur de poids moléculaire; T-56 à N-61 : actinomycètes environnementaux; SR : *Saccharopolyspora rectivirgula*, souche 33515; SV : *Saccharomonospora viridis*, souche 15736; TS : *Thermoactinomyces sacchari*, souche 27375; TV1 : *T. vulgaris*, souche 43649/1; TV : *T. vulgaris*, souche 15733.

*N-38 donne le même patron de bandes que N-32 (voir **figure 37**); les bandes résiduelles inférieures à 344 pb ne sont pas considérées.

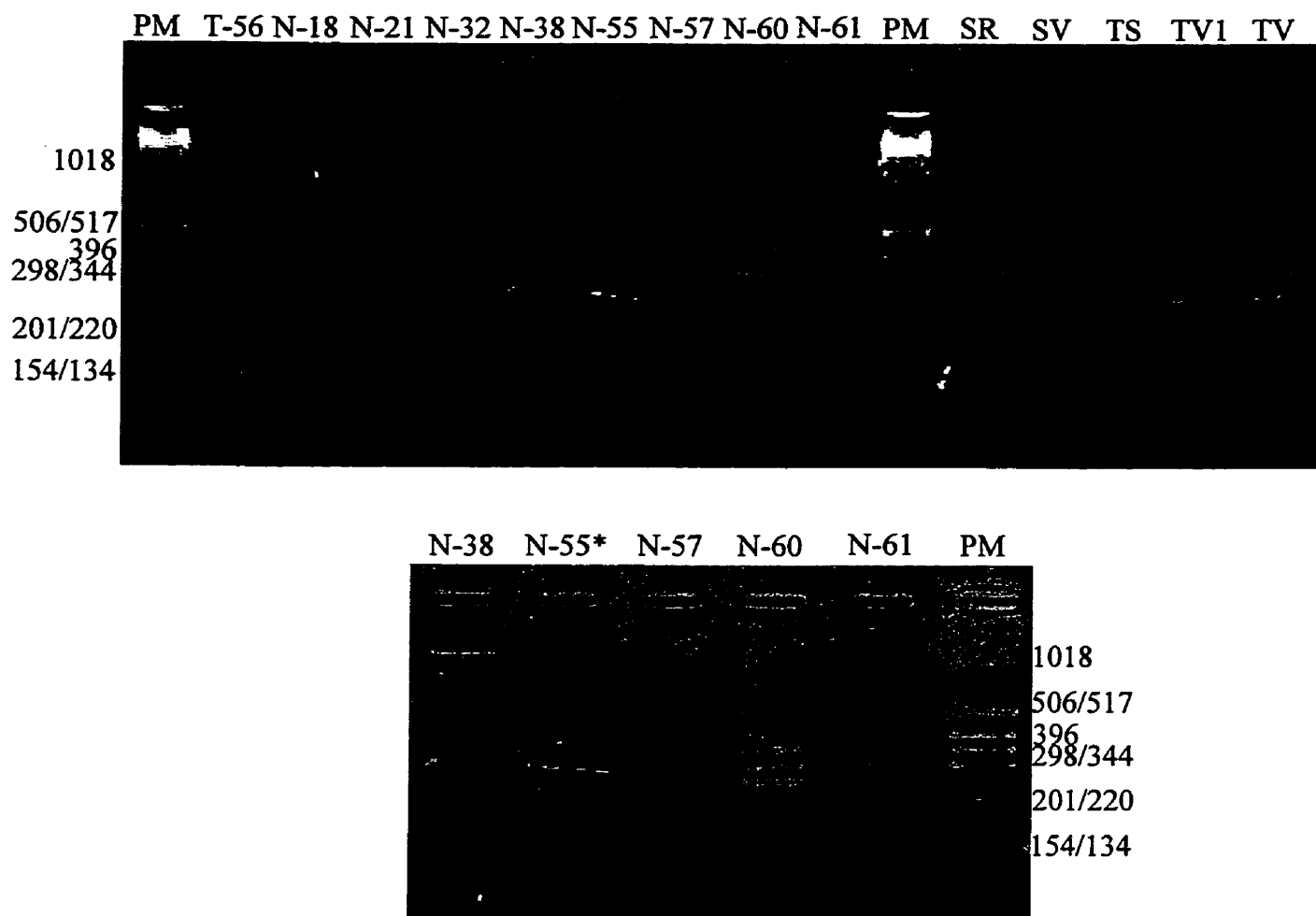


Figure 30 : Originaux des gels d'agarose 3% de la figure 14 des gènes codant pour l'ARNr 16S des actinomycètes environnementaux et ATCC digérés avec *HhaI*. PM : marqueur de poids moléculaire; T-56 à N-61 : actinomycètes environnementaux; SR : *Saccharopolyspora