

Une approche d'identification moléculaire des souches d'actinomycètes productrices d'activités antimicrobiennes par séquençage de l'ADNr 16S

[A molecular approach to the identification of actinomycetes producing antimicrobial activities strains by sequencing of the 16S rDNA]

Elarbi BOUSSABER¹, Sidi Brahim Salem EL IDRISSE^{1,2}, Issam MEFTAH KADMIRI¹⁻³, Lahoucine HILALI¹, and Abderraouf HILALI¹

¹Laboratoire d'Agroalimentaire et Santé
Université Hassan 1er, Faculté des Sciences et Techniques, Settat, Maroc

²Laboratoire de polymères, rayonnement et environnement
Université Ibn Tofail, Faculté des Sciences, Kenitra, Maroc

³Unité de biotechnologie
Moroccan Foundation for Advanced Science, Innovation and Research,
Rabat, Maroc

Copyright © 2013 ISSR Journals. This is an open access article distributed under the **Creative Commons Attribution License**, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ABSTRACT: This work is a part of research of rare Actinomycetal bacteria producing antimicrobial substances that may be used in agricultural, food and pharmaceutical fields. Among the 77 strains of actinomycetes isolated from different types of Moroccan ecosystems, 25 were selected according to their biological activity for molecular identification by sequencing the 16S rDNA fragment. After DNA extraction from isolates, amplification of 16S rDNA fragments by PCR technique (Polymerase Chain Reaction), sequencing of the amplified fragments and comparison of characteristic sequences obtained with the contents of a database and phylogenetic studies using special programs were used to develop phylogenetic trees of the twenty-five isolates. The results Analysis showed the taxonomic affiliation of all isolates to the genus *Streptomyces* and assign each of them to one or more species. This shows the abundance of this kind in relation to others in the studied ecosystems. While the absence of other types of actinomycetes can be explained either by the absence of these genera in these ecosystems, or by the isolation techniques used, or by the fact that microbial population in the sample is non-culturable. Thus, in the last case, the confirmation of the presence of other types in these ecosystems could be performed by amplification of the 16S rDNA PCR from DNA mixture obtained directly from samples.

KEYWORDS: Molecular identification, sequencing, rDNA, phylogenetic trees, *Streptomyces*.

RESUME: Ce travail se situe dans un cadre de recherche des bactéries actinomycétales rares productrices des substances antimicrobiennes susceptibles d'être utilisées dans des domaines agricoles, alimentaires ou pharmaceutiques. Parmi les 77 souches d'actinomycètes isolées de différents types d'écosystèmes marocains, 25 ont été sélectionnées selon leurs activités biologiques pour une identification moléculaire par séquençage du fragment d'ADNr 16S. Après l'extraction d'ADN à partir des isolats, l'amplification des fragments d'ADNr 16S par la technique de la PCR (Polymerase Chain Reaction), le séquençage des fragments amplifiés et la comparaison des séquences caractéristiques obtenues avec le contenu d'une base de données, des études phylogéniques utilisant des programmes spéciaux ont permis d'élaborer les arbres phylogéniques des vingt-cinq isolats. L'analyse des résultats obtenus a montré l'appartenance taxonomique de tous les isolats au genre *Streptomyces* et a permis d'assigner chacun d'eux à une ou plusieurs espèces. Cela montre l'abondance de ce genre par rapport aux autres dans les écosystèmes étudiés. Alors que, l'absence des autres genres d'actinomycètes pourrait être expliquée, soit par l'absence de ces genres dans ces écosystèmes, soit par les techniques d'isolement utilisées, ou bien par le fait que la population

microbienne dans les échantillons est non cultivable. Ainsi, dans ce dernier cas, la confirmation de la présence des autres genres dans ces écosystèmes pourrait être effectuée par l'amplification de l'ADNr 16S par PCR à partir du mélange d'ADN obtenu directement d'échantillons.

MOTS-CLEFS: Identification moléculaire, Séquençage, ADNr, Arbres phylogénétiques, *Streptomyces*.

1 INTRODUCTION

Les méthodes classiques d'identification bactérienne basées sur la détermination des caractères culturels, physiologiques et métaboliques ont montré leurs limites, en particulier, pour la détection des micro-organismes non cultivables [1]. Elles n'ont conduit qu'à la description d'une très faible partie de la diversité microbienne. La taxonomie moléculaire a été mise en place à partir des années 80 et consiste à l'application des méthodes d'analyses génétiques et moléculaires, notamment la détermination du pourcentage en GC [2], l'hybridation ADN-ADN [3] et le séquençage de l'ARN ribosomique 16S [4], [5], [6]. Ces techniques ont permis de tracer toute la phylogénie des bactéries notamment, celle des actinomycètes.

Le gène ADNr 16S qui code pour l'ARNr 16S (ARN ribosomique 16S) est l'un des gènes les mieux conservés parmi les organismes procaryotes (Eubactéries et Archaea). Il a été choisi comme marqueur phylogénétique en constituant une base de comparaison efficace et fiable pour pouvoir à la fois comparer et différencier les bactéries entre elles. En effet, L'ADNr 16S :

- Comporte des séquences internes très conservées qui permettent de sélectionner des amorces universelles pour l'amplification de l'ADNr 16S de la majorité des bactéries existantes ;
- Comporte des séquences internes variables qui, une fois analysées, permettent de distinguer les espèces de bactéries entre elles et de les classer en fonction de leur phylogénie ;
- Est d'une taille suffisamment courte (~1500 pb) pour être analysé rapidement.

La corrélation des pourcentages d'identité entre séquences d'ADNr 16S et des pourcentages de réassociation ADN/ADN a montré que les séquences d'ADNr 16S ayant des similarités inférieures à 97 %, ne correspondaient jamais à des pourcentages de réassociation ADN/ADN supérieurs à 60 % [7]. Par conséquent, les séquences qui partagent moins de 97 % de similarité correspondent à des espèces différentes.

Cette technique a largement contribué dans la classification et l'identification des bactéries actinomycétales [8]. Grâce au séquençage de l'ARN 16S, certains genres bactériens non mycéliens ont été inclus dans l'ordre des *Actinomycetales*, tandis que d'autres en ont été exclus [9], [10].

