

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



Université deGhardaïa

N° d'ordre :

N° de série :

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la terre
Département de Biologie

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de

MASTER

Domaine : Sciences de la nature et de la vie

Filière :Sciences biologiques

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Présentées Par: Belharache fatiha &Nettache yasmine

Thème

**Recherche dans les sols sahariens d'actinobactéries actives
contre des dermatophytes anthropophiles et zoophiles**

Soutenu publiquement le: Devant le jury: 12/06/2023

M. BAKELLI Aissa

Maître de Conférences B

Univ. Ghardaïa

Président

M. BELGHIT Said

Maître de Conférences A

Univ. Ghardaïa

Encadrant

Mme.DJEMOUAI Nadjette

Maître de Conférences B

Univ. Ghardaïa

Examinatrice

2022/2023

DEDICACES

Avant tout, nos sincères remerciements reviennent à
Allah le tout puissant pour tous ses dons.

À l'homme de ma vie, mon exemple éternel, mon soutien
moral et source de la joie et de bonheur celui qui s'est
toujours sacrifié pour me voir réussir, à toi mon Papa.

À la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la
flamme de mon cœur, ma vie et mon bonheur ; Maman que
j'adore.

À mes deux adorables frères Mohammed et Abel illah ,
vous m'avez toujours soutenu durant toutes mes études,
je vous souhaite une vie pleine de joie de bonheur et de
réussite.

À ma sœur Nour et houda adorée à qui je souhaite toute
la réussite.

À mes belles-sœurs wissame ,karima ,soundous, qui je
souhaite tout le Bonheur.

À mon adorable binôme Yasmine avec qui ont a passé de
très bonmoment en réalisant ce travail et a toute sa
famille.

À toute ma chère famille **Belharache**,

Fatiha

DEDICACES

Je dédie ce travail :

À mes chers parents

Mon cher Papa SAID,

Signe de fierté et d'honneur, ce travail est le votre,
Inchallah tu trouveras ici toute mon affection et ma
profonde gratitude pour toutes ces années de sacrifice
pour moi.

Ma chère Maman ROKAYA

Nul mot ne parviendra jamais à exprimer l'amour que je
te porte. Ton amour, ta patience, ton encouragement et
tes prières ont été pour moi le gage de la réussite.
J'espère que ce travail soit à tes yeux le fruit de tes
efforts et un témoignage de ma profonde affection.

À Mon frère et mes sœurs pour leur dévouement, leur
compréhension et leur grande tendresse et de m'avoir
encouragé tout le long de mes études

Et tout la famille NETTACHE

A tous mes amies et amie qui sont chers

Fatiha, Marwa, fatima, Zineb, Ilyas. qu'ALLAH vous
garde pour moi.

Yasmine

REMERCIEMENTS

Avant tous nous remercions **ALLAH**, le tout puissant de nous avoir aidé à surmonter toutes les difficultés lors de nos études et sur lequel nous nous appuyons avant toute chose.

Ce travail a été réalisé au sein de Laboratoire de Microbiologie
Université de Ghardaïa

Nous tenons en premier lieu à exprimer nos sincères remerciements à notre encadrant Mr **BELGHIT Saïd** Maitre de Conférences A à l'Université de Ghardaïa de nous avoir dirigé, de nous avoir passionnément corrigé ce manuscrit, ainsi que son aide, ses précieux conseils, sa disponibilité et ses encouragements.

Nous tenons à remercier Mr **Bakelli Aïssa**, Maitre de Conférences B à l'université de Ghardaïa, qui nous a fait l'honneur en acceptant d'examiner notre travail et de présider le jury de soutenance.

Nous tenons à remercier également Mme **DJEMOUAI Nadjette**, Maitre de conférences B à l'Université de Ghardaïa, d'avoir accepté de donner une partie de son temps précieux pour l'évaluation de ce mémoire et apporter ses remarques pour améliorer notre manuscrit.

Sommaire

REMERCIEMENTS

INDEX DES FIGURES

INDEX DES TABLEAUX

Liste des abréviations

ملخص

ABSTRACT

RESUME

Introduction..... 1

CHAPITRE I

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Généralités sur les actinobactéries

1. Définition et notions générales.....	03
2. Ecologie des actinobactéries.....	03
3. Morphologie.....	03
4. Taxonomie.....	04
5. Critères d'identification des actinobactéries.....	05
5.1. Critères morphologiques.....	05
5.2. Critères chimiques.....	06
5.3. Critères physiologiques et biochimiques.....	06
5.4. Critères moléculaires.....	06
6. Importance des actinobactéries.....	07

II. Généralités sur les antifongiques

1. Mécanisme d'action des antifongiques.....	08
2. Les antifongiques produits par les actinobactéries.....	08
2.1. L'amphotéricine B.....	08
2.2. Nystatine.....	10
2.3. Autres antifongiques produits par les actinobactéries.....	10

III. Les dermatophytes et les dermatomycoses.....

10

1. Généralités	11
2. Origine et modalité de la contamination.....	11
2.1. Les espèces anthropophiles.....	11
2.2. Les espèces zoophiles.....	12
2.3. Les espèces géophiles.....	12
3. Classification.....	12
4. Physiopathologie.....	14
5. Diagnostic.....	14
6. Les Facteurs favorisants.....	16
7. Le traitement.....	16
8. Répartitions géographiques.....	16

CHAPITRE II

Matériel et méthodes

1. Sites de prélèvement d'échantillons de sols.....	18
2. Isolement d'actinobactéries.....	18
2.1. Prétraitement des échantillons.....	18
2.2. Milieux d'isolement et agents sélectifs.....	19
2.3. Ensemencement des échantillons.....	19
2.4. Incubation.....	20

2.5. Sélection, purification et conservation des isolats d'actinobactéries.....	20
3. Caractérisation morphologique des isolats.....	21
3.1. Caractérisation macromorphologique.....	21
3.2. Caractérisation micromorphologique.....	21
4. Criblage de l'activité antifongique sur milieux solide.....	21
4.1. Préparation des cultures des actinobactéries.....	21
4.2. Les germes cibles.....	22
4.3. Technique de stries croisées.....	22
5. Cinétique de production des antifongique en milieu liquide.....	23
5.1. Milieux de culture.....	23
5.2. Pré-cultures.....	23
5.3. Cinétique de production des antifongique.....	23

CHAPITRE III

Résultats et discussions

1. Résultats.....	25
1.1. Isolement et origine des actinobactéries mycéliennes.....	25
1.2. Purification.....	26
1.3. Caractéristiques culturelles et morphologiques des isolats.....	26
1.4. Evaluation du potentiel antifongique des actinobactéries.....	28
1.5. Cinétique de production des antifongique en milieu liquide.....	31
2. Discussion.....	32
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	35
Références bibliographiques.....	36
Annexes.....	44

Index des figures

Figure 01 : Coupe transversale d'une colonie d'actinobactérie.....	04
Figure 02 : Classification des actinobactéries.....	05
Figure 03 : Structure chimique de l'amphotéricine B.....	09
Figure 04: Mécanisme d'action de l'amphotéricine B.....	09
Figure 05 : Structure chimique de la nystatine.....	10
Figure 06: Photos des quelques dermatophytoses.....	15
Figure 07 : Echantillons de sol.....	18
Figure 08 : Prétraitement des échantillons de sol.....	19
Figure 09: Les étapes suivies pour l'isolement des actinobactéries à partir des échantillons de sol.....	20
Figure 10: Observation macroscopique à l'œil nu (A) et microscopique (B) des colonies.....	21
Figure 11 : les dermatophytes cibles utilisés	22
Figure 12 : Mise en évidence de l'activité antifongique sur milieux solide par la méthode des stries croisés.....	23
Figure 13 : Les Différentes étapes de la mise en évidence de l'activité antifongique (Méthode des puits).....	24
Figure 14: Résultats de l'isolement à partir des deux échantillons :(a) E1, (b) E2 sur milieux ChitineVitamines agar (CH-VB) (photo originale).....	25
Figure 15 : Macromorphologie de quelques isolats purs d'actinobactéries sur milieu ISP2 (photos originales).....	27
Figure 15 : Mycélium aérien de quelques isolats purs d'actinobactéries sous microscope x40 (photos originales).....	28
Figure 16: Activité antagoniste des germes cibles des meilleurs isolats sélectionnés.....	30
Figure 17: Cinétique de production des antifongiques de la souche D36 en milieux ISP2 et Bennett.....	31
Figure 18: Activité antifongique de la souche D36 (méthode des puits) contre <i>Trichophyton rubrum</i> (A) et <i>Candida albicans</i> (B).....	31

Index des tableaux

Tableau 01 : Les antifongiques produits par les actinobactéries.....	10
Tableau 2: Classification des principaux dermatophytes.....	13
Tableau 03 : Origine des isolats d'actinobactéries sélectionnés selon le sol, l'agent sélectif et la dilution.....	25
Tableau 04 : Activité antagoniste des isolats d'actinobactéries sélectionnés.....	29

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ATCC	American Type Culture Collection
Ch-VB	Chitine-Vitamines B (milieu de culture)
G+C	Guanine + Cytosine
ISP	International <i>Streptomyces</i> Project (milieux de culture)
PDA	Potato Dextrose Agar
MA	Mycélium Aérien
MS	Mycélium du Substrat
BMR	Bactérie Multi-Résistance
CaCO₃	Carbonate de Calcium
ARNr16S	Acide RiboNucléique codant pour la sous unité ribosomique 16S
L	Laghouat
D	Daia Ben Dahoua
C.A	<i>Candida albicans</i>
CCM	Chromatographie sur couches minces
Hplc	Chromatographie en phase liquide à haute performance
RMN	Résonance magnétique nucléaire
UV-visible	Ultra-violet visible

بحث في أتربة صحراوية عن بكتيريا هيفية نشطة ضد الفطريات الجلدية المتعايشة مع الإنسان

والحيوان

ملخص

هدفنا من هذه الدراسة هو عزل بكتيريا هيفية في أتربة صحراوية ذات نشاط مضاد للفطريات الجلدية المتعايشة مع الإنسان والحيوان. حيث تمكنا إنطلاقاً من عينتين من التربة من عزل عدد كبير من البكتيريا الهيفية باستخدام وسط كيتين فيتامين ب مع أو بدون عوامل انتقائية. بعد ذلك ، تم اختيار 100 عزلة إتماداً على الشكل المورفولوجي والتي من بينها 60 عزلة فقط أمكن تنقيتها. تم اختبار كل هذه العزلات الستون ضد جراثيم مستهدفة عبارة عن فطريات جلدية بطريقة الخطوط العرضية. أظهر هذا الاختبار أن 16 عزلة نشطة من بينها ثلاث عزلات (D36 و D37 و D8) أظهرت نشاطاً جيداً. تم تسجيل أفضل مسافات التثبيط بواسطة السلالات الثلاث على النحو التالي: السلالة D36 ضد *Candida albicans* ATCC10231 (25 مم) وضد *Microsporium canis* (17mm)، السلالة D37 ضد *Trichophyton glabrum* (25 مم) والسلالة D8 ضد *Trichophyton rubrum* (26 مم). تم تتبع حركية إنتاج المضادات الفطرية على الوسط السائل لأفضل سلالة D36 على وسطي زراعة ISP2 و Bennett لمدة 5 أيام. وفقاً للنتائج التي تم الحصول عليها ، تنتج هذه السلالة مضاداتها الفطرية إبتداءً من اليوم الثاني من الحضانة وتحقق أقصى إنتاج لها في اليوم الرابع ضد *Trichophyton rubrum* (قطر تثبيط 23 مم) وفي اليوم الخامس ضد *Candida albicans* ATCC10231 (قطر تثبيط 22 مم).

الكلمات المفتاحية : بكتيريا هيفية، مضاد فطري، تربة صحراوي، فطر جلدي، متعايش مع الإنسان،

متعايش مع الحيوان.

Recherche dans les sols sahariens d'actinobactéries actives contre des dermatophytes anthropophiles et zoophiles

Résumé

Notre objectif de cette étude est d'isoler à partir des sols sahariens des actinobactéries ayant une activité antagoniste des dermatophytes anthropophiles et zoophiles. Ainsi, à partir de deux échantillons de sol nous avons pu isoler un grand nombre d'actinobactéries en utilisant le milieu chitine vitamine B additionné ou non des agents sélectifs. Par la suite, 100 isolats ont été choisis morphologiquement dont parmi les que 60 qui ont pu être purifiés. Tous ces 60 isolats ont fait l'objet pour un test contre des germes cible dermatophytes par la méthode des stries croisés. Ce test a montré que 16 isolats sont avérés actifs et parmi les, trois isolats (D36, D37 et D8) ont montré une bonne activité. Les meilleures zones d'inhibition ont été enregistrées par les 3 souches comme suit : D36 contre *Candida albicans* ATCC10231 (25mm) et contre *Microsporium canis*(17mm), D37 contre *Trichophyton glabrum*(25mm) et D8 contre *Trichophyton rubrum* (26mm).La cinétique de production sur milieu liquide est poursuivie pour la meilleure souche D36 sur les deux milieux ISP2 et Bennett pendant 5 jours. Selon les résultats obtenus, cette souche produit ses métabolites antifongiques dès le 2^e jour d'incubation et aboutit sa production maximale au 4^e jour contre *Trichophyton rubrum* (diametre d'inhibition 23mm) et au 5^e jour contre *Candida albicans* ATCC10231 (diametre d'inhibition 22mm).

Mots-clés : Actinobactérie, antifongique, sol Saharien, dermatophyte, Anthropophile, Zoophile

Introduction

Les mycoses superficielles font partie des infections dermatologiques les plus fréquentes (Chekiri-Talbi et Denning, 2017). Il s'agit de la quatrième maladie la plus courante dans le monde après caries dentaires, types des tensions, maux de tête et migraine (Powell et al., 2022). Elles affectent 20 à 25% de la population mondiale et leur incidence ne cesse d'augmenter (Ameen, 2010). Les infections dermatologiques de la peau, les cheveux et les ongles sont les infections fongiques les plus répandues (Zhan et Liu, 2017). Ces infections sont liées aux champignons dermatophytes qui sont des pathogènes kératinophiles et qui infectent la peau, les ongles et les cheveux. Ces organismes sont répartis en trois genres : *Trichophyton*, *Microsporum* et *Epidermophyton*, dont leurs espèces déterminent chez l'homme et l'animal des lésions superficielles ou dermatophyties (Dimitri, 2014).

Selon Powell et al. (2022) Les dermatophytes peuvent être classés en fonction de leur association primaire avec l'habitat. Ils peuvent être de nature anthropophile, zoophile ou géophile, et selon Chabasse et al. (2007), il est à distinguer plusieurs modes de classification de mycoses, elles peuvent être classées en fonction de: la partie du corps envahie (dermatomycose et onychomycose). Le syndrome provoqué (pieds d'athlète), Le champignon infectieux (aspergillose, candidose). Par contre selon Amimer et Bellabas (2014), les mycoses peuvent être réparties en trois grands groupes: Les mycoses superficielles se localisent au niveau de l'épiderme et des muqueuses, les mycoses sous-cutanées se localisent au niveau de la peau et des tissus sous-cutanés, et les mycoses profondes ou systémiques se localisent au niveau des tissus profonds elles sont en général les plus graves et se soignent plus difficilement.

En Algérie, l'onychomycose et les teignes dominent les mycoses superficielles. *Trichophyton rubrum* est le champignon pathogène prédominant des pieds et des plis inguinaux. Il représente 76,77% des champignons responsables des dermatophytoses (Dafraoui, 2020). La teigne représente un problème de santé publique en Algérie, malgré l'amélioration des conditions de vie cette pathologie affecte surtout les enfants d'âge scolaire, les dermatophytes du cuir chevelu sont habituellement causées par *Microsporum canis* et *Trichophyton violaceum* (Chekiri-Talbi et Denning, 2017).