rectivirgula*, souche 33515; SV : *Saccharomonospora viridis*, souche 15736; TS : *Thermoactinomyces sacchari*, souche 27375; TV1 : *T. vulgaris*, souche 43649/1; TV : *T. vulgaris*, souche 15733.

*N-55 patron de bandes idem à N-57.

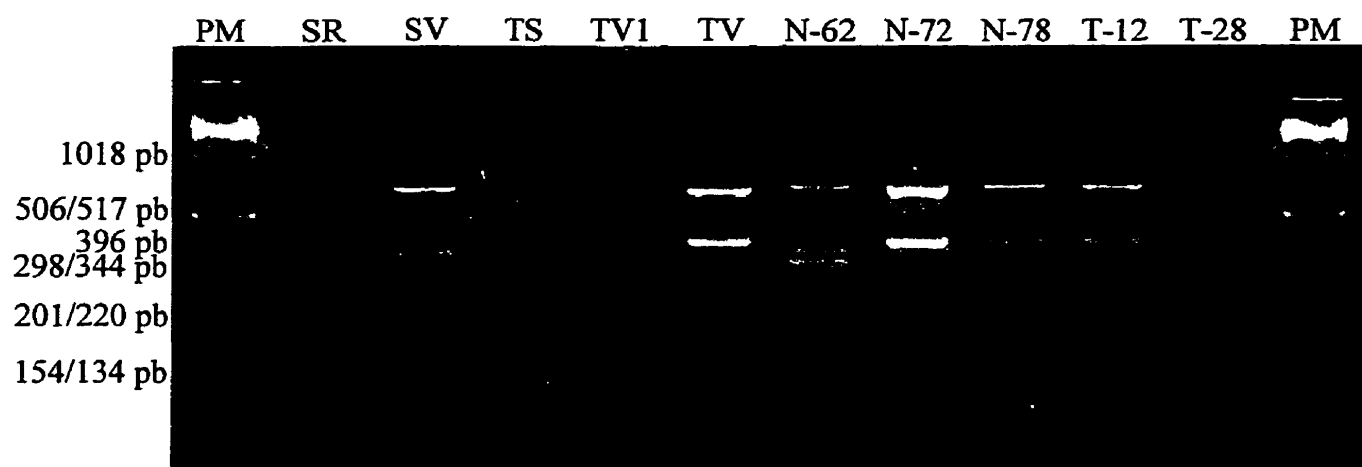


Figure 31 : Original du gel d'agarose 3% de la figure 15 des gènes codant pour l'ARNr 16S des actinomycètes environnementaux et ATCC digérés avec *Taq*^αI. PM : marqueur de poids moléculaire; SR : *Saccharopolyspora rectivirgula*, souche 33515; SV : *Saccharomonospora viridis*, souche 15736; TS : *Thermoactinomyces sacchari*, souche 27375; TV1 : *T. vulgaris*, souche 43649/1; TV : *T. vulgaris*, souche 15733; N-62 à T-28 : actinomycètes environnementaux.

