



République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Aboubekr Belkaïd - Tlemcen

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

## THESE

En vue de l'obtention du diplôme de

**Doctorat de troisième cycle**

En Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie appliquée

Présentée par

**M<sup>me</sup> TEFIANI Ikram**

# Analyse biochimique et de culture des facteurs de virulence de *Candida albicans* issus de dispositifs médicaux au CHU de Tlemcen

Soutenue le : 15/07/2024

Devant le jury :

|                           |                                 |                               |
|---------------------------|---------------------------------|-------------------------------|
| <b>Présidente</b>         | Pr Boucherit-Otmani Zahia       | Université de Tlemcen         |
| <b>Directeur de thèse</b> | Pr Seddiki Sidi Mohammed Lahbib | Centre universitaire de Naâma |
| <b>Examineurs</b>         | Pr Azzi Rachid                  | Université de Tlemcen         |
|                           | Dr Kebdani Mohammed             | Centre universitaire de Naâma |
|                           | Dr Chaouche Tarik Mohammed      | Université de Tlemcen         |

**Année universitaire : 2023-2024**

*Je remercie Allah le tout-puissant pour sa patience qu'il m'a  
accordé pour effectuer ce travail et atteindre mon objectif*

## *Dédicaces*

*Je dédie ce travail*

*A la mémoire de ma mère qui m'est toujours la plus chère, qu'Allah le tout puissant  
lui accorde son infinie miséricorde et l'accueille dans son éternel paradis,*

*A mon cher père,*

*A mon cher frère*

*A mes chères sœurs*

*A mon épouse*

*A ma fille*

*A mes neveux et mes nièces*

*A mes grands-parents*

*A mes beaux-parents, mon beau-frère et mes belles-sœurs,*

*A mes oncles, mes tantes, mes cousins et cousines*

*A mes professeurs et mes amis.....*

**Ikram**

## **Remerciements**

Ce travail a été effectué dans le laboratoire « Antibiotiques Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique » de l'université Aboubekr Belkaïd de Tlemcen.

Le long cheminement d'une thèse de doctorat ne s'effectue pas sans l'aide de personnes indispensables que je tiens sincèrement à remercier.

Je voudrais tous d'abord exprimer mes plus profonds remerciements à mon directeur de thèse Monsieur Seddiki Sidi Mohammed Lahbib, Professeur au département de biologie, centre universitaire de Naâma, pour avoir accepté la charge de m'encadrer. Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance et ma gratitude pour sa gentillesse, sa disponibilité, sa patience, ses remarques judicieuses et pour les nombreux encouragements qu'il m'a prodigué. Qu'il trouve ici l'assurance de ma respectueuse gratitude.

Je suis très honorée que Madame Boucherit-Otmani Zahia, Professeur au département de biologie de la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers, université Aboubekr Belkaïd-Tlemcen ait accepté de présider ce jury. Merci pour l'intérêt que vous avez porté à cette thèse, merci pour votre soutien, votre disponibilité. Vos qualités scientifiques et pédagogiques m'ont été extrêmement bénéfiques.

Ma profonde reconnaissance s'adresse également à Monsieur Azzi Rachid, Professeur au département de biologie de la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers, université Aboubekr Belkaïd-Tlemcen de m'avoir fait l'honneur d'accepter d'examiner cette thèse.

J'exprime mes remerciements à Monsieur Kebdani Mohammed, Maître de conférences A au centre universitaire de Naâma pour avoir accepté d'être l'un des membres de jury. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde gratitude pour votre présence aujourd'hui.

Je tiens également à remercier Monsieur Chaouche Tarik Mohammed, Maître de conférences A au département de biologie de la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers, université Aboubekr Belkaïd-Tlemcen pour avoir accepté d'examiner et de discuter cette thèse.

Je remercie Monsieur Mediouni Mohammed Rida, enseignant chercheur au centre universitaire de Naâma pour son aide et son soutien.

Mes remerciements s'adressent également à madame Kazi Tani-Baba Ahmed Zakia Zahira, Maître de conférences A au département de biologie de la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers, université Aboubekr Belkaïd-Tlemcen, Directrice du laboratoire de recherche « Antibiotiques Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologiques », pour son soutien et sa disponibilité. Qu'elle soit assurée de ma sincère et profonde reconnaissance.

Mes sincères remerciements à Madame Touil Hidaya Fatima Zohra, Docteur en biologie pour son aide précieuse, son soutien, sa disponibilité et pour m'avoir fournis les souches de *Candida albicans* utilisées dans cette thèse.

Je remercie également M<sup>me</sup> Mouderas Faiza et M<sup>elle</sup> Abbou Fayza, Maître assistant B pour m'avoir fournis les extraits de plantes.

Merci à tous les doctorants, les techniciens et les membres du laboratoire avec qui j'ai partagé mon quotidien pour leur soutien à toute épreuve. Merci pour l'amitié, les moments agréables que nous avons passé et surtout l'encouragement que vous m'avez apporté durant les moments difficiles de la thèse.

Mes vifs remerciements s'adressent également à tous mes enseignants durant mon cursus primaire, moyenne, secondaire et universitaire.

J'adresse enfin mes sincères remerciements à tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué directement ou indirectement à la réalisation de ce travail.

## ملخص :

*Candida albicans* هي العامل الفطري الرئيسي الممرض المسؤول عن الالتهابات المنتشرة. العديد من عوامل الضرر تنسب إلى الطبيعة الانتهازية لهذا النوع، بما في ذلك تكوين الأغشية الحيوية وإفراز الإنزيمات المحللة بالماء. الهدف من هذه الدراسة هو تقييم النشاط الإنزيمي في المختبر لسلاسل الفطريات البيضاء *Candida albicans* المعزولة من المركز الاستشفائي الجامعي بتلمسان في حالة العوالق و في حالة الأغشية الحيوية، وتحديد تأثير كل من درجة الحموضة، درجة الحرارة و اتحاد المستخلصات النباتية مع الأمفوتريسين. ب على نشاط الإنزيمات المحللة بالماء للسلاسل المدروسة.

اثبتت الدراسة ان السلاسل الاربعة عشر من الفطريات البيضاء *C. albicans* المستعملة تنتج إنزيمات محللة بالماء تشمل الفسفوليباز (73.33%)، البروتياز (93.33%)، الاستراز (86.66%)، الكواجيلاز (80%) والهيوموليزين (86.66%). بالإضافة إلى ذلك، فإن جميع السلاسل المدروسة لديها القدرة على تكوين الأغشية الحيوية في المختبر. في هذا الوضع، أظهرت فطريات *C. albicans* المعزولة نشاطاً إيجابياً للإنزيمات.

يتأثر النشاط الإنزيمي للسلاسل المدروسة بدرجة الحموضة و/أو درجة الحرارة ؛ يؤثر تغيير هذه العوامل على مستوى نشاط الفسفوليباز والبروتياز على وجه الخصوص.

أظهرت المستخلصات النباتية المستخدمة (مستخلص (E1) أسيتات اثيل من *Traganum nudatum* و مستخلص (E2) هيدروميثانوليك من *Mentha pulegium*) تأثيراً مثبطاً لسلاسل *C. albicans* المستعملة. إن الجمع بين الأمفوتريسين ب والمستخلصين النباتيين يقل بشكل كبير من النشاط الإنزيمي لسلاسل الفطريات البيضاء التي تم اختبارها.

## الكلمات المفتاحية :

*Candida albicans*، الأغشية الحيوية، فسفوليباز، بروتياز، كواجيلاز، استراز، النشاط الانحلالي.

**Résumé :**

*Candida albicans* est le principal agent pathogène fongique responsable d'infections invasives. Beaucoup de facteurs de virulence sont attribués au caractère opportuniste de cette espèce, tels que la formation des biofilms et la sécrétion d'enzymes hydrolytiques. L'objectif principal de la présente étude consiste à évaluer, *In vitro*, l'activité hydrolytique aux modes de vie microbiens, planctonique et sessile, des souches de *C. albicans* isolées du Centre Hospitalo-Universitaire de Tlemcen. Cette recherche vise également à évaluer l'effet du pH, de la température d'incubation et des combinaisons entre des extraits de plantes et de l'amphotéricine B sur l'activité des enzymes hydrolytiques des souches étudiées.

Quatorze souches de *C. albicans* se sont révélées productrices d'enzymes hydrolytiques avec des taux variables, la phospholipase avec 73,33%, la protéase (93,33%), l'estérase (86,66%), la coagulase (80%) et l'hémolysine (86,66%). Par ailleurs, tous les isolats examinés ont démontré le pouvoir de former des biofilms. Ces isolats cliniques de *C. albicans* ont présenté une activité enzymatique positive en mode sessile.

Le pH et/ou la température d'incubation ont une influence sur l'activité hydrolytique des souches étudiées ; les changements dans ces paramètres affectent les niveaux d'activité des phospholipases et des protéases.

En revanche, les deux extraits de plantes employés (l'extrait E1 d'acétate d'éthyle de *Traganum nudatum* et l'extrait E2 hydrométhanolique de *Mentha pulegium*) ont démontré un effet inhibiteur contre les souches étudiées. En combinant l'amphotéricine B avec les deux extraits de plantes, on observe une diminution considérable de l'activité enzymatique des souches de *C. albicans* testées.

**Mots clés :**

*Candida albicans*, biofilms, phospholipase, protéase, estérase, coagulase, activité hémolytique.

**Abstract:**

The primary fungal pathogen that causes invasive infections is *Candida albicans*. The opportunistic nature of this species is linked to numerous virulence factors, such as the production of hydrolytic enzymes and biofilms.

The current study's goals are to assess, *In vitro*, the hydrolytic activity of *C. albicans* strains isolated from the University Hospital Center of Tlemcen in both planktonic and sessile lifestyle, and also to determine the impact of pH, incubation temperature, and combinations of plant extracts and amphotericin B on the strains' hydrolytic enzyme activity.

Hydrolytic enzymes, including phospholipase (73.33%), protease (93.33%), esterase (86.66%), coagulase (80%), and hemolysin (86.66%), were discovered to be produced by the fourteen strains of *Candida albicans* that were isolated. Furthermore, every isolate that has been investigated expressed the ability to generate biofilm *in Vitro*. In addition, clinical isolates of *Candida albicans* exhibited positive enzymatic activity while in sessile state.

The pH and/or incubation temperature of the strains under investigation affected their hydrolytic activity; modifying these parameters has an impact on the levels of phospholipase and protease activities.

The two plant extracts that were employed had an inhibiting effect on the strains under investigation. The combination of amphotericin B and the two plant extracts considerably reduces the tested *C. albicans* strains' enzymatic activity.

**Keywords:**

*Candida albicans*, biofilms, phospholipase, protease, coagulase, esterase, hemolytic activity.

## Sommaire

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Introduction.....</b>  | <b>1</b>  |
| <b>Première partie : Synthèse bibliographique.....</b>                    | <b>3</b>  |
| <b>Deuxième partie : Matériel et méthodes.....</b>                        | <b>17</b> |
| I.    Activité hydrolytique chez <i>Candida albicans</i> .....            | 18        |
| 1. Phospholipase.....   | 18        |
| 2. Protéase.....  | 19        |
| 3. Estérase.....  | 19        |
| 4. Coagulase.....   | 19        |
| 5. Hémolysine.....  | 20        |
| 6. ADNase.....  | 20        |
| II.   Activités enzymatiques des cellules sessiles.....                   | 20        |
| 1. Préparation des inocula.....   | 20        |
| 2. Formation de biofilm.....  | 21        |
| 3. Activités enzymatiques en mode sessile.....                            | 21        |
| III.  Effet du pH et de la température et sur l'activité enzymatique..... | 22        |
| IV.  Effet d'extraits de plantes sur l'activité hydrolytique.....         | 23        |
| 1. Extraits de plantes utilisés.....                                      | 23        |
| 2. Préparation des inocula.....   | 23        |
| 3. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI).....     | 24        |
| 3.1. CMI des extraits.....  | 24        |
| 3.2. CMI des extraits en association avec l'amphotéricine B.....          | 25        |
| 3.3. Activité des enzymes hydrolytiques.....                              | 25        |
| V.    Test statistique.....   | <b>27</b> |
| <b>Troisième partie : Résultats et discussion.....</b>                    | <b>28</b> |
| I.    Activité hydrolytique chez <i>Candida albicans</i> .....            | 34        |
| II.   Activités enzymatiques des cellules sessiles.....                   | 34        |
| 1. Formation de biofilm .....   | 35        |
| 2. Activité enzymatique en mode sessile.....                              | 40        |
| III.  Effet du pH et de la température sur l'activité hydrolytique.....   | 43        |
| 1. Activité de la phospholipase.....                                      | 46        |
| 2. Activité de la protéase.....   | 48        |

|  |           |
|--|-----------|
| 3. Activité de l'estérase.....                                     | 51        |
| IV. Effet d'extraits de plantes sur l'activité hydrolytique.....   | 51        |
| 1. Détermination des CMI.....                                      | 51        |
| 1.1. CMI des extraits et de l'AmB.....                             | 51        |
| 1.2. CMI des combinaisons extraits-AmB.....                        | 53        |
| 2. Activité hydrolytiques en absence des mélanges AmB/extrait..... | 53        |
| 3. Activité hydrolytique en présence des mélanges AmB/extrait..... | 60        |
| <b>Quatrième partie : Conclusion générale.....</b>                 | <b>64</b> |
| <b>Cinquième partie : Références bibliographiques.....</b>         |           |
| <b>Annexes</b>   |           |

## Liste des figures

|  |    |
|--|----|
| <b>Figure 01 :</b> Invasion tissulaire de <i>Candida albicans</i> (Gow et al., 2013).....  | 3  |
| <b>Figure 02:</b> Localisation différentielle et sécrétion des enzymes saps de <i>C. albicans</i> (Cassone et al., 2016).....  | 5  |
| <b>Figure 03:</b> Stades morphologiques de <i>Candida albicans</i> et expression différentielle des gènes SAP (Dos Santos, 2010).....  | 6  |
| <b>Figure 04:</b> Sites d'hydrolyse des diverses phospholipases (Calder, 2016).....  | 8  |
| <b>Figure 05 :</b> Cycle de vie du biofilm de <i>Candida albicans</i> (Gulati et Nobile, 2016).....  | 12 |
| <b>Figure 06 :</b> Structures tridimensionnelles différentes des biofilm microbiens (Seddiki, 2021).....   | 13 |
| <b>Figure 07:</b> Activités hydrolytiques des souches de <i>Candida albicans</i> .....   | 29 |
| <b>Figure 08:</b> Activité de phospholipase chez <i>Candida albicans</i> en mode sessile et planctonique.....  | 35 |
| <b>Figure 09 :</b> Activité de protéase chez <i>Candida albicans</i> en mode sessile et planctonique.....  | 36 |
| <b>Figure 10 :</b> Activité d'estérase chez <i>Candida albicans</i> en mode sessile et planctonique.....   | 37 |
| <b>Figure 11:</b> Niveaux d'activités hydrolytiques de phospholipase, protéase et estérase de <i>Candida albicans</i> dans différentes conditions de pH et de température..... | 40 |
| <b>Figure 12:</b> Moyennes des valeurs Pz des activités de phospholipase, protéase et estérase chez <i>C. albicans</i> à différentes températures d'incubation et de pH.....   | 42 |
| <b>Figure 13 :</b> Représentations graphiques du Box-plot avec distribution scatter plot de l'activité hydrolytique globale des phospholipases chez <i>C. albicans</i> .....   | 44 |
| <b>Figure 14 :</b> Représentations graphiques du Box-plot avec distribution scatter plot de l'activité hydrolytique globale des protéases chez <i>C. albicans</i> .....        | 47 |
| <b>Figure 15:</b> Représentations graphiques du Box-plot avec distribution scatter plot de l'activité hydrolytique globale des estérases chez <i>C. albicans</i> .....         | 49 |
| <b>Figure 16 :</b> Evaluation <i>In vitro</i> de l'activité de phospholipase chez <i>C. albicans</i> en absence et en présence des mélanges E1/AmB et E2/AmB.....              | 54 |
| <b>Figure 17 :</b> Evaluation <i>In vitro</i> de l'activité de protéase chez <i>C. albicans</i> en absence et en présence des mélanges E1/AmB et E2/AmB.....                   | 55 |
| <b>Figure 18 :</b> Evaluation <i>In vitro</i> de l'activité d'estérase chez <i>C. albicans</i> en absence et en présence des mélanges E1/AmB et E2/AmB.....                    | 56 |

## Liste des tableaux

**Tableau 01:** Synthèse des enzymes hydrolytiques chez *C. albicans*.....28

**Tableau 02:**Concentrations minimales inhibitrices des extraits E1 et E2 en association avec l'AmB et indices de concentrations inhibitrices fractionnaires.....52

## Liste des abréviations

**AmB** : Amphotéricine B

**CLSI**: Clinical and Laboratory Standards Institute

**ICIF** : Indice de concentration inhibitrice fractionnaire

**PBS**: tampon phosphate salin

**RPMI**: Roswell Park Memorial Institute medium

**MOPS**: 3-(N-morpholino) propan sulfonic acid

**BSA**: Bovine Sérum Albumine

**DMSO** : Diméthyl sulfoxyde

**E1** : Extrait 01 (d'acétate d'éthyle de *Traganum nudatum*)

**E2** : Extrait 02 (hydro-méthanolique de *Mentha pulegium*)

**R1**: Souche de référence "*Candida albicans* ATCC 10231"

**Sap** : Aspartyl-protéinases sécrétoires

---

# *Introduction*

---

La fréquence des infections fongiques a considérablement augmenté au cours des dernières décennies, en particulier chez les personnes ayant des systèmes immunitaires affaiblis. Ces infections disséminées constituent des causes importantes de morbidité et de mortalité ainsi que des coûts supplémentaires considérables **(Soulountsi et al., 2021)**. Ce type d'infections peut être attribué à plusieurs espèces pathogènes de *Candida*, notamment *Candida albicans* **(Pannanusorn et al., 2023)**. Cette levure est en effet responsable de plus de 75% de mycoses invasives, elle présente un tandem médico-économique important et, est responsable de pathologies potentiellement mortelles **[(Lai et al., 2012); (Wang et al., 2014)]**.

*Candida albicans* est connu pour son caractère opportuniste qui est attribué à certains facteurs de virulence. Outre ses capacités d'adhésion aux dispositifs médicaux et aux cellules hôtes, son aptitude à changer de forme (dimorphisme) et à former des biofilms ainsi que sa capacité à se développer dans diverses conditions physiologiques, *C. albicans* est également capable de synthétiser et de sécréter des enzymes hydrolytiques telles que les phospholipases, protéases, estérases, hémolysines, ect. **[(Ishida et al., 2013); (Seddiki et al., 2015); (Hacioglu et al., 2019)]**.

Ainsi, les enzymes hydrolytiques ont un rôle crucial dans la pathogénie de *Candida* car elles facilitent son adhésion et sa pénétration dans les tissus, facilitant ainsi sa dissémination dans l'hôte **[(Das Mohan et Ballal, 2008); (Silva et al., 2011) ; (Marzoq, 2023)]**. De plus, il a été démontré dans plusieurs études que cette pathogénie s'exprime de manière intensive en fonction de l'activité hydrolytique qui, elle même, est soumise à l'effet des conditions environnementales telles que le pH et la température **[(Haynes, 2001); (Bramono et al., 2006); (Ingham et al., 2012)]**.

Par ailleurs, la formation de biofilms sur des supports biotiques ou abiotiques est un autre facteur de virulence majeur chez *C. albicans*, ce mode de vie sessile présente une résistance accrue aux traitements antifongiques. Dans le même temps, il est difficile de prévoir de nouvelles thérapies antifongiques, ce qui complique le traitement des infections associées aux biofilms **(Pareira et al., 2021)**.

Cependant, certains composés naturels peuvent être utilisés en tant qu'agents antifongiques contre les souches résistantes de *Candida*. De nombreuses études ont prouvé l'efficacité des composés végétaux qui peuvent réduire la virulence des espèces de *Candida* **[(Guevara-Lora et al., 2020) ; (Karpiński et al., 2021)]**; ce qui a suscité l'enthousiasme des chercheurs envers

de nouveaux investissements conduisant à l'utilisation des ressources naturelles comme alternative.

Dans ce contexte général, il a semblé nécessaire d'entreprendre ce présent travail qui s'intéresse à la virulence biochimique hydrolytique de *Candida albicans*. Cette thèse s'est donc articulée autour de trois objectifs principaux :

- ✓ Évaluation, *In vitro*, de l'activité hydrolytique chez les isolats cliniques de *Candida albicans*, planctoniques et sessiles.
- ✓ Mise en évidence de l'effet des paramètres physiques, pH et température d'incubation, sur l'activité enzymatique des souches étudiées.
- ✓ Détermination de l'effet des combinaisons extraits de plantes/amphotéricine B sur l'activité des enzymes hydrolytiques.

Le manuscrit de cette thèse est présenté en quatre parties. La première, une synthèse bibliographique, est consacrée à la description générale de la virulence de *Candida albicans*, notamment l'activité hydrolytique et la formation des biofilms; cette partie donne également une vue d'ensemble des enzymes hydrolytiques étudiées. La seconde décrit le mode opératoire et la méthodologie suivie. La partie suivante se concentre sur l'analyse et la discussion des résultats obtenus. Finalement, la dernière partie est une conclusion suivie de perspectives.

---

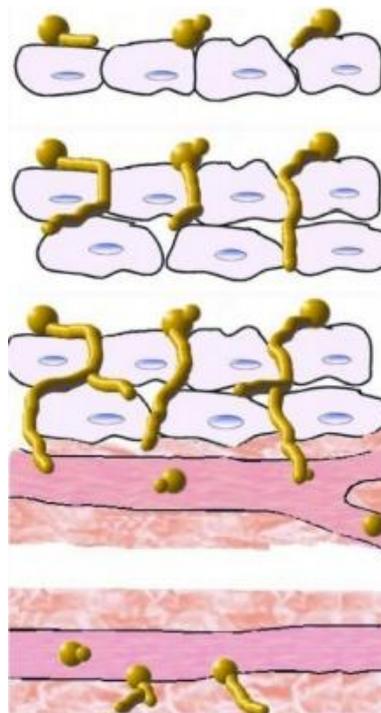
*Première partie*

*Synthèse bibliographique*

---

Les espèces de *Candida* sont responsables de la majorité des infections fongiques, *Candida albicans* est cependant l'agent pathogène le plus courant et le plus impliqué [(Mba et Nweze, 2020); (Dos Santos Silva et al., 2024)]. Ces levures saprophytes et de petites tailles, 2 à 5 µm par 3 à 7 µm, ont développé plusieurs caractères de virulence leur permettant d'envahir les tissus hôtes et de résister aux différents mécanismes de défense [(Schaller et al., 2005); (Fitzpatrick et al., 2006)].

Un déséquilibre physiopathologique fait intervenir une transition de *C. albicans* de l'état saprophyte commensal vers un état pathogène virulent, accompagné souvent par la formation de filaments appelés hyphes. Ce caractère dimorphique lui confère la particularité d'être l'espèce la plus virulente [(Samaranayake et al., 2005); (Irimés et al., 2008); (Poissy, 2015)]. Les hyphes, formes filamenteuses de *Candida albicans*, sont séparées par des cloisons incomplètes qui garantissent la continuité cytoplasmique, ce qui facilite l'invasion des tissus hôtes (Figure 01), entraînant ainsi une transition commensale-pathogène [(Odds, 1988); (Chauhan et al., 2006); (Gow et al., 2013)].



**Figure 01 :** Invasion tissulaire de *Candida albicans* (Gow et al., 2013).

*Candida albicans* est une levure commensale, elle colonise les voies orales, gastro-intestinales et génitales de manière asymptomatique. Cependant, en cas d'une dysbiose ou d'une perturbation de l'intégrité de la barrière cutané-muqueuse et/ou un dysfonctionnement immunitaire de l'hôte, cette espèce devient pathogène opportuniste et provoque des infections superficielles localisées qui peuvent aller jusqu'aux infections systémiques disséminées, potentiellement mortelles (Talapko et al., 2021).

Par ailleurs, la progression et le développement des candidoses sont souvent influencés par des facteurs de virulence, notamment la sécrétion des enzymes hydrolytiques et la formation des biofilms. Ces deux facteurs jouent un rôle important dans la pathogénie de *C. albicans* (Talapko et al., 2021).

Les activités hydrolytiques sont des déterminants importants de la virulence chez *Candida albicans*. Les enzymes hydrolytiques agissent en facilitant l'adhésion microbienne aux cellules hôtes, conduisant ainsi à l'invasion des tissus profonds tout en échappant aux mécanismes de défenses immunitaires [(Chaves et da Silva, 2012) ; (Menezes et al., 2013)]. Toutefois, plusieurs enzymes hydrolytiques sont sécrétées par cette espèce, en particulier les protéases et les phospholipases. Ces enzymes constituent un facteur de virulence important qui contribue à la pathogénie fongique [(Karkowska-Kuleta et al., 2009) ; (Pannanusorn et al., 2023)].

Les protéinases, protéases ou peptidases, sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse des liaisons peptidiques. Selon leurs mécanismes catalytiques, quatre sous classes sont identifiées, à savoir la sérine protéinase, la cystéine protéinase, la métalloprotéinase et l'aspartyl protéinase (Meenambiga et al., 2018).

Chez la levure *Candida*, les aspartyl-protéinases sécrétoires (Sap) sont fortement impliquées dans sa pathogénie. Ces enzymes catalysent la dégradation de protéines humaines telles que l'albumine et les immunoglobulines (Aoki et al. 2011). Grâce à ces enzymes, *C. albicans* réussit à faire face à l'immunité cellulaire et humorale de manière plus efficace en altérant les anticorps et les cytokines [(Hube et Naglik, 2001) ; (Reynaud et al., 2001) ; (Borst et Fluit, 2003)].

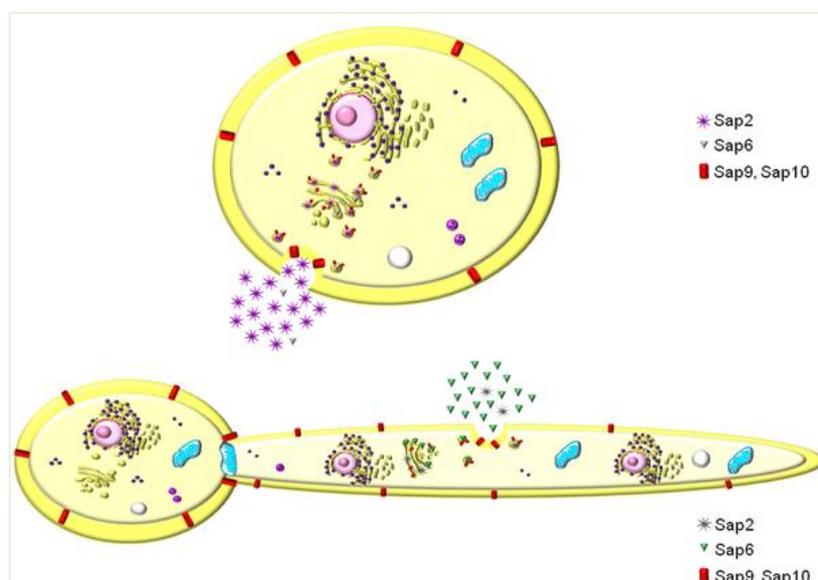
Ces enzymes inhibent la phagocytose des polynucléaires neutrophiles, induisant ainsi des réactions inflammatoires suite à l'activation des  $\beta$ -interleukines et d'autres cytokines [(Beausejour et al., 1998); (Schaller et al., 2005)].

En outre, le niveau d'expression des gènes SAP influence l'activité hydrolytique des protéinases aspartiques, ce qui explique leur rôle dans la pathologie humaine. Ainsi, la virulence de *C. albicans* est liée à l'expression des gènes qui en sont responsables [(Cooper, 2002); (Sardi et al., 2013)].

Le rôle pathogène de cette famille d'enzymes hydrolytiques est évident. *Candida albicans* exprime une famille de dix membres (Sap1 - Sap10) codés par les gènes SAP. L'expression de ces derniers est considérée comme l'un des principaux déterminants de différents types de candidoses [(Zaugg et al., 2001) ; (Meenambiga et al., 2018)].

Ces gènes particuliers sont régulés à différents stades de l'infection, contribuant à la pathogénie de cette espèce, d'où les symptômes cliniques de la candidose (Bruno et al., 2015).

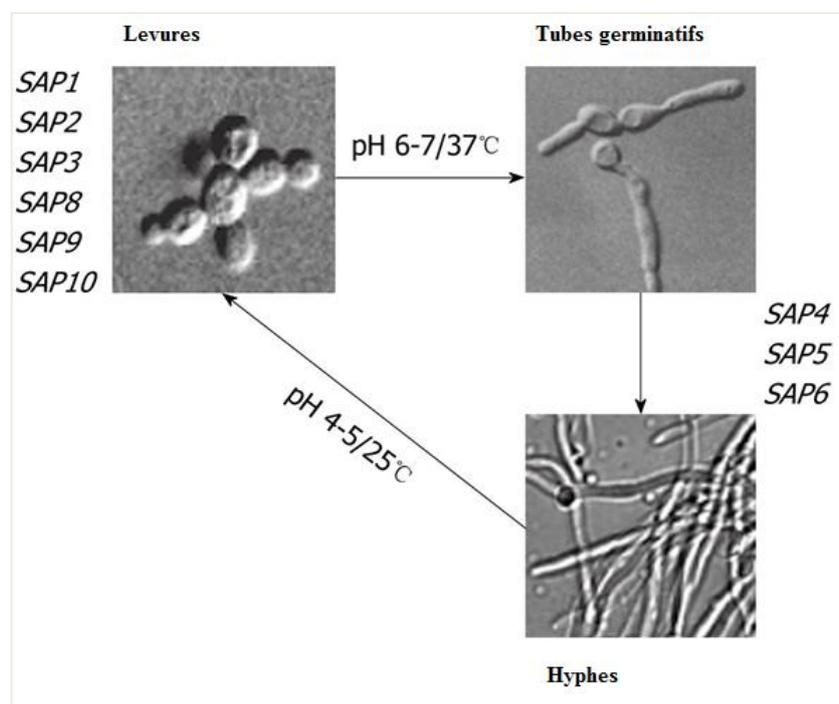
Bien que huit protéinases hydrolytiques (Sap1 - Sap8) soient sécrétées dans l'espace extracellulaire (Figure 02), les enzymes Sap 9 et Sap10 se fixent à la membrane cellulaire de *Candida albicans* grâce à l'interaction avec le glycoposphatidyl-inositol. Ces deux derniers ont des séquences C-terminal typiques n'ayant pas de caractère hydrophobe intra-membranaire (Albrecht et al., 2006), et ne peuvent être libérés dans le milieu extracellulaire qu'après la lyse des cellules de levures (Mayer et al., 2013).



**Figure 02:** Localisation différentielle et sécrétion des enzymes saps de *C. albicans* (Cassone et al., 2016).

En revanche, Sap1, Sap2 et Sap3 jouent un rôle important dans l'adhésion et la formation de biofilm. Ces enzymes hydrolytiques sont nécessaires aux dommages des cellules épithéliales lors d'infections cutanées [(Buu et Chen, 2013) ; (Samaranayake et al., 2013) ; (Bruno et al., 2015)].

