



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

**Chetitah Fatima Zohra**

*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 tropicalis***

Soutenu le 08/07/2020, 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
Examineur	Mme Benmansour Meriem	Maître de conférences B	Université de Tlemcen

**Année universitaire 2019/2020**

## *Remerciement*

*Avant toute chose, je remercie Dieu le tout puissant qui m'a donné, patience et la force durant toutes ces années d'étude.*

*Je remercie chaleureusement mon encadreur Madame SARI BELKHERROUBI LAMIA, Professeur de département de Biologie, faculté des SNV-STU, Université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen, de m'avoir transmis le gout du travail, pour son aide, sa gentillesse, ses bons conseils ainsi que pour sa grande contribution à faciliter toutes les étapes de la réalisation de ce travail. Je souhaite que le contenu de ce mémoire soit la meilleure façon de mes remerciements.*

*Je tiens aussi à remercier Monsieur RAHMOUN MOHAMMED NADJIB, Maître de conférences A de Biologie, faculté des SNV-STU, Université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen de m'avoir fait l'honneur de présider et de juger ce mémoire. Qu'il trouve ici l'assurance de ma respectueuse gratitude.*

*Je voudrais adresser mes remerciements à Madame BENMANSOUR MERIEM, Maître de conférences B au département de Biologie, Faculté des SNV-STU, Université Aboubekr Belkaid de Tlemcen, d'avoir accepté de faire partie du jury et d'examiner mon travail. Qu'elle trouve dans ce mémoire le témoignage de ma sincère reconnaissance et de mon respect.*

*A Madame KHERBOUCHE HANANE, doctorante au département de Biologie, Faculté des SNV-STU, Université Aboubekr Belkaid de Tlemcen, pour son aide et son soutien, qu'elle trouve ici le témoignage de ma profonde reconnaissance.*

*Faty*

# *Dédicace*

*Je dédie ce modeste travail,*

*Aux êtres les plus chers : Mes parents,*

*A ma mère,*

*La lumière de mes yeux et le bonheur de mon existence, celle qui a sacrifié les meilleurs moments de sa vie pour ma réussite de ma naissance à ce jour.*

*A mon père*

*Mon modèle de persévérance pour aller toujours de l'avant et ne jamais baisser les bras. Pour ses encouragements incessants. J'espère que ce mémoire sera à la hauteur de tes attentes.*

*Que Dieu les protèges*

*A Mes très chères sœurs Sabrina et Amina qui m'ont toujours témoigné leurs admirations et leurs soutiens. Qu'elles trouvent ici toute mon affection.*

*A ma très chère princesse petite nièce Ranya.*

*A mes neveux : Hamza, Othman et Wassim.*

*A mes beaux-frères : Mohamed et Hamid.*

*A la mémoire de mes grands-mères, qui ne sont plus là pour partager ma joie.*

*A ma très chère cousine : Sanaa.*

*A ma très chère copine : Yasmine.*

*A mon cousin : Youcef.*

*Faty*

# TABLE DES MATIERES

<b>PREMIERE PARTIE : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	<b>01</b>
Introduction.....	02
1. <i>Candida tropicalis</i> .....	03
2. Les facteurs de virulence du genre <i>Candida</i> .....	04
3. La production d'enzymes lytiques.....	05
3.1. Les hémolysines.....	05
3.2. Les phospholipases.....	06
3.3. Les estérases.....	07
3.4. Les lipases.....	07
3.5. Les protéinases.....	08
4. Les paramètres qui peuvent influencer sur les facteurs de virulence des levures.....	10
<b>DEUXIEME PARTIE : MATERIEL ET METHODES.....</b>	<b>12</b>
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.....	14
<b>TROISIEME PARTIE : RESULTATS ET DISCUSSION.....</b>	<b>15</b>
1. Recherche de la production d'hémolysine par <i>Candida tropicalis</i> .....	16
2. Production d'hémolysine en présence des électrolytes à différentes concentrations.....	18
2.1. Effet du chlorure de sodium (NaCl) sur l'activité hémolytique des souches de <i>Candida tropicalis</i> .....	18
2.1.1. NaCl à 1% (poids/volume) .....	18
2.1.2. NaCl à 2,5% (poids/volume) .....	19

2.1.3. NaCl à 5% (poids/volume) .....	21
2.2. Effet du chlorure Potassium (KCl) sur l'activité hémolytique des souches de <i>candida tropicalis</i> .....	24
2.2.1. KCl à 1% (poids/volume) .....	24
2.2.2. KCl à 2,5% (poids/volume) .....	25
2.2.3. KCl à 5% (poids/volume) .....	26
<b>QUATRIEME PARTIE : CONCLUSION GENERALE.....</b>	<b>30</b>
<b>CINQUIEME PARTIE : REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>32</b>

# LISTE DES FIGURES

<b>Figure N° 1</b>	Caractéristiques phénotypiques de <i>Candida tropicalis</i> .....	<b>03</b>
<b>Figure N° 2</b>	Implication des facteurs et traits de virulence de <i>Candida sp</i> liés à sa pathogénicité dans le stade séquentiel d'interaction avec l'hôte humain pendant l'infection.....	<b>04</b>
<b>Figure N° 3</b>	Action d'hydrolyse des différentes phospholipases sur la phosphatidylcholine.....	<b>06</b>
<b>Figure N° 4</b>	Hydrolyse enzymatique d'une liaison ester par une estérase.....	<b>07</b>
<b>Figure N° 5</b>	Action de la lipase.....	<b>07</b>
<b>Figure N° 6</b>	Les différents types de réactions de synthèse catalysées par les lipases en milieu micro-aqueux.....	<b>08</b>
<b>Figure N° 7</b>	Sap de <i>C. albicans</i> et leur localisation et sécrétion différentielles.....	<b>09</b>

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau N° 1</b>	Activité hémolytique de 9 souches de <i>Candida tropicalis</i> .....	<b>17</b>
<b>Tableau N° 2</b>	Activité hémolytique de 9 souches de <i>Candida tropicalis</i> en présence de 1% NaCl.	<b>19</b>
<b>Tableau N° 3</b>	Activité hémolytique de 9 souches de <i>Candida tropicalis</i> en présence de 2,5% NaCl.....	<b>20</b>
<b>Tableau N° 4</b>	Activité hémolytique de 9 souches de <i>Candida tropicalis</i> en présence de 5% NaCl.	<b>22</b>
<b>Tableau N° 5</b>	Effet de NaCl sur l'activité hémolytique de <i>Candida tropicalis</i> .....	<b>23</b>
<b>Tableau N° 6</b>	Activité hémolytique de 9 souches de <i>Candida tropicalis</i> en présence de 1% KCl..	<b>25</b>
<b>Tableau N° 7</b>	Activité hémolytique de 9 souches de <i>Candida tropicalis</i> en présence de 2,5% KCl	<b>26</b>
<b>Tableau N° 8</b>	Activité hémolytique de 9 souches de <i>Candida tropicalis</i> en présence de 5% KCl..	<b>28</b>
<b>Tableau N° 9</b>	Effet de KCl sur l'activité hémolytique de <i>Candida tropicalis</i> .....	<b>29</b>

## LISTE DES PHOTOS

<b>Photo N°1</b>	Détermination <i>in vitro</i> des zones d'hémolyse autour des colonies de <i>Candida tropicalis</i> sur gélose sabouraud dextrose agar au sang de mouton.....	<b>16</b>
<b>Photo N°2</b>	Détermination <i>in vitro</i> des zones d'hémolyse autour des colonies de <i>Candida tropicalis</i> sur gélose sabouraud dextrose agar au sang de mouton additionnée de 1% NaCl.....	<b>18</b>
<b>Photo N°3</b>	Détermination <i>in vitro</i> des zones d'hémolyse autour des colonies de <i>Candida tropicalis</i> sur gélose sabouraud dextrose agar au sang de mouton additionnée de 2,5% NaCl.....	<b>19</b>
<b>Photo N°4</b>	Détermination <i>in vitro</i> des zones d'hémolyse autour des colonies de <i>Candida tropicalis</i> sur gélose sabouraud dextrose agar au sang de mouton additionnée de 5% NaCl.....	<b>21</b>
<b>Photo N°5</b>	Détermination <i>in vitro</i> des zones d'hémolyse autour des colonies de <i>Candida tropicalis</i> sur gélose sabouraud dextrose agar au sang de mouton additionnée de 1% KCl.....	<b>24</b>
<b>Photo N°6</b>	Détermination <i>in vitro</i> des zones d'hémolyse autour des colonies de <i>Candida tropicalis</i> sur gélose sabouraud dextrose agar au sang de mouton additionnée de 2,5% KCl.....	<b>25</b>
<b>Photo N°7</b>	Détermination <i>in vitro</i> des zones d'hémolyse autour des colonies de <i>Candida tropicalis</i> sur gélose sabouraud dextrose agar au sang de mouton additionnée de 5% KCl.....	<b>27</b>



# **SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**

---

Depuis les années 1980, l'incidence et la prévalence des infections fongiques invasives ont connu une considérable augmentation, en particulier dans la grande population des patients immunodéprimés (**Sardi et coll., 2013**). Les infections fongiques sont amplement reconnues comme l'une des principales causes de morbidité et de mortalité, avec un taux très important (40à 60%) (**Massou et coll., 2013**), en particulier celles provoquée par des champignons pathogènes opportunistes, comme le genre *Candida* (**Fernandes et coll., 2020**).

Malgré le développement de nouveaux moyens thérapeutiques, les levures du genre *Candida* sont responsables des affections graves. Selon **Williams et coll. (2011)**, le nombre des espèces dépendantes à ce genre dépasse 350, alors que seulement une minorité est considérée comme pathogène pour l'homme. *Candida* est la troisième cause des septicémies dans les unités de soins intensifs en tenant compte de 10% de chaque infection, elle est associée à la mortalité des patients hospitalisés (**Serefhanoglu et coll., 2012**).

*Candida albicans* est l'agent infectieux le plus courant de toutes les formes de candidose, mais plus de 40% des infections à *Candida* sont provoquées par des espèces de *Candida non albicans* telles que *C. tropicalis*, *C. glabrata* et *C. parapsilosis* (**Lin et coll., 2018**).

Par ailleurs les mycoses dues à *Candida tropicalis* ont largement augmenté à l'échelle mondiale, affirmant ainsi ce microorganisme comme une levure pathogène émergente (**Kothavade et coll., 2010**). Ce pathogène à une prévalence élevée dans les cas de candidémie au Brésil et dans le monde, son incidence totale a augmenté au cours des dernières années et cette levure figure parmi les six premiers isolats nosocomiaux de la circulation sanguine selon les études américaines et européennes (**Sharma et coll., 2017**). Elle peut constituer jusqu'à 66% de toutes les infections à *Candida* dans le monde en fonction des régions (**Bhattacharjee, 2016**). Il semblerait que l'espèce *Candida tropicalis* prend de plus en plus de place en infectiologie humaine, c'est pourquoi nous avons voulu travailler sur cette espèce d'autant plus que des travaux en cours (soumis à la publication) dirigés par le Pr Sari-Belkherroubi Lamia ont permis d'isoler cette espèce du centre hospitalo-universitaire de Tlemcen.