Les affections fongiques représentent un véritable problème de santé publique et constituent l'une des principales causes de décès surtout chez les immunodéprimés à travers le monde (Yanisse, 2013). L'émergence de la résistance aux antifongiques, avec un nombre

croissant de rapports d'infections difficiles à traiter a été souligné comme un problème de plus en plus préoccupant (**Powell et al., 2022**). Malgré l'arrivée de nouveaux antifongiques plus performants, les traitements des dermatophytes (ex onychomycoses) restent longs, délicats, avec des échecs, et non dépourvus d'effets secondaires (**Baudraz-Rosselet et al., 2005**). Les scientifiques sont donc toujours à la recherche de nouveaux produits d'origine naturelle, présentant moins de danger pour la santé (**Hajji et al., 2016**).

La plupart des antibiotiques issus du milieu naturel proviennent des microbes du sol (**Ben yaou, 2015**). Parmi les microbes, les actinobactéries produisent près de 45% de ces molécules (**Takahashi et Omura, 2003; Bèrddy et al., 2005**). Elles sont le pilier des industries d'antibiotiques. Ils jouent un rôle important dans la production de variété de ces molécules extrêmement importants pour notre santé (**Chaudhary et al., 2013**). Parmi les antibiotiques sécrétés par les actinobactéries mycéliennes, environ 75% (soit, plus de 7600 molécules) sont produits par les espèces du genre *Streptomyces*, le genre le plus répandu dans l'environnement (**Berdy, 2005 ; Solecka et al., 2012**). Plus de 50 taxons rares d'actinobactéries sont rapportés comme étant producteurs de 2500 composés bioactifs, soit plus de 25% du total des métabolites produits par les actinobactéries (**Kurtböke, 2012 ; Subramani et Aalbersberg, 2013**).

Notre travail porte sur la recherche dans les sols Sahariens des actinobactéries qui possèdent une activité antifongique contre des dermatophytes anthropophiles et zoophiles.

La rédaction de notre document se décline en trois parties :

- ✓ Le premier chapitre, nous ferons un rappel bibliographique sur les actinobactéries et les dermatophytes
- ✓ Le deuxième chapitre est réservé à la présentation du matériel et à la description des méthodes utilisées pour l'isolement et l'évaluation de l'activité antagoniste d'actinobactéries
- ✓ les résultats obtenus, seront exposés et discutés dans le troisième chapitre
- ✓ Une conclusion et des perspectives qui en découlent ainsi que les références bibliographiques clôtureront ce document.

CHAPITRE I
REVUE
BIBLIOGRAPHIQUE

I. Généralités sur les actinobactéries

1. Définition et notions générales

Les actinobactéries sont des bactéries Gram-positives, généralement avec un coefficient de Chargaff de 60 à 70 %. Lorsque ce type de bactérie se développe, il forme généralement des colonies circulaires composées d'hyphes. Cette croissance mycélienne est à la base du nom d'actinomycètes, dérivé des mots grecs *actis*, signifiant rayon, et *mikes*, signifiant champignon. La plupart des actinobactéries sont des espèces hétérotrophes, mais certaines espèces sont également capables de croissance chimioautotrophe. D'autres espèces ont besoin de nutriments tels que des vitamines et des acides aminés spécifiques et se fixent souvent sur des substrats insolubles tels que le charbon de bois (Bouaziz, 2018 ;Harir, 2018).

2. Ecologie des actinobactéries

Les actinobactéries sont largement répandus dans la nature et appartiennent généralement aux saprophytes. Cependant, certaines formes sont pathogènes pour l'homme, les plantes et les animaux. Ils sont présents dans tous les écosystèmes (sol, eau douce, eau de mer, air). L'habitat le plus important pour les actinobactéries est le sol, où le genre *Streptomyces* est le plus abondant et le plus isolé(Belyagoubi, 2014). Ils sont généralement présents à des densités de l'ordre de 10^6 à 10^9 cellules par gramme de sol(Barka *et al.*, 2016). La plupart vivent dans des environnements à faible humidité avec une très faible activité de l'eau.

Physiologiquement, la forme aérobie est la plus abondante, et la forme anaérobie se rencontre primitivement chez l'animal et l'homme. Les actinobactéries préfèrent un pH neutre ou légèrement alcalin et sont généralement mésophiles, tandis que d'autres sont thermophiles et tolèrent des températures autour de 50 °C et peuvent atteindre jusqu'à 60 °C (Boucheffa,2011).

3.Morphologie

La structure hyphale des actinobactéries présente une grande variété de morphologies. Trois cas peuvent être distingués (Djaballah, 2010) :

- Seul le mycélium végétatif est formé (par exemple *Frankia*, *Dactylosporangium*). La croissance se produit à l'intérieur ou à la surface du milieu.
- Un mycélium végétatif se forme, suivi d'un mycélium aérien qui se transforme en conidies (par exemple *Streptomyces*). Le mycélium aérien se développe à la surface du mycélium végétatif et l'utilise comme substrat (Fig.1).

- Alternativement, seul le mycélium aérien est formé. Cela se produit uniquement dans le genre *Sporichthya*, où les hyphes de mycélium aérien sont attachés au substrat par des pinces.

Certains actinobactéries forment des structures uniques telles que des sclérotés (*Chainia*), des synnems (*Actinosynema*), des vésicules contenant des spores (*Frankia*) ou des vésicules sans spores (*Intrasporangium*) (Barka *et al.*, 2016).

Sur milieux solides, les actinobactéries forment des colonies très spécifiques. Cela provient de l'accumulation d'hyphes ramifiés plutôt que de cellules comme dans les bactéries non filamenteuses. Le diamètre des colonies varie entre 1 et 10 mm. L'aspect des colonies est compact, sec, lisse, rugueux, aux contours lisses ou concaves. Les colonies sont souvent colorées (jaune, violet, blanc, blanc cassé, rose, gris, etc.) (Perry *et al.*, 2004).

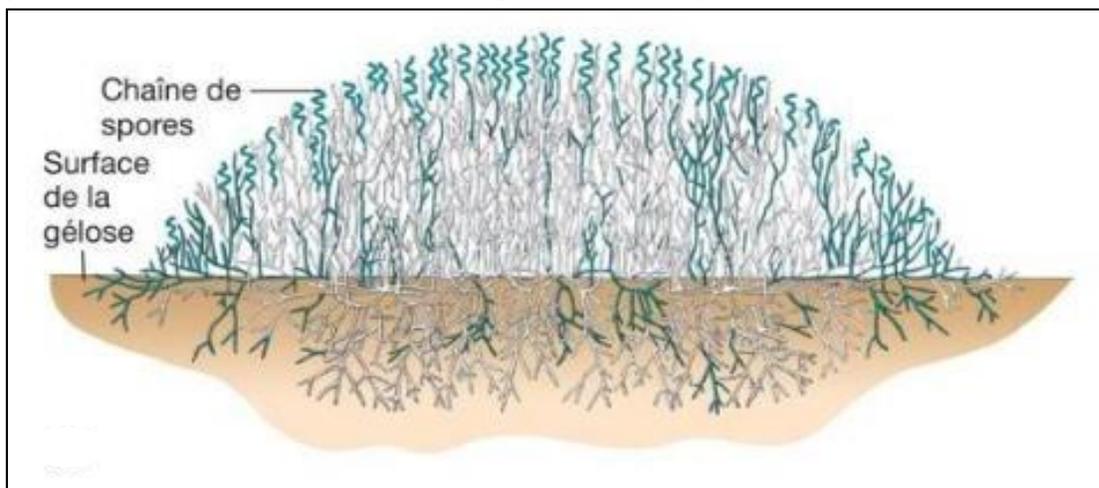


Figure 01 : Coupe transversale d'une colonie d'actinobactérie (Prescott *et al.*, 2018)

4. Taxonomie

Le phylum actinobacteria (actinomycetota) comprend 6 classes, 25 ordres, 52 familles, 232 genres et plus de 3000 espèces (Law *et al.*, 2020 ; Gupta *et al.*, 2022) (Fig. 2). Tous les membres de cet ordre sont caractérisés par une grande teneur en G+C %, allant de 51 % chez certaines Corynebactéries, à plus de 70 % chez les genres *Streptomyces* et *Frankia* (Ventura *et al.*, 2007)

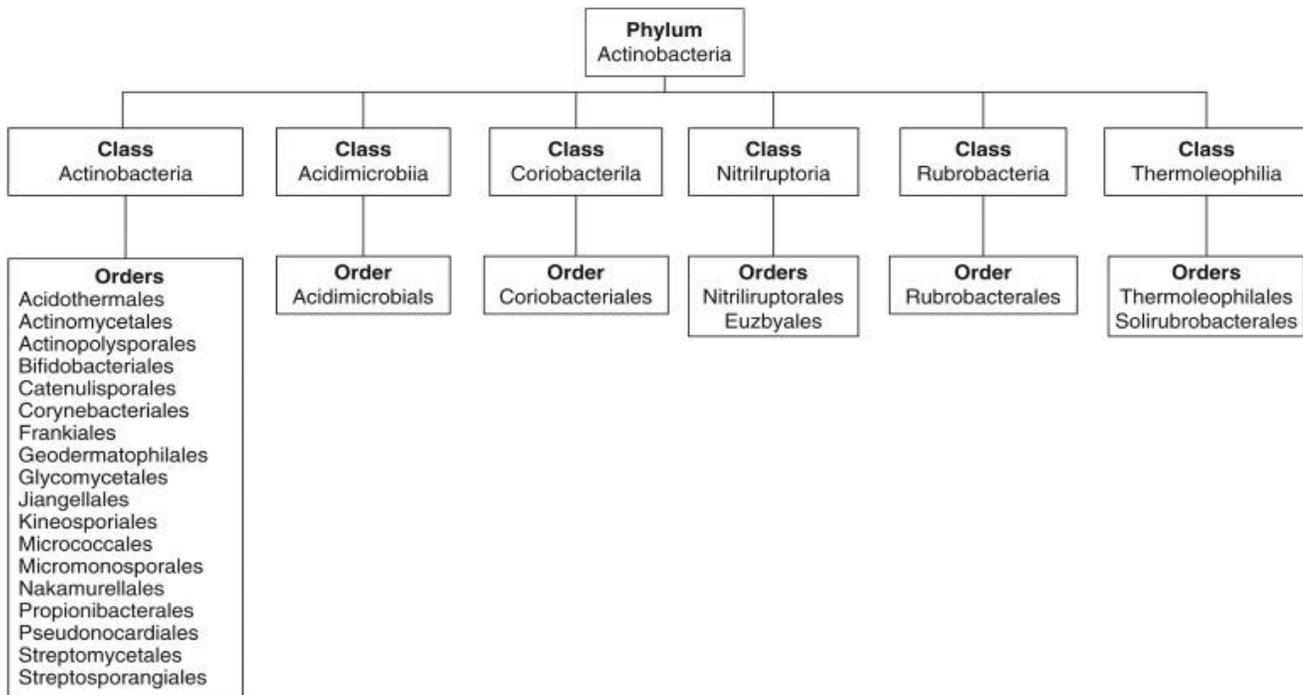


Figure02 : Classification des actinobactéries(Lawson, 2018).

Le genre *Streptomyces* comprend actuellement 1170 espèces et 73 sous espèces (Euzeby,2023). Quelques espèces sont pathogènes pour l’Homme et les animaux, et quelques-unes sont phytopathogènes.

5. Critères d’identification des actinobactéries

La classification des actinobacteries repose sur plusieurs critères : morphologiques, chimiques, physiologiques et moléculaires. L'identification des genres est facilitée par des études morphologiques et chimiques, et les espèces sont séparées par des critères physiologiques et moléculaires (Badji, 2006 ; Smaoui, 2010).

5.1. Critères morphologiques

Badji(2006), ont rapporté que des caractéristiques morphologiques importantes étaient liées à la présence, au type (avec ou sans fragmentation) et à la couleur du mycélium aérien (AM) et/ou du mycélium du substrat (SM), et à la présence ou à l'absence de sporanges sur le mycélium. La présence ou l'absence de sporanges, de sclérotés ou de synnèmes, la présence de spores, leur forme, leur mobilité, leur emplacement et leur nombre sur l'hyphe, et enfin la production et la couleur du pigment soluble sécrété (PS). Parfois, les souches peuvent être attribuées à des genres particuliers sur la base de critères micromorphologiques très clairs et spécifiques. Par exemple, des genres tels que *Micromonospora*, *Planobispora*, *Planomonospora*,

Spirylospora et *Streptosporandium*.

5.2. Critères chimiques

Pour la plupart des genres d'actinobactérie, les caractéristiques morphologiques sont insuffisantes pour la reconnaissance (*Streptomyces*, *Actinomadura*, *Nocardia*, *Microtetraspora*, *Nonomraea*, *Nocordioides*, *Amycolatopsis*, *Pseudo Nocardia*, *Soccharotrix*, *Citasatosporia*, *Glycomyces*, etc.) et nécessitent une étude chimique de leurs constituants cellulaires. Une combinaison de critères chimiques et morphologiques permet de déterminer le genre et même la famille. Les propriétés chimiques sont :

- Détermination des isomères de l'acide diaminopimélique (DAP) (LL ou DL) et présence ou absence de glycine dans la paroi cellulaire.

- Présence ou absence de sucres taxonomiquement significatifs dans toute la cellule, tels que les couples « arabinose-galactose », « arabinose-xylose », « rhamnose-galactose » et même madulose (3-méthyl-galactose).

- Composition des membranes cellulaires à partir des lipides : acides mycoliques, phospholipides, ménaquinones, acides gras (**Boudjella, 2007**).

5.3. Critères physiologiques et biochimiques

Cette caractérisation porte spécifiquement sur la dégradation de divers composés glucidiques, lipidiques et protéiques, ainsi que sur la résistance à des agents antimicrobiens spécifiques et à des valeurs variables de température, de pH et de salinité (**Lamari, 2006**).

5.4. Critères moléculaires

Trois critères sont généralement étudiés :

5.4.1. Séquençage de l'ADN ribosomique 16S

L'analyse de l'ARNr 16S est un outil très rapide pour l'identification des espèces. Il a été utilisé pour des groupements de niveau super générique (famille, ordre et même classe) (**Richert et al., 2005**). Les techniques de base utilisées dans cette étude sont la PCR (amplification en chaîne par polymérase) et le séquençage. L'ARN ribosomal (ARNr), en particulier une partie de l'ADN génomique (ADNr) codant pour 16S (~ 1600 paires de bases) est amplifié par PCR et le produit est séquençé. Les séquences obtenues à partir de différents taxons font l'objet d'études comparatives (ou études phylogénétiques) entre elles ou avec des espèces de référence répertoriées dans des bases de données génomiques. Plusieurs méthodes informatiques ont été développées pour mener à bien ce type de recherche, sous la forme de programmes informatiques

libres (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, Version 6 (MEGA 5), Philip, Clustal W, etc.) disponibles sur Internet.

Selon **Kim et al (2014)**, si le taux de similarité entre les séquences des gènes codant pour l'ARNr 16S de deux souches est inférieur à 98,65 %, ces souches appartiennent à deux espèces différentes. En revanche, si le taux de similarité est supérieur à 98,65 %, la classification de deux souches dans la même espèce ou dans deux espèces différentes doit être basée sur les résultats d'hybridation ADN-ADN.

5.4.2. Taux d'hybridation ADN/ADN

Semblable à l'analyse de l'ARNr, la recombinaison ADN-ADN est utilisée de manière plus fiable pour l'identification des espèces par rapport à celles déjà décrites. Deux espèces sont considérées comme différentes si leur taux de similarité (taux de recombinaison des brins d'ADN) est inférieur à 70 % (**Wellington et Ul-Hassan, 2009**).

5.4.3. Coefficient de Chargaff ou GC%

Grâce au coefficient de Chargaff (G+C%), la définition des actinobactéries (ADN contenant plus de 55% de G+C) a été revue. Cela a permis de distinguer les lignées d'actinobactéries de celles des Bacillaceae, Lactobacillaceae et autres lignées Gram-positives (G+C < 55%). De même, d'autres bactéries non mycéliennes telles que *Corynebacterium*, *Cellulomonas*, *Arthrobacter* et même *Micrococcus* sont considérées comme faisant partie de la lignée des actinobactéries (**Wellington et Ul-Hassan, 2009**).

Selon **Euzéby (2002)**, les souches bactériennes avec plus de 5% de différence G+C ne peuvent pas appartenir à la même espèce, et les bactéries avec plus de 10% de différence G+C ne peuvent pas appartenir au même genre.

