



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



UNIVERSITE de TLEMCEEN

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de
l'Univers

Département De Biologie

Antibiotiques antifongiques : physicochimie, synthèse et activité biologique

MEMOIRE

Présenté par

Andaloussi Mohammed Seddik

En vue de l'obtention du

Diplôme de MASTER en Sciences Biologiques

Option Biochimie

Thème

**Etude de l'effet des électrolytes sur la production d'enzymes lytiques
par quelques souches de *Candida glabrata* et *Candida famata***

Soutenu le 09/07/2020, devant le jury composé de :

Président	Mr Rahmoun Mohammed Nadjib	Maître de conférences A	Université de Tlemcen
Encadreur	Mme Sari-Belkherroubi Lamia	Professeur	Université de Tlemcen
Examinatrice	Mme Benmansour Meriem	Maître de conférences B	Université de Tlemcen

Année universitaire 2019/2020

في هذه الدراسة، نحن مهتمون بعوامل الضراوة التي تساعد مسببات الأمراض على البقاء والاستمرار في المضيف. لهذا، قمنا بتقييم تأثير أملاح NaCl و KCl، بتركيزات مختلفة على إنتاج Hemolysin في *Candida glabrata* و *Candida famata*. تم تحديد النشاط الانحلالي بعد 48 ساعة. أظهرت نتائجنا، من ناحية، أن النشاط الانحلالي يختلف كدالة لتركيز كلوريد الصوديوم في نوعي الخميرة. من ناحية أخرى، أنه في وجود، يتم تقليل النشاط الانحلالي لـ *C. glabrata*، في حين أن نمو فطريات المبيضات يثبط تمامًا.

الكلمات الرئيسية: *Candida glabrata*، *C. famata*، الالتهابات الفطرية، الضراوة، Hemolysin، NaCl، KCl،

Résumé

Dans cette étude nous sommes intéressés aux facteurs de virulence qui aident les agents pathogènes à survivre et à persister dans l'hôte. Pour cela nous avons évalué l'effet des sels NaCl et KCl, à différentes concentrations sur la production d'hémolysine chez *Candida glabrata* et *Candida famata*. L'activité hémolytique a été déterminée après 48 h. Nos résultats ont montré d'une part que l'activité hémolytique varie en fonction de la concentration en NaCl chez les deux espèces levurienne. D'autre part, qu'en présence de KCl l'activité hémolytique est réduite pour *C. glabrata*, alors que la croissance de *Candida famata* est totalement inhibée.

Mots clés : *Candida glabrata*, *C. famata*, infections fongiques, virulence, hémolysine, NaCl, KCl

Summary

Study of the effect of electrolytes on the production of lytic enzymes by some strains of *Candida glabrata* and *Candida famata*

In this study we are interested in virulence factors that help pathogens to survive and persist in the host. For this we evaluated the effect of the NaCl and KCl salts, at different concentrations on the production of hemolysin in *Candida glabrata* and *Candida famata*. The hemolytic activity was determined after 48 h. Our results showed, on the one hand, that the hemolytic activity varies as a function of the NaCl concentration in the two yeast species. On the other hand, that in the presence of KCl the hemolytic activity is reduced for *C. glabrata*, while the growth of *Candida famata* is completely inhibited.

Keywords: *Candida glabrata*, *C. famata*, fungal infections, virulence, hemolysin, NaCl, KCl

Dédicaces

C'est avec un énorme plaisir et une immense joie, que je dédie mon travail

À mes très chers parents qui m'ont soutenue tout au long de ma vie ainsi qu'à mes frères abd-el-rezzak et yassine et ma sœur farah

A toute la famille

A toute la promotion du master Biochimie 2019-2020 avec qui j'ai partagé d'agréables moments

Enfin, à tous ce que j'aime et qui m'aime de près et de loi.

Mohammed seddik

Remerciements

Je remercie avant tout,

Dieu tout puissant pour m'avoir donné la santé, le courage afin de réaliser ce travail dans les conditions les plus favorables.

Ce travail a été réalisé au sein de laboratoire : Antibiotiques, Antifongiques, Physico-chimie, - synthèse et activité biologique, Université Aboubekr Belkaïd-Tlemcen.

Je tiens à remercier en tout premier lieu **Madame Sari Lamia Professeur**, à la faculté de des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers, Université Aboubekr Belkaïd -Tlemcen qui ma guidée sur le choix de ce thème.

Je souhaite que le contenu de ce mémoire soit la meilleure façon de remerciements

Pour ses conseils précieux et ses orientations scientifiques et surtout pour sa patience.

Mes sincères remerciements et gratitude sont adressés à **Mr Rahmoun mohamed Nadjib**, Maître de conférences A, au département de Biologie, faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sciences de la Terre et de l'Univers, Université Aboubekr Belkaïd-Tlemcen d'avoir accepté de présider le jury de master.

J'adresse mes sincères gratitude à **Mme Benmansour Meriem**, Maître de conférences B au département de Biologie, faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sciences de la Terre et de l'Univers, Université Aboubekr Belkaïd-Tlemcen, pour l'honneur qu'elle m'a fait en acceptant de commenter et discuter ce modeste travail. Je l'assure de ma profonde gratitude, ainsi que de ma sincère reconnaissance.

Mes vifs remerciements s'adressent également à tous les enseignants durant mon cursus

Universitaires et tous les membres du **laboratoire LAPSAB** pour toutes leurs attentions, ainsi que pour les moments de détente et de sympathies et pour leurs immenses aides.

- Merci enfin à ceux qui, de près ou de loin intéressés à mon travail et m'ont encouragé pendant la réalisation de ce travail. Même si ce fut bref, ce fut plaisant.

Liste des tableaux
Liste des figures
synthèse bibliographique

Matériel et méthodes

1. Matériel biologique..... 13
2. Préparation de la suspension levurienne :..... 13
3. Les sels étudiés 13
4. Etude de pouvoir hémolytique en absence de tout additif : 13

Résultats et discussions

1. Evaluation de la capacité des levures à produire de l'hémolysine sur gélose au sang sans additif..... 15
 2. Effet du chlorure de sodium (NaCl) sur la production d'hémolysine.....17
 3. Effet du chlorure de potassium (KCl) sur la production d'hémolysine 24
- Conclusion**32

Références Bibliographiques

Liste des tableaux

Tableau n°1 : Activité hémolytique de <i>Candida glabrata</i> en absence de toute addition de sel	16
Tableau n°2 : Activité hémolytique de <i>Candida famata</i> en absence de toute addition de sel	17
Tableau n°3 : Activité hémolytique de <i>Candida glabrata</i> en présence de 1% NaCl	18
Tableau n°4 : Activité hémolytique de <i>Candida famata</i> en présence de 1% NaCl	19
Tableau n°5 : Activité hémolytique de <i>Candida glabrata</i> en présence de 2,5% NaCl	20
Tableau n°6 : Activité hémolytique de <i>Candida famata</i> en présence de 2,5% NaCl	21
Tableau n°7 : Activité hémolytique de <i>Candida glabrata</i> en présence de 5% NaCl	22
Tableau n°8 : Effet de NaCl sur l'activité hémolytique de <i>C. glabrata</i> et <i>C. famata</i>	24
Tableau n°9 : Activité hémolytique de <i>Candida glabrata</i> en présence de 1% KCl	25
Tableau n°10 : Activité hémolytique de <i>Candida glabrata</i> en présence de 2,5% KCl	27
Tableau n°11 : Activité hémolytique de <i>Candida glabrata</i> en présence de 5% KCl	28
Tableau n°12 : Effet de KCl sur l'activité hémolytique de <i>C. glabrata</i>	30

Liste des Figures

Figure n°1 : Structure de la levure du genre <i>Candida</i>	5
Figure n°2 : Mécanismes cellulaire de résistance aux antifongiques.....	7
Figure n°3 : Interaction de <i>C. albicans</i> avec les cellules de l'hôte et communication cellulaire dans les vaisseaux sanguins	8
Figure n°4 : Les différentes étapes de la formation d'un biofilm par <i>Candida</i> à la surface d'un cathéter à : 1h (A), 3h (B), 6h (C), 18 (D), 24h (E) et 48h (F).....	8
Figure n°5 : Détermination <i>in vitro</i> des zones d'hémolyse autour des colonies de <i>Candida glabrata</i> sur gélose sabouraud dextrose au sang de mouton.....	16
Figure n°6 : Détermination <i>in vitro</i> des zones d'hémolyse autour des colonies de <i>Candida famata</i> sur gélose sabouraud dextrose au sang de mouton.....	17
Figure n°7 : Détermination <i>in vitro</i> des zones d'hémolyse autour des colonies de <i>C. glabrata</i> sur gélose sabouraud dextrose au sang de mouton en présence de NaCl à 1%.....	18
Figure n°8 : Détermination <i>in vitro</i> des zones d'hémolyse autour des colonies de <i>C. famata</i> sur gélose sabouraud dextrose au sang de mouton en présence de 1% de NaCl.....	19
Figure n°9 : Détermination <i>in vitro</i> des zones d'hémolyse autour des colonies de <i>Candida glabrata</i> sur gélose sabouraud dextrose au sang de mouton en présence de 2,5% de NaCl	20
Figure n°10 : Détermination <i>in vitro</i> des zones d'hémolyse autour des colonies de <i>Candida famata</i> sur gélose sabouraud dextrose au sang de mouton en présence de NaCl à 2,5%.....	21
Figure n°11 : Détermination <i>in vitro</i> des zones d'hémolyse autour des colonies de <i>Candida glabrata</i> sur gélose sabouraud dextrose au sang de mouton en présence de 5% de NaCl.....	22
Figure n°12 : Détermination <i>in vitro</i> des zones d'hémolyse autour des colonies de <i>Candida famata</i> sur gélose sabouraud dextrose au sang de mouton en présence de NaCl à 5%.....	23
Figure n°13 : Détermination <i>in vitro</i> des zones d'hémolyse autour des colonies de <i>Candida glabrata</i> sur gélose sabouraud dextrose au sang de mouton en présence de KCl à 1%.....	25
Figure n°14 : Détermination <i>in vitro</i> des zones d'hémolyse autour des colonies de <i>Candida famata</i> sur gélose sabouraud dextrose au sang de mouton en présence de KCl à 1%.....	26