Rappelons à présent les principales caractéristiques de cette levure ainsi que les différents facteurs de virulence liés au genre *Candida*.

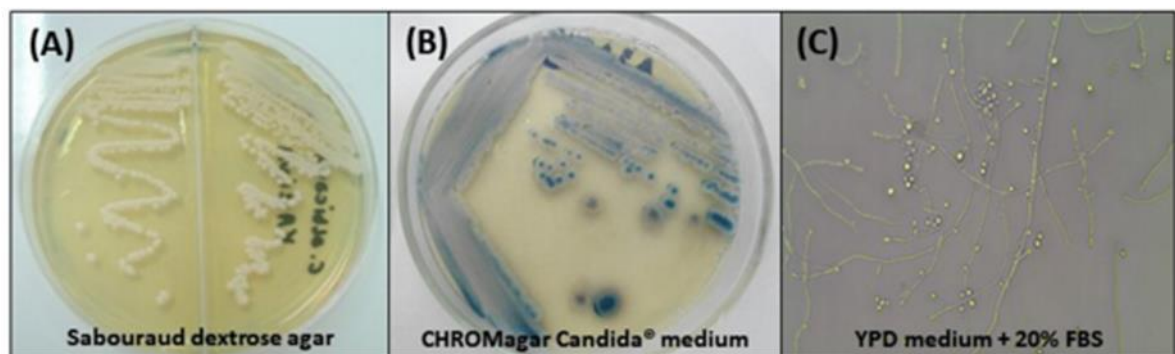
### 1. *Candida tropicalis* :

*Candida tropicalis* est un pathogène responsable de candidose épidémiologique, systémique ou muqueuse chez les individus immunodéprimés [(Munoz et coll., 2011) ; (Patil et coll., 2018)] surtout dans les régions tropicales et elle provoque selon la géographie 3 à 66% des candidémies (Ann Chai et coll., 2010).

Elle est la deuxième espèce la plus virulente très proche de *Candida albicans* et a été facilement reconnue avec des méthodes phénotypiques et moléculaires, elle est cliniquement adéquate et peut être le deuxième ou le troisième agent étiologique de la candidémie, se situant dans les pays d'Amérique latine et en Asie. En plus de ces caractéristiques elle a été estimée comme un microorganisme osmotolérant et cette capacité à survivre à l'augmentation en sel peut être importante pour la persistance fongique dans les environnements salins (Zuza-Alves et coll., 2017).

Concernant les caractéristiques biochimiques, *Candida tropicalis* par le biais de la voie oxydative est capable d'incorporer et de fermenter le galactose, le saccharose, le maltose et le tréhalose.

D'après Gürcüoğlu et coll. (2010), *Candida tropicalis* possède des formes variables rondes à allongées avec des tailles différentes (6 à 10µm de long sur 5 à 7µm de large), retrouvée dans le tube digestif et les voies urinaires de l'homme. Sur la gélose Sabouraud dextrose (SDA), elle forme des colonies blanches à crème avec une structure crémeuse et un aspect lisse et peuvent avoir des bords faiblement ridés (Figure N°1).



**Figure N°1 : Caractéristiques phénotypiques de *Candida tropicalis* :**

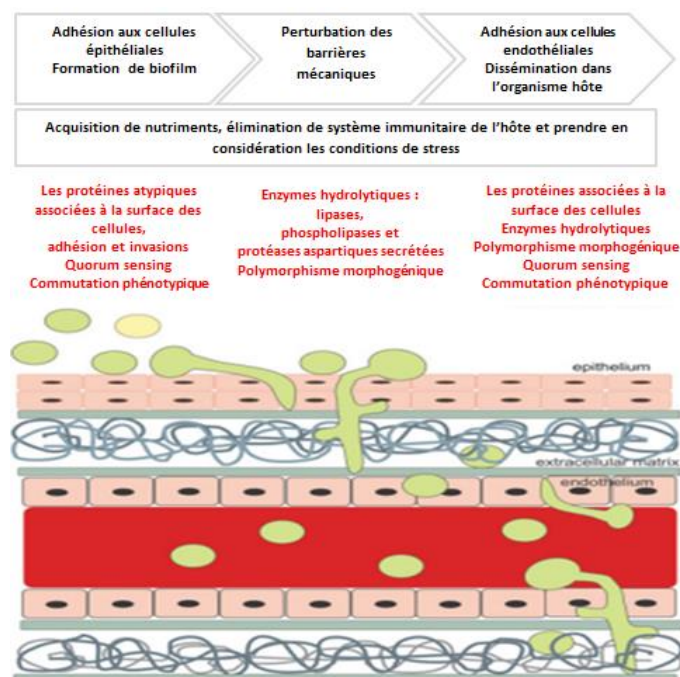
(A) colonies de couleur crème, ternes et lisses, après 48 h d'incubation à 30 ° C sur gélose Sabouraud dextrose; (B) Colonies de couleur bleu foncé typique sur milieu CHROMagar Candida® après 96 h d'incubation à 35°C; (C) Aspects micromorphologiques après incubation dans YPD milieu contenant 20% de sérum bovin fœtal (FBS) pendant 7 jours à 30°C, 400x: blastoconidies en chaînes simples ou ramifiées, véritables hyphes et pseudohyphes abondants. (Zuza-Alves et coll., 2017).

## 2. Les facteurs de virulence du genre *Candida* :

Le nombre d'études durant ces dernières années liées à *Candida non albicans* a augmenté. Ceux-ci rapportent la formation de biofilm, l'activité des enzymes hydrolytiques extracellulaires telles que la phospholipase, la protéinase et les estérases, ainsi que l'expression des hémolysines comme facteurs essentiels de virulence (**Treviño-Rangel et coll., 2018**).

Chez *Candida sp* l'expression des facteurs de virulence peuvent changer selon l'espèce infectante, l'origine géographique, le type d'infection, le site et le stade de l'infection, ainsi que la réaction de l'hôte (**Deorukhkar et coll., 2014**).

De nombreux facteurs de virulence s'avèrent être la cause des infections à *C. tropicalis*, qui présentent la capacité élevée de dissémination et de mortalité. L'adhésion aux surfaces des dispositifs médicaux et la formation de biofilms sont considérées comme des facteurs favorisant au développement de la candidose (**Cordeiro et coll., 2014**). De plus, l'adhésion et l'invasion des cellules hôtes par *C. tropicalis* est considérée comme la première étape pour entamer les infections invasives. Une fois adhérents à l'épithélium, *C. tropicalis* est capable de sécréter des enzymes hydrolytiques qui détériorent l'intégrité de la membrane des cellules hôtes, engendrant un dysfonctionnement ou un déséquilibre des structures de l'hôte (**Negri, 2011**) (**Figure N°2**).



**Figure N°2 :** Implication des facteurs et traits de virulence de *Candida sp* liés à sa pathogénicité dans le stade séquentiel d'interaction avec l'hôte humain pendant l'infection (**Gogol et coll., 2017**).

### **3. La production d'enzymes lytiques :**

Les enzymes hydrolytiques tels que la phospholipase, la protéinase, la lipase, l'estérase, l'hémolysine et autres sont les plus fréquentes chez *Candida* (**Pandey et coll., 2018**). Ces enzymes hydrolytiques sont lipolytiques (**Sanita et coll., 2014**). Ce sont des hydrolases de classe 3 selon la classification révélée par l'union internationale de la Biochimie et de la Biologie Moléculaire (**Kerviel, 2014**).

Ces enzymes auraient pour fonction de faciliter la pénétration active des levures dans les cellules, de participer à la digestion et à la synthèse des esters lipidiques pour leur nutrition et de collaborer à l'incursion des tissus en hydrolysant les composants lipidiques des membranes des cellules hôtes. Il a été noté que les hydrolases sont capables de détériorer les cellules et les molécules du système immunitaire pour empêcher l'activité antimicrobienne (**Castillo et coll., 2019**).

#### **3.1. Les hémolysines :**

La sécrétion d'enzymes hydrolytiques telles que l'hémolysine est reconnue comme un attribut de virulence important du champignon pathogène opportuniste *Candida* (**Anil et coll., 2014**). Les hémolysines privilégient la lyse des globules rouges par la destruction de leur membrane cellulaire et la libération de leur teneur en hémoglobine qui est employée par les cellules fongiques comme nutriment pour contribuer à leur croissance et leur développement (**Ramos et coll., 2016**).

Les facteurs hémolytiques sécrétés par les champignons entraînent le dégagement d'hémoglobine des globules rouges pour une application postérieure par les levures comme source de fer, la capacité d'assimilation du fer est d'un intérêt primordial pour la continuité des micro-organismes et l'établissement de processus infectieux (**Giolo et Svidzinski, 2010**).

Des études suggèrent que les hémolysines sont des toxines porogènes qui interfèrent avec des ligands spécifiques à la surface de diverses cellules cibles (**Nayak et coll., 2013**).

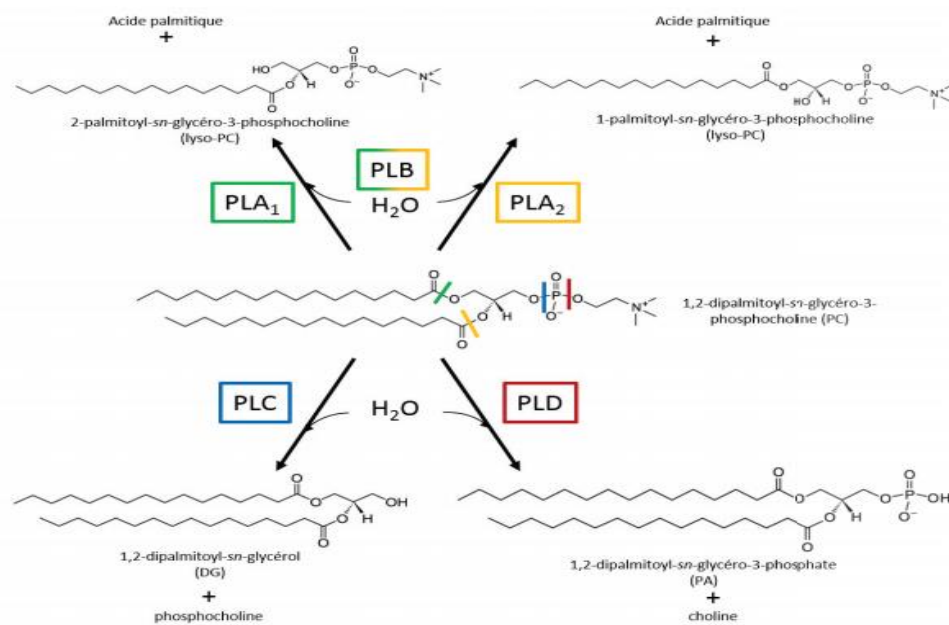
Les hémolysines sont des facteurs de virulence essentielle qui aident les agents pathogènes à subsister et à durer dans l'hôte (**Wan et coll., 2015**).