6. Importance des actinobactéries

La fonction écologique principale des actinobactéries au sein des écosystèmes est la décomposition des substances organiques (**Prescott et al., 2010**). Grâce à leurs capacités de produire une large gamme d'enzyme hydrolytique, comme les protéases, les nucléases, les lipases, etc. (**Prakash et al., 2012**). En plus de leur rôle dans la décomposition de la matière organique, les actinobactéries sont connues pour leur production de substances biologiquement actives telles que les antibiotiques, les vitamines et les enzymes (**Boer et al., 2005**).

D'après **Anibou et al.,(2008)** une analyse a été réalisée sur le nombre de substances médicamenteuses utilisées en chimiothérapie cancéreuse indique que plus de 60% des médicaments approuvés dérivent de composés naturels et la plupart ont été extraites à partir d'actinobactéries, tels que l'actinomycine D et la mitomycine.

II. Généralités sur les antifongiques

La majorité des agents antifongiques naturels sont d'origine microbienne, dont près de la moitié sont synthétisés par des actinobactéries, notamment *Streptomyces*(**Zou et al., 2021**). En particulier, des produits à base de *Streptomyces griseoviridis* ont été utilisés pour lutter contre les champignons phytopathogènes *Botrytis* et *Fusarium*(**Errakhi et al., 2008 ; Naili et al., 2021**). Les antifongiques représentent un groupe très restreint mais important de médicaments qui jouent un rôle clé dans le contrôle des maladies fongiques (**Bharti et al., 2010**). Compte tenu du nombre limité de molécules utilisées pour la thérapie antiseptique et de l'émergence de la multi résistance, l'industrie pharmaceutique et les chercheurs recherchent de nouveaux agents antifongiques plus efficaces et moins agressifs pour l'organisme (**Badji et al., 2005**).

1. Mécanisme d'action des antifongiques

Les actinobactéries ont la capacité d'inhiber la croissance de divers pathogènes bactériens et fongiques (**Djebaili et al., 2020**) en produisant des hydrolases extracellulaires (**Singh et Gaur, 2016 ; Singh et al., 2018**). Cela peut dégrader les parois cellulaires fongiques (**Aamir et al., 2020 ; Wei et al., 2020**). Ces enzymes comprennent la chitinase, qui agit sur le composant chitine, et la 1-3-glucanase, qui agit sur la paroi cellulaire fongique (**Hungund et al., 2021**). Les chitinases et les β -1,3-glucanases sont des enzymes hydrolytiques importantes dans la lyse des parois cellulaires fongiques telles que celles de *Fusarium oxysporum*, *Sclerotinia minor* et *Sclerotium rolfsii* (**Keikha et al., 2015**).

2. Les antifongiques produits par les actinobactéries

2.1. L'amphotéricine B

2.1.1. Structure chimique:

L'amphotéricine B est un composé antifongique produit par *Streptomyces nodosus*. Il se caractérise par un cycle macrolide contenant un sucre aminé, une mycosamine avec une chaîne

hydrophile contenant plusieurs groupes hydroxyle, et une fraction hydrophobe contenant sept doubles liaisons conjuguées, comme le montre la figure ci-dessous (**Bagirova et al., 2022**).

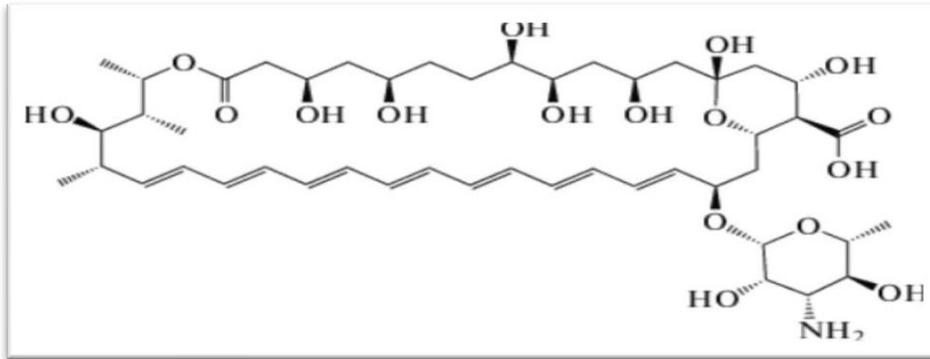


Figure 03 : Structure chimique de l'amphotéricine B (**Baghirova et al., 2022**).

2.1.2. Mécanisme d'action de l'amphotéricine B:

Cet antibiotique est utilisé pour traiter les infections fongiques systémiques depuis plus de 60 ans et reste l'un des antibiotiques les plus importants sur le plan clinique. Comme AmB pénètre la barrière hémato-encéphalique, il sert de norme de soins pour la plupart des infections fongiques du système nerveux central (**Bagirova et al., 2022**).

Ce type de molécule peut perturber les membranes fongiques en raison de sa forte affinité pour l'ergostérol (Erg), ce stérol est un composé majeur des membranes cellulaires fongiques (**Bagirova et al., 2022**). Leurs propriétés amphotères leur permettent de s'associer à la bicouche lipidique des membranes fongiques et de former des pores qui conduisent à la déstabilisation des parois et à la lyse cellulaire (**Sinkó et al., 2022**).

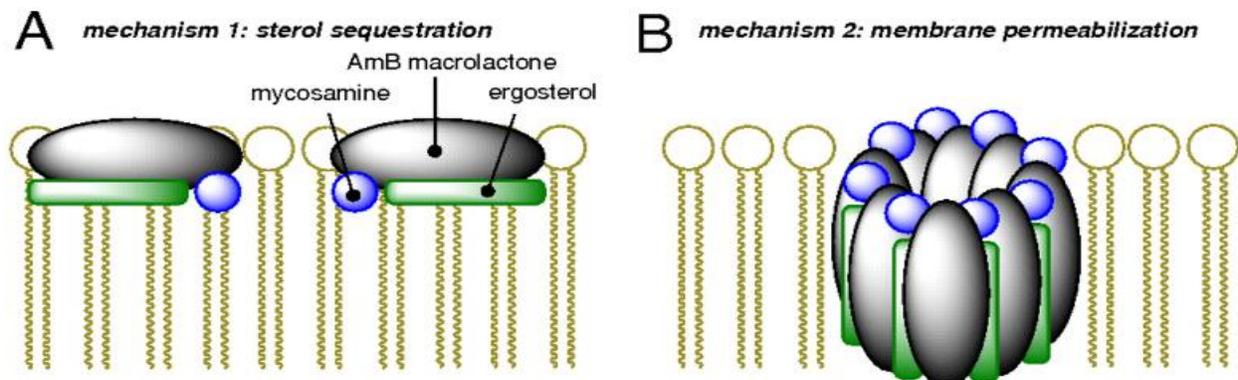


Figure 04: Mécanisme d'action de l'amphotéricine B (**Baghirova et al., 2022**)

2.2. Nystatine

2.2.1. Structure chimique:

La nystatine est un médicament antifongique polyène obtenu à partir de cultures de *Streptomyces noursei*. Elle agit sur divers agents antifongiques in vitro (Özdal Zincir et al., 2022 ; Kumar et Jha, 2017 ; Alsharif et al., 2020). Cependant, des problèmes de solubilité et de toxicité assez importants après administration parentérale ont limité leur utilisation en thérapie systémique. Il s'agit d'un macrolide tétraène structurellement similaire à AmpB (La Clair, 2021). Son mécanisme d'action principal est le même que celui d'AmpB (Kumar et Jha, 2017).

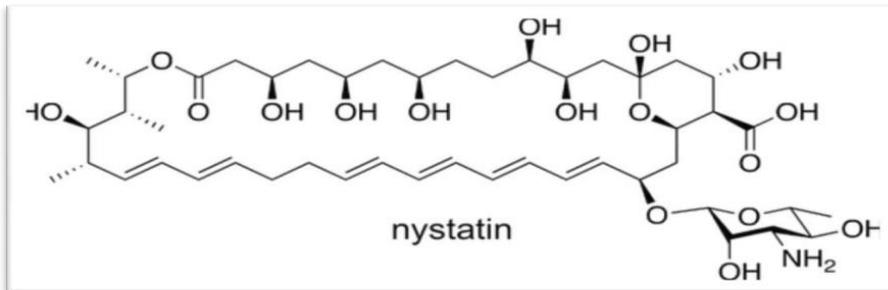


Figure 05 : Structure chimique de la nystatine (La Clair, 2021).

Bien que son spectre d'activité in vitro soit similaire à celui de l'amphotéricine B, cet agent antifongique est principalement utilisé pour le traitement des candidoses gastro-intestinales (orales) et mucocutanées (topiques). Il est utilisé pour la candidose chez les petits animaux et les oiseaux et pour les otites causées par *Microsporium canis* (La Clair, 2021).

2.3. Autres antifongiques produits par les actinobactéries

Tableau 01: Les antifongiques produits par les actinobactéries (Rajivgandhi et al., 2022).

Antifongiques	Micromorganisme producteur	Références
Validamycine	<i>Streptomyces malaysiensis</i>	(Rajivgandhi et al., 2022)
Lomofugine	<i>Streptomyces lomodesis</i>	(Rajivgandhi et al., 2022)
Antimycine	<i>Streptomyces lucius</i>	(Rajivgandhi et al., 2022)
Transvalensine	<i>Nocardia transvalensis</i>	(Hoshino et al. 2004)
Macrotermycine	<i>Amycolatopsis sp</i>	(Risidian et al., 2022)
TransvalencinA	<i>Nocardia transvalensis</i>	(Hoshino et al., 2004)
Rustmicine	<i>Micromonospora narashinoensis</i>	(Talukdaret al., 2016)

III. Les dermatophytes et les dermatomycoses

1. Généralités :

Les dermatophytoses sont des infections fongiques superficielles dues à des champignons filamenteux microscopiques kératinophiles et kératinolytiques appelés dermatophytes qui ont une affinité particulière pour la kératine de la peau et envahissant progressivement le stratum corneum puis, pour certains, les phanères. Certains dermatophytes sont des parasites de l'homme, comme le *Trichophyton rubrum* ou animal comme le *Microsporum canis*. D'autres espèces sont des parasites occasionnels comme *Microsporum gypseum* présents dans le sol, enfin d'autres espèces telluriques sont uniquement des saprophytes de sol comme *Trichophyton ajelloi* (Christian, 2013). Ces microchampignons filamenteux exogènes appartiennent à la classe des Ascomycetes, qui forment trois genres : *Trichophyton*, *Microsporum* et *Epidermophyton*. Les cellules ou mycéliums sont septés et produisent des spores (macroconidies, microconidies et chlamydospores).

Contrairement à la plupart des champignons, les dermatophytes sont des parasites obligatoires qui peuvent infecter même les individus sains et provoquer des infections contagieuses (Feuilhade de Chauvinetal., 2003).

Taxonomiquement, les dermatophytes appartiennent à :

- **Phylum** : Ascomycotina.
- **Classe** : Ascomycetes.
- **SousClasse** : Plectomycetidae.
- **Ordre** : Onygenales.
- **Famille** : Rhizoidacées.

2. Origine et modalité de la contamination

L'origine de la contamination par les dermatophytes est triple (Christian, 2013).

2.1. Les espèces anthropophiles

Ce sont des parasites obligatoires de l'homme qui ont une transmission inter humaine, soit par contact direct, soit indirect, par l'intermédiaire d'objets souillés ou la fréquentation des lieux publics contaminés. Les dermatophytes anthropophiles, bien adaptés à l'homme, donnent des lésions discrètes habituellement bien tolérées ou ignorées et sont très fréquents en pathologie

humaine. La contamination se fait par les spores (arthrospores), très résistantes, qui sont présentes sur les lésions elles-mêmes, mais également dans les débris d'ongles, de squames, de cheveux. Ces spores peuvent survivre des mois voire des années dans le milieu extérieur, en particulier dans l'environnement des malades, ce qui contribue à leur re-contamination (**Chabasse et Guiguen, 2019**)

2.2. Les espèces zoophiles

La transmission à l'homme se fait accidentellement par un animal. Il peut s'agir d'animaux d'élevage, de rente, de compagnie ou plus rarement d'animaux sauvages (**Guillotet al., 2015**). La contamination peut se faire par contact direct (caresses) ou indirect (squames ou poils contenant les spores virulentes laissés sur le sol, un fauteuil...). Les cas les plus fréquents sont causés par *Microsporium canis* qui affecte les chats et les chiens. D'autant plus qu'ils peuvent être porteurs asymptomatiques (**Cafarchia et al., 2006**). La transmission interhumaine est possible, mais reste très limitée (**Chabasse et al., 2004**)

3.3. Les espèces géophiles

Un certain nombre de dermatophytes peuvent être retrouvés dans le sol, surtout lorsque celui-ci est enrichi par la kératine d'origine animale (poils, plumes...) (**Chabasse et Piheta, 2008**). La transmission à l'homme est très souvent accidentelle car il faut un traumatisme avec de la terre contaminée pour que le pathogène s'implante. Ce phénomène est donc rare. En revanche, les animaux peuvent véhiculer des espèces géophiles qui secondairement vont contaminer l'homme. La transmission interhumaine est quasi nulle (**Chabasse, 2004**). Les lésions causées par une espèce zoophile ou tellurique sont habituellement inflammatoires, et parfois aussi suppurées. Elles sont dues à des espèces non adaptées à la kératine humaine (**Anofel, 2014**).

3. Classification

- Les dermatophytes sont classés selon deux modes, sexué et asexué.
- Puisqu'il est difficile d'obtenir la forme sexuée de ces champignons, leur classification actuelle est basée sur la reproduction asexuée.

Tableau 2:Classification des principaux dermatophytes (Veloo et al., 2011).

Genres	Espèces
Dermatophytes anthropophiles : Parasites obligatoires de l'homme.	
<i>Epidermophyton</i>	- <i>E. floccosum</i>
<i>Microsporum</i>	- <i>M. audouinii</i> - <i>M. ferrugineum</i>
<i>Trichophyton</i>	- <i>T. soudanense</i> - <i>T. rubrum</i> - <i>T. violaceum</i> - <i>T. tonsurans</i> - <i>T. schoenleinii</i> - <i>T. gourvilii</i>
Dermatophytes zoophiles: Parasites obligatoires des animaux qui sont pour la plupart des agents de zoonoses.	
<i>Microsporum</i>	- <i>M. canis</i> (chien, chat) - <i>M. persicolor</i> (souris) - <i>M. equinum</i> (cheval) - <i>M. nanum</i> (porc) - <i>M. preacox</i> (cheval)
<i>Trichophyton</i>	- <i>T. mentagrophytes</i> (chat, lapin, cheval) - <i>T. gallinae</i> (volaille) - <i>T. equinum</i> (cheval) - <i>T. verrucosum</i> (bovin) - <i>T. erinacei</i> (hérisson)
Dermatophytes telluriques: Vie saprobiotique dans le sol et peuvent parfois contaminer l'homme ou les animaux.	
<i>Microsporum</i>	<i>M. gypseum</i> <i>M. cookei</i> <i>M. fulvum</i> <i>M. preacox</i> (également zoophile)

<i>Trichophyton</i>	<i>T. mentagrophytes</i> (également zoophile) <i>T. terrestre</i> (habituellement saprophyte) <i>T. ajelloi</i> (habituellement saprophyte).
---------------------	--

4. Physiopathologie:

Le dermatophyte pénètre plus facilement dans l'épiderme en cas de lésion cutanée. Le parasitisme débute par l'adhérence d'une spore aux cornéocytes. La spore germe, donne des filaments à croissance centrifuge qui pénètrent puis se multiplient dans la couche cornée grâce à la production d'enzymes protéolytiques formant ainsi une lésion circulaire érythématoquameuse. La zone active se trouve en périphérie et le centre guérit progressivement. Antigènes, cytokines et facteurs chémoattractifs induisent une réponse inflammatoire et une réponse cellulaire spécifique. La symptomatologie clinique exprime cette réaction, elle dépend donc du terrain immunitaire de l'hôte mais aussi de l'espèce du champignon incriminé: moins il est adapté à l'homme, plus la réaction inflammatoire est importante(Chabasse, 2000).

