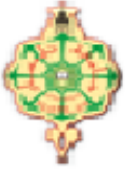


REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE ABOU-BEKR BELKAÏD –TLEMCEEN-



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

Département de Biologie

Laboratoire

Antibiotiques Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique

**Mémoire présenté**

En vue de l'obtention du

**Diplôme de Master**

En Biochimie

Présentée par

**M<sup>elle</sup> BERDEG Hanane**

**Recherche de lien potentiel entre l'expression de l'activité des  
enzymes hydrolytiques et le pouvoir de former les biofilms chez  
les souches cliniques de *Candida albicans***

**Soutenu le : 08/07/2020, Devant le jury :**

<b>Présidente</b>	M <sup>me</sup> Boucherit-Otmani Zahia	Professeur	Université de Tlemcen
<b>Encadreur</b>	M <sup>r</sup> Seddiki Sidi Mohammed Lahbib	MCA	Centre universitaire de Naâma
<b>Examineur</b>	M <sup>r</sup> Seghir Abdelfettah	MCA	Centre universitaire d'Ain-Temouchent

**Année Universitaire : 2019 – 2020**

## *Remerciements*

Ce travail a été réalisé avec l'aide d'Allah, le tout puissant, qui m'a donné la patience et la volonté pour terminer ce mémoire.

J'aimerais remercier mon encadreur, M<sup>r</sup> **Seddiki Mohammed**, Maitre de conférences A, au centre universitaire de Naâma, pour l'intéressant sujet qu'il m'a proposé, pour son soutien continu et pour sa disponibilité tout au long de la réalisation de ce mémoire, je veux lui exprimer ma gratitude.

Je veux remercier aussi M<sup>me</sup> **Boucherit-Otmani Zahia**, Professeur au département de biologie, Faculté des Sciences de la nature et de la vie, Sciences de la terre et de l'univers, Université de Tlemcen, pour avoir accepté de présider le jury de ce mémoire.

Mes remerciements s'adresse également à M<sup>r</sup> **Seghir Abdelfettah**, Maitre de conférences classe A, au Centre universitaire de Ain-Temouchent, qui m'a fait l'honneur de jugé le contenu de ce mémoire.

Mes sincères remerciements vont à M<sup>elle</sup> **Tefiani Ikram**, Doctorante au laboratoire «LapSap» pour tous ses efforts, son aide et ses encouragements pendant la réalisation de ce travail.

Merci à chaque personne du laboratoire « LapSap » ayant donné du temps, de l'aide et des conseils d'encouragement.

## *Dédicace*

*Je dédie ce modeste travail*

*À deux personnes vraiment très chers à mon cœur, mon père et ma mère qui  
m'ont accompagné et m'ont soutenu depuis mes débuts d'enfance jusqu'à  
l'achèvement de ce travail.*

*À mon cher frère et mes sœurs*

*À toute ma famille*

*À chaque personne qui me donne du courage et du soutien morale*

*Hanane*

## ملخص

*Candida albicans* هي خميرة متعايشة موجود في أجزاء عديدة من أجسامنا، ولكن تحت ظروف معينة تصبح هذه الأخيرة مسببة للأمراض ويمكن أن تسبب داء المبيضات تحت تأثير العديد من عوامل العدائية، خاصة إفراز إنزيمات الإماهة وتشكيل الأغشية الحيوية.

في هذا العمل بحثنا عن وجود صلة محتملة بين هذين العاملين العدائين. أولاً، اختبرنا الأنشطة المائية لثلاثة إنزيمات *Estérase*، *Protéase*، *Phospholipase* من ناحية أخرى، قمنا باختبار قوة تكوين الأغشية

الحوية عند سلالات *C. albicans* ثانياً، اختبرنا نفس الأنشطة الإنزيمية عند خلايا *C. albicans* في وضع الأغشية الحيوية.

أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها زيادة في قوة التحلل البروتيني في جميع خلايا الأغشية الحيوية مقارنة بالخلايا الحرة. بالنسبة لنشاط *Phospholipase*، أظهرت السلالات *A01*، *A06* و *A14* فقط زيادة في وضع الأغشية الحيوية مقارنةً بنظيراتها في الوضع الحر. بينما لوحظ انخفاض في نشاط *Estérase* عند السلالة المرجعية

*C. albicans ATCC 10231* وكذلك في السلالات *A06* و *A11*.

في الختام، يبدو أن تشكيل الأغشية الحيوية لسلالات *C. albicans* يؤثر بشكل إيجابي على الأنشطة المائية *Protease* و *Phospholipase* من ناحية أخرى، يتأثر نشاط *Estérase* بشكل سلبي بتشكيل الأغشية الحيوية.

الكلمات المفتاحية: *Candida albicans*، الإنزيم المائي، *Estérase*، *Protéase*، *Phospholipase*،

الغشاء الحيوي.

## Résumé

*Candida albicans* est une levure saprophyte présente dans plusieurs parties de notre corps, mais dans certaines conditions celle-ci devient pathogène et peut provoquer une candidose sous l'action de plusieurs facteurs de virulence, la sécrétion d'enzymes hydrolytiques et la formation de biofilm, notamment.

Dans ce travail, nous avons recherché l'existence d'un lien possible entre ces deux facteurs de virulence. Tout d'abord, nous avons testé les activités hydrolytiques de trois enzymes, la phospholipase, la protéase et l'estérase, d'une part. D'autre part, nous avons testé le pouvoir de formation des biofilms chez les souches de *C. albicans*. Dans un second temps, nous avons testé les mêmes activités enzymatiques chez les cellules sessiles de *C. albicans*, en mode biofilm.

Les résultats obtenus ont montré une augmentation du pouvoir protéolytique chez toutes les cellules sessiles par rapport aux cellules planctoniques. Pour l'activité phospholipase, seules les souches sessiles de A01, A06 et A14 ont présenté une augmentation par rapport à leurs homologues planctoniques; tandis qu'une diminution de l'activité estérase chez la souche de référence *C. albicans* ATCC 10231 ainsi que chez les souches A06 et A11 a été observée.

En conclusion, la formation de biofilms des souches de *C. albicans* semble influencer positivement les activités hydrolytiques phospholipase et protéase. En revanche, l'activité estérase est influencée de façon négative par la formation des biofilms.

**Mots clés :** *Candida albicans*, enzyme hydrolytique, phospholipase, protéase, estérase, biofilm.

## Abstract

*Candida albicans* is a saprophytic yeast present in several parts of our body, but under certain conditions it becomes pathogenic and can cause candidiasis under the action of several virulence factors, the secretion of hydrolytic enzymes and the formation of biofilm, especially.

In this work, we looked for the existence of a possible link between these two virulence factors. First, we tested the hydrolytic activities of three enzymes, phospholipase, protease and esterase, on the one hand. On the other hand, we tested the power of biofilm formation in strains of *C. albicans*. Second, we tested the same enzymatic activities in sessile cells of *C. albicans*, in biofilm mode.

The results obtained showed an increase in proteolytic power in all sessile cells compared to planktonic cells. For phospholipase activity, only the sessile strains of A01, A06 and A14 showed an increase compared to their planktonic counterparts; whereas a decrease in the esterase activity in the reference strain *C. albicans* ATCC 10231 as well as in the strains A06 and A11 was observed.