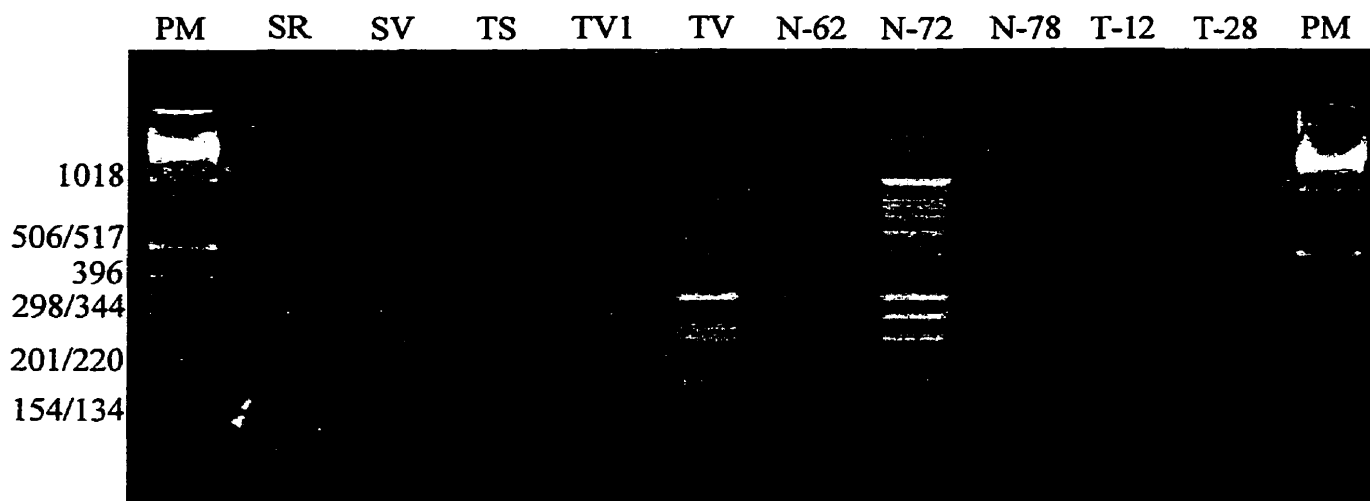


Figure 32 : Original du gel d'agarose 3% de la figure 16 des gènes codant pour l'ARNr 16S des actinomycètes environnementaux et ATCC digérés avec *Hha*I. PM : marqueur de poids moléculaire; SR : *Saccharopolyspora rectivirgula*, souche 33515; SV : *Saccharomonospora viridis*, souche 15736; TS : *Thermoactinomyces sacchari*, souche 27375; TV1 : *T. vulgaris*, souche 43649/1; TV : *T. vulgaris*, souche 15733; N-62 à T-28 : actinomycètes environnementaux.

