

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

Centre Universitaire Abbes LAGHROUR-Khenchela
Institut des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie

Mémoire

Pour l'obtention du Diplôme de Master II en Microbiologie

Thème

Mise en évidence d'une activité anti-*Cryptococcus neoformans* chez des levures.

Soutenu le : 03/06/2012

Présenté par :

BOUACID Fouzia

BOUZIANE Rachida

RIM Monira

Devant le jury :

Président : M^r. DARBOUCHE A.	Professeur	Centre Universitaire de Khenchela
Rapporteur : M^{lle}. LABBANI F-Z K.	M.A.A	Centre Universitaire de Khenchela
Examineur : M^{lle}. LEULMI N.	M.A.B	Centre Universitaire de Khenchela

Année Universitaire : 2011-2012

REMERCIEMENT

Evidemment, j'ai à cœur d'exprimer ma gratitude à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation du travail qui est présenté dans ce manuscrit.

*Mes remerciements les plus sincères s'adressent en premier lieu à «Allah» qui nous a donné la force et le courage .Et en deuxième lieu, mon Encadreur Madame **LABBANI Kenza**, pour ses conseils judicieux, et son aide au laboratoire et de m'avoir transmis ses connaissances, son jugement critique et son appui tout au long de cette étude.*

*Je remercie le chef du département le professeur **DERBOUCHE**, et les membres de jury , et à tous l'équipe de la biologie d'avoir accepté d'héberger mes travaux expérimentaux.*

Enfin je remercie l'ensemble du personnel du Laboratoire de la microbiologie pour l'énergie phénoménale qui a été dépensée afin de faire revivre cette unité de recherche.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à Ma mère pour m'avoir mis au monde et pour m'avoir accompagné tout le long de ma vie. Pour ta présence dans mes moments les plus difficiles, et si j'en suis arrivée là ce n'est que grâce à toi ma maman adorée. Puisse dieu te prêter longue vie et bonne santé.

A mon très cher père aucun mot ne saurait exprimer tout mon amour et toute ma gratitude. Merci pour tes sacrifices le long de ces années. Merci pour ta présence rassurante. Tu as toujours, la lumière qui me guide dans les moments les plus obscures. Puisse dieu te prêter longue vie et bonne santé.

A ma chère belle-sœur Amel, mes chers beaux-frères : Adel, Ramzi et Oussama Je vous dédie ce travail en témoignage de mon grand amour, mon grand respect et ma profonde estime Que Dieu vous protège.

A mes très chères amies Je vous dédie ce mémoire en témoignage de ma grande affection et en souvenir des agréables moments passés ensemble et leurs encouragements à la réalisation de ce travail.

A mes cousines et mes cousins.

A tous ceux qui me sont chers et que j'ai omis de citer

RIM MOUNIRA

Dédicace

Je dédie ce travail à mon mère qui est l'esprit de ma vie, Pour ta présence dans mes moments les plus difficiles sans t'inquiéter moi.

À tous les membres de ma famille : Soumia, Samir, et surtout Fatah, , pour tout ce qui ont fait pour moi, pour leur patience et leur encouragement.

À mon oncle Mohammed, et tous mes tantes et mes voisines.

Ainsi je n'oublie pas mon Père, c'est vrai il est mort, mais je lui 'envoyé un grand merci.

Sans oublier tous les « collègues » étudiants que j'ai pu côtoyer durant ces Années,

Mes chers amis : Sabrina, Imane, Rachida, Sabrina, Karima, Saïda. Soulef. ... Surtout Bachir et mille mercis pour son coopération et son conseil.

Et tous ce que je l'aime.

Bouacide Fouzia

Dédicace

Je dédie ce travail à

Mon très cher père qui a fournir tout effort que je ne manque de rien pour les mots me suffira jamais pour le remercie.

A ma mère en témoignage de mon amour ,son courage ,patience et sa sacrifice qu' elle consentit a mon égale devant a tout ma vie

A mes sœurs : Selma, sameh

A mes frères : mored, djesser

Son oublie ma grand père et ma grande mère mes oncles et mes tantes, a touts cousines et cousins, a mes voisines

Je dédie, ce travail a mes amies fideles.