### 3.2. Les phospholipases :

Les phospholipases sont des enzymes souvent impliquées dans le potentiel pathogène de *Candida sp* (Treviño-Rangel et coll., 2018). Ces enzymes hydrolysent les substrats phospholipidiques à des liaisons esters spécifiques. Elles changent énormément leur ossature, leur activité, leur contrôle ainsi que leur mode d'action (Aloulou et coll., 2018).

Il existe quatre types fondamentaux des phospholipases, la phospholipase A (PLA<sub>1</sub> et PLA<sub>2</sub>), la phospholipase B (PLB), la phospholipase C (PLC) et la phospholipase D (PLD), sur la base du clivage de la liaison ester au sein d'une molécule phospholipidique du substrat et qui sont en plus rangés en différents sous types (Barman et coll., 2018) (Figure N°3).

Ces enzymes simplifient l'agression des épithéliums muqueux de l'hôte par l'hydrolyse d'une ou plusieurs liaisons esters dans les glycérophospholipides, entraînant le déséquilibre de la membrane des cellules hôtes (Sachin et coll., 2012).

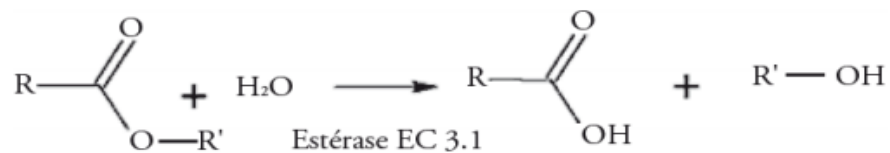


**Figure N°3 :** Action d'hydrolyse des différentes phospholipases sur la phosphatidylcholine (Arhab. 2018).

### 3.3. Les estérases :

L'enzyme estérase est aussi un facteur de virulence crucial qui dégrade les liaisons esters et accroît son invasion tissulaire (**Pandey et coll., 2018**). Les estérases nommées hydrolases carboxyl esters (EC 3.1.1.-) catalysent l'hydrolyse et la synthèse des liaisons esters (**Thierry et coll., 2017**) (**Figure N°4**).

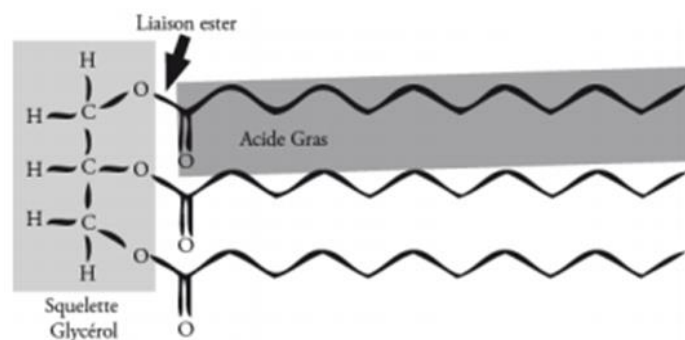
En raison des utilisations répandues des enzymes lipolytiques dans divers applications, il y'a toujours un intérêt pour les nouvelles estérases aux propriétés uniques. L'estérase a été classée comme type lipolytiques IV, adhésion à la sous famille GDSAG des lipases hormonosensibles (**Borchert et coll., 2017**).



**Figure N°4** : Hydrolyse enzymatique d'une liaison ester par une estérase (**Kerviel.2014**).

### 3.4. Les lipases :

Les lipases (EC 3.1.1.3) sont des hydrolases omniprésentes pour la liaison ester carboxyle de substrats insolubles dans l'eau, tels que les triacylglycérols, les phospholipides et d'autres substrats insolubles, agissant dans des milieux aqueux ainsi que dans des milieux à faible teneur en eau (**Stauch et coll., 2015**) (**Figure N°5**).

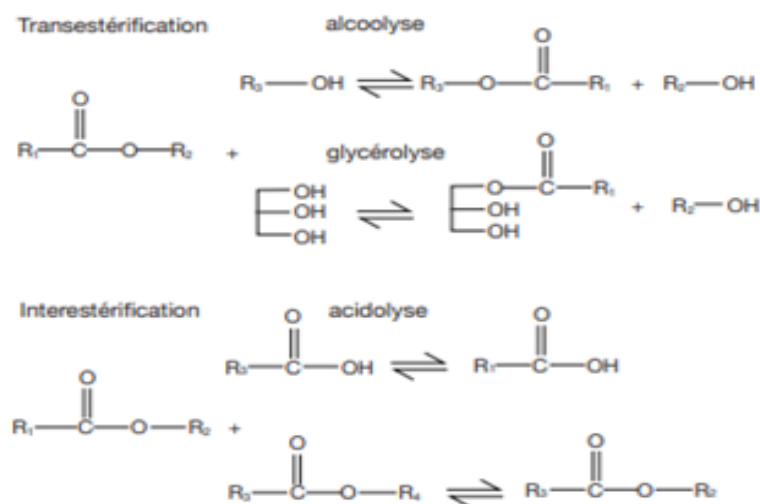


**Figure N°5** : Action de la lipase (**Kerviel.2014**).

Les levures ont été largement utilisées pour la production de ces enzymes, avec un accent particulier sur le genre *Candida sp* (Oliveira et coll., 2014). Les lipases extracellulaires permettent la dégradation des lipides pour l'appropriation des nutriments et l'adhésion aux tissus hôtes. Elles entraînent aussi des processus inflammatoires non spécifiques en améliorant l'immunité à médiation cellulaire. La production de lipase extracellulaire chez *C. albicans* a été décrite pour la première fois par Werner en 1965. Les lipases de *C. albicans* sont codées par 10 gènes (LIP1 à LIP10) (Gascier et coll., 2007).

Des séquences semblables sont aussi identifiées chez *C. tropicalis* (Deorukhkar et Roushani, 2017).

Les lipases interviennent dans deux types de réaction : l'hydrolyse et la synthèse (Kerviel, 2014). La Figure N°6 présente l'ensemble des réactions de synthèse catalysées par les lipases en milieu micro-aqueux



**Figure N°6** : Les différents types de réactions de synthèse catalysées par les lipases en milieu micro-aqueux (Alloue et coll., 2008).

### 3.5. Les protéinases :

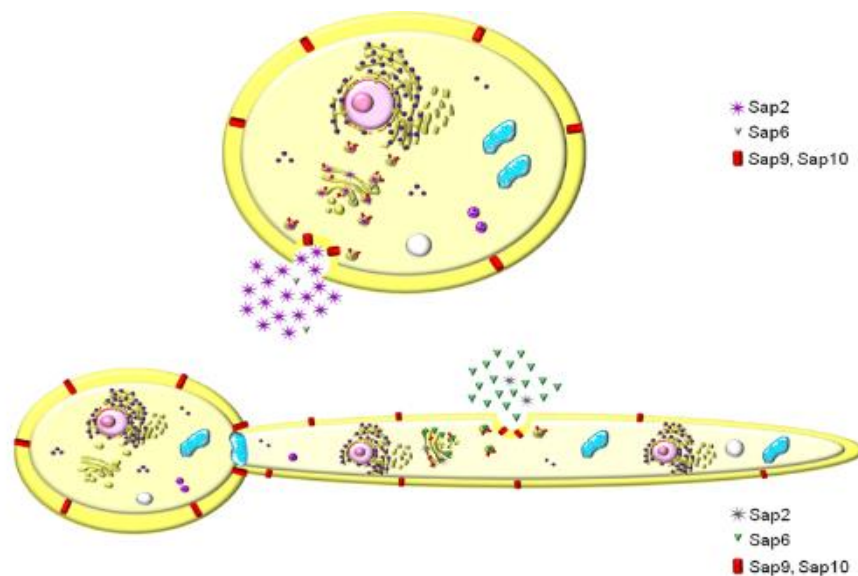
Les protéases ou les protéinases font partie de la classe des hydrolases (EC 3.4.21-24.X). En effet, ce sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse des protéines dans des sites bien spécifiques en séparant la liaison peptidique qui lie deux acides aminés dans une chaîne peptidique et sont produites de façon extracellulaire ou intracellulaire (Kumar et coll., 2008). L'activité protéinase de *Candida sp* est due à dix iso-enzymes de protéase aspartique (Sap) sécrétées (Tsang et coll., 2007). Sap détériore le complément, les cytokines et les



immunoglobulines. De surcroît Sap abîme les protéines barrières épithéliales et muqueuses telles que le collagène, la kératine et la mucine **(Deorukhkar et Saini, 2015)**.

Chez *Candida*, Sap est codé par dix gènes SAP1-10. Ils se caractérisent par une capacité protéolytique à large spectre et des propriétés de virulence qui s'expriment différemment à différents stades et formes de croissance des levures. Sap2 (comme Sap1 et Sap3) est actif à pH acide et est principalement associé à une forme de croissance de levure tandis que Sap6 (comme Sap4 et Sap5) est plus actif à pH neutre à légèrement alcalin. Avec le Sap5 dominant, Sap6 a été associé à des hyphes **(Figure N°7) (Cassone et coll., 2016)**.

Sap1-6 est essentiel pour l'adhérence, les lésions tissulaires et l'altération des mécanismes de défense de l'hôte et le rôle de Sap 7 dans la pathogénicité de *Candida sp* ne sont pas complètement compris alors que Sap 9 et Sap 10 sont essentiels pour maintenir l'intégrité de surface régulatrice des cellules levuriennes **(Deorukhkar et Saini, 2015)**.



**Figure N°7** : les protéases aspartiques (Sap) chez la levure du genre *Candida* et leurs localisations et sécrétion différentielles **(Cassone et coll., 2016)**.

Chez *C. tropicalis* quatre gènes SAP (SAPT1-4) ont été identifiés. *C. tropicalis* démontre une activité protéinase élevée dans un milieu contenant de l'albumine sérique bovine comme seule source d'azote **(Silva et coll., 2012)**.

Les différents rôles confirmés des protéases aspartiques candidales dans les interactions hôte-pathogène au cours de la candidose confirment ces enzymes comme des cibles potentielles prometteuses pour de nouvelles thérapies antifongiques (**Gogol et coll., 2017**).