Figure n°15 : Détermination <i>in vitro</i> des zones d'hémolyse autour des colonies de <i>Candida glabrata</i> sur gélose sabouraud dextrose au sang de mouton en présence de KCl à 2.5%.....	26
Figure n°16 : Détermination <i>in vitro</i> des zones d'hémolyse autour des colonies de <i>Candida famata</i> sur gélose sabouraud dextrose au sang de mouton en présence de KCl à 2.5%.....	27
Photo n°17 : Détermination <i>in vitro</i> des zones d'hémolyse autour des colonies de <i>Candida glabrata</i> sur gélose sabouraud dextrose au sang de mouton en présence de KCl à 5%.....	28
Figure n° 18 : Détermination <i>in vitro</i> des zones d'hémolyse autour des colonies de <i>Candida glabrata</i> sur gélose sabouraud dextrose au sang de mouton en présence de KCl à 5%.....	29

Liste des abréviations

NaCl : Chlore de sodium

KCl : Chlore de potassium

CaCl₂ : chlorure de calcium

MgCl₂ : chlorure de Magnésium

Cg : *Candida glabrata*

Cf : *Candida famata*

Hi : Indice Hémolytique

μHi : Moyen d'indice hémolytique

°C : Celsius

mL : millilitres

mm : millimètre

μm : micromètre

Première partie

Synthèse

bibliographique

Les infections fongiques systémiques restent des affections graves dont l'incidence est en constante progression ces dernières années en raison de l'augmentation considérable des facteurs de risques tels que l'utilisation de cathéters vasculaires et l'administration d'antibiotiques à large spectre. Elles sont associées à une élévation significative de la morbidité et de la mortalité des patients immunodéprimés (SIDA, transplantation d'organes, pathologies cancéreuses et hématologiques). **(Arama.J., 2019)**

Depuis plus de deux décennies, l'amélioration des pratiques médicales et chirurgicales a notablement amélioré la survie des patients profondément immunodéprimés, mais qui sont à haut risque d'infections opportunistes. Une proportion importante de ces patients, ne meurt pas de leur pathologie sous-jacente mais de complications infectieuses. Parmi celles-ci, on retrouve les infections fongiques, généralement sévères chez ces patients et dont le diagnostic et le traitement sont difficiles. **(Eggimann et coll., 2002)**

Au début des années 2000, les levures du genre *Candida* étaient les agents les plus fréquemment responsables d'infections fongiques invasives. Les candidoses invasives représentaient près de 17% des infections nosocomiales chez les patients hospitalisés en soins. **(Maruyama et coll., 2005)**

Au cours de ces dernières années, l'épidémiologie des candidoses profondes, systémiques et disséminées s'est modifiée. Les infections fongiques opportunistes à *Candida* sont fréquentes : elles représentent la cinquième cause d'infections nosocomiales et la quatrième cause des septicémies nosocomiales (environ 7 à 10 %). Leur mortalité reste élevée : de 30 à 50 % selon les études, et les espèces en cause sont variées **(Weiss et Timsit., 2014) ; (Lortholary et coll., 2014).**

Candida albicans était le champignon dimorphique le plus souvent isolé chez l'homme **(Henriques et coll., 2006)**, cependant, la prévalence et l'incidence des mycoses due à d'autres espèces non *albicans* dont *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *C. kefyr*, *C. dubliniensis* et *C. famata* a augmenté. Plusieurs études ont noté l'émergence des espèces de *Candida* non-*albicans* pouvant être résistantes ou moins sensibles aux antifongiques, et ont montré avec des taux variables, selon le groupe de sujets étudié, que *C. glabrata*, *C. parapsilosis* et *C. tropicalis* étaient les espèces les plus fréquemment isolées après *C. albicans*. **(Mayer et coll., 2013), (Ortiz et coll., 2018).**

Plusieurs travaux réalisés au sein de notre laboratoire (**Boucherit et coll,2011**), (**Seddiki et coll, 2013**), (**Seghir et coll, 2017**) ont montré l'émergence des espèces *Candida glabrata* et *Candida famata* dans les centres hospitaliers de l'ouest Algérien, c'est pourquoi nous avons porté notre attention sur ces deux espèces fongiques dans le cadre de notre travail.

Notons qu'au cours de la première décennie des années 2000, le taux d'isolement des souches de *Candida glabrata* a augmenté de manière significative dans certains centres spécialisés dans la prise en charge de patients neutropéniques ou immunodéprimés, où ces espèces représentent jusqu'à près des deux tiers des levures du genre *Candida* **(Pfaller et coll., 2002)**.

C. glabrata représente environ 8% des isolats de levures du genre *Candida* isolées des prélèvements cliniques **(Gloor., 2009)**.

C. glabrata été considéré comme un organisme principalement non pathogène, mais, au cours des deux dernières décennies, cette levure a émergé comme un important pathogène nosocomiale et a été considérée comme la deuxième espèce responsable de candidémie chez l'homme. Cette espèce est associée à une mortalité élevée, son incidence est augmentée et cause des septicémies dans les unités de soins intensifs **(Seddiki et coll., 2013)**.

Candida glabrata est moins sensible au fluconazole et à l'amphotéricine B par rapport à la majorité des autres espèces de *Candida*. Elle a la capacité et de développer rapidement des résistances à tous les azolés **(Moran. G., 2012)**.

Pour ce qui est de l'espèce *C. famata*, elle reste très peu fréquente en infectiologie puisque cette levure est responsable de moins de 1 % des candidoses invasives. *Candida famata* est principalement isolée de la peau de l'homme. Cependant. Cette levure est impliquée dans les septicémies liées aux cathéters centraux chez les patients qui ont subi une transplantation de moelle osseuse **(Defosse., 2018)**.

Les études épidémiologiques montrent que sa présence dans le contexte des infections varie de 0,2 % à 2 % des cas. *C. famata* arrive en dernier rang des espèces isolées, cette espèce est une cause rare de candidoses **(Seghir et coll., 2017)**.

Candida famata est une espèce peu isolée en pathologie humaine, représentant moins de 1% des isolats de candidoses invasives selon une étude américaine entre 1997 et 2007 **(Pfaller and Diekema., 2007)**.

En 2011, selon l'étude de Boucherit et coll au centre hospitalo-universitaire de Tlemcen, la colonisation des cathéters vasculaires par les levures était dans 5,7% due à *Candida famata*.

Rappelons à présent les principales caractéristiques des levures du genre *Candida* ainsi que leurs différents facteurs de virulence

1. Caractères généraux de *Candida*

Les levures du genre *Candida* appartiennent au phylum des ascomycètes à la classe des saccharomycètes, à l'ordre des saccharomycetales et au groupe des saccharomycètes mitosporiques (Aurore., 2010).

Il s'agit de levures de petites tailles de 2 à 5µm, globulaires, ovoïdes ou cylindriques selon l'espèce, non pigmentées, non capsulées à bourgeonnement multilatérale productrices ou non de filaments et donnant des colonies blanches crémeuses en culture (Fitzpatrick et coll., 2006).

Il est à noter que le cytoplasme des levures du genre *Candida* contient les organites retrouvés chez les cellules eucaryotes et entouré d'une enveloppe fongique constituée d'une paroi et d'une membrane (Williams et coll., 2011). (figure1)

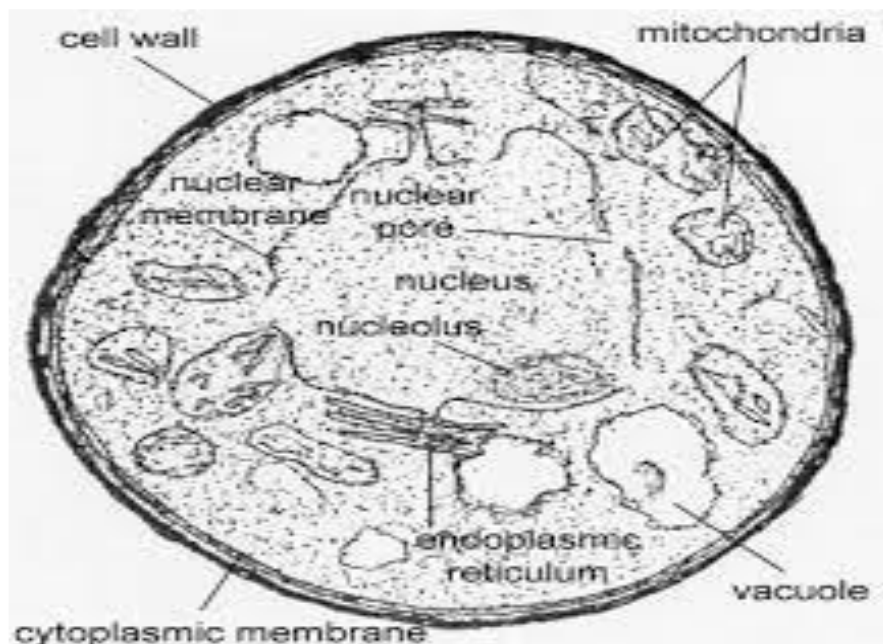


Figure n°1 : Structure de la levure du genre *Candida* (Guignard J.L.,1989)

Ce genre comprend environ 350 espèces. Toutefois, seules quelques unes sont rencontrées en pathologie humaine, il s'agit essentiellement de *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* et *Candida krusei* (Odds., 2010).

Malgré la dominance de *Candida albicans*, les espèces non *albicans*, notamment *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* et *Candida tropicalis*, sont très fréquentes dans les isolats cliniques (Silva et coll., 2009)

2. Facteurs de virulence des levures du genre *Candida*

Comme pour d'autres pathogènes, la virulence des levures du genre *Candida* est liée à de nombreux facteurs. Différents niveaux d'expression des facteurs de virulence ont été observés chez différentes espèces de *Candida* (Mane et coll., 2012).

La capacité de *Candida* à adhérer aux tissus de l'hôte, à sécréter divers enzymes, des toxines, des hémolysines et la capacité à changer de morphologie et à moduler la défense de l'hôte, constituent les déterminants majeurs de sa pathogénicité. La capacité de *Candida* à s'adapter à leur environnement, notamment à résister aux antifongiques est également déterminante (El Kirat., 2010), (Giolo et coll., 2010), (Da Silva-Rocha et coll., 2014)]. Plusieurs mécanismes peuvent être à l'origine de cette résistance aux antifongiques

(figure 2) notamment :

- Un défaut de transport ou de pénétration de l'antifongique à l'intérieur de la cellule fongique. Un des mécanismes de résistance à la 5-FC est l'inactivation de la cytosine perméase, codée par le gène *FCY2* et qui permet l'import de la flucytosine dans la cellule fongique (Chapeland-Leclerc et coll., 2005) ; (Papon et coll., 2007).
- La modification de la cible cellulaire de l'antifongique, qui conduit à la diminution de son affinité pour l'antifongique. Certaines mutations ponctuelles du gène *ERG11* peuvent se traduire par la substitution d'acides aminés importants pour la structure tridimensionnelle (Sanglard., 2002).
- La disparition de la cible et de son remplacement par le recrutement ou le détournement d'un autre métabolite. Ce mécanisme pourrait être impliqué dans la résistance à l'amphotéricine B. Dans un premier temps, la voie de biosynthèse de l'ergostérol serait bloquée afin de soustraire la cible à l'action de l'antifongique. (Zhang et coll.,2010)
- Un efflux actif de l'antifongique. Deux principales familles de transporteurs sont impliquées dans la résistance aux azolés chez les levures. Elles se distinguent par l'énergie nécessaire à leur fonctionnement et par les différents substrats antifongiques qui peuvent les emprunter. (Sanglard et coll., 1995).
- Une surproduction de la cible cellulaire de l'antifongique. Ce type de mécanisme de résistance est fréquent : la surexpression des gènes de la thymidylate synthase ou de la C14-alpha-déméthylase (*ERG11*) aboutit respectivement à une résistance à la 5-FC ou aux azolés (Song et coll., 2004).