5. Diagnostic

Le diagnostic des dermatomycoses repose sur la détection des hyphes septés par examen microscopique direct des échantillons cliniques. Cet examen microscopique direct est rapide et peu coûteux mais ne permet pas d'identifier le genre ou l'espèce. L'identification des espèces est basée sur l'examen macroscopique et microscopique des cultures. L'identification basée sur la culture est plus spécifique mais prend souvent 2 à 3 semaines(Carbonnelle *et al.*, 2007; Degand., 2008). L'utilisation des milieux spécifiques pour stimuler la condition ou la production de pigments est parfois nécessaire, retardant encore le diagnostic de plusieurs semaines.

Le diagnostic mycologique conventionnel par culture reste le gold standard mais des techniques complémentaires peuvent aider au diagnostic d'espèce. L'identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF est plus économique et d'une précision comparable à celle du séquençage de l'ADN. Elle permet une identification rapide et standardisée de l'ensemble des bactéries et des champignons, isolés en routine, s'est généralisée dans les laboratoires d'analyses de microbiologie(Marie, 2022).

Des méthodes moléculaires alternatives ont été développées pour permettre une identification rapide et précise des dermatophyte. Ces méthodes comprennent la PCR spécifique

et le séquençage du gène de l'ARNr à grande sous-unité ou du gène codant pour la chitine synthase, l'empreinte PCR, l'hybridation de l'ADN. Cependant, ces méthodes moléculaires sont longues et coûteuses (Alshawa *et al.*, 2012).



A. Onychis candidosiqueD. intertrigo (Pied d'athlète)



B. Infection à *M. canis*E. Teignes du cuir chevelu



C. Folliculite à dermatophyteF. sycosis trichophytique

Figure 06: Photos des quelques dermatophytoses(Source:<https://shorturl.at/gmJSX>)

6. Les Facteurs favorisants

Les facteurs favorisants l'infection avec les dermatophytes sont nombreux (**Coulibaly, 2014 ; Petinataud, 2014 ; Vanetti, 2009**) :

6.1. Facteurs liés à l'hôte : L'Age joue un rôle dans les teignes de cuir chevelu qui se rencontrent chez l'enfant à l'âge scolaire, et disparaissent à l'âge de la puberté car les cheveux d'un adulte sont plus riches en acide gras soufré.

6.2. Facteurs liés à la profession : Agriculture, vétérinaires, éleveurs sont exposés à une contamination par les espèces zoophiles.

6.3. Facteurs hormonaux : Les teignes surviennent chez l'enfant.

6.4. Facteurs locaux : Les coiffures et les tresses serrées.

6.5. Facteurs généraux : Chaleur et humidité

6.6. Pratique du sport : Natation et sports en salles.

7. Le traitement :

Le traitement des dermatophytes comprend :

- ✓ **Antifongiques systémiques (Coulibaly, 2014 ; Ripert, 2013).**
- ✓ Griséofulvine
- ✓ Dérivés azolés
- ✓ Allylamines
- ✓ **Antifongique topiques (Kamil, 2015 ; Ripert, 2013)**
- ✓ Les dérivés de l'imidazole
- ✓ Cyclopiroxolamine
- ✓ Amorolfine

8. Répartitions géographiques

La majorité des dermatophytes sont cosmopolites comme *E.floccosum*, *T.rubrum*, *T.mentagrophytes*, *M.canis...*, alors que d'autres espèces restent localisées à certaines régions du globe comme *M.ferruginum* en Asie et en Afrique ou encore *T.concentricum* en Asie et en Indonésie. Certaines espèces comme *T.schoenleinii* et *M.ferruginum* diminuent en fréquence et se limitent de plus en plus à des zones géographiques étroites. A l'inverse, d'autres sont en augmentation s'adaptant aux populations autochtones et deviennent prédominantes, conduisant à

des épidémies en milieu scolaire dans les grandes villes cosmopolites. C'est le cas de *M.audouinii var.langeronii* et de *T.soudanense* (Chabasse et Guiguen, 1999).

En Algérie, l'étude menée au niveau du CHU Mustapha Bacha d'Alger au niveau du laboratoire de parasitologie-mycologie sur une période qui s'étale de 2009 jusqu'en 2014 a démontré que l'espèce *T. rubrum* domine les infections d'onyxis dermatophytique avec un pourcentage de (90%) puis *T. interdigitale* avec(10%) et également les infections d'epidermophyties avec 80% puis *T. mentagrophytes* (12%),*M. canis*(6%) et *T. violaceum* + *T. verrucosum*(2%).

CHAPITRE II

Matériel et méthodes

1. Sites de prélèvement d'échantillons de sols

Les prélèvements ont été réalisés à partir des deux échantillons de sol : le premier est un sol rhizophérique d'une 'palmeraie' de la région Daïa Ben dahoua, wilaya de Ghardaïa et le deuxième est un sol non rhizophérique d'un 'Reg' aux environs de la wilaya de Laghouat. Après avoir écarté les trois premiers centimètres de la couche superficielle du sol, 50 à 100 g sont prélevés aseptiquement à une profondeur d'environ 15 à 20 cm à l'aide d'une grande cuillère stérile. Les échantillons de sols sont déposés dans des sacs stériles et transportés vers le laboratoire à température ambiante. Après écartement des gros débris, ces échantillons ont été séchés à l'air ambiant et broyés dans un mortier pour éliminer les grumeaux de terre. Ensuite, sont déposés dans des bocaux préalablement stérilisés et immédiatement conservés au réfrigérateur à 4°C jusqu'à utilisation (**Pochon et Trdieux, 1962**).



Figure07 : Echantillons de sol

2. Isolement d'actinobactéries

2.1. Prétraitement des échantillons

- ❖ traitement thermique: Consiste à chauffer 10 g de chaque échantillon à 60°C pendant 2heure (**Takizawa et al., 1993**).
- ❖ traitement chimique: Consiste à traiter 1 g de sol de chaque échantillon avec 0.1 g de CaCO₃. Le mélange est mis dans une enceinte stérile saturée d'humidité pendant sept jours à 30°C (**El-Nakeeb et Lechevalier, 1963**).



Figure08 :Prétraitement des échantillons de sol.

2.2. Milieux d'isolement et agents sélectifs

L'isolement des actinobactéries est effectué sur le milieu chitine-vitamines agar (Ch-VB)(Annexel) préconisés par **Hayakawa et Nonomura (1987)** et **Jiang et al. (2012)** respectivement pour l'isolement des actinobactéries. Ces milieux sont supplémentés par des agents sélectifs. Parmi les agents sélectifs additionnés on distingue un agent antifongique cycloheximide (50µg/l) qui permet d'éviter les contaminations par les champignons présents dans les sols, La solution d'antifongique est stérilisée par filtration sur membrane type millipore (de 0,22 µm de porosité) et est ajoutée aseptiquement au milieu d'isolement en surfusion,des antibactériens tels que la pénicilline (25 mg/l), streptomycine (10 µg/ml) et le chloramphénicol (25 µg/ml) qui permettent de diminuer l'effectif microbien et d'orienter la sélection vers des isolats particuliers pouvant être intéressants. Un témoin sans antibiotique est également nécessaire. Le choix du milieu CHV et les agents sélectifs avec leurs concentrations est basé sur les résultats obtenus par les chercheurs de notre laboratoire (**Sabaou et al., 1998; Boudjella, 2007**).

2.3. Ensemencement des échantillons

La méthode d'ensemencement utilisée est celle des suspensions dilutions (**Rapilly, 1968**) et étalement sur les milieux de culture coulés en boîtes de Pétri stériles. La dilution 10^{-1} est préparée par addition de 1g de sol (prélevé d'une façon homogène à partir de l'échantillon de sol) dans 9 ml d'eau stérile. Deux autres suspensions (10^{-2} , 10^{-3}) sont préparées par dilution de 10 en 10, après homogénéisation de la dilution de départ par un mélange vigoureux à l'aide d'un vortex.

Des aliquotes de 0,1 ml (100 μ l) de chacune des dilutions sont ensemencées sur le milieu d'isolement par étalement à l'aide d'un râteau en verre stérile (Fig. 8) à raison de deux répétitions par dilution pour chacun des milieux utilisés.

2.4. Incubation

Les boîtes ensemencées sont incubées à 30 °C et examinées régulièrement à partir du 7^e jour, 14^e jour et jusqu'au 21^e jour, en raison notamment de la croissance parfois assez lente qui caractérise certains genres d'actinobactéries (**Rapilly, 1968**).

2.5. Sélection, purification et conservation des isolats d'actinobactéries

Les colonies qui ont montré, après observation à l'œil nu et au microscope optique, les caractéristiques morphologiques des actinobactéries mycéliennes, en particulier la formation d'un mycélium du substrat très fin (chez toutes les colonies) et d'un mycélium aérien très fin aussi (chez la majorité) sont considérées comme étant des actinobactéries.

Le repérage des colonies d'actinobactéries qui apparaissent à la surface du milieu d'isolement se fait par l'observation in situ à l'œil nu et au microscope optique (grossissement x10 et x40). (**Shirling et Gottlieb, 1966**). La purification est effectuée par la technique des stries (Fig. 9). Les colonies sélectionnées sont prélevées délicatement avec une pointe métallique stérile puis purifiées par repiquage successif sur le milieu ISP 2 (composition en annexe), à base de glucose et d'extraits de malt et de levure. Ces derniers sont incubés à 30 °C pendant 14 jours.

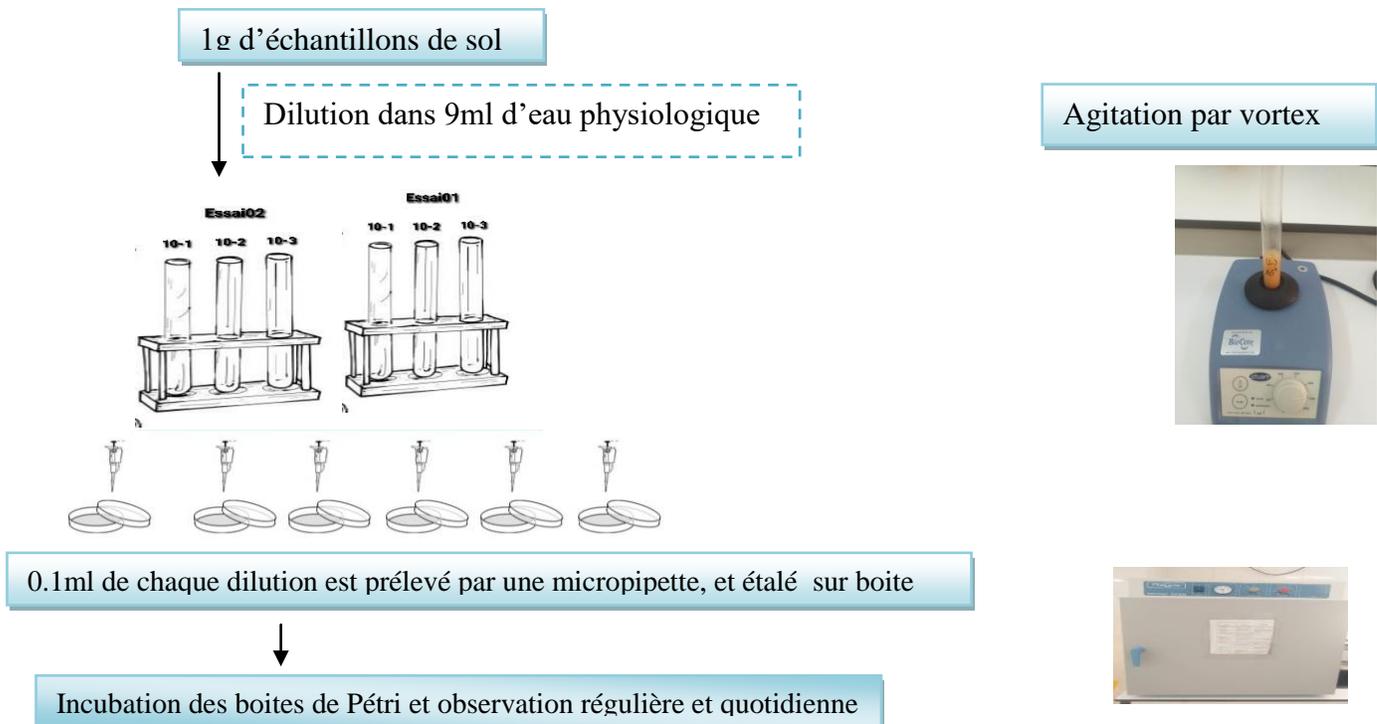


Figure 09: Les étapes suivies pour l'isolement des actinobactéries à partir des échantillons de sol.

3. Caractérisation morphologique des isolats

3.1. Caractérisation macromorphologique

L'étude macromorphologique consiste à apprécier la croissance (faible, moyenne, bonne) et à déterminer la couleur des mycélia aérien et du substrat ainsi que celles des pigments solubles s'ils sont sécrétés (Athalye *et al.*, 1981).

3.2. Caractérisation micromorphologique

Les isolats obtenus sur les différents milieux cités précédemment sont observés à l'aide d'un microscope optique (Optika) à deux grossissements (x40 et x10) après 14 jours d'incubation. Ces observations sont réalisées directement sur les boîtes de Pétri et ce, pour étudier les mycélia sans altérer les structures en place. Elles consistent à voir également la sporulation caractéristique des isolats sélectionnés ainsi que la fragmentation ou non du mycélium du substrat (Williams *et al.*, 1989).

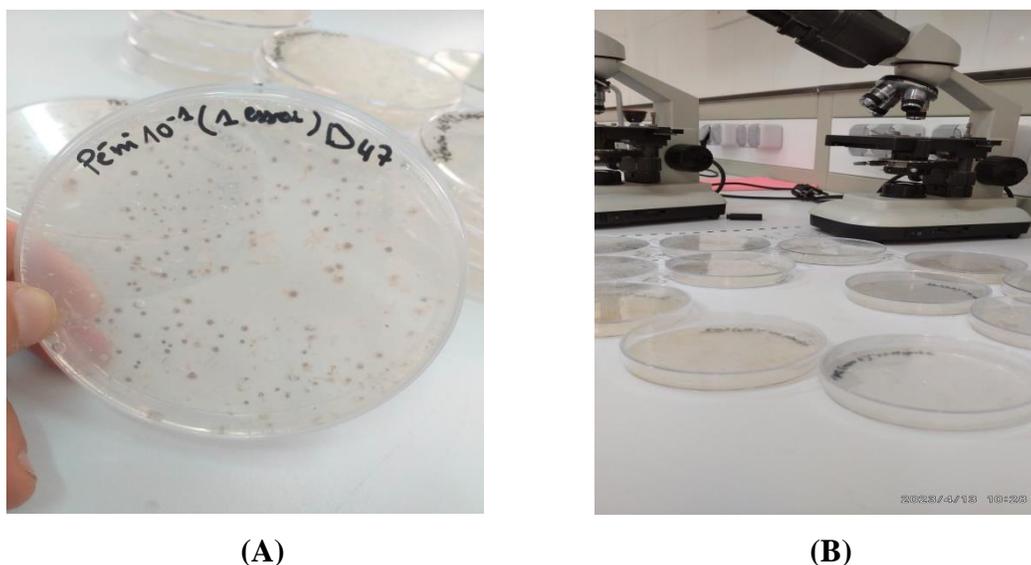


Figure 10: Observation macroscopique à l'œil nu (A) et microscopique (B) des colonies.

4. Criblage de l'activité antifongique sur milieux solide

4.1. Préparation des cultures des actinobactéries.

L'ensemble d'isolats d'actinobactéries sont ensemencés en stries très serrées à la surface du milieu ISP2 solide coulé en boîtes de pétri stériles. Les boîtes sont incubées à 30°C pendant 10 jour.