#### **4. Les paramètres qui peuvent influencer sur les facteurs de virulence des levures :**

De multiples facteurs environnementaux, tels que le pH extracellulaire et les concentrations de cations de métaux alcalins, peuvent affecter la virulence des isolats de *Candida* (**Wan et coll., 2015**). Les concentrations élevées des ions alcalins ( $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$ ) ont des influences sur la croissance et sur certains facteurs de virulence de *Candida albicans* (**Hermann et coll., 2003**). Globalement, les espèces de *Candida* peuvent s'accroître à des concentrations de NaCl relativement élevées (**Hartz Alves et coll., 2002**), bien que le sel ait un effet négatif sur certaines particularités de virulence (**Hermann et coll., 2003**).

Les levures possèdent un antiport  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  qui est un système de transport essentiel dont l'activité peut influencer la tolérance des souches de *Candida* aux fortes concentrations externes de cations alcalins (**Velkova et Sychrova, 2006**).

La température exerce un contrôle fort sur la progression et la virulence de divers agents pathogènes. Chez *Candida albicans* la température a une intense influence sur les mutations morphogénétiques entre la forme levure et la forme filamenteuse qui ont des propriétés de virulence différentes, car la levure est importante pour une propagation anticipée et les filaments pour l'invasion tissulaire et les infections profondes (**Shapiro et coll., 2012**).

En 2016, **Muthamil et Karutha Pandian** ont évalué le potentiel anti-infectieux de la plante médicinale *Murraya koenigii* (feuilles de curry) sur *Candia albicans* par des tests *in vitro* et une analyse microscopique. Ils ont déduit que l'extrait méthanolique de feuille de *M. koenigii* a inhibé de manière marquante les facteurs de virulence de la levure tels que la formation de biofilm, la transition de la forme levure à hyphe, l'hydrophobicité de la surface cellulaire, la production d'hémolysine et la filamentation.

Une autre étude réalisée cette fois-ci par **El Zawawy et Hafez (2017)**, visait à évaluer l'efficacité d'extrait de feuille de *Pluchea dioscoridis* (*Blumea baccharoides* ou *Pluchea krausii*) sur la croissance, la morphogénèse, la survie et l'expression des gènes de virulence de *Candida albicans*. C'est un agent anti-candidal puissant pour traiter les infections à levures pathogènes. Cette étude circonstancielle a suggéré que l'extrait possédait des propriétés levuricides à des concentrations plus élevées et élimine la croissance des cellules de levure. A la concentration minimale inhibitrice (CMI) de valeur 30mg/mL, l'expression des gènes de la phospholipase, de la protéinase et de l'hémolysine a été réduite jusqu'à 90% pour Sap 1 et 40% pour Sap 10.

Certaines huiles essentielles de *Carum copticum* (Ajwain), *Thymus vulgaris* (Thym commun) ont été testées pour leur activité inhibitrice sur 27 souches de *Candida sp* résistantes à certains antifongiques, afin de déterminer les concentrations minimales inhibitrices (CMI). Il a été constaté que, pour des concentrations en huiles d'essai de 0,25 à 0,5 fois la CMI, une diminution supérieure de 70% de l'hydrophobicité de la surface cellulaire, de la production de protéinase et d'hémolysine (**Khan et coll., 2014**).

Plusieurs facteurs peuvent influencer l'activité hémolytique des levures, tel que la température, le glucose, certains ions, dont  $Fe^{3+}$  ou certains composés (éthanol, *n*-butanol ou vapeur de *n*-pentanol). **Wan et coll. (2015)**, ont testé l'effet de différentes concentrations de quelques électrolytes sur la production d'hémolysine par les *Candida sp*. Après avoir ajouté les électrolytes au milieu réactionnel, chaque souche présentait toujours une hémolyse positive. Néanmoins, les résultats suggéraient que lorsqu'ils étaient cultivés dans du  $CaCl_2$ , du NaCl ou du KCl, l'activité hémolytique des isolats de *Candida* était réduite par rapport au groupe témoin. Des différences significatives étaient évidentes entre différentes concentrations de NaCl ce qui signifie que l'activité hémolytique de la levure dans les conditions d'hypernatrémie diminue.

Partant des travaux de **Wan et coll. (2015)**, nous nous sommes intéressés à l'étude de l'effet de quelques sels sur la production d'enzymes lytiques par les levures *Candida tropicalis* isolées du centra hospitalo-universitaire de Tlemcen. 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». En effet, des résultats, en cours de publication, obtenus par cette équipe de recherche ont confirmé que *Candida tropicalis* est une souche fortement présente sur les dispositifs médicaux prélevés du CHU de Tlemcen.

# **MATERIEL ET METHODES**

---

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 des 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 9 souches de *Candida tropicalis*.

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 concentration 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)**:

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

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

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

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

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

$$\mu_{Hi} = [Hi_0 \text{ addition} - Hi_{\text{sel}}] / Hi_0 \text{ addition}$$

## **RESULTATS ET DISCUSSION**

---

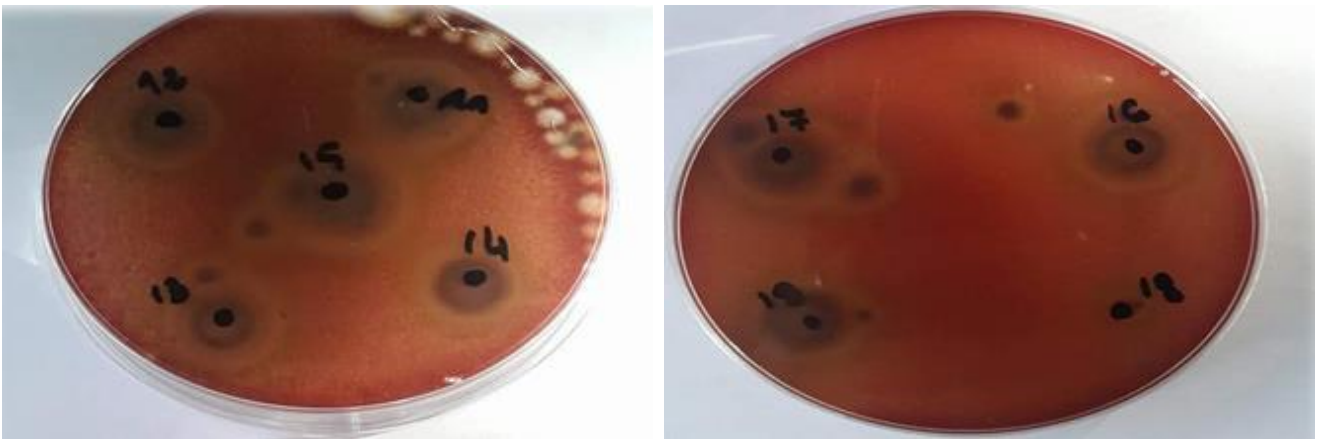
Chez les champignons du genre *Candida*, la transition du commensalisme à la pathogénicité peut être attribuée à l'expression sélective de différents facteurs de virulence qui agissent en synergie dans des conditions favorables. Le type, le stade et le site d'infection, en plus de la nature de la réponse immunitaire, déterminent les facteurs de virulence exprimés par la levure. Parmi ces facteurs de virulence, l'activité protéolytique, lipolytique ou hémolytique semble jouer un rôle majeur dans la pathogénicité de ces microorganismes [(Noumi et coll., 2010) ; (Mane et coll., 2011)].

L'hémolysine dégrade les érythrocytes de l'hôte pour libérer du fer à utiliser pour la croissance et le métabolisme de ces champignons en cas d'infections systémiques (Jeeves et coll., 2011). Dans le présent travail, nous avons évalué la production d'hémolysine, un facteur de virulence essentiel pour *Candida tropicalis* en absence et en présence de différentes concentrations de sels.

### 1. Recherche de la production d'hémolysine par *Candida tropicalis* :

Nous avons déterminé l'activité hémolytique des 9 souches de *Candida tropicalis* sur gélose sabouraud dextrose additionnée de 7% de sang de mouton frais.

Sur la photo N°1 nous remarquons qu'autour de toutes les souches testées il y a un halo clair. Il s'agit de zones d'hémolyse autour des 9 colonies de *Candida tropicalis* ce qui correspond à une lyse des érythrocytes présents dans le milieu.



**Photo N°1 :** Détermination *in vitro* des zones d'hémolyse autour des colonies de *Candida tropicalis* sur gélose sabouraud dextrose agar 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.

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 au sang de mouton les 9 souches de *Candida tropicalis* produisaient des hémolysines et toutes ont une activité hémolytique positive.

**Tableau N°1** : Activité hémolytique de *Candida tropicalis* en absence de toute addition de sel

Souches	0 Additon	
	Indice $H_i$	Activité hémolytique
<b>Souche 1</b>	0,8	Positive
<b>Souche 2</b>	0,9	Positive
<b>Souche 3</b>	0,8	Positive
<b>Souche 4</b>	0,8	Positive
<b>Souche 5</b>	0,7	Positive
<b>Souche 6</b>	0,8	Positive
<b>Souche 7</b>	0,8	Positive
<b>Souche 8</b>	0,7	Positive
<b>Souche 9</b>	0,7	Positive

## 2. Production d'hémolysine en présence des sels à différentes concentrations :

Après avoir déterminé la capacité des levures à produire de l'hémolysine sur une gélose sabouraud dextrose au sang de mouton sans aucune addition, nous avons recherché l'effet de l'addition des sels sur l'activité hémolytique de nos souches.

Nous avons testé deux sels le NaCl et le KCl à différentes concentrations.

### 2.1. Effet du chlorure de sodium (NaCl) sur l'activité hémolytique des souches de *Candida tropicalis* :

#### 2.1.1. NaCl à 1% (poids/volume) :

Sur la photo N°2 nous remarquons qu'autour de toutes les souches testées il y a un halo sur la gélose additionnée de 1% de NaCl. Il s'agit de zones d'hémolyse autour des 9 colonies de *Candida tropicalis* ce qui correspond à une lyse des érythrocytes présents dans le milieu.



**Photo N°2 :** Détermination *in vitro* des zones d'hémolyse autour des colonies de *Candida tropicalis* sur gélose sabouraud dextrose agar au sang de mouton additionnée de 1% NaCl.