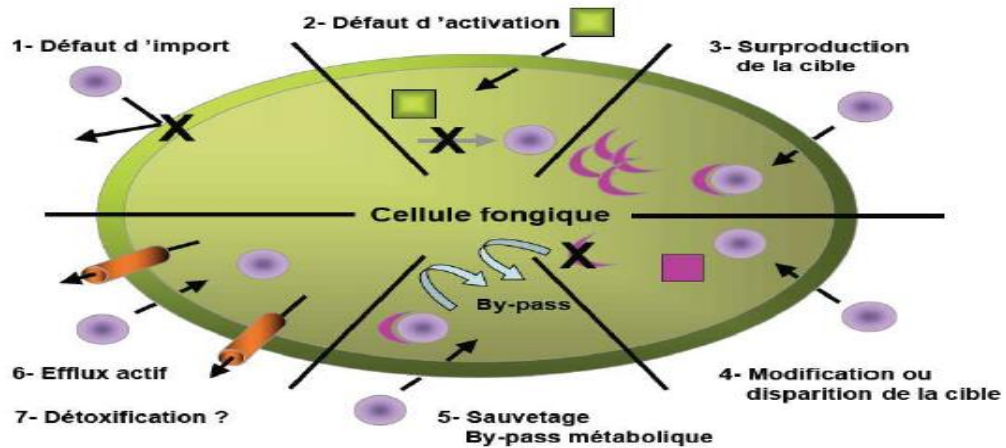


Figure n°2 : Mécanismes cellulaire de résistance aux antifongiques

Plusieurs propriétés biologiques de *Candida* contribuent à sa capacité à envahir les tissus de ses hôtes. On retrouve des processus d'adhésion capables de s'adapter aux différents constituants rencontrés petit à petit lors de la dissémination.

Ce phénomène d'adhérence est la première étape de pathogénicité lors de la dissémination. Les *Candida* ont la capacité d'adhérer aux cellules et aux tissus de l'hôte mais aussi aux dispositifs médicaux introduits dans l'organisme (cathéters, prothèses...). Ces interactions peuvent être spécifiques ou non spécifiques : l'adhérence spécifique implique un système de reconnaissance de type ligand-récepteur, tandis que l'adhérence non spécifique dépend de forces de nature électrostatique de type Van Der Waals ou d'interactions hydrophobes (Cassone. A., 2007).

Les *Candida spp* sont capables d'adhérer à différents substrats et tissus par l'intermédiaire de molécules dénommées adhésines (des glycoprotéines de surface) faisant partie d'une interaction spécifique. Ces derniers sont codés par la famille de gènes *ALS* (agglutinin-like sequence) chez *C. albicans* (Calderone., 2002).

Les adhésines identifiées chez les champignons pathogènes sont principalement des protéines et des mannoprotéines. Certaines espèces de *Candida* privilégient des localisations telles que *C. albicans* qui semble avoir une meilleure adhérence à l'épithélium de la cavité buccale que *C. tropicalis*, ou bien alors *C. albicans* et *C. glabrata* ont une forte affinité pour l'épithélium vaginale (Cassone., 2007).

A cela s'ajoute des mécanismes de pénétration liés à une transition morphologique vers la forme filamenteuse adaptée à la perforation et à la sécrétion des enzymes lytiques (figure n°3)

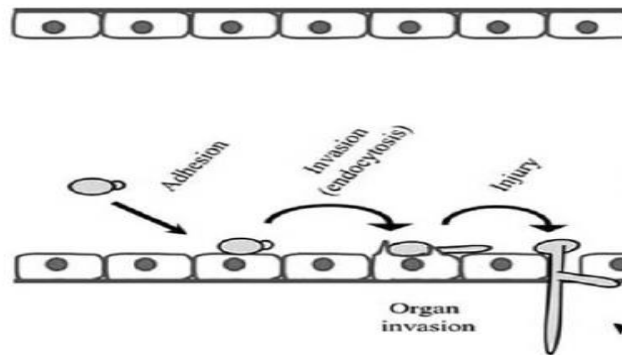


Figure n°3 : Interaction de *C. albicans* avec les cellules de l'hôte et communication cellulaire dans les vaisseaux sanguins (**Pappagianis. D.,1979**)

D'autre part, l'adhésion des levures aux surfaces inertes est à l'origine de la formation de biofilms qui sont des communautés de microorganismes adhérentes à une surface et produisant une matrice exopolymérique (**Blankenship et coll., 2006**) (**figure n°4**).

Les biofilms générés par les levures du genre *Candida* représentent un problème clinique (**Douglas., 2003**).

Enfin, les levures du genre *Candida* sont capables de résister aux systèmes effecteurs innés ou acquis de l'immunité à médiation cellulaire, humorale ou mixte, grâce à des mécanismes de résistance ou d'échappement (**Caraës., 2016**).

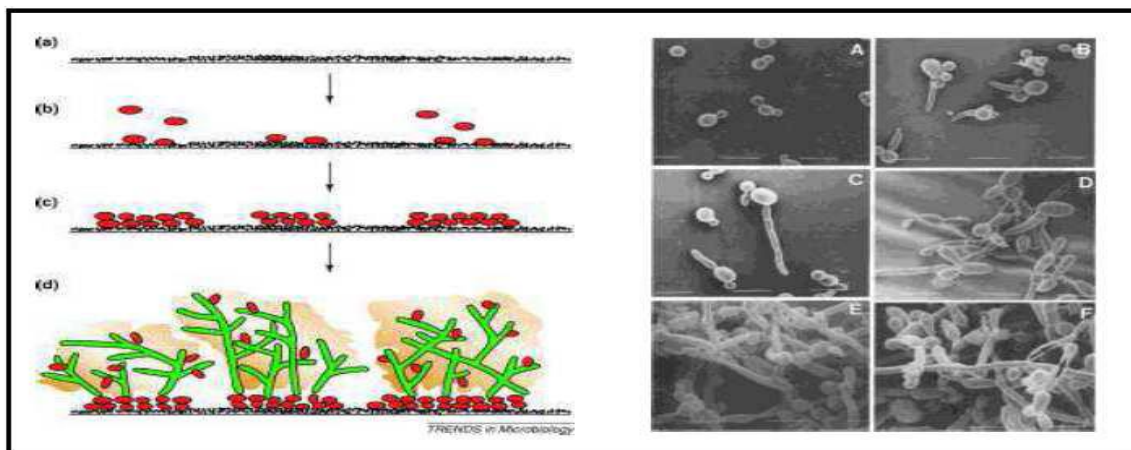


Figure n°4 : Les différentes étapes de la formation d'un biofilm par *Candida* à la surface d'un cathéter à : 1h (A), 3h (B), 6h (C), 18 (D), 24h (E) et 48h (F) (**Hawser and Douglas., 1994**)

(a) : colonisation de la surface du cathéter par des protéines de l'hôte.

(b) : Adhésion initiale des levures *Candida*,

(c) : Formation de micro-colonies formées par des levures constituant la première couche du biofilm.

(d) : formation d'un réseau constitué de filaments mycéliens, sur lesquels se fixent les levures constituant la seconde couche du biofilm englobée dans une matrice extracellulaire.

3. Production d'enzymes lytiques par la levure *Candida*

Les enzymes hydrolytiques tels que la phospholipase, la protéinase, la lipase, l'estérase, l'hémolysine et autres, dégradent la composante cellulaire des tissus et facilitent leur survie, leur adhésion, leur invasion et leur dissémination. La phospholipase et la protéinase sont considérées comme les enzymes les plus courantes car elles contribuent à l'interaction *Candida*-hôte (Mutlu Sariguzel et coll., 2015), (Canela et coll., 2018). Il a été démontré que les protéases extracellulaires et les lipases jouent un rôle fondamental dans l'adhésion et l'invasion de la membrane cellulaire permettant la pénétration dans le tissu (Staniszewska et coll., 2012), (Mayer et coll., 2013).

Bien que *Candida* a la capacité de produire ces enzymes, la quantité et la puissance de ces enzymes sont différentes ; les tendances parmi les espèces dépendent de la source ou du site d'isolement (Pakshir et coll., 2018). En effet, Fatahinia et coll (2017) ont remarqué que les activités de protéinase et phospholipase chez les espèces *C. glabrata* et *C. krusei* se sont révélés plus faibles que ceux de *C. albicans* et *C. dubliniensis*

3.1.La gélatinase

La gélatinase est un facteur de virulence important qui hydrolyse la gélatine en sous-composants tels que des polypeptides, des peptides et des acides aminés (Elangovan Elavarashi et coll., 2017).

Les gélatinases sont des protéases spécifiques qui hydrolysent la gélatine par un processus bidirectionnel, d'abord en polypeptides, puis en acides aminés en particulier de type alpha. Chimiquement, les gélatinases sont des métallo-endopeptidases extracellulaires (EC 3.4.24.30) qui ont la capacité non seulement d'hydrolyser la gélatine mais aussi d'autres composés comme la phéromone, la caséine, le collagène et le fibrinogène (Makinen et coll., 1989), (Makinen et Makinen., 1994), (Balan et coll., 2012).

3.2. Les protéinases

Les protéinases sont capables de dégrader les protéines de la barrière épithéliale et muqueuse de l'hôte telles que le collagène, la kératine et la mucine. Ils aident également la levure *Candida* à résister à l'immunité cellulaire et humorale en dégradant les anticorps, le complément et les cytokines (**Fotedar et coll., 2005**).

La capacité d'exprimer les enzymes protéinases varie non seulement entre les différentes espèces de *Candida*, mais également entre les souches de la même espèce isolées de différents sites corporels (**Ramesh et coll., 2011**)

Des aspartyl protéinases sécrétées (SAP) capables de dégrader de nombreux substrats qui constituent des protéines hôtes dans la cavité buccale ont également été étudiées. On pense que ces enzymes aident la levure *Candida* à acquérir de l'azote essentiel à leur croissance, pour se fixer à la muqueuse buccale et y pénétrer, ou les deux (**Naglik et coll., 2004**). Ces enzymes peuvent également provoquer une perméabilité vasculaire amplifiée, entraînant des réactions inflammatoires et des symptômes cliniques, qui peuvent perturber la défense humorale de l'hôte (**Kaminishi et coll., 1990**).