Selon (Dos Santos, 2010), les changements de température et de pH influencent directement la transition levures-hyphes ainsi que l'expression des gènes SAP. En ce sens, l'expression de SAP1, SAP3, SAP8 et SAP10 a été détectée dans les cellules de levure, tandis que SAP4, SAP5 et SAP6 a été associée aux formes filamenteuses (Figure 03).



**Figure 03:** Stades morphologiques de *Candida albicans* et expression différentielle des gènes SAP (Dos Santos, 2010).

En fait, un effet synergique de plusieurs iso-enzymes est observé (Kretschmar et al., 2002), les iso-enzymes des protéines Sap4 et Sap6 sont impliqués dans la candidose vulvo-vaginale et à la résistance de *C. albicans* contre l'attaque phagocytaire [(Naglik et al., 2003) ; (Bruno et al., 2015)].

Pour Sap6, cette enzyme joue un rôle essentiel dans le maintien de l'intégrité de la surface cellulaire de *Candida albicans* (Buu et Chen, 2013). Avec Sap5, cette enzyme contribue également à la résistance aux méthylsulfones halogénés (Staniszewska et al., 2015).

Par ailleurs, les dérivés sulfones représentent un groupe de composés synthétiques ayant une activité antifongique (**Xu et al., 2011**). Les méthylsulfones halogénés peuvent inhiber la croissance des cellules planctoniques, l'adhésion, la filamentation et la formation de biofilm chez les espèces de *Candida* (**Staniszewska et al., 2015**).

Il convient de souligner que les recherches menées par **Fallon et al., (1997)** et **Schallet et al., (2003)** ont mis en évidence l'action de la pepstatine comme inhibiteur des protéinases aspartiques lors des premiers stades de l'infection par *Candida albicans*.

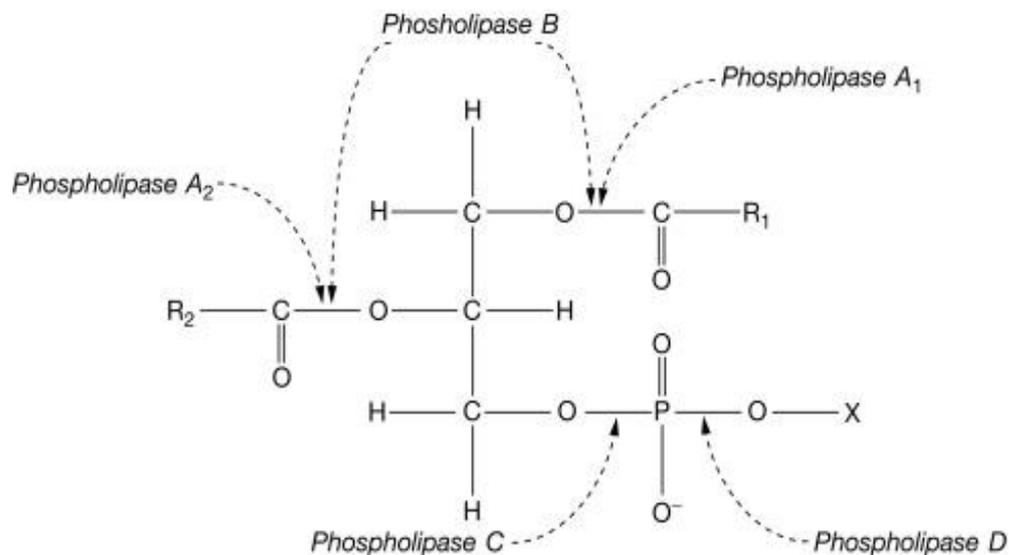
En outre, les phospholipases forment un groupe hétérogène d'enzymes ayant la capacité d'hydrolyser une ou plusieurs liaisons esters des glycérophospholipides, le composant majeur des membranes cellulaires. La synthèse des phospholipases est souche dépendante, elle est considérée comme l'un des principaux paramètres de distinction entre les souches invasives et celles colonisatrices non invasives [(**Cafarchia, et al., 2008**); (**Furlaneto-Maia, et al., 2008**); (**Galán-Ladero et al., 2010**); (**Sachin et al., 2012**)].

Ces enzymes hydrolytiques clivent les phospholipides et affectent la stabilité membranaire car elles hydrolysent les liaisons ester des glycéro-phospholipides sur la membrane des cellules hôtes [(**Yang, 2003**); (**Pandey et al., 2018**)]. Les phospholipases agissent également comme un déterminant important de la pathogénie chez *C. albicans* en éliminant les antigènes de la surface des cellules. De plus, cette enzyme joue un rôle majeur dans la localisation de l'infection et présente une activité cytotoxique sur le tissu hôte (**Sachin et al., 2012**).

La synthèse de ces enzymes hydrolytiques est plus importante sur les extrémités des hyphes, l'activité productive est plus importante lorsque l'hyphes est en contact direct avec la membrane des cellules hôtes. Cela démontre que les phospholipases extracellulaires de *Candida albicans* ont un rôle primordiale dans l'invasion tissulaire [(**Ghannoum, 2000**); (**Yang, 2003**)].

Bien que toutes les phospholipases ciblent les phospholipides comme substrats, chaque enzyme aura la capacité de cliver une liaison ester spécifique (**Figure 04**). Selon leurs modes d'actions et leurs cibles, ces enzymes hydrolytiques appartiennent à quatre classes différentes de phospholipases, désignées par les lettres A, B, C et D [(**Ghannoum, 2000**) ; (**Niewerth et Korting, 2001**)].

En revanche, sept gènes codant sont impliqués dans la synthèse de ces différentes phospholipases; PLA, PLB1, PLB2, PLC1, PLC2, PLC3 et PLD (**Samaranayake et al., 2006**). Selon **Mayer et al., (2013)**, seuls les phospholipases B sont secrétées à l'extérieure des cellules de *C. albicans* et peuvent contribuer à la pathogénie par la rupture des membranes des tissus hôtes.



**Figure 04:** Sites d'hydrolyse des diverses phospholipases (A1, A2, B, C et D). R1 et R2, position des chaînes acyles grasses ; X, groupe de tête phospholipidique (**Calder, 2016**).

La phospholipase A hydrolyse l'un des deux fragments d'acides gras estérifiés du glycérol, cette enzyme a la capacité de provoquer des dommages au niveau des membranes érythrocytaires conduisant à l'hémolyse. Elle est représentée par deux isoenzymes, phospholipase A1 et A2 qui hydrolysent respectivement les phospholipides au niveau des site sn-1 et sn-2 [(**Ghannoum, 2000**) ;(**Arioka et al., 2005**); (**Köhler et al., 2006**)].

La phospholipase B possède trois activités catalytiques distinctes. Une activité hydrolase responsable de l'hydrolyse des liaisons ester aux positions sn-1 et sn-2 des glycérophospholipides, une activité lyso-phospholipase libérant des acides gras et une activité transacylase qui se traduit par la synthèse des phospholipides en transférant un acide gras libre à un lysophospholipide [(**Gassama-Diagne et al., 1989**); (**Saito et al., 1991**); (**Lee et al., 1994**); (**Ghannoum, 2000**); (**Theiss et al., 2006**)].

Cette classe d'enzyme (PLB) est la principale phospholipase sécrétée par *C. albicans* (**Ibrahim et al., 1995**), car seuls les isoenzymes de PLB (PLB1 - PLB5) sont extracellulaires

et peuvent contribuer à sa pathogénie en perturbant les membranes de l'hôte (**Mavor et al., 2005**).

La famille des gènes CaPLB codant pour ces isoenzymes présente une expression plus élevée pendant la phase stationnaire de la croissance de *C. albicans*. Cette expression élevée est également observée dans des conditions favorisant la croissance des hyphes [(**Hoover et al., 1998**); (**Leidich et al., 1998**); (**Ghannoum, 2000**); (**Theiss et al., 2006**)].

La phospholipase C, quant à elle, est une enzyme qui hydrolyse la liaison phosphodiester des phospholipides pour former le 1,2-diacylglycérol et le phosphatidylcholine ou le phosphatidyléthanolamine. Cette enzyme joue un rôle important dans la transduction du signal.

Après son activation, cette enzyme catalyse l'hydrolyse du phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>) produisant deux seconds messagers, l'inositol 1,4,5-trisphosphate (IP<sub>3</sub>) qui induit la libération de Ca<sup>2+</sup> à partir des réserves intracellulaires de Ca<sup>2+</sup> et le diacylglycérol (DAG), ce dernier se lie au domaine C1 et active la protéine kinase C (PKC), d'où l'inflammation [(**Berridge et Irvine, 1984**); (**Nishizuka, 1984**); (**Dennis et al., 1992**); (**Lennartz, 1999**); (**Clapham, 2007**)].

Pour la phospholipase D, elle hydrolyse la deuxième liaison phosphodiester des phospholipides en libérant l'acide phosphatidique et de la choline ou de l'éthanolamine [(**Yang et al., 1967**); (**Ella et al., 1997**)].

Par ailleurs, les estérases et les lipases sont des enzymes ayant la capacité d'hydrolyser les liaisons esters des mono-acyl-glycérols, des di-acyl-glycérols et des tri-acyl-glycérols ou encore, des phospholipides. Les estérases hydrolysent des substrats solubles contenant des chaînes d'acides gras courtes, tandis que les lipases agissent sur des substrats insolubles d'acides gras aux longues chaînes [(**Bornscheuer, 2002**); (**Jaeger et Eggert., 2002**); (**Reetz., 2002**); (**Schaller et al., 2005**)].

**Tellapragada et al., (2014)** ont suggéré que la virulence observée chez les souches de *Candida albicans* peut être attribuée aux effets cytotoxiques des estérases et des lipases dans les tissus hôtes. En effet, l'équipe de **Paraje** avait montré pour la première fois en **2008** que la lipase produite par *C. albicans* déclenche une cytotoxicité et facilite le dépôt de lipides dans les cellules du système immunitaire.

Les estérases sont associées à la pathogénie de *Candida albicans*. En effet, selon **Jayatilake et al., (2005)**, ces enzymes hydrolytiques permettent l'adhésion de cette espèce aux cellules épithéliales et, par conséquent, l'envahissement des tissus. Elles sont responsables du catabolisme des acylglycérols en hydrolysant les liaisons ester des glycérides à courte chaîne ( $\leq 10$ ) (**Tsuboi et al., 1996**). Les estérases sont des enzymes stables à haute température et dans les solvants organiques et résistantes à la protéolyse (**Gácsér et al., 2007**).

Les lipases, quant à elle, sont une classe particulière d'estérases capables d'hydrolyser les esters des glycérides à longue chaîne aliphatique ( $> 10$ ) (**Tsuboi et al., 1996**). Ces enzymes extracellulaires sont codées par dix membres du gène LIP (LIP1 - LIP10); elles jouent un rôle dans la digestion des lipides pour l'acquisition des nutriments, l'adhésion et la pénétration dans les tissus hôtes [(**Staniszewska et al., 2012**); (**Sardi et al., 2013**)]. L'inhibition des lipases contribue à la perte de la virulence de *C. albicans* (**Gácsér et al., 2007**).

La coagulase est une autre enzyme hydrolytique, elle s'attache au fibrinogène plasmatique et provoque la conversion du fibrinogène en fibrine, induisant par conséquent la coagulation du sang, d'où la virulence de *C. albicans*. Cette enzyme est un déterminant biochimique de virulence très important chez la plupart des organismes pathogènes (**Padmajakshi et al., 2014**).

L'activité coagulase chez les espèces de *Candida* contribue à leur virulence (**Mba et Nweze, 2020**). Des études antérieures ont révélé des activités de coagulase variables selon que le plasma provient d'organismes différents (mouton, lapin ou humain). Ces activités peuvent être attribuées à la présence d'enzymes hydrolytiques sur les surfaces cellulaires [(**Becker et al., 2007**); (**Yigit et al., 2008**)].

L'hémolysine est un autre facteur enzymatique de virulence de *C. albicans*. Cette enzyme hydrolytique est responsable de la destruction des globules rouges et de l'acquisition du fer, essentiel à l'adaptation et à la survie des micro-organismes pathogènes. La sécrétion d'hémolysine joue un rôle dans l'invasion des tissus hôtes, l'établissement du processus d'infection et le développement d'une candidose disséminée [(**Luo et al., 2004**); (**Silva et al., 2012**); (**Sardi et al., 2013**); (**Jalal et al., 2019**)].

Bien qu'il est démontré dans plusieurs études que les espèces de *Candida* sont bêta-hémolytiques [(**Chin et al., 2013**); (**Sathiya et al., 2015**); (**Jasim et al., 2016**)], trois catégories d'enzymes hémolytiques existent. La  $\beta$  hémolysine (complète), elle est associée à

la lyse complète des globules rouges. La  $\alpha$  hémolysine (incomplète), qui se traduit par une lyse partielle de la membrane des globules rouges et, en fin, la  $\gamma$  hémolysine (non hémolytique) indique l'absence d'hémolyse.

Toutes ces enzymes sont impliquées dans la perturbation et/ou la lyse des érythrocytes et des leucocytes et participent au processus de l'inflammation [(Luo et al., 2001); (Savardi et al., 2018)]. La production d'hémolysine peut être influencée par des facteurs tels que la concentration de glucose dans le sang, le génotype de la souche des espèces de *Candida* et la présence d'électrolytes. En effet,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{NaCl}$  et  $\text{KCl}$  peuvent entraîner une diminution de la production d'hémolysine chez les espèces de *Candida* (Wan et al., 2015).

Au contraire, l'augmentation de la glycémie peut influencer positivement la production d'hémolysine (Malcok et al., 2009). Paradoxalement, selon une autre étude, le diabète sucré n'a présenté aucune influence sur la virulence de *Candida* (Arslan et al., 2016), suggérant ainsi l'implication simultanée d'autres facteurs de virulence.

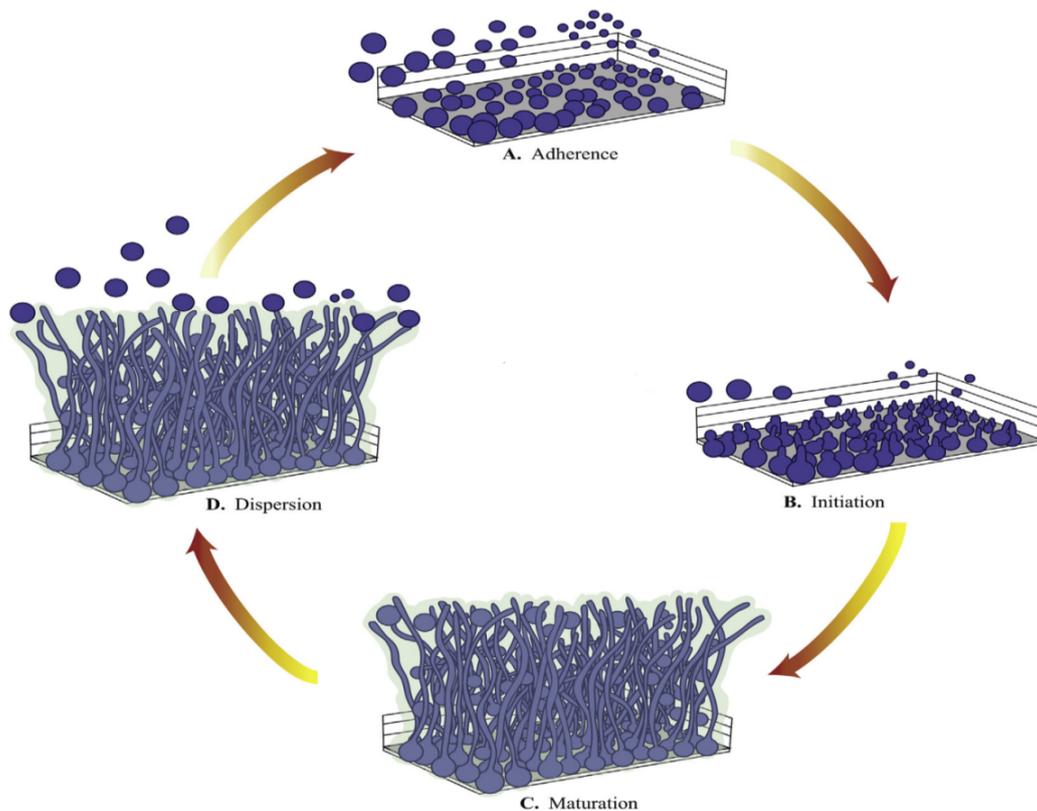
Par ailleurs, les candidoses sont amplifiées non seulement par l'activité d'enzymes hydrolytiques, mais également suit à la formation des biofilms de *C. albicans* (Talapko et al., 2021). Ces derniers constituent une forme de niche qui protège les microorganismes contre le traitement antimicrobien et les défenses immunitaires de l'hôte (Peeters et al., 2008).

Le biofilm est une communauté de micro-organismes, pure ou formé d'espèces mixtes, adhérents à une surface biotique ou abiotique et intégrés dans une matrice extracellulaire. Le comportement phénotypique des cellules, y compris le taux de croissance, et l'expression des gènes sont modifiés par rapport aux cellules planctoniques [(Al-Fattani et Douglas, 2006); (Ghannoum et al., 2015); (Baudin, 2017)].

Les estimations suggèrent que plus de 80% de tous les microorganismes dans l'environnement existent dans des communautés structurées en biofilms (Donlan, 2002). Le développement d'un biofilm est divisé en quatre principales étapes (Figure 05); l'adhésion, la prolifération, la maturation et la dispersion [(Blankenship et Mitchell, 2006) ; (Lohse et al., 2018)].

Au cours de l'étape d'adhésion, les cellules de levure adhèrent au substrat ainsi qu'entre elles en formant une couche basale de biofilm. Plusieurs forces d'attraction et de répulsion interviennent afin d'assurer et de renforcer l'adhésion cellulaire. Cette étape est tributaire de

l'espèce microbienne et de la nature du support [(Nett et Andes, 2006); (Finkel et Mitchell, 2011); (Nobile et al., 2012); (Tournu et Van Dijck, 2012)].

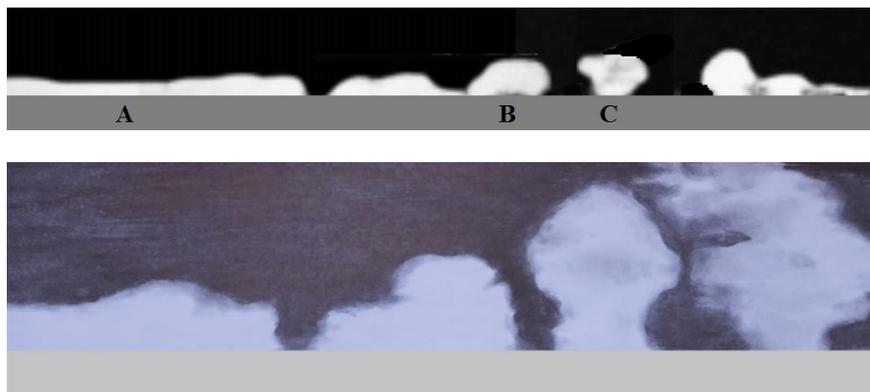


**Figure 05 :** Cycle de vie du biofilm de *Candida albicans*. **(A):** Adhésion des cellules de levures à une surface. **(B):** Initiation de la formation du biofilm, les cellules prolifèrent pour former une couche basale de cellules adhérees au support. **(C):** Maturation du biofilm, des couches complexes de cellules polymorphes se développent et s'enferment dans une matrice extracellulaire. **(D):** Dispersion des cellules de levure qui quittent le biofilm mature pour coloniser de nouveaux sites (Gulati et Nobile, 2016).

Au stade de prolifération, les cellules sessiles de *C. albicans* émettent des prolongements sous forme d'hyphes servant de couche d'ancrage fournissant ainsi une stabilité primaire au biofilm. Ce polymorphisme facilite l'invasion des cellules hôtes en raison de la pénétration active des hyphes (Monds et O'toole, 2008). Des microcolonies se forment et la matrice extracellulaire est synthétisée abondamment. Un échafaudage filamenteux et un matériel non cellulaire forme une monocouche confluyente, ainsi les microcolonies s'unissent par les extensions des hyphes (Ramage et al., 2009).

Durant la maturation des biofilms, la matrice extracellulaire occupe la majeure partie du volume du biofilm et enveloppe toutes les formes cellulaires et filamenteuses de celui-ci. Sa présence est l'un des facteurs clés qui contribuent à l'augmentation de la résistance du biofilm aux antifongiques (Tsui *et al.*, 2016).

Un biofilm mature de *C. albicans* peut comprendre des cellules de levure et des hyphes entrelacés les uns avec les autres et entourés d'une dense matrice extracellulaire auto-produite. Cette dernière est formée de polysaccharides, de chitines, d'ADNe et de protéines; des canaux d'eau qui entrecoupent cette structure tridimensionnelle (Figure 06) qui semble être une propriété commune à presque tous les micro-organismes sessiles [(Kojic et Darouiche, 2004); (Blankenship et Mitchell, 2006); (Hirota *et al.*, 2017)].



**Figure 06 :** Structures tridimensionnelles différentes des biofilm microbiens. A : Forme compacte, B : Forme hétérogène, C : Forme de champignon (Seddiki, 2021).

Les cellules de *C. albicans* peuvent retrouver leur forme planctonique et se dispersent dans le milieu extérieur du biofilm. Cette étape est caractérisée par la libération et la dispersion des cellules de levure vers de nouveaux sites, augmentant ainsi les risques d'infection systémique (Gulati et Nobile, 2016).

La formation des biofilms est toutefois l'un des principaux facteurs de virulence de *Candida sp.* Ces structures microbiennes sont impliquées dans la majorité des infections associées à *Candida* et contribuent aux taux élevés de morbidité et de mortalité [(Tumbarello *et al.*, 2012); (Rajendran *et al.*, 2016)].

Plusieurs maladies sont également liées à la capacité de *C. albicans* à former des biofilms, telles que la candidose oropharyngée, la stomatite prothétique et la candidose vaginale (**Ramage et al., 2009**).

En mode biofilm, les cellules de *Candida* développent une résistance multifactorielle aux antifongiques mécaniquement complexe, limitant l'effet thérapeutique de l'arsenal antifongique (**Gulati et Nobile, 2016**).

De plus, les cellules sessiles de *Candida albicans* communiquent entre elles via un système appelé quorum sensing. Le développement du biofilm, la formation d'hyphes, la production de la matrice extracellulaire et la régulation d'autres processus cellulaires vitaux sont contrôlés par ce système [(**Araujo et al., 2017**); (**Cavalheiro et Teixeira, 2018**)].

Le quorum sensing permet aux microorganismes de réguler une variété de fonctions physiologiques et structurelles. Le milieu environnant les biofilms où ils sont confinés et les conditions physico-chimiques, comme le pH, la température et les nutriments, interagissent positivement ou négativement sur le quorum sensing (**Seddiki, 2021**).

*Candida albicans* peut résister à une large gamme de températures et de pH; l'adaptation au changement de ces paramètres environnementaux est essentielle à la croissance et à la virulence de cette espèce.

L'expression génétique peut être impactée par une altération ou un changement de ces paramètres, ce qui peut entraîner l'induction ou la répression des gènes codant pour des fonctions liées à la virulence (**Hassan et al., 2021**).

En revanche, les enzymes hydrolytiques sont extrêmement sensibles aux conditions environnementales, notamment la température et le pH (**Bousmaha et al., 2007**).

L'activité des lipases fongiques est optimale à un pH neutre à légèrement acide (**Fickers et al., 2008**), tandis que les protéinases aspartiques ne sont généralement actives que dans des intervalles de pH acides, ce qui constitue un avantage pour la croissance de *C. albicans* dans certains tissus hôtes, comme la muqueuse vaginale (**Schaller et al., 2005**).

Les infections fongiques invasives sont difficiles à diagnostiquer et difficiles à traiter. L'augmentation de la résistance aux médicaments antifongiques actuellement utilisés exige des recherches intensifiées et plus ciblées des nouvelles molécules pour contrôler la

pathogénie de *Candida* et pour développer des stratégies thérapeutiques plus efficaces et moins agressives pour l'organisme **(Guevara-Lora et al., 2020)**.

Plusieurs composés bioactifs d'origine végétale ont été explorés pour leur activité antimicrobienne contre les agents pathogènes humains. De nombreuses activités biologiques ont déjà été rapportées pour les extraits de *Traganum nudatum* et *Mentha pulegium* notamment une activité antimicrobienne contre de nombreux micro-organismes **[(Alharbi et al., 2021); (Fatehi et al., 2021)]**.

Selon ces mêmes chercheurs, l'extrait de *M. pulegium* inhibe le développement de *C. albicans*. De plus, l'extrait aqueux de *T. nudatum* a été efficace pour empêcher la prolifération de *Penicillium oxalicum* et *Aspergillus nidulans* **[(Alharbi et al., 2021) ; (Fatehi et al., 2021)]**.

Le caractère opportuniste de la *Candida albicans* est attribué à certains facteurs de virulence. En plus de son aptitude d'adhésion aux dispositifs médicaux et aux cellules hôtes, de changer sa morphologie (dimorphisme) et de former des biofilms, *C. albicans* est capable de se développer dans différentes conditions physiologiques et de synthétiser des enzymes hydrolytiques. Celles ci sont sécrétées à l'extérieure des cellules, ce qui leur confère un rôle crucial dans la pathogénie de cette espèce.

Face à cette situation préoccupante, il a été jugé indispensable de mener cette étude qui examine la virulence biochimique hydrolytique de *Candida albicans*.

Dans cette étude, nous avons examiné l'activité hydrolytique des isolats cliniques de *Candida albicans*, analysé l'impact du pH et de la température d'incubation sur l'activité hydrolytique des enzymes testées, et nous avons évalué l'effet des extraits de plantes sur ces paramètres de virulences.

---

*Deuxième partie*  
*Matériel et méthodes*

---

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

Le matériel biologique utilisé dans cette étude est la levure *Candida albicans*. Quatorze souches de cette espèce nous ont été fournies par M<sup>me</sup> TOUIL Hidaya Fatima Zohra, laboratoire Antibiotiques Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique (LAPSAB) - université de Tlemcen.

Les souches en question ont été prélevées entre novembre 2014 et décembre 2015 à partir de différents dispositifs médicaux (cathéters veineux centraux et sondes urinaires) et ce, après être retirés des patients hospitalisés au CHU de Tlemcen dans les services de neurologie médicale, chirurgie ortho-traumatologie et anesthésie-réanimation.

La souche de référence *C. albicans* ATCC 10231 est utilisée pour le contrôle des tests. Tous les tests sont répétés trois fois pour toutes les souches.

## I. Activité hydrolytique chez *Candida albicans*

L'activité enzymatique est exprimée par la formation d'un halo autour de la colonie microbienne formée sur la gélose. Cette activité enzymatique (Pz) est mesurée en divisant le diamètre de la colonie (D<sub>C</sub>) par celui de la colonie plus la zone de précipitation (D<sub>P</sub>) autour de la colonie formée (**Price et al., 1982**).

$$Pz = D_C / D_P$$

Selon la valeur de Pz, cinq classes peuvent être décrites pour évaluer l'activité enzymatique.

Pz = 1 signifie que l'activité est négative ; alors qu'une valeur de Pz incluse entre 0,99 et 0,90 traduit une très faible activité ; si par contre  $0,89 < Pz \leq 0,80$ , l'activité enzymatique est faible; pour  $0,79 < Pz \leq 0,70$ , l'activité est dite modérée et pour  $Pz < 0,70$ , l'activité est qualifiée de forte.

### 1. Phospholipase

L'activité des phospholipases est déterminée en utilisant la méthode de **Tsang** et ses collaborateurs (**2007**), avec quelques modifications. Brièvement, la gélose au jaune-d'œuf suivante est préparée comme suit ; le Sabouraud dextrose agar (13,0g), le NaCl (11,7g), le CaCl<sub>2</sub> (0,11g) et l'eau distillée (184 mL) sont mélangés et stérilisés à l'autoclave pendant 20 minutes à 120°C. En parallèle, le jaune d'œuf est centrifugé à 3000 g pendant 10 minutes à

4°C, ensuite 20 mL de surnagent sont ajoutés, dans des conditions d'asepsie, à la gélose préalablement préparée.

L'ensemencement est réalisé en déposant 10 µL de la suspension microbienne de *C. albicans* ( $10^8$  cellules/mL) sur la gélose au jaune-d'œuf coulée dans des boîtes de Petri, puis incubés à 37°C pendant 72 heures. L'activité phospholipasique est exprimée en fonction des valeurs Pz obtenues selon la méthode décrite par **Price et al., (1982)**.

## **2. Protéase**

La production des protéases est détectée selon la méthode de **Aoki et al., (1990)**. Pour ce faire, 60 mL d'une solution contenant du  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (0,04 g),  $K_2HPO_4$  (0,5 g), NaCl (1 g), extrait de levure (0,2 g), glucose (4g) et 0,05 g de BSA (Bovine Sérum Albumine) sont préparés (pH= 3,5). Cette solution est ensuite stérilisée puis mélangée avec 140 mL d'agar stérile. 10µL de l'inoculum ( $10^6$  cellules/mL) sont déposés sur la gélose et les boîtes de Petri sont ensuite incubées à 37°C pendant 7 jours. L'activité protéasique est estimée selon la méthode décrite par **Price et al. (1982)**.

## **3. Estérase**

L'activité de l'estérase est évaluée selon le protocole de **Slifkin (2000)** qui consiste à mélanger 10g de peptone, 5 g de NaCl ; 0,1 g de  $CaCl_2$  ; 15 g d'agar et de l'eau distillée (qsp 1L). Après stérilisation à l'autoclave puis refroidissement à 50 °C, 5 mL de tween 80 stériles leur sont ajoutés. Le pH final est 6,8.

Un spot de 10 µL de l'inoculum ( $10^6$  cellules/mL) est déposé sur la gélose coulée dans des boîtes de Petri, puis incubées à 30°C pendant 10 jours. La présence d'un halo transparent autour de la colonie indique une activité positive. La valeur de l'activité estérasique est mesurée selon la méthode décrite par **Price et ses collaborateurs (1982)**.

## **4. Coagulase**

100µL d'une pré-culture de *C. albicans* ( $10^8$  cellules/mL) est ajouté à un tube contenant 500µL de sérum humain. Les tubes sont ensuite incubés à 37 °C. La formation de caillots est vérifiée après 2, 4, 6 ou 24 heures d'incubation à 37 °C (**Yigit et al., 2011**).

## 5. Hémolysine

La gélose Sabouraud additionnée de sang de mouton est le milieu le plus sensible pour démontrer l'effet hémolyse par les espèces de *Candida* (Yigit et Aktas, 2009). Pour ce faire, 7mL de sang frais de mouton sont ajoutés à 100 mL du milieu Sabouraud dextrose agar additionné de glucose (3%). Ensuite, 10  $\mu$ L de l'inoculum ( $10^8$  cellules/mL) sont déposés sur la gélose préalablement coulée dans des boites de Petri. L'incubation est réalisée à 37 °C pendant 48 heures (Manns et al., 1994).

La présence d'un halo translucide distinctif autour de la colonie indique une activité hémolytique positive. Celle-ci se traduit par un anneau totalement translucide indiquant l'hémolysine bêta, ou incomplet (anneau noir verdâtre) pour l'hémolysine alpha, tandis que l'hémolysine gamma reflète une synthèse négative de l'enzyme et donc pas d'anneau autour de la colonie (Luo et al., 2001).