In conclusion, the formation of biofilms of *C. albicans* seems to positively influence the hydrolytic activities phospholipase and protease. However, the esterase activity is negatively influenced by the formation of biofilms.

**Key words:** *Candida albicans*, hydrolytic enzyme, phospholipase, protease, esterase, biofilm.

# Sommaire

<b>Première partie : Synthèse bibliographique</b>	1
<b>Deuxième partie : Matériel et méthodes</b>	7
<b>1. Repiquage des souches</b>	8
<b>2. Préparation des inocula</b>	8
<b>3. Formation de biofilm chez les souches de <i>C. albicans</i></b>	8
<b>4. Activités enzymatiques en mode planctonique</b>	9
<b>4.1. Activité phospholipase</b>	10
<b>4.2. Activité protéase</b>	10
<b>4.3. Activité estérase</b>	11
<b>5. Activités enzymatiques en mode sessile</b>	11
<b>Troisième partie : Résultats et discussion</b>	13
1. Formation de biofilm chez les souches de <i>C. albicans</i>	14
2. Activités enzymatiques en mode planctonique	15
3. Activités enzymatiques en mode sessile	18
<b>Quatrième partie : Conclusion</b>	21
<b>Cinquième partie : Références bibliographiques</b>	23

*Première partie*

*Synthèse bibliographique*



Les candidoses dues à *Candida albicans* sont un problème majeur associé à une mortalité importante qui affecte 15% des patients hospitalisés. Les signes cliniques de telles infections apparaissent tardivement, ce qui les rendent difficiles à diagnostiquer [(Vandijck et al., 2008) ; (Falagas et al., 2010) ; (Seddiki et al., 2013)].

L'incidence des infections fongiques a augmenté en raison du nombre croissant des patients immunodéprimés et l'utilisation généralisée d'antibiotiques (Aktas et al., 2002).

*C. albicans* est une levure opportuniste retrouvée sur les muqueuses buccales, vaginales et intestinales, sur la peau d'une personne en bonne santé. Cependant, l'initiation d'une candidose disséminée nécessite le franchissement des cellules épithéliales des muqueuses et l'invasion des tissus profonds de l'hôte [(Sardi et al., 2013) ; (Stefanie et al., 2018)]. La formation des hyphes, induite par la formation des biofilms, ainsi que la sécrétion des enzymes hydrolytiques, particulièrement les protéases, les phospholipases et les estérases, rendent faciles l'invasion de *C. albicans* [(Develoux et Bretagne, 2005) ; (Bochenska et al., 2016)].

*C. albicans* présente une activité phospholipase très élevée (Barret-Bee et al., 1985). Ces enzymes sont susceptibles de contribuer à la pathogénie de cette espèce en endommageant les membranes des cellules hôtes pour faciliter l'invasion des tissus ; elles catalysent l'hydrolyse des liaisons esters des glycérophospholipides, elles sont classées en quatre groupes, phospholipase « A1, A2 » ; B ; C ; D [(Hube et al., 1997) ; (Leidich et al., 1998) ; (De Bernardis et al., 1999)].

Les protéases, actifs au pH acides, catalysent l'hydrolyse des liaisons peptidiques; elles sont responsables de la dégradation des protéines [(Hruskova-Heidingsfeldova, 2008); (Barret et al., 1991)].

Ces enzymes sont capables de dégrader les protéines des barrières épithéliales et muqueuses telle que l'albumine, le collagène, la kératine et la mucine ainsi que des anticorps et des cytokines [(Cassone et al., 1987) ; (Sanglard et al., 1997) ; (Watts et al., 1998)].

Les protéases aspartiques sécrétées (SAPs) constituent une famille d'enzymes de 10 protéines, de tailles différentes allant de 35 à 50 kDa, qui sont contrôlées par 10 gènes différents (Naglik et al., 2014).

Ces enzymes semblent jouer différents rôles dans l'infection à *C. albicans* et contribuent à sa virulence en favorisant l'adhésion, la formation des hyphes et l'évasion du système immunitaire [(Naglik et al., 2003); (Schaller et al., 2005); (Calderone et al., 2011)].

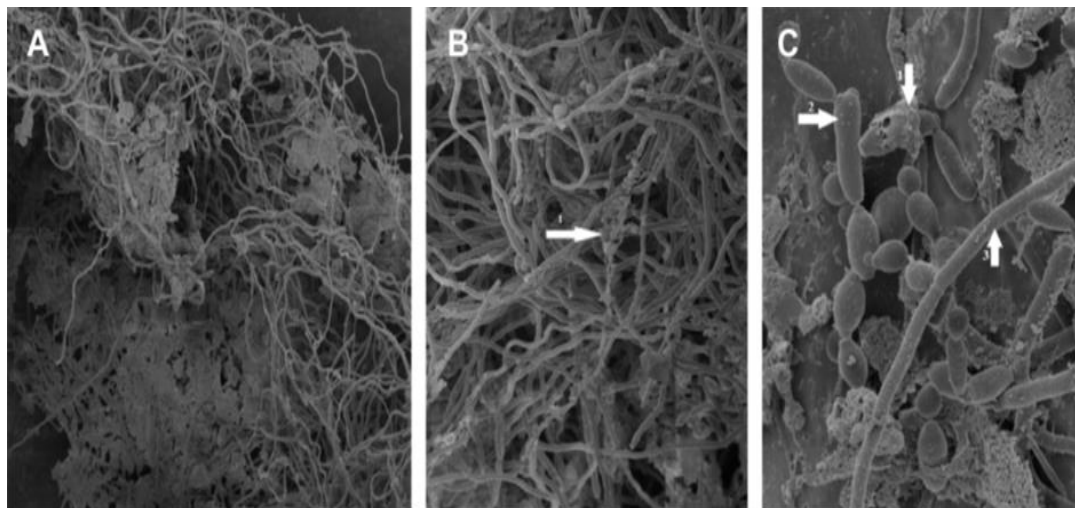
En effet, *SAP1* et *SAP3* sont impliquées dans la transition phénotypique de *C. albicans*, *SAP2* est impliquée dans la croissance, *SAP4* à *SAP6* sont impliquées dans la formation des hyphes [(Naglik et al., 2003) ; (Hube et al., 2001)]. Alors que *SAP9* et *SAP10*, des endo-enzymes, jouent un rôle de maintien de l'intégrité de la surface cellulaire et contribuent au processus d'adhésion [(Naglik et al., 2003) ; (Copping et al., 2005) ; (Albrecht et al., 2006)].

Les estérases, quant à elles, se caractérisent par leurs capacités à catalyser l'hydrolyse des liaisons esters des monoglycérides, diglycérides et triglycérides. Elles hydrolysent préférentiellement des substrats hydrosolubles contenant des chaînes courtes d'acides gras [(Hruskova-Heidingsfeldova, 2008) ; (Schaller et al., 2005)].

La pathogénie de *C. albicans* se complique par la formation des biofilms hautement structurés, composés de plusieurs types de cellules (Nobile et Johnson, 2015). En effet, les biofilms de *C. albicans* se composent d'un réseau dense de levure

(blastospore) et des formes filamenteuses d'hyphes et pseudohyphes (Figure N°1) [(Chandra et al., 2001) ; (Seddiki et al., 2013)].

Il est fermement établi que la formation des biofilms représente un facteur de virulence majeur pendant la candidose (Wall et al., 2019).