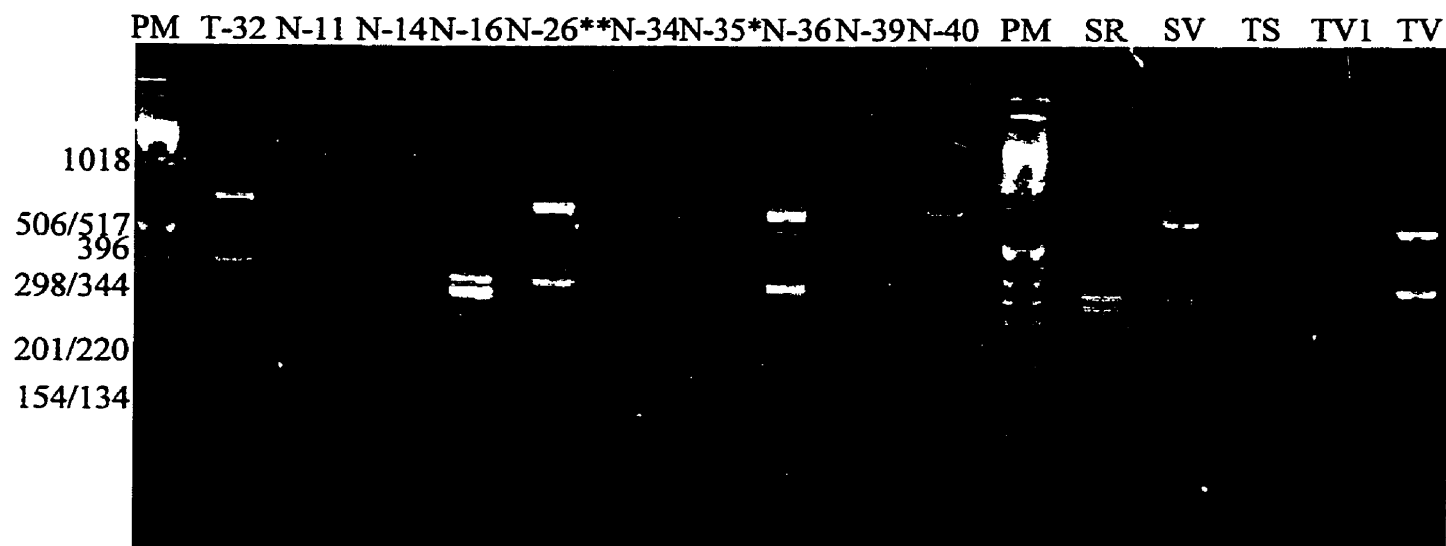


Figure 33 : Original du gel d'agarose 3% de la figure 17 des gènes codant pour l'ARNr 16S des actinomycètes environnementaux et ATCC digérés avec *Taq*^αI. PM : marqueur de poids moléculaire; T-32 à N-40 : actinomycètes environnementaux; SR : *Saccharopolyspora rectivirgula*, souche 33515; SV : *Saccharomonospora viridis*, souche 15736; TS : *Thermoactinomyces sacchari*, souche 27375; TV1 : *T. vulgaris*, souche 43649/1; TV : *T. vulgaris*, souche 15733.

*N-35 non visible.