Aujourd'hui, plus d'une centaine de milliers de séquences d'ARNr 16S ou du gène ADNr 16S sont mises à la disposition des scientifiques et des chercheurs sur le réseau internet, dans des bases de données généralistes comme Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), ou des bases de données spécialisées comme le ribosomal database project (RDP) (<http://rdp.cme.msu.edu/>) à l'Université du Michigan aux États-Unis ou the European ribosomal RNA database à l'Université de Gand en Belgique (<http://www.psb.ugent.be/rRNA/index.html>).

Dans ce travail, on s'est fixé comme objectif principal l'identification, par l'amplification et le séquençage de l'ADNr 16S, des bactéries actinomycétales isolées d'environnements marocains variés et productrices d'activités antimicrobiennes intéressantes.

2 MATÉRIEL ET MÉTHODES

Parmi les 77 souches d'actinomycètes isolées au Laboratoire d'agroalimentaire et santé de la Faculté des Sciences et Techniques de Settat, 25 ont fait l'objet d'une identification moléculaire par le séquençage de l'ADNr 16S. Ces souches ont été choisies et regroupées selon leurs activités antimicrobiennes (tableau 1) [11].

Les travaux de la présente étude ont été réalisés au laboratoire de séquençage, Unité d'Appui Technique à la Recherche Scientifique (UATRS) au Centre National pour la Recherche Scientifique et Technique(CNRST), Rabat, MAROC.

Tableau 1. Isolats d'actinomycètes sélectionnés pour l'identification moléculaire

N°	Isolat	Origine
1	SP2	Sol de décharge de poterie
2	SP6	
3	SP13'	
4	SDJ1'	Sol de décharge
5	SEU1	Sol irrigué par des eaux usées
6	BEU1	Boue d'eau usée
7	BEU2	
8	EBB	Eaux de barrage
9	EC3	Ecorce de <i>Casuarina sp.</i>
10	EA2	Ecorce <i>Atriplex nummularia</i>
11	SPO1	Sol phosphaté d'Oued-Zem
13	SPO6	
12	EUS2	Eaux usées
14	SFr1'	Sol de forêt
15	SFr4'	
16	SR1'	Substrat attaché aux rochers
17	Act1	Rhizosphères de conifère
18	Act2r	
19	Act3	Rhizosphères de conifère
20	Rhc1	
21	Rhc-ac1'	
22	Rhc-ac2'	
23	Rhc-ac3'	
24	Rhc-ac10'	
25	Rhc-ac4'	

2.1 EXTRACTION DE L'ADN À PARTIR DES SOUCHES D'ACTINOMYCÈTES

L'extraction de l'ADN est effectuée à partir des cultures d'actinomycètes de 48 heures en milieu liquide. Les cultures des vingt-cinq souches étudiées sont centrifugées à 10000 g pendant 30 secondes. Le culot est lavé avec 0,5 mL de Tris-EDTA à pH égal à 8. Deux centrifugations successives à 10000 g pendant 30 secondes sont réalisées. Après élimination du surnageant, l'extraction de l'ADN est réalisée selon le protocole du kit « GenElute Bacterial Genomic DNA kit » de SIGMA.

Le dosage de la concentration de l'ADN extrait à partir des vingt-cinq échantillons a été réalisé par le Nanodrop 8000.

2.2 REACTION DE POLYMERISATION EN CHAÎNE (PCR)

2.2.1 AMPLIFICATION DU FRAGMENT D'ADN RIBOSOMIQUE 16S

L'amplification de l'ADN in vitro est effectuée par la technique de la PCR (Polymerase Chain Reaction) qui permet d'obtenir un très grand nombre de copies d'une séquence d'ADN. La séquence choisie dans cette étude est le gène ribosomal 16S (1500 paires de bases).

Les gènes codant l'ARN ribosomal 16S des souches sont amplifiées par l'utilisation des amorces (ou primers) suivantes :

- Fd1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') ;
- Rp2 (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3').

L'amplification est réalisée dans un thermocycleur de type « Verity » d'Applied Biosystems. Le tableau 2 donne la composition du milieu de réaction PCR. L'opération débute par une dénaturation initiale à 96°C pendant 4 min, ensuite 35 cycles comportant 10 secondes de dénaturation à 96°C, 40 secondes d'hybridation à 52°C, 2 min d'élongation à 72 °C et enfin terminée par une élongation finale à 72°C pendant 4 min.

Tableau 2. Mélange réactionnel et quantité de réactifs utilisés pour une réaction PCR

Réactifs (Tampon et Taq platiniem d'Invitrogen)	Quantités en (µl) pour un tube
Tampon 10x	2.5
dNTP 10 mM	2
Amorces Fd1 (100 µM)	0.125
Amorce Rp2 (100 µM)	0.125
MgCL2 (50 mM)	0.75
Taq DNA polymerase 5 U/µl	0.2
H2O	14.3
ADN (30 ng/µl)	5

2.2.2 PURIFICATION DES PRODUITS DE PCR

La purification des produits de PCR a pour but d'enlever les amorces et les nucléotides (dNTPS) non utilisés durant la réaction de PCR. Elle est réalisée selon le protocole du Kit « ExoSAP-IT » qui consiste, d'abord, à mélanger dans des plaques de réaction « MicroAmp optical 96 », 5 µL du produit de la réaction de PCR et 2 µL de l'ExoSAP-IT, pour un volume final de 7 µL. Ensuite, incuber la plaque de réaction à 37°C pendant 15 min dans le thermocycleur pour dégrader les amorces et les nucléotides libres. Enfin, incuber la plaque de réaction à 80°C pendant 15 min pour inactiver l'ExoSAP-IT. Le produit de PCR est, donc, prêt à l'analyse pour le séquençage.

Après amplification, les échantillons sont analysés par électrophorèse dans un gel d'agarose à 1 % en présence d'un marqueur de poids moléculaire 100 paires de bases. Après migration, le gel est examiné sous lumière ultraviolette pour repérer les bandes amplifiées. Les photos ont été visualisées par le système de photo documentation « G Box ».

2.3 SEQUENÇAGE

La méthode de séquençage utilisée est celle automatisée en utilisant un séquenceur automatique capable de réaliser à la fois les réactions ainsi que la détermination de la séquence nucléotidique du fragment d'ADN étudié.

Dans ce travail, on a utilisé le séquenceur automatique ABI 3130 Genetic Analyser (séquenceur 16 capillaires de la société Applied Biosystems). La méthode utilisée est celle de Sanger [12] se basant sur la technologie des ddNTPs (Société Applied Biosystems). Les réactions de séquences ont été réalisées dans des plaques PCR de 96 puits en utilisant le kit de séquençage (Big Dye Terminator version 3.1 ou version 1.1 cycle sequencing –Applied Biosystems).