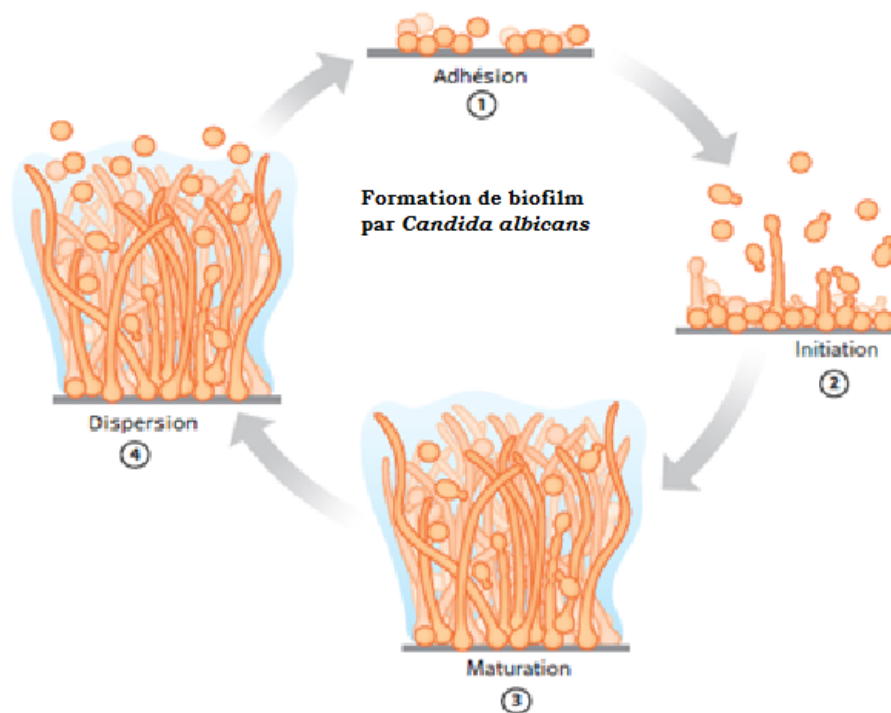
**Figure N° 1.** Microscopie électronique à balayage d'un mélange de formes morphologiques de biofilm de *Candida albicans* développé sur la surface interne d'un cathéter veineux central. Grossissement : (A)  $\times 450$ ; (B)  $\times 1100$ ; (C)  $\times 4500.1$  = Matrice extracellulaire ; 2 = pseudohyphe ; 3 = hyphe) (Seddiki et al., 2013).

La formation des biofilms de *C. albicans* se déroule selon un ordre bien établi; trois phases principales la caractérisent. La première phase est l'adhésion des cellules de *C. albicans* sur une surface médiée par des interactions non spécifiques, telles que l'hydrophobicité et les forces électrostatiques entre les cellules et le substrat [(Samaranayake et MacFarlane, 1990) ; (Donlan et Costerton, 2002)].

Des molécules spécifiques sont ensuite exprimées pour faciliter une adhésion plus forte à la surface. La phase suivante se caractérise par la formation des micro-colonies et la synthèse d'une matrice extracellulaire. Elle est suivie par la phase de maturation, c'est l'étape final de formation d'un biofilm complet; celui-ci englobe un

réseau complexe de blastospores, de pseudohyphes et des hyphes contribuant à la stabilité de l'architecture du biofilm (Gulati et Nobile, 2016).

Une autre phase peut être distinguée, celle de dispersion du biofilm. Elle se caractérise par le détachement de légères parties du biofilm en réponse aux conditions hydrodynamiques qui se dispersent dans le milieu environnant où elles peuvent coloniser d'autres portions de la surface [(de Andrade Pinho Medeiros, 2017) ; (Seneviratne et al., 2008)].



**Figure N° 2.** Étapes de la formation du biofilm de *Candida albicans*. (Nobile et al., 2015).

Par ailleurs, la pathogénie de *C. albicans* due à l'activité hydrolytique et la production de biofilm semblent être des facteurs de virulences importants chez cette espèce (Gokce et al., 2007). Ces données suggèrent que la recherche de potentiel lien entre

eux peut aider à mieux comprendre la pathogénie de *C. albicans* pour lutter contre les infections de cette levure.

Pour ces raisons, nous nous sommes fixés les objectifs suivants :

- Tester l'activité hydrolytique chez les souches de *C. albicans*.
- Évaluer la formation de biofilm chez ces souches.
- Rechercher l'existence de lien entre la formation des biofilms de *C. albicans* et leurs activités hydrolytiques.

*Deuxième partie*

*Matériel et méthodes*

### 1. Repiquage des souches

Une collection de sept souches de *Candida albicans* du laboratoire de recherche Antibiotique Antifongique : physico-chimie, synthèse et activité biologique, sont utilisées dans cette étude.

Une souche de référence, *Candida albicans* ATCC 10231, est également utilisée pour le contrôle interne.

Un repiquage des souches est réalisé sur le milieu Sabouraud pour avoir des cellules de levures jeunes.

### 2. Préparation des inocula

Les inocula sont préparés dans le milieu Sabouraud liquide (18 à 24 heures). Puis, une centrifugation est réalisée (3000g, 4 °C, 5 min) ; le culot est lavé trois fois par le tampon phosphate stérile (PBS ; pH 7,4). Un dénombrement cellulaire est effectué à l'aide d'une chambre de comptage de Thoma afin d'ajuster le nombre à 10<sup>6</sup>cellules/mL (Marcos-Zambrano et al., 2014).

### 3. Formation de biofilm

La formation des biofilms par les souches utilisées de *C. albicans* est effectuée par la méthode de micro-titration selon les protocole de (Marcos-Zambrano et al., 2014). Les puits des microplaques stériles, aux fonds plats, sont inoculés en plaçant 100 µL de l'inoculum (10<sup>6</sup> cellules/mL), préalablement préparé, un contrôle négative est préparer en ajoutant 100 µL du milieu RPMI 1640; les microplaques sont ensuite incubés à 37°C pendant 24heures.

Afin d'éliminer les cellules non adhérentes, les puits de la microplaque sont rincés deux fois par le PBS stérile ; ensuite 100 µL de méthanol sont ajoutés dans chaque puits et laissés 15 minutes à la température du laboratoire afin de maintenir la

fixation des cellules sessiles. Pour quantifier les biofilms formés, 100  $\mu$ L du cristal violet sont ajoutés dans les puits et laissés pendant 20 minutes ; un autre lavage est ensuite effectué. 100  $\mu$ L de l'acide acétique (33%) sont répartis dans chaque puits et laissés 5 minutes; celui-ci est transféré dans une nouvelle microplaque à 96 puits pour tester son absorbance grâce à un lecteur de microplaque (RT-2100C) à une longueur d'onde de 630 nm.

**Tableau N°1 : Niveau formation de biofilm selon la valeur de l'absorbance (Marcos-zambrano et al., 2014).**

Absorbance	Formation biofilm
< 0,44	Faible
0,44 à 1,17	Modéré
> 1,17	Haute

#### 4. Activités enzymatiques en mode planctonique

L'évaluation des activités phospholipases, protéases et estérases est respectivement effectuée selon les protocoles : **Samaranayake et al., (1984)** ; **Aoki et al., (1990)** et **Slifkin (2000)**.

L'activité enzymatique est déterminée par les valeurs Pz calculées en rapportant le diamètre de la colonie sur le diamètre total de la colonie plus celui de la zone de précipitation (**Price et al., 1982**).