**N-26 éliminé car culture originale contaminée.

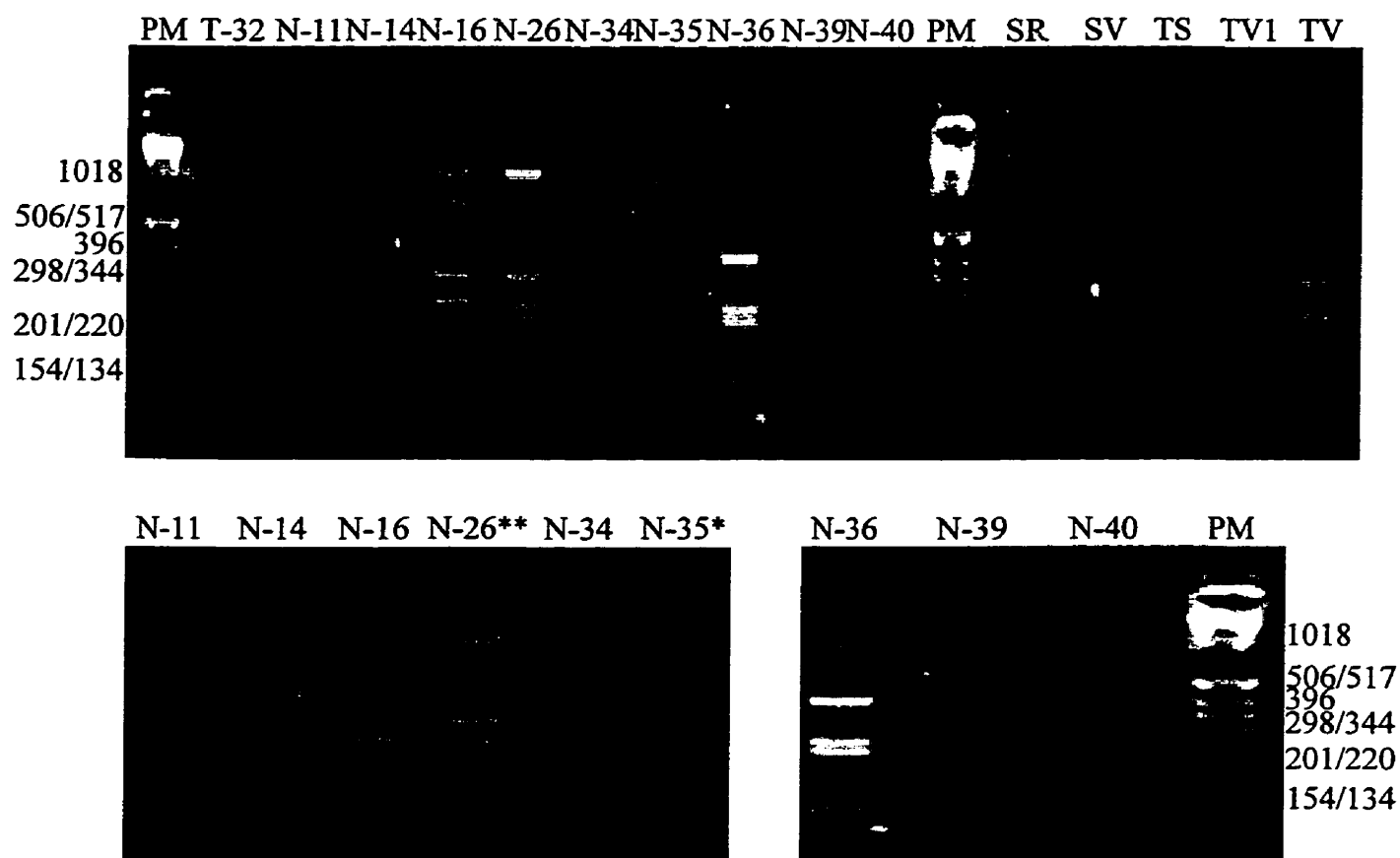


Figure 34 : Originaux des gels d'agarose 3% de la figure 18 des gènes codant pour l'ARNr 16S des actinomycètes environnementaux et ATCC digérés avec *Hha*I. PM : marqueur de poids moléculaire; T-32 à N-40 : actinomycètes environnementaux; SR : *Saccharopolyspora rectivirgula*, souche 33515; SV : *Saccharomonospora viridis*, souche 15736; TS : *Thermoactinomyces sacchari*, souche 27375; TV1 : *T. vulgaris*, souche 43649/1; TV : *T. vulgaris*, souche 15733.

*N-35 non visible.

**N-26 éliminé car culture originale contaminée.

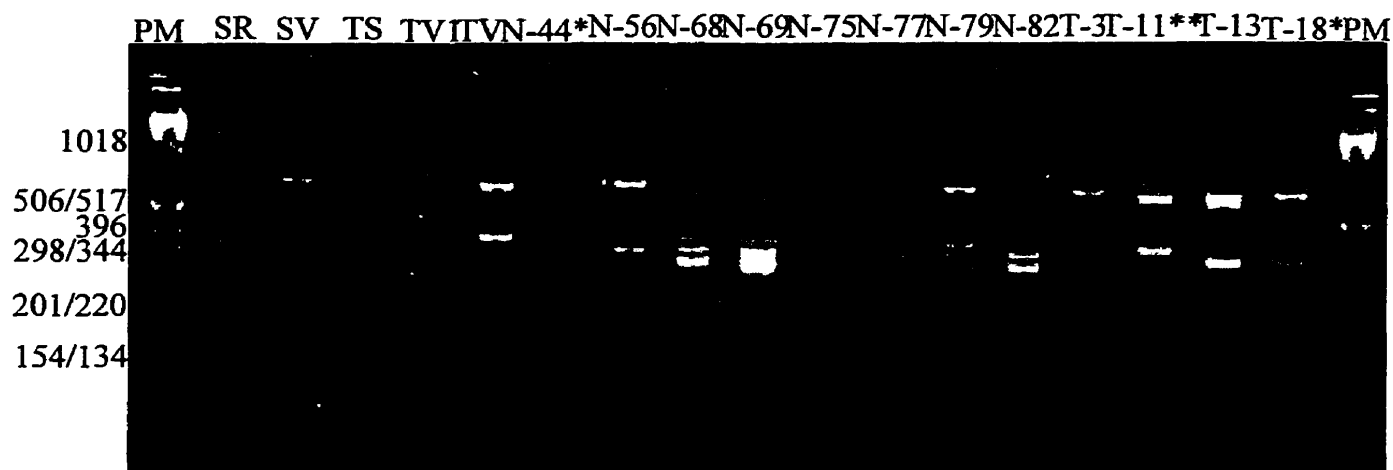


Figure 35 : Original du gel d'agarose 3% de la figure 19 des gènes codant pour l'ARNr 16S des actinomycètes environnementaux et ATCC digérés avec *Taq*^αI. PM : marqueur de poids moléculaire; SR : *Saccharopolyspora rectivirgula*, souche 33515; SV : *Saccharomonospora viridis*, souche 15736; TS : *Thermoactinomyces sacchari*, souche 27375; TV1 : *T. vulgaris*, souche 43649/1; TV : *T. vulgaris*, souche 15733; N-44 à T-18 : actinomycètes environnementaux.

*N-44 et T-18 échantillons éliminés car cultures originales contaminées.