2.4 ANALYSE DES SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES

Les résultats du séquençage des fragments d'ADNr amplifiés ont été obtenus sous forme d'électrophorogrammes bruts. Ces derniers ont été visualisés par le logiciel SequenceScanner (Applied Biosystems) et analysés par le logiciel Chromas lite 2.1. Les alignements du couple des séquences sens/antisens sont effectués par le logiciel DNAMAN pour définir la séquence consensus. Les séquences obtenues sont comparées à des séquences homologues contenues dans la banque informatique internationale de données dénommée « GenBank » à l'aide de Blast (Basic Local Alignment Search Tool) [13] dans le site web de Genbank « <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> » afin de déterminer leur affiliation phylogénétique. Les résultats sont exprimés en pourcentage de similarité de la souche à identifier avec les espèces les plus proches, et sous forme d'arbres phylogénétiques qui montrent la position taxonomique de chaque isolat.

3 RESULTATS ET DISCUSSION

3.1 EXTRACTION ET AMPLIFICATION DU GENE DE L'ADN RIBOSOMIQUE 16S

Après extraction de l'ADN à partir des souches d'actinomycètes isolées et dosage par Nanodrop d'ADN extrait, la pureté est particulièrement analysée. La figure 1 donne les concentrations des vingt-cinq échantillons étudiés. La pureté de l'ADN est considérée comme étant correcte. En effet, la densité optique 260/280 est supérieure à 0,8 et la densité optique 230/280 est supérieure à 2 pour la majorité des échantillons.

Les fragments d'ADNr 16S ont été, ensuite, amplifiés par PCR universelle. Après l'électrophorèse des produits de la PCR, le gel d'agarose est photographié sur table UV, les bandes d'ADN ont bien migré dans la région 1500 paires de bases (Figure 2).