Selon Oliveira et coll (2013) les isolats de *C. famata* sont les plus grands producteurs de protéinase (40%), suivi de *C. tropicalis* (33,3%) *C. glabrata* (20%).

3.3. Les lipases

La production de lipases par les levures *Candida* joue un rôle clé dans la persistance et la virulence chez l'homme. Les lipases jouent un rôle important dans la digestion des lipides pour l'acquisition de nutriments, l'adhésion aux cellules hôtes et tissus, les interactions synergiques avec d'autres enzymes, l'hydrolyse et l'auto-défense. De plus *Candida spp* sécrète généralement différentes lipases qui catalysent à la fois l'hydrolyse et la synthèse des triacylglycérols (**Schofield. D., 2005**)

3.4. L'hémolysine :

L'hémolysine est l'enzyme qui dégrade la composante cellulaire du sang. C'est une mannoprotéine attachée à la surface cellulaire qui permet à la levure d'exploiter le fer de la protéine hôte. (**Watanabe et coll., 1999**).

La sécrétion d'enzymes hydrolytiques telles que l'hémolysine est considérée comme un attribut de virulence important du champignon pathogène opportuniste *Candida*. Il est connu que *Candida spp* isolé de patients infectées par le VIH, produisent de grandes hémolysines (Hashem et coll., 2014). Selon certaines études, l'activité hémolytique s'est avéré significativement plus élevé chez *C. albicans* que chez les espèces *non albicans* telles que *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* et *C. famata*. (Chin et coll., 2013).

3.5.L'estérase :

L'enzyme estérase est également un facteur de virulence important qui dégrade les liaisons esters et accentue son invasion tissulaire. Les estérases catalysent l'hydrolyse des liaisons esters dans les esters d'acide gras à chaîne courte des groupes acyle. En raison des applications répandues des enzymes lipolytiques, il existe toujours un intérêt pour les nouvelles estérases aux propriétés uniques. L'estérase a été classée comme un type d'enzyme lipolytique IV (ce sont des lipases hormono-sensibles) (Borchert et coll., 2017)

3.6.La phospholipase :

La phospholipase dégrade le composant phospholipide de la membrane cellulaire, entraînant des dommages cellulaires et une lyse qui accentue sa dissémination. De nombreux chercheurs ont observé que le caractère invasif des cellules *Candida* vers les tissus épithéliaux est facilité par la production plus élevée de phospholipases. (Ghannoum., 2000).

4. Facteurs influençant la production d'enzymes lytiques.

Certaines études ont mis en évidence l'efficacité de produits naturels tels que les huiles de *Cinnamomum verum* (Cannelle de Ceylan ou Cinnamome), *Syzygium aromaticum* (giroflie), *Thymus vulgaris* (thym) et leurs composés actifs, Cinna aldéhyde et eugénol. A une concentration sub-inhibitrice, ces substances inhibent la production d'hémolysine ainsi que d'autres protéines chez les souches de *C. albicans* (Khan et Ahmad., 2012) (Khan et coll., 2014).

El Zawawy et coll (2012) ont évalué l'efficacité d'extrait de feuille de *Pluchea dioscoridis* (*Blumea baccharoides* ou *Pluchea krausii*) sur la croissance, la morphogénèse et l'expression des gènes de virulence de *Candida albicans* et observé une diminution supérieure à 70% de l'expression des gènes de la phospholipase, de la protéinase et de

l'hémolysine. Les composés inhibant les enzymes hydrolytiques extracellulaires pourraient être des molécules intéressantes pour la découverte de médicaments anti-*Candida* (El Zawawy. H.,2017).

De nombreux facteurs peuvent également influencer l'activité hémolytique, tels que la température, le glucose, certains ions dont Fe^{3+} ou certains alcools (éthanol, n-butanol ou vapeur de n-pentanol) (Ronsani et coll., 2011), (Shuster et coll., 2004), (Tanaka et coll., 1997).

Des résultats obtenus par notre équipe de recherche au niveau du laboratoire antibiotiques antifongiques ; physicochimie synthèse et activité biologique (résultats en cours de publication) ont confirmé que *Candida glabrata* et *Candida famata* sont des souches de plus en plus isolées du centre hospitalo-universitaire de Tlemcen sur les dispositifs médicaux qui sont des portes d'entrées aux germes favorisant le développement de mycoses invasives chez les patients hospitalisés. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à ces deux types de levure pour réaliser ce travail de fin d'études. D'un autre côté, selon l'étude de (Wan et coll 2015), l'addition d'électrolytes par des sels tels que le $CaCl_2$ le $NaCl$ ou le KCl permet d'une part de réduire largement l'activité hémolytique de quelques isolats de *Candida spp*, d'autre part, l'effet de ces électrolytes sur l'activité hémolytique dépend de la souche et de la concentration en sel étudiée.

Et partant de toutes les données citées, nous avons étudié l'effet de quelques sels sur la production d'hémolysine par les levures *Candida glabrata* et *Candida famata*. Ce travail s'inscrit dans un axe de recherche développé par le professeur Sari-Belkherroubi Lamia chef de l'équipe 3 « Etude du mécanisme de résistance aux antibiotiques » du laboratoire « Antibiotiques antifongiques ; physico-chimie, synthèse et activité biologique ».

Deuxième partie

Matériel et méthodes

Ce travail a été réalisé au laboratoire Antibiotiques Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique de l'université Aboubekr Belkaïd de Tlemcen.

1. Matériel biologique

Pour notre étude, nous avons utilisé une collection de souches isolées, par notre équipe (travaux de Doctorats en cours), à partir de dispositifs médicaux mis en place sur des patients hospitalisés au service de réanimation du Centre Hospitalo-Universitaire de Tlemcen.

Il s'agit de 4 souches de *Candida glabrata* et de 3 souches de *Candida famata*.

Ces souches sont maintenues par repiquages successifs sur gélose Sabouraud et conservée à 4°C.

2. Préparation de la suspension levurienne :

Une colonie de levure d'une culture de 24h sur gélose Sabouraud est suspendue dans 1 mL d'eau physiologique stérile (8,5%). La concentration cellulaire est fixée à 10^6 cellules/mL par dénombrement sur cellule de Thoma.

3. Les sels étudiés

Afin d'évaluer l'effet des sels sur la production d'hémolysine nous avons additionné le sel à tester à différentes concentrations pour chaque condition expérimentale.

Pour cela nous avons utilisé:

- Le NaCl et KCl à 1%, 2.5% et 5% (poids/volume).

Pour chaque sel étudié différentes concentration sont ajoutés à la gélose sabouraud dextrose agar selon le protocole de **Wan et coll., 2015**.

Le pouvoir hémolytique est évalué sur les géloses préparées additionnées de 7% de sang de mouton frais.

4. Etude de pouvoir hémolytique en absence de tout additif :

La capacité des souches de levures à produire l'hémolysine est évaluée selon la technique décrite par **Udayalaxmi et coll., 2014**.

La suspension levurienne est mise à des points équidistants sur des boîtes de Pétri contenant de la gélose sabouraud dextrose additionnée de 7% de sang de mouton. Les boîtes sont ensuite incubées à 37°C pendant 48h. La présence d'un halo clair à translucide autour de la colonie témoigne d'une activité hémolytique positive.

Après incubation mesurer le diamètre de la colonie (en mm) ainsi que le diamètre de la zone de lyse additionnée du diamètre de la colonie (en mm).

Le calcul de l'indice d'hémolyse se fait selon l'équation proposée par

(Yigit et Aktas., 2009):

$H_i = [\text{diamètre des colonies}] / [\text{diamètre de la zone de précipitation} + \text{Diamètre des colonies}]$

$H_i = 1$ il n'y a pas d'activité hémolytique.

$0,64 < H_i < 1$ activité hémolytique positive

$H_i < 0,64$ l'activité hémolytique est fortement positive

Le calcul du taux de la variation de l'activité se fait selon l'équation:

$\mu H_i = [(H_i \text{ 0\% addition} - H_i \text{ sel}) / H_i \text{ 0\% addition}]$

Troisième partie
Résultats et discussion

Les espèces appartenant au genre *Candida* produisent différents facteurs de virulence qui contribuent à la colonisation, à la pathogénicité et à l'infection des tissus, notamment l'adhésion aux cellules épithéliales et aux biomatériaux hôtes, la formation de tubes germinaux et d'hyphes, la production d'enzymes hydrolytiques telles que les protéinases et les phospholipases ainsi que la capacité hémolytique.

(Akpan. A et coll.,2002), (Noumi. E et coll.,2010)

Le pouvoir hémolytique est un facteur de virulence important, qui permet aux levures du genre *Candida* d'acquérir le fer des tissus de l'hôte, qui est ensuite utilisé par le microorganisme pour le métabolisme, la croissance et l'invasion pendant l'infection de l'hôte (Almeida et coll., 2009).

Dans le présent travail, nous avons évalué la production d'hémolysine chez deux espèces levuriennes *Candida glabrata* et *C. famata* en absence et en présence de différentes concentrations de sels.

1. Evaluation de la capacité des levures à produire de l'hémolysine sur gélose au sang sans additif

Dans un premier temps nous avons évalué la capacité de nos souches à produire de l'hémolysine en absence de tout additif sur la gélose Sabouraud dextrose au sang de mouton.

Pour rappel l'activité hémolytique est évaluée selon la technique décrite par (Udayalaxmi et coll., 2014), qui consiste à déterminer l'indice hémolytique calculé selon l'équation proposée par (Yigit et Aktas., 2009) :

- $H_i = 1$: il n'y a pas d'activité hémolytique.
- $0,64 < H_i < 1$: activité hémolytique positive.
- $H_i < 0,64$: l'activité hémolytique est fortement positive.

1.1.Chez *Candida glabrata*

Nous avons déterminé l'activité hémolytique de 4 souches de *Candida glabrata* sur gélose sabouraud dextrose additionnée de 7% de sang de mouton frais.

Sur la **Figure n°5** nous remarquons qu'autour de toutes les souches testées il y a un halo translucide. Il s'agit de zones d'hémolyse autour de ces colonies ce qui correspond à une lyse des érythrocytes présents dans le milieu.