## 6. ADNase

Le milieu de culture utilisé pour déterminer l'activité d'ADNase est fourni par l'institut Pasteur-Alger. Ce milieu contient 20g de Tryptone, 5g de Chlorure de sodium, 2g d'Acide désoxyribonucléique et 15g d'agar. Ce milieu est coulé dans des boites de Petri, puis 10  $\mu$ L de la suspension microbienne de *C.albicans* ( $10^8$  cellules/mL) sont déposés sur la gélose, puis incubés à 37°C pendant 24 h.

Après incubation, les boites sont inondées par une quantité suffisante de solution d'acide chlorhydrique HCl (1N). L'apparition d'une zone transparente autour des colonies après 2 min reflète une activité enzymatique positive (Jeffries et al., 1957).

### II. Activités enzymatiques des cellules sessiles

#### 1. Préparation des inocula

Une pré-culture de *C. albicans* est réalisée sur milieu liquide de Sabouraud, celui-ci est incubé à 30 °C pendant 18 heures.

La culture obtenue est soumise à une centrifugation à 3000g pendant 5minutes à 4 °C. Cette opération est suivie de trois lavages avec du tampon phosphate salin (PBS, pH7,4 ; 10mM). Un dénombrement cellulaire à l'aide d'une cellule de Thoma est effectué afin de fixer la concentration cellulaire à  $10^6$  cellules /mL.

## 2. Formation de biofilm

Après une incubation pendant 18 heures à 30 °C, les souches récupérées de *C. albicans* sont lavées trois fois avec du PBS puis remises en suspension dans le milieu RPMI 1640. L'inoculum est ajusté à 10<sup>6</sup> cellules /mL (**Ramage et al., 2001**).

La technique de coloration au crystal violet (**Christensen et al., 1985**), modifiée par **O'Toole** en **2011** est utilisée pour mesurer la quantité de la biomasse des biofilms microbiens. 100 µL de la suspension levurienne sont alors déposés dans chacun des puits d'une microplaque à 96 puits; celle-ci est ensuite scellée puis incubée à 37°C pendant 24 heures.

Après la formation des biofilms, les puits sont rincés trois fois avec de l'eau de robinet, puis 100 µL de méthanol (99%) leurs sont ajoutés et laissés agir pendant 15 minutes à la température ambiante du laboratoire. Les puits sont rincés encore une fois et 100 µL d'une solution au crystal violet leurs sont ajoutés (0,1% p/v), un temps d'action de 20 minutes à température ambiante est pris en compte. Après rinçage des puits, 150 µL d'acide acétique (33 %) sont ajoutés dans chaque puits pour libérer le crystal violet lié aux biofilms formés.

Pour évaluer la biomasse des biofilms, le contenu des puits est transféré dans une nouvelle microplaque. La densité optique dans chaque puits est lue à 570nm grâce à un lecteur de microplaques (Rayto, RT-2100C).

## 3. Activités enzymatiques en mode sessile

Compte tenu de leur grande importance en pathologie médicale chez *Candida sp*, les activités enzymatiques hydrolytiques des phospholipases, des protéases et des estérases sont étudiées dans cette partie [(**Sardi et al., 2013**); (**Dabiri et al., 2016**); (**Pandey et al., 2018**)].

Afin de montrer d'éventuel lien entre la formation des biofilms et la sécrétion des enzymes hydrolytiques, la méthode de disque de **Chandra et al. (2012)** est utilisée à cet effet. Des plaques à 24 puits et des disques de silicone stériles de 1cm de diamètre sont utilisés. Les disques sont laissés pendant une nuit à 37 °C dans du sérum humain préalablement introduit dans les puits des plaques.

Deux tests sont ensuite effectués en parallèle. Le premier consiste à déposer les disques de silicone directement sur la gélose appropriée à chaque enzyme, préalablement coulée dans des boîtes de Pétri etensemencée par *Candida albicans*. Les boîtes sont ensuite incubées à 37 °C pendant 24 heures avant de révéler l'activité hydrolytique en question.

Le deuxième test est réalisé en transférant les disques dans les puits d'une nouvelle plaque à 24 puits, contenant chacun 1mL du milieu Sabouraud inoculé par *C. albicans* ( $10^6$  cellules /mL). La plaque est ensuite scellée et incubée à 37 °C pendant 24 heures. Une fois les biofilms formés sur les disques, ceux-ci sont à nouveau transférés dans des boîtes de Pétri pour être déposés sur la gélose appropriée à chaque enzyme (phospholipase, protéase et estérase). L'incubation des boîtes est effectuée à 37 °C pendant 24 heures.

### **III. Effet du pH et de la température sur l'activité enzymatique**

Les microorganismes manifestent différemment leurs activités enzymatiques selon les conditions de leurs environnements.

Étant donné que les conditions physiques de température d'incubation et de pH utilisés pour l'évaluation des différentes activités hydrolytiques changent d'un protocole à l'autre (tests expérimentaux précédents), deux températures distinctes (30 °C et 37 °C) sont utilisées afin de vérifier leurs effets.

Puisque les enzymes hydrolytiques ne sont pas actifs aux pH alcalins, elles sont testées aux pH acides et neutres. Les activités des phospholipases et des estérases sont évaluées aux pH 5 et 7 [(Tsang *et al.*, 2007); (Slifkin, 2000)]; tandis que les protéases hydrolytiques sont testées aux pH 3,5 et 7 (Aoki *et al.*, 1990).

#### IV. Effet d'extraits de plantes sur l'activité hydrolytique

##### 1. Extraits de plantes utilisés

Pour tester l'effet antivirulent des plantes vis-à-vis de *Candida albicans*, deux extraits de plantes sont utilisés. L'extrait (E1) d'acétate d'éthyle de *Traganum nudatum* (Ed-dhamrane) et l'extrait (E2) hydro-méthanolique de *Mentha pulegium* (Fliou). L'extrait E1 nous a été fourni par M<sup>me</sup> Faiza Mouderas et E2 par M<sup>elle</sup> Fayza Abbou.

Les solutions mères des extraits sont préparées en solubilisant l'extrait E1 dans le diméthyl sulfoxyde (DMSO, Sigma-Aldrich) et l'extrait E2 dans de l'eau distillée. La stérilisation de ces solutions est réalisée par filtration sur filtre de porosité 0,20 µm.

##### 2. Préparation des inocula

Quatre souches de *Candida albicans* (A6, A8, A11, A13) sont utilisées. La souche de référence, *C. albicans* ATCC 10231, est utilisée également pour le contrôle des différents tests.

Après avoir préparé une pré-culture de 18 heures dans le milieu Sabouraud liquide, une centrifugation de la suspension microbienne obtenue est effectuée (3000g, 5 min, 4°C); celle-ci est suivie par trois lavages successifs du culot en utilisant du PBS stérile (pH 7,4 ; 10mM). Un dénombrement cellulaire est réalisé sur cellule de Thoma en utilisant le microscope optique afin d'ajuster deux concentrations cellulaires, l'une pour les activités estérases et protéases (10<sup>6</sup> cellules/mL) et l'autre pour le test phospholipase (10<sup>8</sup> cellules/mL) [(Aoki et al., 1990); (Slifkin, 2000); (Tsang et al., 2007)].

##### 3. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI)

*Candida albicans* est un micro-organisme important dans la flore normale d'un sujet sain. Cependant, préserver la viabilité de *C. albicans* tout en inhibant le potentiel virulent des enzymes hydrolytiques reste un défi. À cet égard, la présente étude visait à trouver une alternative *In vitro* qui pourrait réduire la virulence de cette levure sans altération vitale de la flore microbienne.

L'utilisation des CMI décroissantes des extraits et le maintien de la valeur CMI de l'AmB et inversement, permettent d'avoir les meilleures combinaisons pour atteindre cet objectif.

### 3.1. CMI des extraits

Les CMI des extraits sont déterminées par la technique de micro-dilution en utilisant des microplaques à 96 puits et ce, en suivant le protocole du Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2008) publié dans le document M27-A3.

Le milieu *Roswell Park Memorial Institute* 1640 (RPMI 1640, Sigma), tamponné à pH 7 par l'acide morpholine propane sulfonique est utilisé (MOPS, Sigma).

À l'aide d'une micropipette, 100 µL de RPMI 1640 sont mis dans les puits des microplaques à 96 puits. 100 µL de la solution mère de l'extrait à tester sont ensuite ajoutés dans les premiers puits, cette opération est suivie d'une série de dilutions de ½ de puits en puits jusqu'au dernier. Enfin, 100 µL de l'inoculum ( $10^6$  cellules /mL) sont répartis dans tous les puits. Les concentrations finales des extraits dans les puits sont comprises entre 3 et 0,02 mg/mL.

Les dernières lignes des microplaques ont servi de témoin positif et négatif, respectivement. Les microplaques sont scellées et incubées à 37°C pendant 24 heures. Les CMI sont ensuite déterminées à l'œil nu.

### 3.2. CMI des extraits en association avec l'amphotéricine B

Dans cette partie, une combinaison entre l'AmB et l'un des deux extraits est réalisée. La solution mère de l'amphotéricine B (1 mg/mL) est préparée en solubilisant celle-ci dans le diméthyl sulfoxyde (DMSO, Sigma). La CMI égale à 0,5 µg /mL de l'amphotéricine B (AmB) utilisée dans cette étude est celle obtenue lors d'une étude précédente vis-à-vis la souche de référence, *Candida albicans* ATCC 10231 (Seddiki et al., 2015).

Dans un premier temps, en fonction des CMI calculées précédemment (section précédente), les extraits E1 et E2 sont introduits dans les puits à des concentrations variables tout en conservant la même concentration finale pour l'AmB (0,5 µg/mL). Pour cela, 100 µL du milieu RPMI 1640 sont mis dans les puits d'une microplaque. 100 µL de l'extrait, E1 ou E2, sont ajoutés ensuite aux premiers puits, cette opération est suivie d'une série de dilution de ½ de puits en puits. 100 µL de l'AmB et 100 µL de l'inoculum ( $10^6$  cellules /mL) sont ajoutés ensuite dans les puits de la microplaque.

Dans la deuxième étape, cette procédure a été inversée ; en d'autres termes, les concentrations des extraits ont été maintenues au même niveau, tandis que l'AmB a été préparé à des

concentrations décroissantes (0,5 à 0,003 µg /mL). Les microplaques sont ensuite scellées et incubées à 37°C pendant 24 heures.

Selon **Vitale et al., (2005)**, la nature de l'interaction est déterminée en calculant l'indice de concentration inhibitrice fractionnaire (ICIF). L'interaction est déterminée en tant que ICIF selon la formule suivante.

$$\text{ICIF} = \Sigma \text{CIF} = \text{CIF}_E + \text{CIF}_{\text{AmB}}$$

$\text{CIF}_E = \text{CMI}_E$  en combinaison /  $\text{CMI}_E$  calculée seule.

$\text{CIF}_{\text{AmB}} = \text{CMI}_{\text{AmB}}$  en combinaison /  $\text{CMI}_{\text{AmB}}$  calculée seule.

L'interprétation des résultats en fonction des valeurs ICIF aboutie à différents effets; la synergie si  $\text{ICIF} \leq 0,5$  ; effet additif si  $0,5 < \text{ICIF} \leq 1$ ; effet indifférent si  $1 < \text{ICIF} < 4$  et antagonisme au cas ou  $\text{ICIF} \geq 4$  (**Mulyaningsih et al., 2010**).

### 3.3. Activité des enzymes hydrolytiques

La technique de contact direct sur gélose (**Silva-Rocha et al., 2015**) est adoptée pour évaluer l'effet des mélanges AmB/Extrait et Extrait/AmB sur l'activité des enzymes hydrolytiques. Les activités enzymatiques (phospholipase, protéase et estérase) sont réalisées selon les protocoles de [(**Tsang et al., 2007**); (**Aoki et al., 1990**) ; (**Slifkin, 2000**)], respectivement. Ces activités sont évaluées en absence et en présence des combinaisons AmB/Extrait.

Avant d'être versé dans les boîtes de Petri, les mélanges AmB/E1, AmB/E2, E1/AmB et E2/AmB sont ajoutés aux géloses appropriées pour chaque enzyme à raison de 1mL de la solution de l'extrait et 1mL de l'AmB et ce, à des concentrations correspondant aux ICIFs relatives aux effets synergiques, précédemment évaluées (section précédente).

Après inoculation, les boîtes sont incubées aux températures appropriées pendant une durée correspondante à chaque activité hydrolytique.

**V. Test statistique**

Le logiciel statistique GEN STAT Discovery, Edition 3, a été utilisé pour l'analyse des données. Les résultats ont été présentés sous forme de moyenne  $\pm$  erreur standard de la moyenne. La comparaison entre les moyennes a été réalisée à l'aide de l'ANOVA et du test à plages multiples de Duncan. Le niveau de signification a été fixé à une valeur  $p < 0,01$ . Les représentations graphiques de type Boxplot ont été réalisés par le logiciel Past software, version 4.03.

---

*Troisième partie*

*Résultats et discussion*

---

### I. Activité hydrolytique chez *Candida albicans*

Il est important de rappeler que l'activité hydrolytique des enzymes de *Candida albicans* conduit souvent à un dysfonctionnement cellulaire et tissulaire [(Manns, 1994) ; (Dabiri et al., 2016)].

Quatorze (14) souches de *C. albicans* sont utilisées dans cette étude. Selon les résultats obtenus, 73,33% parmi elles se sont révélées productrices des phospholipases, tandis que 93,33% étaient positives pour la synthèse des protéases. L'activité des estérases est observée chez 86,66% des isolats, alors que les activités des coagulases et des hémolysines sont observées, respectivement, chez 80 % et 86,66% des souches. Concernant l'ADNase, toutes les souches testées ont présenté une activité négative (**Tableau 01**).

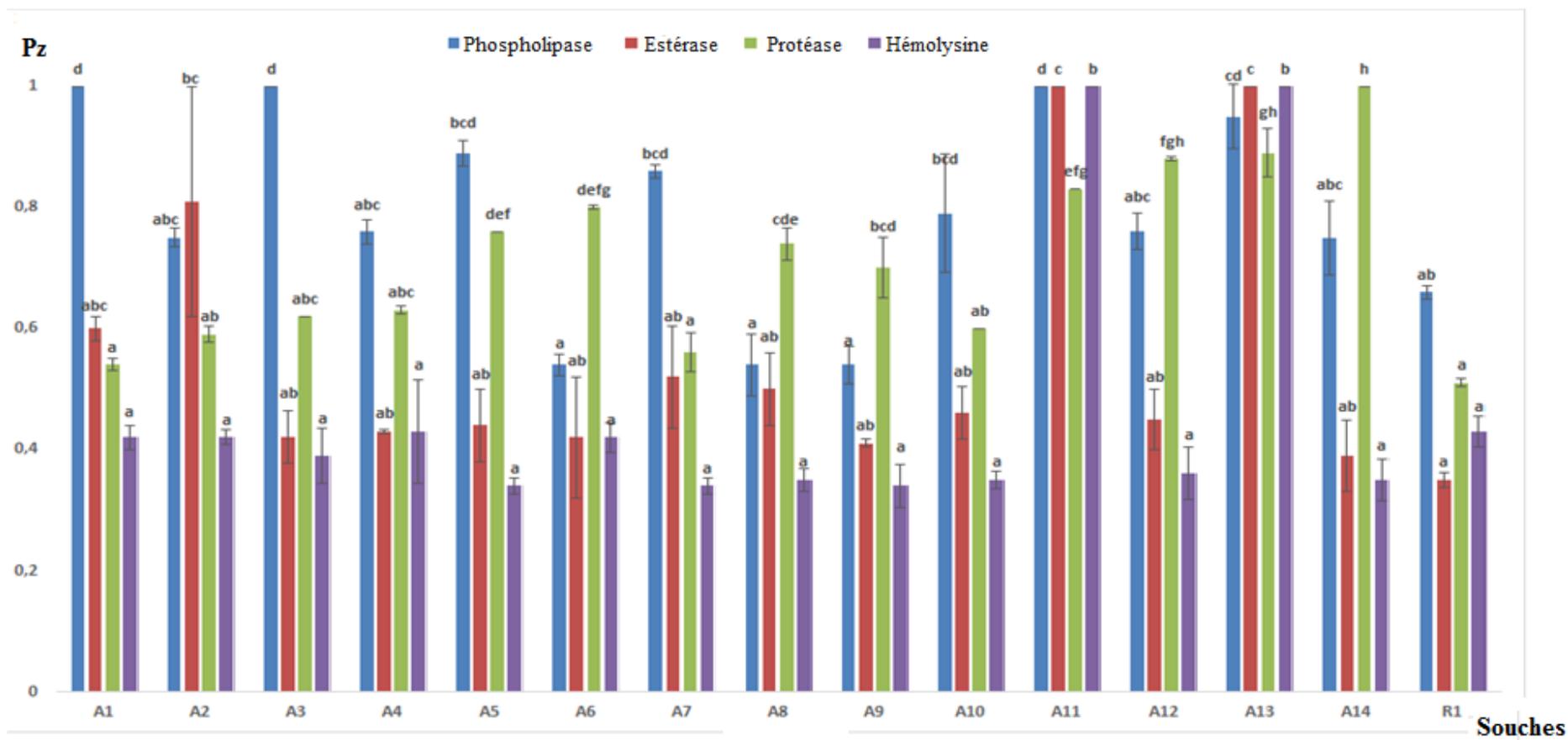
**Tableau 01:** Synthèse des enzymes hydrolytiques chez *C. albicans*.

| <i>C. albicans</i><br>(n=14) | Activités enzymatiques (%) |          |          |           |            |
|------------------------------|----------------------------|----------|----------|-----------|------------|
|                              | Phospholipase              | Protéase | Estérase | Coagulase | Hémolysine |
|                              | 73,33                      | 93,33    | 86,66    | 80        | 86,66      |

D'après les valeurs Pz, calculées à partir des diamètres des halos de précipitation formés autour des colonies de *C. albicans*, les activités hydrolytiques se sont révélées différentes d'une souche à l'autre. En effet, une forte activité enzymatique est observée chez 20%, 40% et 80% des isolats de *C. albicans*, respectivement vis-à-vis des phospholipases, protéases et estérases (**Figure 07**). En revanche, 33,33% et 20 % des souches présentaient respectivement une activité moyenne pour les phospholipases et les protéases ; tandis que seulement 6% des souches présentaient une activité modérée pour l'activité estérasique. Les détails de ces résultats sont regroupés dans l'annexe 01.

Par ailleurs, une faible activité des phospholipases et des protéases est enregistrée chez 13,33% et 33,33% des souches, respectivement. Pour les phospholipases et les estérases, 26,66% et 13,33% des souches n'ont montré aucune activité, tandis que seulement 6,66 % des isolats ont montré une activité protéase négative (**Figure 07**).

D'un autre côté, 86,66% des isolats sont  $\beta$ -hémolysine et 13,34% sont  $\gamma$ -hémolysine, ce résultat signifie que la plupart des souches étudiées présentent une activité hémolytique positive.



**Figure 07:** Activités hydrolytiques des souches de *Candida albicans*. Les histogrammes avec les mêmes lettres ne diffèrent pas significativement selon le test aux plages multiples de Duncan avec un niveau de probabilité de 1 %. Les barres verticales indiquent l'erreur standard. A1-A14 : souches isolées, R1 : *Candida albicans* ATCC10231.

L'analyse statistique des résultats obtenus a montré que seules les souches A11 et A13 présentaient des activités enzymatiques significativement réduites par rapport à *Candida albicans* ATCC 10231 (**Figure 07**). En revanche, dix souches de *C. albicans* (A2, A4-A10, A12 et A14) n'avaient présenté aucune différence significative en ce qui concerne l'activité phospholipasique par rapport à la souche de référence. Ce même constat est observé pour l'activité protéasique chez six souches (A1-A4, A7 et A10).

Par ailleurs, seulement trois souches (A2, A11 et A13) ont présenté une différence significative par rapport à l'activité estérasique de *C. albicans* ATCC 10231. À l'exception des souches A11 et A13 qui ont présenté des activités hémolytiques négatives ( $P_z = 1$ ), tous les isolats avaient une activité hémolysine qui ne différait pas significativement de celle de la souche de référence.

Les résultats précédents suggèrent que la majorité des isolats avaient un potentiel hydrolytique actif ; autrement dit, l'expression de ces activités semble être un facteur de virulence attribué aux souches de *C. albicans* étudiées. Les enzymes hydrolytiques, telles que les protéases, les phospholipases et les hémolysines sont sécrétés par *C. albicans* en permettant donc d'envahir les tissus de l'hôte ou d'autres substrats solides [(**Mathé et Van Dijck, 2013**); (**Tsui et al., 2016**)].

La production des enzymes hydrolytiques par *Candida sp.* peut aider, en fait, à mieux comprendre le processus de la maladie car ces enzymes ont une activité sur un large éventail de substrats hôtes (**Tellapragada et al., 2014**), mais la quantité et le potentiel de l'activité enzymatique sont différents [(**Pakshir et al., 2013**) ; (**Yapar, 2014**)].

Selon **Chin** et ses collègues (**2013**), il a été proposé que la disparité d'activité des exoenzymes chez les espèces de *Candida* puisse être attribuée à des tailles moléculaires variables et des taux de diffusion variés.

Il semble également que les niveaux d'activité enzymatiques extracellulaires sont influencés par le type de milieu incorporé, le temps d'incubation, les sites anatomiquement affecté par des isolats de *Candida*, le type d'échantillons biologiques examinés et les groupes de patients (**Seifi et al., 2015** ; **De Paula Menezes et al., 2016** ; **Sokol et al., 2018**).

**Pinto et al. (2008)** et **De Souza Ramos et al. (2015)** ont respectivement démontré des activités des phospholipases positives chez 99,4 % et 100 % de leurs isolats. Dans ce même contexte, de nombreuses études ont signalé des niveaux élevés d'activité hydrolytique liées à ces enzymes [(**Deepa et al., 2015**); (**De Souza Ramos et al., 2015**); (**De Paula Menezes et al., 2016**); (**Jafari et al., 2017**); (**Aparna et al., 2023**)]. Il convient de noter que ce même constat concorde avec les conclusions de la présente étude.

D'autres résultats ont été rapportés par **Chin et al., (2013)**, **Erum et al., (2020)** et **Jafarian et al., (2021)**; ces auteurs ont précisé que leurs isolats cliniques de *Candida albicans* avaient présenté des activités des phospholipases divers, elles étaient de 75%, 85% et 47,4%, respectivement. Il est observé que différents éléments peuvent influencer la production des phospholipases, tels que le lieu d'isolement, l'état de santé du patient et le type d'infection [(**Brondani et al., 2018**); (**Sokol et al., 2018**)].

Lors de lésions tissulaires, l'activité des phospholipases est extrêmement élevée car ces enzymes hydrolysent une ou plusieurs liaisons esters de glycérophospholipides sur la membrane de la cellule hôte (**Pawar et al., 2014**). Il a été rapporté, par ailleurs, que le nombre de souches testées pour chaque site d'infection dans les différentes études peut influencer les résultats du test de phospholipase (**El Baz et al., 2021**).

Concernant l'activité protéasique, un autre facteur de virulence analysé dans cette étude, elle a été observée chez 93,33% des isolats. De nombreuses études ont également rapporté des taux élevés de cette activité hydrolytique chez *C. albicans* [(**De Souza Ramos et al., 2015** ; **De Paula Menezes et al., 2016** ; **Jafari et al., 2017**) ; (**Gharaghani et al., 2022**)].

Une corrélation importante existe entre la pathogénie et l'activité protéasique chez *C. albicans*. Ce facteur biochimique de virulence est également associé à la durée de l'infection par cette espèce (**Ilkhanizadeh-Qomi et al., 2020**).

La production et l'expression des protéases chez *C. albicans* varient en fonction de différents éléments, tels que le degré d'infection (**Brondani et al., 2018**). En réalité, les gènes SAP se manifestent de manière différente en fonction des souches de *C. albicans*. De plus, leur manifestation dans le laboratoire diffère de leur manifestation *In vivo* (**De Cássia Mardegan et al., 2006**). En fait, en exprimant ces gènes, *C. albicans* pourrait être en mesure de faire face à la phagocytose (**Faria-Gonçalves et al., 2022**).

L'activité d'estérase, l'autre facteur de virulence analysé dans cette étude, a été détecté chez 86,66% des isolats. Ce ci est également en accord avec les résultats obtenus par d'autres chercheurs [(Slifkin, 2000) ; (Yucesoy et Marol, 2003); (Pakshir et al., 2013) ; (Gharaghani et al., 2022); (Aparna et al., 2023)]. En revanche, Deepa et al., (2015) et Noori et al., (2017) ont démontré que près de la moitié des souches de *C. albicans* étaient capables de produire l'estérase.

Dans cette étude, la synthèse d'hémolysine a été observée chez 86,66% des souches cliniques de *Candida albicans* ; ce résultat est inférieur à celui rapporté par Sachin et al., (2012). Une activité hémolytique élevée a été observée dans les études de [(Ghannoum, 2000 ; Pakshir et al., 2013 ; Deepa et al., 2015 ; De Paula Menezes et al., 2016, Jafarian et al., 2022), (Aparna et al., 2023)]. Tous ces résultats indiquent que l'activité des hémolysines peut différer selon les souches cliniques de *C. albicans*.

La production d'hémolysine est un élément intrinsèque de *C. albicans* qui se produit dans des conditions particulières [(Favero et al., 2014) ; (De Paula Menezes et al., 2016)]. Son expression peut être affectée par la concentration de l'inoculum de cette levure et les conditions du milieu [(Chin et al., 2013 ; Nouraei et al., 2020)].

Dans leur étude de 2015, Deepa et ses collègues ont démontré que l'activité de l'hémolysine est impossible lorsque le glucose n'est pas présent dans le milieu de culture. Paradoxalement, une glycémie élevée peut également avoir un impact direct ou indirect sur la production de cette enzyme hémolytique (Tsang et al., 2007).

Selon Yigit et ses collègues (2011), l'association du Sabouraud dextrose agar au sang de mouton semble être le meilleur milieu pour évaluer l'activité hémolytique des espèces de *Candida albicans*.

De plus, étant donné l'importance de l'ion fer dans le processus respiratoire des mammifères, cet élément peut également jouer un rôle crucial dans les fonctions vitales des levures et leur croissance, notamment dans l'activité hémolytique [(Manns et al., 1994) ; (De Paula Menezes et al., 2016)].

Concernant le test de la coagulase, 80% des souches étudiées se sont révélées positives pour cette activité. Contrairement à ce résultat, Padmajakshi et al., (2014) ont rapporté que l'activité de cette enzyme n'était observée que chez 3 % des souches de *C. albicans*. De plus,

**Yigit et al., (2008)** n'ont constaté aucune activité coagulase *In vitro* en utilisant du sérum humain. En utilisant du sérum de lapin, 45,3% de leurs mêmes souches étaient pourtant positives pour la synthèse de cette enzyme. Rappelons que les résultats obtenus dans la présente étude ont été testés avec du sérum humain.

En revanche, plusieurs recherches ont mis en évidence des résultats similaires à ceux de cette étude. Il a été démontré que 69% des isolats de *C. albicans* étaient capables de produire de la coagulase (**Jabeen et al., 2023**). En outre, 40% et 50% des souches de cette espèce ont été testées positivement pour la coagulase, respectivement dans les études de (**Adogo et al., 2020**) et (**Miruka et al., 2023**).

## II. Activités enzymatiques des cellules sessiles

### 1. Formation de biofilm

L'objectif de cette étude était de déterminer les facteurs de pathogénies attribués à la formation des biofilms et à l'activité des enzymes hydrolytiques chez les souches de *Candida albicans*. D'après les résultats obtenus, 53.33% des souches se sont révélées fortement productrices de biofilm, tandis que le reste (46.66%) a montré une capacité moyenne.

Ces résultats montrent que toutes les souches utilisées sont dotées du pouvoir de formation des biofilms et confirment ceux de **Touil et al., (2018)**, qui nous ont fourni les souches de *Candida albicans* utilisées dans cette étude.

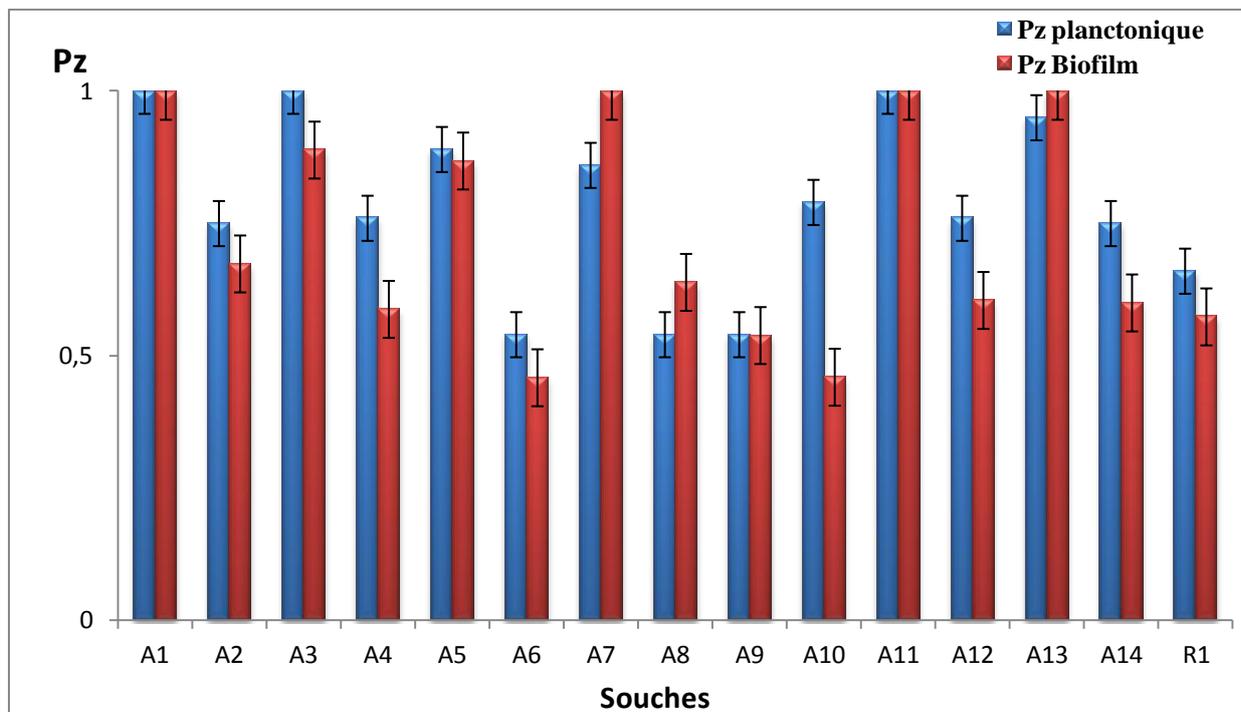
En fait, les souches de *C. albicans* ont le pouvoir de former le biofilm [(**Seghir et al., 2015**) ; (**Dabiri et al., 2018**)]. Pour la première fois en 1999, **William Costerton** et son équipe ont mis en évidence le lien entre la pathogénie microbienne et la formation des biofilms. Cela explique en partie l'importance considérable des biofilms de *C. albicans* dans sa redoutable pathogénie [(**Ghannoum et al., 2000**) ; (**Douglas, 2003**)].