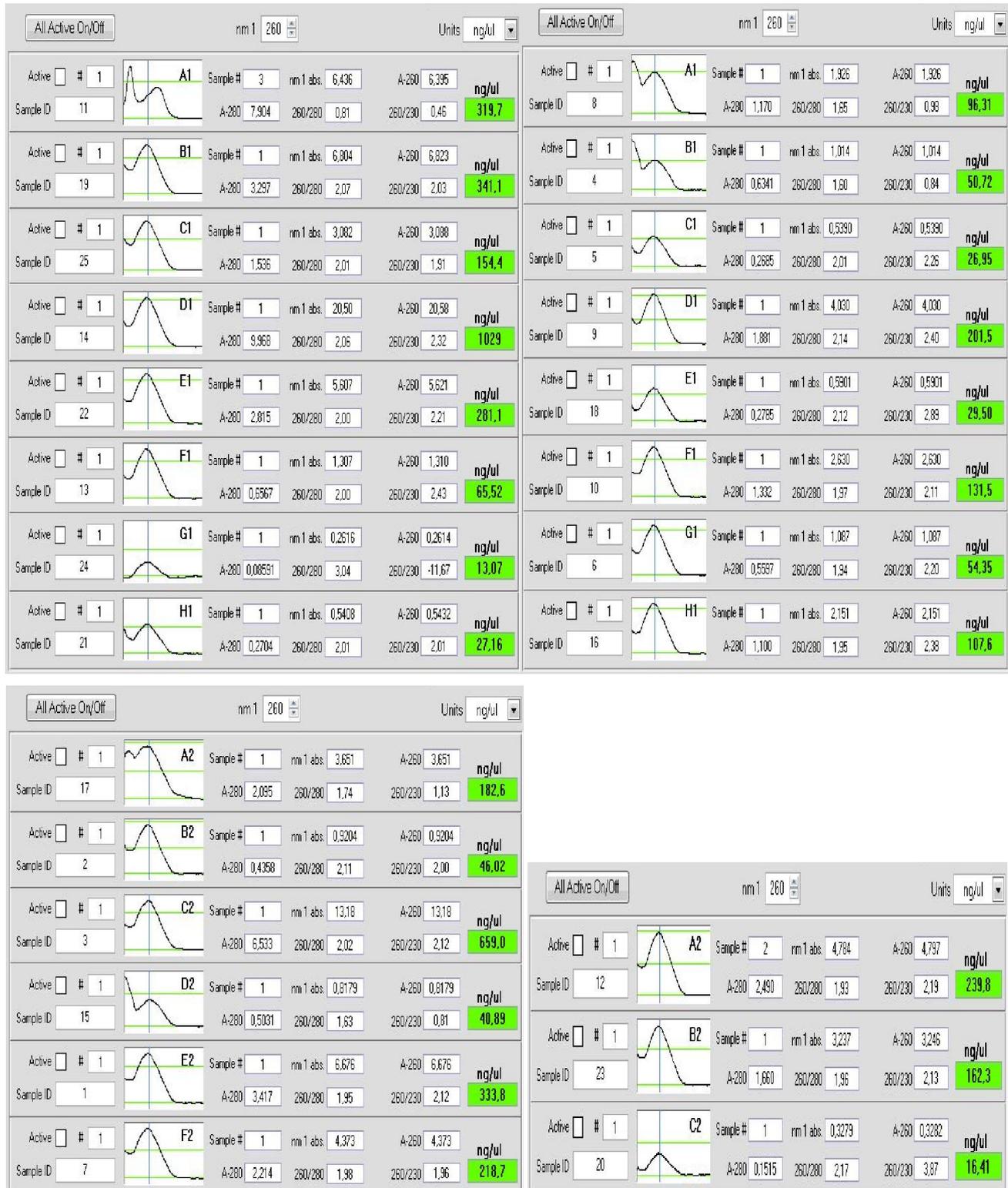


Fig. 1. Résultats du dosage d'ADN extrait par Nanodrop

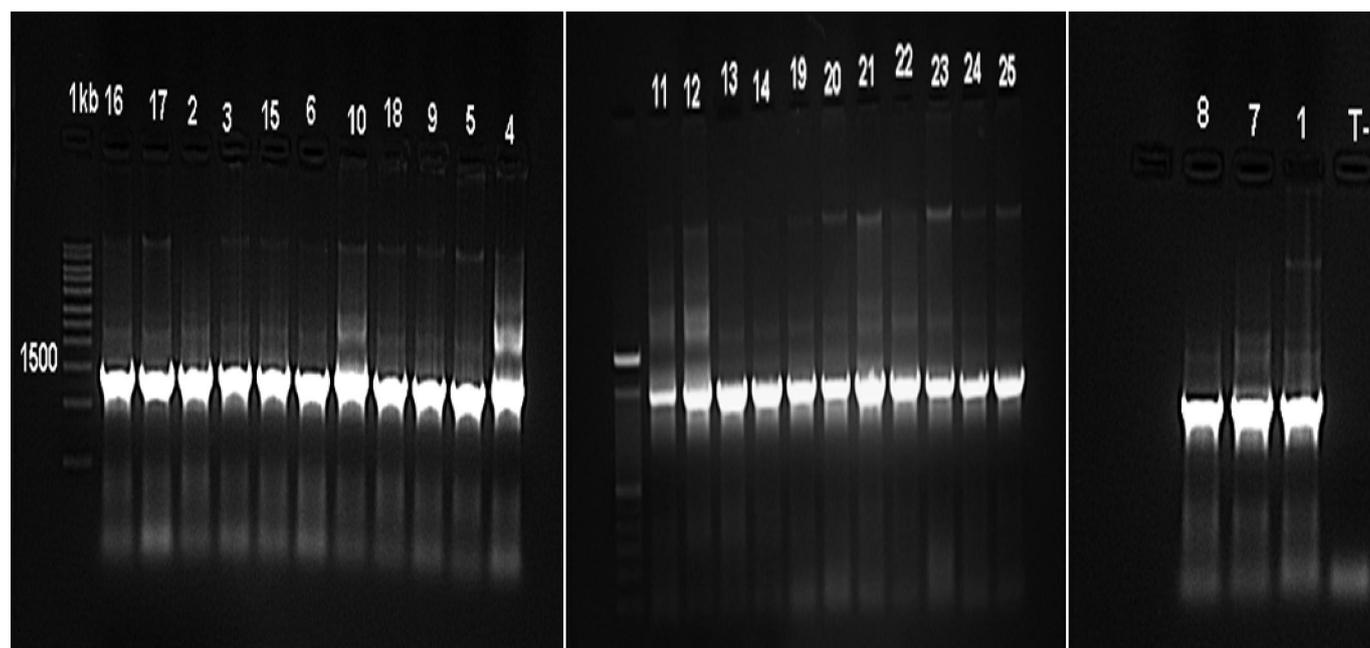


Fig. 2. Résultats de l'électrophorèse des produits de la PCR des vingt-cinq souches étudiées

3.2 SEQUENÇAGE DES FRAGMENTS D'ADN RIBOSOMIQUE 16S

Le séquençage des fragments obtenus, sous forme d'électrophorégrammes, permet d'accéder à la diversité des actinomycètes présents dans les échantillons étudiés.

Les électrophorégrammes obtenus par le logiciel SequenceScanner (Applied Biosystems), relatifs aux vingt-cinq souches d'actinomycètes, ont été analysés par le logiciel Chromas lite 2.1 pour déterminer les séquences nucléotidiques de chaque échantillon.

3.3 ALIGNEMENT ET COMPARAISON DES SEQUENCES OBTENUES AVEC CELLES CONTENUES DANS LA BANQUE DE DONNEES « GENBANK »

Les couples des séquences sens/antisens, ainsi obtenues, sont alignés par le logiciel DNAMAN pour définir les séquences consensus. Ces dernières sont comparées à des séquences disponibles au niveau de la banque informatique internationale (GenBank). Les résultats sont exprimés en pourcentage de similarité de la souche à identifier avec les espèces les plus proches.

L'alignement des séquences nucléotidiques avec celles de la banque de données montrent que les 25 souches d'actinomycètes isolées sont classées dans le phylum des *Actinobacteria*, la classe V des *Actinobacteridae* et l'ordre I des *Actinomycetales* et toutes font partie au genre *Streptomyces*.

Chaque isolat présente une similitude avec plusieurs espèces de la banque de donnée « Genbank ». Pour affilier chacun des isolats à l'une des espèces les plus proches, une analyse phylogénétique est donc nécessaire.

3.4 ANALYSE PHYLOGENETIQUE

Les arbres phylogénétiques représentent les relations phylogénétiques entre les séquences nouvellement obtenues et des séquences de référence dans les banques de données. Ils ont été construits par la méthode des distances Neighbor-Joining par le programme Blast. C'est une méthode de distance basée sur le nombre moyen de substitutions nucléotidiques entre des séquences prises deux à deux. Elle permet de trouver les paires de séquences les plus voisines qui minimisent la somme des longueurs des branches de chaque étape de regroupement.

Les figures 3, 4, 5 et 6 représentent les différents types d'arbres qui ont été élaborés pour déterminer l'appartenance taxonomique aux espèces les plus similaires à l'isolat SP13'. Ce dernier est pris comme exemple afin de montrer la démarche suivie pour trouver les espèces très similaires aux vingt-cinq souches d'actinomycètes concernées.

La figure 3 montre l'affiliation de cet isolat au groupe des bactéries Gram positives dont le coefficient de Chargaff (G+C %), est élevé. Chez les actinomycètes, ce coefficient est supérieur à 55 %, généralement compris entre 60 et 75 % [14]. Cela confirme l'appartenance de l'isolat SP13' aux bactéries actinomycétales.

Dix-sept espèces appartenant au genre *Streptomyces* présentent des séquences très similaires à l'isolat SP13' (figure 3, 4). Le pourcentage de similarité varie entre 97 % et 98 % (tableau 3). Les arbres phylogénétiques élaborés sous forme triangulaire (figure 5) et radiale (figure 6), où les nœuds sont écartés les uns des autres pour une meilleure présentation, montrent que *Streptomyces crystallinus* NBRC 15401 est l'espèce la plus apparentée à la souche SP13'.