Les valeurs Pz sont exprimés en moyenne  $\pm$  SE (SE : Erreur Standard des Moyennes).



**Tableau N° 2 : Activité enzymatiques selon la valeur Pz (Price et al., 1982).**

Valeur Pz	Activité
1	Négative (-)
0,90-0,99	Faible (+)
0,80-0,89	Légère (++)
0,70-0,79	Moyenne (+++)
≤ 0,69	Forte (++++)

#### 4.1. Activité phospholipase

Selon le protocole de **Samaranayake et al., (1984)**, 184 mL du milieu de culture sont préparés en ajoutant 13g du milieu Sabouraud dextrose agar, 11,7g de NaCl et 0,11g de CaCl<sub>2</sub> ; cette solution est stérilisée à l'autoclave à 120 °C pendant 20 minutes.

Le jaune d'un œuf est centrifugé (3000g, 4 °C, 20 min), puis 20 mL de surnageant sont ajoutés au milieu préparé précédemment.

Cette gélose est coulée dans les boîtes de Pétri puis un spot de 10 µL de la suspension levurienne (10<sup>6</sup> cellule/mL) est déposé sur la gélose ; les boîtes sont ensuite incubées à 37°C pendant 72 heures.

L'apparition d'une zone autour des colonies révèle la production des phospholipases par les cellules.

#### 4.2. Activité protéase

En suivant le protocole d'**Aoki et ses collaborateurs (1990)**, 60 mL d'une solution de sérum d'albumine bovin (BSA) sont préparées en leur ajoutant 0,04 g de MgSO<sub>4</sub>, 0,5 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 g de NaCl, 0,2 g extrait de levure, 4 g glucose et 0,05 g de BSA. Le pH est ajusté à 3,5 et la solution est stérilisée par filtration (filtre milipore 0,22 µL). Cette dernière est ajoutée à 140 mL d'agar-agar stérile.

Les boîtes de Pétri sont coulées par cette gélose ensuite un spot de 10  $\mu$ L de la suspension levurienne ( $10^6$  cellule/mL) est déposé sur la gélose ; les boîtes sont ensuite incubées à 37 °C pendant 7 jours.

La présence d'un anneau autour des colonies indique une activité positive et donc, la production des protéases.

### 4.3. Activité estérase

Le protocole de **Slifkin (2000)** permet de tester l'activité des estérases par les souches de *C. albicans*. Une gélose spécifique pour cette activité, composée de 10g de peptone, 5 g de NaCl, 0,1 g de CaCl<sub>2</sub>, 15 g d'agar-agar, est préparée puis stérilisée à l'autoclave. 5 mL de Tween 80 lui sont ensuite ajoutés.

Les boîtes de Petri sont coulés par cette gélose, laissés refroidir, puis 10  $\mu$ L d'inoculum ( $10^6$  cellule/mL) sont inoculés par spot ; l'incubation des boîtes est effectuée à 37 °C pendant 10 jours.

L'activité positive est révélée par la présence d'un halo autour du site inoculé.

## 5. Activités enzymatiques en mode sessile

Pour rechercher la relation entre la synthèse des enzymes hydrolytiques et la formation des biofilms, des microplaques de 24 puits et des disques de silicone de 1cm de diamètre sont utilisés (**Chandra et al., 2012**).

Les disques stériles sont déposés dans les puits de la microplaque à l'aide d'une pince stérile, ensuite 1 mL d'inoculum ( $10^6$  cellule/mL) est ajouté dans les puits. Les microplaques sont scellées et incubées à 37 °C pendant 24 heures.

Après la formation de biofilms, le milieu est aspiré et les disques sont lavés deux fois avec du PBS stérile. Ils sont ensuite transférés et déposés sur les géloses appropriées à chaque test étudié.

Enfin, les boites sont incubées à 37 °C (72h pour l'activité des phospholipases, 7 jours pour l'activité protéase et 10 jours pour l'activité estérase).

*Troisième partie*

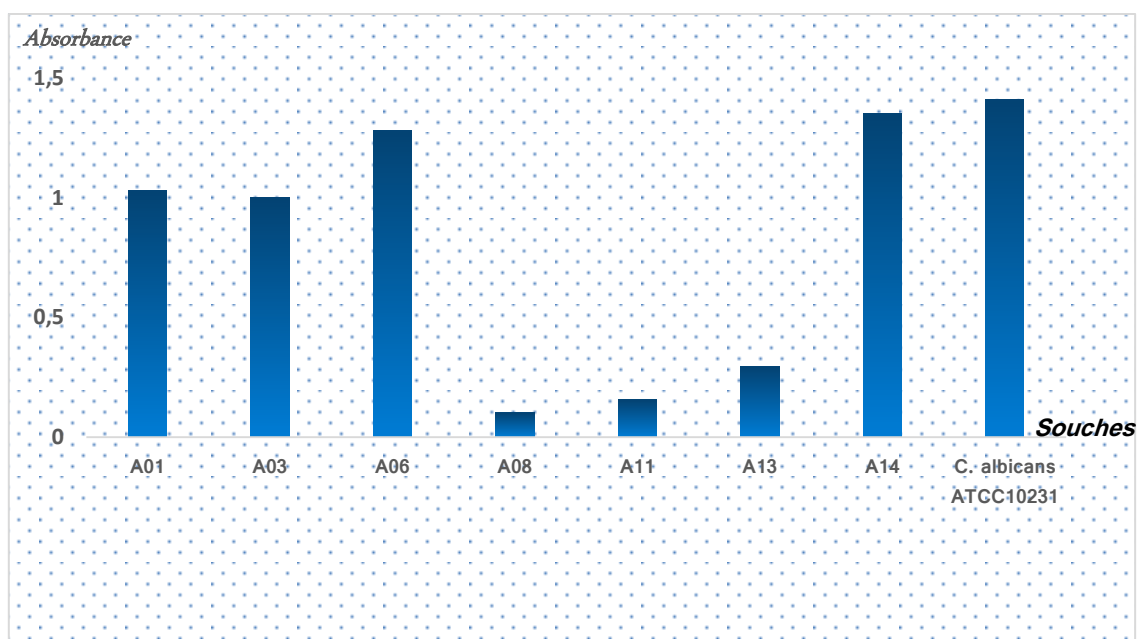
*Résultats et discussion*

La sécrétion d'exoenzymes, phospholipase, protéase et estérase joue un rôle important dans la virulence et la pathogénie de *C. albicans* (Pakshir et al., 2013). Notre étude est réalisée dans le but d'évaluer l'activité des enzymes hydrolytiques et la formation des biofilms chez les souches de *Candida albicans* et, la recherche du lien entre ces deux facteurs de virulence.

### 1. Formation de biofilm

Les résultats du potentiel de formation des biofilms réalisé par la technique au cristal violet sont montrés dans la **figure N°3**. La lecture de l'absorbance (A) à 630 nm a permis de quantifier le biofilm formé par chaque souche de *C. albicans*.

Selon les résultats obtenus, les souches A08, A11 et A13 ont montré un faible potentiel de formation de biofilm ( $A < 0,44$ ).