D'autres recherches études ont révélé le potentiel considérable d'adhésion à divers supports et de formation de biofilms chez les isolats de *Candida albicans* [(**Ghannoum et al., 2000**) ; (**Mukherjee et al., 2003**)].

## 2. Activité enzymatique en mode sessile

L'activité hydrolytique des phospholipases est souvent liée à la virulence de *C. albicans* (Sachin et al., 2012). D'après les résultats obtenus, trois quart (73.33%) des souches étudiées ont présenté une activité phospholipase positive en mode sessile, tandis que 26.66% en étaient incapables.

Parmi celles positives, neuf (9) souches de *C. albicans* ont montré une forte activité phospholipase, tandis qu'une faible activité a été observée chez deux souches. Il convient de noter le tandem de la forte activité observé en mode sessile et planctonique chez la souche de référence, *C. albicans* ATCC10231 (Figure 08).

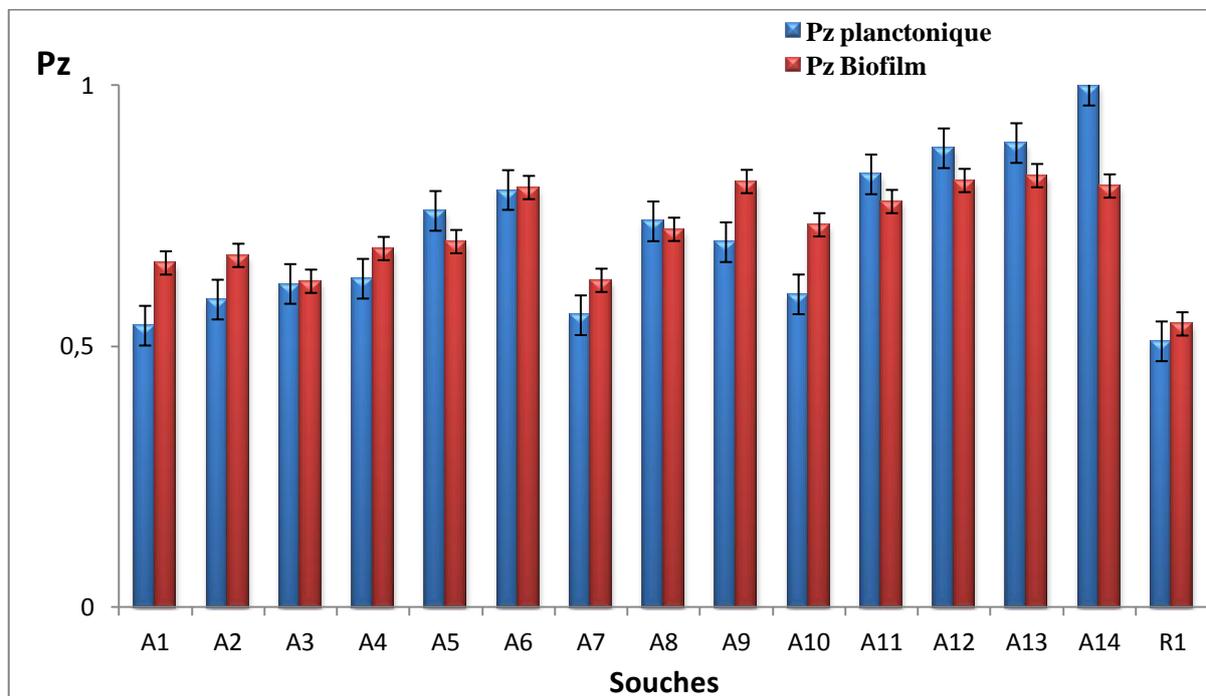


**Figure 08:** Activité de phospholipase chez *Candida albicans* en mode sessile et planctonique. Les barres verticales indiquent l'erreur standard. A1-A14 : souches isolées, R1 : *C. albicans* ATCC 10231.

Les souches A4, A12 et A14 ont montré une activité forte en mode sessile ( $Pz = 0,59 \pm 0,01$  ;  $0,60 \pm 0,03$  ;  $0,6 \pm 0$ , respectivement), cette activité a été qualifiée moyenne en mode planctonique ( $Pz$  respectifs de  $0,760 \pm 0,02$  ;  $0,760 \pm 0,03$  ;  $0,750 \pm 0,06$ ). De même, la faible activité observée chez la souche A2 en mode planctonique est passée à une activité élevée en mode biofilm ( $Pz = 0,67 \pm 0,01$ ).

Par ailleurs, la souche A3 qui était négative pour cette activité en mode planctonique ( $Pz = 1$ ), a présenté une activité phospholipasique positive en mode sessile ( $Pz = 0,89$ ). Remarquablement, l'activité de phospholipase des souches sessiles A11 et A13 n'a pas changé, elle est restée négative ( $Pz = 1$ ).

Concernant l'activité des protéases, les résultats obtenus ont montré que toutes les souches étaient positives en mode sessile (**Figure 09**). Cette activité est restée forte chez *Candida albicans* ATCC10231 en mode de vie biofilm et ce, malgré la légère augmentation de la valeur  $Pz$  ( $0,54 \pm 0,01$ ).

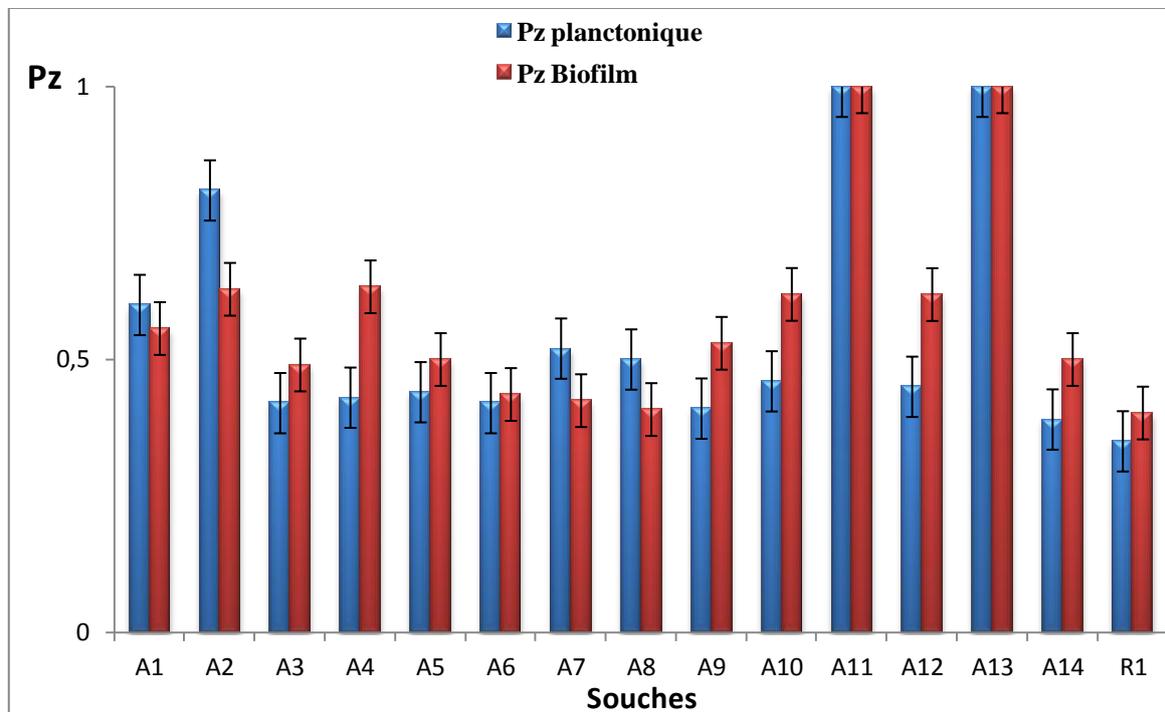


**Figure 09** : Activité des protéases chez *Candida albicans* en mode sessile et planctonique. Les barres verticales indiquent l'erreur standard. A1-A14 : souches isolées, R1 : *C. albicans* ATCC10231.

Le switch de *Candida albicans* du mode de vie planctonique à celui sessile a révélé une augmentation de l'activité des protéases chez les souches A5, A11, A12 et A13. Toutefois, cette activité a connu une baisse chez A1, A2 et A9 et demeure inchangée chez A3, A6 et A8. Ces résultats suggèrent que l'expression des gènes responsables de l'activité hydrolytique des protéases soit liée à la souche, car elle varie d'une souche à l'autre, tant en mode planctonique que en mode biofilm.

D'une manière surprenante, la souche A14 qui était négative pour cette activité hydrolytique en mode planctonique (**Figure 09**), devient positive en mode sessile ( $Pz = 0,81 \pm 0$ ).

Concernant l'activité estérasique, toutes les souches de *Candida albicans* ont montré une activité forte en mode sessile à l'exception des deux souches A11 et A13. Ces deux dernières n'ont présenté aucune activité, ni en mode planctonique ni en mode sessile; ceci étant dit, il pourrait s'agir d'un dysfonctionnement des gènes responsables ou de leur absence totale du génome cellulaire (**Figure 10**).



**Figure 10** : Activité d'estérase chez *Candida albicans* en mode sessile et planctonique. Les barres verticales indiquent l'erreur standard. A1-A14 : souches isolées, R1 : *C. albicans* ATCC 10231.

Selon la **figure 10**, l'activité hydrolytique estérase est accentuée en mode sessile chez les souches A1, A2, A7 et A8 par rapport à celle observée en mode planctonique. Il convient de noter que la souche A2 est passée d'une activité faible en mode planctonique ( $Pz = 0,81 \pm 0,19$ ) à une activité forte en mode biofilm ( $Pz = 0,63 \pm 0,03$ ).

En revanche, cette activité a diminué chez A3, A4, A5, A6, A9, A10, A12 et A14 en mode sessile. Ce résultat est similaire à celui observé chez la souche de référence, *C. albicans* ATCC 10231.

La synthèse d'enzymes hydrolytiques par *Candida albicans* pourrait être influencée par la transition du mode de vie planctonique à celui du biofilm, selon les résultats de cette étude.

Ce constat va dans le même sens avec les observations de **El-Houssaini et al., (2019)** qui ont révélé une corrélation significative positive entre la formation de biofilm et l'activité de phospholipase des souches de *C. albicans*. Cette même observation a été mise en évidence par **Mohammadi** et ses collègues en **2020**.

En effet, des isolats appartenant à cette espèce synthétisent des taux plus élevés de phospholipase en mode sessile (**Sachin et Santosh, 2013**). Ceci dit que la quantité de production de biofilm est directement proportionnelle à l'activité phospholipasique (**Figueredo et al., 2012**).

À contrario, l'équipe de **Samaranayake** documente dans ses recherches que la synthèse des phospholipases n'est pas liée à la production d'autres facteurs de virulence [(**Samaranayake et al., 2005**); (**Samaranayake et al., 2006**)]. De plus, selon **Rajendran et al., (2010)**, aucune association n'existe entre l'activité phospholipasique et la formation de biofilm de *C. albicans*.

En revanche, ces mêmes chercheurs stipulent que la formation de biofilm est associée positivement à l'activité protéolytique chez cette levure (**Rajendran et al., 2010**). Il a également été signalé qu'il existe une corrélation entre l'expression des gènes SAP9 et SAP10 et la forte synthèse de biofilm par les isolats de *C. albicans* (**Kadry et al., 2018**). Selon **Chaffin (2008)** et **Schild et al., (2011)**, ces gènes sont en effet impliqués dans la formation des biofilms de cette espèce.

Selon **Joo** et ses collègues (**2013**), il a été démontré que les communautés cellulaires de *Candida albicans*, qui résident en mode biofilm, produisent davantage de protéines Saps que

les cellules planctoniques. De plus, les niveaux d'expression des gènes SAP5 et SAP9 en mode sessile étaient nettement supérieurs à ceux des cellules planctoniques *In vitro*.

Il a également été démontré que l'activité de Sap5 et Sap6 augmente de manière significative lors de la formation du biofilm. Les biofilms matures montrent une expression beaucoup plus élevée de ces gènes *In vivo* que les cellules planctoniques, confirmant leur pertinence dans les infections provoquées par les biofilms (**Winter et al., 2016**).

Par ailleurs, **Ramage et al., (2012)** ont signalé que les gènes SAP sont sur-exprimés lors de la maturation des biofilms et que SAP8 joue un rôle majeur ; c'est pourquoi l'étude de l'interférence de ces gènes et de la formation de biofilms peut permettre de comprendre la gravité des maladies qui leur sont associées; menant ainsi au développement de nouvelles stratégies pour combattre les infections à *Candida sp.* (**Sachin et Santosh, 2013**).

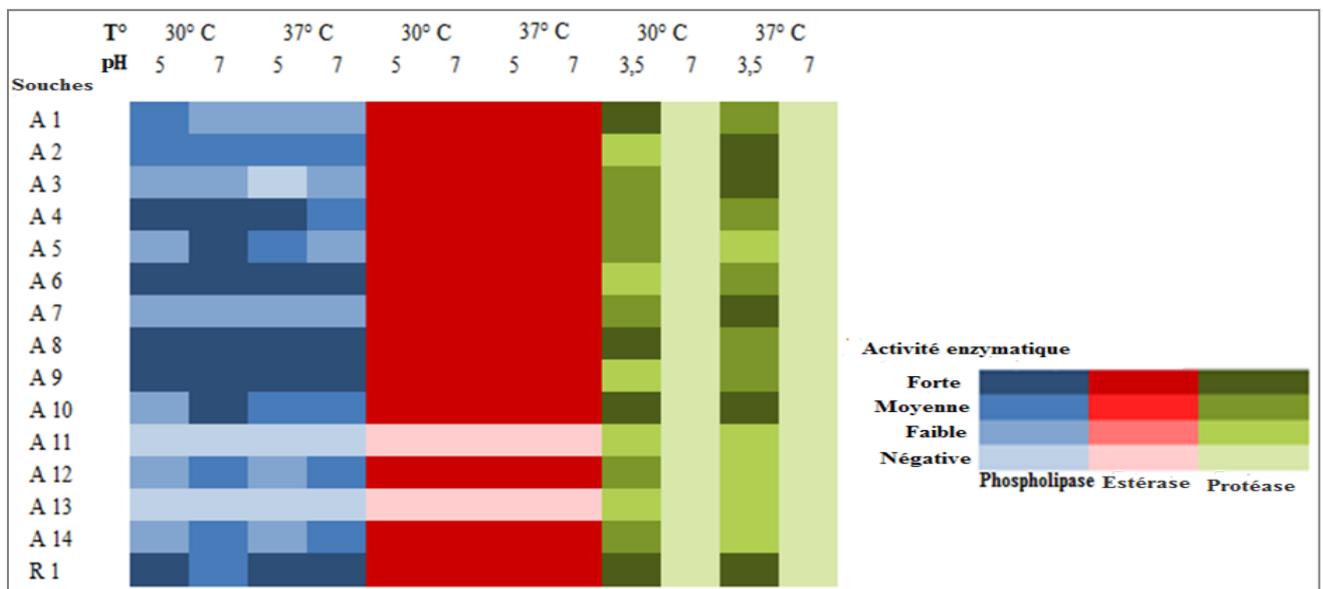
### III. Effet du pH et de la température sur l'activité hydrolytique

Afin de déterminer l'effet des deux paramètres physiques, pH et température d'incubation, sur la synthèse des enzymes hydrolytiques (phospholipase, protéase et estérase), deux pH différents et deux températures différentes ont été considérés pour la réalisation des tests.

La **figure 11** illustre l'ensemble des résultats obtenus sous un aspect dégradé des couleurs. **Annexe 2** regroupe les résultats détaillés des valeurs Pz des tests réalisées.

D'après les résultats obtenus (**Figure 11**), les températures d'incubation et le pH semblent agir différemment sur les niveaux des activités hydrolytiques selon qu'il s'agit de phospholipase, protéase ou estérase.

En effet, aucune activité hydrolytique des protéases n'est observée chez toutes les souches de *Candida albicans* à pH 7; tandis que la majorité d'entre elles exprimaient une forte activité estérasique indépendamment de la température d'incubation ou du pH (**Figure 11**).



**Figure 11:** Niveaux d'activités hydrolytiques de phospholipase, protéase et estérase de *Candida albicans* dans différentes conditions de pH et de température. L'aspect dégradé des couleurs désigne le changement du niveau de l'activité hydrolytique.

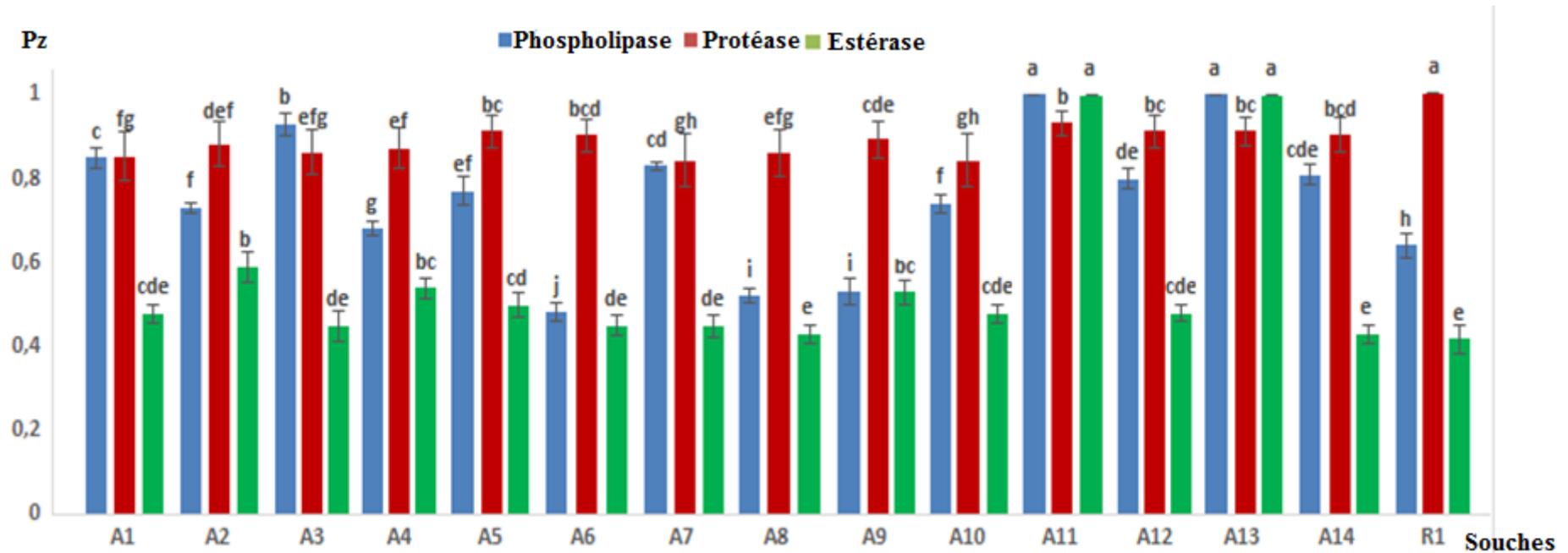
Suite aux changements du pH et de la température d'incubation, les résultats ont montré une différence significative ( $P < 0,01$ ) des activités hydrolytiques des phospholipases et des protéases chez tous les isolats par rapport à *Candida albicans* ATCC 10231. Cependant, les

activités des estérases observées chez A1, A3, A6, A7, A8, A10, A12 et A14 n'étaient pas significatives par rapport à cette souche de référence.

Globalement, malgré le fait que les activités hydrolytiques soient restées inchangées pour certaines souches, les résultats obtenus suggèrent que *C. albicans* possède des activités phospholipasiques et protéasiques variables en fonction du pH et de la température d'incubation. En effet, l'interaction souche-pH-température était significative ( $P < 0,01$ ).

Pour l'activité estérasique, ni le pH ni la température d'incubation n'ont d'influence sur son niveau d'activité (**Figure 11**); la signification de l'interaction souche-pH-température n'a pas été observée pour cette enzyme hydrolytique ( $P = 0,187$ ).

Selon la **figure 12**, à une température de 37°C, la souche A5 qui présentait une faible activité phospholipasique à pH = 7 ( $Pz = 0,86 \pm 0,01$ ), a diminué son activité pour devenir moyenne à pH= 5 ( $Pz = 0,73 \pm 0$ ). Dans ces mêmes conditions physiques d'incubation, l'activité moyenne des phospholipases est devenue forte ( $Pz = 0,74 \pm 0,02$ ) chez la souche A4 ( $Pz = 0,63 \pm 0,03$ ); pourtant, elle a diminué jusqu'au niveau faible chez A12 et A14.



**Figure 12:** Moyennes des valeurs Pz des activités des phospholipases, protéases et estérases chez *C. albicans* à différentes températures d'incubation et de pH. Les lettres non identiques pour la même activité enzymatique indiquent des différences significatives entre les moyennes selon le test de la séparation moyenne de Duncan au seuil critique de 0,01. Les barres verticales indiquent l'erreur standard. A1-A14 : souches isolées, R1 : *Candida albicans* ATCC10231.

### 1. Activité de phospholipase

D'après les résultats obtenus, l'activité de phospholipase était variable suivant les changements de pH et de température d'incubation. Globalement, une activité positive est enregistrée chez 80% des souches utilisées. Dans les conditions d'incubation à 30 °C et de pH égale à 7, une forte activité phospholipasique a été observée chez la moitié (50%) des isolats. Cependant, 25% d'entre eux ont présenté une activité moyenne, 16.66% une faible activité et 8.33% ont présenté une activité très faible (**Figure 12**).

En revanche, à pH = 7 mais à la température de 37°C, seulement un quart (25%) des souches ont présenté une forte activité. Cela signifie que l'augmentation de la température jusqu'à 37°C a provoqué la diminution de cette forte activité chez la moitié de la population qui l'avait à 30°C. En revanche, dans ces mêmes conditions d'incubation (pH = 7, 37°C), une activité phospholipasique moyenne a été exprimée chez 41.66% des souches au lieu de 25% observé à 30°C. Il a également été constaté que 16,66% des isolats exprimaient une activité hydrolytique faible ou très faible.

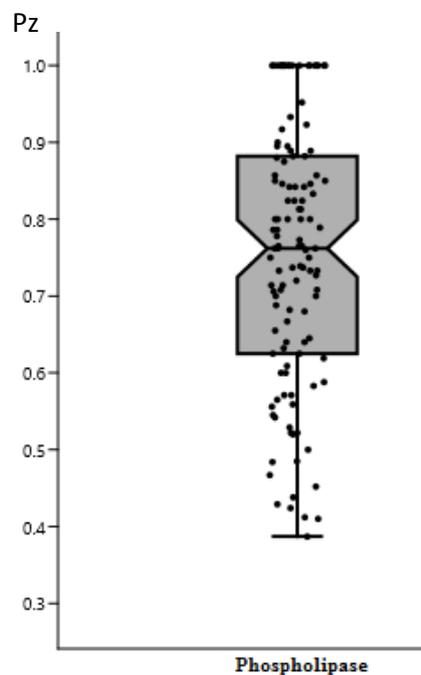
Par ailleurs, à pH = 5 et à la température de 30°C, 33.33% des souches ont présenté une activité forte, 25% des isolats ont présenté une activité moyenne. Une activité faible est observée chez 41.66% des souches de *C. albicans*.

Il convient de noter que dans les conditions d'incubation de 37°C et de pH = 5, l'activité phospholipasique positive a diminué pour atteindre un taux de 73,33 % chez les isolats de *Candida albicans* au lieu de 80% observés ultérieurement. En fait, 36,36% des souches ont exprimé une activité phospholipasique forte, 27,27% avec une activité moyenne et 36,36% avec une faible activité hydrolytique.

D'après **Bornscheuer et al., (2002)**, les phospholipasases microbiennes sont actives sur une large gamme de pH (7 - 9) et de température (30 - 40°C). À la température d'incubation de 30°C, les souches A5 et A10 ont présenté une activité phospholipasique forte à PH = 7, (Pz respectifs de  $0,63 \pm 0,010$  et  $0,64 \pm 0,007$ ). Cependant, ces mêmes souches ont exprimé une faible activité à un pH de 5 (Pz =  $0,83 \pm 0,006$  et  $0,80 \pm 0,02$ , respectivement). A noter que *Candida albicans* ATCC 10231 a exprimé une activité moyenne à un pH de 7 mais une forte activité à pH = 5.

Les souches A12 et A14, ayant présenté une activité moyenne à pH = 7 avec des valeurs Pz respectives de  $0,77 \pm 0,01$  et  $0,76 \pm 0,001$ , ont diminué leurs activités jusqu'à devenir faibles à pH = 5 ( $Pz = 0,86 \pm 0,02$  ;  $0,86 \pm 0,02$ ). Cependant, les souches A6, A8 et A9 ont conservé la même activité forte aux pH expérimentaux de 7 et 5 (**Figure 12**).

**La figure 13** représente les performances enzymatiques hydrolytiques des phospholipases chez *C. albicans* en fonctions des valeurs Pz globales.



**Figure 13** : Représentations graphiques du Box-plot avec distribution scatter plot de l'activité hydrolytique globale des phospholipases chez *C. albicans*.

En se référant à la figure précédente, une médiane s'affiche à une valeur de 0,76 avec un minimum de 0,4 et une valeur maximale de 1. Selon le scatter plot, la distribution de l'activité hydrolytique est hétérogène tandis que le modèle mathématique ne détecte pas de valeurs atypiques.

Selon les résultats obtenus, l'influence de l'un ou de l'autre des deux paramètres physiques étudiés (pH et température) sur l'activité hydrolytique des phospholipases de *Candida albicans* ne semble être intercepté qu'en gardant l'un d'entre eux constant, et vice versa. L'effet

du pH a été effectivement mis en évidence lorsque la température était maintenue constante (30°C et 37°C). De même, l'effet de la température a été observé lorsque le pH était maintenu constant.

Dans ce contexte, plusieurs études ont montré en effet que les facteurs physiques tels que le pH et la température influencent la virulence de *Candida* [(Hazen et Hazen, 1987); (Tsuboi et al., 1989); (Brown et al., 1999) ; (Ramon et al., 1999);(Ernst, 2000); (Lane et al., 2001); (Staib et al., 2001)].

Toutes ces données permettent de déduire que le pH et la température d'incubation jouent un rôle déterminant dans l'activité des phospholipases qui peut évoluer selon la souche. Dans ce même ordre d'idées, Mukherjee et ses collaborateurs ont révélé en 2003 que la phospholipase est sécrétée différemment chez *C. albicans* selon des conditions environnementales variables. Cette activité hydrolytique est exprimée à 30°C et 37°C, tandis que le pH optimal pour son expression est de 5,9.

À l'inverse, Pawar et al., (2014) ont rapporté que cette activité hydrolytique est optimale à un pH de 7. De même, Samaranayake et ses collaborateurs ont montré en 1984 que cette espèce ne peut sécréter de phospholipase que dans un intervalle limité entre 3,6 et 4,7. Ces auteurs ont également souligné que les changements de pH dans la cavité buccale peuvent altérer l'expression normale de la phospholipase; il existe en effet une corrélation significative entre le pH de la salive et l'activité de cette dernière (Thomas et al., 2015).

A la température d'incubation de 37 °C, Fule et ses collaborateurs ont détecté en 2015 une activité de phospholipase chez huit dixièmes (8/10) de leurs isolats de *C. albicans*, dont plus de la moitié avec une activité forte. De plus, Pakshir et al., (2013) ont rapporté que plus de 90 % des souches appartenant à cette espèce avaient une activité de phospholipase forte. De Souza Ramos et al., (2015), pour leur part, affirment que plus de la moitié de leurs isolats avaient exprimé une forte activité de phospholipase, tandis que le reste présentait une activité moyenne.

## 2. Activité de protéase

En ce qui concerne l'activité de protéase, toutes les souches utilisées n'ont présenté aucune activité hydrolytique à pH = 7 et ce, quelque soit la température d'incubation (30°C ou 37°C). Les résultats obtenus ont montré que *Candida albicans* n'exprime aucune activité hydrolytique de protéase à pH 7. Cette observation a été soulignée dans plusieurs études [(Samaranayake *et al.*, 2005); (De Souza Ramos *et al.*, 2015) ; (Sriphannam *et al.*, 2019) ;(Ramos-Pardo *et al.*, 2023)], ces auteurs ont indiqué que l'activité optimale de la protéase est exprimée aux pH acides.

Dans les conditions expérimentales de pH = 3,5 et de température d'incubation de 30°C, 93,33% des souches de *C. albicans* ont exprimé une positive activité des protéases. Parmi celles-ci, 21,42% ont exprimé une activité forte, 42,85% avec une activité moyenne et 35,71% avec une activité faible.

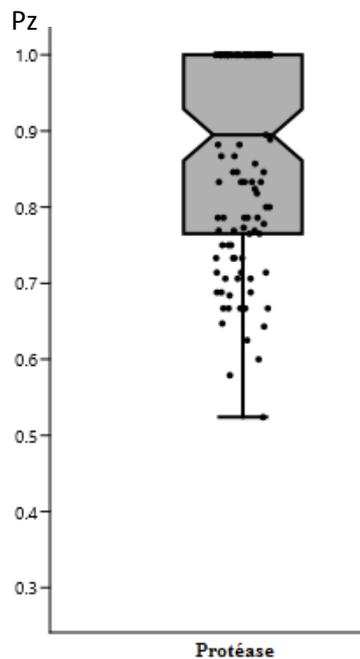
En revanche, avec ce même pH (3,5) mais à la température d'incubation de 37°C, un taux similaire (93,33 %) de souches a été enregistré avec une activité de protéase positive. Cela signifie que cette activité hydrolytique reste constante chez *C. albicans* malgré l'augmentation de la température d'incubation. Parmi celles-ci, 28,57% avaient une forte activité, tandis que le même taux (35,71%) a été observé chez les souches ayant exprimé une activité protéasique moyenne ou faible (**Figure 12**).

Des résultats similaires ont été rapportés par **Sriphannam *et al.*, (2019)** ainsi que **De Souza Ramos *et al.*, (2015)**. Ces chercheurs ont montré que tous leurs isolats de *C. albicans* produisaient de la protéase à pH = 3,5 à 37°C. De plus, **Fatahinia *et al.*, (2017)** et **Miranda *et al.*, (2015)** ont souligné des taux respectifs de 89,1% et 100% chez *C. albicans* ayant une activité protéasique positive à pH = 5 à 37°C.

Par ailleurs, les souches A1 et A8 qui ont révélé une activité forte à 30°C ( $Pz = 0,65 \pm 0,009$ ), ont passé à une activité moyenne à 37°C ( $Pz$  respectifs de  $0,73 \pm 0,029$  et  $0,79 \pm 0,007$ ). Contrairement, les souches A3 et A7 ont passé d'une activité moyenne à 30°C ( $Pz$  respectifs de  $0,76 \pm 0,02$  et  $0,71 \pm 0,02$ ) à un effet hydrolytique fort à 37°C ( $Pz$  respectifs de  $0,68 \pm 0,02$  et  $0,63 \pm 0,03$ ).