Que tous ceux qui m'ont aidée dans la réalisation de ce travail trouvent ici l'expression de ma gratitude.

A toutes la promotion 2012.

A toutes les personnes que j'aime.

Bouziane Rachida

Beuxiane Paschida

Liste des figures

	Page
Figure 1 : Le phénomène killer.	04
Figure 2 : Mode d'action de la toxine killer sécrétée par <i>saccharomyces cerevisiae</i> .	06
Figure 3 : Visualisation par coloration à l'encre de Chine de la capsule polysidique de <i>Cryptococcus neoformans</i> .	13
Figure 4: Cycle sexuel de <i>C. neoformans</i> .	16
Figure 5 : Représentation idéalisée d'une cellule <i>C. neoformans</i> notez que la mélanine se trouve dans la paroi.	16
Figure 6 : Aspect macroscopique des souches de levures à étudier après une culture sur milieu YPGA à 25°C pendant 24 heures.	20
Figure 7 : Test de la mise en évidence de l'activité killer des souches <i>Cryptococcus</i> sp. (A) ; <i>Meyerozyma</i> sp. (B) ; <i>Pichia</i> sp. (C) et <i>Saccharomyces</i> sp.(D), contre <i>Cryptococcus neoformans</i> .	23
Figure 8 : Test de l'expression du phénotype killer contre <i>C. neoformans</i> sur milieu YPGA-BM (pH 4,5) après 5 jours d'incubation à 25°C.	24

Liste des tableaux

	Page
Tableau 1 : Quelques espèces de levure killer.	03
Tableau 2 : Applications potentielles des toxines killer.	10
Tableau 3 : Classification de l'espèce <i>Cryptococcus neoformans</i> .	12
Tableau 4 : Activité killer des quatre isolats de levures sur milieu sur milieu YPGA-BM, en présence des concentrations de 0%, 1% et 3% de NaCl.	25

Liste des abréviations

NaCl : chlore de sodium.

Na₂HPO₄ : phosphate di-sodique

C₆H₈O₇ : l'acide citrique.

YPGA: Yeast -extract Peptone Glucose Agar.

YPGA-MB: Yeast -extract Peptone Glucose Agar- Blue de
Methylene.

MAT a : mating type a

MAT alpha : mating type alpha

Sommaire

	Page
INTRODUCTION GENERALE	1
PARTIE I. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	
CHAPITRE 1. Phénomène killer	
1. Introduction	3
2. Rôle écologique du phénomène killer de levures	5
3. Origine de l'activité antimicrobienne	5
4. Mode d'action de toxines killer	7
5. Paramètres déterminants l'intensité et l'interaction	7
5.1. Sensibilité	8
5.2. Quantité de toxine	8
5.3. Etat physiologique	8
5.4. Environnement	9
6. Intérêt de phénomène killer	9
7. Intérêt médical de phénomène killer	10
CHAPITRE 2. Levures pathogènes : <i>Cryptococcus neoformans</i>.	
1. Introduction	11
2. Taxonomie	11
3. Morphologie	12
4. Habitat	14
5. Multiplication	14
6. Mode de transmission	15
7. Facteurs de virulence	17
7.1. La capsule	17
7.2. La mélanine	17

PARTIE II: MATERIEL ET METHODES

1. Matériel	
1.1. Matériel biologique	19
1.2. Milieux de culture	19
1.3. Tampon	21
2. Méthodes	21
2.1. Maintenance de souches de levures	21
2.2. Test de la mise en évidence de l'activité killer contre <i>C. neoformans</i>	21
2.3. Effet de la concentration du NaCl sur l'activité killer	22

PARTIE 3. RESULTATS ET DISCUSSION

. Résultats et discussion	25
Conclusion générale	28
Références bibliographiques	29
Résumés	

Introduction générale

Durant les trois dernières décennies, les microorganismes ont apporté une contribution significative dans plusieurs domaines industriels. Parmi ces microorganismes, on recense les levures : un groupe de champignons microscopiques et unicellulaires, qui présente une grande importance dans divers secteurs de biotechnologies (Manyri, 2005).