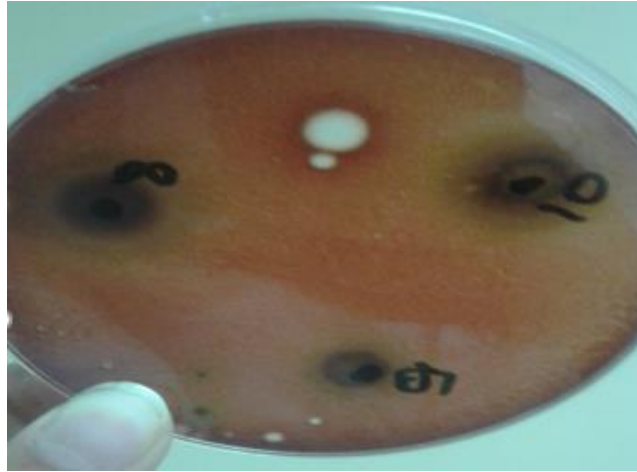


Figure n° 5 : Détermination *in vitro* des zones d'hémolyse autour des colonies de *Candida glabrata* sur gélose sabouraud dextrose au sang de mouton

Le tableau n°1 regroupe l'ensemble des résultats que nous avons obtenu en absence de tout additif dans le milieu réactionnel. Nous remarquons qu'après 48h d'incubation à 37°C sur gélose sabouraud dextrose au sang de mouton, les 4 souches de *Candida glabrata* produisaient des hémolysines et toutes ont une activité hémolytique positive avec un indice hémolytique de **Hi=0,71 ±0,05**.

Tableau n°1 : Activité hémolytique de *Candida glabrata* en absence de toute addition de sel

N ° souches	Indice hémolytique Hi	Activité hémolytique
<i>Cg 1</i>	0,75	Positive
<i>Cg 2</i>	0,76	Positive
<i>Cg 3</i>	0,70	Positive
<i>Cg 4</i>	0,67	Positive

1.2.Chez *Candida famata*

Nous avons déterminé l'activité hémolytique des 3 souches de *Candida famata* sur gélose sabouraud dextrose additionnée de 7% de sang de mouton frais.

Sur **la Figure n°6** nous remarquons qu'autour de toutes les souches testées il y a un halo clair. Il s'agit de zones d'hémolyse autour de ces colonies ce qui correspond à une lyse des érythrocytes présents dans le milieu.



Figure n°6 : Détermination *in vitro* des zones d'hémolyse autour des colonies de *Candida famata* sur gélose sabouraud dextrose agar au sang de mouton

Le **tableau n°2** regroupe l'ensemble des résultats que nous avons obtenu en absence de tout additif dans le milieu réactionnel. Nous remarquons qu'après 48h d'incubation à 37°C sur gélose sabouraud au sang de mouton, les 3 souches de *Candida famata* produisent des hémolysines et toutes ont une activité hémolytique positive avec un indice hémolytique **Hi=0,70 ± 0,05**.

Tableau n°2 : Activité hémolytique de *Candida famata* en absence de toute addition de sel

N ° souches	Indice hémolytique Hi	Activité hémolytique
<i>Cf 1</i>	0,72	Positive
<i>Cf 2</i>	0,65	Positive
<i>Cf 3</i>	0,68	Positive

2. Effet du chlorure de sodium (NaCl) sur la production d'hémolysine

2.1.NaCl à 1%

2.1.1. Chez *Candida glabrata*

Sur **La figure n°7** nous remarquons qu'autour de toutes les colonies des souches testées il y a un halo sur la gélose additionnée de 1% de NaCl. Il s'agit de zones d'hémolyse autour des 4 colonies de *Candida glabrata* ce qui correspond à une lyse des érythrocytes présents dans le milieu.



Figure n°7: Détermination *in vitro* des zones d'hémolyse autour des colonies de *C. glabrata* sur gélose sabouraud dextrose au sang de mouton en présence de NaCl à 1%

Le tableau n°3 regroupe l'ensemble des résultats que nous avons obtenu en présence de 1% de NaCl dans le milieu réactionnel. Nous remarquons qu'après 48h d'incubation à 37°C sur gélose au sang de mouton, les 4 souches de *Candida glabrata* produisent des hémolysines. Nous remarquons également que l'activité hémolytique des isolats de *Candida glabrata* a augmenté pour 2 d'entre elles qui passent d'une activité positive à fortement positive. L'activité hémolytique dans ces conditions a augmenté en moyenne d'un facteur moyen de 0,23

Tableau n°3 : Activité hémolytique de *Candida glabrata* en présence de 1% NaCl

Souches	0% Addition		1% NaCl		Taux de variation en valeur absolue
	indice Hi	Activité hémolytique	indice Hi	Activité hémolytique	
<i>Cg 1</i>	0,76	Positive	0,47	Fortement positive	0,38
<i>Cg 2</i>	0,70	Positive	0,75	Positive	0,07
<i>Cg 3</i>	0,67	Positive	0,60	Fortement positive	0,10
<i>Cg 4</i>	0.75	Positive	0.47	Fortement positive	0.38

2.1.2. Chez *Candida famata*

Sur la **Figure n°8** nous remarquons qu'autour de toutes les colonies des souches testées il y a un halo sur la gélose additionnée de 1% de NaCl. Il s'agit de zones d'hémolyse autour de ces colonies ce qui correspond à une lyse des érythrocytes présents dans le milieu.

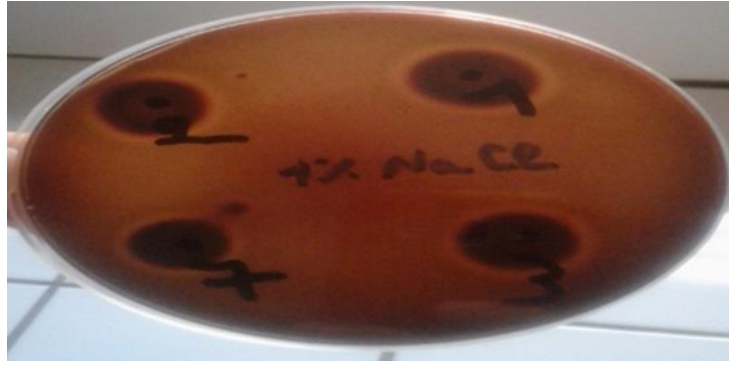


Figure n°8 : Détermination *in vitro* des zones d'hémolyse autour des colonies de *C. famata* sur gélose sabouraud dextrose au sang de mouton en présence de 1% de NaCl

Le tableau n°4 regroupe l'ensemble des résultats que nous avons obtenu en présence de 1% de NaCl dans le milieu réactionnel. Nous remarquons qu'après 48h d'incubation à 37°C sur gélose au sang de mouton les 3 souches de *Candida famata* produisent des hémolysines. Nous remarquons également que l'activité hémolytique des isolats de *Candida famata* a augmenté pour 2 d'entre elles qui passent d'une activité positive à fortement positive. L'activité hémolytique dans ces conditions a augmenté en moyenne d'un facteur moyen de 0.45

Tableau n°4 : Activité hémolytique de *Candida famata* en présence de 1% NaCl

Souches	0% Addition		1% NaCl		Taux de variation en valeur absolue
	indice Hi	Activité hémolytique	indice Hi	Activité hémolytique	
<i>Cf 1</i>	0,72	Positive	0,40	Fortement positive	0,44
<i>Cf 2</i>	0,65	Positive	0,39	Positive	0,40
<i>Cf 3</i>	0,68	Positive	0,33	Fortement positive	0,51

2.2. NaCl à 2,5%

2.2.1 Chez *Candida glabrata*

Sur la **Figure n°9** nous remarquons qu'autour de toutes les colonies des souches testées il y a un halo sur la gélose additionnée de 2,5% de NaCl. Il s'agit de zones d'hémolyse autour de ces colonies de *Candida glabrata* ce qui correspond à une lyse des érythrocytes présents dans le milieu.



Figure n°9 : Détermination *in vitro* des zones d'hémolyse autour des colonies de *Candida glabrata* sur gélose sabouraud dextrose au sang de mouton en présence de 2,5% de NaCl .

Le tableau n°5 regroupe l'ensemble des résultats que nous avons obtenu en présence de 2,5% de NaCl dans le milieu réactionnel. Nous remarquons qu'après 48h d'incubation à 37°C sur gélose sabouraud dextrose au sang de mouton les 4 souches de *Candida glabrata* produisent des hémolysines. Nous remarquons également que l'activité hémolytique a augmenté pour 3 d'entre elles qui passent d'une activité positive à fortement positive. L'activité hémolytique dans ces conditions a augmenté d'un facteur moyen de 0.42

Tableau n°5 : Activité hémolytique de *Candida glabrata* en présence de 2,5% NaCl

Souches	0% Addition		2.5% NaCl		Taux de variation en valeur absolue
	Indice Hi	Activité hémolytique	Indice Hi	Activité hémolytique	
<i>Cg 1</i>	0,76	Positive	0,35	Fortement positive	0,54
<i>Cg 2</i>	0,70	Positive	0,26	Positive	0,63
<i>Cg 3</i>	0,67	Positive	0,39	Fortement positive	0,42
<i>Cg 4</i>	0.75	Positive	0.35	Fortement positive	0.54

2.2.2 Chez *Candida famata*

Sur **la Figure n°10** nous remarquons qu'autour de toutes les colonies des souches testées il y a un halo sur la gélose additionnée de 2,5% de NaCl. Il s'agit de zones

d'hémolyse autour des 3 colonies de *Candida famata* ce qui correspond à une lyse des érythrocytes présents dans le milieu.