A6 et A9 quant à elles, leur activité faible exprimée à 30°C ( $Pz$  respectifs de  $0,84 \pm 0,006$  et  $0,80 \pm 0,03$ ) est passée à moyenne à 37°C ( $Pz$  respectifs de  $0,77 \pm 0,004$  et de

0,75 ± 0,007). Cependant, la souche A10 a conservé sa forte activité, tandis que les souches A11 et A13 ont exprimé la même activité hydrolytique faible à 30°C et à 37°C.



**Figure 14 :** Représentations graphiques du Box-plot avec distribution scatter plot de l'activité hydrolytique globale des protéases chez *C. albicans*.

Selon **la figure 14**, la performance cellulaire pour l'activité hydrolytique des protéases semble avoir une médiane de 0,89, un minimum de 0,52 et un maximum de 1. La distribution scatter plot est hétérogène. Deux groupes inférieurs à la médiane se distinguent en plus d'un autre groupe égal au troisième quartile.

L'activité hydrolytique des protéases chez *Candida albicans* est due à l'activité des gènes SAP, la variabilité de cette activité peut être attribuée à l'expression de ce groupe de gènes qui semble avoir une spécificité isoenzymes/pH optimal [(Hube et al., 1994) ;(White et Agabian, 1995)].

Des différences intéressantes de pH optimales ont été effectivement observées entre ces isoenzymes. En règle générale, l'activité optimale de Sap2, Sap3 et Sap8 a été trouvée dans la plage de pH comprise entre 2,5 et 4,5. Toutefois, ces enzymes demeurent actives jusqu'à un pH de 7. En outre, on constate une activité optimale pour Sap1, Sap4, Sap5, Sap6, Sap7, Sap9

et Sap10 à des pH plus élevés (5 à 6,5) [(Rapala-Kozik et al., 2018) ; Ramos-Pardo et al., 2023)].

Grâce à ces différents pH optimaux, *C. albicans* se dote d'une gamme d'activités protéolytiques positives qui lui sont cruciales envers son hôte, en particulier lorsqu'elle infecte la muqueuse vaginale (pH acide) ou la cavité buccale (pH neutre). [(Capobianco et al., 1992) ; (Wagner et al., 1995)].

Il convient de souligner que lorsque le pH dépasse 7, une dénaturation alcaline irréversible des protéines enzymatiques est constatée. Cette dénaturation est également observée à des températures supérieures à 45°C (De Bernardis et al., 2001).

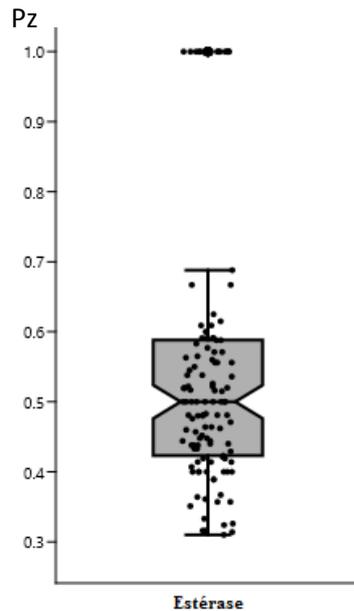
L'étude *In vitro* a démontré que SAP2 se manifeste à des températures allant de 30°C à 37°C (Hube et al., 1994). Toutefois, Monod et ses collègues (1998) ont mis en évidence que la température idéale pour l'expression de SAP8 était de 25°C, ce qui laisse entendre que l'expression de ce gène est température-dépendante.

Il convient de souligner que le pH de l'environnement n'a pas d'impact sur le profil d'expression des protéases de *C. albicans*, mais a un impact sur leur niveau d'expression (White et Agabian, 1995). L'expression de SAP9 et SAP10 est indépendante des conditions de culture, ils s'expriment intégralement dans toutes les formes de croissance [(Felk et al., 2002) ; (Schaller et al., 2003)].

### 3. Activité d'estérase

Les résultats obtenus pour l'activité des estérases ont montré que 86.66% des souches ont une activité positive forte et ce, quelque soit le pH (5 ou 7) ou la température d'incubation (30°C ou 37°C). Aucune différence significative n'est observée entre les valeurs Pz chez toutes les souches, quelles que soient les conditions expérimentales utilisées (pH et T°).

De manière générale, les souches du genre *Candida* produisent de l'estérase à des températures variant de 30°C à 40°C et des pH allant de 6 à 8 [(Chi et al., 2009); (González-Bacero et al., 2010)].



**Figure 15:** Représentations graphiques du Box-plot avec distribution scatter plot de l'activité hydrolytique globale des estérases chez *C. albicans*.

Selon la **figure 15**, la performance cellulaire pour l'activité hydrolytique des estérases semble avoir une médiane de 0,5, un minimum de 0,31 et un maximum de 0,69. Une distribution hétérogène du scatter plot des valeurs Pz, représentée par des valeurs atypiques autour de 1 et des valeurs inférieures à 0,6.

Ces enzymes restent stables aux pH compris entre 4 et 11 (**Mehta et al., 2017**). Néanmoins, certaines estérases sont actives à un pH plus acide ou alcalin (**González-Bacerio et al., 2010**). **Pawar et al., (2014)**, quant à eux, ont rapporté que cette activité hydrolytique est maximale à 37°C.

L'absence d'activité lipolytique n'est pas causée par un manque d'expression génétique, mais plutôt par des conditions de croissance qui ne favorisent pas leur production optimale (**Ramos-Pardo et al., 2023**).

Des études antérieures ont fourni des résultats proches à ceux de la présente étude. **Fatahinia et al., (2015)**, **Noori et al., (2017)** ainsi que **Pandey et al., (2018)** ont révélé que la majorité de leurs souches de *C. albicans* produisaient de l'estérase à une température d'incubation de 30°C. Tandis que **Slifkin (2000)** et **Sriphannam et al., (2019)** ont rapporté que 100 % de leurs isolats exprimaient une activité estérasique à pH = 6,8. Ces auteurs rapportent

néanmoins que leurs résultats sont similaires quelle que soit la température d'incubation, 30 ou 35°C.

Les résultats de **Ramos-Pardo et al., (2023)** ont révélé des différences d'expression de l'activité hydrolytique des estérases. En fait, 90%, 70% et 35% de leurs isolats de *C. albicans* ont respectivement exprimé cette activité aux pH = 5, 6,5 et 7,5. Selon ces mêmes auteurs, le pH est un facteur déterminant pour cette activité chez *C. albicans*, des niveaux de pH plus élevés entraînaient des activités enzymatiques plus faibles.

De plus, **Alami et al., (2017)**, affirment que les intervalles de 27°C - 45°C pour la température et 4,5 - 7 pour le pH sont valables pour la synthèse de lipase par *Candida sp.* Pour **Korbekandi et al., (2008)**, la température et le pH idéaux pour une activité estérasique optimale sont de 30°C et 7.

#### IV. Effet d'extraits de plantes sur l'activité hydrolytique

##### 1. Détermination des CMI

Afin d'évaluer l'effet des extraits E1 et E2 sur l'activité hydrolytique des souches de *Candida albicans*, les concentrations minimales inhibitrices de ces substances ont été déterminées seules et en association avec l'AmB.

##### 1.1. CMI des extraits et de l'AmB

Les résultats obtenus ont montré que les deux extraits avaient un effet inhibiteur contre les souches étudiées. Ces résultats ont montré que la CMI de l'extrait E1 était de 1,5 mg.mL<sup>-1</sup> tandis que celle de l'extrait E2 était égale à 3 mg.mL<sup>-1</sup>; soit deux fois supérieure que celle de l'extrait E1. Ces résultats ont été observés vis-à-vis de toutes les souches testées de *Candida albicans*, y compris la souche de référence (A6, A8, A11, A13, R1).

Les travaux de **Mouderas et al.**, ont révélé en **2019** que *C. albicans* ATCC10231 peut résister à 0,5 mg.mL<sup>-1</sup> de l'extrait d'acétate d'éthyle de *Traganum nudatum*. Cependant, **Aouadhi et al.**, (**2013**) suggèrent que l'extrait méthanolique de *Mentha pulegium* n'a aucun effet antimicrobien contre *C. albicans* aux concentrations inférieures à 50 mg.mL<sup>-1</sup>.

Pour certains chercheurs, les extraits végétaux ne présentent pas tous des effets inhibiteurs vis-à-vis des activités hydrolytiques chez *C. albicans* (**Teodoro et al.**, **2018**)

Pour l'amphotéricine B, la CMI obtenue vis-à-vis de *C. albicans* ATCC10231 (0,5 µg.mL<sup>-1</sup>) a été prise en considération pour les tests qui vont suivre [(**Boucherit-Atmani et al.**, **2011**) ; (**Seddiki et al.**, **2015**)].

##### 1.2. CMI des combinaisons extraits-AmB

Les concentrations minimales inhibitrices des extraits en association avec l'AmB sont déterminées en utilisant les extraits à des concentrations décroissantes tout en maintenant dans un premier temps la même concentration finale de l'AmB (0,5 µg.mL<sup>-1</sup>), puis, dans un deuxième temps, en la diminuant progressivement.

Les valeurs des CMI des combinaisons AmB/E1 et E1/AmB étaient respectivement de 0,5 µg.mL<sup>-1</sup> / 0,002 mg.mL<sup>-1</sup> et 0,375 mg.mL<sup>-1</sup> / 0,003 µg.mL<sup>-1</sup>. Toutefois, celles des

combinaisons AmB/E2 et E2/AmB étaient de  $0,5 \mu\text{g.mL}^{-1} / 0,75 \text{ mg.mL}^{-1}$  et  $1,5 \text{ mg.mL}^{-1} / 0,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , respectivement (**Tableau 02**).

**Tableau 02:** Concentrations minimales inhibitrices des extraits E1 et E2 en association avec l'AmB et indices de concentrations inhibitrices fractionnaires.

| Combinaisons extraits et AmB | AmB/E1<br>( $\mu\text{g.mL}^{-1}/\text{mg.mL}^{-1}$ ) | E1/AmB<br>( $\text{mg.mL}^{-1}/\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) | AmB/E2<br>( $\mu\text{g.mL}^{-1}/\text{mg.mL}^{-1}$ ) | E2/AmB<br>( $\text{mg.mL}^{-1}/\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) |
|------------------------------|---|---|---|---|
| <b>CMI</b>                   | 0,5 / 0,002   | 0,375 / 0,003   | 0,5 / 0,75  | 1,5/ 0,25   |
| <b>ICIF</b>                  | 1,0014  | 0,256   | 1,25  | 1   |

Comparativement aux CMI des deux extraits calculées seules, le mélange d'extraits avec  $0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$  d'AmB (CMI) avait conduit à la diminution de leur concentration d'un facteur de 750 dans la combinaison AmB/E1 et d'un facteur égale à 4 dans celle AmB/E2. Inversement, avec des concentrations inférieures à celles de la CMI de l'AmB, ce facteur n'a diminué que de 1,33 dans la combinaison E1/AmB, or dans le mélange E2/AmB la diminution était de l'ordre de 2.

Selon les descriptions de **Mulyaningsih et al., (2010)**, relatives à l'indice de concentration inhibitrice fractionnaire (**Tableau 02**), un effet synergique pourrait être attribué à la combinaison E1/AmB (ICIF = 0,256). Cependant, un effet légèrement indifférent (ICIF = 1,0014) a été observé avec l'association inverse, AmB /E1.

Par ailleurs, l'association E2/AmB a révélé un effet additif avec un indice ICIF = 1. En revanche, AmB/E2 a montré un effet indifférent avec un indice ICIF = 1,25 (**Tableau 02**).

Les résultats obtenus précédemment ont révélé l'efficacité inhibitrice de l'extrait E1 par rapport à E2. Ces résultats suggèrent également que la combinaison E1/AmB pourrait constituer une approche thérapeutique contre la virulence hydrolytique de *C. albicans*.

## 2. Activité hydrolytique en absence des mélanges AmB/extrait

En absence d'effecteurs (E1, E2 et AmB), l'activité hydrolytique des phospholipases était fortement positive chez *Candida albicans* ATCC 10231, A6 et A8. Les valeurs Pz observées chez ces trois souches étaient de  $0,62 \pm 0,01$  ;  $0,46 \pm 0,05$  ; et  $0,52 \pm 0,04$ , respectivement. Toutefois, les souches A11 et A13 ont montré une activité phospholipasique négative (Pz = 1).

Par ailleurs, les souches de *C. albicans* étudiées ont montré une activité protéasique positive. Pour *C. albicans* ATCC10231, une forte activité a été observée (Pz =  $0,55 \pm 0,02$ ); tandis qu'une activité moyenne a été enregistrée chez les deux souches A6 et A8 (Pz respectifs de  $0,77 \pm 0,004$  et  $0,79 \pm 0,007$ ). A11 et A13, quant à elles, ont montré une activité protéasique faible (Pz respectifs égales à  $0,85 \pm 0,02$  et  $0,84 \pm 0,02$ ).

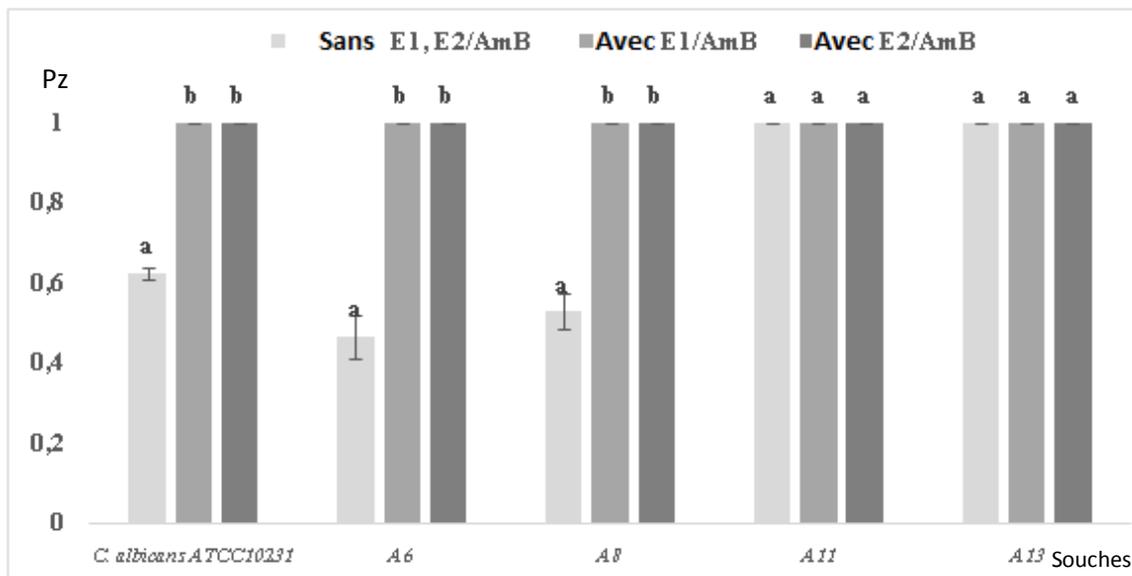
Pour l'activité estérasique, deux souches (A6, A8) ont présenté une forte activité avec une valeur Pz  $\leq 0,63$ . Ces résultats sont comparables à celui enregistré chez *Candida albicans* ATCC10231, la souche de référence. Les deux autres souches (A11 et A13) présentaient cependant une activité estérasique négative (Pz = 1). (**Annexe 03**)

## 3. Activité hydrolytique en présence des mélanges AmB/extrait

Les enzymes hydrolytiques sont des facteurs de virulence chez la levure *Candida albicans*, l'inhibition de leur activités révèle un effet protecteur pour l'hôte [(De Bernardis, 2001); (Hube et Naglik, 2001)]. D'un point de vue pratique, il est important de noter que les antibiotiques sont parfois utilisés en association en raison de leur effet additif ou synergique (Calandra, 2003).

Compte tenu des résultats obtenus, relatifs aux indices de concentrations fractionnaires inhibiteurs (ICIF) et, en tenant compte de la toxicité de l'AmB qui est réduite à des concentrations inférieures à  $0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (Hammond, 1977), les concentrations de  $0,375 / 0,003 \text{ mg.mL}^{-1}/\mu\text{g.mL}^{-1}$  (E1/AmB) et  $1,5 / 0,25 \text{ mg.mL}^{-1}/\mu\text{g.mL}^{-1}$  (E2/AmB), respectivement aux effets synergique et additif, ont été prises en considération dans cette partie d'étude.

Dans ces conditions, l'addition des mélanges E1/AmB et E2/AmB a exercé un effet inhibiteur remarquable sur l'activité phospholipasique (**Figure 16**).



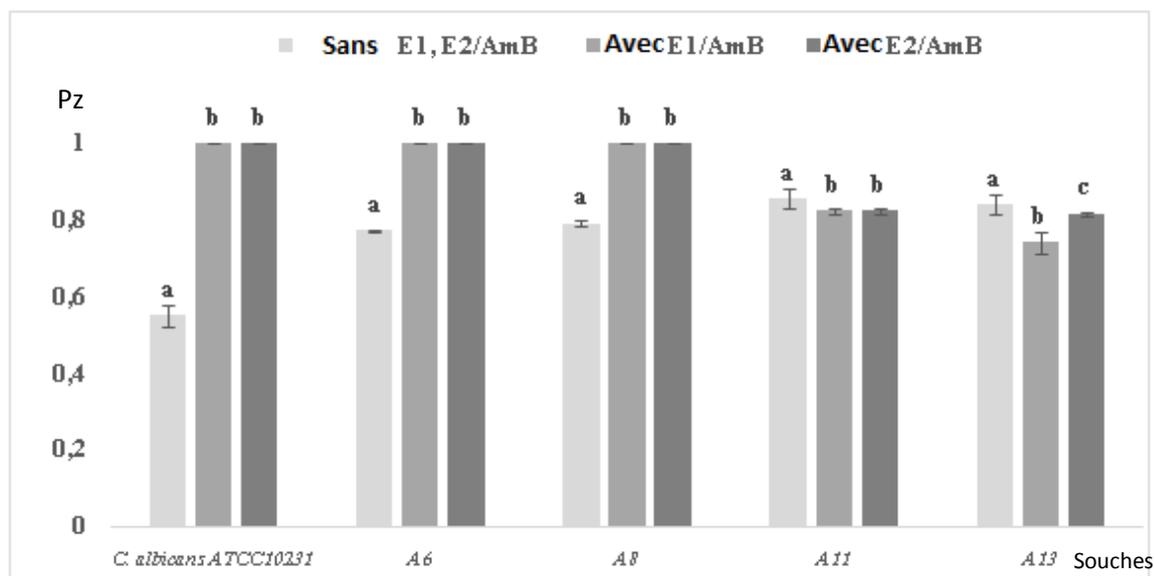
**Figure 16 :** Evaluation *In vitro* de l'activité de phospholipase chez *C. albicans* en absence et en présence des mélanges E1/AmB et E2/AmB. Les barres verticales indiquent l'erreur standard. Les histogrammes représentant la même souche avec les mêmes lettres ne diffèrent pas significativement selon le test à plages multiples de Duncan au niveau de probabilité de 1 %. L'axe des abscisses représente les souches de *C. albicans* utilisées.

L'activité phospholipasique s'est avérée totalement inhibée chez *Candida albicans* ATCC10231, ainsi que chez les souches A6 et A8 ( $P_z = 1$ ). Comparativement avec les résultats obtenus sans ajout d'extraits, la différence significative ( $P < 0,01$ ) enregistrée entre les valeurs  $P_z$  suggère que ces mélanges peuvent avoir un effet anti-virulent intéressant contre cette activité hydrolytique chez *C. albicans* (**Figure 16**).

En revanche, les deux souches A11 et A13 n'ont montré aucune activité phospholipasique, que ce soit en présence ou en absence des mélanges E1/AmB et E2/AmB (**Figure 16**), ce qui semble décrire l'absence des gènes responsables ou leur non-expression.

Pour l'activité protéasique, l'ajout des mélanges E1/AmB et E2/AmB au milieu de culture aux concentrations respectives de 0,375/0,003 mg.mL<sup>-1</sup>/µg.mL<sup>-1</sup> et 1,5/0,25 mg.mL<sup>-1</sup>/µg.mL<sup>-1</sup> a entraîné l'inhibition totale de cette activité hydrolytique chez *Candida albicans* ATCC10231, A6 et A8 (Pz=1). Une différence significative ( $P < 0,01$ ) des valeurs Pz a été enregistrée chez ces trois souches comparativement avec les résultats obtenus sans addition des deux mélanges (Figure 17).

De manière surprenante, une diminution significative des valeurs de Pz a été observée chez les souches A11 et A13 malgré la conservation de leur activité protéasique, qualifiée de légère (Figure 17). Il est important de souligner que le mélange E1/AmB a entraîné une augmentation plus importante de cette activité chez la souche A13.

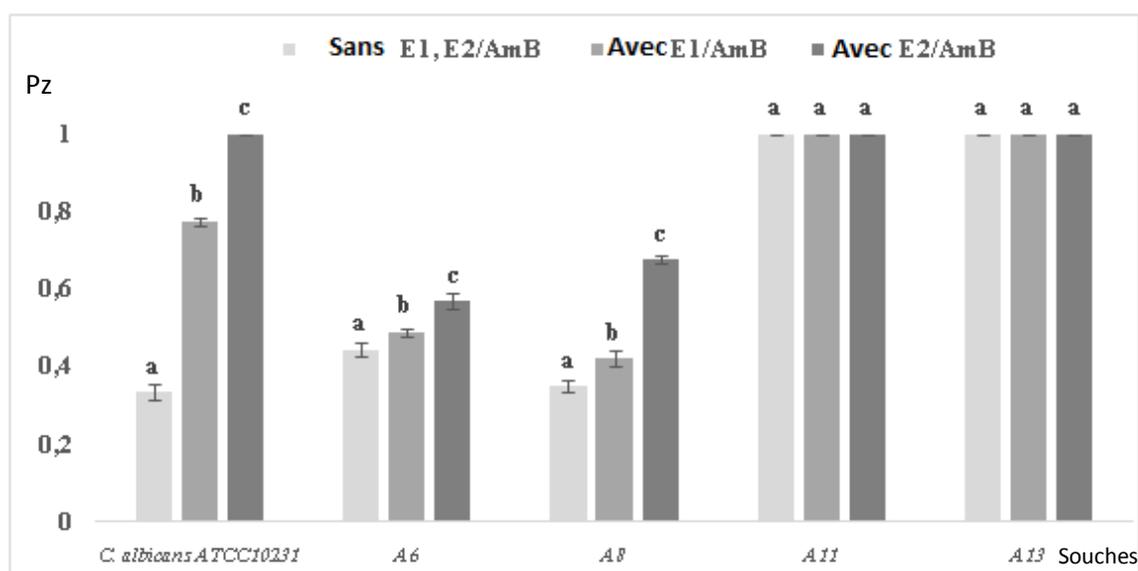


**Figure 17 :** Evaluation *in vitro* de l'activité de protéase chez *C. albicans* en absence et en présence des mélanges E1/AmB et E2/AmB. Les barres verticales indiquent l'erreur standard. Les histogrammes représentant la même souche avec les mêmes lettres ne diffèrent pas significativement selon le test à plages multiples de Duncan au niveau de probabilité de 1 %. L'axe des abscisses représente les souches de *C. albicans* utilisées.

Par ailleurs, les résultats obtenus ont montré que l'ajout de 0,375/0,003 mg.mL<sup>-1</sup>/µg.mL<sup>-1</sup> du mélange E1/AmB dans le milieu de culture contribuait significativement ( $P < 0,01$ ) à la réduction de l'activité estérasique de *C. albicans* ATCC 10231. Cette activité hydrolytique est passée de forte à moyenne (Pz = 0,77 ± 0,01). Pour cette même souche de référence, le

mélange E2/AmB avait exercé une inhibition complète de l'activité hydrolytique des estérases, avec une augmentation significative de la valeur Pz (**Figure 18**).

Pour les souches A6 et A8, l'augmentation significative ( $P < 0,01$ ) des valeurs de Pz n'a pas modifier le niveau de leurs activités hydrolytiques, qualifiées de fortes. Cette observation est enregistrée vis-à-vis des deux combinaisons, E1/AmB et E2/AmB. Malgré cela, ces résultats semblent avoir un effet inhibiteur sur l'activité hydrolytique de l'estérase, notamment avec le mélange E2/AmB.



**Figure 18 :** Evaluation *in vitro* de l'activité de l'estérase chez *C. albicans* en absence et en présence des mélanges E1/AmB et E2/AmB. Les barres verticales indiquent l'erreur standard. Les histogrammes représentant la même souche avec les mêmes lettres ne diffèrent pas significativement selon le test à plages multiples de Duncan au niveau de probabilité de 1 %. L'axe des abscisses représente les souches de *C. albicans* utilisées.

À contrario, aucune activité estérase n'a été observée chez A11 et A13, que ce soit en l'absence ou en présence de mélange E1/AmB ou E2/AmB. On peut également expliquer l'absence de cette activité hydrolytique chez ces deux souches par un manque de gènes responsables ou leurs repression (**Figure 18**).

D'une manière générale, la combinaison extrait/AmB a montré son effet anti-virulent contre les souches de *Candida albicans* en réduisant leurs activités hydrolytiques sans en inhiber la croissance microbienne. Cet effet biologique constitue une alternative qui pourrait être dirigée contre la virulence biochimique de cette espèce appartenant à la flore microbienne naturelle de l'humain. Il est donc préférable de conserver la flore microbienne tout en réduisant sa virulence hydrolytique, plutôt que de l'éradiquer totalement (Tefiani et al., 2020).

Les agents antimycosiques tels que la nystatine et l'amphotéricine B réduisent significativement l'activité de la phospholipase des isolats cliniques des espèces de *Candida*, permettant donc de réduire leur virulence [(Anil et Samaranayake, 2003); (Kothavade et al., 2010)].

De plus, les phospholipases agissent comme des cibles diagnostiques et thérapeutiques potentielles pour un certain nombre de maladies cliniquement importantes (Barman et al., 2018). Cette enzyme hydrolytique est corrélée, par conséquent, à la résistance antifongique et joue un rôle important dans l'augmentation de la diffusion de l'infection (Mba et al., 2020).

La présente étude a révélé des effets inhibiteurs avec différentes CMI d'extraits de plantes en association avec l'AmB. Dans ce contexte, Guo et al., (2009) ont rapporté un effet synergique de l'association Thymol/AmB contre les isolats cliniques de *C. albicans*, évalué par la méthode de micro-dilution.

Récemment, Benziane et al., (2023) ont affirmé dans ce même contexte cet effet inhibiteur de l'association d'extraits de plantes endémiques de la région de Tlemcen en association avec l'AmB. Une activité synergique a été trouvée lorsque l'huile essentielle d'*Origanum glandulosum* a été combinée à l'amphotéricine B contre *Candida albicans*.

D'autres chercheurs affirment que la combinaison extrait/AmB utilisant l'huile essentielle de *Melaleuca alternifolia* et *Ruta graveolens* a un effet fongicide synergique [(El Alama et al., 2017); (Donadu et al., 2021)]. En fait, ce type de recherche *In vitro* constitue un véritable défi en termes de coût et de temps. Compte tenu des effets indésirables et de l'apparition de résistances aux médicaments antifongiques, l'effet synergique est considéré comme un réel gain pour le traitement des candidoses (Cui et al., 2015).

L'ajout des mélanges E1/AmB et E2/AmB au milieu de culture aux concentrations respectives de 0,375/0,003 mg.mL<sup>-1</sup>/μg.mL<sup>-1</sup> et 1,5/0,25 mg.mL<sup>-1</sup>/μg.mL<sup>-1</sup> induit

partiellement ou totalement la réduction des activités hydrolytiques chez *C. albicans*; ce qui suggère que l'effet anti-virulent de ces associations dépend des souches et des enzymes hydrolytiques responsables.

En effet, la diminution de l'activité enzymatique des isolats de *C. albicans* pourrait réduire considérablement leur pouvoir pathogène (Abaci, 2011). En parallèle, des métabolites secondaires des plantes peuvent être impliqués dans l'inhibition de ces enzymes hydrolytiques (Mierziak et al., 2014). Akroum en 2021 a montré que l'extrait éthanolique de *Zingiber officinale* est plus actif que le fluconazole et l'amoxiciline sur la levure *Candida albicans*.

Dans cette optique, Silva-Rocha et al., (2015) ont mis en évidence une forte diminution des activités des phospholipases et des protéases chez *C. albicans* après l'ajout de l'extrait brut d'*Eugenia uniflora* dans le milieu de culture. Gacemi et ses collaborateurs ont montré cinq ans après (2020) que les graines de *Lepidium sativum* inhibent la production des phospholipases.

De plus, Budzynska et ses collaborateurs (2014) ont pu réduire considérablement l'activité enzymatique chez *C. albicans* suite à son traitement avec des huiles essentielles. Ce métabolite secondaire extrait à partir d'*Origanum vulgare* conduit à une réduction significative de l'activité phospholipasique chez les isolats de cette espèce (Brondani et al., 2018 ; Váczi et al., 2024). De même, El-Baz et al., (2021) ont montré que l'huile de romarin était la plus inhibitrice de l'activité phospholipasique comparativement aux huiles de Jasmin, de Cannelle et de clou de girofle.

En outre, Höfling et al., (2011) stipulent que les extraits de plantes présentent un effet réducteur sur l'activité protéasique des souches de *C. albicans*. Bravo-Chaucanés et ses collègues (2022) ont rapporté que l'extrait éthanolique de poivre noir (*P. nigrum*) entraîne une réduction significative de la production des protéases hydrolytiques. De plus, l'extrait méthanolique de la racine de *Juglans regia* affecte la sécrétion de ces enzymes chez *Candida sp.* (Raja et al., 2017).

Bu et al., (2022), ont montré que la phlorétine réprime la sécrétion des enzymes hydrolytiques en diminuant l'expression des gènes codant pour les protéases SAP1, SAP2 et les phospholipases PLB1. En effet, expliquent ces mêmes auteurs, l'utilisation d'extraits végétaux peut représenter une stratégie importante pour contrôler et prévenir les infections, telles que les candidoses. Par conséquent, l'inhibition de l'activité protéolytique des protéases Sap

affaiblit l'invasion des cellules de *Candida albicans*, permettant ainsi aux cellules immunitaires de les éliminer facilement (**Khan et al., 2014**).

Une étude de l'effet inhibiteur d'extrait de *Thapsia garganica* sur la lipase de *Candida rugosa* a montré une activité inhibitrice puissante surtout la partie des graines qui sont riches en polyphénols et présentent une activité antioxydante importante, ont révélé l'effet inhibiteur le plus élevé vis-à-vis de la lipase de *Candida rugosa* (**Halima, 2020**).

Les produits végétaux sont des substances chimiques qui peuvent jouer un rôle antimicrobien essentiel. En outre, les caractéristiques phénotypiques et génotypiques de chaque souche de *Candida albicans* influencent l'activité anti-enzymatique (**Brondani et al., 2018**).

---

*Quatrième partie*

*Conclusion générale*

---

Au cours des dernières décennies, *Candida albicans*, principal agent pathogène responsable des candidoses, a provoqué une hausse importante des infections fongiques, ce qui a entraîné une morbidité et une mortalité considérables.

Certains facteurs de virulence, tels que l'adhésion aux cellules hôtes, le dimorphisme, la production d'enzymes hydrolytiques et la formation de biofilm, expliquent le caractère opportuniste de cette espèce et sa pathogénie ; la résistance aux antifongiques traditionnels a également à cette pathogénie.