**Figure N°3** : Potentiel de formation de biofilm chez les souches de *C. albicans*.

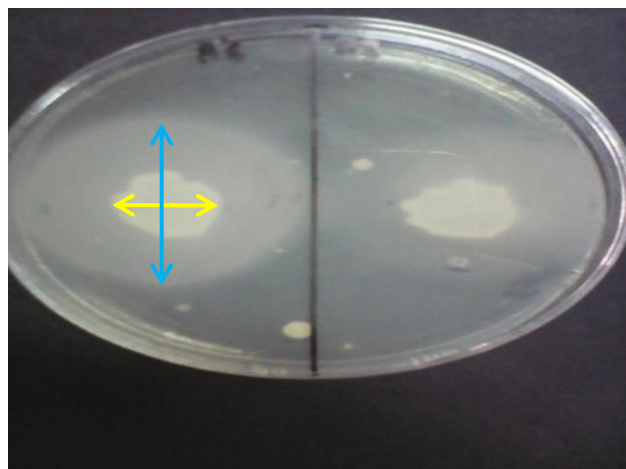
La figure N°3 montre que les souches A01 et A03 forment modérément les biofilms; cependant, A06, A14 et la souche de référence ont montré un haut potentiel pour leur formation ( $A > 1,17$ ).

*C. albicans* peut former des biofilms complexes sur une variété de substrats (**Daniels et al., 2013**). En effet, les essais de **Sun et al, (2011)** montrent que *C. albicans* forme les biofilms après 48 heures d'incubation. Certaines études ont révélé que cette espèce forme les biofilms au potentiel variable [(**Chandra et al., 2001**); (**Seddiki et al., 2013**)]. Récemment, **Moron et Cabrera (2019)** ont trouvé que 23,08% des isolats cliniques de *C. albicans* étaient des producteurs de biofilm faibles.

## 2. Activités enzymatiques en mode planctonique

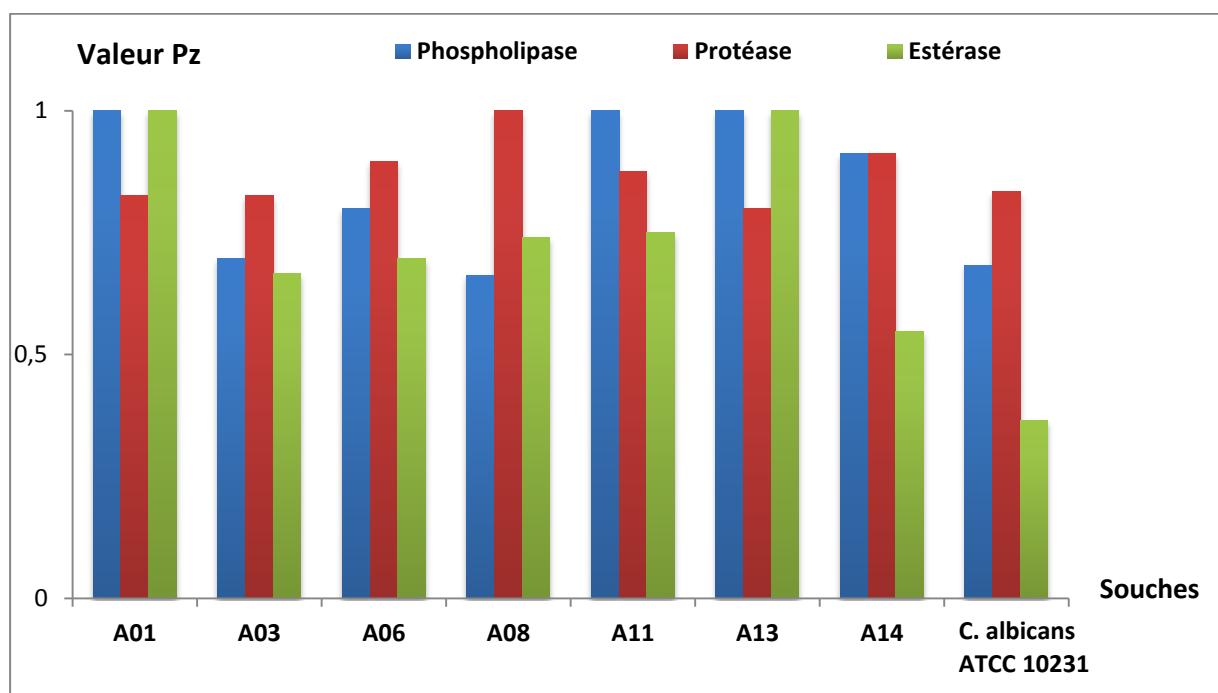
**Price et al, 1982** ont montré que l'activité enzymatique est déterminée par le rapport du diamètre de la colonie sur le diamètre de la zone de précipitation plus le diamètre de la colonie, exprimé en valeur Pz.

Selon les résultats obtenus (**figure N°4**), les colonies sont entourées par une zone de précipitation qui explique l'activité de chaque enzyme et qui diffère par son diamètre.



**Figure N°4 :** Test de l'activité hydrolytique chez les souches A06, A08 de *C. albicans*. (Flèche jaune : diamètre de la colonie. Flèche bleu : diamètre de la colonie + diamètre de la zone de précipitation).

Selon les résultats obtenus (**Figure N°5**), l'activité phospholipase est forte chez la souche *C. albicans* ATCC 10231 ( $Pz = 0.68 \pm 0.18$ ). De même, les souches A03 et A08 ont présenté des activités fortes avec les valeurs Pz respectives,  $0,69 \pm 0.01$  et  $0.66 \pm 0.03$ . Une activité légère est cependant observée chez la souche A06 ( $Pz = 0.8 \pm 0.2$ ) et une activité faible est soulignée chez la souche A14 ( $Pz=0.91 \pm 0.088$ ). Par ailleurs, les souches A01, A11 et A13 ont une activité phospholipase négative ( $Pz = 1$ ).



**Figure N°5** : Activité des enzymes hydrolytiques chez les souches planctoniques de *C. albicans*.

L'activité protéase était présente chez la majorité des souches de *C. albicans*. Selon la figure N°5, cette activité est légère chez la souche de référence *C. albicans* ATCC 10231 ( $Pz = 0.83 \pm 0.17$ ) ainsi que chez les souches A01, A03, A06, A11, A13 avec les valeurs respectives  $0,83 \pm 0.17$ ,  $0,83 \pm 0.17$ ,  $0,89 \pm 0.10$ ,  $0,87 \pm 0.12$  et  $0,8 \pm 0.2$ . Cette activité hydrolytique est faible chez la souche A14 ( $Pz = 0.91 \pm 0.09$ ). Par contre, l'activité protéase est négative chez la souche A08 ( $Pz = 1$ ).

À partir des résultats présentés dans la **figure N°5**, l'activité estérase est marquée chez les souches de *C. albicans*, elle est forte chez *C. albicans* ATCC 10231 ( $Pz = 0.36 \pm 0.01$ ) ainsi que chez A03, A06 et A14 avec les valeurs respectives suivantes  $0.66 \pm 0.00$ ,  $0,67 \pm 0.30$  et  $0,55 \pm 0.05$ . Cette activité est moyenne chez les souches A08 et A11 ( $Pz = 0,74 \pm 0.26$ ) et ( $Pz = 0,75 \pm 0.25$ ); alors qu'elle est négative chez les souches A01 et A13 ( $Pz = 1$ ).