**T-11 préparation d'ADN contaminée donc échantillon éliminé.

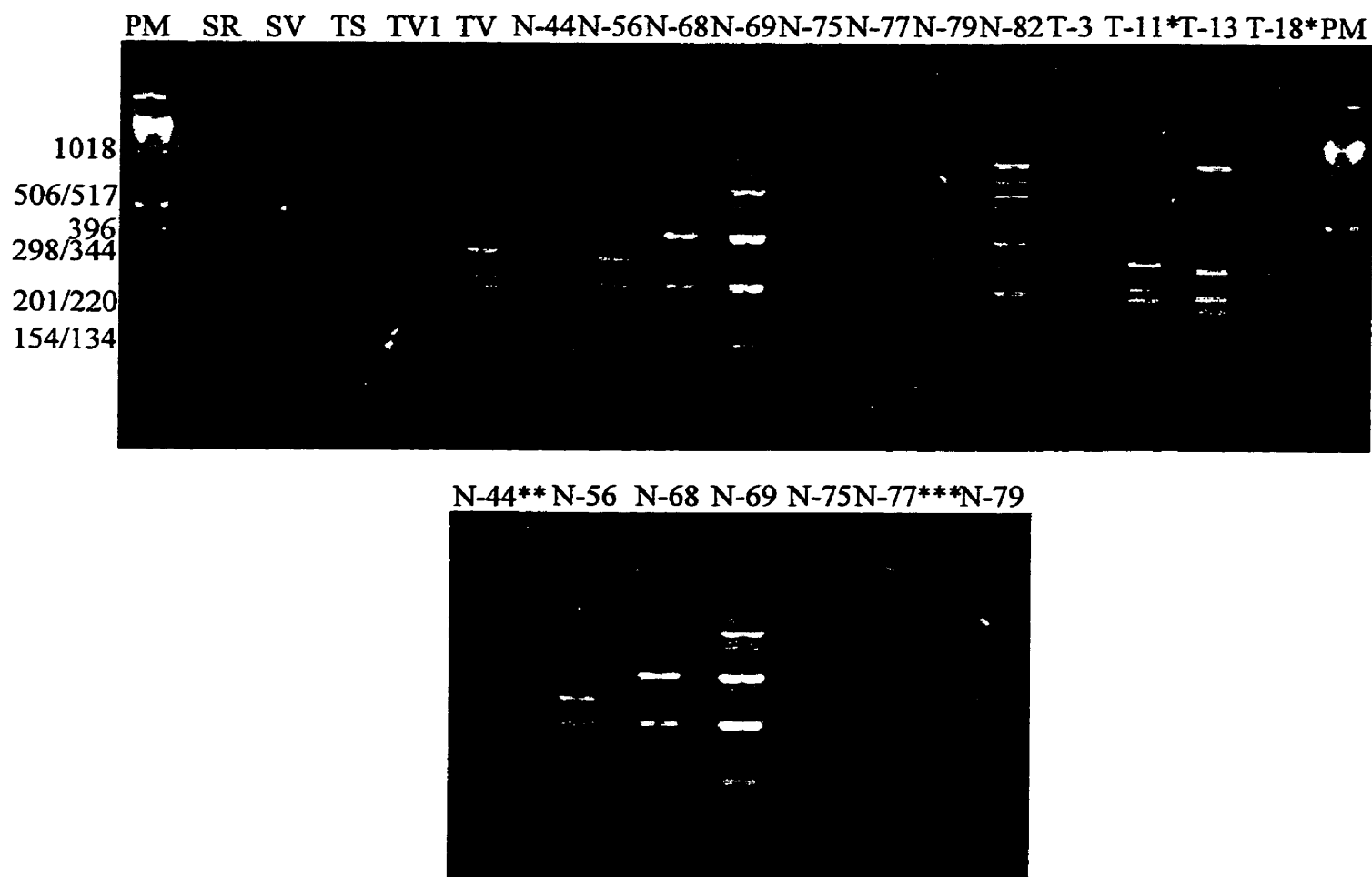


Figure 36 : Originaux des gels d'agarose 3% de la figure 20 des gènes codant pour l'ARNr 16S des actinomycètes environnementaux et ATCC digérés avec *HhaI*. PM : marqueur de poids moléculaire; SR : *Saccharopolyspora rectivirgula* 33515; SV : *Saccharomonospora viridis* 15736; TS : *Thermoactinomyces sacchari* 27375; TV1 : *T. vulgaris* 43649/1; TV : *T. vulgaris* 15733; N-44 à T-18 : actinomycètes environnementaux.