4.2. Les germes cibles

Les germes-cibles qui ont été utilisés sont 3 champignons dermatophytes d'origine (laboratoire Ibn Rochd de Ghardaïa). Ils ont été prélevés à partir de certains malades à savoir : *Trichophyton rubrum*, *Microsporium canis* et *Trichophyton glabrum*. Trois autres germes d'origine institut Pasteur qui sont : une levure, celle de *Candida albicans* ATCC 10231 et deux autres souches bactériennes, il s'agit de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (bactérie à Gram positif) et *Escherichia coli* ATCC 8739 (bactérie à Gram négatif). Il est à noter que ces deux derniers germes cibles ont été ajoutés juste pour avoir une idée sur le profil d'activité de nos souches d'actinobactéries isolées. Toutes les souches tests sont ensemencés sur : le milieu PDA (pour les champignons filamenteux et la levure) et le milieu GN (pour les bactéries). Les boîtes sont incubés à 30°C, jusqu'à l'obtention d'une bonne croissance. Par la suite, et à partir de ces cultures, des suspensions de germes ont été préparées pour les utiliser ultérieurement.



Figure 11 : les dermatophytes cibles utilisés

4.3. Technique de stries croisées

L'activité antimicrobienne des isolats est évaluée par la méthode des stries croisées sur milieu ISP2. Celle-ci consiste à ensemencer les isolats d'actinobactéries à tester en un seul trait à la surface du milieu solide en bordure de la boîte de Pétri. Après incubation pendant 10 jours à 30°C. Les souches cibles sont ensemencées perpendiculairement à la strie longitudinale de l'actinobactérie (Fig. 12). Les boîtes sont incubées à 30°C pendant 24h à 48h pour les bactéries et la levure et les moisissures 48h jusqu'à 5 jour. La lecture des résultats s'effectue par la mesure de la distance d'inhibition entre les bordures de la souche cible et l'isolat d'actinobactéries testé.

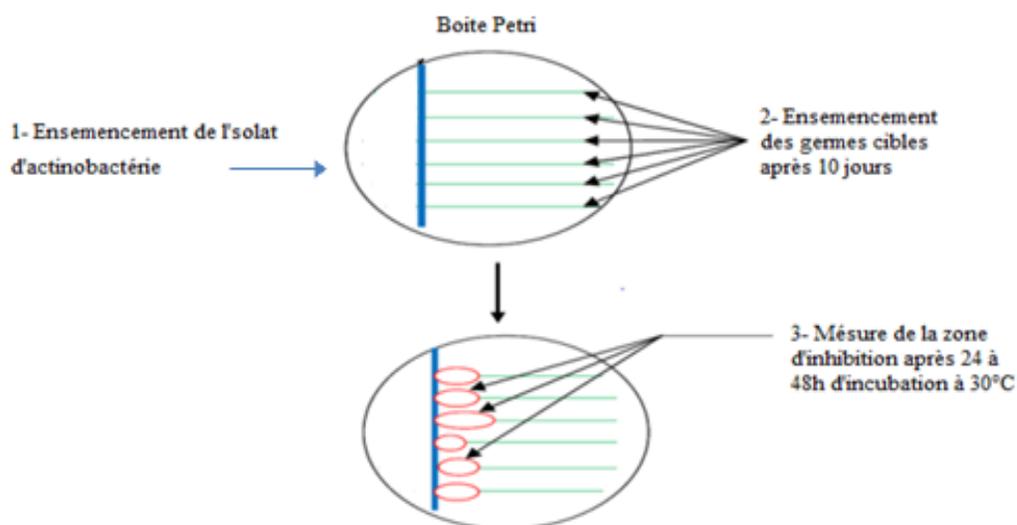


Figure 12 : Mise en évidence de l'activité antifongique sur milieux solide par la méthode des stries croisés (Rothrock et Gottlieb,1981)

5. Cinétique de production des antifongique en milieu liquide

Cette étude a été réalisée sur la meilleure souche d'actinobactéries, celle ayant montré une activité antifongique intéressante lors des tests préliminaires par stries croisés.

5.1. Milieux de culture

Deux milieux de culture complexes sont utilisés: ISP2 et Bennett (voir annexe).

5.2. Pré-cultures

Pour obtenir les pré-cultures, les spores sont raclées à partir d'une culture en boîte de Pétri de la souche d'actinobactérie âgée de 7 jours, et inoculés dans des tube à vis contenant 3 mL de chaque milieu désiré à inoculer par la suite. Après 48 h d'incubation dans un shaker (150 rpm; 30°C), les pré-cultures sont utilisées pour inoculer les milieux de production.

5.3. Cinétique de production des antifongique

La cinétique de production des antifongiques a été réalisée en vue de déterminer le temps nécessaire pour qu'elle soit maximale. Des fioles d'Erlenmeyer de 500 mL contenant chacune 100 mL de milieu (pH 7,2) sont ensemencées avec 3 mL de la pré-culture. Les cultures sont incubées à 30°C et agitées à 150 rpm dans un Shaker. Des prélèvements sont effectués toutes les 24 h pendant 5 jours pour être analysés.

L'activité antifongique est déterminée par la méthode de diffusion des puits contre *Candida albicans* et *T.rubrum*. Dans cette méthode, du milieu ISP2 semi solide contenant 12 g/L d'agar en

surfusion est pré-ensemencé avec le germe-cible avant d'être coulé en boîtes de Pétri. Après solidification du milieu, des puits sont conçus à l'aide d'un emporte-pièce de 10 mm de diamètre. Une aliquote de 0,2 mL de surnageant de culture à analyser, est prélevée stérilement puis introduite dans le puits. Les boîtes sont mises 2 h à 4°C pour permettre la diffusion des substances actives tout en arrêtant momentanément la croissance des germes, puis incubées à 30°C. La lecture des résultats se fait en mesurant le diamètre de l'auréole d'inhibition formée autour du puits après 24 h (pour les bactéries et les levures) et 48 h (pour les champignons).



Figure 13 :Les Différentes étapes de la mise en évidence de l'activité antifongique (Méthode des puits).

CHAPITRE III

Résultats et discussions

1. Résultats :

1.1. Isolement et origine des actinobactéries mycéliennes

L'isolement des actinobactéries mycéliennes a été effectué à partir de 2 échantillons de sols, provenant de Daïa Ben Dahoua et de Laghouat, sur le milieu Chitine-Vitamines B (CH-VB) additionnés ou non des agents sélectifs, et incubés à 30°C pendant 21 jours. A partir d'un grand nombre de colonies d'actinobactéries, 100 isolats ont pu être choisis sur la base de leur diversité culturelle macro et micromorphologique remarquée lors de l'observation des colonies à l'œil nu et au microscope optique sur les milieux d'isolements. Nous avons ainsi choisi 50 isolats à partir du sol de Daïa Ben Dahoua et 50 isolats du sol de Laghouat, le tableau 3 montre l'origine des isolats selon l'échantillon de sol, l'agent sélectif utilisé et la dilution.

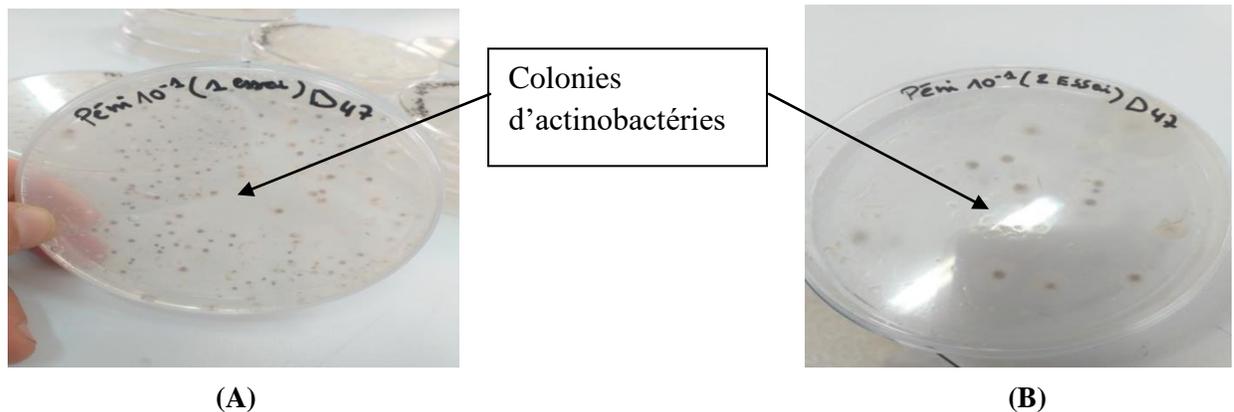


Figure 14: Résultats de l'isolement à partir des deux échantillons :(a) E1, (b) E2 sur milieux Chitine-Vitamines agar (CH-VB) (photo originale).

Tableau 03. Origine des isolats d'actinobactéries sélectionnés selon le sol, l'agent selectif et la dillution

Sol	Milieu	Dilution	Agents sélectif			Témoin	Total
			Chloramphénicol	Pénicilline	Streptomycine		
Echantillon de laghouat (L)	Chitine-Vitamines agar (CH-VB)	10 ⁻¹	L9, L10, L11, L6	L24, L25, L26, L27, L28	L18, L48 L49, L50	/	13
		10 ⁻²	L1, L2, L3, L4, L5, L7	L44, L45 L46	L14, L15, L16 L17	L19, L20 L21, L23	17
		10 ⁻³	L8, L12	L29, L30, L31, L32, L33, L34, L35, L36, L37, L38, L39, L40, L41, L42, L43,	L13, L47	L22	20
Echantillon de Daia Bendahoua (D)	Chitine-Vitamines agar (CH-VB)	10 ⁻¹	D25, D26, D29, D30	D42,	D18, D19, D20	D7, D8 D9, D10D49, D50	14
		10 ⁻²	D23, D24, D27, D28	D37, D38, D39, D43	D16, D21, D22	D5, D6, D12	14
		10 ⁻³	D31, D32, D33	D34, D35, D36, D40, D41	D13, D14, D15,D17, D44, D45, D46	D1, D2 D3, D4, D11, D47, D48	22
Total	/	/	23	33	23	21	100

1.2. Purification

Après 21 jours d'incubation (période nécessaire pour la croissance des actinobactéries), 100 colonies ont été choisies en se basant sur des critères morphologiques (observation à l'œil nu et au microscope photonique (Zeiss) aux grossissements 100 et 400). Afin de les purifier, ces colonies ont été transférées etensemencées par la méthode d'épuisement sur un nouveau milieu de culture ISP2. Parmi les 100 colonies, seuls 60 isolats (tableau 4) ont pu croître purement et ont présenté les caractéristiques macros et micro morphologique des actinobactéries. Il est à noter que la majorité parmi les 40 autres isolats ont été contaminés et les autres n'ont pas pu croître.

1.3. Caractéristiques culturales et morphologiques des isolats

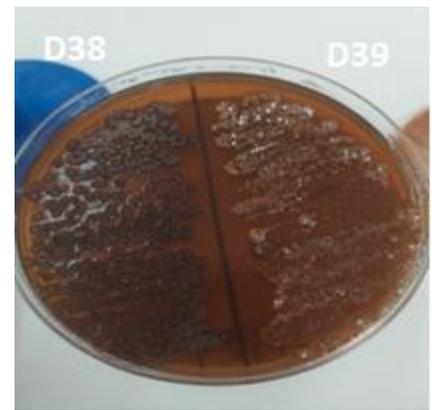
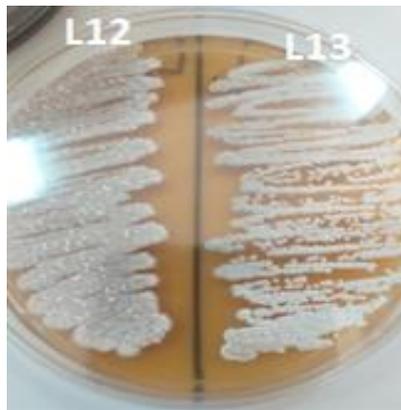
Les isolats sélectionnés ont montré une bonne croissance sur ISP2 et leurs colonies apparaissent à l'œil nu généralement rondes, opaques et avec un contour irréguliers. Elles adhèrent à la surface de la gélose et présentent un aspect poudreux pour certains isolats (ex : D36, D31, L5, L12, L13...), granuleux (ex : D8, D37...) ou encore lisse (ex : D38) pour autres.

- Plusieurs couleurs ont été notées pour le mycélium aérien des colonies à savoir : blanche pour (D36, L14, L5, L13, D30, L25....), grise pour (L11, D31, D14, D7, L41...), marron pour (D8, D37, D40...), rouge pour (L1, D42...).

- Le mycélium de substrat sur le dos des boites apparait de couleur jaune pour (D36, L5...), marron foncé pour (D8, D37, D38...), beige pour (L2...), grise pour (D31, L14...).

- Certains isolats produisent des pigments diffusibles de couleur marron dans le milieu comme (ex : D8, D37, D40...).

- Micromorphologiquement, la plupart des colonies sous microscope ont montré un mycélium aérien avec des chaînes de spores de type S (chaînes spiralées) (ex D36, L5), RF (chaînes droites à flexueuses) (par ex : L14) ou RA (chaîne sen crochets ou en boucles fermées) (par ex : D31) caractérisant le genre *Streptomyces*.



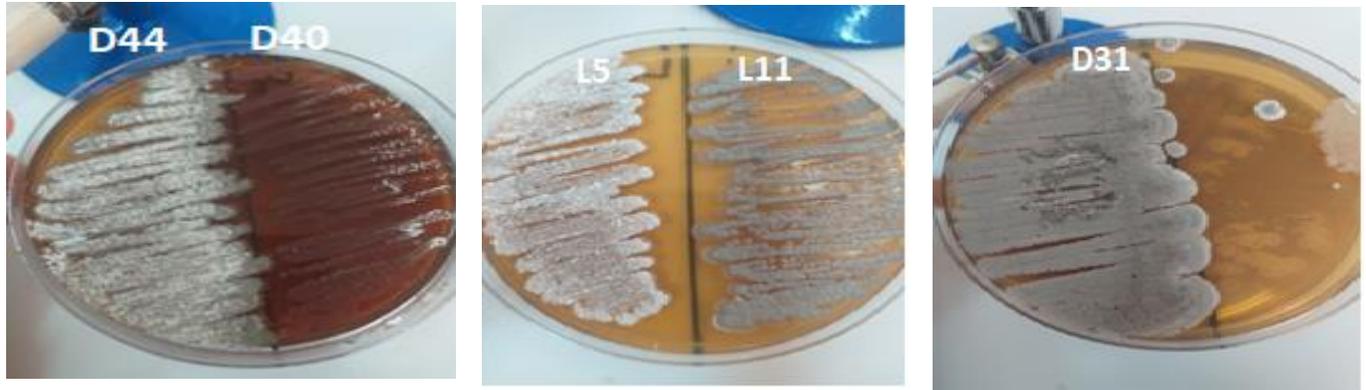


Figure :15Macromorphologie de quelques isolats purs d'actinobactéries sur milieu ISP2 (photos originales).