En tant qu'un groupe de microorganismes, les levures présentent une distribution cosmopolite. Elles peuvent être isolées à partir des feuilles, des fleurs, des fruits, des insectes, de l'eau, le sol, etc. (Cabral *et al.*, 2009). Dans les stratégies écologiques, les levures peuvent agir comme agents antagonistes contre d'autres souches sensibles éventuellement présentes dans le même milieu, afin d'éliminer leur accès aux éléments nutritifs et dominer finalement sur la niche écologique (Cabral *et al.*, 2009). En fait, ce phénomène est basé sur la sécrétion par une souche de levure dite « killer » d'une protéine ou glycoprotéine (toxine killer) ayant une activité létale ou inhibitrice vis-à-vis des microorganismes cibles, qualifiés de « sensibles », qui appartiennent soit à la même espèce, soit à d'autres espèces ou bien aux genres différents de levures (Hua *et al.*, 2010).

Le phénomène killer a été découvert pour la première fois chez *Saccharomyces cerevisiae* par Bevan et Makower en 1963. Ensuite, l'attention donnée à ce phénomène a augmenté et par voie de conséquence, les levures killer ont été identifiées dans environ 100 espèces appartenant à plus de 20 genres de levures tels que : *Candida*, *Cryptococcus*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Zygosaccharomyces*, etc. (Hua *et al.*, 2010). En effet, les levures killer et leurs toxines peuvent présenter des potentialités d'applications dans différents domaines : le domaine des industries alimentaire et de fermentation, le domaine de la conservation des aliments et le domaine agricole (Goretti *et al.*, 2009 ; Antonio *et al.*, 2011).

Dans le domaine médical, l'utilisation du caractère killer a été également révélé pour l'élaboration de nouveaux agents antifongiques dans le traitement des mycoses humaines et animales, a été également révélé (Lim & Tay, 2011). Aussi, les trois dernières décennies ont assisté à une augmentation dramatique des infections fongiques en raison de l'augmentation de la population immunodéprimée. Par exemple, la méningite cryptococcose, causée par la levure pathogène *Cryptococcus neoformans*, peut provoquer une mortalité de 30% au sein de patients immunodéprimé. D'un autre côté, le nombre d'agents antifongiques, actuellement disponibles, avec une faible potentialité d'action. De plus, ils peuvent présenter une toxicité pour l'homme hôte (Türeli, 2005). Par conséquent, la recherche pour de nouveaux agents antifongiques avec un

spectre d'action plus large est devenue nécessaire pour le contrôle de la propagation des mycoses.

Dans cette optique, le présent travail a pour objectif d'évaluation de la production d'une activité anti-*Cryptococcus neoformans* par des souches de levures isolées de l'environnement.

La première partie de ce mémoire est une Synthèse bibliographique comprenant deux chapitres. Le premier chapitre décrit le phénomène killer des levures, son rôle écologique, son origine, les caractéristiques et le mode d'action des toxines killer ainsi que les différentes applications du système killer. Le deuxième chapitre représente une description générale de la levure pathogène *Cryptococcus neoformans* : classification, morphologie, habitat naturel, multiplication, mode de transmission, les facteurs de virulence et pathogénicité.

La partie Matériel et Méthodes décrit l'ensemble du matériel biologique et les techniques utilisées lors des manipulations effectuées.

Les résultats sont présentés dans la troisième partie de ce mémoire accompagnés d'une discussion spécifique.

La conclusion générale sur le travail présenté clôture ce manuscrit.