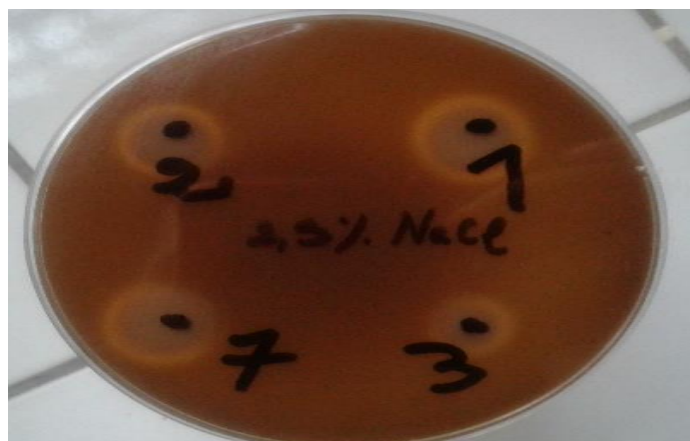


Figure n°10 : Détermination *in vitro* des zones d'hémolyse autour des colonies de *Candida famata* sur gélose sabouraud dextrose au sang de mouton en présence de NaCl à 2,5%

Le tableau n°6 regroupe l'ensemble des résultats que nous avons obtenu en présence de 2,5% de NaCl dans le milieu réactionnel. Nous remarquons qu'après 48h d'incubation à 37°C sur gélose au sang de mouton les 3 souches de *Candida famata* produisent des hémolysines. Nous remarquons également que l'activité hémolytique de ces isolats a augmenté pour 2 d'entre elles qui passent d'une activité positive à fortement positive. L'activité hémolytique dans ces conditions a augmenté d'un facteur moyen de 0.38

Tableau n°6 : Activité hémolytique de *Candida famata* en présence de 2,5% NaCl

Souches	0% Addition		2.5% NaCl		Taux de variation en valeur absolue
	indice Hi	Activité hémolytique	indice Hi	Activité hémolytique	
<i>Cf1</i>	0,72	Positive	0,47	Fortement positive	0,35
<i>Cf2</i>	0,65	Positive	0,50	Positive	0,23
<i>Cf3</i>	0,68	Positive	0,42	Fortement positive	0,38

2.3 NaCl à 5%

2.3.1 Chez *Candida glabrata*

Sur la **Figure n°11** nous remarquons que seule une souche présente un halo clair autour de sa colonie sur gélose dextrose au sang de mouton additionnée de 5% de NaCl, alors que les trois autres ne présentent pas de zone d'hémolyse.



Figure n°11 : Détermination *in vitro* des zones d'hémolyse autour des colonies de *Candida glabrata* sur gélose sabouraud dextrose au sang de mouton en présence de 5% de NaCl

Le **tableau n°7** regroupe l'ensemble des résultats que nous avons obtenu en présence de 5% de NaCl dans le milieu réactionnel. Nous remarquons qu'après 48h d'incubation à 37°C sur gélose sabouraud dextrose au sang de mouton, que les 3 souches de *Candida glabrata* ne produisent plus d'hémolysines. Alors que pour une souche, cette activité hémolytique augmente d'un facteur de 0,42 et devient fortement positive.

Tableau n°7 : Activité hémolytique de *Candida glabrata* en présence de 5% NaCl

Souches	0% Addition		5% NaCl		Taux de variation en valeur absolue
	Indice Hi	Activité hémolytique	Indice Hi	Activité hémolytique	
<i>Cg 1</i>	0,76	Positive	0,44	Fortement positive	0.42
<i>Cg 2</i>	0,70	Positive	1	Aucune activité	/
<i>Cg 3</i>	0,67	Positive	1	Aucune activité	/
<i>Cg 4</i>	0.75	Positive	1	Aucune activité	/

2.3.2 Chez *Candida famata*

Sur la **Figure n°12** nous remarquons que, sur la gélose dextrose au sang de mouton additionnée de 5% de NaCl, les souches de *C. famata* ne croissent pas.

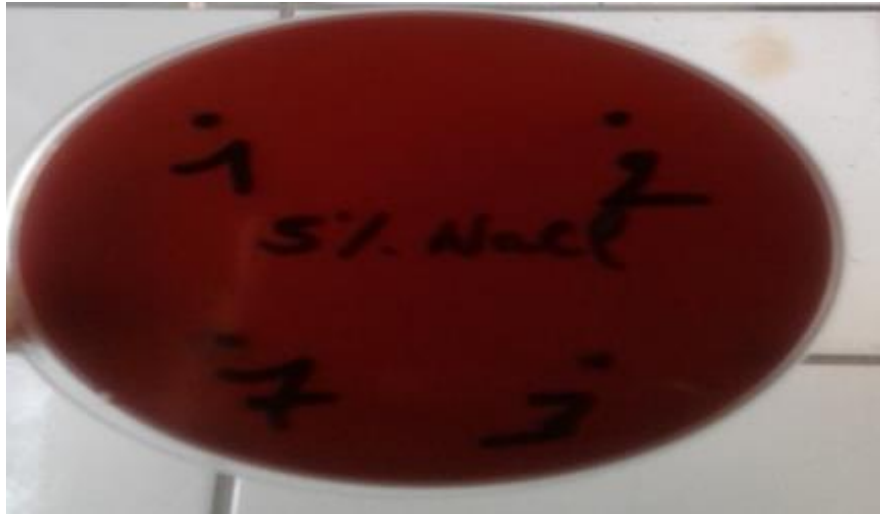


Figure n°12 : Détermination *in vitro* des zones d'hémolyse autour des colonies de *Candida famata* sur gélose sabouraud dextrose au sang de mouton en présence de NaCl à 5%

De l'ensemble des résultats que nous avons obtenu à ce niveau de l'étude (tableau n°8), nous remarquons que l'addition de NaCl à la gélose sabouraud au sang de mouton, induit une augmentation de l'activité hémolytique de nos souches. Cette augmentation varie d'un facteur de 0,23 à 0,42 chez *C. glabrata* et de 0,38 à 0,45 chez *C. famata* et ce pour des concentrations en NaCl de 1% et de 2,5% respectivement. Cependant à une concentration de 5% de NaCl nous observons une inhibition totale de la croissance de *C. famata* et une perte totale de l'activité hémolytique de *C. glabrata* chez la plupart des souches testées.

Nos résultats ne sont pas en accord à ceux de (**Wan et coll., 2015**), qui ont observé que plus la concentration en NaCl augmente plus l'activité hémolytique diminue sans inhibition de la croissance levurienne.

Tableau n°8 : Effet de NaCl sur l'activité hémolytique de *C. glabrata* et *C. famata*

Souches		0 Addition		1% de NaCl		2,5% de NaCl		5% de NaCl	
		Hi	Activité hémolytique	Hi	Activité hémolytique	Hi	Activité hémolytique	Hi	Activité hémolytique
<i>C. glabrata</i>	1	0,76	Positive	0,47	Fortement positive	0,35	Fortement positive	0,44	Fortement positive
	2	0,70	Positive	0,75	Positive	0,26	Positive	1	Aucune activité
	3	0,67	Positive	0,60	Fortement positive	0,39	Fortement positive	1	Aucune activité
	4	0,75	Positive	0,47	Fortement positive	0,35	Fortement positive	1	Aucune activité
<i>C. famata</i>	1	0,72	Positive	0,40	Fortement positive	0,47	Fortement positive	0,59	Fortement positive
	2	0,65	Positive	0,39	Positive	0,50	Positive	0,53	Fortement positive
	3	0,68	Positive	0,33	Fortement positive	0,42	Fortement positive	0,53	Fortement positive

3. Effet du chlorure de potassium (KCl) sur la production d'hémolysine :

3.1. KCl à 1%

3.1.1 Chez *Candida glabrata*

Sur la **Figure n°13** nous remarquons qu'autour de toutes les colonies des souches testées il y a un halo sur la gélose additionnée de 1% de KCl. Il s'agit de zones d'hémolyse autour des 4 colonies de *Candida glabrata* ce qui correspond à une lyse des érythrocytes présents dans le milieu.

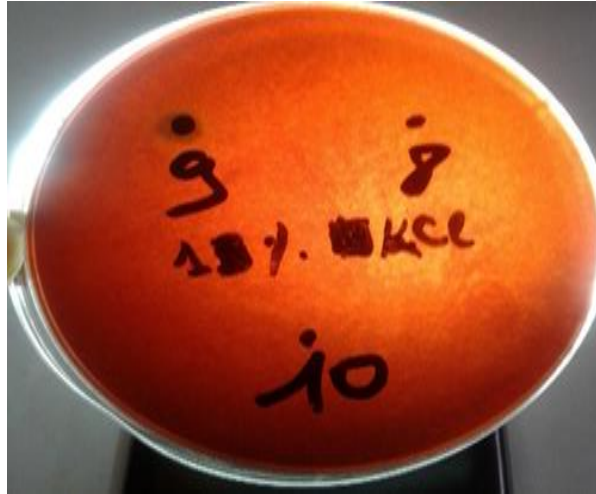


Figure n°13 : Détermination in vitro des zones d'hémolyse autour des colonies de *Candida glabrata* sur gélose sabouraud dextrose agar au sang de mouton en présence de KCl à 1%

Le **tableau n°9** regroupe l'ensemble des résultats que nous avons obtenu en présence de 1% de KCl dans le milieu réactionnel. Nous remarquons qu'après 48h d'incubation à 37°C sur gélose au sang de mouton, les 4 souches de *Candida glabrata* produisent des hémolysines. Nous remarquons également que l'activité hémolytique des isolats de *Candida glabrata* est identique à celle obtenu en absence de toute addition dans le milieu.

Tableau n°9 : Activité hémolytique de *Candida glabrata* en présence de 1% KCl

Souches	0% Addition		1% KCl		Taux de variation en valeur absolue
	indice Hi	Activité hémolytique	indice Hi	Activité hémolytique	
<i>Cg 1</i>	0,76	Positive	0,76	Positive	/
<i>Cg 2</i>	0,70	Positive	0,70	Positive	/
<i>Cg 3</i>	0,67	Positive	0,67	Positive	/
<i>Cg 4</i>	0.75	Positive	0.75	Positive	/

3.1.2 Chez *Candida famata*

Sur la **Figure n°14** nous remarquons l'absence de croissance des souches sur la gélose sabouraud dextrose additionnée de 1% de KCl.

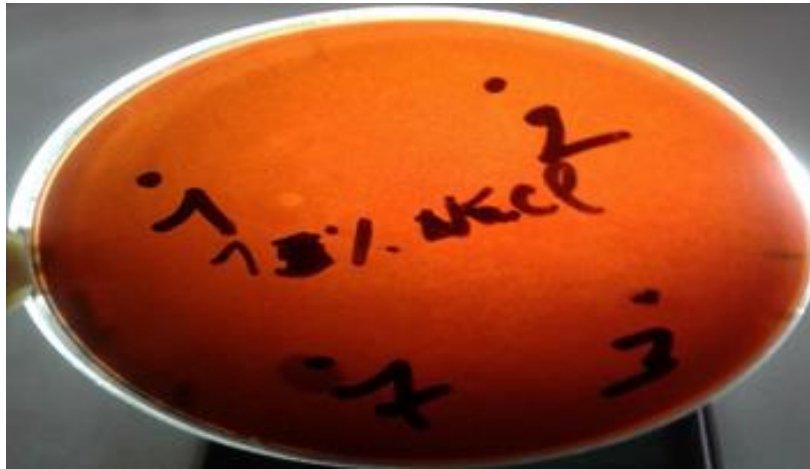


Figure n°14 : Détermination *in vitro* des zones d'hémolyse autour des colonies de *Candida famata* sur gélose sabouraud dextrose agar au sang de mouton en présence de KCl à 1%

3.2. KCl à 2,5%

3.2.1. Chez *Candida glabrata*

Sur la **figure n°15** nous remarquons que parmi les 4 souches de *Candida glabrata* seules deux d'entre elles ont un halo clair autour de leurs colonies sur la gélose additionnée de 2,5% de KCl.