L'objet de cette étude porte sur cette problématique, la démarche expérimentale et les résultats obtenus ont permis de tirer les conclusions suivantes :

La majorité des isolats ont une activité hémolytique positive, ce potentiel hydrolytique actif semble être un élément de virulence attribué aux souches examinées de *C. albicans*. Les activités hydrolytiques des souches A11 et A13 étaient nettement inférieures à celles de *Candida albicans* ATCC 10231. En revanche, ces deux souches ainsi que A2, ont montré une différence significative par rapport à l'activité estérasiqque de la souche de référence. De plus, 4/5 des isolats sont positifs à la  $\beta$ -hémolysine. Cependant, cette activité hémolytique est négative chez A11 et A13.

La production de biofilm était forte chez plus de la moitié des souches, tandis que le reste (46,66%) a affiché une capacité moyenne. Cela signifie que chaque souche possède un potentiel fort ou moyen à former des biofilms.

Le switching de *C. albicans* de la vie planctonique à la vie sessile a mis en évidence des changements métaboliques. En effet, près de trois quart des souches étudiées ont présenté une activité phospholipasique positive en mode sessile, tandis que le reste n'en était pas capable. Parmi celles positives, neuf ont démontré une forte activité phospholipasique. La souche de référence, quant à elle, a présenté une forte activité à la fois à l'état sessile et planctonique.

En ce qui concerne l'activité hydrolytique des protéases, toutes les souches se sont révélées positives en mode sessile. L'évolution du mode de vie planctonique de *C. albicans* vers le mode sessile a montré une augmentation de cette activité chez les souches A5, A11, A12 et A13. Néanmoins, cette activité hydrolytique a cependant diminué chez A1, A2 et A9 et est restée inchangée chez A3, A6 et A8. D'après ces résultats, il semble que l'expression des gènes responsables de l'activité hydrolytique des protéases soit liée à la souche, car elle

diffère d'une souche à l'autre, tant en mode planctonique qu'en mode biofilm. Toutes les souches ont montré une activité forte en mode sessile pour l'activité estérasique, à l'exception des deux souches A11 et A13.

Par ailleurs, le pH et la température d'incubation se sont révélés être des facteurs influençant diverses activités hydrolytiques, que ce soit la phospholipase, la protéase ou l'estérase. Bien que certaines souches aient maintenu leurs activités hydrolytiques inchangées, les résultats ont indiqué, en effet, des activités des phospholipases et des protéases variables en fonction du pH et de la température d'incubation. Dans ce contexte, l'analyse statistique des résultats a mis en évidence une interaction souche-pH-température significative. En revanche, l'activité estérasique n'était pas influencée par le pH ou la température d'incubation ; aucune signification de l'interaction souche-pH-température n'a été observée pour les enzymes responsables de cette activité.

La virulence biochimique de *C. albicans* peut être expliquée, en partie, par l'importance de ces enzymes en tant que facteurs de virulence. Selon des études *In vitro*, les combinaisons synergiques et additives d'extrait et d'amphotéricine B ont montré des effets anti-virulents remarquables. Cela peut avoir un impact bénéfique sur la diminution de sa pathogénie.

Les résultats ont démontré que les deux extraits utilisés ont un effet inhibiteur sur les souches examinées. Il a été démontré que la CMI de l'extrait E1 était de  $1,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ , tandis que celle de l'extrait E2 était deux fois supérieure. Les CMI des combinaisons AmB/E1 et E1/AmB étaient respectivement de  $0,5 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1} / 0,002 \text{ mg.mL}^{-1}$  et  $0,375 \text{ mg.mL}^{-1} / 0,003 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Cependant, en ce qui concerne l'extrait E2, les CMI des combinaisons AmB/E2 et E2/AmB étaient de  $0,5 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1} / 0,75 \text{ mg.mL}^{-1}$  et  $1,5 \text{ mg.mL}^{-1} / 0,25 \text{ } \mu\text{g/mL}^{-1}$ , respectivement.

Les concentrations ayant des effets synergiques et additifs ( $0,375 / 0,003 \text{ mg.mL}^{-1} / \mu\text{g}^{-1} .\text{mL}^{-1}$  et  $1,5 / 0,25 \text{ mg.mL}^{-1} / \mu\text{g.mL}^{-1}$  des mélanges respectifs E1/AmB et E2/AmB), ont montré un effet inhibiteur significatif sur l'activité de la phospholipase, une inhibition complète de cette activité hydrolytique chez *C. albicans* ATCC10231, A6 et A8, ainsi qu'un effet inhibiteur sur l'activité hydrolytique de l'estérase, en particulier avec le mélange E2/AmB. Cela laisse entendre que l'effet anti-virulent de ces associations varie en fonction des souches et de l'enzyme hydrolytique cible.

En guise de conclusion, *C. albicans* reste l'un des pathogènes opportunistes les plus répandus chez l'homme, ce qui souligne l'importance d'orienter la recherche vers l'étude des moyens de lutte contre ce champignon en prenant en compte ses facteurs de virulence biochimiques. Afin de continuer les investigations menées par cette étude, il serait pertinent de :

- ✓ Effectuer une analyse moléculaire et génétique afin d'approfondir notre compréhension de la relation entre la formation des biofilms et l'activité hydrolytique.
- ✓ Examiner l'activité hydrolytique chez d'autres espèces de *Candida*.
- ✓ Évaluer l'activité hydrolytique d'autres enzymes.
- ✓ Analyser les propriétés anti-virulentes d'autres extraits de plantes, ainsi que d'autres combinaisons d'extraits et d'agents antifongiques.

---

*Cinquième partie*

*Références bibliographiques*

---

1. Abaci, O. (2011). Investigation of extracellular phospholipase and proteinase activities of *Candida* species isolated from individual's denture wearers and genotypic distribution of *Candida albicans* strains. *Current microbiology*, 62(4), 1308-1314.
2. Adogo, L. Y., Aleruchi, C., & Nfongeh, J. F. (2020). Incidence, Virulence Markers and Antifungal Susceptibility Profile of *Candida* Species among Contraceptive Users in Benue and Niger States, Nigeria. *Nigerian Journal of Microbiology*, 34(2), 5333-5342.
3. Akroum, S. (2021). Activité antimicrobienne des extraits de *Rosmarinus officinalis* et *Zingiber officinale* sur les espèces du genre *Candida* et sur *Streptococcus pneumoniae*. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, 79 (1), 62-69.
4. Alami, N. H., Nasihah, L., Umar, R. L. A., Kuswytasari, N. D., Zulaika, E., & Shovitri, M. (2017). Lipase production in lipolytic yeast from Wonorejo mangrove area. *AIP conference proceedings*, 1854(1), 020001.
5. Albrecht, A., Felk, A., Pichova, I., Naglik, J.R., Schaller, M., de Groot, P., MacCallum, D., Odds, F.C., Schafer, 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*, 281(2), 688-694.
6. Al-Fattani, M. A., & Douglas, L. J. (2006). Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: Chemical composition and role in drug resistance. *Journal of medical microbiology*, 55(8), 999-1008.
7. Alharbi, N. K., Naghmouchi, S., & Al-Zaban, M. (2021). Evaluation of antimicrobial potential and comparison of HPLC composition, secondary metabolites count, and antioxidant activity of *Mentha rotundifolia* and *Mentha pulegium* extracts. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2021, 1-8.
8. Anil, S., & Samaranyake, L. P. (2003). Brief exposure to antimycotics reduces the extracellular phospholipase activity of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. *Chemotherapy*, 49(5), 243-247.
9. 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.

10. Aoki, W., Kitahara, N., Miura, N., Morisaka, H., Yamamoto, Y., Kuroda, K., & Ueda, M. (2011). Comprehensive characterization of secreted aspartic proteases encoded by a virulence gene family in *Candida albicans*. *The journal of biochemistry*, 150(4), 431-438.
11. Aouadhi, C., Ghazghazi, H., Hasnaoui, B., & Maaroufi, A. (2013). Comparaison de l'activité antifongique d'extraits méthanoliques de trois plantes collectées du nord-ouest de la Tunisie. *Microbiologie Hygiène Alimentaire*, 25(73), 9-14.
12. Aparna, T., Raphy, H. M., KS, H. K., & Innu, S. (2023). Phospholipase, proteinase, esterase and haemolytic activity of *Candida* species isolated from oral cavity and its antifungal susceptibility pattern. *International Journal of Research in Medical Sciences*, 11(7), 2476-2482.
13. Araújo, D., Henriques, M., & Silva, S. (2017). Portrait of *Candida* species biofilm regulatory network genes. *Trends in microbiology*, 25(1), 62-75.
14. Arioka, M., Cheon, S. H., Ikeno, Y., Nakashima, S., & Kitamoto, K. (2005). A novel neurotrophic role of secretory phospholipases A2 for cerebellar granule neurons. *Febs letters*, 579(12), 2693-2701.
15. Arslan, S., Koç, A. N., Şekerci, A. E., Tanriverdi, F., Sav, H., Aydemir, G., & Diri, H. (2016). Genotypes and virulence factors of *Candida* species isolated from oralcavities of patients with type 2 diabetes mellitus. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 46(1), 18-27.
16. Barman, A., Gohain, D., Bora, U., & Tamuli, R. (2018). Phospholipases play multiple cellular roles including growth, stress tolerance, sexual development, and virulence in fungi. *Microbiological Research*, 209, 55-69.
17. Baudin, M. (2017). Couplage de rapporteurs génétiques et d'une molécule active pour l'étude de la dispersion de biofilms (Doctoral dissertation, Université Paris Saclay (COMUE)).
18. Beauséjour, A., Grenier, D., Goulet, J. P., & Deslauriers, N. (1998). Proteolytic activation of the interleukin-1 $\beta$  precursor by *Candida albicans*. *Infection and immunity*, 66(2), 676-681.
19. Becker, S., Michalczyk, A., Wilhelm, S., Jaeger, K. E., & Kolmar, H. (2007). Ultrahigh-throughput screening to identify *E. coli* cells expressing functionally active enzymes on their surface. *Chembiochem*, 8(8), 943-949.

20. Benziane, M. Y., Bendahou, M., Benbelaïd, F., Khadir, A., Belhadeh, H., Benaïssa, A., & Muselli, A. (2023). Efficacy of endemic Algerian essential oils against single and mixed biofilms of *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Archives of Oral Biology*, 145, 105584.
21. Berridge, M. J., & Irvine, R. F. (1984). Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature*, 312(5992), 315-321.
22. Blankenship, J. R., & Mitchell, A. P. (2006). How to build a biofilm: a fungal perspective. *Current opinion in microbiology*, 9(6), 588-594.
23. Bornscheuer, U. T., Bessler, C., Srinivas, R., & Krishna, S. H. (2002). Optimizing lipases and related enzymes for efficient application. *Trends in Biotechnology*, 20(10), 433-437.
24. Borst, A., & Fluit, A. C. (2003). High levels of hydrolytic enzymes secreted by *Candida albicans* isolates involved in respiratory infections. *Journal of medical microbiology*, 52(11), 971-974.
25. Boucherit-Atmani, Z., Seddiki, S. M. L., Boucherit, K., Sari-Belkharoubi, L., & Kunkel, D. (2011). *Candida albicans* biofilms formed into catheters and probes and their resistance to amphotericin B. *Journal de mycologie médicale*, 21(3), 182-187.
26. Bousmaha, L., Elmoualdi, L., Ouhssine, M., & El Yachioui, M. (2007). Souche de *Candida guilliermondii* isolée de la saumure de carottes productrice d'une  $\beta$  fructofuranosidase extracellulaire. *Bulletin de la Société de Pharmacie de Bordeaux*, 146, 51-62.
27. Bramono, K., Yamazaki, M., Tsuboi, R., & Ogawa, H. (2006). Comparison of proteinase, lipase and alpha-glucosidase activities from the clinical isolates of *Candida* species. *Japanese journal of infectious diseases*, 59(2), 73-76.
28. Bravo-Chaucanés, C. P., Vargas-Casanova, Y., Chitiva-Chitiva, L. C., Ceballos-Garzon, A., Modesti-Costa, G., & Parra-Giraldo, C. M. (2022). Evaluation of anti-*Candida* potential of *Piper nigrum* extract in inhibiting growth, yeast-hyphal transition, virulent enzymes, and biofilm formation. *Journal of Fungi*, 8(8), 784-805.
29. Brondani, L. P., da Silva Neto, T. A., Freitag, R. A., & Lund, R. G. (2018). Evaluation of anti-enzyme properties of *Origanum vulgare* essential oil against oral *Candida albicans*. *Journal de mycologie médicale*, 28(1), 94-100.

30. Brown Jr, D. H., Giusani, A. D., Chen, X., & Kumamoto, C. A. (1999). Filamentous growth of *Candida albicans* in response to physical environmental cues and its regulation by the unique CZF1 gene. *Molecular microbiology*, 34(4), 651-662.
31. Bruno, V. M., Shetty, A. C., Yano, J., Fidel Jr, P. L., Noverr, M. C., & Peters, B. M. (2015). Transcriptomic analysis of vulvovaginal candidiasis identifies a role for the NLRP3 inflammasome. *MBio*, 6(2), 10-1128.
32. Bu, Q. R., Bao, M. Y., Yang, Y., Wang, T. M., & Wang, C. Z. (2022). Targeting Virulence Factors of *Candida albicans* with Natural Products. *Foods*, 11(19), 2951.
33. Budzyńska, A., Sadowska, B., Więckowska-Szakiel, M., & Różalska, B. (2014). Enzymatic profile, adhesive and invasive properties of *Candida albicans* under the influence of selected plant essential oils. *Acta Biochimica Polonica*, 61(1), 115-121.
34. Buu, L. M., & Chen, Y. C. (2013). Sap6, a secreted aspartyl proteinase, participates in maintenance the cell surface integrity of *Candida albicans*. *Journal of biomedical science*, 20(101), 1-9.
35. Cafarchia, C., Romito, D., Caccioli, C., Camarda, A., & Otranto, D. (2008). Phospholipase activity of yeasts from wild birds and possible implications for human disease. *Sabouraudia*, 46(5), 429-434.
36. Calandra, O. M. (2003). Traitement des infections invasives à *Candida* et *Aspergillus*: quoi de neuf en 2003. *Revue Médicale Suisse*, 1, 22901.
37. Calder, P.C. (2016). Fatty acids: Metabolism. In: *The Encyclopedia of Food and Health*. Oxford, G.B. Academic Press, 632-644.
38. Capobianco, J. O., Lerner, C. G., & Goldman, R. C. (1992). Application of a fluorogenic substrate in the assay of proteolytic activity and in the discovery of a potent inhibitor of *Candida albicans* aspartic proteinase. *Analytical biochemistry*, 204(1), 96-102.
39. Cassone, A., Vecchiarelli, A., & Hube, B. (2016). Aspartyl proteinases of eukaryotic microbial pathogens: from eating to heating. *PLoS Pathogens*, 12(12), e1005992.
40. Cavalheiro, M., & Teixeira, M. C. (2018). *Candida* biofilms: threats, challenges, and promising strategies. *Frontiers in medicine*, 5, 28.
41. Chaffin, W. L. (2008). *Candida albicans* cell wall proteins. *Microbiology and molecular biology reviews*, 72(3), 495-544.
42. Chandra, J., Mukherjee, P. K., & Ghannoum, M. A. (2012). *Candida* biofilms associated with CVC and medical devices. *Mycoses*, 55, 46-57.

43. Chauhan, N., Latge, J. P., & Calderone, R. (2006). Signalling and oxidant adaptation in *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *Nature Reviews Microbiology*, 4(6), 435-444.
44. Chaves, G. M., & Silva, W. P. D. (2012). Superoxide dismutases and glutaredoxins have a distinct role in the response of *Candida albicans* to oxidative stress generated by the chemical compounds menadione and diamide. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 107, 998-1005.
45. Chi, Z., Chi, Z., Zhang, T., Liu, G., Li, J., & Wang, X. (2009). Production, characterization and gene cloning of the extracellular enzymes from the marine-derived yeasts and their potential applications. *Biotechnology Advances*, 27(3), 236-255.
46. Chin, V. K., Foong, K. J., Maha, A., Rusliza, B., Norhafizah, M., Ng, K. P., & Chong, P. P. (2013). *Candida albicans* isolates from a Malaysian hospital exhibit more potent phospholipase and haemolysin activities than *non-albicans Candida* isolates, *Tropical Biomedicine*, 30(4), 654-662.
47. Christensen, G. D., Simpson, W. A., Younger, J. J., Baddour, L. M., Barrett, F. F., Melton, D. M., & Beachey, E. H. (1985). Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *Journal of clinical microbiology*, 22(6), 996-1006.
48. Clapham, D. E. (2007). Calcium signaling. *Cell*, 131(6), 1047-1058.
49. CLSI. (2008) Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard-third edition; CLSI document M27-A3. *Clinical and Laboratory Standards Institute*.
50. Cooper, J. B. (2002). Aspartic proteinases in disease: a structural perspective. *Current drug targets*, 3(2), 155-173.
51. Costerton, J. W., Stewart, P. S., & Greenberg, E. P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 284(5418), 1318-1322.
52. Cui, J., Ren, B., Tong, Y., Dai, H., & Zhang, L. (2015). Synergistic combinations of antifungals and anti-virulence agents to fight against *Candida albicans*. *Virulence*, 6(4), 362-371.
53. Dabiri, S., Shams-Ghahfarokhi, M., & Razzaghi-Abyaneh, M. (2016). SAP (1-3) gene expression in high proteinase producer *Candida* species strains isolated from

- Iranian patients with different candidosis. *Journal of pure and applied microbiology*, 10(3), 1891-1896.
54. Dabiri, S., Shams-Ghahfarokhi, M., & Razzaghi-Abyaneh, M. (2018). Comparative analysis of proteinase, phospholipase, hydrophobicity and biofilm forming ability in *Candida* species isolated from clinical specimens. *Journal de Mycologie Médicale*, 28(3), 437-442.
55. Das, V. M., & Ballal, M. (2008). Actividad proteínasa y fosfolipasa como factores de virulencia en especies de *Candida* aisladas de sangre. *Revista Iberoamericana de Micología*, 25(4), 208-210.
56. De Bernardis, F., Sullivan, P. A., & Cassone, A. (2001). Aspartyl proteinases of *Candida albicans* and their role in pathogenicity. *Sabouraudia*, 39(4), 303-313.
57. De Cássia Mardegan, R., Foglio, M. A., Gonçalves, R. B., & Höfling, J. F. (2006). *Candida albicans* proteinases. *Brazilian Journal of Oral Sciences*, 5(16), 944-952.
58. De Paula Menezes, R., de Melo Riceto, É. B., Borges, A. S., de Brito Röder, D. V. D., & dos Santos Pedroso, R. (2016). Evaluation of virulence factors of *Candida albicans* isolated from HIV-positive individuals using HAART. *Archives of Oral Biology*, 66, 61-65.
59. De Souza Ramos, L., Barbedo, L. S., Braga-Silva, L. A., dos Santos, A. L. S., Pinto, M. R., & da Graça Sgarbi, D. B. (2015). Protease and phospholipase activities of *Candida spp.* isolated from cutaneous candidiasis. *Revista Iberoamericana de Micologia*, 32(2), 122-125.
60. Deepa, K., Jeevitha, T., & Michael, A. (2015). In vitro evaluation of virulence factors of *Candida* species isolated from oral cavity. *Journal of Microbiology and antimicrobials*, 7(3), 28-32.
61. Dennis, E. A., Deems, R. A., & Yu, L. (1992). Extracellular phospholipase A2. *Neurobiology of Essential Fatty Acids*, 318, 35-39.
62. Donadu, M. G., Peralta-Ruiz, Y., Usai, D., Maggio, F., Molina-Hernandez, J. B., Rizzo, D., & Chaves-Lopez, C. (2021). Colombian essential oil of *Ruta graveolens* against nosocomial antifungal resistant *Candida* strains. *Journal of Fungi*, 7(5), 383.
63. Donlan, R. M. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging infectious diseases*, 8(9), 881.
64. Dos Santos Silva, K. G., do Nascimento, G. O., da Silva, E. E. M., Cabral, L. H. V., Faria, T. M. R., & de Oliveira, J. R. (2024). *Candida albicans*: Virulence factors,

- pathogenesis, and ways to diagnose and control its infection. *Research, Society and Development*, 13(1), e6413144781.
65. Dos Santos, A. L. S. (2010). HIV aspartyl protease inhibitors as promising compounds against *Candida albicans*. *World Journal of Biological Chemistry*, 1(2), 21.
66. Douglas, L. J. (2003). *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends in microbiology*, 11(1), 30-36.
67. El Alama, H., El Aissami, A., Benmoussa, A., Said, A. A. H., Arahou, M., & El Alaoui-Faris, F. E. (2017). Cinétique des interactions huile essentielle-antifongique Kinetics of the essential oil-antifungal interactions. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, 86, 67-77.
68. El-Baz, A. M., Mosbah, R. A., Goda, R. M., Mansour, B., Sultana, T., Dahms, T. E., & El-Ganiny, A. M. (2021). Back to nature: combating *Candida albicans* biofilm, phospholipase and hemolysin using plant essential oils. *Antibiotics*, 10(1), 81.
69. El-Houssaini, H. H., Elnabawy, O. M., Nasser, H. A., & Elkhatib, W. F. (2019). Correlation between antifungal resistance and virulence factors in *Candida albicans* recovered from vaginal specimens. *Microbial pathogenesis*, 128, 13-19.
70. Ella, K. M., Meier, K. E., Kumar, A., Zhang, Y., & Meier, G. P. (1997). Utilization of alcohols by plant and mammalian phospholipase D. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology life*, 41(4), 715-724.
71. Ernst, J. F. (2000). Transcription factors in *Candida albicans*—environmental control of morphogenesis. *Microbiology*, 146(8), 1763-1774.
72. Erum, R., Samad, F., Khan, A., & Kazmi, S. U. (2020). A comparative study on production of extracellular hydrolytic enzymes of *Candida* species isolated from patients with surgical site infection and from healthy individuals and their co-relation with antifungal drug resistance. *BMC microbiology*, 20, 1-12.
73. Fallon, K., Bausch, K., Noonan, J., Huguenel, E., & Tamburini, P. (1997). Role of aspartic proteases in disseminated *Candida albicans* infection in mice. *Infection and immunity*, 65(2), 551-556.
74. Faria-Gonçalves, P., Oliveira, A. S., Gaspar, C., Rodrigues, L., Palmeira-de-Oliveira, R., Martinez-de-Oliveira, J., & Rolo, J. (2022). Vulvovaginal *Candida albicans* Clinical Isolates' Resistance to Phagocytosis *In-Vitro*. *Life*, 12(6), 838.

75. Fatahinia, M., Halvaezadeh, M., & Rezaei-Matehkolaei, A. (2017). Comparison of enzymatic activities in different *Candida* species isolated from women with vulvovaginitis. *Journal de mycologie medicale*, 27(2), 188-194.
76. Fatahinia, M., Poormohamadi, F., & Mahmoudabadi, A. Z. (2015). Comparative study of esterase and hemolytic activities in clinically important *Candida* species, isolated from oral cavity of diabetic and non-diabetic individuals. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 8(3), e20893.
77. Fatehi, N., Benmehdi, H., Allali, H., Sahel, N., & Oulednecir, N. (2021). Evidence-based antifungal potential of some traditional medicinal plants, from the Bechar region (Southwest Algeria). *Indian journal of natural products and resources*, 12(1), 68-73.
78. Favero, D., Furlaneto-Maia, L., França, E. J., Góes, H. P., & Furlaneto, M. C. (2014). Hemolytic factor production by clinical isolates of *Candida* species. *Current microbiology*, 68, 161-166.
79. Felk, A., Kretschmar, M., Albrecht, A., Schaller, M., Beinhauer, S., Nichterlein, T., & Hube, B. (2002). *Candida albicans* hyphal formation and the expression of the Efg1-regulated proteinases Sap4 to Sap6 are required for the invasion of parenchymal organs. *Infection and immunity*, 70(7), 3689-3700.
80. Fickers, P., Destain, J., & Thonart, P. (2008). Les lipases sont des hydrolases atypiques: principales caractéristiques et applications. *Biotechnologie, agronomie, société et environnement*, 12(2), 119-130.
81. Figueredo, L. A., Cafarchia, C., Desantis, S., & Otranto, D. (2012). Biofilm formation of *Malassezia pachydermatis* from dogs. *Veterinary microbiology*, 160(1-2), 126-131.
82. Finkel, J. S., & Mitchell, A. P. (2011). Biofilm formation in *Candida albicans*. In: *Candida and candidiasis*, 2<sup>nd</sup> Edition. Washington DC. American Society for Microbiology Press, 299-315.
83. Fitzpatrick, D. A., Logue, M. E., Stajich, J. E., & Butler, G. (2006). A fungal phylogeny based on 42 complete genomes derived from supertree and combined gene analysis. *BMC evolutionary biology*, 6, 1-15.
84. Fule, S. R., Das, D., & Fule, R. P. (2015). Detection of phospholipase activity of *Candida albicans* and *non albicans* isolated from women of reproductive age with vulvovaginal candidiasis in rural area. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 33(1), 92-95.

85. Furlaneto-Maia, L., Specian, A. F., Bizerra, F. C., de Oliveira, M. T., & Furlaneto, M. C. (2008). *In vitro* evaluation of putative virulence attributes of oral isolates of *Candida spp.* obtained from elderly healthy individuals. *Mycopathologia*, 166, 209-217.
86. Gacemi, S., Benarous, K., Imperial, S., & Yousfi, M. (2020). Lepidine B & E as new target inhibitors from *Lepidium sativum* seeds against four enzymes of the pathogen *Candida albicans*: *in vitro* and *in silico* studies. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Immune, Endocrine & Metabolic Disorders)*, 20(1), 127-138.
87. Gácsér, A., Trofa, D., Schäfer, W., & Nosanchuk, J. D. (2007). Targeted gene deletion in *Candida parapsilosis* demonstrates the role of secreted lipase in virulence. *The Journal of clinical investigation*, 117(10), 3049-3058.
88. Galan-Ladero, M. A., Blanco, M. T., Sacristan, B., Fernández-Calderón, M. C., Pérez-Giraldo, C., & Gomez-Garcia, A. C. (2010). Enzymatic activities of *Candida tropicalis* isolated from hospitalized patients. *Medical mycology*, 48(1), 207-210.
89. Gassama-Diagne, A., Fauvel, J., & Chap, H. (1989). Purification of a new, calcium-independent, high molecular weight phospholipase A2/lysophospholipase (phospholipase B) from guinea pig intestinal brush-border membrane. *Journal of Biological Chemistry*, 264(16), 9470-9475.
90. Ghannoum, M. A. (2000). Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clinical microbiology reviews*, 13(1), 122-143.
91. Ghannoum, M., Roilides, E., Katragkou, A., Petraitis, V., & Walsh, T. J. (2015). The role of echinocandins in *Candida* biofilm-related vascular catheter infections: *in vitro* and *in vivo* model systems. *Clinical Infectious Diseases*, 61(suppl\_6), S618-S621.
92. Gharaghani, M., Shabanzadeh, M., Jafarian, H., & Zarei Mahmoudabadi, A. (2022). ABC typing and extracellular enzyme production of *Candida albicans* isolated from *Candida* vulvovaginitis. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 36(1), e24117.
93. González-Bacerio, J., Moreno-Medina, V. R., & del Monte Martínez, A. (2010). Lipases: enzymes having the potential for developing immobilised biocatalysts by interfacial adsorption. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 12(1), 113-140.
94. Gow, N. A., Van De Veerdonk, F. L., Brown, A. J., & Netea, M. G. (2012). *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. *Nature reviews microbiology*, 10(2), 112-122.

95. Guevara-Lora, I., Bras, G., Karkowska-Kuleta, J., González-González, M., Ceballos, K., Sidlo, W., & Rapala-Kozik, M. (2020). Plant-derived substances in the fight against infections caused by *Candida* species. *International journal of molecular sciences*, 21(17), 6131.
96. Gulati, M., & Nobile, C. J. (2016). *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. *Microbes and infection*, 18(5), 310-321.
97. Guo, N., Liu, J., Wu, X., Bi, X., Meng, R., Wang, X., & Yu, L. (2009). Antifungal activity of thymol against clinical isolates of fluconazole-sensitive and-resistant *Candida albicans*. *Journal of medical microbiology*, 58(8), 1074-1079.
98. Hacıoglu, M., Guzel, C. B., Savage, P B., Tan, A. S. B. (2019). Antifungal susceptibilities, *in vitro* production of virulence factors and activities of *ceragenins* against *Candida spp.* isolated from vulvovaginal candidiasis. *Medical Mycology*, 57(3), 291–299.
99. Halima, N. E. B. E. G. (2020). Contribution à l'étude des fractions polaire et apolaire de *Thapsia garganica*L (Doctoral dissertation, Université Kasdi Merbah Ouargla).
100. Hammond, S. I. (1977). 3 biological activities of polyene antibiotics. *Progress in medicinal chemistry*, 14, 105-179.
101. Hassan, Y., Chew, S. Y., & Than, L. T. L. (2021). *Candida glabrata*: pathogenicity and resistance mechanisms for adaptation and survival. *Journal of Fungi*, 7(8), 667.
102. Haynes, K. (2001). Virulence in *Candida* species. *Trends in microbiology*, 9(12), 591-596.
103. Hazen K. C., & Hazen, B. W. (1987). A polystyrene microsphere assay for detecting surface hydrophobicity variations within *Candida albicans* populations. *Journal of microbiological methods*, 6(5), 289-299.
104. Hirota, K., Yumoto, H., Sapaar, B., Matsuo, T., Ichikawa, T., & Miyake, Y. (2017). Pathogenic factors in *Candida* biofilm-related infectious diseases. *Journal of Applied Microbiology*, 122(2), 321-330.
105. Höfling, J. F., Mardegan, R. C., Anibal, P. C., Furletti, V. F., & Foglio, M. A. (2011). Evaluation of antifungal activity of medicinal plant extracts against oral *Candida albicans* and proteinases. *Mycopathologia*, 172, 117-124.
106. Hoover, C. I., Jantapour, M. J., Newport, G., Agabian, N., & Fisher, S. J. (1998). Cloning and regulated expression of the *Candida albicans* phospholipase B (PLB1) gene. *FEMS microbiology letters*, 167(2), 163-169.