Selon **Naglik et al., (2003)**, *C. albicans* devient plus pathogène suite à la sécrétion des phospholipases. **Samaranayake et al, (1984)** ont trouvé que 73% des isolats de *C. albicans* possèdent une activité phospholipase. Par ailleurs, les expériences de **Shirkhani** et ses collaborateurs en **2016** sur trente-quatre isolats de *C. albicans* ont révélé que seulement dix isolats ont une activité phospholipase forte alors que les vingt- quatre restant n'ont présenté aucune activité phospholipase.

**Shirkhani et al., (2016)** ont réalisé un test sur trente-trois isolats de *C. albicans* et celles-ci avaient tous des activités protéase positives. Les résultats de **Kantarcioğlu et Yücel** en **(2002)** vont dans le même sens que les nôtres, ils ont montré en effet que plus de 93% de souches de *C. albicans* testées ont marqué des activités hydrolytiques positives de cette enzyme. **Gokce et al., (2007)** ont également obtenu des résultats similaires.

Sachant que *C. albicans* a tendance à avoir une activité hydrolytique des estérases plus élevée par rapport à d'autres espèces de *Candida* **Tsuboi et al., (1996)**, **Pakshir** et ses collaborateurs ont révélé en **2013** que 87 % des souches de *C. albicans* synthétisent l'enzyme estérase à partir du troisième jour. D'après les essais de **Noori** et ses collègues **(2017)**, cette activité est évaluée sur le milieu de test d'opacité Tween 80.



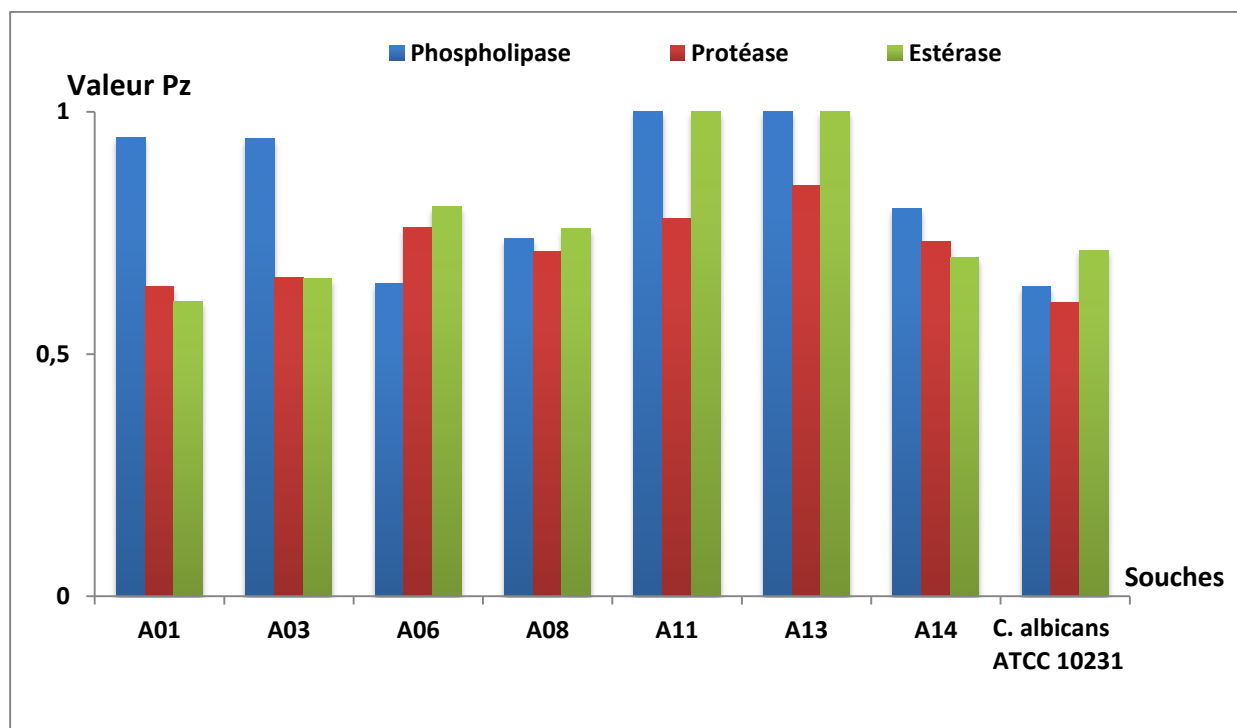
### 3. Activités enzymatiques en mode sessile

D'après les résultats obtenus, l'activité phospholipase est maintenue forte chez les cellules sessiles de la souche de référence ( $Pz = 0,64 \pm 0.14$ ).

La souche A01 a montré une activité faible en mode biofilm ( $Pz = 0,95 \pm 0.05$ ) après être nulle en mode planctonique (figure N°6).

Les souches A06 et A14 ont montré des changements de leurs activités en mode biofilm ; de légère et faible à forte et légère, avec les valeurs  $Pz$  respectives suivantes ( $Pz = 0,64 \pm 0.14$ ) et ( $Pz = 0,8 \pm 0.2$ ). Cependant, les activités hydrolytiques forte des souches A03 et A08 en mode planctonique, ont changé en mode biofilm en faible ( $Pz = 0,94 \pm 0.05$ ) chez A03 et moyenne ( $Pz = 0,74 \pm 0.17$ ) chez A08. Il est à noter que cette activité phospholipase n'a pas changés en mode biofilm chez les souches A11, A13, elle est restée négative ( $Pz = 1$ ).

Une étude en 2005, par **Dagdeviren et al.**, sur trente-trois souches de *Candida parapsilosis* a montré que l'activité phospholipase est proportionnellement liée à l'augmentation de l'adhésion des levures aux cellules épithéliales.



**Figure N°6 :** Activité hydrolytique chez les cellules sessiles de *C. albicans*.

D'après les résultats de la **figure N°6**, toutes les souches ont montré une activité protéase en mode sessile. À l'exception de la souche A13 dont l'activité hydrolytique reste inchangée en mode biofilm, toutes les autres souches sessiles ont présenté une augmentation de cette activité.

En effet, l'activité protéase a passé de légère à forte chez la souche *C. albicans* ATCC 10231 ( $Pz = 0,61 \pm 0,05$ ); ainsi que les souches A01 et A03 ( $Pz = 0,64 \pm 0,07$ ) et ( $Pz = 0,66 \pm 0,06$ ), respectivement. Pour les souches A06 et A11, cette activité a passé de légère à moyenne avec les valeurs Pz respectives de  $0,76 \pm 0,04$  et  $0,78 \pm 0,002$ .

L'activité négative en mode libre de la souche A08 est devenue moyenne en mode biofilm ( $Pz = 0,71 \pm 0,06$ ); alors que A14 a changé son activité de faible à moyenne ( $Pz = 0,73 \pm 0,02$ ).

L'étude de **Rajendran** et ses collaborateurs en **2010** a montré que la formation de biofilm est associée positivement au pouvoir protéolytique de *C. albicans*. **Tsang** et ses collègues (**2007**) ont observé une relation entre l'activité protéase et la formation de biofilm chez certaines souches *C. albicans*

L'étude de **Ramage** et ses collègues en **2012**, a démontré que la candidose buccale est due à la formation de biofilm par *C. albicans* et que les souches isolées des patients ayant des signes d'une candidose buccale ont des activités protéases plus élevées que les souches des patients sains.