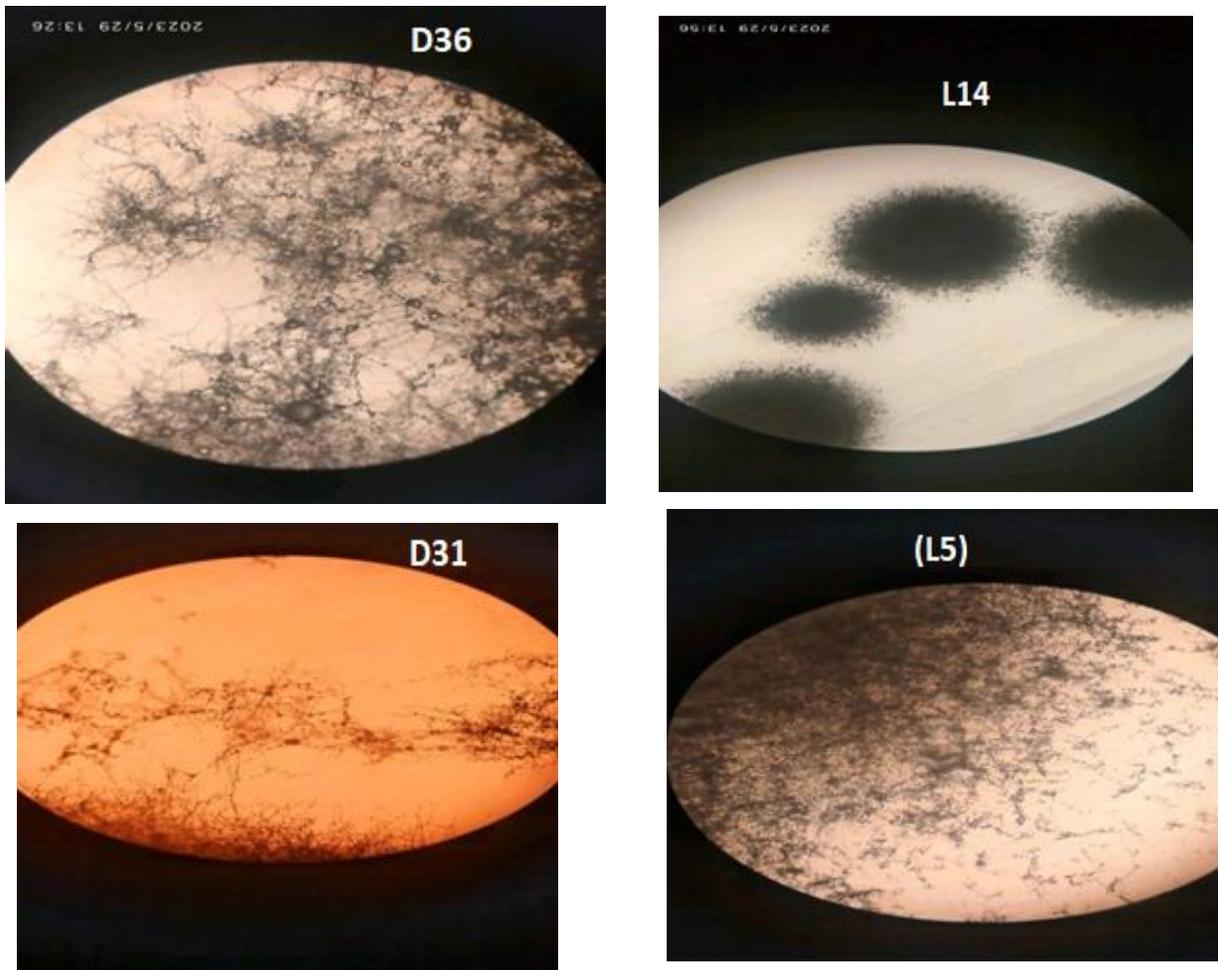


Figure 15 :Mycélium aérien de quelques isolats purs d'actinobactéries sous microscope x40(photos originales).

1.4. Évaluation du potentiel antifongique des actinobactéries

Tous les 60 isolats ont été testés pour leurs activités antifongiques par la méthode de stries croisées (Fig. 16). Cette méthode permet de détecter l'effet inhibiteur des isolats d'actinobactéries vis-à-vis les germes cibles. Le test est effectué contre 3 souches dermatophytes (*Trichophyton rubrum*, *Trichophyton glabrum* et *Microsporium canis*) et une souche de *Candida albicans* ATCC 10231. Parmi les 60 isolats testés, nous avons constaté que 16 ont présenté une activités antimicrobienne soit (26%) contre au moins un germe cible (Tableau 4). Trois isolats ont montré une bonne activité anti-dermatophytes. Le premières l'isolat D36 qui a présenté une bonne activité contre tous les germes cibles notamment contre *Candida albicans*(25 mm) et *Microsporium canis* (17mm). Le deuxième est l'isolat D37 qui a montré une grande activité anti-dermatophytes notamment contre *Trichophyton rubrum*(24mm), *Trichophyton glabrum* (25 mm) et *Microsporium canis* (15mm). Le troisième est l'isolat D8 qui a présenté un grand effet inhibiteur contre les souches dermatophytes avec une zone d'inhibition de 26mm contre *Trichophyton rubrum* et 20mm contre *Trichophyton glabrum* puis 12mm contre *Microsporium canis*. Cependant, cet isolat n'a aucune activité contre la souche test *Candida albicans*. Trois autres isolats ont illustré une activité anti dermatophytes moyenne à forte à savoir : L14, L34 et D30. Les autres qui restent sont avec une activité moyenne à faible. Les valeurs d'activité des 16 isolats contre les germes tests utilisés sont illustrées par ordre dans le tableau 4.

Tableau 04. Activité antagoniste des isolats d'actinobactéries sélectionnés

Isolatactif	Diamètre d'inhibition contre les germes-cibles en mm					
	<i>B.s</i>	<i>E.c</i>	<i>C.a</i>	<i>M.c</i>	<i>T.r</i>	<i>T.g</i>
D36	15	25	25	17	10	5
D37	20	20	09	15	24	25
D08	16	17	00	12	26	20
L14	00	00	20	ND	10	10
L34	00	05	15	ND	15	20
D30	00	00	10	20	05	10
L 5	10	00	10	10	00	00
D6	10	00	15	20	00	02
D34	00	02	12	ND	8	11
D07	00	00	17	13	00	00
L48	00	00	15	09	00	00
L32	00	00	08	12	04	10
D32	00	00	06	ND	05	06
L27	10	00	00	00	00	00
L16	00	00	10	00	00	00
D29	00	00	10	00	00	00

Note : *E.C:* *Escherichia coli*, *B.S:* *Bacillus subtilis*, *C.A:* *Candida albicans*, *T.r :* *trichophyton rubrum*, *T.g :* *Tricophyton glabrum*, ND : Non déterminé (absence de la croissance de la souche test)

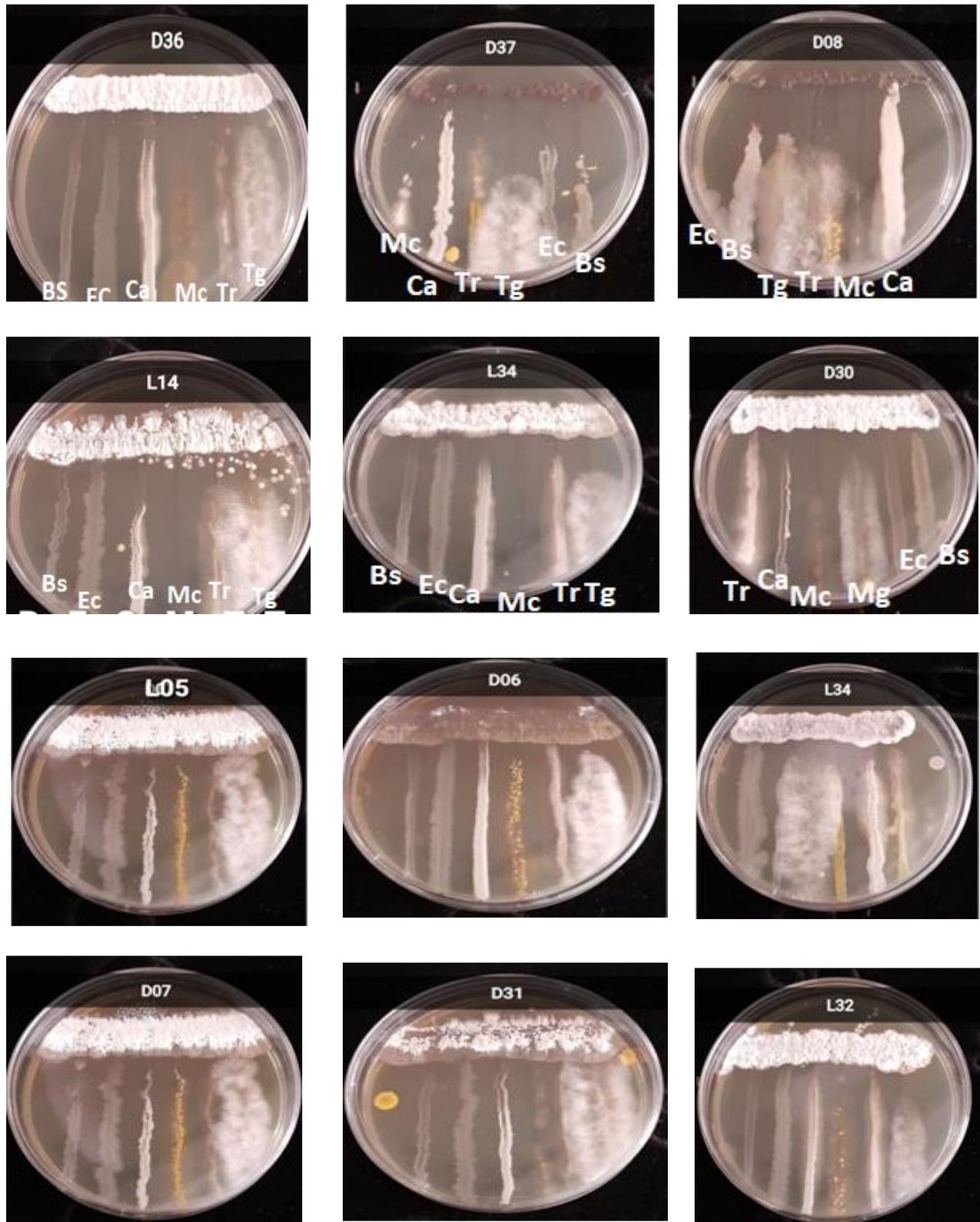
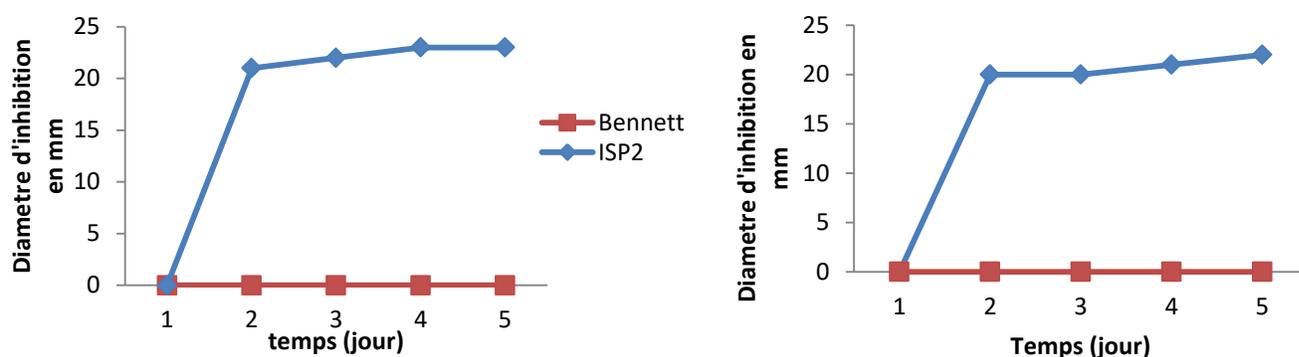


Figure 16: Activité antagoniste des germes cibles des meilleurs isolats sélectionnés

1.5. Cinétique de production des antifongique en milieu liquide

La cinétique de production des métabolites antifongiques a été menée avec la souche qui a montré la bonne activité sur milieu solide par la technique des stries croisés, il s'agit de la souche D36. Des prélèvements quotidiens à intervalle de 24h pendant 5 jours ont été effectués pour déterminer la biomasse et mesurer les diamètres des zones d'inhibition vis-à-vis des souches cibles : *Candida albicans* ATCC 10231 et *trichophyton rubrum*. Les activités ont été mesurées par la méthode des puits. La cinétique de production des antifongiques n'a été constatée que dans le milieu ISP2 et aucune activité n'a été enregistrée dans le milieu Bennett. Elle a débuté le 2^e jour d'incubation avec un diamètre d'inhibition 20mm contre *Candida albicans* et atteint une valeur de 22mm au 5^e jour. La même cinétique presque a été remarquée contre *Trichophyton rubrum*, dans laquelle a débuté le 2^e jour d'incubation par un diamètre de 21mm et atteint 23mm au 4^e jour et reste stable au 5^e jour (Fig. 17).



Souche test: (*Trichophyton rubrum*) Souche test: (*Candida albicans*)

Figure 17: Cinétique de production des antifongiques de la souche D36 en milieux ISP2 et Bennett

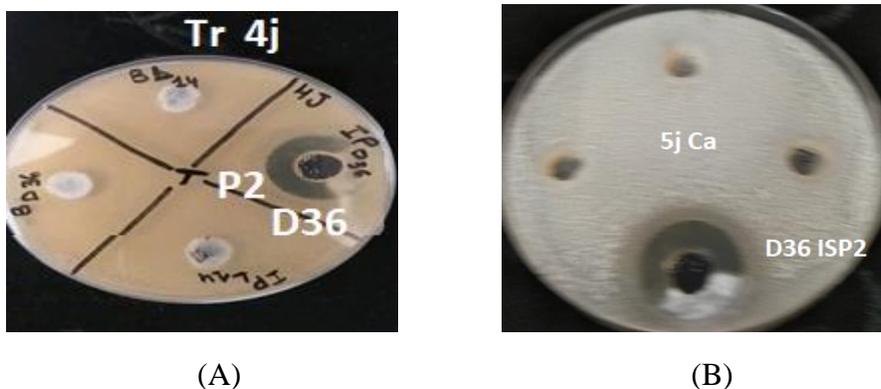


Figure 18: Activité antifongique de la souche D36 (méthode des puits) contre *Trichophyton rubrum* (A) et *Candida albicans* (B)

2. Discussion

Dans notre étude, nous avons essayé de rechercher des actinobactérie ayant une activité antagoniste contre les dermatophytes à partir du sol de la région. L'isolement a été effectué sur milieu Chitine vitamine B de **Hayakawa et Nonomura (1984)** ajouté ou non des agents sélectifs. Nous avons choisi ce milieu en se basant sur des travaux antérieurs qui ont confirmé sa prédilection pour les actinobactéries des sols sahariens (**Boudjella, 1994**). Ainsi, un grand nombre d'actinobactéries a été isolé à partir des deux échantillons de sol choisis. Cependant nous avons constaté que le nombre est plus élevé dans l'échantillon prélevé de la palmeraie. Ceci peut être expliqué par la richesse de ce type des sols par la matière organique comme il a été affirmé par **Djaballah,(2010) et Belyagoubi (2014)**, ou bien par aillera la différence dans les facteurs physico-chimiques, qui influent considérablement sur le nombre ainsi que le type d'actinobactérie habitant le sol (**Hop et al, 2012**). Selon **Sabaou et al. (1980; 1992)**, la densité des actinobacteries dans les sols de surface des palmeraies oscille entre 5×10^5 et 5×10^6 ufc/gss (unités formant colonies par gramme de sol sec) par contre, celle des autres sols sahariens, varie entre 10^2 et 10^5 ufc/gss. Cette affirmation est corroborée par **Lee et Hwang. (2002)**, qui ont confirmé que le nombre d'actinobactéries est corrélé positivement avec le taux de la matière organique dans le sol.

Le prétraitement des échantillons par chaleur est connu dans ce type d'isolement et son objectif est de réduire le nombre des contaminants. De même le prétraitement chimique par CaCO_3 qui a le même rôle. En plus, il y en a plusieurs chercheurs qui ont confirmé que l'ajout du CaCO_3 est efficace pour l'isolement des actinobacteries (**Kitouni, 2007**). D'après **Gurung et al, (2009)** cette technique permet non seulement une augmentation du nombre des colonies d'actinobacteries par un facteur de 100 ou plus en comparaison avec les échantillons non traités par le bicarbonate de calcium, mais aussi une diminution de la flore fongique et bactérienne qui ont un temps de génération courtait qui peuvent exercer un effet compétitif avec les actinobacteries. D'après **Monisha et al., 2011**, le traitement chimique au CaCO_3 peut améliorer ou favoriser l'isolement d'actinobacteries rare, entre autre de nouvelles souches de *Streptomyces*. C'est ce que d'autres chercheur sont le prétendu (**El Nakeeb et lechevalier, 1963 ; Cavalla et Eberlin, 1994**).