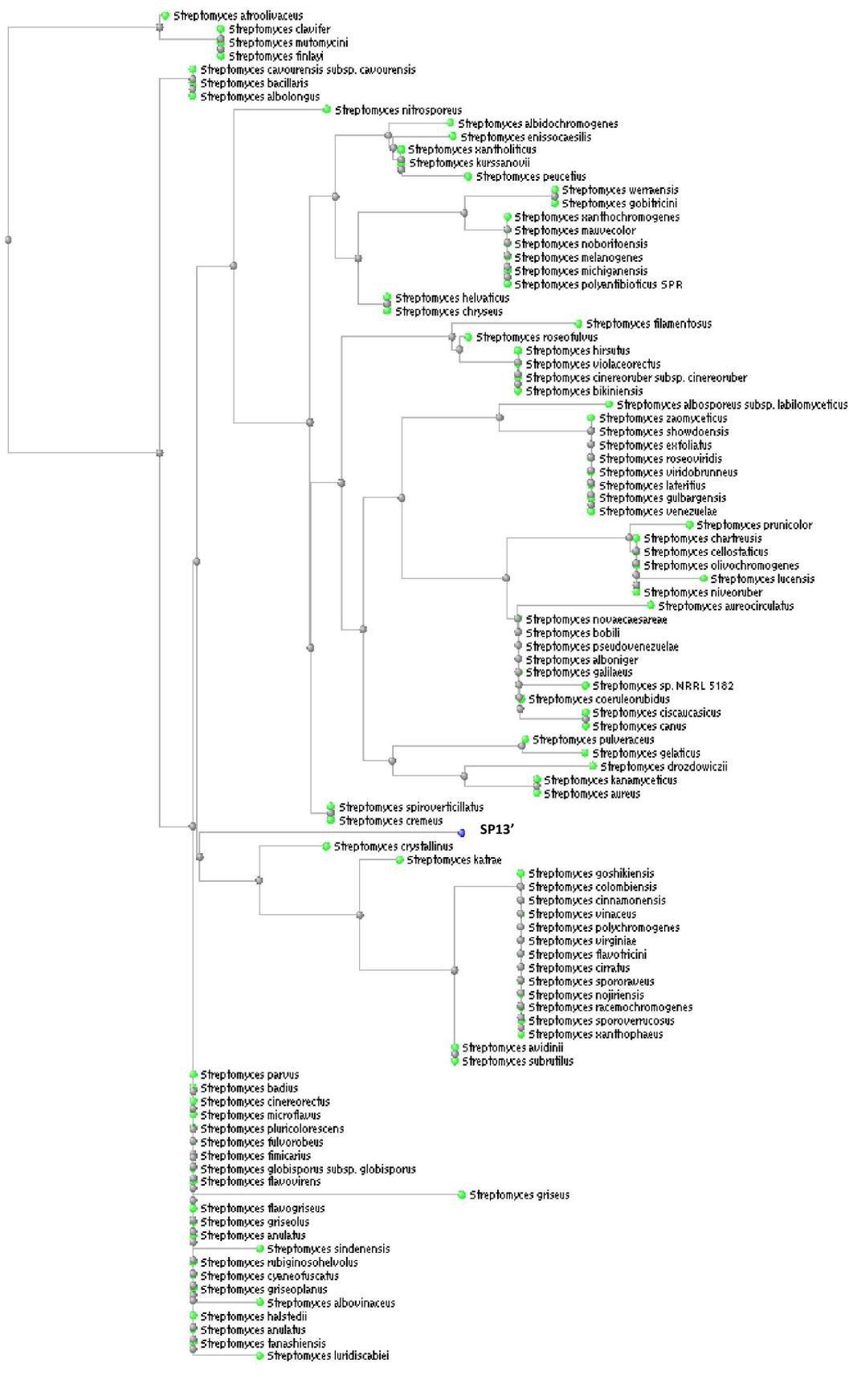


Fig. 3. Arbre phylogénétique basé sur les gènes codant l'ARNr 16S montrant la position de l'isolat SP13'

Tableau 3. Espèces proches de l'isolat SP13' et leur degré de similarité

Espèces proches	Degré de similarité	Accession
<i>Streptomyces crystallinus</i> NBRC 15401	98 %	NR_041177.1
<i>Streptomyces avidinii</i> NBRC 13429	98 %	NR_041132.1
<i>Streptomyces subrutilus</i> DSM 40445	98 %	NR_026203.1
<i>Streptomyces sporoverrucosus</i> NRRL B-16379	98 %	NR_043837.1
<i>Streptomyces goshikiensis</i> NRRL B-5428	98 %	NR_044147.1
<i>Streptomyces colombiensis</i> NRRL B-1990	98 %	NR_043494.1
<i>Streptomyces cinnamomensis</i> NBRC 15873	98 %	NR_041194.1
<i>Streptomyces vinaceus</i> NBRC 13425	98 %	NR_041131.1
<i>Streptomyces polychromogenes</i> NBRC 13072	98 %	NR_041109.1
<i>Streptomyces virginiae</i> NBRC 12827	98 %	NR_041078.1
<i>Streptomyces flavotricini</i> NRRL B-5419	98 %	NR_043380.1
<i>Streptomyces cirratus</i> NRRL B-3250	98 %	NR_043356.1
<i>Streptomyces spororaveus</i> LMG 20313	98 %	NR_042306.1
<i>Streptomyces nojiriensis</i> LMG 20094	98 %	NR_042303.1
<i>Streptomyces racemochromogenes</i> NRRL B-5430	97 %	NR_043499.1
<i>Streptomyces katrae</i> NBRC 13447	97 %	NR_041136.1
<i>Streptomyces xanthophaeus</i> NRRL B-5414	97 %	NR_043848.1