Selon nos résultats (**figure N°6**), l'activité estérase a changé chez la souche de référence de forte à une activité moyenne ( $Pz = 0,71 \pm 0.28$ ) lors du passage du mode de vie planctonique au mode biofilm.

Cette activité n'a pas changé chez les souches A03, A14. De même, l'activité hydrolytique reste moyenne ( $Pz = 0,76 \pm 0.24$ ) chez la souche A08 et négative chez A13 ( $Pz = 1$ ).

En revanche, l'activité des estérases a diminué chez les cellules sessiles des souches, A06 et A11. Elle est devenue légère chez la souche A06 ( $Pz = 0,80 \pm 0.19$ ) après être forte en mode planctonique; négative pour la souche A11 ( $Pz = 1$ ) après être moyenne et en fin, de négative à forte chez la souche A01 ( $Pz = 0,61 \pm 0.043$ ).

*Quatrième partie*

*Conclusion*

La synthèse des enzymes hydrolytiques et la formation des biofilms sont deux facteurs de virulences importants chez *Candida albicans*. Notre travail se focalise sur la recherche de lien entre ces deux facteurs chez sept souches de *C. albicans*.

Nous avons d'abord évalué la sécrétion de trois enzymes hydrolytiques: Phospholipase, Protéase et Estérase chez les souches de *C. albicans* ainsi que et la formation de biofilm chez les mêmes souches. Nous avons ensuite évalué les mêmes activités hydrolytiques chez les cellules sessiles des mêmes souches de *C. albicans*.

L'activité phospholipase est présente chez cinq souches de *C. albicans* en mode libre, alors qu'elle devient plus forte chez les souches A01, A06 et A14 en mode biofilm. Pour l'activité protéase, elle a augmenté chez toutes les souches en mode sessile sauf chez la souche A13, elle a resté inchangée. En revanche, l'activité estérase est aussi présente chez six souches de *C. albicans* en mode planctonique, mais elle a diminué en mode sessile chez trois souches A06, A11 et la souche de référence.

La formation de biofilm influence positivement les activités hydrolytiques des Phospholipase et Protéase, alors qu'elle a un effet négatif sur l'activité estérase.

Pour compléter ce travail, il serait nécessaire de :

- Évaluer les activités hydrolytiques chez d'autres souches de *C. albicans* en mode biofilm.
- Évaluer les activités d'autres enzymes hydrolytiques.
- Élargir la recherche à d'autres espèces de *Candida*.

*Cinquième partie*

*Références bibliographiques*

1. Aktas, E., Yigit, N., Ayyildiz, A. (2002) Esterase Activity in Various *Candida* Species. The Journal of International Medical Research. 30(3): 322-324.
2. Albrecht, A., Felk, A., Pichova, I., Naglik, J. R., Schaller, M., de Groot, P., MacCallum, D., Odds, F. C., Schäfer, W., Klis, F., Monod, M., Hube, B. (2006) Glycosylphosphatidylinositol-anchored Proteases of *Candida albicans* Target Proteins Necessary for Both Cellular Processes and Host-Pathogen Interactions. Journal of Biological Chemistry, 10- 11:15.
3. Aoki, S., Ito-kuwa, S., Nakamura, Y., Masuhara, T. (1990) Comparative pathogenicity of a wild-type strain and respiratory mutants of *candida albicans* in mice. Zentralblatt Für Bakteriologie, 273(3): 332-343.
4. Barrett, A. J.; Rawlings, N. D. (1991) Types and families of endopeptidases. Biochemical Society Transactions, 638<sup>th</sup> Meeting held at Reading University.
5. Barrett-bee, K. Hayes, Y.Wilson, R. G. Ryley J. F. (1985). A Comparison of Phospholipase Activity, Cellular Adherence and Pathogenicity of Yeasts. J Gen Microbiol. 131(5): 1217-1221.
6. Bochenska, O. ; Kozik, M. R. ; Wolak, N. ; Aoki, W. ; Ueda, M. ; Kozik, A. (2016) The action of ten secreted aspartic proteases of pathogenic yeast *Candida albicans* on major human salivary antimicrobial peptide, histatin 5. The journal of The Polish Academy of Science, 63 (3): 403–410.
7. Calderone, R. A., Clancy, C. J. (2011). *Candida and Candidiasis*, Edition nuova, 2<sup>nd</sup> ed.
8. Cassone, A., De Bernardis, F., Mondello, F., Ceddia, T., Agatensi, L. (1987) Evidence for a Correlation Between Proteinase Secretion and Vulvovaginal Candidosis. The Journal of Infectious Diseases, 156 (5): 777-783.
9. Chandra, J., Mukherjee, P. K., Ghannoum, M. A. (2012) *Candida* biofilms associated with CVC and medical devices. Mycoses, 55(1): 46–57.

10. Chandra, J., Mukherjeel,P.K., Leidichl, S.D., Faddoul, F.F., Hoyer, L.L., Douglas, L.J., Ghannouml, M. A. (2001) Antifungal Resistance of Candidal Biofilms Formed on Denture Acrylic in vitro. *Journal of Dental Research*, 80(3): 903-908.
11. Copping, V. M. S., Barelle, C. J., Hube, B., Gow, N. A. R., Brown, A. J. P.,Odds,F. C. (2005) Exposure of *Candida albicans* to antifungal agents affects expression of *SAP2* and *SAP9* secreted proteinase genes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 55(5): 645–654.
12. Dagdeviren, M. Cerikcioglu, N. Karavus, M. (2005). Acid proteinase, phospholipase and adherence properties of *Candida parapsilosis* strains isolated from clinical specimens of hospitalized patients. *Mycoses*, 41.
13. Daniels, K. J., Park Y., Srikantha, T., Pujol, C., Soll, D. R. (2013). Impact of Environmental Conditions on the Form and Function of *Candida albicans* Biofilms. *Eukaryotic Cell*, 12 (10): 1389-1402.
14. De Andrade Pinho MEDEIROS. A. C. (2017) Etude expérimentale de la formation des biofilms sous conditions hydrodynamiques contrôlées. Thèse de doctorat, Université Grenoble Alpes.
15. De Bernardis, F., Arancia, S., Morelli, L., Hube, B., Sanglard, D., Schafer, W. & Cassone, A. (1999). Evidence that members of the secretory aspartyl proteinase gene family, in particular *SAP2*, are virulence factors for *Candida* vaginitis. *The Journal of Infectious Diseases*, 179, 201–208.
16. Develoux , M.; Bretagne, S. (2005) candidiasis and yeast infections. *EMC-Maladies Infectieuses*, 2(3): 119-139.
17. Donlan, R. M., Costerton, J. W. (2002) Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2): 167-193.
18. Falagas, M.E., Roussos, N., Vardakas, K.Z. (2010) Relative frequency of albicans and the various non-albicans *Candida* spp among candidemia isolates from