L'isolement sélectif des actinobactéries à partir de leur habitat, pose problème. En effet, trop de substrats favorisent les champignons et les bactéries à croissance rapide et empêchent de

ce fait un isolement facile des actinobactéries qui ont un temps de génération relativement long (**Williams et al., 1983 ; Crawford et al., 1993**). Pour réduire cet effet le prétraitement à la chaleur sèche et l'ajout d'antibiotiques tels que: le chloramphénicol, la pénicilline et la streptomycine et l'antifongique cycloheximide étaient indispensables. Les agents sélectifs utilisés dans notre travail ont été choisis au vu des résultats obtenus par (**Boudjella, 1994**). Selon cet auteur l'addition au milieu « chitine vitamine B » d'antibiotiques sélectifs tels que: le chloramphénicol, la kanamycine, la pénicilline, la rifampicine et la streptomycine, permet de mettre en évidence des genres peu fréquemment ou rarement isolés de par le monde, tels que: *Actinomadura, Amycolatopsis, Nocardia, Nocardiosis, Saccharomonospora, Saccharopolyspora*. **Sabaou et al. (1998)** ont noté que le genre *Streptomyces* est favorisé par la présence du chloramphénicol, la rifampicine et la streptomycine. Les genres *Actinomadura, Nocardia,* et *Nocardiosis* sont favorisés par la pénicilline et la rifampicine (**Sabaou et al., 1998; Badji, 2006; Zitouni et al., 2005**).

Les résultats de notre isolement ont montré une prédominance nettement visible pour le genre *Streptomyces*. Ceci n'était pas étonnant car ce genre constitue 80 à 95% des actinobactéries dans divers types de sols et autres substrats de par le monde (**Goodfellow et Williams, 1983**).

La mise en évidence des activités antifongiques a été mesurée par la méthode des stries croisées (**Rothrock et Gottlieb, 1981**) sur milieu ISP2. Sachant que nos dermatophytes cibles poussent très bien sur ce milieu nous l'avons préféré au milieu de Sabouraud (à base d'extrait de malt et de peptone) habituellement utilisé pour la croissance des champignons et levures. La méthode des stries croisées est choisie cause de son avantage de pouvoir utiliser plusieurs micro-organismes tests pour la même souche étudiée et sur la même boîte. Les résultats obtenus ont montré que sur les soixante isolats testés seulement 16 ont présenté une activité antifongique (soit 26%). Ce pourcentage pourrait apparaître compatible avec les travaux de **Alimuddin et al. (2011)** qui ont trouvé 32% (sur 43) et **Belyagoubi (2014)** qui a trouvé 26% (sur 38).

D'après nos résultats, trois souches (D36, D37 et D8) ont montré des propriétés antagonistes beaucoup plus importantes que les autres souches sélectionnées. Nous rappelons que l'activité mesurée est globale; elle peut résulter soit d'un grand nombre de molécules produites simultanément ou d'une molécule très puissante.

Les antifongiques anti dermatophytes de la souche D36 ont été produits en utilisant 2 milieux de culture complexes: L'ISP2 et le Bennett. Ils ont été choisis suite aux travaux effectués antérieurement par **Badji, (2006)**. Cet auteur a trouvé ces deux milieux meilleurs parmi 10 autres qui les a testé pour la production des antibiotiques par les actinobactéries.

Nous avons remarqué une absence totale de l'activité de la souche D36 dans le milieu Bennett par contre elle est bien exprimée dans le milieu ISP2. Cela peut être due à la présence de facteurs peu favorables à la production, contenus dans la composition de peptone et l'extrait de viande (Composés différents dans la composition de Bennett par rapport au ISP2). Selon **Gesheva et al. (2005)**, la nature des sources: de carbone, d'azote, de phosphore, de potassium, de magnésium et de trace d'éléments minéraux affectent fortement la production de la molécule antifongique.

*CONCLUSION
ET PERSPECTIVES*

Le travail que nous avons entrepris a pour objectif d'isoler des actinobactéries à partir de sol ayant une activité antagoniste contre les dermatophytes. Ainsi, le milieu chitine vitamine B nous a permis d'isoler à partir de deux échantillons de sol un grand nombre d'actinobactéries. Nous avons sélectionné sur la base des critères morphologiques 100 isolats qui ont été purifiés. Parmi les, 60 isolats qui ont pu croître et ont donné des colonies pures. Tous ces isolats ont été testés pour leur activité anti-dermatophytes par la méthode de stries croisées contre les germes cibles : *Trichophyton rubrum*, *Microsporium canis*, *Trichophyton glabrum* et *Candida albicans* ATCC 10231. Les résultats ont montré que 16 isolats ayant présenté une activité contre au moins un germe cible. En plus, 3 souches ont exhibé la meilleure activité contre les dermatophytes cibles. Il s'agit de D36, D37 et D8. La suite du travail pour l'étude de cinétique de production des antifongiques sur milieu liquide a été poursuivie avec la souche D36. Cette souche a montré une activité sur milieu ISP2 depuis le deuxième jour d'incubation et a inhibé la croissance de *Trichophyton rubrum* et *Candida albicans* ATCC 10231, avec des auréoles d'inhibition de diamètre 23mm et 22mm successivement par la méthode de diffusion des puits.

Enfin nous pouvons dire que notre étude a montré des résultats intéressants et mérite la continuité par les perspectives suivantes pour les isolats avérés intéressants :

- Réaliser une étude taxonomique polyphasique
- Suivre l'étude de production des métabolites sur les milieux liquides
- Semi purifier et purifier les fractions actives par (CCM, HPLC..)
- Caractériser les molécules pures par la spectrométrie de masse et RMN.

Références

Bibliographiques

- Aamir, M., Rai, K. K., Zehra, M. K., Samal, S., Yadav, M., and Upadhyay, R. S. (2020). —Endophytic actinobacteries in bioactive compounds production and plant defense system, in *Microbial Endophytes*, eds A. Kumar, and V. K. Singh, (Sawston: Woodhead Publishing), 189–229.
- Abbas, E., Osman, A., and Sitohy, M. (2020). Biochemical control of *Alternaria tenuissima* infecting post-harvest fig fruit by chickpea vicilin. *Journal. Science. Food Agriculture*. 100, 2889–2897. doi: 10.1002/jsfa.10314
- Aboul-enein, H. Y., Ali, I. (2000). Macrocylic Antibiotics As Effective chiral Selector Resolution by liquid chromatography and capillary Electrophoresis. *Chromatographia*. 52, 679-691.
- Amimer L ; bellabas. 2014. L'étude de la mycoflore superficielle chez le diabétique. Thèse soutenue le Université ABOU BEKR BELKAID. Faculté de médecine Dr .B.benzerdjeb-Tlemcen. 115 p.
- Anibou, M., Chait, A., Zyad, A., Taourirt, M., Ouhdouch, Y. et Benherref, A. (2008). Actinobacteries from Moroccan habitats: isolation and screening for cytotoxic activities. *Jornal mondial de microbiologie et biotechnologie*. 24, 2019–2025p.
- ANOFEL. (2014). Association Française des Enseignants de Parasitologie et Mycologie. Dermatophytes ou Dermatophyties. UMVF - Université Médicale Virtuelle Francophone.
- Arrache D., Sebai K., Talzazet L., Zait H., Madani K., Hamrioui B. 2015. Profil épidémiologique des teignes du cuir chevelu (2009–2014). *Journal de Mycologie Médicale* September 2015, Alger, Algérie. 2015. p. 243-244.
- Athalye M., Lacey J. and Goodfellow M. (1981). Selective isolation and enumeration of actinobacteries using rifampicin. *J. Appl. Bacteriol.* 51:289–297. In *bergey's Manuel of Systematic Bacteriology*. (2012). The actinobacteria, Part 4. Genus *Nocardiosis*.
- Badji, B. (2006). Etude de la taxonomie et des antibiotiques antifongiques de trois souches d'actinobacteries d'origine saharienne appartenant aux genres *Actinomadura* et *Nonomurea*. Thèse de Doctorat. Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou. 226p.

1. Baghirova, A. A., & Kasumov, K. M. (2022). Antifungal Macrocyclic Antibiotic Amphotericin B—Its Present and Future. Multidisciplinary Perspective for the Use in the Medical Practice. *Biochemistry (Moscow), Supplement Series B: Biomedical Chemistry*, 16(1), 1-12.
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibnsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of pharmaceutical analysis*, 6(2), 71-79.
 - Barka E.A. (2016). Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. Vol. 80 n°1. P 3-4.
 - Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H. P., et van Wezel, G. P. (2016). Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(1), 1-43.
 - Belyagoubi L. (2014). Antibiotiques produits par des bactéries (actinobactéries et bactéries lactiques) issus de différents écosystèmes naturels algériens. Thèse de Doctorat. Université Aboubakr Belkaïd-Tlemcen. P : 14-17.
 - Belyagoubi, L (2014). Antibiotiques produits par des bactéries (actinomycètes et bactéries lactiques) issus de différents écosystèmes naturels Algériens. Thèse de doctorat : Substances Naturelles, Activités Biologiques et Synthèse. Tlemcen : Université Aboubakr Bel kaïd Tlemcen, 170.
 - Berdy, J. (2005). Bioactive microbial metabolites. *J. Antibiot.* 58: 1-26.
 - Berdy, J., Aszalos, A., McNitt, K. L. (1987). *CRC Handbook of antibiotic compounds*. Vol. XIII. Microbial metabolites. Part 1, 2, 3. Florida, USA. CRC Press, Boca Raton.
 - Bharti, A., Kumar, V., Gusain, O., & Bisht, G. S. (2010). Antifungal activity of actinobacteria isolated from Garhwal region. *Journal of Science, Engineering, & Technology. Mgt.* Vol, 2(2).
 - Boer, W. D., Folman L. B., Summerbell, R. C. et Boddy, L. (2005). Living in a fungal world: impact of fungi on soil bacterial niche development. *FEMS Microbiol.* 29:795-811.
 - Boudjella H. (1994). Influence des milieux de culture, des antibiotiques et du pré-traitement des échantillons à la chaleur sur la sélection des genres et des espèces d'actinomycètes rares de quelques sols sahariens. Magister de Microbiologie, E.N.S. de Kouba. 177.

- Bouaziz S. (2018). Recherche de souches bactériennes locales productrices de substances antimicrobiennes : isolement, sélection, identification des souches actives et caractérisation partielle des substances bioactives. Thèse de Doctorat. Université Kasdi Merbah-Ouargla.P : 4-13.
- Boucheffa K. (2011). Criblage de souches d'actinobacteriesproductrices d'antifongiques non-polygéniques : identification des souches productrices et essai de caractérisation des antifongiques produits. Thèse de Magister. Université Abderrahmane Mira-Bejaia. P : 12-14.
- Boudjelal-Bencheikh F. (2012). Taxonomie et antagonisme des actinobacterieshalophiles d'origine saharienne et caractérisation des composés bioactifs sécrétés par Actinoalloteichus sp. AH97. Thèse de Doctorat. Ecole Nationale Supérieure Agronomique. P : 5-35.
- Boudjella, H. (2007). Etude taxonomique et des propriétés antagonistes des Streptosporangium des sols sahariens et caractérisation des principaux antibiotiques sécrétés par trois souches. Thèse de Doctorat. Institut National Agronomique El-Harrach (Alger). pp177.
- Brans A. 2015. Les mycoses superficielles : pharmacologie des antifongiques. Thèse soutenue. Université Lille2. Faculté des sciences pharmaceutiques et biologiques. 155p.
- CAFARCHIA C., ROMITO D., CAPELLI G., GUILLOT J. et OTRANTO D .(2006) .Isolation of Microsporumcanis from the hair coat of pet dogs and cats belonging to owners diagnosed with M. canistineacorporis. Vet Dermatol , 17,31-327.
- Cavallo J-D. et Mérens A. (2008). Antibacterial spectrum of an antibiotic and clinical categorization.Pathologie Biologie. Vol .56 (5). P : 300-304.
- Chabasse D ; Martin D ; Guiguen C et Richard-Lenoble. 2007. Parasitoses et mycoses des régions tempérées et tropicales Edition Anofel Elsevier Masson. 321 p.
- CHABASSE D, BOUCHARA J., DE GENTILE L., BRUN S.,CIMON B . et PENN P. (2004). Les dermatophytes , cahier n°3 1, bioforma, paris.
- Chabasse D, Contet-Audonneau N. Dermatophytes et dermatophytoses. EMC Maladies infectieuses. 2011; 8(2): 1-15.
- **37.**CHABASSE D. et PIHET M.(2008) ;Les dermatophytes : les difficultés du diagnostique mycologique ;Revue Francophone des Laboratoire,406 , 29-38.

- Chabasse D., Guiguen CI., Contet-Audonneau N., 1999. Mycologie médicale. Les abrégés. Paris, Masson, 1999,320 p.
- ChabasseD, Guiguen C. Dermatophytes: difficultés d'interprétation et pièges du diagnostic mycologique. *Revue francophone des laboratoires*. 2019; 2019(510): 26-35.
- Chater, K. F. (2006). Streptomyces inside out: a new perspective on the bacteria that provide us with antibiotics. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 361, 761–768p.
- Chaudhary, H. S., Soni, B., Shrivastava, A. R., et Shrivastava, S. (2013). Diversity and versatility of actinobacterias and its role in antibiotic production. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 3(8 SUPPL).
- Christian, R. (2013). Mycologie médicale. Lavoisier. Paris. 750 pages.
- Clere N. 2011. Comment venir à bout des mycoses *Actualités pharmaceutiques* ; n° 507 p.
- Coates, A. et Hu, Y. (2007). Novel approaches to developing new antibiotics for bacterial infections. *Brit. J. Pharmacol.* 152: 1147-1154.
- Coulibaly, O., 2014. Dermatophytoses En Milieu Scolaire Au Mali (Doctorat en maladies infectieuses). Aix-Marseille, France.
- Crawford D. L., Lynch J. M., Whipps J. M. et Ousley M. A. (1993). Isolation and characterization of actinomycete antagonists of a fungal root pathogen. *Applied and Environmental Microbiology* 59 (11): 3899–3905.
- Djaballah C. (2010). Biodiversité des actinobacteries halophiles et halotolérantes isolées de la sebka d'Ain Mlila. Thèse de Magister. Université Mentouri-Constantine. P : 5-7.
- Djaballah, C (2010). Biodiversité des actinomycetes halophiles et halotolerants isolés de La Sebka de AIN M'LILA. Mémoire Magistère : Ecologie Microbienne. Université Mentouri de Constantine, Algérie, 79.
- Djebaili, R., Pellegrini, M., Smati, M., Del Gallo, M., & Kitouni, M. (2020). Actinomycete strains isolated from saline soils: Plant-growth-promoting traits and inoculation effects on solanum lycopersicum. *Sustainability*, 12(11), 4617. Edition 5.
- El-Nakeeb, M. A. et Lechvalier, H. A., (1963). Selective isolation of aerobic actinomycetes. *Appl. Microbiol.* 11. 75-77.