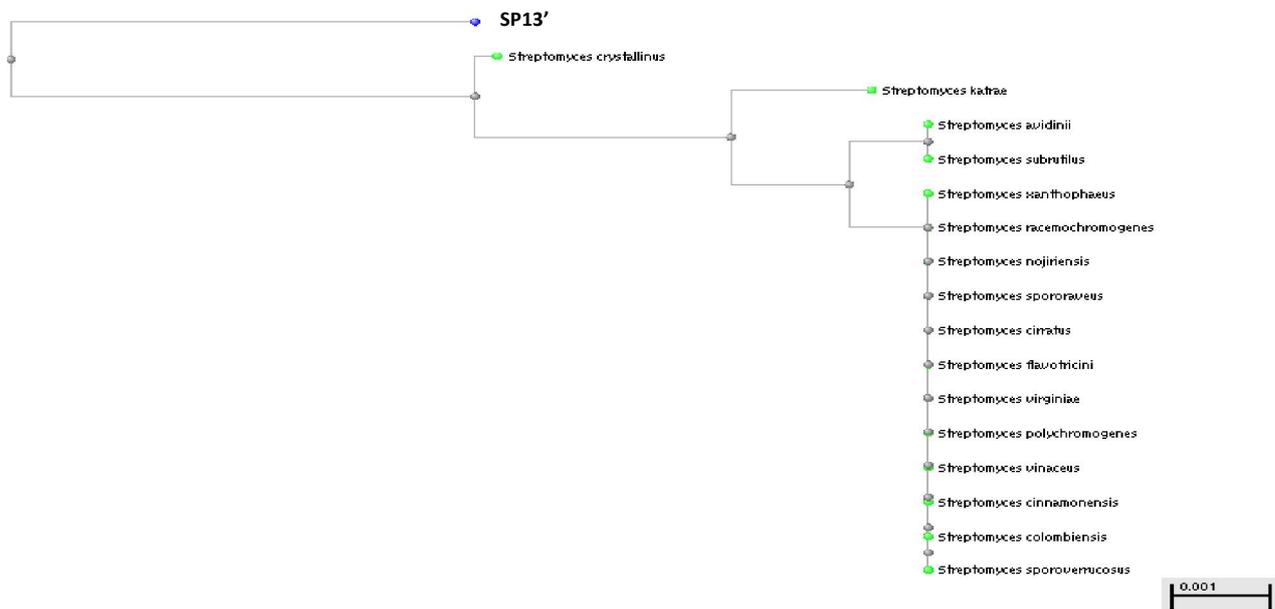


Fig. 4. Arbre phylogénétique basé sur les gènes codant l'ARNr 16S montrant l'affiliation de SP13'

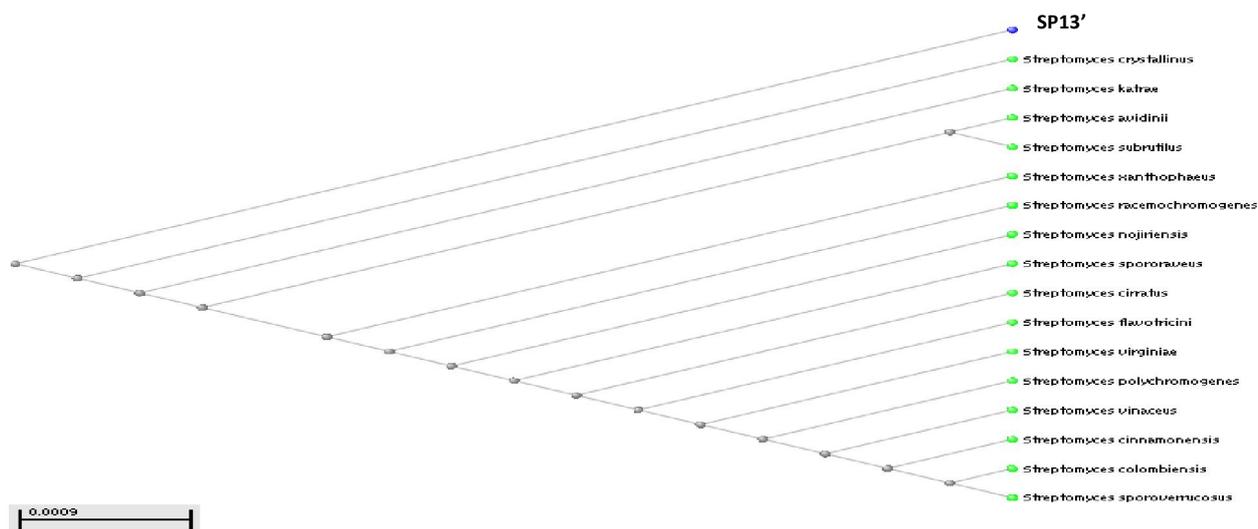


Fig. 5. Arbre phylogénétique sous forme triangulaire basé sur les gènes codant l'ARNr 16S montrant l'affiliation de SP13'

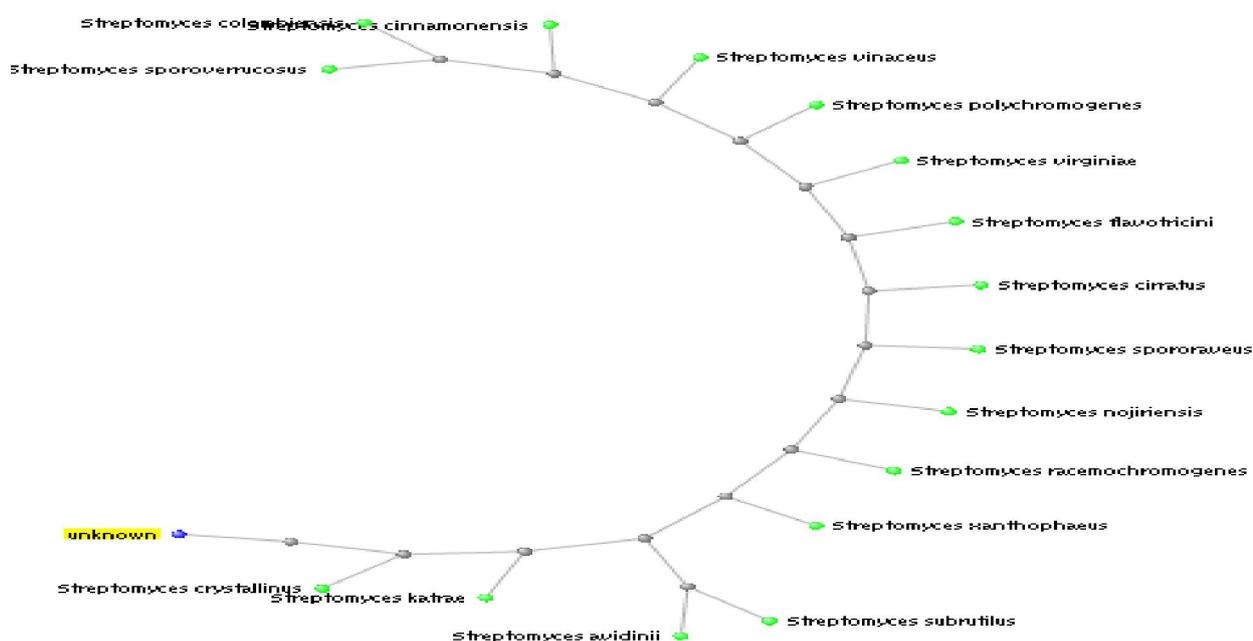


Fig. 6. Arbre phylogénétique sous forme radiale basé sur les gènes codant l'ARNr 16S montrant l'affiliation de la souche SP13'

Le même travail a été effectué pour les vingt-quatre autres souches. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau 4. Chaque isolat présente une forte similitude avec une ou plusieurs espèces. 19 (76 %) isolats présentent des pourcentages de similarité supérieurs ou égal à 97 %, 5 (20 %) présentent des pourcentages de similarité compris entre 90 et 96 % et c'est seulement 1 (0,4 %) qui présente une similarité de 74 %.