- inpatients in various parts of the world: A Systematic Review. *International Journal of Infectious Diseases*, 14(11): 954-966.
- 19. Gokce, G., Cerikcioglu, N., Yagci, A. (2007)** Acid proteinase, phospholipase, and biofilm production of *Candida* species isolated from blood cultures. *Mycopathologia*, 164: 265–26.
- 20. Gulati, M., Nobile, C. J. (2016)** *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. *Microbes and Infection*, 18(5): 310-321.
- 21. Hruskova-Heidingsfeldova, O. (2008).** Secreted proteins of *Candida albicans*. 13: 7227-7242.
- 22. Hube, B., Naglik, J. (2001)** *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. *Microbiology Society*, 147 (8): 1997–2005.
- 23. Hube, B., Sanglard, D., Odds, F. C., Hess, D., Monod, M., Schafer, W., Brown, A. J. & Gow, N. A. (1997)** Disruption of each of the secreted aspartyl proteinase genes SAP1, SAP2, and SAP3 of *Candida albicans* attenuates virulence. *Infection and Immunity*, 65 (9): 3529-3538.
- 24. Kantarcioğlu, A. S., Yücel, A. (2002)** Phospholipase and protease activities in clinical *Candida* isolates with reference to the sources of strains. *Mycoses*, 45: 160–165.
- 25. Leidich, S. D., Ibrahim, A. S., Fu, Y. & 8 other authors (1998).** Cloning and disruption of caPLB1, a phospholipase B gene involved in the pathogenicity of *Candida albicans*. *Journal of Biological Chemistry*, 273: 26078–26086.
- 26. Marcos-Zambranoa, L. J., Escribano, Pilar., Bouzaa, E., Guineaa, J. ( 2014)** Production of biofilm by *Candida* and *non-Candida* spp. Isolates causing fungemia: Comparison of biomass production and metabolic activity and development of cut-off points. *International Journal of Medical Microbiology*, 304(8): 1192–1198.

27. Moron, L. S., Cabrera, E. C. (2019) ABC genotyping and putative virulence factors of *Candida albicans* clinical isolates. *Malaysian Journal of Microbiology*, 15(5): 400-407.
28. Naglik, J. R.; Challacombe, S. J.; Hube, B. (2003) *Candida albicans* Secreted Aspartyl Proteinases in Virulence and Pathogenesis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67 (3): 400-428.
29. Naglik, J.R., Richardson, J. P., Moyes, D. L. (2014) *Candida albicans* pathogenicity and epithelial immunity. *PLOS Pathogens*, 10(8) : e1004257.
30. Nobile, C. J., Johnson, A. D. (2015). *Candida albicans* Biofilms and Human Disease. *Annual Review of Microbiology*, 69: 71-92.
31. Noori, M., Dakhili, M., Sepahvand, A., Davari, N. (2017). Evaluation of esterase and hemolysin activities of different *Candida* species isolated from vulvovaginitis cases in Lorestan Province, Iran. *Current Medical Mycology*, 3(4): 1-5.
32. Pakshir, K., Zomorodian, K., Karamitalab, M., Jafari, M., Taraz, H., Ebrahimi, H. (2013). Phospholipase, esterase and hemolytic activities of *Candida* spp. isolated from onychomycosis and oral lichen planus lesions. *Journal de Mycologie Médicale*, 23 (2): 113-118.
33. Price, M. F., Wilkinson, I. D., Gentry, L. O. (1982) Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *International Society For Human and Animal Mycology*, 20: 7-14.
34. Rajendran et al., (2010) Hydrolytic Enzyme Production is Associated with *Candida Albicans* Biofilm Formation from Patients with Type 1 Diabetes. *Mycopathologia*, 170: 229-235.
35. Ramage, G., Coco, B., Sherry, L., Bagg, J., Lappin, D. F. (2012) In Vitro *Candida albicans* Biofilm Induced Proteinase Activity and SAP8 Expression Correlates with In Vivo Denture Stomatitis Severity. *Mycopathologia*, 174: 11-19.

- 36. Samaranayake, L. P., MacFarlane, T. L. (1990)** Host factors and oral candidosis, 66-103. ref 274.
- 37. Samaranayake, L. P., Raeside, J. M., Macfarlane, T. W. (1984)** Factors affecting the phospholipase activity of *Candida* species in vitro. Journal of Medical and Veterinary Mycology 22: 201-207.
- 38. Sanglard, D., Hube, B., Monod, M., Odds, F. C. & Gow, N. A. (1997).** A triple deletion of the secreted aspartyl proteinase genes SAP4, SAP5, and SAP6 of *Candida albicans* causes attenuated virulence. Infection and Immunity 65(9): 3539–3546.
- 39. Sardi, J. C. O., Boasb, P. V., Aguiarb, N., Fonsecab, M., Theobaldob, J., Höflingb, J. F., Saitoc, D. (2013)** In vitro Evaluation of Phospholipase and Proteinase of *Candida albicans* Isolated From Oral Cavity of Diabetic Patients. Journal of Health Sciences, 15(1): 9-12.
- 40. Schaller, M.; Borelli, C.; Korting, H. C.; Hube, B. (2005)** Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. Mycoses, 48(6), 365-377.
- 41. Seddiki, S. M. L., Boucherit-Otmani, Z., Boucherit, K., Badsî-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. International Journal of General Medicine, 6:1-7.
- 42. Seneviratne, C. J., Jin, L., Samaranayake, L. P. (2008)** Biofilm lifestyle of *Candida*: a mini review. Journal Compilation, 14(7): 582–590.
- 43. Shirkhani, S., Sepahvand, A., Mirzaee, M., Anbari, K. (2016).** Phospholipase and proteinase activities of *Candida* spp. isolates from vulvovaginitis in Iran. Journal de Mycologie Médicale, 26(3): 255-260.
- 44. Slifkin, M., (2000)** Tween 80 Opacity Test Responses of Various *Candida* Species. Journal of Clinical Microbiology, 28 (12): 4626–4628.

45. Stefanie, A.; Forster, T. M.; Svensson, C. M.; Richardson, J. P.; Pawlik, T.; Hebecker, B.; Rudolphi, S.; Juraschitz, M.; Schaller, M.; Blagojevic, M.; Morschauser, J.; Figge, M. T.; Jacobsen, I. D.; Naglik, J. R.; Kasper, L.; Mogavero, S.; Hube, B. (2018) *Candida albicans*-Induced Epithelial Damage Mediates Translocation through Intestinal Barriers. *Institute of Microbiology*, 9 (3): 15-18.
46. Sun, T. T. Ira azzura, Z. A. Hamimah, H. Kee peng, N. (2011). Proteinase, phospholipase, biofilm forming abilities and antifungal susceptibilities of Malaysian *Candida* isolates from blood cultures. *Medical Mycology*, 49(5): 556-560.
47. 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.
48. Tsuboi, R., Komatsuzaki, H., Ogawa, H. (1996). Induction of an Extracellular Esterase from *Candida albicans* and Some of Its Properties. *Infection and Immunity*, 64 (8): 2936-2940.
49. Vandijck, D., Blot, S., Labeau, S., Buyle, F., Depaemelaere, M., Vandewoude, K., Decruyenaere, J. (2008) Candidemia in critically ill patient: An analysis of daily antifungal therapy related costs. *Journal de Mycologie Médicale*, 18(2): 96-99.
50. Wall, G., Montelongo-jauregui, D., Bonifacio, B. V., Lopez-ribot, J. L., Uppuluri, P. (2019) *Candida albicans* biofilm growth and dispersal: contributions to pathogenesis. *Current Opinion In Microbiology*, 52: 1-6.
51. Watts, H. J., Cheah, F. S., Hube, B., Sanglard, D. & Gow, N. A. (1998). Altered adherence in strains of *Candida albicans* harbouring null mutations in secreted aspartic proteinase genes. *FEMS Microbiol Letters*, 159(1): 129–135.