1. Introduction

Alors que les antibiotiques et les bactériocines ont été découverts dans la première moitié du XX^{ème} siècle, il a fallu attendre les années 1960 pour qu'un principe équivalent soit mis en évidence chez les levures. C'est ainsi en 1963 que Bevan et Makower ont mis en évidence le phénomène killer à partir d'une souche de *Saccharomyces cerevisiae* isolée de contaminants de brasserie (Bevan et Makower, 1963 ; Pommier, 2003). Ce phénomène est basé sur la sécrétion par une souche dite « killer » d'une protéine ou glycoprotéine de faible poids moléculaire, ayant une action létale sur des souches de levures « sensibles » de la même espèce ou d'autres espèces, sans contact direct de cellule à cellule (interaction indirecte). Ces substances peuvent exercer des effets antibactériens et antifongiques (Türel, 2005). L'expression du phénotype killer et la production de la toxine, sont simultanément associées à une immunité spécifique protégeant les levures killer contre leurs propres toxines (Ivanovska et Hardwik, 2005) mais elles restent sensibles aux toxines produites par les autres souches de levures (Izgu *et al.*, 2005). On qualifie de « neutre » une souche qui n'est pas sensible à une toxine et qui n'en produit pas. Par ailleurs, le phénomène killer n'est pas limité au genre *Saccharomyces cerevisiae*. On le trouve également chez des levures *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Trichosporon* et *Zygosaccharomyces* (Tableau I.1) (Golubev & Péter, 2006). La présence du caractère killer chez les souches levures indigènes de divers milieux naturels est très fréquente et il a été établi que la production de toxine peut constituer un gros avantage en cas de compétition avec des souches sensibles en condition de limitation nutritive (Pommier, 2003 ; Schmitt & Reiter, 2008).

Tableau I.1 – Quelques espèces de levure killer.

Espèces de levures	Références
<i>Cryptococcus albidus</i>	Starmer <i>et al.</i> (1987)
<i>Cryptococcus aquaticus</i>	Pfeiffer <i>et al.</i> (2004)
<i>Cryptococcus aerius</i>	Carreiro <i>et al.</i> (2002)
<i>C. flavus</i>	Buzzini and Martini (2000b)
<i>Debaryomyces occidentalis</i>	Chen <i>et al.</i> (2000)
<i>Kluyveromyces polysporus</i>	Kono and Himeno (1997)
<i>Pichia acaciae</i>	Bolen <i>et al.</i> (1994)
<i>P. anomala</i>	Sawant <i>et al.</i> (1989)
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	Weiler and Schmitt (2003)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Wickner (1996)