Figure n°15 : Détermination *in vitro* des zones d'hémolyse autour des colonies de *Candida glabrata* sur gélose sabouraud dextrose au sang de mouton en présence de KCl à 2.5%

Le tableau n°10 regroupe l'ensemble des résultats que nous avons obtenu en présence de 2,5% de KCl dans le milieu réactionnel. Nous remarquons qu'après 48h d'incubation à 37°C sur gélose au sang de mouton, 2 souches de *Candida glabrata* maintiennent une activité hémolytique inchangée et que les 2 autres ont perdu cette activité.

Tableau n°10 : Activité hémolytique de *Candida glabrata* en présence de 2,5% KCl

Souches	0% Addition		2.5% KCl		Taux de variation en valeur absolue
	indice Hi	Activité hémolytique	indice Hi	Activité hémolytique	
<i>Cg 1</i>	0,76	Positive	0,73	Positive	0.04
<i>Cg 2</i>	0,70	Positive	0,69	Positive	0.014
<i>Cg 3</i>	0,67	Positive	1	Aucune Activité hémolytique	/
<i>Cg 4</i>	0.75	Positive	1	Aucune activité hémolytique	/

2.3.2. Chez *Candida famata*

Sur **la Figure n°16** nous remarquons l'absence de croissance des souches sur la gélose sabouraud dextrose additionnée de 2,5% de KCl.

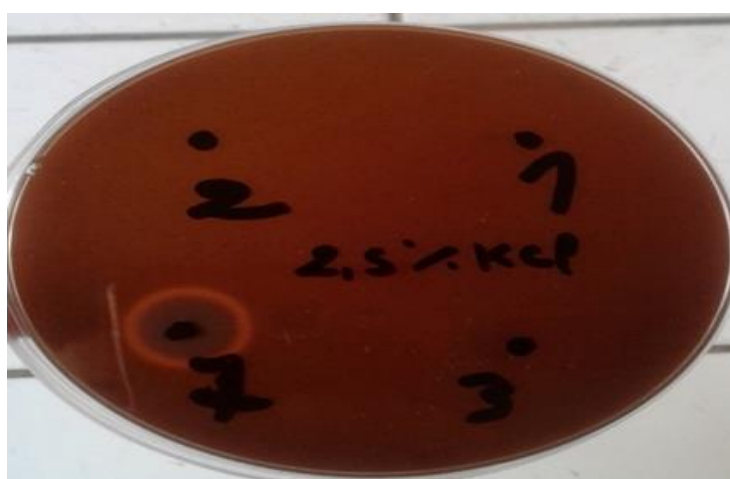


Figure n°16 : Détermination *in vitro* des zones d'hémolyse autour des colonies de *Candida famata* sur gélose sabouraud dextrose au sang de mouton en présence de KCl à 2.5%

3.3. KCl à 5%

3.3.1 Chez *Candida glabrata*

Sur la Figure n°17 nous remarquons que parmi les 4 souches de *Candida glabrata* seules deux d'entre elles ont un halo clair autour de leurs colonies sur la gélose additionnée de 5% de KCl.

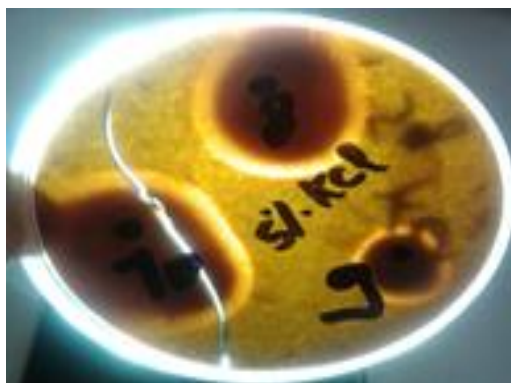


Figure n°17 : Détermination *in vitro* des zones d'hémolyse autour des colonies de *Candida glabrata* sur gélose sabouraud dextrose au sang de mouton en présence de KCl à 5%

Le tableau n°11 regroupe l'ensemble des résultats que nous avons obtenu en présence de 2,5% de KCl dans le milieu réactionnel. Nous remarquons qu'après 48h d'incubation à 37°C sur gélose au sang de mouton, 2 souches de *Candida glabrata* maintiennent une activité hémolytique inchangée et que les 2 autres ont perdu cette activité.

Tableau n°11 : Activité hémolytique de *Candida glabrata* en présence de 5% KCl

Souches	0% Addition		5% KCl		Taux de variation en valeur absolue
	Indice Hi	Activité hémolytique	Indice Hi	Activité hémolytique	
<i>Cg 1</i>	0,76	Positive	0,73	Positive	0.04
<i>Cg 2</i>	0,70	Positive	0,69	Positive	0.014
<i>Cg 3</i>	0,67	Positive	1	Aucune activité hémolytique	/
<i>Cg 4</i>	0.75	Positive	1	Aucune activité hémolytique	/

2.3.3. Chez *Candida famata*

Sur la **Figure n°18** nous remarquons la présence de croissance des souches sur la gélose sabouraud dextrose additionnée de 5% de KCl. Avec une activité hémolytique présentée par un halo clair autour chaque colonie.



Figure n° 18 : Détermination in vitro des zones d'hémolyse autour des colonies de *Candida glabrata* sur gélose sabouraud dextrose au sang de mouton en présence de KCl à 5%

De l'ensemble des résultats que nous avons obtenu à ce niveau de l'étude (**tableau n°12**), nous remarquons que l'addition de KCl à la gélose sabouraud au sang de mouton, induit une inhibition totale de la croissance de *C. famata*.

Pour *Candida glabrata* l'activité hémolytique est maintenue en présence de 1% de KCl et à partir de 2,5% de KCl dans le milieu l'activité hémolytique est perdue pour la moitié des souches restées.

Nos résultats vont dans le même sens que ceux de **Wan et coll. 2015**, qui ont observé que plus la concentration en KCl augmente plus l'activité hémolytique.

Tableau n°12 : Effet de KCl sur l'activité hémolytique de *C. glabrata*

Souches		0% Addition		1% KCl		2,5% KCl		5% KCl	
		Hi	Activité hémolytique	Hi	Activité hémolytique	Hi	Activité hémolytique	Hi	Activité hémolytique
<i>C. glabrata</i>	1	0,76	Positive	0,76	Positive	0,73	Positive	0,73	Positive
	2	0,70	Positive	0,70	Positive	0,69	Positive	0,69	Positive
	3	0,67	Positive	0,67	Positive	1	Aucune activité hémolytique	1	Aucune activité hémolytique
	4	0,75	Positive	0,75	Positive	1	Aucune activité hémolytique	1	Aucune activité hémolytique
<i>C. famata</i>	1	0,72	Positive	La croissance est totalement inhibée en présence de sel Aucune activité hémolytique				/	/
	2	0,65	Positive					/	/
	3	0,68	Positive					/	/

Quatrième partie
Conclusion générale

Les levures du genre *Candida* entraînent des atteintes cutanées et muqueuses, voire viscérales profondes, pouvant avoir une lourde morbi-mortalité chez les patients immunodéprimés mais aussi chez ceux présentant des facteurs de risques tels qu'un âge avancé, une thérapeutique agressive ou une chimiothérapie intensive.

L'objectif que nous nous sommes fixés pour cette étude est de tester l'effet de différentes concentrations de NaCl et de KCl sur les l'activité hémolytique des levures *Candida glabrata* et *C. famata*.

Il ressort de notre étude que :

- L'addition de NaCl à la gélose sabouraud au sang de mouton, induit une augmentation de l'activité hémolytique de nos souches. Cette augmentation varie d'un facteur de 0,23 à 0,42 chez *C. glabrata* et de 0,45 à 0,38 chez *C. famata* et ce pour des concentrations en NaCl de 1% et de 2,5% respectivement. Cependant à une concentration de 5% de NaCl nous observons une inhibition totale de la croissance de *C. famata* et une perte totale de l'activité hémolytique de *C. glabrata* chez la plupart des souches testées.
- L'addition de KCl à la gélose sabouraud au sang de mouton, induit d'une part une inhibition totale de la croissance de *C. famata* d'autre part, pour *Candida glabrata* l'activité hémolytique est perdue pour la moitié des souches restées.

Pour continuer ce travail, il serait intéressant :

- D'évaluer le pouvoir hémolytique pour d'autres espèces de *Candida non albicans*.
- De tester l'effet d'autres électrolytes comme le CaCl₂ et MgCl₂
- D'élargir l'étude avec d'autres enzymes lytiques tels que les phospholipases et les estérases.

Références

Bibliographique

1. **Arama.J.(2019)**, Identification et antifongogramme des levures isolées au service de Bactériologie-Virologie à l'INSP.
2. **Aurore.S.(2010)** Les glycannes pariétaux de levures et leurs implications dans l'induction et la régulation de la réponse immunitaire de l'hôte. Thèse de Doctorat. Université Lille 2.
3. **Boucherit-Atmani.Z, Seddiki.SML, Boucherit.K, Sari-Belkharoubi L, Kunke.D., (2011)** Candida albicans biofilms formed into catheters and probes and their resistance to Amphotericin B. J Mycol Med.
4. **Canela.HM, Cardoso.B, Vitali.LH, Coelho.HC, Martinez.R, Ferreira.ME.,(2018)** Prevalence, virulence factors and antifungal susceptibility of Candida spp. isolated from bloodstream infections in a tertiary care hospital in Brazil. Mycoses;61:11–21.
5. **Chakrabarti, A., Nayak.N, and Talwar.P.,(1991)**. In vitro proteinase production by Candida species. Mycopathologia, 114(3), 163–168.
6. **Chin.VK, Foong.KJ, Maha.A, Rusliza.B, Norhafizah.M et al.,(2013)** Candida albicans isolates from a Malaysian hospital exhibit more potent phospholipase and haemolysin activities than non-albicans Candida isolates. Trop Biomed;30(4)654–62. 35
7. **Da Silva-Rocha.WP, Lemos.VL, Svidizinski.T, Milan EP, Chaves GM.(2014)** Candida species distribution, genotyping and virulence factors of Candida albicans isolated from the oral cavity of kidney transplant recipients of two geographic regions of Brazil. BMC Oral Health. BMC Oral Health, 14(1).
8. **Eggimann. P, Pittet. D.,(2002)** Candidoses en réanimation, Division des soins intensifs de médecine, unité de prévention et contrôle de l'infection, département de médecine interne, hôpitaux universitaires de Genève. 11 : 209-21
9. **El Kirat.S.,(2010)** Développement d'outils cellulaires et moléculaires pour l'étude des interactions Candida-phagocytes ; Application à la caractérisation du gène OLE2 codant une désaturase chez *Candida lusitaniae* Thèse de doctorat. Université Bordeaux 2.
10. **El Zawawy.H.,(2012)**. Efficacy of *Pluchea dioscoridis* leaf extract against pathogenic Candida albicans. J. Infect. Dev. 11(4):334-342
11. **Borchert, E.(2017)**. The biotechnological potential of deep sea sponges and their associated microbiome. PhD Thesis, University College Cork.
12. **Esmailzadeh, Alireza, Zarrinfar, Hossein, AbdolMajid, et al.(2017)** High prevalence of candiduria due to non-albicans Candida species among diabetic patients: A matter of concern. Journal of clinical laboratory analysis. Fata, 32(4), e22343