Lorsqu'il existe moins de 97 % de similarité entre les séquences des ADNr 16S de deux souches, ces souches appartiennent à des espèces différentes [7]. Par contre, si le pourcentage de similarité est égal ou supérieur à 97 %, l'affiliation taxonomique à une unique espèce ou à deux espèces différentes nécessite la mise en œuvre d'autres techniques, telle que celle se basant sur les hybridations ADN-ADN.

Tableau 4. Espèces proches des vingt-cinq souches d'actinomycètes étudiées et leurs degrés de similitude

Isolat	Espèces proches	Degré de Similarité	N° d'accèsion
SP2	<i>Streptomyces parvus</i> NRRL B-1455	99 %	NR_043833.1
	<i>Streptomyces badius</i> NRRL B-2567	99 %	NR_043350.1
SP6	<i>Streptomyces cavourensis</i> subsp. <i>Cavourensis</i> NRRL 2740	98 %	NR_043851.1
SP13'	<i>Streptomyces crystallinus</i> NBRC 15401	98 %	NR_041177.1
SDJ1'	<i>Streptomyces alanosinicus</i> NBRC 13493	74 %	NR_041148.1
SEU1'	<i>Streptomyces melanogenes</i> NBRC 12890	97 %	NR_041089.1
BEU1	<i>Streptomyces globisporus</i> subsp. <i>Globisporus</i> NRRL B-2872	97 %	NR_044145.1
BEU2	<i>Streptomyces cellulosa</i> NRRL B-2889	98 %	NR_043815.1
EBB	<i>Streptomyces flavovirens</i> NRRL B-2685	97 %	NR_043487.1
EC3	<i>Streptomyces badius</i> NRRL B-2567	98 %	NR_043350.1
EA2	<i>Streptomyces iakyrus</i> NBRC 13401	93 %	NR_041231.1
SPO1	<i>Streptomyces viridodiataticus</i> IFO 13106	95 %	NR_043367.1
EUS2	<i>Streptomyces griseus</i> KACC 20084	92 %	NR_042791.1
SPO6	<i>Streptomyces cinnabarinus</i> NBRC 13028	91 %	NR_041097.1
SFr1'	<i>Streptomyces melanogenes</i> NBRC 12890	98 %	NR_041089.1
SFr4'	<i>Streptomyces rectiviolaceus</i> NRRL B-16374	98 %	NR_043502.1
SR1'	<i>Streptomyces badius</i> NRRL B-2567	98 %	NR_043350.1
Act1	<i>Streptomyces coeruleorubidus</i> NBRC 12761	98 %	NR_041217.1
Act2r	<i>Streptomyces peucetius</i> JCM 9920	98 %	NR_024763.1
Act3	<i>Streptomyces badius</i> NRRL B-2567	98 %	NR_043350.1
Rhc1	<i>Streptomyces crystallinus</i> NBRC 15401	98 %	NR_041177.1
Rhc-ac1'	<i>Streptomyces griseoflavus</i> LMG 19344	97 %	NR_042291.1
Rhc-ac2'	<i>Streptomyces sampsonii</i> ATCC 25495	96 %	NR_025870.1
Rhc-ac3'	<i>Streptomyces humiferus</i> DSM 43030	98 %	NR_025250.1
Rhc-ac10'	<i>Streptomyces ciscaucasicus</i> NBRC 12872	97 %	NR_041085.1
	<i>Streptomyces canus</i> NRRL B-1989	97 %	NR_043347.1
	<i>Streptomyces plumbiresistens</i> CCNWHX 13-160	97 %	NR_044518.1
Rhc-ac4'	<i>Streptomyces</i> sp. 40003	98 %	NR_042760.1
	<i>Streptomyces tendae</i> ATCC 19812	98 %	NR_025871.1

4 CONCLUSION

Après amplification par PCR de l'ADNr 16S des isolats et comparaison des séquences obtenues avec celles des espèces d'actinomycètes disponibles au niveau des bases de données (GenBank) en utilisant le programme Blast, les 25 souches étudiées ont été assimilées au genre *Streptomyces* avec des pourcentages d'homologies allant de 74 % à 99 %. Ces résultats confirment donc l'abondance des *Streptomyces* par rapport aux autres dans les écosystèmes étudiés. L'absence des autres genres d'actinomycètes pourrait être expliquée soit par l'absence de ces genres dans les écosystèmes étudiés, soit à cause des techniques d'isolement utilisées. En plus, seulement 0,001 à 15 % de la population microbienne présente dans les différents écosystèmes serait cultivable [15]. La confirmation de la présence des autres genres dans ces écosystèmes pourrait être effectuée par amplification du gène codant pour l'ARNr 16S par PCR à partir du mélange d'ADN obtenu directement d'échantillons [16]. En effet, la caractérisation d'un organisme en terme de phylotype ne nécessite qu'une séquence génétique et non pas une cellule fonctionnelle. Ce qui pourrait permettre la détection de microorganismes inaccessibles en culture.

Les techniques moléculaires, principalement celles basées sur l'analyse des séquences d'ADNr 16S, permettent, donc, la mise en évidence de la diversité phylogénétique dans les différents types d'écosystèmes.

Des études antérieures ont montré que ces souches d'actinomycètes (*Streptomyces*) présentent une activité antimicrobienne intéressante. Mais, pour certains auteurs, les métabolites bioactifs d'intérêts pharmaceutiques isolés à partir des *Streptomyces* ont été largement exploités. Ils suggèrent qu'il faudrait s'orienter vers la recherche et l'isolement des bactéries actinomycétales autres que les *Streptomyces* afin de découvrir des substances bioactives nouvelles [17], [18], [19], [20], [21],[22], [23]. Par contre, les travaux d'autres chercheurs qui se sont lancés dans des screenings de toute la flore actinomycétale sans écarter les *Streptomyces*, ont montré que les *Streptomyces* constituent encore une ressource d'antibiotiques et de diverses substances pharmaceutiques très intéressantes [24], [25], [6].