107. Hube, B., & Naglik, J. (2001). *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. *Microbiology*, 147(8), 1997-2005.
108. Hube, B., Monod, M., Schofield, D. A., Brown, A. J. P., & Gow, N. A. R. (1994). Expression of seven members of the gene family encoding secretory aspartyl proteinases in *Candida albicans*. *Molecular microbiology*, 14(1), 87-99.
109. Ibrahim, A. S., Mirbod, F., Filler, S. G., Banno, Y., Cole, G. T., Kitajima, Y., & Ghannoum, M. A. (1995). Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*. *Infection and immunity*, 63(5), 1993-1998.
110. Ilkhanizadeh-Qomi, M., Nejatbakhsh, S., Jahanshiri, Z., & Razzaghi-Abyaneh, M. (2020). Aspartyl proteinase and phospholipase activities of *Candida albicans* isolated from oropharyngeal candidiasis in head and neck cancer patients. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 13(9), e105200.
111. Ingham, C.J, Boonstra, S., Levels, S., De Lange, M., Meis, J.F., Schneeberger, P.M. (2012), Rapid susceptibility testing and microcolony analysis of *Candida spp.* cultured and imaged on porous aluminum oxide. *PLoS One*, 7(3), e33818.
112. Irimes, C., Séguin, J., Roy, S., & Barbeau, J. (2008). Investigations on farnesol lowresponsiveness in *Candida albicans*: Influence of CO<sub>2</sub>, temperature and expression of selected genes. Abstract Number: B50, 9<sup>th</sup> conference on *Candida* and candidiasis. *American Society for Microbiology Conferences*, 17-130.
113. Ishida, K., Ueda-Yamaguchi, M., Yamada-Ogatta, S. F., Ueda-Nakamura, T., Svidizinsk, T. I. E., & Nakamura, C. V. (2013). Characterization of *Candida spp.* isolated from vaginal fluid: identification, antifungal susceptibility, and virulence profile. *Acta Scientiarum. Health Sciences*, 35(1), 1-8.
114. Jabeen, G., Naz, S. A., Rangel, D. E., Jabeen, N., Shafique, M., & Yasmeen, K. (2023). *In-vitro* evaluation of virulence markers and antifungal resistance of clinical *Candida albicans* strains isolated from Karachi, Pakistan. *Fungal Biology*, 127(7-8), 1241-1249.
115. Jaeger, K. E., & Eggert, T. (2002). Lipases for biotechnology. *Current opinion in biotechnology*, 13(4), 390-397.
116. Jafari, M., Salari, S., Pakshir, K., & Zomorodian, K. (2017). Exoenzyme activity and possibility identification of *Candida dubliniensis* among *Candida albicans* species isolated from vaginal candidiasis. *Microbial pathogenesis*, 110, 73-77.

117. Jafarian, H., Gharaghani, M., Seyedian, S. S., & Mahmoudabadi, A. Z. (2021). Genotyping, antifungal susceptibility, enzymatic activity, and phenotypic variation in *Candida albicans* from esophageal candidiasis. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 35(7), e23826.
118. Jafarian, H., Hardani, A. K., Asnafi, A. A., & Mahmoudabadi, A. Z. (2022). Enzymatic and antifungal susceptibility profiles of *Candida glabrata* isolates from paediatric patients and their genetic diversity based on microsatellite length polymorphism. *Letters in Applied Microbiology*, 75(6), 1569-1578.
119. Jalal, M., Ansari, M. A., Alzohairy, M. A., Ali, S. G., Khan, H. M., Almatroudi, A., & Siddiqui, M. I. (2019). Anticandidal activity of biosynthesized silver nanoparticles: effect on growth, cell morphology, and key virulence attributes of *Candida* species. *International journal of nanomedicine*, 14, 4667-4679.
120. Jasim, S. T., Flayyih, M. T., & Hassan, A. A. (2016). Isolation and identification of *Candida spp.* from different clinical specimens and study the virulence factors. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5(7), 121-37.
121. Jayatilake, J. A. M. S., Samaranayake, Y. H., & Samaranayake, L. P. (2005). An ultrastructural and a cytochemical study of candidal invasion of reconstituted human oral epithelium. *Journal of oral pathology & medicine*, 34(4), 240-246.
122. Jeffries, C.D., Holtman, D.F., & Guse, D.G. (1957). Rapid method for determining the activity of microorganisms on nucleic acids. *Journal of bacteriology*, 73(4), 590-591.
123. Joo, M. Y., Shin, J. H., Jang, H. C., Song, E. S., Kee, S. J., Shin, M. G., & Ryang, D. W. (2013). Expression of SAP5 and SAP9 in *Candida albicans* biofilms: comparison of bloodstream isolates with isolates from other sources. *Medical Mycology*, 51(8), 892-896.
124. Kadry, A. A., El-Ganiny, A. M., & El-Baz, A. M. (2018). Relationship between Sap prevalence and biofilm formation among resistant clinical isolates of *Candida albicans*. *African health sciences*, 18(4), 1166-1174.
125. Karkowska-Kuleta, J., Rapala-Kozik, M., & Kozik, A. (2009). Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. *Acta Biochimica Polonica*, 56(2), 211-224.

126. Karpiński, T. M., Ożarowski, M., Seremak-Mrozikiewicz, A., Wolski, H., & Adamczak, A. (2021). Plant preparations and compounds with activities against biofilms formed by *Candida* spp. *Journal of Fungi*, 7(5), 360.
127. 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), 1-14.
128. Köhler, G. A., Brenot, A., Haas-Stapleton, E., Agabian, N., Deva, R., & Nigam, S. (2006). Phospholipase A2 and phospholipase B activities in fungi. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1761(11), 1391-1399.
129. Kojic, E. M., & Darouiche, R. O. (2004). *Candida* infections of medical devices. *Clinical microbiology reviews*, 17(2), 255-267.
130. Korbekandi, H., Abedi, D., Pourhossein, M., Motovali-Bashi, M., Hejazi, M., Narimousaei, M., & Kabiri, M. (2008). Optimisation of *Candida rugosa* lipase esterase activity. *Biotechnology*, 7(1), 112-117.
131. 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.
132. Kretschmar, M., Felk, A., Staib, P., Schaller, M., Heß, D., Callapina, M., & Nichterlein, T. (2002). Individual acid aspartic proteinases (Saps) 1-6 of *Candida albicans* are not essential for invasion and colonization of the gastrointestinal tract in mice. *Microbial pathogenesis*, 32(2), 61-70.
133. Lai, C. C., Wang, C. Y., Liu, W. L., Huang, Y. T., & Hsueh, P. R. (2012). Time to positivity of blood cultures of different *Candida* species causing fungaemia. *Journal of medical microbiology*, 61(5), 701-704.
134. Lane, S., Zhou, S., Pan, T., Dai, Q., & Liu, H. (2001). The basic helix-loop-helix transcription factor Cph2 regulates hyphal development in *Candida albicans* partly via TEC1. *Molecular and cellular biology*, 21(19), 6418-6428.
135. Lee, K. S., Patton, J. L., Fido, M., Hines, L. K., Kohlwein, S. D., Paltauf, F., & Levin, D. E. (1994). The *Saccharomyces cerevisiae* PLB1 gene encodes a protein required for lysophospholipase and phospholipase B activity. *Journal of Biological Chemistry*, 269(31), 19725-19730.
136. Leidich, S. D., Ibrahim, A. S., Fu, Y., Koul, A., Jessup, C., Vitullo, J., & Ghannoum, M. A. (1998). Cloning and disruption of caPLB1, a phospholipase B gene involved in

- the pathogenicity of *Candida albicans*. *Journal of Biological Chemistry*, 273(40), 26078-26086.
137. Lennartz, M. R. (1999). Phospholipases and phagocytosis: the role of phospholipid-derived second messengers in phagocytosis. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 31(3-4), 415-430.
138. Lohse, M. B., Gulati, M., Johnson, A. D., & Nobile, C. J. (2018). Development and regulation of single- and multi-species *Candida albicans* biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, 16(1), 19-31.
139. Luo, G., Samaranayake, L. P., & Yau, J. Y. (2001). *Candida* species exhibit differential *in vitro* hemolytic activities. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(8), 2971-2974.
140. Luo, G., Samaranayake, L. P., Cheung, B. P. K., & Tang, G. (2004). Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) detection of HLP gene expression in *Candida glabrata* and its possible role in *in vitro* haemolysin production. *Apmis*, 112(4-5), 283-290.
141. Malcok, H. K., Aktas, E., Ayyildiz, A., Yigit, N., & Yazgi, H. (2009). Hemolytic activities of the *Candida* species in liquid medium. *The Eurasian Journal of Medicine*, 41(2), 95.
142. Manns, J. M., Mosser, D. M., & Buckley, H. R. (1994). Production of a hemolytic factor by *Candida albicans*. *Infection and immunity*, 62(11), 5154-5156.
143. Marzoq, A. K. (2023). The association of yeast infections with diabetic foot ulcer. *Journal of Survey in Fisheries Sciences*, 10(4S), 371-378.
144. Mathé, L., & Van Dijck, P. (2013). Recent insights into *Candida albicans* biofilm resistance mechanisms. *Current genetics*, 59, 251-264.
145. Mavor, A. L., Thewes, S., & Hube, B. (2005). Systemic fungal infections caused by *Candida* species: epidemiology, infection process and virulence attributes. *Current drug targets*, 6(8), 863-874.
146. Mayer, F. L., Wilson, D., & Hube, B. (2013). *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*, 4(2), 119-128.
147. Mba, I. E., & Nweze, E. I. (2020). Mechanism of *Candida* pathogenesis: revisiting the vital drivers. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 39, 1797-1819.

148. Meenambiga, S. S., Venkataraghavan, R., & Biswal, R. A. (2018). In silico analysis of plant phytochemicals against secreted aspartic proteinase enzyme of *Candida albicans*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 8(11), 140-150.
149. Mehta, A., Bodh, U., & Gupta, R. (2017). Fungal lipases: a review. *Journal of Biotech Research*, 8, 58.
150. Menezes, O.A.T., Gillet, C.S.L., Menezes, A.F.S., Feitosa, N.M.R., Ishak, O.G.M., Ishak, R., & Vallinoto, C.R.A. (2013). Virulence factors of *Candida albicans* isolates from the oral cavities of HIV-1-positive patients. *Current HIV research*, 11(4), 304-308.
151. Mierziak, J., Kostyn, K., & Kulma, A. (2014). Flavonoids as important molecules of plant interactions with the environment. *Molecules*, 19(10), 16240-16265.
152. Miranda, T. T., Vianna, C. R., Rodrigues, L., Rosa, C. A., & Corrêa Jr, A. (2015). Differential proteinase patterns among *Candida albicans* strains isolated from root canal and lingual dorsum: possible roles in periapical disease. *Journal of Endodontics*, 41(6), 841-845.
153. Miruka, H. N., Eric, O. O., Musyoki, S., & Awuor, S. O. (2023). Incidence, antifungal resistance properties, and virulence traits of *Candida* species isolated from HIV/AIDS Patients from the hospital system in Kenya. *Access Microbiology*, 1, 000620.
154. Mohammadi, F., Ghasemi, Z., Familsatarian, B., Salehi, E., Sharifynia, S., Barikani, A., & Hosseini, M. A. (2020). Relationship between antifungal susceptibility profile and virulence factors in *Candida albicans* isolated from nail specimens. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 53, e20190214.
155. Monds, R. D., & O'Toole, G. A. (2008). Metabolites as intercellular signals for regulation of community-level traits. In: *Chemical communication among bacteria*. Washington DC. American Society for Microbiology Press, 105-129.
156. Monod, M., Hube, B., Hess, D., & Sanglard, D. (1998). Differential regulation of SAP8 and SAPS, which encode two new members of the secreted aspartic proteinase family in *Candida albicans*. *Microbiology*, 144(10), 2731-2737.
157. Mouderas, F., El Haci, I. A., & Lahfa, F. B. (2019). Phytochemical profile, antioxidant and antimicrobial activities of *Traganum nudatum* Delile aerial parts organic extracts collected from Algerian Sahara's flora. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*, 19, 299-310.

158. Mukherjee, P. K., Chandra, J., Kuhn, D. M., & Ghannoum, M. A. (2003). Differential expression of *Candida albicans* phospholipase B (PLB1) under various environmental and physiological conditions. *Microbiology*, 149(1), 261-267.
159. Mulyaningsih, S., Sporer, F., Zimmermann, S., Reichling, J., & Wink, M. (2010). Synergistic properties of the terpenoids aromadendrene and 1, 8-cineole from the essential oil of *Eucalyptus globulus* against antibiotic-susceptible and antibiotic-resistant pathogens. *Phytomedicine*, 17(13), 1061-1066.
160. Naglik, J. R., Rodgers, C. A., Shirlaw, P. J., Dobbie, J. L., Fernandes-Naglik, L. L., Greenspan, D., & Challacombe, S. J. (2003). Differential expression of *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase and phospholipase B genes in human's correlates with active oral and vaginal infections. *The Journal of infectious diseases*, 188(3), 469-479.
161. Nett, J., & Andes, D. (2006). *Candida albicans* biofilm development, modeling a host-pathogen interaction. *Current opinion in microbiology*, 9(4), 340-345.
162. Niewerth, M., & Korting, H. C. (2001). Phospholipases of *Candida albicans*. *Mycoses*, 44(9-10), 361-367.
163. Nishizuka, Y. (1984). The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature*, 308(5961), 693-698.
164. Nobile, C. J., Fox, E. P., Nett, J. E., Sorrells, T. R., Mitrovich, Q. M., Hernday, A. D., & Johnson, A. D. (2012). A recently evolved transcriptional network controls biofilm development in *Candida albicans*. *Cell*, 148(1), 126-138.
165. 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.
166. Nouraei, H., Pakshir, K., ZareShahrabadi, Z., & Zomorodian, K. (2020). High detection of virulence factors by *Candida* species isolated from bloodstream of patients with candidemia. *Microbial Pathogenesis*, 149, 104574.
167. Odds, F. C. (1988). *Candida and candidosis: a review and bibliography*, 2<sup>nd</sup> Edition. London. Bailliere Tindall, 124.
168. O'Toole, G. A. (2011). Microtiter dish biofilm formation assay. *Journal of Visualized Experiments*, 47, e2437.

169. Padmajakshi, G., Saini, S., Deorukhkar, S., & Ramana, K. V. (2014). Coagulase activity of *Candida spp.* Isolated from HIV seropositive patients using different animal plasma. *American Journal of Microbiological Research*, 2(2), 57-59.
170. 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.
171. 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(04), 392-396.
172. Pannanusorn, S., Tongman, S., & Pootong, A. (2023). Biofilm, proteinase and phospholipase production by *Candida albicans* isolates from a hospital in Thailand. *Songklanakarinn Journal of Science & Technology*, 45(6), 620-626.
173. Paraje, M. G., Correa, S. G., Theumer, M., Renna, M. S., & Sotomayor, C. E. (2008). *Candida albicans* lipase: potential role in virulence and fungal pathogenesis. *Canadian Journal of Microbiology*, 54, 647-659.
174. Pawar, P. R., Pawar, V. A., & Aute, R. A. (2014). Role of extracellular hydrolytic enzymes in *Candida albicans* virulence. *International journal of pharmaceutical sciences review and research*, 2, 1521-1532.
175. Peeters, E., Nelis, H. J., & Coenye, T. (2008). Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *Journal of microbiological methods*, 72(2), 157-165.
176. Pereira, R., Dos Santos Fontenelle, R. O., De Brito, E. H. S., & De Morais, S. M. (2021). Biofilm of *Candida albicans*: formation, regulation and resistance. *Journal of Applied Microbiology*, 131(1), 11-22.
177. Pinto, E., Ribeiro, I. C., Ferreira, N. J., Fortes, C. E., Fonseca, P. A., & Figueiral, M. H. (2008). Correlation between enzyme production, germ tube formation and susceptibility to fluconazole in *Candida* species isolated from patients with denture-related stomatitis and control individuals. *Journal of oral pathology & medicine*, 37(10), 587-592.
178. Poissy, J. (2015). Physiopathologie des candidoses invasives. *Réanimation*, 24(3), 318-327.

179. Price, M. F., Wilkinson, I. D., & Gentry, L. O. (1982). Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia: Journal of Medical and Veterinary Mycology*, 20(1), 7-14.
180. Raja, V., Ahmad, S. I., Irshad, M., Wani, W. A., Siddiqi, W. A., & Shreaz, S. (2017). Anticandidal activity of ethanolic root extract of *Juglans regia* (L.): Effect on growth, cell morphology, and key virulence factors. *Journal de Mycologie Médicale*, 27(4), 476-486.
181. Rajendran, R., Robertson, D. P., Hodge, P. J., Lappin, D. F., & Ramage, G. (2010). Hydrolytic enzyme production is associated with *Candida albicans* biofilm formation from patients with type 1 diabetes. *Mycopathologia*, 170, 229-235.
182. Rajendran, R., Sherry, L., Nile, C. J., Sherriff, A., Johnson, E. M., Hanson, M. F., & Ramage, G. (2016). Biofilm formation is a risk factor for mortality in patients with *Candida albicans* bloodstream infection—Scotland, 2012–2013. *Clinical Microbiology and Infection*, 22(1), 87-93.
183. 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.
184. Ramage, G., Mowat, E., Jones, B., Williams, C., & Lopez-Ribot, J. (2009). Our current understanding of fungal biofilms. *Critical reviews in microbiology*, 35(4), 340-355.
185. Ramage, G., Vande Walle, K., Wickes, B. L., & López-Ribot, J. L. (2001). Standardized method for *in vitro* antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 45(9), 2475-2479.
186. Ramon, A. M., Porta, A., & Fonzi, W. A. (1999). Effect of environmental pH on morphological development of *Candida albicans* is mediated via the PacC-related transcription factor encoded by PRR2. *Journal of Bacteriology*, 181(24), 7524-7530.
187. Ramos-Pardo, A., Castro-Álvarez, R., Quindós, G., Eraso, E., Sevillano, E., & Kaberdin, V. R. (2023). Assessing pH-dependent activities of virulence factors secreted by *Candida albicans*. *Microbiology Open*, 12(1), e1342.
188. Rapala-Kozik, M., Bochenska, O., Zajac, D., Karkowska-Kuleta, J., Gogol, M., Zawrotniak, M., & Kozik, A. (2018). Extracellular proteinases of *Candida* species pathogenic yeasts. *Molecular oral microbiology*, 33(2), 113-124.

189. Reetz, M. T. (2002). Lipases as practical biocatalysts. *Current opinion in chemical biology*, 6(2), 145-150.
190. Reynaud, A. H., Nygaard-Østby, B., Bøygard, G. K., Eribe, E. R., Olsen, I., & Gjermo, P. (2001). Yeasts in periodontal pockets. *Journal of clinical periodontology*, 28(9), 860-864.
191. 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.
192. Sachin, D., & Santosh, S. (2013). Evaluation of phospholipase activity in biofilm forming *Candida* species isolated from intensive care unit patients. *British Microbiology Research Journal*, 3(3), 440-447.
193. Saito, K., Sugatani, J., & Okumura, T. (1991). [42] Phospholipase B from *Penicillium notatum*. *Methods in enzymology*, 197, 446-456.
194. Samaranayake, L. P., Raeside, J. M., & MacFarlane, T. W. (1984). Factors affecting the phospholipase activity of *Candida* species *in vitro*. *Sabouraudia: Journal of Medical and Veterinary Mycology*, 22(3), 201-207.
195. Samaranayake, Y. H., Cheung, B. P., Yau, J. Y., Yeung, S. K., & Samaranayake, L. P. (2013). Human serum promotes *Candida albicans* biofilm growth and virulence gene expression on silicone biomaterial. *PLoS One*, 8(5), e62902.
196. Samaranayake, Y. H., Dassanayake, R. S., Cheung, B. P. K., Jayatilake, J. A. M. S., Yeung, K. W. S., Yau, J. Y. Y., & Samaranayake, L. P. (2006). Differential phospholipase gene expression by *Candida albicans* in artificial media and cultured human oral epithelium. *Apmis*, 114(12), 857-866.
197. Samaranayake, Y. H., Dassanayake, R. S., Jayatilake, J. A., Cheung, B. P., Yau, J. Y., Yeung, K. W., & Samaranayake, L. P. (2005). Phospholipase B enzyme expression is not associated with other virulence attributes in *Candida albicans* isolates from patients with human immunodeficiency virus infection. *Journal of Medical Microbiology*, 54(6), 583-593.
198. Sardi, J. C. O., Scorzoni, L., Bernardi, T., Fusco-Almeida, A. M., & Mendes Giannini, M. J. S. (2013). *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *Journal of medical microbiology*, 62(1), 10-24.

- 199.Sathiya, T., Sheeba, M. A., Moorthy, K., Punitha, T., Vinodhini, R., & Saranya, A. S. (2015). *Candida albicans non-albicans* species: A study of biofilm production and putative virulence properties. *Journal of Harmonized Research in Pharmacy*, 4(1), 64-75.
- 200.Schaller, M., Bein, M., Korting, H. C., Baur, S., Hamm, G., Monod, M., & Hube, B. (2003). The secreted aspartyl proteinases Sap1 and Sap2 cause tissue damage in an *in vitro* model of vaginal candidiasis based on reconstituted human vaginal epithelium. *Infection and immunity*, 71(6), 3227-3234.
- 201.Schaller, M., Borelli, C., Korting, H. C., & Hube, B. (2005). Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. *Mycoses*, 48(6), 365-377.
- 202.Schaller, M., Korting, H. C., Borelli, C., Hamm, G., & Hube, B. (2005). *Candida albicans*-secreted aspartic proteinases modify the epithelial cytokine response in an *in vitro* model of vaginal candidiasis. *Infection and immunity*, 73(5), 2758-2765.
- 203.Schild, L., Heyken, A., de Groot, P. W., Hiller, E., Mock, M., de Koster, C., & Hube, B. (2011). Proteolytic cleavage of covalently linked cell wall proteins by *Candida albicans* Sap9 and Sap10. *Eukaryotic cell*, 10(1), 98-109.
- 204.Seddiki, S. M. L., Boucherit-Otmani, Z., Boucherit, K., & Kunkel, D. (2015). Infectivités fongiques des cathéters implantés dues à *Candida sp.* Formation des biofilms et résistance. *Journal de Mycologie Médicale*, 25(2), 130-135.
- 205.Seddiki, S.M.L. (2021). Introduction aux biofilms microbiens [Introduction to microbial biofilms]. Connaissances et Savoir Editions, Paris (France). French.
- 206.Seghir, A., Boucherit-Otmani, Z., Boucherit, K., Sari-Belkharroubi, L., & Anselme-Bertrand, I. (2015). Evaluation of mixed biofilm formation between *Candida albicans* and a variety of bacterial species isolated from peripheral catheters at Tlemcen CHU. First study in Algeria. *Journal de Mycologie Médicale*, 25(2), 123-129.
- 207.Seifi, Z., Mahmoudabadi, A. Z., & Zarrin, M. (2015). Extracellular enzymes and susceptibility to fluconazole in *Candida* strains isolated from patients with vaginitis and healthy individuals. *Jundishapur journal of microbiology*, 8(3), e20162.
- 208.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.

209. Silva-Rocha, W. P., de Brito Lemos, V. L., Ferreira, M. R. A., Soares, L. A. L., Svidzinski, T. I. E., Milan, E. P., & Chaves, G. M. (2015). Effect of the crude extract of *Eugenia uniflora* in morphogenesis and secretion of hydrolytic enzymes in *Candida albicans* from the oral cavity of kidney transplant recipients. *BMC complementary and alternative medicine*, 15(1), 1-15.
210. Slifkin, M. (2000). Tween 80 opacity test responses of various *Candida* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(12), 4626-4628.
211. Sokół, I., Gawel, A., & Bobrek, K. (2018). The prevalence of yeast and characteristics of the isolates from the digestive tract of clinically healthy turkeys. *Avian diseases*, 62(3), 286-290.
212. Soulountsi, V., Schizodimos, T., & Kotoulas, S. C. (2021). Deciphering the epidemiology of invasive candidiasis in the intensive care unit: Is it possible? *Infection*, 49(6), 1107-1131.
213. Sriphanam, C., Nuanmuang, N., Saengsawang, K., Amornthipayawong, D., & Kummasook, A. (2019). Anti-fungal susceptibility and virulence factors of *Candida spp.* isolated from blood cultures. *Journal De Mycologie Medicale*, 29(4), 325-330.
214. Staib, P., Wirsching, S., Strauß, A., & Morschhäuser, J. (2001). Gene regulation and host adaptation mechanisms in *Candida albicans*. *International journal of medical microbiology*, 291(2), 183-188.
215. Staniszewska, M., Bondaryk, M., Piłat, J., Siennicka, K., Magda, U., & Kurzątkowski, W. (2012). Czynniki zjadliwości *Candida albicans*. *Przegląd Epidemiologiczny*, 66, 629-633.
216. Staniszewska, M., Bondaryk, M., Żukowski, K., & Chudy, M. (2015). Role of SAP7-10 and morphological regulators (EFG1, CPH1) in *Candida albicans*' hypha formation and adhesion to colorectal carcinoma Caco-2. *Polish journal of microbiology*, 64(3), 203-210.
217. Talapko, J., Juzbašić, M., Matijević, T., Pustijanac, E., Bekić, S., Kotris, I., & Škrlec, I. (2021). *Candida albicans*—the virulence factors and clinical manifestations of infection. *Journal of Fungi*, 7(2), 79.
218. Tefiani, I., Seddiki, S. M. L., & Mahdad, M. Y. (2020). *In vitro* activities of *Traganum nudatum* and *Mentha pulegium* extracts combined with amphotericin B against *Candida albicans* in production of hydrolytic enzymes. *Current Medical Mycology*, 6(3), 27-32.

219. Tellapragada, C., Eshwara, V. K., Johar, R., Shaw, T., Malik, N., Bhat, P. V., & Mukhopadhyay, C. (2014). Antifungal susceptibility patterns, *in vitro* production of virulence factors, and evaluation of diagnostic modalities for the speciation of pathogenic *Candida* from blood stream infections and vulvovaginal candidiasis. *Journal of pathogens*, 2014, 142864.
220. Teodoro, G. R., Gontijo, A. V., Salvador, M. J., Tanaka, M. H., Brighenti, F. L., Delbem, A. C., & Koga-Ito, C. Y. (2018). Effects of acetone fraction from *Buchenavia tomentosa* aqueous extract and gallic acid on *Candida albicans* biofilms and virulence factors. *Frontiers in Microbiology*, 9, 647.
221. Theiss, S., Ishdorj, G., Brenot, A., Kretschmar, M., Lan, C. Y., Nichterlein, T., & Köhler, G. A. (2006). Inactivation of the phospholipase B gene PLB5 in wild-type *Candida albicans* reduces cell-associated phospholipase A2 activity and attenuates virulence. *International Journal of Medical Microbiology*, 296(6), 405-420.
222. Thomas, A., Mariani-Floderer, C., López-Huertas, M. R., Gros, N., Hamard-Péron, E., Favard, C., & Muriaux, D. (2015). Involvement of the Rac1-IRSp53-Wave2-Arp2/3 signaling pathway in HIV-1 Gag particle release in CD4 T cells. *Journal of virology*, 89(16), 8162-8181.
223. Touil, H. F. Z., Boucherit-Otmani, Z., & Boucherit, K. (2018). *In vitro* activity of antifungal combinations against planktonic and sessile cells of *Candida albicans* isolated from medical devices in an intensive care department. *Journal de Mycologie Medicale*, 28(3), 414-418.
224. Tournu, H., & Van Dijck, P. (2012). *Candida* biofilms and the host: models and new concepts for eradication. *International journal of microbiology*, 2012, 845352.
225. 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.
226. 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.
227. Tsuboi, R., Matsuda, K., Ko, I. J., & Ogawa, H. (1989). Correlation between culture medium pH, extracellular proteinase activity, and cell growth of *Candida albicans* in

- insoluble stratum corneum-supplemented media. *Archives of dermatological research*, 281, 342-345.
- 228.** Tsui, C., Kong, E. F., & Jabra-Rizk, M. A. (2016). Pathogenesis of *Candida albicans* biofilm. *FEMS Pathogens and Disease*, 74(4), ftw018.
- 229.** Tumbarello, M., Fiori, B., Trecarichi, E. M., Posteraro, P., Losito, A. R., De Luca, A., & Posteraro, B. (2012). Risk factors and outcomes of candidemia caused by biofilm-forming isolates in a tertiary care hospital. *PloS one*, 7(3), e33705.
- 230.** Váczi, P., Proškovcová, M., Čonková, E., Marcinčáková, D., Bačkorová, M., & Harčárová, M. (2024). Essential oil and plant extract of oregano as agents influencing the virulence factors of *Candida albicans*. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 27(1), 25-33.
- 231.** Vitale, R. G., Afeltra, J., & Dannaoui, E. (2005). Antifungal combinations. *Antifungal agents: Methods and protocols*, 118, 143-152.
- 232.** Wagner, T., Borg-v. Zepelin, M., & Rüchel, R. (1995). pH-dependent denaturation of extracellular aspartic proteinases from *Candida* species. *Journal of medical and veterinary mycology*, 33(4), 275-278.
- 233.** 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, 1-7.
- 234.** Wang, Y., Su, Q., Dong, S., Shi, H., Gao, X., & Wang, L. (2014). Hybrid phage displaying SLAQVKYTSASSI induces protection against *Candida albicans* challenge in BALB/c mice. *Human vaccines & immunotherapeutics*, 10(4), 1057-1063.
- 235.** White, T. C., & Agabian, N. (1995). *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases: isoenzyme pattern is determined by cell type, and levels are determined by environmental factors. *Journal of bacteriology*, 177(18), 5215-5221.
- 236.** Winter, M. B., Salcedo, E. C., Lohse, M. B., Hartooni, N., Gulati, M., Sanchez, H., & Nobile, C. J. (2016). Global identification of biofilm-specific proteolysis in *Candida albicans*. *MBio*, 7(5), 10-1128.
- 237.** Xu, W., He, J., He, M., Han, F., Chen, X., Pan, Z., & Tong, M. (2011). Synthesis and antifungal activity of novel sulfone derivatives containing 1, 3, 4-oxadiazole moieties. *Molecules*, 16(11), 9129-9141.

238. Yang, S. F., Freer, S., & Benson, A. A. (1967). Transphosphatidylaton by phospholipase D. *Journal of Biological Chemistry*, 242(3), 477-484.
239. Yang, Y. L. (2003). Virulence factors of *Candida* species. *Journal of Microbiology Immunology and Infection*, 36(4), 223-228.
240. Yapar, N. (2014). Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. *Therapeutics and clinical risk management*, 10, 95-105.
241. 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.
242. Yigit, N., Aktas, A. E., & Ayyildiz, A. (2008). Detection of coagulase activity in pathogenic *Candida* species. *Journal of International Medical Research*, 36(6), 1378-1382.
243. Yigit, N., Aktas, E., Dagistan, S., & Ayyildiz, A. (2011). Investigating biofilm production, coagulase and hemolytic activity in *Candida* species isolated from denture stomatitis patients. *The Eurasian Journal of Medicine*, 43(1), 27.
244. Yücesoy, M., & Marol, S. (2003). Determination of esterase activity of *Candida* varieties. *Mikrobiyoloji Bulteni*, 37(1), 59-63.
245. Zaugg, C., Borg-von Zepelin, M., Reichard, U., Sanglard, D., & Monod, M. (2001). Secreted aspartic proteinase family of *Candida tropicalis*. *Infection and immunity*, 69(1), 405-412.

---

# *Annexes*

---

**Annexe 01 :** Activité de la phospholipase, protéase, estérase et de l'hémolysine des souches de *Candida albicans* issues des dispositifs médicaux au CHU de Tlemcen.