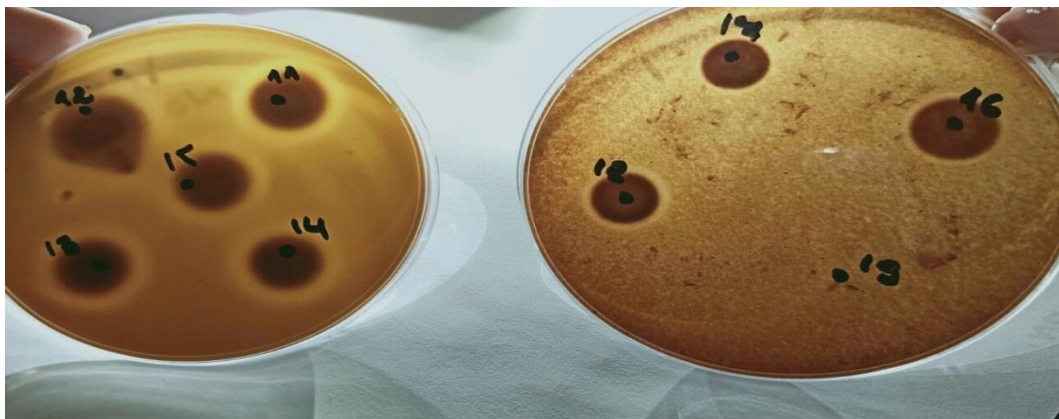
Le tableau N°2 regroupe l'ensemble des résultats que nous avons obtenu en présence de 1% de NaCl dans le milieu réactionnel. Nous remarquons qu'après addition de 1% de NaCl à la gélose sabouraud dextrose au sang de mouton incubé à 37°C pendant 48h, les 9 souches de *Candida tropicalis* ont toujours une activité hémolytique. Nous remarquons également que cette activité a augmenté pour 6 souches qui passent d'une activité positive à fortement positive. L'activité hémolytique dans ces conditions a augmenté en moyenne d'un facteur de 0,43.

**Tableau N°2 :** Activité hémolytique de *Candida tropicalis* en présence de 1% de NaCl

Souches	0 Addition		1% NaCl		Taux de variation en valeur absolue
	Indice Hi	Activité hémolytique	Indice Hi	Activité hémolytique	
<b>Souche 1</b>	0,8	Positive	0,466	Fortement positive	0,4175
<b>Souche 2</b>	0,9	Positive	0,562	Fortement positive	0,3755
<b>Souche 3</b>	0,8	Positive	0,428	Fortement positive	0,465
<b>Souche 4</b>	0,8	Positive	0,647	Positive	0,1912
<b>Souche 5</b>	0,7	Positive	0,7	Positive	0
<b>Souche 6</b>	0,8	Positive	0,411	Fortement positive	0,4862
<b>Souche 7</b>	0,8	Positive	0,411	Fortement positive	0,4862
<b>Souche 8</b>	0,7	Positive	0,687	Positive	0,0185
<b>Souche 9</b>	0,7	Positive	0,437	Fortement positive	0,3757

### 2.1.2. NaCl à 2,5% (poids/volume) :

Sur la photo N°3 nous remarquons que les 9 souches de *Candida tropicalis* ont un halo autour des colonies sur la gélose additionnée de 2,5% de NaCl. Il s'agit de zones d'hémolyse autour de ces colonies de *Candida tropicalis* ce qui correspond à une lyse des érythrocytes présents dans le milieu.



**Photo N°3 :** Détermination *in vitro* des zones d'hémolyse autour des colonies de *Candida tropicalis* sur gélose sabouraud dextrose agar au sang de mouton additionnée de 2,5% NaCl.

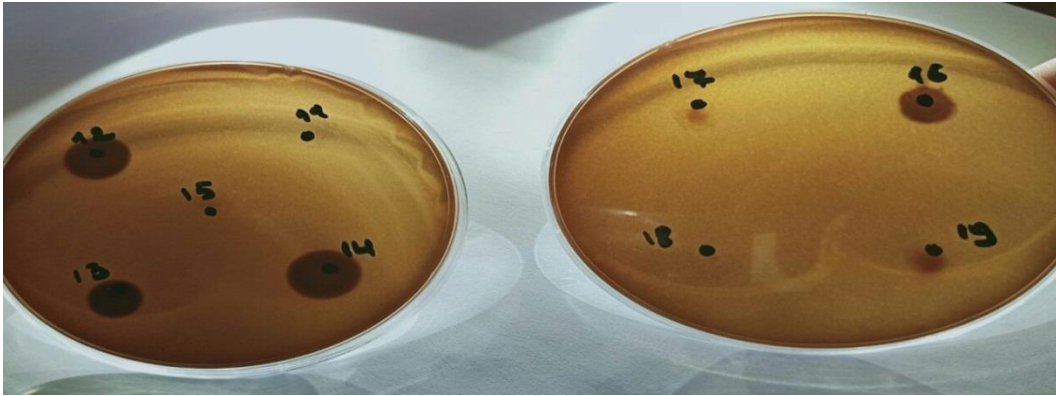
Le tableau N°3 regroupe l'ensemble des résultats que nous avons obtenu en présence de 2,5% de NaCl dans le milieu réactionnel. Nous remarquons qu'après addition de 2,5 % de NaCl à la gélose sabouraud dextrose agar au sang du mouton incubé à 37°C pendant 48h, l'activité hémolytique est maintenue pour les 9 souches de *Candida tropicalis*. Nous remarquons également que cette activité a augmenté pour 5 souches qui passent d'une activité positive à fortement positive. L'activité hémolytique dans ces conditions a augmenté en moyenne d'un facteur de 0,35.

**Tableau N°3 :** Activité hémolytique de *Candida tropicalis* en présence de 2,5% de NaCl

Souches	0 Addition		2,5% NaCl		Taux de variation en valeur absolue
	Indice Hi	Activité hémolytique	Indice Hi	Activité hémolytique	
<b>Souche 1</b>	0,8	Positive	0,571	Fortement positive	0,2862
<b>Souche 2</b>	0,9	Positive	0,529	Fortement positive	0,4122
<b>Souche 3</b>	0,8	Positive	0,357	Fortement positive	0,5537
<b>Souche 4</b>	0,8	Positive	0,538	Fortement positive	0,3275
<b>Souche 5</b>	0,7	Positive	0,571	Fortement positive	0,1842
<b>Souche 6</b>	0,8	Positive	0,692	Positive	0,135
<b>Souche 7</b>	0,8	Positive	0,8	Positive	0
<b>Souche 8</b>	0,7	Positive	0,727	Positive	0,0385
<b>Souche 9</b>	0,7	Positive	0,7	Positive	0

### 2.1.3. NaCl à 5% (poids/volume) :

Sur la photo N°4 nous remarquons que sur les 9 souches de *Candida tropicalis* 7 d'entre elles ont un halo clair autour des colonies sur la gélose additionnée de 5% 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.



**Photo N°4 :** Détermination *in vitro* des zones d'hémolyse autour des colonies de *Candida tropicalis* sur gélose sabouraud dextrose agar au sang de mouton additionnée de 5% NaCl.

Le tableau N°4 regroupe l'ensemble des résultats que nous avons obtenu en présence de 5% de NaCl dans le milieu réactionnel. Nous remarquons qu'après addition de 5% NaCl à la gélose sabouraud dextrose agar au sang du mouton incubé pendant 48h à 37°C, sur les 7 souches de *Candida tropicalis* qui gardent leur pouvoir hémolytique 4 d'entre elles ont une activité plus importante. L'activité hémolytique dans ces conditions a augmenté en moyenne d'un facteur de 0,28.

**Tableau N°4** : Activité hémolytique de *Candida tropicalis* en présence de 5% NaCl

Souches	0 Addition		5% NaCl		Taux de variation en valeur absolue
	Indice Hi	Activité hémolytique	Indice Hi	Activité hémolytique	
<b>Souche 1</b>	0,8	Positive	0,8	Positive	0
<b>Souche 2</b>	0,9	Positive	0,583	Fortement positive	0,3522
<b>Souche 3</b>	0,8	Positive	0,6	Fortement positive	0,25
<b>Souche 4</b>	0,8	Positive	0,615	Fortement positive	0,2312
<b>Souche 5</b>	0,7	Positive	0,7	Positive	0
<b>Souche 6</b>	0,8	Positive	0,777	Positive	0,0287
<b>Souche 7</b>	0,8	Positive	1	Négative	0
<b>Souche 8</b>	0,7	Positive	1	Négative	0
<b>Souche 9</b>	0,7	Positive	0,5	Fortement positive	0,2857

De l'ensemble des résultats que nous avons obtenu à ce niveau de l'étude (tableau N°5), nous remarquons que l'addition de NaCl à la gélose sabouraud au sang de mouton, induit une augmentation de l'activité hémolytique pour la plupart de nos souches. Cette augmentation varie d'un facteur de 0,43 à 0,28 lorsque la concentration de NaCl passe de 1% à 5%. Il semblerait qu'à 1% de NaCl l'activité hémolytique est la plus importante par rapport aux autres conditions expérimentales (elle augmente d'un facteur de variation moyen de 0,43). En effet, en présence de 1%NaCl, nous remarquons que sur les 9 souches de *Candida tropicalis*, 6 d'entre elles ont une activité hémolytique fortement positive. Alors qu'en présence de 2,5% de NaCl, uniquement 5 d'entre elles ont une activité hémolytique fortement positive (un facteur de variation moyen de 0,35). Tant dis qu'en présence de 5% NaCl, 4 souches de *Candida tropicalis* présentaient une activité hémolytique fortement positive avec un facteur de variation moyen de 0,28.

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.