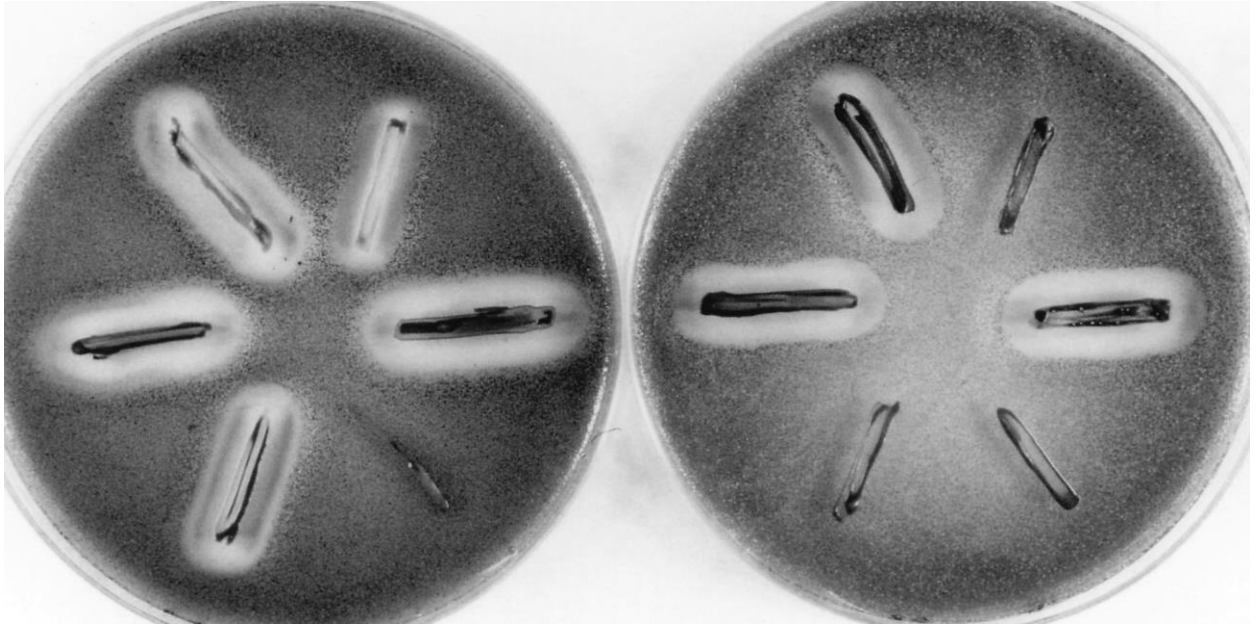


Figure I.1 - Le phénomène killer (Walter *et al*, 1997).

2. Rôle écologie du phénomène killer de levures

Les souches killer des levures peuvent être isolées à partir de diverses sources, mais elles se trouvent plus fréquemment dans les habitats où la densité de la population levurienne est relativement élevée, de sorte que la compétition soit plus intense (Golubev & Péter, 2006).

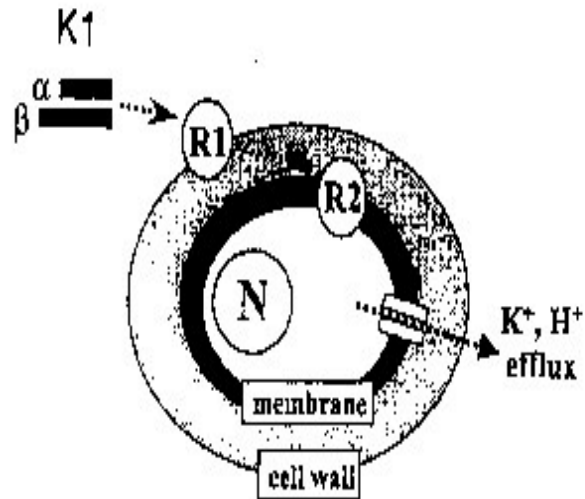
Le rôle écologique du phénomène killer des levures (production de toxine et sensibilité) a été extensivement étudié au sein des communautés des levures de fruits et du matériel végétal en décomposition (Lim & Tay, 2011). De plus, les fruits semblent être un principal habitat pour la production d'activité killer car, ils se caractérisent par un pH faible et une concentration élevée en sucres (Walter *et al.* 1997). Le système killer présente un impact remarquable sur la compétition entre les levures apparentées vis-à-vis à leur niche écologique privilégiée. Ceci, parce que la sensibilité aux toxines killer est spécifique et seules les cellules levuriennes qui contiennent des récepteurs pour les protéines killer, sont sensibles à celles-ci (Acun, 2003).

D'autre part, les levures killer isolées d'habitats particuliers peuvent présenter une activité killer contre de levures sensibles plus importante des autres habitats par rapport aux souches du même habitat. Ainsi, l'activité killer de *Pichia kluyveri* sur des levures sensibles des fruits est de 12%. Tandis que son activité contre des levures d'autres habitats est de 64%. De la même façon, la majorité des isolats du sol sont sensibles aux protéines killer produites par des levures originaires de la phyllosphère, par contre, il existe plusieurs souches résistantes parmi des isolats de fruits, ce qui indique donc une sélection au sein des communautés vis-à-vis des toxines killer (Golubev W.I & Golubev N.W, 2004).