REFERENCES

- [1] Douga Catherine, Joel Dore, Abdelghani Sghir, "La diversité insoupçonnée du monde microbien," *MEDECINE/SCIENCES*, vol. 21, pp. 290-296, 2005.
- [2] Chargaff, E. and Vischer E., "The composition of the desoxyribose nucleic acids of thymus and spleen," *J. Biol. Chem.*, vol. 177, pp. 405-416, 1949.
- [3] Labeda D. P., "DNA-DNA hybridization in the systematics of *Streptomyces*," *Gene.*, Vol. 115, pp. 249-253, 1992.
- [4] Jeffrey, L. S. H., "Isolation, characterization and identification of actinomycetes from agriculture soils at Semongok, Sarawak," *African Journal of Biotechnology*, Vol. 7, n°. 20, pp. 3697-3702, October, 2008.
- [5] Afifi M.M., H. M. Atta, A.A. Elshanawany, U.M. Abdoul-raouf and A.M. El-Adly, "Biosynthesis of Hygromycin-B Antibiotic by *Streptomyces crystallinus* AZ151 Isolated from Assuit, Egypt," *Bacteriol. J.*, vol. 2, pp. 46-65, 2012.
- [6] Boughachiche Faiza, "Étude de molécules antibiotiques secrétées par des souches appartenant au genre *Streptomyces*, isolées de Sebkhah," *Thèse de doctorat, Université Mentouri- Constantine, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Algérie*, 164p, 2012.
- [7] Stackebrandt E., and Goebel B. M., "Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequences analysis in the present species definition in bacteriology," *Int. J. Syst. Bacteriol.*, vol. 44, pp. 846-849, 1994.
- [8] Laurent F.J., Provost F., Boiron P., "Rapid identification of clinically relevant *Nocardia* species to genus level by 16S rRNA gene PCR," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 37, pp. 99-102, 1999.
- [9] Kim B. S., Lonsdale J., Seong C.N., et Goodfellow M., "*Streptacidiphilus* gen. nov., acidophilic actinomycetes with wall chemotype I and emendation of the family *Streptomycetaceae*," *Ant. V Leeuwenhoek.*, vol. 83, pp. 107-116, 2003.
- [10] Labeda D. P., Goodfellow M., Brown R., Ward A. C., Lanoot B., Vannanneyt M., Swings J. et al., "Phylogenetic study of the species within the family *Streptomycetaceae*," *Antonie van Leeuwenhoek*, vol. 101, pp. 73-104, 2012.
- [11] Boussaber Elarbi, "Isolement et identification des souches d'actinomycètes productrices de substances antimicrobiennes à partir de différents types d'écosystèmes marocains," *Thèse de doctorat, Université Hassan 1^{er}, FST Settat, Maroc*, 232p, 2013.
- [12] Sanger F., Nicklen S. et Coulson A.R., "DNA sequencing with chain terminating inhibitors," *Proc Nat Acad Sci USA*, Vol. 74, pp. 5463-5467, 1977.
- [13] Altschul S. F., Madden T. L., Schaffer A. A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D. J. Gapped, "BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs," *Nucleic Acids Res.*, vol. 25, pp. 3389-3402, 1997.
- [14] Chun J., Youn H.-D., Yim Y.-I., Lee H., Kim M. Y., Hah Y.C., Kang S.O., "*Streptomyces seoulensis* sp.," *Nov. Int. J. syst. Bact.*, vol. 47, pp. 492-498, 1997.
- [15] Amann R. I., Ludwig W. and Schleifer K.-H., "Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation," *Microbiol. Rev.*, vol. 59, pp. 143-169, 1995.
- [16] Meftah k. I., Boussaber E., Amahdar L., Abboussi O., Amghar S., Hilali L. et Hilali A., "An improved extraction procedure of DNA from the "El Halassa" phosphate deposit (Khouibga, Morocco)," *Engineering Science and Technology Int. J. (ESTIJ)*, vol. 2, n°. 6, pp. 1002-1008, 2012.
- [17] SHEARER MC, "Methods for the isolation of non-streptomycetes actinomycetes," *J. Ind. Microbiol.*, vol. 28, pp. 91-8, 1997.
- [18] Ouhdouch, Y., Barakate, M., Finace, C., "Actinomycetes from Moroccan Habitats: Screening for antifungal activities," *Eur. J. soil Biol.*, vol. 37, pp. 1-6, 2001.
- [19] LAMARI L., ZITOUNI A., "New dithiopyrrolone antibiotics from *Saccharothrix* sp. SA 233. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities," *J. Antibiot.* Vol. 55, pp. 696-701, 2002.
- [20] Zakharova O S OS, G M GM Zenova, and D G DG Zviagintsev, "Selective isolation of actinomycetes of the genus *Actinomadura* from soil," *Mikrobiologija*, vol. 72, n°. 1, pp. 126-30, 2003.

- [21] Zitouni A, Boudjella.H, Lamari L, Badji.B, Mathieu.F, Lebrihi A, Sabaou. N., "Nocardiosis and Saccharothrix genera in saharan soils in Algeria: Isolation, biological activities and partial characterization of antibiotics," *Res. Microbio.*, Vol. 42, pp. 1-10, 2005.
- [22] Hilali L., "Isolement et sélection de souches d'actinomycètes productrices de substances antifongiques de structure non-polyénique. Production, extraction, purification de métabolite active et étude taxonomique," *Thèse de doctorat : Université Hassan II- Faculté des sciences (Maroc)*, 177p, 2006.
- [23] Marinelli F., "Antibiotics and *Streptomyces*: the futur and antibiotic discovery," *Microbiol. Today*, vol. 2, pp. 20-23, 2009.
- [24] BORAMORA A., ATTILI A., ARENGHI F., "A novel chimera : "the truncated hemoglobin-antibiotic monooxygenase" from *Streptomyces avermitilis*," *Gene*, vol. 393, pp. 52-61, 2007.
- [25] Smaoui S., "Purification et caractérisation de biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés," *Thèse de Doctorat en Génie de Procédés et Environnement, Université de Toulouse, France*, 251p, 2010.