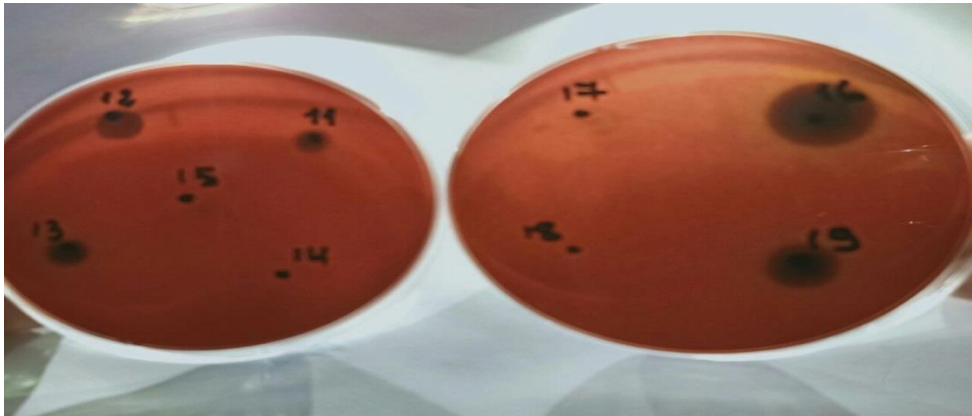
**Tableau N°5** : Effet de NaCl sur l'activité hémolytique de *Candida tropicalis*

Souches	0 Addition		1% NaCl		2,5% NaCl		5% NaCl	
	Indice Hi	Activité hémolytique	Indice Hi	Activité hémolytique	Indice Hi	Activité hémolytique	Indice Hi	Activité hémolytique
<b>Souche 1</b>	0,8	Positive	0,466	Fortement positive	0,571	Fortement positive	0,8	Positive
<b>Souche 2</b>	0,9	Positive	0,562	Fortement positive	0,529	Fortement positive	0,583	Fortement positive
<b>Souche 3</b>	0,8	Positive	0,428	Fortement positive	0,357	Fortement positive	0,6	Fortement positive
<b>Souche 4</b>	0,8	Positive	0,647	Positive	0,538	Fortement positive	0,615	Fortement positive
<b>Souche 5</b>	0,7	Positive	0,7	Positive	0,571	Fortement positive	0,7	Positive
<b>Souche 6</b>	0,8	Positive	0,411	Fortement positive	0,692	Positive	0,777	Positive
<b>Souche 7</b>	0,8	Positive	0,411	Fortement positive	0,8	Positive	1	Négative
<b>Souche 8</b>	0,7	Positive	0,687	Positive	0,727	Positive	1	Négative
<b>Souche 9</b>	0,7	Positive	0,437	Fortement positive	0,7	Positive	0,5	Fortement positive

## 2.2. Effet du chlorure de potassium (KCl) sur l'activité hémolytique des souches de *Candida tropicalis* :

### 2.2.1. KCl à 1% (poids/volume):

Sur la photo N°5 nous remarquons que sur les 9 souches de *Candida tropicalis* 8 d'entre elles ont un halo clair autour des colonies sur la gélose additionnée de 1% de de KCl. Il s'agit de zones d'hémolyse autour de ces colonies ce qui correspond à une lyse des érythrocytes présents dans le milieu.



**Photo N°5 :** Détermination *in vitro* des zones d'hémolyse autour des colonies de *Candida tropicalis* sur gélose sabouraud dextrose au sang de mouton additionnée de 1% de KCl.

Le tableau N°6 regroupe l'ensemble des résultats que nous avons obtenu en présence de 1% de KCl dans le milieu réactionnel. Les résultats ont montré qu'après addition de 1% de KCl à la gélose sabouraud dextrose au sang du mouton incubé pendant 48h à 37°C, sur les 8 souches de *Candida tropicalis* qui gardent leur pouvoir hémolytique nous remarquons qu'une 1 souche passe d'une activité positive à fortement positive. L'activité hémolytique dans ces conditions a augmenté d'un facteur moyen de 0,22.

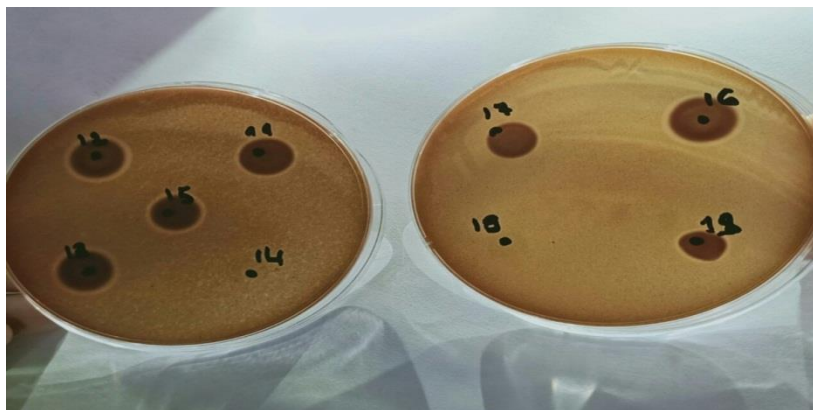


**Tableau N°6 :** Activité hémolytique de *Candida tropicalis* en présence de 1% de KCl

Souches	0 Addition		1%KCl		Taux de variation en valeur absolue
	Indice Hi	Activité hémolytique	Indice Hi	Activité hémolytique	
<b>Souche 1</b>	0,8	Positive	0,666	Positive	0,1675
<b>Souche 2</b>	0,9	Positive	0,888	Positive	0,0133
<b>Souche 3</b>	0,8	Positive	0,75	Positive	0,0625
<b>Souche 4</b>	0,8	Positive	0,8	Positive	0
<b>Souche 5</b>	0,7	Positive	0,7	Positive	0
<b>Souche 6</b>	0,8	Positive	0,733	Positive	0,0837
<b>Souche 7</b>	0,8	Positive	1	Négative	0
<b>Souche 8</b>	0,7	Positive	0,7	Positive	0
<b>Souche 9</b>	0,7	Positive	0,545	Fortement positive	0,2214

### 2.2.2. KCl à 2,5% (poids/volume)

Sur la photo N°6 nous remarquons que sur les 9 souches de *Candida tropicalis* 7 d'entre elles ont un halo clair autour des colonies sur la gélose additionnée de 2,5% de KCl. Il s'agit de zones d'hémolyse autour de ces colonies ce qui correspond à une lyse des érythrocytes présents dans le milieu.



**Photo N°6 :** Détermination *in vitro* des zones d'hémolyse autour des colonies de *Candida tropicalis* sur gélose sabouraud dextrose agar au sang de mouton additionnée de 2,5% KCl.

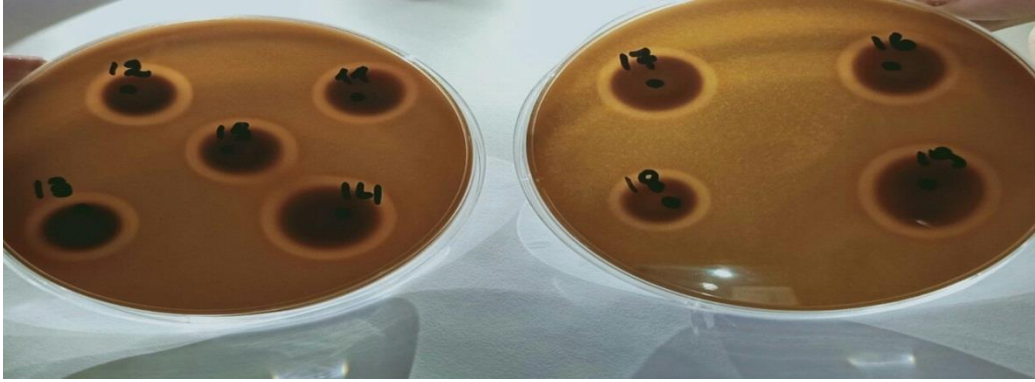
Le tableau N°7 regroupe l'ensemble des résultats que nous avons obtenu en présence de 2,5% de KCl dans le milieu réactionnel. Nous remarquons qu'après addition de 2,5 % KCl à la gélose sabouraud dextrose au sang du mouton incubé pendant 48h à 37°C, 7 souches de *Candida tropicalis* ont toujours une activité hémolytique. Nous remarquons également que cette activité a augmenté pour 4 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 0,29.

**Tableau N°7 : Activité hémolytique de *Candida tropicalis* en présence de 2,5% de KCl**

Souches	0 Addition		2,5% KCl		Taux de variation en valeur absolue
	Indice Hi	Activité hémolytique	Indice Hi	Activité hémolytique	
<b>Souche 1</b>	0,8	Positive	0,75	Positive	0,0625
<b>Souche 2</b>	0,9	Positive	0,583	Fortement positive	0,3522
<b>Souche 3</b>	0,8	Positive	0,5	Fortement positive	0,375
<b>Souche 4</b>	0,8	Positive	1	Négative	0
<b>Souche 5</b>	0,7	Positive	0,545	Fortement positive	0,2214
<b>Souche 6</b>	0,8	Positive	0,615	Fortement positive	0,2312
<b>Souche 7</b>	0,8	Positive	0,727	Positive	0,0912
<b>Souche 8</b>	0,7	Positive	1	Négative	0
<b>Souche 9</b>	0,7	Positive	0,777	Positive	0,11

### 2.2.3. KCl à 5% (poids/volume)

Sur la photo N°7 nous remarquons qu'autour de toutes les souches testées il y a un halo clair sur la gélose sabouraud au sang additionnée de 5% de KCl. Il s'agit de zones d'hémolyse autour des 9 colonies de *Candida tropicalis* ce qui correspond à une lyse des érythrocytes présents dans le milieu.



**Photo N°7 :** Détermination *in vitro* des zones d'hémolyse autour des colonies de *Candida tropicalis* sur gélose sabouraud dextrose agar au sang de mouton additionnée de 5% KCl.

Le tableau N°8 regroupe l'ensemble des résultats que nous avons obtenu en présence de 5% de KCl dans le milieu réactionnel. Nous remarquons qu'après addition de 5 % de KCl à la gélose sabouraud dextrose agar au sang du mouton incubé pendant 48h à 37°C, les 9 souches de *Candida tropicalis* ont toujours une activité hémolytique. Nous remarquons également que cette activité a augmenté pour 8 d'entre elles qui passent d'une activité positive à fortement positive. L'activité hémolytique dans ces conditions a augmenté d'un facteur de 0,31.

**Tableau N°8** : Activité hémolytique de *Candida tropicalis* en présence de 5% KCl

Souches	0 Addition		5% KCl		Taux de variation en valeur absolue
	Indice Hi	Activité hémolytique	Indice Hi	Activité Hémolytique	
<b>Souche 1</b>	0,8	Positive	0,571	Fortement positive	0,2862
<b>Souche 2</b>	0,9	Positive	0,615	Fortement positive	0,3166
<b>Souche 3</b>	0,8	Positive	0,384	Fortement positive	0,52
<b>Souche 4</b>	0,8	Positive	0,588	Fortement positive	0,265
<b>Souche 5</b>	0,7	Positive	0,5	Fortement positive	0,2857
<b>Souche 6</b>	0,8	Positive	0,5	Fortement positive	0,375
<b>Souche 7</b>	0,8	Positive	0,533	Fortement positive	0,3337
<b>Souche 8</b>	0,7	Positive	0,666	Positive	0,0485
<b>Souche 9</b>	0,7	Positive	0,625	Fortement positive	0,1071

De l'ensemble des résultats que nous avons obtenu à ce niveau de l'étude (tableau N°9), nous remarquons que l'addition de KCl à la gélose sabouraud au sang de mouton, induit une augmentation de l'activité hémolytique pour la plupart de nos souches. Cette augmentation varie d'un facteur de 0,22 à 0,31 lorsque la concentration de KCl passe de 1% à 5%. Il semblerait qu'à 5% de KCl l'activité hémolytique est la plus importante par rapport aux autres conditions expérimentales (elle augmente d'un facteur de variation moyen de 0,31). En effet, en présence de 1% KCl, nous remarquons que sur les 9 souches de *Candida tropicalis*, 1 souche a une activité hémolytique fortement positive (un facteur de variation moyen de 0,22). Alors qu'en présence de 2,5% de KCl, uniquement 4 d'entre elles ont une activité hémolytique fortement positive (un facteur de variation moyen de 0,29). Tant dis qu'en présence de 5% KCl 8 souches de *Candida tropicalis* présentaient une activité hémolytique fortement positive avec un facteur de variation moyen de 0,31.