13. **François L. Mayer, Duncan Wilson & Bernhard Hube(2013)** *Candida albicans* pathogenicity mechanisms, *Virulence*, 4:2, 119-128.
14. **Ghannoum, M.A., and Rice L.(1999)** Antifungal agents: Mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clin. Microbiol.*, 12(4):501-17.
15. **Gloor A.(2009)** Antifongigramme : Evaluation de la carte AST-YSOI® sur L'automate Vitek2®. ICHV laboratoire de bactériologie, Sion.
16. **Guignard J.L., Bouchet P., Madulo G., Regli P(1989)**. Mycologie générale et médicale. Abrégé Masson., 107-120,108-109.
17. **Hawer S.P., and Douglase L.j.(1994)** biofilm formation by candida species on the surface of catheter materials in vitro. *Infect. Immun.* 62,915-921.
18. **Hulin A, Deguillaume A, Bretagne S, Bézie Y.(2005)** Bon usage des antifongiques dans le traitement des candidoses et aspergilloses invasives. *Journal de Pharmacie Clinique.*;24(3):125-38.
19. **Kaminishi H., Tanaka M., Cho T., Maeda H., Hagihara Y.(1990)** Activation of the plasma kallikrein-kinin system by *Candida albicans* proteinase. *Infect. Immun.* 58(7):2139-43.
20. **Khan MSA, Ahmad I.(2012)** In vitro influence of certain essential oils on germ tube formation, cell surface hydrophobicity, and production of proteinase and hemolysin in *Candida albicans*. *J. Nat. Pharm.* 3, 110–117
21. **Khan MSA, Ahmad I, Cameotra SS, Botha F.(2014)** Sub-MICs of *Carum copticum* and *Thymus vulgaris* influence virulence factors and biofilm formation in *Candida* spp. *BMC Complement. Altern. Med.* 14, 337.
22. **Luo G, Samaranayake LP, Yau JY.(2001)** *Candida* species exhibit differential in vitro hemolytic activities. *J Clin Microbiol.* 58(7):2139-43.
23. **Luo S., Poltermann S., Kunert A., Rupp S. and Zipfel P. F.(2009)**. "Immune evasion of the human pathogenic yeast *Candida albicans*: Pra1 is a Factor H, FHL-1 and plasminogen binding surface protein." *Mol Immunol* 47(2-3): 541-50.
24. **Luo, G., L. P. Samaranayake, B. P. Cheung, and G. Tang.(2004)** Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) detection of HLP gene expression in *Candida glabrata* and its possible role in in vitro haemolysin production. *APMIS* 112: 283–90, 2004

25. **M. Fatahinia , M. Halvaezadeh , A. Rezaei-Matehkolaei.(2017).**Comparison of enzymatic activities in different *Candida* species isolated from women with vulvovaginitis. *Journal de Mycologie Médicale*, 27(2), 188–19 .
26. **Mane A, Gaikwad S, Bembalkar S, Risbud A.(2012)** Increased expression of virulence attributes in oral *Candida albicans* isolates from human immunodeficiency virus-positive individuals. *J Med Microbiol*, 61, 285–290.
27. **Maruyama J, Juvvadi PR, Ishi K, Kitamoto K.(2005).** Three-dimensional image analysis of plugging at the septal pore by Woronin body during hypotonic shock inducing hyphal tip bursting in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 331:1081–1088.
28. **Mayer, François L., WILSON, Duncan, et HUBE, Bernhard.(2013).** *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*, vol. 4, no 2, p. 119-128.
29. **Mayor A. L., Thewes S. and Hube B.(2005).** "Systemic fungal infections caused by mechanism of flucytosine resistance in *Candida lusitanae*: contribution of the FCY2.
30. **Mohamed Hashem,Sajith , Vellappally , Shankargouda Patil H. M. H. N. Bandara L. P. Samaranayake.(2014).** Sub-inhibitory Concentrations of Antifungals Suppress Hemolysin Activity of Oral *Candida albicans* and *Candida tropicalis* Isolates from HIV-Infected Individuals Sukumaran Anil. *Mycopathologia* 178, 207–215.
31. **Moran, G., D. Coleman, and D. Sullivan.(2012).** An Introduction to the Medically Important *Candida* Species, in *Candida and Candidiasis.*, p 11-25.
32. **Naglik J., Albrecht A., Bader O., Hube B.(2004)** *Candida albicans* proteinases and host/pathogen interactions. *Cell. Microbiol.* ;6:915–926.
33. **Nessma Ahmed El Zawawy et El Sayed El Sayed Hafez.(2017)** Efficacy of *Pluchea Dioscoridis* Leaf Extract Against Pathogenic *Candida Albicans*,*J Infect Dev Ctries* 11:334-342.
34. **Nicolas Caraës.(2016)** Épidémiologie des candidoses profondes au Centre Hospitalier Universitaire de Rouen. Sciences pharmaceutiques. Thèse de doctorat: Pharmacie. Université de Rouen,200p.
35. **Odds F. C., Rinaldi M. G., Cooper C. R., Jr., Fothergill A., Pasarell L., et al. (1997).**"*Candida* and *Torulopsis*: a blinded evaluation of use of pseudohypha formation as basis for identification of medically important yeasts." *J Clin Microbiol* 35(1): 313-6.
36. **Ortiz, Bryan, PÉREZ-ALEMÁN, Erika, GALO, Carmen, et al.(2018)** Molecular identification of *Candida* species from urinary infections in Honduras. *Revista iberoamericana de micologia* 35(2), 73–77.

37. **Pakshir. K, Zomorodian.K, Karamitalab.K, Jafari.M, Taraz .H, Ebrahimi .H.(2013)** Phospholipase, estérase et activité hémolytique de *Candida* sp. Isolé d'onychomycose et de lésions de lichen plan. *J Mycol Med.*23(2):113-8.
38. **Papon N., Noel T., Florent M., Gibot-Leclerc S., Jean D., et al.,(2007).** "Molecular mechanism of flucytosine resistance in *Candida lusitaniae*: contribution of the FCY2, FCY1, and FUR1 genes to 5-fluorouracil and fluconazole cross-resistance." *Antimicrob Agents Chemother* 51(1): 369-71.
39. **Pappagianis D, Collins MS, Hector R, Remington J.(1979).** Development of resistance to amphotericin B in *Candida lusitaniae* infecting a human. *Antimicrob. Agents Chemother. Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 16(2), 123–126.
40. **Pfaller MA, Diekema DJ, Jones RN, Messer SA, Hollis RJ.(2002)** Trends in antifungal susceptibility of *Candida* spp. isolated from pediatric and adult patients with bloodstream infections: Sentry Antimicrobial Surveillance Program. *J Clin Microbiol.* 40(3): 852–856.
41. **Ramesh N, Priyadharsini M, Sumathi CS, Balasubramanian V, Hemapriya J, Kannan R.(2011)** Virulence factors and antifungal sensitivity pattern of *Candida* Sp. isolated from HIV and TB patients. *Indian J Microbiol.* 51(3):273-8.
42. **Rashmi Fotedar.,(2005),** Comparison of phospholipase and proteinase activity in *Candida albicans* and *C. dubliniensis* .*Mycoses*, 48(1), 62–67.
43. **Sanglard D.(2002)** "Clinical relevance of mechanisms of antifungal drug resistance in yeasts." . *Enferm Infecc Microbiol Clin* **20**(9): 462-9; quiz 470, 479.
44. **Schofield, D. A., C. Westwater, T. Warner, and E. Balish.(2005).** Differential *Candida albicans* lipase gene expression during alimentary tract colonization and infection. *FEMS Microbiol. Lett.* 244:359–365.
45. **Seddiki S.M.L., Boucherit-Otmani Z., Boucherit K., Badsı-Amir S.,Taleb M., Kunkel D.(2013)** Assessment of the types of catheter infectivity caused by *Candida* species and their biofilm formation. First study in an intensive care unit in Algeria. *Int. J. Gen. Med.* 6, 1-7.

46. **Seghir A, Boucherit-Otmani.Z ,Boucherit. K, Sari-Belkharroubi.(2010).**
L'Étude de l'ineffectivité des *Candida* sur cathéters vasculaires périphériques prélevés du Centre Hospitalier Universitaire de Tlemcen. Seghir, Journal de Mycologie Médicale, 27(4), 457–462.
47. **Song J. L., Harry J. B., Eastman R. T., Oliver B. G. and White T. C.(2004)** "The *Candida albicans* lanosterol 14- α -demethylase (ERG11) gene promoter is maximally induced after prolonged growth with antifungal drugs." *Antimicrob Agents Chemother* 48(4): 1136-44.
48. **Wan L, Luo G, Lu H, Xuan D, Cao H, Zhang J, et al.(2015)** Changes in the hemolytic activity of *Candida* species by common electrolytes. *BMC Microbiol.*15(1).
49. **Watanabe T, Takano M, Murakami M, Tanaka H, Matsuhisa A, Nakao N, et al. (1991)** Characterization of a haemolytic factor from *Candida albicans*. *Microbiology.* 45(3):689-94 .
50. **Weiss.E et Timsit.J.F.(2014)** "Management of invasive candidiasis in nonneutropenic ICU patients". *Therapeutic Advances in Infectious Disease*, 2(5-6), 105–115.
51. **Udayalaxmi Jacob.S., D'Souza.D.(2014).** Comparison between virulence factors of *Candida albicans* and non-*albicans* species of *Candida* isolated from genitourinary tract. *Journal of Clinical and Diagnostic Research.*
52. **Yigit.N, Aktas.E.(2009).** Determination of antifungal susceptibility of *Aspergillus spp.* responsible for otomycosis by E-test method. *Journal de Mycologie Médicale*, 19(2), 122–125.
53. **Zhang M.,(2010)** Creation of a hyperpermeable yeast strain to genotoxic agents through combined inactivation of PDR and CWP genes. *Toxicol Sci* 113(2):401-11.