*T-11 préparation d'ADN contaminée donc échantillon éliminé.

**N-44 et T-18 échantillons éliminés car cultures originales contaminées.

***N-77 non visible mais voir **figure 38**.

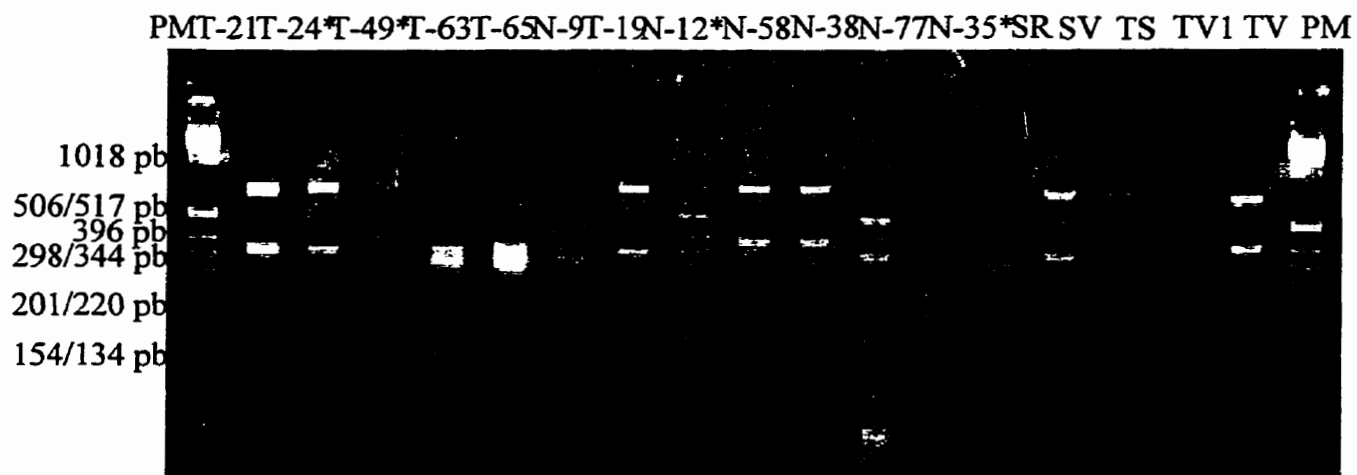


Figure 37 : Original du gel d'agarose 3% de la figure 21 des gènes codant pour l'ARNr 16S des actinomycètes environnementaux et ATCC digérés avec *Taq*^αI. PM : marqueur de poids moléculaire; SR : *Saccharopolyspora rectivirgula*, souche 33515; SV : *Saccharomonospora viridis*, souche 15736; TS : *Thermoactinomyces sacchari*, souche 27375; TV1 : *T. vulgaris*, souche 43649/1; TV : *T. vulgaris*, souche 15733; T-21 à T-40 : actinomycètes environnementaux. *N-35 non visible donc éliminé, N-12, T-24 et T-49 échantillons éliminés car préparations d'ADN contaminées, N-58 voir **figure 27.**