Nos résultats ne sont pas en accord avec ceux de **Wan et coll. 2015**, qui ont observé que plus la concentration en KCl augmente plus l'activité hémolytique diminue.

**Tableau N°9** : Effet de KCl sur l'activité hémolytique de *Candida tropicalis*

Souches	0 Addition		1%KCl		2,5% KCl		5%KCl	
	Indice Hi	Activité hémolytique	Indice Hi	Activité hémolytique	Indice Hi	Activité hémolytique	Indice Hi	Activité hémolytique
<b>Souche 1</b>	0,8	Positive	0,666	Positive	0,75	Positive	0,571	Fortement positive
<b>Souche 2</b>	0,9	Positive	0,888	Positive	0,583	Fortement positive	0,615	Fortement positive
<b>Souche 3</b>	0,8	Positive	0,75	Positive	0,5	Fortement positive	0,384	Fortement positive
<b>Souche 4</b>	0,8	Positive	0,8	Positive	1	Négative	0,588	Fortement positive
<b>Souche 5</b>	0,7	Positive	0,7	Positive	0,545	Fortement positive	0,5	Fortement positive
<b>Souche 6</b>	0,8	Positive	0,733	Positive	0,615	Fortement positive	0,5	Fortement positive
<b>Souche 7</b>	0,8	Positive	1	Négative	0,727	Positive	0,533	Fortement positive
<b>Souche 8</b>	0,7	Positive	0,7	Positive	1	Négative	0,666	Positive
<b>Souche 9</b>	0,7	Positive	0,545	Fortement positive	0,777	Positive	0,625	Fortement positive

# **CONCLUSION GENERALE**

---

En Algérie, comme la majorité des pays du monde, la fréquence des infections fongiques, en particulier les candidoses dues aux espèces *Candida non albicans* a considérablement augmenté au cours des dernières années. Le développement d'alternatives de traitement pour ces infections dépend de l'étude et de la compréhension des facteurs de virulence des micro-organismes. C'est pourquoi, l'objectif de ce travail a été de déterminer l'effet de différentes concentrations de NaCl et de KCl sur la production d'hémolyse chez *Candida tropicalis*.

Les résultats que nous avons obtenus montrent que :

- L'addition de NaCl induit une augmentation de l'activité hémolytique qui varie d'un facteur de 0,43 à 0,28 lorsque la concentration de NaCl passe de 1% à 5%. Par conséquent c'est en additionnant 1% de NaCl que l'activité est la plus importante.
- De même l'addition de KCl induit une augmentation de l'activité hémolytique qui varie d'un facteur de 0,22 à 0,31 lorsque la concentration de KCl passe de 1% à 5%. Par conséquent c'est à 5% de KCl que l'activité hémolytique est la plus importante.

Par conséquent la présence de NaCl et KCl dans le milieu semble augmenter le pouvoir hémolytique de *Candida tropicalis*.

Pour donner une suite au présent 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 CaCl<sub>2</sub> et MgCl<sub>2</sub>
- D'élargir l'étude avec d'autres enzymes lytiques tels que les phospholipases et les estérases.

# **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

---



1. **Alloue Wazé Aimée Mireille., Aguedo Mario., Destain Jacqueline., Ghalfi Hakim., Christophe Blecker., Wathelet Jean-Paul., Thonart Philippe (2008)** Les lipases immobilisées et leurs applications. *Biotechnol. Agron. Soc.*12 (1), 57-68.
2. **Aloulou, A., Rahier, R., Arhab, Y., Noiriél, A., and Abousalham, A. (2018)** Phospholipases : An Overview Methods in Molecular Biology, 69-105.
3. **Anil, S., Hashem, M., Vellappally, S., Patil, S., Bandara, H. M. H. N., & Samaranayake, L. P. (2014)** Sub-inhibitory Concentrations of Antifungals Suppress Hemolysin Activity of Oral *Candida albicans* and *Candida tropicalis* Isolates from HIV-Infected Individuals. *Mycopathologia*, 178 (3-4), 207-215.
4. **Ann Chai, L.Y., Denning, D.W., & Warn, P. (2010)** *Candida tropicalis* human disease. *Critical Reviews in Microbiology*, 36 (4), 282-298.
5. **Arhab, Y. (2018)** Caractérisation structurale et fonctionnelle des phospholipases D. Thèse de doctorat. Université Claude Bernard Lyon 1.
6. **Barman, A., Gohain, D., Bora, U., and Tamuli, R. (2018)** Phospholipases play multiple cellular roles including growth, stress tolerance, sexual development, and virulence in fungi. *Microbiological Research*, 209, 55-69.
7. **Bhattacharjee, P. (2016)** Epidemiology and antifungal susceptibility of *Candida* species in a tertiary care hospital, Kolkata, India. *Current Medical Mycology*, 2(2), 20-27.
8. **Borchert, E., Selvin, J., Kiran, S. G., Jackson, S. A., O’Gara, F., & Dobson, A. D. W. (2017)** A Novel Cold Active Esterase from a Deep Sea Sponge *Stelletta normani* Metagenomic Library. *Frontiers in Marine Science*, 4.
9. **Cassone, A., Vecchiarelli, A., & Hube, B. (2016)** Aspartyl Proteinases of Eukaryotic Microbial Pathogens: From Eating to Heating. *PLOS Pathogens*, 12(12), e1005992.
10. **Castillo, G.D.V., Azcurra, A.I., Sotomayor, C.E. (2019)** Lipasas de especies *Candida* : una revisión sobre aspectos bioquímicos, moleculares y patogénicos. *Revista de La Facultad de Ciencias Médicas de Córdoba*, 76 (2), 107.
11. **Cordeiro, R.d.A., Oliveira, J.S.d., Castelo-Branco, D.d.S.C.M., Teixeira, C.E.C., Marques, F.J.d.F., Bittencourt, P.V., ... Rocha, M.F.G. (2014)** *Candida tropicalis* isolates obtained from veterinary sources show resistance to azoles and produce virulence factors. *Medical Mycology*, 53 (2), 145-152.
12. **Deorukhkar, S.C., Roushani, S. (2017)** Traits de virulence contribuant à la pathogénicité des espèces de *Candida*. *J Microbiol Exp* 5 (1): 00140.
13. **Deorukhkar, S.C., Saini, S. (2015)** Candidiasis: Past, present, future. *Int J Infect Trop Dis* 2: 12-24.

14. **Deorukhkar, S.C., Saini, S., & Mathew, S. (2014)** Virulence Factors Contributing to Pathogenicity of *Candida Tropicalis* and Its Antifungal Susceptibility Profile. *International Journal of Microbiology*, 2014,1- 6.
15. **El Zawawy Nessma Ahmed, Hafez ElSayed (2017)** Efficacy of *Pluchea Dioscoridis* Leaf Extract Against Pathogenic *Candida Albicans*. *Journal of infection in developing countries*.11 (4): 334-342.
16. **Favero, D., Franca, E. J. G., Furlaneto-Maia, L., Quesada, R. M. B., & Furlaneto, M.C. (2011)** Production of haemolytic factor by clinical isolates of *Candida tropicalis*. *Mycoses*, 54(6), e816-e820.
17. **Fernandes, L., Oliveira, A., Henriques, M., & Rodrigues, M. E. (2020)** Honey as a Strategy to Fight *Candida tropicalis* in Mixed –Biofilms with *Pseudomonas aeruginosa* Antibiotics, 9 (2), 43.
18. **Gascer A, Stehr F, Kroger C, Kredics L, Schafer W, Nosanchuk J (2007)** Lipase 8 affects the pathogenesis of *Candida albicans*. *Infect Immun* 75(10), 4710-4717.
19. **Giolo, M. P., and Svidzinski, T. I. E. (2010)** Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia. *Journal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 46(3), 225-234.
20. **Gogol, M., Bochenska, O., Zawrotniak, M., Karkowska-Kuleta, J., Zajac, D., et Rapala-Kozik, M. (2017)** Rôles des protéases aspartiques de *Candida albicans* dans les interactions hôte-pathogène. *Aspects physiopathologiques des protéases*, 353–380.
21. **GÜRCÜOĞLU, E., ENER, B., AKALIN, H., SINIRTAŞ, M., EVCI, C., AKÇAĞLAR, S., ... HEPER, Y. (2010)** Epidemiology of nosocomial candidaemia in a university hospital: a 12-year study. *Epidemiology and Infection*, 138(09), 1328–1335.
22. **Hartz Alves, S., Pipolo Milan, E., de Laet Sant’Ana, P., Oliveira, L. O., Santurio, J. M., & Lopes Colombo, A. (2002)** Hypertonic sabouraud broth as a simple and powerful test for *Candida dubliniensis* screening. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 43(1), 85–86.
23. **Hermann, P., Forgács, K., Gál, E., Lenkey, B., Nagy, G., & Rozgonyi, F. (2003)** Effects of alkali metal ions on some virulence traits of *Candida albicans*. *Folia Microbiologica*, 48(2), 173–176.
24. **Hinkle, C. (2011)** Electrolyte Disorders in the Cardiac Patient. *Critical Care Nursing Clinics of North America*, 23(4), 635–643.