*1 : Activité de phospholipase et de protéase*

| Souches    | Activité de phospholipase |                        |                        |                              |                        |                        |                                      | Activité de protéase  |                        |                        |                              |                        |                        |                                      |
|------------|---------------------------|------------------------|------------------------|------------------------------|------------------------|------------------------|--------------------------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|------------------------------|------------------------|------------------------|--------------------------------------|
|            | Diamètre (cm) colonie     |                        |                        | Diamètre (cm) colonie + zone |                        |                        | Valeurs de Pz (activité enzymatique) | Diamètre (cm) colonie |                        |                        | Diamètre (cm) colonie + zone |                        |                        | Valeurs de Pz (activité enzymatique) |
|            | 1 <sup>er</sup> essai     | 2 <sup>ème</sup> essai | 3 <sup>ème</sup> essai | 1 <sup>er</sup> essai        | 2 <sup>ème</sup> essai | 3 <sup>ème</sup> essai | Moyenne                              | 1 <sup>er</sup> essai | 2 <sup>ème</sup> essai | 3 <sup>ème</sup> essai | 1 <sup>er</sup> essai        | 2 <sup>ème</sup> essai | 3 <sup>ème</sup> essai | Moyenne                              |
| <b>A1</b>  | 1,7                       | 1,1                    | 1,2                    | 1,7                          | 1,1                    | 1,2                    | 1±0.00                               | 1                     | 1                      | 0,9                    | 1,8                          | 1,8                    | 1,7                    | 0,54±0.01                            |
| <b>A2</b>  | 1,6                       | 1,6                    | 1,4                    | 2,1                          | 2,2                    | 1,8                    | 0,75±0.01                            | 1                     | 1                      | 1                      | 1,7                          | 1,7                    | 1,7                    | 0,59±0.01                            |
| <b>A3</b>  | 1,9                       | 1,5                    | 1,2                    | 1,9                          | 1,5                    | 1,2                    | 1±0.00                               | 1                     | 1                      | 1                      | 1,6                          | 1,6                    | 1,6                    | 0,62±0.00                            |
| <b>A4</b>  | 1,3                       | 1,9                    | 1,6                    | 1,8                          | 2,4                    | 2,1                    | 0,76±0.02                            | 1,1                   | 1                      | 1                      | 1,7                          | 1,6                    | 1,6                    | 0,63±0.006                           |
| <b>A5</b>  | 2,2                       | 1,9                    | 1,5                    | 2,5                          | 2,2                    | 1,6                    | 0,89±0.02                            | 1                     | 1                      | 1                      | 1,3                          | 1,3                    | 1,3                    | 0,76±0.00                            |
| <b>A6</b>  | 1,0                       | 1,4                    | 1,1                    | 2,0                          | 2,5                    | 2,0                    | 0,54±0.01                            | 0,8                   | 0,8                    | 0,9                    | 1                            | 1                      | 1,1                    | 0,8±0.003                            |
| <b>A7</b>  | 1,6                       | 1,5                    | 1,3                    | 1,9                          | 1,7                    | 1,5                    | 0,86±0.01                            | 0,9                   | 1,1                    | 1,1                    | 1,8                          | 1,8                    | 1,9                    | 0,56±0.03                            |
| <b>A8</b>  | 1,0                       | 1,2                    | 1,1                    | 2,1                          | 2,3                    | 1,7                    | 0,54±0.05                            | 1                     | 1,1                    | 0,9                    | 1,3                          | 1,4                    | 1,3                    | 0,74±0.02                            |
| <b>A9</b>  | 1,1                       | 1,2                    | 1,0                    | 2,1                          | 2,0                    | 2,0                    | 0,54±0.03                            | 0,9                   | 0,9                    | 0,9                    | 1,2                          | 1,2                    | 1,2                    | 0,7±0.05                             |
| <b>A10</b> | 1,0                       | 1,2                    | 1,4                    | 1,2                          | 2,0                    | 1,5                    | 0,79±0.09                            | 0,9                   | 0,9                    | 0,9                    | 1,5                          | 1,5                    | 1,5                    | 0,6±0.00                             |
| <b>A11</b> | 1,1                       | 1,2                    | 1,0                    | 1,1                          | 1,2                    | 1,0                    | 1±0.00                               | 1,5                   | 1,5                    | 1,5                    | 1,8                          | 1,8                    | 1,8                    | 0,83±0.00                            |
| <b>A12</b> | 1,1                       | 1,4                    | 1,1                    | 1,5                          | 1,7                    | 1,5                    | 0,76±0.03                            | 1,5                   | 1,5                    | 1,7                    | 1,7                          | 1,7                    | 1,9                    | 0,88±0.003                           |
| <b>A13</b> | 1,1                       | 1,2                    | 1,0                    | 1,3                          | 1,2                    | 1,0                    | 0,95±0.05                            | 1,8                   | 2,8                    | 2,8                    | 2,2                          | 3                      | 3                      | 0,89±0.004                           |
| <b>A14</b> | 1,9                       | 1,3                    | 1,4                    | 2,2                          | 2,0                    | 1,9                    | 0,75±0.06                            | 0,5                   | 0,2                    | 0,5                    | 0,5                          | 0,2                    | 0,5                    | 1±0.00                               |
| <b>R1</b>  | 1,6                       | 1,2                    | 1,1                    | 2,5                          | 1,8                    | 1,6                    | 0,66±0.01                            | 1                     | 1                      | 1,1                    | 1,9                          | 2                      | 2,1                    | 0,51±0.006                           |

**R1 :** *Candida albicans* ATCC10231

2 : Activité d'estérase et d'hémolysine

| Souches    | Activité d'estérase   |                        |                        |                              |                        |                        |                                      | Activité d'hémolysine |                        |                        |                              |                        |                        |                                      |
|------------|-----------------------|------------------------|------------------------|------------------------------|------------------------|------------------------|--------------------------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|------------------------------|------------------------|------------------------|--------------------------------------|
|            | Diamètre (cm) colonie |                        |                        | Diamètre (cm) colonie + zone |                        |                        | Valeurs de Pz (activité enzymatique) | Diamètre (cm) colonie |                        |                        | Diamètre (cm) colonie + zone |                        |                        | Valeurs de Pz (activité enzymatique) |
|            | 1 <sup>er</sup> essai | 2 <sup>ème</sup> essai | 3 <sup>ème</sup> essai | 1 <sup>er</sup> essai        | 2 <sup>ème</sup> essai | 3 <sup>ème</sup> essai | Moyenne                              | 1 <sup>er</sup> essai | 2 <sup>ème</sup> essai | 3 <sup>ème</sup> essai | 1 <sup>er</sup> essai        | 2 <sup>ème</sup> essai | 3 <sup>ème</sup> essai | Moyenne                              |
| <b>A1</b>  | 1,8                   | 1,8                    | 1,3                    | 2,9                          | 2,9                    | 2,3                    | 0,6±0.02                             | 1,7                   | 1,5                    | 2                      | 4                            | 3,8                    | 4,3                    | 0,42±0.02                            |
| <b>A2</b>  | 1,5                   | 1,5                    | 1,3                    | 1,5                          | 1,5                    | 3                      | 0,81±0.19                            | 1,5                   | 1,5                    | 2                      | 3,6                          | 3,7                    | 4,5                    | 0,42±0.01                            |
| <b>A3</b>  | 1,4                   | 1,4                    | 1,1                    | 3                            | 3                      | 3,3                    | 0,42±0.04                            | 1,2                   | 1,3                    | 2                      | 3,6                          | 3,6                    | 4,1                    | 0,39±0.04                            |
| <b>A4</b>  | 1,3                   | 1,3                    | 1,1                    | 3                            | 3                      | 2,5                    | 0,43±0.003                           | 1,7                   | 1,3                    | 2,7                    | 4,5                          | 4                      | 4,5                    | 0,43±0.08                            |
| <b>A5</b>  | 1,5                   | 1,5                    | 1,3                    | 3                            | 3                      | 4                      | 0,44±0.06                            | 1,5                   | 1,2                    | 1,5                    | 4                            | 3,6                    | 4,5                    | 0,34±0.01                            |
| <b>A6</b>  | 2                     | 3,6                    | 1,3                    | 5,6                          | 5,8                    | 4,3                    | 0,42±0.09                            | 1,8                   | 2                      | 2                      | 4,6                          | 5                      | 4,2                    | 0,42±0.02                            |
| <b>A7</b>  | 2,9                   | 2,9                    | 1,5                    | 5                            | 4,7                    | 4,2                    | 0,52±0.08                            | 1,2                   | 1,2                    | 1,3                    | 3,6                          | 3,6                    | 3,5                    | 0,34±0.01                            |
| <b>A8</b>  | 1,7                   | 1,7                    | 1,3                    | 3                            | 3                      | 3,4                    | 0,5±0.06                             | 1,1                   | 1,5                    | 1                      | 3,2                          | 3,8                    | 3                      | 0,35±0.01                            |
| <b>A9</b>  | 1,4                   | 1,4                    | 1,5                    | 3,5                          | 3,5                    | 3,5                    | 0,41±0.006                           | 1,5                   | 1,5                    | 1                      | 4                            | 3,9                    | 3,7                    | 0,34±0.03                            |
| <b>A10</b> | 1,4                   | 1,4                    | 1,5                    | 2,8                          | 2,8                    | 4                      | 0,46±0.04                            | 1,6                   | 1,5                    | 1,3                    | 4,5                          | 4                      | 4                      | 0,35±0.01                            |
| <b>A11</b> | 1,6                   | 1,6                    | 1,7                    | 1,6                          | 1,6                    | 1,7                    | 1±0.00                               | 1,2                   | 1,2                    | 1,4                    | 1,2                          | 1,2                    | 1,4                    | 1±0.00                               |
| <b>A12</b> | 1,5                   | 1,5                    | 1,4                    | 3                            | 3                      | 4                      | 0,45±0.05                            | 1,8                   | 1,8                    | 1,1                    | 4,5                          | 4,5                    | 4                      | 0,36±0.04                            |
| <b>A13</b> | 1,9                   | 1,9                    | 1,5                    | 1,9                          | 1,9                    | 1,5                    | 1±0.00                               | 1,3                   | 1,3                    | 1,7                    | 1,3                          | 1,3                    | 1,7                    | 1±0.00                               |
| <b>A14</b> | 1,5                   | 1,5                    | 1,2                    | 4                            | 3                      | 4                      | 0,39±0.05                            | 1,5                   | 1,3                    | 1,5                    | 3,8                          | 4,5                    | 3,9                    | 0,35±0.03                            |
| <b>R1</b>  | 1,5                   | 1,5                    | 1,5                    | 4                            | 4,4                    | 4,5                    | 0,35±0.01                            | 1,7                   | 1,6                    | 2                      | 4,1                          | 4                      | 4,1                    | 0,43±0.02                            |

**R1** : *Candida albicans* ATCC10231

**Annexe 02 :** Valeurs Pz des activités des phospholipases, des protéases et des estérase des souches de *C. albicans* testées à différents pH et température.

*I : Activité de phospholipase*

| Souches    | Valeurs de Pz<br>(activité enzymatique) Phospholipase |                        |                       |                        |                       |                        |                       |                        |
|------------|---|------------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|
|            | pH =7<br>T° 30  |                        | pH =7<br>T° 37        |                        | pH =5<br>T° 30        |                        | pH =5<br>T° 30        |                        |
|            | 1 <sup>er</sup> essai                                 | 2 <sup>ème</sup> essai | 1 <sup>er</sup> essai | 2 <sup>ème</sup> essai | 1 <sup>er</sup> essai | 2 <sup>ème</sup> essai | 1 <sup>er</sup> essai | 2 <sup>ème</sup> essai |
| <b>A1</b>  | 0,89473684  | 0,85                   | 0,91666667            | 0,92307692             | 0,73333333            | 0,78571429             | 0,82352941            | 0,875                  |
| <b>A2</b>  | 0,75  | 0,71428571             | 0,73333333            | 0,7                    | 0,78571429            | 0,75                   | 0,70833333            | 0,7                    |
| <b>A3</b>  | 0,9   | 0,93333333             | 1                     | 0,95238095             | 0,85714286            | 0,8                    | 1                     | 1                      |
| <b>A4</b>  | 0,68  | 0,6                    | 0,71428571            | 0,76190476             | 0,6875                | 0,70588235             | 0,68181818            | 0,625                  |
| <b>A5</b>  | 0,64516129  | 0,625                  | 0,88                  | 0,85714286             | 0,84615385            | 0,83333333             | 0,73684211            | 0,73684211             |
| <b>A6</b>  | 0,52941176  | 0,48387097             | 0,52173913            | 0,41025641             | 0,54545455            | 0,52173913             | 0,42857143            | 0,38709677             |
| <b>A7</b>  | 0,85  | 0,8                    | 0,82352941            | 0,8                    | 0,8                   | 0,8125                 | 0,88235294            | 0,84615385             |
| <b>A8</b>  | 0,55882353  | 0,5                    | 0,57142857            | 0,48484848             | 0,58333333            | 0,56521739             | 0,46666667            | 0,4516129              |
| <b>A9</b>  | 0,58823529  | 0,55555556             | 0,57142857            | 0,41176471             | 0,61904762            | 0,6                    | 0,42424242            | 0,4375                 |
| <b>A10</b> | 0,65517241  | 0,64                   | 0,8125                | 0,76                   | 0,77777778            | 0,82352941             | 0,76190476            | 0,72727273             |
| <b>A11</b> | 1   | 1                      | 1                     | 1                      | 1                     | 1                      | 1                     | 1                      |
| <b>A12</b> | 0,76470588  | 0,78947368             | 0,73333333            | 0,70833333             | 0,84210526            | 0,88888889             | 0,8                   | 0,88235294             |
| <b>A13</b> | 1   | 1                      | 1                     | 1                      | 1                     | 1                      | 1                     | 1                      |
| <b>A14</b> | 0,76470588  | 0,76190476             | 0,77272727            | 0,72                   | 0,84210526            | 0,89473684             | 0,84210526            | 0,88888889             |
| <b>R1</b>  | 0,76470588  | 0,73913043             | 0,64                  | 0,60869565             | 0,63157895            | 0,63157895             | 0,66666667            | 0,54166667             |

**R1 :** *Candida albicans* ATCC10231

2 : Activité de protéase

| Souches    | Valeurs de Pz<br>(activité enzymatique) Protéase |                        |                       |                        |                       |                        |                       |                        |
|------------|--|------------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|
|            | pH =3,5<br>T° 30                                 |                        | pH =3,5<br>T° 37      |                        | pH =7<br>T° 30        |                        | pH =7<br>T° 30        |                        |
|            | 1 <sup>er</sup> essai                            | 2 <sup>ème</sup> essai | 1 <sup>er</sup> essai | 2 <sup>ème</sup> essai | 1 <sup>er</sup> essai | 2 <sup>ème</sup> essai | 1 <sup>er</sup> essai | 2 <sup>ème</sup> essai |
| <b>A1</b>  | 0,64705882                                       | 0,66666667             | 0,70588235            | 0,76470588             | 1                     | 1                      | 1                     | 1                      |
| <b>A2</b>  | 0,8  | 0,84615385             | 0,6875                | 0,66666667             | 1                     | 1                      | 1                     | 1                      |
| <b>A3</b>  | 0,73333333                                       | 0,78571429             | 0,66666667            | 0,70588235             | 1                     | 1                      | 1                     | 1                      |
| <b>A4</b>  | 0,73333333                                       | 0,71428571             | 0,76923077            | 0,75                   | 1                     | 1                      | 1                     | 1                      |
| <b>A5</b>  | 0,75   | 0,78571429             | 0,84615385            | 0,86666667             | 1                     | 1                      | 1                     | 1                      |
| <b>A6</b>  | 0,83333333                                       | 0,84615385             | 0,76923077            | 0,77777778             | 1                     | 1                      | 1                     | 1                      |
| <b>A7</b>  | 0,68421053                                       | 0,73333333             | 0,6                   | 0,66666667             | 1                     | 1                      | 1                     | 1                      |
| <b>A8</b>  | 0,66666667                                       | 0,64285714             | 0,78571429            | 0,78571429             | 1                     | 1                      | 1                     | 1                      |
| <b>A9</b>  | 0,76923077                                       | 0,83333333             | 0,75                  | 0,76470588             | 1                     | 1                      | 1                     | 1                      |
| <b>A10</b> | 0,66666667                                       | 0,71428571             | 0,625                 | 0,6875                 | 1                     | 1                      | 1                     | 1                      |
| <b>A11</b> | 0,83333333                                       | 0,85714286             | 0,83333333            | 0,88235294             | 1                     | 1                      | 1                     | 1                      |
| <b>A12</b> | 0,73333333                                       | 0,78571429             | 0,89473684            | 0,88235294             | 1                     | 1                      | 1                     | 1                      |
| <b>A13</b> | 0,83333333                                       | 0,77272727             | 0,86666667            | 0,81818182             | 1                     | 1                      | 1                     | 1                      |
| <b>A14</b> | 0,71428571                                       | 0,78571429             | 0,88888889            | 0,82352941             | 1                     | 1                      | 1                     | 1                      |
| <b>R1</b>  | 0,6875   | 0,70588235             | 0,52380952            | 0,57894737             | 1                     | 1                      | 1                     | 1                      |

**R1** : *Candida albicans* ATCC10231

3 : Activité d'estérase

| Souches    | Valeurs de Pz<br>(activité enzymatique) Estérase |                        |                       |                        |                       |                        |                       |                        |
|------------|--|------------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|
|            | pH =5<br>T° 30                                   |                        | pH =5<br>T° 37        |                        | pH =7<br>T° 30        |                        | pH =7<br>T° 37        |                        |
|            | 1 <sup>er</sup> essai                            | 2 <sup>ème</sup> essai | 1 <sup>er</sup> essai | 2 <sup>ème</sup> essai | 1 <sup>er</sup> essai | 2 <sup>ème</sup> essai | 1 <sup>er</sup> essai | 2 <sup>ème</sup> essai |
| <b>A1</b>  | 0,58823529                                       | 0,54545455             | 0,44                  | 0,5                    | 0,42105263            | 0,46428571             | 0,42307692            | 0,48148148             |
| <b>A2</b>  | 0,6  | 0,59090909             | 0,66666667            | 0,6875                 | 0,38888889            | 0,48                   | 0,625                 | 0,66666667             |
| <b>A3</b>  | 0,36363636                                       | 0,57692308             | 0,5                   | 0,51851852             | 0,30952381            | 0,53846154             | 0,36111111            | 0,44444444             |
| <b>A4</b>  | 0,59090909                                       | 0,56521739             | 0,59090909            | 0,57142857             | 0,4                   | 0,5                    | 0,55555556            | 0,57142857             |
| <b>A5</b>  | 0,58823529                                       | 0,60869565             | 0,48148148            | 0,58333333             | 0,46                  | 0,5                    | 0,38888889            | 0,4137931              |
| <b>A6</b>  | 0,53846154                                       | 0,53571429             | 0,44827586            | 0,48148148             | 0,32608696            | 0,4137931              | 0,42857143            | 0,46153846             |
| <b>A7</b>  | 0,5625   | 0,52                   | 0,47058824            | 0,4375                 | 0,45714286            | 0,44827586             | 0,32432432            | 0,4                    |
| <b>A8</b>  | 0,52173913                                       | 0,47619048             | 0,4375                | 0,4516129              | 0,4                   | 0,41935484             | 0,33333333            | 0,36666667             |
| <b>A9</b>  | 0,59090909                                       | 0,60869565             | 0,61538462            | 0,56                   | 0,5                   | 0,43333333             | 0,51724138            | 0,4137931              |
| <b>A10</b> | 0,55   | 0,55555556             | 0,5                   | 0,46428571             | 0,4375                | 0,4                    | 0,51612903            | 0,4                    |
| <b>A11</b> | 1  | 1                      | 1                     | 1                      | 1                     | 1                      | 1                     | 1                      |
| <b>A12</b> | 0,52   | 0,48148148             | 0,48275862            | 0,5                    | 0,35714286            | 0,43333333             | 0,52173913            | 0,51515152             |
| <b>A13</b> | 1  | 1                      | 1                     | 1                      | 1                     | 1                      | 1                     | 1                      |
| <b>A14</b> | 0,41935484                                       | 0,48                   | 0,44444444            | 0,44                   | 0,31428571            | 0,40740741             | 0,4                   | 0,5                    |
| <b>R1</b>  | 0,55555556                                       | 0,5                    | 0,35135135            | 0,52631579             | 0,31578947            | 0,4                    | 0,35714286            | 0,31578947             |

**R1** : *Candida albicans* ATCC10231

**Annexe 03 :** Activité des phospholipases, protéases et estérases chez les souches de *C. albicans* en absence et en présence des mélanges E1/AmB et E2/AmB.

*I : Activité phospholipase*

| Souches                                 | Activité de phospholipase sans E1, E2/AmB |                        |                              |                        |                                      |                        | Activité de phospholipase en présence de E1/AmB |                        |                              |                        |                                      |                        | Activité de phospholipase en présence de E2/AmB |                        |                              |                        |                                      |                        |
|---|---|------------------------|------------------------------|------------------------|--------------------------------------|------------------------|---|------------------------|------------------------------|------------------------|--------------------------------------|------------------------|---|------------------------|------------------------------|------------------------|--------------------------------------|------------------------|
|   | Diamètre (cm) colonie                     |                        | Diamètre (cm) colonie + zone |                        | Valeurs de Pz (activité enzymatique) |                        | Diamètre (cm) colonie                           |                        | Diamètre (cm) colonie + zone |                        | Valeurs de Pz (activité enzymatique) |                        | Diamètre (cm) colonie                           |                        | Diamètre (cm) colonie + zone |                        | Valeurs de Pz (activité enzymatique) |                        |
|   | 1 <sup>er</sup> essai                     | 2 <sup>ème</sup> essai | 1 <sup>er</sup> essai        | 2 <sup>ème</sup> essai | 1 <sup>er</sup> essai                | 2 <sup>ème</sup> essai | 1 <sup>er</sup> essai                           | 2 <sup>ème</sup> essai | 1 <sup>er</sup> essai        | 2 <sup>ème</sup> essai | 1 <sup>er</sup> essai                | 2 <sup>ème</sup> essai | 1 <sup>er</sup> essai                           | 2 <sup>ème</sup> essai | 1 <sup>er</sup> essai        | 2 <sup>ème</sup> essai | 1 <sup>er</sup> essai                | 2 <sup>ème</sup> essai |
| <b><i>C. albicans</i><br/>ATCC10231</b> | 1,6                                       | 1,4                    | 2,5                          | 2,3                    | 0,64<br>(forte)                      | 0,6086<br>(forte)      | 1,1   | 1,1                    | 1,1                          | 1,1                    | 1<br>(négative)                      | 1<br>(négative)        | 1   | 1                      | 1                            | 1                      | 1<br>(négative)                      | 1<br>(négative)        |
| <b>A6</b>                               | 1,2                                       | 1,6                    | 2,3                          | 3,9                    | 0,5217<br>(forte)                    | 0,4102<br>(forte)      | 1,2   | 1,2                    | 1,2                          | 1,2                    | 1<br>(négative)                      | 1<br>(négative)        | 1,2   | 1,2                    | 1,2                          | 1,2                    | 1<br>(négative)                      | 1<br>(négative)        |
| <b>A8</b>                               | 1,2                                       | 1,6                    | 2,1                          | 3,3                    | 0,5714<br>(forte)                    | 0,4848<br>(forte)      | 1   | 1                      | 1                            | 1                      | 1<br>(négative)                      | 1<br>(négative)        | 0,9   | 0,9                    | 0,9                          | 0,9                    | 1<br>(négative)                      | 1<br>(négative)        |
| <b>A11</b>                              | 1,1                                       | 1,5                    | 1,1                          | 1,5                    | 1<br>(négative)                      | 1<br>(négative)        | 1,1   | 1,1                    | 1,1                          | 1,1                    | 1<br>(négative)                      | 1<br>(négative)        | 1,2   | 1,2                    | 1,2                          | 1,2                    | 1<br>(négative)                      | 1<br>(négative)        |
| <b>A13</b>                              | 1,1                                       | 1,4                    | 1,1                          | 1,4                    | 1<br>(négative)                      | 1<br>(négative)        | 1,3   | 1,3                    | 1,3                          | 1,3                    | 1<br>(négative)                      | 1<br>(négative)        | 1,1   | 1,1                    | 1,1                          | 1,1                    | 1<br>(négative)                      | 1<br>(négative)        |

2 : Activité de protéase

| Souches                                 | Activité de protéase sans E1, E2/AmB |                        |                              |                        |                                      |                        | Activité de protéase en présence de E1/AmB |                        |                              |                        |                                      |                        | Activité de protéase en présence de E2/AmB |                        |                              |                        |                                      |                        |
|---|--------------------------------------|------------------------|------------------------------|------------------------|--------------------------------------|------------------------|--|------------------------|------------------------------|------------------------|--------------------------------------|------------------------|--|------------------------|------------------------------|------------------------|--------------------------------------|------------------------|
|   | Diamètre (cm) colonie                |                        | Diamètre (cm) colonie + zone |                        | Valeurs de Pz (activité enzymatique) |                        | Diamètre (cm) colonie                      |                        | Diamètre (cm) colonie + zone |                        | Valeurs de Pz (activité enzymatique) |                        | Diamètre (cm) colonie                      |                        | Diamètre (cm) colonie + zone |                        | Valeurs de Pz (activité enzymatique) |                        |
|   | 1 <sup>er</sup> essai                | 2 <sup>ème</sup> essai | 1 <sup>er</sup> essai        | 2 <sup>ème</sup> essai | 1 <sup>er</sup> essai                | 2 <sup>ème</sup> essai | 1 <sup>er</sup> essai                      | 2 <sup>ème</sup> essai | 1 <sup>er</sup> essai        | 2 <sup>ème</sup> essai | 1 <sup>er</sup> essai                | 2 <sup>ème</sup> essai | 1 <sup>er</sup> essai                      | 2 <sup>ème</sup> essai | 1 <sup>er</sup> essai        | 2 <sup>ème</sup> essai | 1 <sup>er</sup> essai                | 2 <sup>ème</sup> essai |
| <b><i>C. albicans</i><br/>ATCC10231</b> | 1,1                                  | 1,1                    | 2,1                          | 1,9                    | 0,5238<br>(forte)                    | 0,5789<br>(forte)      | 0,8  | 0,8                    | 0,8                          | 0,8                    | 1<br>(négative)                      | 1<br>(négative)        | 0,8  | 0,4                    | 0,8                          | 0,4                    | 1<br>(négative)                      | 1<br>(négative)        |
| <b>A6</b>                               | 1                                    | 1,4                    | 1,3                          | 1,8                    | 0,7692<br>(moyenne)                  | 0,7777<br>(moyenne)    | 0,5  | 0,5                    | 0,5                          | 0,5                    | 1<br>(négative)                      | 1<br>(négative)        | 0,6  | 0,8                    | 0,6                          | 0,8                    | 1<br>(négative)                      | 1<br>(négative)        |
| <b>A8</b>                               | 1,1                                  | 1,2                    | 1,4                          | 1,5                    | 0,7857<br>(moyenne)                  | 0,8<br>(légère)        | 0,6  | 0,6                    | 0,6                          | 0,6                    | 1<br>(négative)                      | 1<br>(négative)        | 0,7  | 0,8                    | 0,7                          | 0,8                    | 1<br>(négative)                      | 1<br>(négative)        |
| <b>A11</b>                              | 1,5                                  | 1,5                    | 1,8                          | 1,7                    | 0,8333<br>(légère)                   | 0,8823<br>(légère)     | 0,9  | 1                      | 1,1                          | 1,2                    | 0,8181<br>(légère)                   | 0,8333<br>(légère)     | 1  | 0,9                    | 1,2                          | 1,1                    | 0,8333<br>(légère)                   | 0,8181<br>(légère)     |
| <b>A13</b>                              | 2,6                                  | 1,8                    | 3                            | 2,2                    | 0,8666<br>(légère)                   | 0,8181<br>(légère)     | 1  | 1                      | 1,3                          | 1,4                    | 0,7692<br>(moyenne)                  | 0,7142<br>(moyenne)    | 1,3  | 1,4                    | 1,6                          | 1,7                    | 0,8125<br>(légère)                   | 0,8235<br>(légère)     |

C: Activité d'estérase

| Souches                      | Activité d'estérase sans E1, E2/AmB |                        |                              |                        |                                      |                        | Activité d'estérase en présence de E1/AmB |                        |                              |                        |                       |                        | Activité d'estérase en présence de E2/AmB |                        |                              |                        |                       |                        |
|------------------------------|-------------------------------------|------------------------|------------------------------|------------------------|--------------------------------------|------------------------|---|------------------------|------------------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|---|------------------------|------------------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|
|                              | Diamètre (cm) colonie               |                        | Diamètre (cm) colonie + zone |                        | Valeurs de Pz (activité enzymatique) |                        | Diamètre (cm) colonie                     |                        | Diamètre (cm) colonie + zone |                        | Valeurs de Pz         |                        | Diamètre (cm) colonie                     |                        | Diamètre (cm) colonie + zone |                        | Valeurs de Pz         |                        |
|                              | 1 <sup>er</sup> essai               | 2 <sup>ème</sup> essai | 1 <sup>er</sup> essai        | 2 <sup>ème</sup> essai | 1 <sup>er</sup> essai                | 2 <sup>ème</sup> essai | 1 <sup>er</sup> essai                     | 2 <sup>ème</sup> essai | 1 <sup>er</sup> essai        | 2 <sup>ème</sup> essai | 1 <sup>er</sup> essai | 2 <sup>ème</sup> essai | 1 <sup>er</sup> essai                     | 2 <sup>ème</sup> essai | 1 <sup>er</sup> essai        | 2 <sup>ème</sup> essai | 1 <sup>er</sup> essai | 2 <sup>ème</sup> essai |
| <b>C. albicans ATCC10231</b> | 1,5                                 | 1,2                    | 4,2                          | 3,8                    | 0,3571 (forte)                       | 0,3157 (forte)         | 1,1                                       | 1,3                    | 1,4                          | 1,7                    | 0,7857 (moyenne)      | 0,7647 (moyenne)       | 1,2                                       | 1,3                    | 1,2                          | 1,3                    | 1 (négative)          | 1 (négative)           |
| <b>A6</b>                    | 1,2                                 | 1,2                    | 2,8                          | 2,6                    | 0,4285 (forte)                       | 0,4615 (forte)         | 1,2                                       | 1,3                    | 2,5                          | 2,6                    | 0,48 (forte)          | 0,5 (forte)            | 1,1                                       | 1,3                    | 2                            | 2,2                    | 0,55 (forte)          | 0,5909 (forte)         |
| <b>A8</b>                    | 1,1                                 | 1,1                    | 3,3                          | 3                      | 0,3333 (forte)                       | 0,3666 (forte)         | 1,2                                       | 1                      | 2,7                          | 2,5                    | 0,4444 (forte)        | 0,4 (forte)            | 1,1                                       | 1,2                    | 1,6                          | 1,8                    | 0,6875 (forte)        | 0,6666 (forte)         |
| <b>A11</b>                   | 1,3                                 | 1,3                    | 1,3                          | 1,3                    | 1 (négative)                         | 1 (négative)           | 0,9                                       | 0,9                    | 0,9                          | 0,9                    | 1 (négative)          | 1 (négative)           | 1,1                                       | 1,1                    | 1,1                          | 1,1                    | 1 (négative)          | 1 (négative)           |
| <b>A13</b>                   | 1,4                                 | 1,3                    | 1,4                          | 1,3                    | 1 (négative)                         | 1 (négative)           | 1   | 1                      | 1                            | 1                      | 1 (négative)          | 1 (négative)           | 1,4                                       | 1,4                    | 1,4                          | 1,4                    | 1 (négative)          | 1 (négative)           |