- Errakhi, R., Dauphin, A., Meimoun, P., Lehner, A., Reboutier, D., Vatsa, P., ... & Bouteau, F.(2008). An early Ca²⁺ influx is a prerequisite to thaxtomin Ainduced cell death in Arabidopsis thaliana cells. *Journal of Experimental Botany*, 59(15), 4259-4270.
- Euzéby, J. P. (2002). List of bacterial names with standing in nomenclature.<http://www.bacterio.cict.fr/>.
- Feuilhade de Chauvin M., Bazex J., Claudy A., Roujeau JC. 2003. Infections à Dermatophytes de la peau glabre, des plis et des phanères. *Ann. Dermatol. Venereol.* 130 p : 3S59-3S63.
- Gonzalez-Franco, A. C., & Robles-Hernández, L. (2022). Antagonist activities and phylogenetic relationships of actinobacterias isolated from an Artemisia habitat. *Revista Argentina de Microbiología*.
- Goodfellow M (2012). Phylum XXVI. Actinobacteria phyl.nov. In: Whitman WB, Goodfellow M, Kämpfer P, Busse HJ, Trujillo ME, Ludwig W, Suzuki KI, Parte A(eds) *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol 5, 2nd edn, The Actinobacteria, Part B. Springer, New York, pp 33–34.
- GUILLOT J., ODILE CROSAZA., BOTTERELB F. et CHERMETTE R .(2015). Rôle des animaux vertébrés dans la transmission des champignons dermatophytes pathogènes pour l'homme. *Revue francophone des laboratoires*, 477, 53-60.
- Gundliffe, E. (2006). Antibiotic production by actinomycetes: the Janus faces of regulation. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 33, 500-506.
- Gundliffe, E. (2006). Antibiotic production by actinomycetes: the Janus faces of regulation. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 33, 500-506.
- Hayakawa M. and Nonomura H. (1987). Humic acid-vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycetes. *J Ferm Technol.* 65 :501–509.
- Hop, D., Sakiyama, Y., Binh, C., Otaguro, M., Hang, D., Miyadoh, S., Luong, D., et Ando, K (2012). Taxonomic and ecological studies of actinomycetes from Vietnam: isolation and genus-level diversity. *The Journal of Antibiotics*. Vol: 64: 599–606
- Hoshino, Y., Mukai, A., Yazawa, K., Uno, J., Ishikawa, J., Ando, A., ... & Mikami, Y. (2004). Transvalencin A, a thiazolidine zinc complex antibiotic produced by a

- clinical isolate of *Nocardia transvalensis* I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities. *The Journal of antibiotics*, 57(12), 797-802. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00019-15>
- <https://doi.org/10.1007/s10298-014-0874-2>
- Hungund, B.S., Desai, S.S., Kamath, K.C., Tennalli, G.B. (2021). Terrestrial Ecology of Actinobacteria. In: Yaradoddi, J.S., Kontro, M.H., Ganachari, S.V. (eds) *Actinobacteria. Rhizosphere Biology*. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-16-3353-9_3
- Kitouni, M (2007). Isolement de bactéries actinomycétales productrices d'antibiotiques à partir d'écosystèmes extrêmes. Identification moléculaire des souches actives et caractérisation préliminaire des substances élaborées. Thèse de Doctorat en Microbiologie appliquée. Université Mentouri-Constantine. Algérie. 170
- Kim, M., Oh, H. S., Park, S. C. et Chun, J. (2014). Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 64 (2): 346-351.
- Kurtböke, D. İ. (2012). Biodiscovery from rare actinomycetes: an eco-taxonomical perspective. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 93:1843–1852.
- La Clair, J. J. (2021). Accessing Nystatin through Mariculture. *Molecules*, 26(24), 7649
- Lamari, N. L. (2006). Production de nouveaux antibiotiques du groupe des pyrrothines par une nouvelle espèce d'actinomycète, *Saccharothrix algeriensis*. Thèse de doctorat en biologie, option microbiologie, Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, p.156.
- Lee J. Y. et Hwang B. K. (2002). Diversity of antifungal actinomycetes in various vegetative soils of Korea. *Canadian journal of microbiology* 48 (5): 407–417.
- Naili, I., Ababsa, D., & Bensalama, O. (2021). Les Biofongicides comme moyen de biocontrôle contre les champignons phytopathogènes.
- Perry J. J., Staley J. T. et Lory S. (2004). *Microbiologie*. Dunod. 912p.
- Petinataud, D., 2014. Optimisation de la stratégie diagnostique des onychomycoses : du prélèvement à l'identification fongique. (Doctorat en pharmacie). Lorraine, France.
- **85.** Prakash, A., Satyanarayana, T. et Johri, B. N. (2012). *Microorganisms in Environmental Management*. Springer. Pp: 819.

- Prescott L.M., Willey J. M., Sherwood L. M. et Woolverton C. J. (2018). Microbiologie. De Boeck supérieur. France. 1120p.
- Prescott, L. M., Harley, J. P. et Klein, D. A. (2010). Microbiologie. De Boeck: Bruxelles. 2ème édition Pp : 1088. Press, London. 9-26. *Rhodococcus aethrivorans* sp.
- Prescott, L., Harley, J. P. et Klein, D. A. (1995). Microbiologie tome II. De Boeck, Bruxelles. Pp 506–517.
- Rajivgandhi, G.N., Vimala, R.T.V., Ramachandran, G., Kanisha, C.C., Manoharan, N., Li, WJ. (2022). An Overview on Natural Product from Endophytic Actinomycetes. In: Rai, R.V., Bai, J.A. (eds) Natural Products from Actinomycetes. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-16-6132-7_6
- Rapilly F. (1968). Techniques de mycologie en pathologie végétale. Ann. Epiphyties. 19, numéros hors série.
- Reference nvl partie dermatophytes facteur favorisant
- Richert, K., Brambilla, E. et Stackebrandt, E. (2005). Development of PCR primers specific for the amplification and direct sequencing of *gyrB* genes from microbacteria, order Actinomycetales. Journal of Microbiological Methods, 60(1) 115-123.
- Risandiansyah, R., & Yahya, A. (2022). Antibiotic Activity of Actinobacteria Isolated from Young *Tectona Grandis* (L.) Wood and Pith. Biointerface Res. Applied. Chemistry, 12, 8174-8183.
- Rothrock, C.; and Gottlieb, D. (1981). -Importance of antibiotic production in antagonism of selected *Streptomyces* species to two soil-borne plant pathogens. The Journal of Antibiotics, 34 (7), 830-835p.
- Sabaou N., Boudjella H., Bennadji A., Mostefaoui A., Zitouni A, Lamari L., Bennadji H., Lefebvre G. et Germain P. (1998). Les sols des oasis du Sahara algérien. sources d'actinobactéries rares producteurs d'antibiotiques. Sécheresse. 9: 147-153.
- Saravanamuthu, R. (2010). Industrial Exploitation of Microorganisms, I. K. International Pvt. Ltd., 304p.
- Shirling E.B. and Gottlieb D. (1966). Methods for characterization of *Streptomyces* species. Int. J. Syst. Bacteriol., 16: 3313-3340.
- Sibanda, T., Leonard, V., Mabinya, L. V., Mazomba, N., Akinpelu, D. A., Bernard, K., Olaniran, A. O. et Okoh. A. I. (2010). Antibiotic Producing Potentials of Three

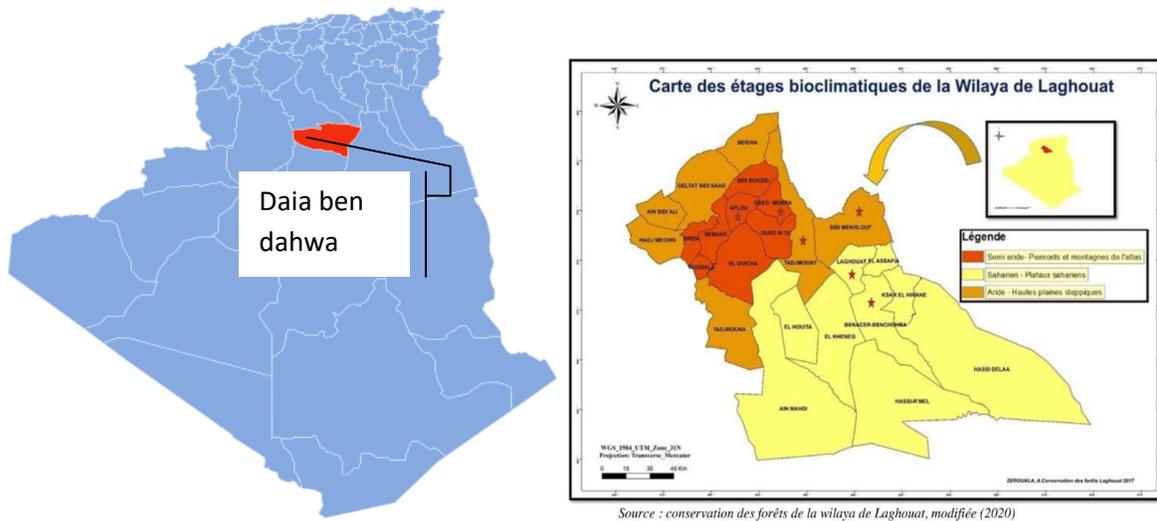
- Freshwater Actinobacterias Isolated from the Eastern Cape Province of South Africa. *Int. J. Mol. Sci.* Vol : 11. N° 7. 2612–2623p.
- Singh, D. P., Patil, H. J., Prabha, R., Yandigeri, M. S., and Prasad, S. R. (2018). Actinobacterias as potential plant growth-promoting microbial communities. *Crop Impro. Microbiology. Biotech.* 2018, 27–38. doi: 10.1016/B978-0-444-63987-5.00002-5
 - Singh, S. P., and Gaur, R. (2016). Evaluation of antagonistic and plant growth promoting activities of chitinolytic endophytic actinobacterias associated with medicinal plants against *Sclerotium rolfsii* in chickpea. *Journal. Applied. Microbiology.* 121, 506– 518. doi: 10.1111/jam.13176
 - Singleton, P. (1994). *Bactériologie*. Masson. France. Prescott, L., Harley, J.P., Klein D.A. (1995). *Microbiologie tome II*. De Boeck, Bruxelles. Pp 506–517.
 - Sinkó, J. Amphotericin B-deoxycholate as first-line antifungal therapy in critically ill patients: a word of caution. *Intensive Care Med* 46, 562–563 (2020). <https://doi.org/10.1007/s00134-019-05880-y>
 - Smaoui, S. (2010). 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.
 - Solecka, J., Zajko, J., Postek, M. et Rajnisz, M. (2012). Biologically active secondary metabolites from actinomycetes. *Cent Eur J Biol.* 373-390p..
 - Stapley, E. O., Woodruff, H. B, (1982). Avermectins, antiparasitic lactones produced by *Streptomyces avermitilis* isolate from a soil Japan. In: *Trends in antibiotic Research.* Japan. : 154-170.
 - Subramani ; R. et Aalbersberg, W. (2013). Culturable rare Actinobacterias: diversity, isolation and marine natural product discovery .*Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97:9291–9321.
 - syndromique par les prescripteurs. Th. Doct. En médecine, Faculté de médecine et de pharmacie. :Université de Bamako, 2003, P : 15.
 - Takizawa, M., Colwell, R. R. et Hill, R. T. (1993). Isolation and Diversity of Actinobacterias in the Chesapeake Bay. *Appl. Enviro. Microbiol.*, 997-1002.

- Talukdar, M., Bora, T. C., & Jha, D. K. (2016). Micromonospora: a potential source of antibiotic. In *Bioprospecting of Indigenous Bioresources of North-East India* (pp. 195-213). Springer, Singapore. 10.1007/978-981-10-0620-3_12.
- Vanetti, A., 2009. *Mycoses superficielles cutanéomuqueuses et enquête auprès de pharmaciens d'officine* (Doctorat en pharmacie). Nantes, France.
- Veloo ACM., Welling GW. Degener JE. 2011. The identification of anaerobic bacteria using MALDI-TOF MS. *Anaerobe*. 17(4):211-2 p.
- Wei Y, Zhao Y, Zhou D, Qi D, Li K, Tang W, Chen Y, Jing T, Zang X, Xie J and Wang W (2020) A Newly Isolated *Streptomyces* sp. YYS-7 With a Broad-Spectrum Antifungal Activity Improves the Banana Plant Resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Tropical Race 4. *Front. Microbiology*. 11:1712. doi:10.3389/fmicb.2020.01712
- Wellington, E. M. et Ul-Hassan, A. (2009). Actinobacteria. *Encyclopedia of Microbiology* (Moselio Schaechter, Ed.), pp. 26-44, Oxford: Elsevier.
- Williams S.T., Goodfellow M., Alderson G., Wellington E.M.H., Sneath P.H.A. et Sackin M.J.(1983). Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. *J. Gen. Microbiol.*, 129:1743–1813
- Williams S.T., Lanning S., and Wellington E.M.H. (1984). Ecology of Actinomycetales. 481–528p. In: *The Biology of the Actinomycetes*. (Goodfellow, M., Mordarski, M. and Williams, S.T., Eds). Academic Press, London.
- YANISSE S. recherche et évaluation de l'activité antifongique des extraits de plantes aromatique et médicinales en milieu solide. Thèse de docteur en pharmacie. Université Mohammed-V-RABAT. 2013, 115p.
- Zou, N., Zhou, D., Chen, Y., Lin, P., Chen, Y., Wang, W., ...& Wang, M. (2021). A Novel Antifungal Actinomycete *Streptomyces* sp. Strain H3-2 Effectively Controls Banana Fusarium Wilt. *Frontiers in microbiology*, 12, 706647.

Annexes

Annexe 01:

Les sites de prélèvement des échantillons de sol



Annexe 02:

Milieus de culture utilisés:

1. Milieu d'isolement:

- ❖ **Chitine-vitamine de Hyakawa modifié (sans vitamine):** chitine 2g, K₂HPO₄ 0,2g, NaCl 0,3g, CaCO₃ 0,02 g, FeSO₄ · 7H₂O 10mg, agar 18g, eau distillé 1000ml, pH 7,5 (Aouiche, Sabaou et al., 2012, Badji et al., 2005).

2. Milieux de purification et de test d'antagonisme:

- ❖ **ISP2 (International Streptomyces Project):** Extrait de levure 4g, extrait de malt 10g, glucose 4g, agar 18g, pH 7,2 préconisé par Shirling et Gottlieb (1966), (Cheriti et al., 2012; Jihani et al., 2012).

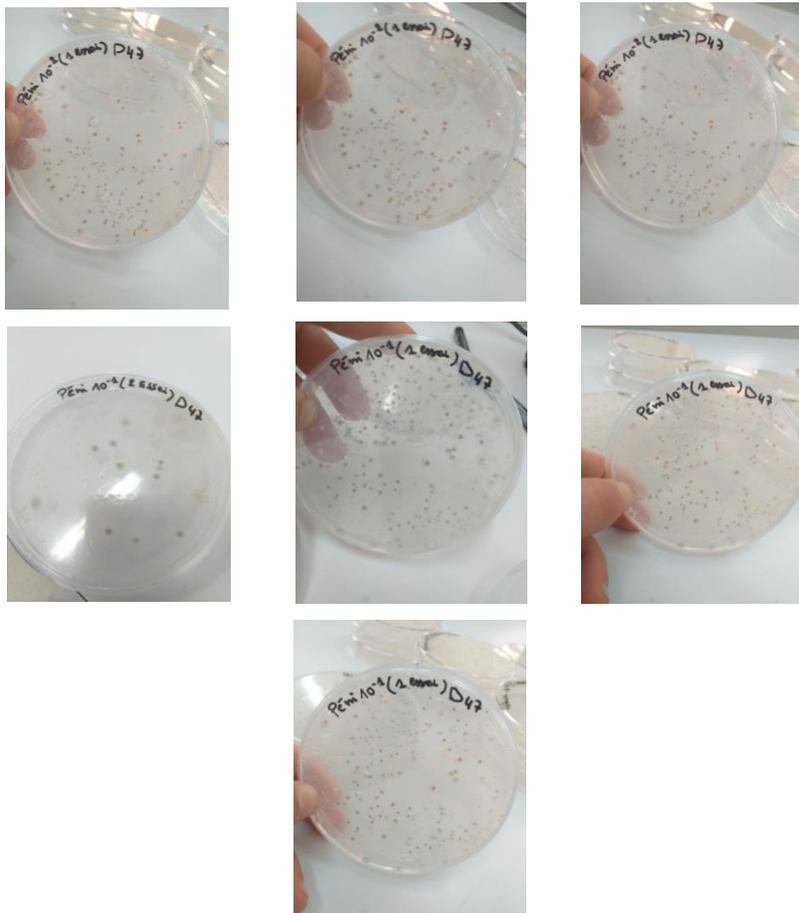
- ❖ **Milieu PDA (Rapilly, 1969)**

Filtrat de pomme de terre: 500 mL; glucose: 20 g; agar: 20 g; eau distillée: 500 mL. pH 6,5.

Le filtrat est préparé en mettant à bouillir 200 à 250 g de pomme de terre épluchée dans 500 ml d'eau distillée.

- ❖ **Milieu Bennett (Warren et al., 1955)**

Glucose: 10 g; peptone: 2 g; extrait de levure: 1 g; extrait de viande: 1 g; eau distillée: q.s.p. 1000 mL. pH 7,2



Quelques photos de l'isolement des colonies d'actinobactéries sur milieu chitine vitamine B