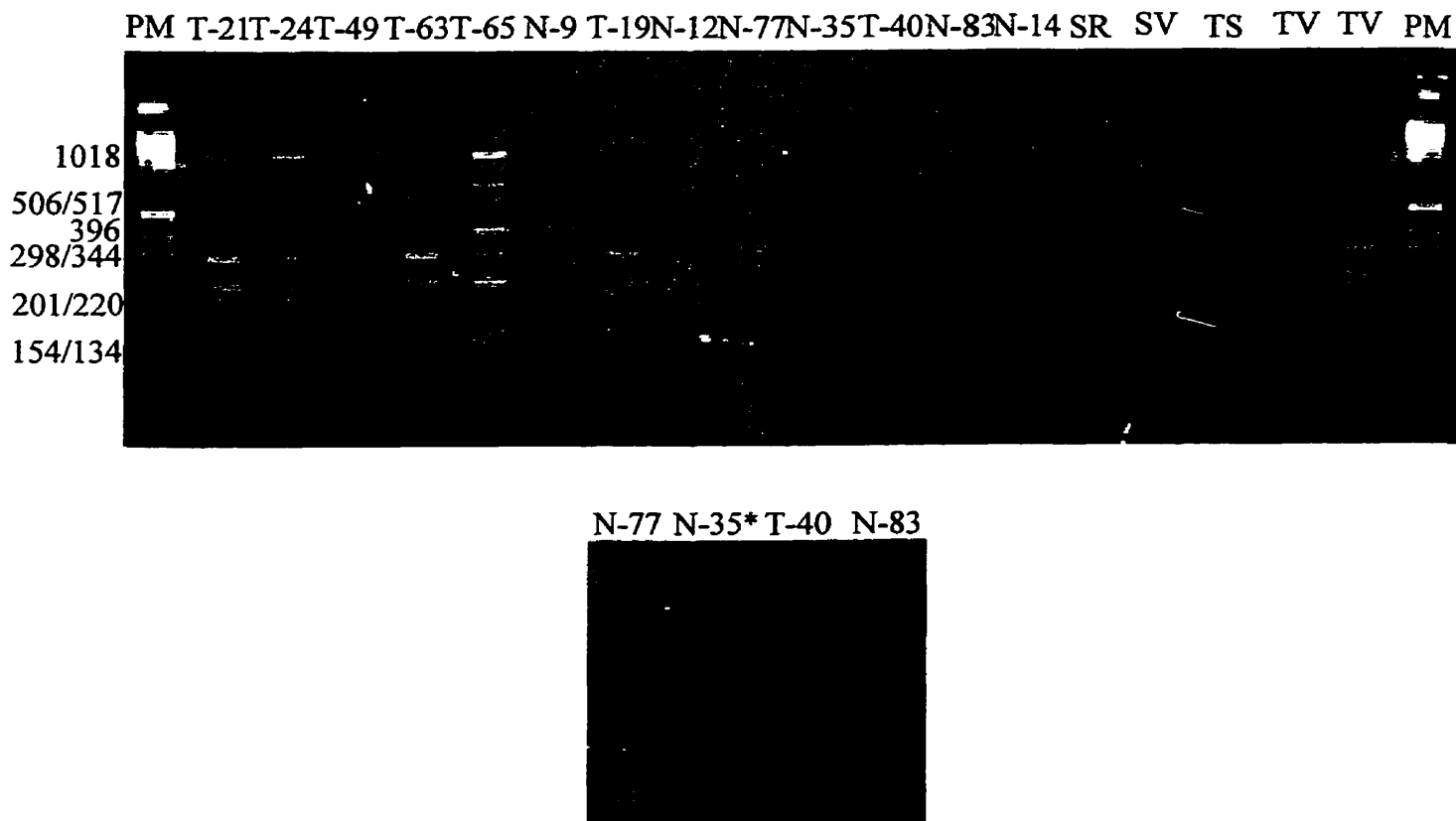


Figure 38 : Originaux des gels d'agarose 3% de la figure 22 des gènes codant pour l'ARNr 16S des actinomycètes environnementaux et ATCC digérés avec *Hha*I. PM : marqueur de poids moléculaire; T-21 à N-14 : actinomycètes environnementaux; SR : *Saccharopolyspora rectivirgula*, souche 33515; SV : *Saccharomonospora viridis*, souche 15736; TS : *Thermoactinomyces sacchari*, souche 27375; TV1 : *T. vulgaris*, souche 43649/1; TV : *T. vulgaris*, souche 15733.

*N-35 non visible donc échantillon éliminé, N-12, T-24 et T-49 échantillons éliminés car préparations d'ADN contaminées, N-58 voir **figure 28**.

ANNEXE G

Formule du calcul de l'indice de discrimination¹²⁰:

$$D = 1 - \left[\frac{1}{N(N-1)} \sum_{i=1}^s n_i(n_i-1) \right]$$

Où D = indice de discrimination

N = nombre de souches totales étudiées

s = nombre total de patrons de restrictions différents obtenus

n_i = nombre de souches similaires pour un patron de restriction observé