25. Jeeves, R. E., Mason, R. P., Woodacre, A., & Cashmore, A. M. (2011) Ferric reductase genes involved in high-affinity iron uptake are differentially regulated in yeast and hyphae of *Candida albicans*. *Yeast*, 28(9), 629–644.
26. KERVIEL, V. (2014) Clonage et caractérisation de deux gènes codant des enzymes lipolytiques de la microalgue *Isochrysis galbana*. thèse de doctorat. Université Nantes Angers Le Mans.
27. Khan, M. S., Ahmad, I., Cameotra, S. S., & Botha, F. (2014) Sub-MICs of *Carum copticum* and *Thymus vulgaris* influence virulence factors and biofilm formation in *Candida spp.* *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14(1).
28. Kothavade, R. J., Kura, M. M., Valand, A. G., & Panthaki, M. H. (2010) *Candida tropicalis*: its prevalence, pathogenicity and increasing resistance to fluconazole. *Journal of Medical Microbiology*, 59 (8), 873-880.
29. Kumar, A. G., Nagesh, N., Prabhakar, T. G., & Sekaran, G. (2008) Purification of extracellular acid protease and analysis of fermentation metabolites by *Synergistes sp.* utilizing proteinaceous solid waste from tanneries. *Bioresource Technology*, 99(7), 2364–2372.
30. Liamis, G., Rodenburg, E. M., Hofman, A., Zietse, R., Stricker, B. H., & Hoorn, E. J. (2013). Electrolyte Disorders in Community Subjects: Prevalence and Risk Factors. *The American Journal of Medicine*, 126(3), 256–263.
31. Lin, C.-J., Wu, C.-Y., Yu, S.-J., & Chen, Y.-L. (2018) Protein Kinase A governs growth and virulence in *Candida tropicalis*. *Virulence*, 9 (1), 311-347.
32. Mane, A., Gaikwad, S., Bembalkar, S., & Risbud, A. (2011) Increased expression of virulence attributes in oral *Candida albicans* isolates from human immunodeficiency virus-positive individuals. *Journal of Medical Microbiology*, 61(2), 285–290.
33. Massou, S., Ahid, S., Azendour, H., Bensghir, M., Mounir, K., Iken, M., Lmimouni, B.E., Balkhi, H., Drissi, K.N., Haimeur, C. (2013) Les candidoses systémiques en réanimation médicale : analyse des facteurs de risque et intérêt de l'index de colonisation. *Pathologie Biologie*, 61 : (3), 108-112.
34. Munoz, P., Giannella, M., Fanciulli, C., Guinea, J., Valerio, M., Rojas, L., ... Bouza, E. (2011) *Candida tropicalis* fungaemia: incidence, risk factors and mortality in a general hospital. *Clinical Microbiology and Infection*, 17(10), 1538–1545.
35. Muthamil, S., & Karutha Pandian, S. (2016) Inhibitory effect of *Murraya koenigii* against *Candida albicans* virulence and biofilm development. *Biologia*, 71(3).

36. **Nayak, A. P., Green, B. J., & Beezhold, D. H. (2013)** Fungal hemolysins .Medical Mycology, 51(1), 1-16.
37. **Negri, M.F.N. (2011)** Insights into *Candida tropicalis* virulence factors.These doctoral.Minho University.
38. **Noumi, E., Snoussi, M., Hentati, H., Mahdouani, K., del Castillo, L., Valentin, E., ... Bakhrouf, A. (2010)** Adhesive Properties and Hydrolytic Enzymes of Oral *Candida albicans* Strains. Mycopathologia, 169(4), 269–278.
39. **Oliveira, A. C. D., Fernandes, M. L., & Mariano, A. B. (2014)** Production and characterization of an extracellular lipase from *Candida guilliermondii*. Brazilian Journal of Microbiology, 45(4), 1503–1511.
40. **Pandey, N., Gupta, M. K., & Tilak, R. (2018)** Extracellular hydrolytic enzyme activities of the different *Candida spp.* isolated from the blood of the Intensive Care Unit-admitted patients. Journal of Laboratory Physicians, 10 (4), 392-396.
41. **Patil, A.H., Datta, K.K., Behera, S.K., Kasaragod, S., Pinto, S.M., Koyangana, S.G., ... Prasad, T.S.K. (2018)** Dissecting Candida Pathobiology: Post-Translational Modifications on the *Candida tropicalis* Proteome.OMICS : A Journal of Integrative Biology, 22 (8),544-552.
42. **Ramos, L. S., Branquinha, M. H., & Santos, A. L. S. (2016)** Different classes of hydrolytic enzymes produced by multidrug-resistant yeasts comprising the *Candida haemulonii* complex.Medical Mycology, 55 (2), 228-232.
43. **Sachin, C.D., Ruchi, K., Santosh, S. (2012)** In vitro evaluation of proteinase: Phospholipase and haemolysin activities of *Candida* species isolated from clinical specimens. International Journal of Medicine and Biomedical Research 1(2 ):153-157.
44. **Sanitá, P. V., Zago, C. E., Mima, E. G. de O., Pavarina, A. C., Jorge, J. H., Machado, A. L., & Vergani, C. E. (2014)** In vitro evaluation of the enzymatic activity profile of *non-albicans Candida* species isolated from patients with oral candidiasis with or without diabetes. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology, 118(1), 84–91.
45. **Sardi, J. C. O., Mendes Giannini, M. J. S., Bernardi, T., Scorzoni, L., & Fusco-Almeida, A. M. (2013)** *Candida species*: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. Journal of Medical Microbiology , 62 (1),10-24.
46. **Serefhanoglu, K., Timurkaynak, F., Can, F., Cagir, U., Arslan, H., & Ozdemir, F.N. (2012)** Risk factors for candidemia with non-albicans *Candida spp.*in intensive care unit

patients with end-stage renal disease on chronic hemodialysis. *Journal of the Formosan Medical Association*, 111(6), 325-332.

47. Shapiro, R. S., Sellam, A., Tebbji, F., Whiteway, M., Nantel, A., & Cowen, L. E. (2012) Pho85, Pcl1, and Hms1 Signaling Governs *Candida albicans* Morphogenesis Induced by High Temperature or HSP90 Compromise. *Current Biology*, 22 (6), 461-470.
48. Sharma, Y., Chumber, S.K., Kaur, M. (2017) Studying the Prevalence, Species Distribution, and Detection of In vitro Production of phospholipase from *Candida* Isolated from Cases of Invasive Candidiasis. *Journal of global infectious diseases*. 9(1), 8-11.
49. Silva, S., Negri, M., Henriques, M., Oliveira, R., Williams, D. W., & Azeredo, J. (2012) *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis* : biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, 36(2), 288-305.
50. Stauch, B., Fisher, S. J., & Cianci, M. (2015) Open and closed states of *Candida antarctica* lipase B: protonation and the mechanism of interfacial activation. *Journal of Lipid Research*, 56(12), 2348–2358.
51. Thierry, A., Collins, Y. F., Abeijón Mukdsi, M. C., McSweeney, P. L. H., Wilkinson, M. G., & Spinnler, H. E. (2017) Lipolysis and Metabolism of Fatty Acids in Cheese. *Cheese*, 423-444.
52. Treviño-Rangel, R. de J., Boddén-Mendoza, B. A., Montoya, A. M., Villanueva-Lozano, H., Elizondo-Zertuche, M., Robledo-Leal, E., & González, G. M. (2018) Phenotypical characterization and molecular identification of clinical isolates of *Candida tropicalis* .*Revista Iberoamericana de Micología*, 35(1), 17-21.
53. Tsang, C. S. P., Chu, F. C. S., Leung, W. K., Jin, L. J., Samaranayake, L. P., & Siu, S. C. (2007) Phospholipase, proteinase and haemolytic activities of *Candida albicans* isolated from oral cavities of patients with type 2 diabetes mellitus. *Journal of Medical Microbiology*, 56(10), 1393–1398.
54. 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: JCDR*, 8(11), DC15–DC17.
55. Velkova, K., & Sychrova, H. (2006) The *Debaryomyces hansenii* NHA1 gene encodes a plasma membrane alkali-metal-cation antiporter with broad substrate specificity. *Gene*, 369, 27–34.
56. Wan, L., Luo, G., Lu, H., Xuan, D., Cao, H., & Zhang, J. (2015) Changes in the hemolytic activity of *Candida species* by common electrolytes. *BMC Microbiology*, 15(1).

- 57. Williams D.W., Kuriyama T., Silva, S., Malic, S., & Lewis M.A.O. (2011)** *Candida* biofilms and oral candidosis: Treatment and prevention. *Periodontology* 2000 ; 55(1) :250-265.
- 58. Yigit, N., & Aktas, E. (2009)** Comparison of the efficacy of different blood medium in determining the hemolytic activity of *Candida* species. *Journal de Mycologie Médicale*, 19(2), 110–115.
- 59. Zuza-Alves, D.L., Silva-Rocha, W.P.,Chaves, G.M.(2017)** An Update on *Candida tropicalis* Based on Basic and Clinical Approaches.*Frontiers in Microbiology*,8 :1927.

**ملخص :** دراسة تأثير الشوارد على إنتاج الإنزيمات المحللة لبعض سلالات *Candida tropicalis* حدوث وانتشار الالتهابات الفطرية *Candida tropicalis* ازدادت على الصعيد العالمي وبالتالي تأكيد ان هذا الكائن الحي ممرض انتهازى. يرتبط تطور عدوى الخميرة بعدة عوامل ضراوة بما في ذلك إنتاج hémolysine الذي يحلل كريات الدم الحمراء لتحرير الحديد المستخدم كمصدر غذائي من قبل الخلايا الفطرية.

في هذا السياق أجرينا هذه الدراسة التي تهدف لتحقيق من تقييم تأثير NaCl و KCl على إنتاج hémolysine في سلالات *Candida tropicalis*

تشير النتائج التي تم الحصول عليها إلى أن إضافة NaCl و KCl يؤدي إلى زيادة في النشاط الانحلالي *Candida tropicalis* عندما ينتقل تركيز الملح من 1% إلى 5%.

**الكلمات المفتاحية :** *Candida tropicalis* ، الالتهابات الفطرية ، ضراوة ، hémolysine ، NaCl ، KCl.

**Résumé :** Etude de l'effet des électrolytes sur la production d'enzymes lytiques par quelques souches de *Candida tropicalis*.

L'incidence et la prévalence des infections fongiques dues aux levures *Candida tropicalis* ont largement augmenté à l'échelle mondiale affirment ainsi cet organisme comme un pathogène opportuniste. Le développement de ces mycoses est lié à plusieurs facteurs de virulences dont la production d'hémolysine qui dégrade les érythrocytes de l'hôte pour libérer le fer utilisé comme source de nutriment par les cellules fongiques. Dans ce contexte nous avons entrepris d'évaluer l'effet du NaCl et KCl sur la production d'hémolysine chez les souches de *Candida tropicalis*.

Les résultats obtenus indiquent que l'addition de NaCl et de KCl induit une augmentation de l'activité hémolytique chez *Candida tropicalis* lorsque la concentration en sel passe de 1% à 5%.

**Mots clés :** *Candida tropicalis*, infections fongiques, virulence, hémolysine, NaCl , KCl.

**Summary :** Study of the effect of electrolytes on the production of lytic enzymes by some strains of *Candida tropicalis*.

The incidence and prevalence of fungal infections due to *Candida tropicalis* yeast have greatly increased worldwide, thus affirming this organism as an opportunistic pathogen. The development of these mycoses is linked to several virulence factors, including the production of hemolysin, which breaks down the host's erythrocytes to release the iron used as a nutrient source by the fungal cells. In this context, we undertook to evaluate the effect of NaCl and KCl on hemolysin production in strains of *Candida tropicalis*.

The results obtained indicate that the addition of NaCl and KCl induces an increase in hemolytic activity in *Candida tropicalis* when the salt concentration increases from 1% to 5%.

**Keywords :** *Candida tropicalis*, fungal infections, virulence, haemolysin, NaCl , KCl.