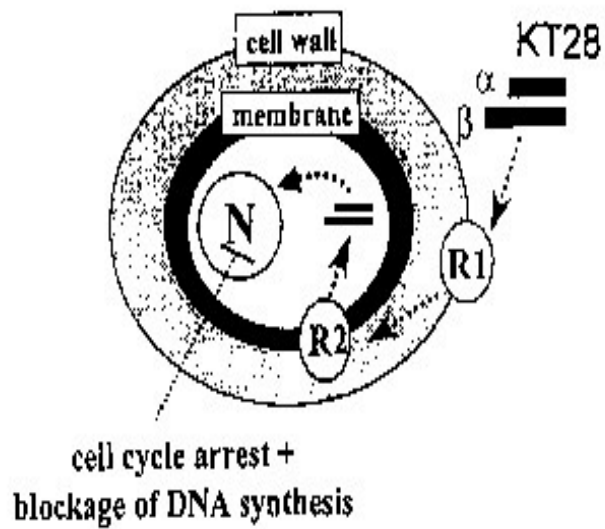
La production de toxines killer présente un outil efficace pour les souches killer de levures défendant leur niche écologique de l'invasion par les cellules antagonistes présentant les mêmes besoins nutritionnels et qui peuvent par conséquent, occuper les mêmes sites écologiques. Autrement dit, le phénomène killer présente un rôle dans le maintien de la composition de la communauté levurienne en excluant les cellules compétitives « étrangères » d'habitats particuliers (Schmit & Reiter, 2008 ; Lammi, 2011).

2. Origine du système killer de levure

Les levures sécrétant des toxines sont fréquemment infectées par un virus à ARN double brin, responsable de l'expression du phénotype killer et la sécrétion de la toxine de l'hôte infecté et un virus d'aide « *helper* » assurant la reproduction de l'ARN viral. La protéine killer peut être aussi codée par des plasmides à ADN linéaire double brin ou un chromosome (Vadaz *et al.*, 2000).



(a) Mode d'action de la toxine killer K1 de *S. cerevisiae*



(b) Mode d'action de la toxine killer K28 de *S. cerevisiae*.

Figure II.1 - Mode d'action de la toxine killer sécrétée par *S. cerevisiae* (Schmitt & Breinig, 2002).

4. Mode d'action des toxines killer

Le mode d'action des toxines killer a été largement étudié pour le système Killer K1 et K2 de *S. cerevisiae* (Figure I.1). L'activité killer des toxines de levures killer s'effectue en deux étapes : la liaison au récepteur de la paroi cellulaire et l'action au niveau de la membrane cellulaire. Ainsi donc, il a été supposé que certaines protéines killer se fixent à un récepteur de la paroi cellulaire, 1,6- β -D-glucane. Ces récepteurs se trouvent à un grand nombre sur les cellules de souches sensibles ainsi que les souches du phénotype killer. Cette étape est indépendante de l'énergie (Sesti, 2001 ; Acun, 2003).

Par ailleurs, le transfert et l'interaction avec la membrane sont des processus dépendants de l'énergie. Il a été démontré que des toxines killer provoquent un changement de la perméabilité de la membrane et la création d'un gradient de protons. Cette opération est suivie par une diminution du pH à l'intérieur de la cellule, l'inhibition des processus métaboliques, la perte d'ions K^+ et d'ATP ce qui se traduit par la mort éventuelle de la cellule sensible.

Contrairement aux autres toxines killer, la protéine killer KT28 de *S. cerevisiae* se lie aux mannoprotéines de la paroi cellulaire. L'interaction avec la membrane cellulaire provoque une inhibition rapide de la synthèse de l'ADN nucléaire (Gintar *et al*, 2004). La viabilité cellulaire est perdue plus lentement et la toxine provoque l'arrêt du cycle cellulaire dans la phase S (Figure I.1) (Schmitt & Breinig, 2002)

La toxine killer de *Kluyveromyces lactis* entraîne un arrêt irréversible du cycle cellulaire dans la phase G1 (Meneghin *et al*, 2010). De plus, Il a été démontré que les toxines sécrétées par diverses souches killer du genre *Hansenula* inhibent la biosynthèse des β -1-3-D-glucanes de la paroi cellulaire de la souche sensible. Par exemple, la toxine de *H. mrakii* provoque la formation des pores en inhibant la synthèse des β -1-3-D-glucanes ce qui se traduit par une fuite du matériel cellulaire et éventuellement la mort de la cellule (Marquina *et al*, 2002).

3. Paramètres déterminant l'intensité de l'interaction

L'intensité de l'interaction killer dépend de la sensibilité propre de la souche considérée, de la quantité de toxine fixée, de l'état physiologique des cellules et des conditions environnementales (Pommier, 2003).

3.1. Sensibilité

Les premiers éléments déterminant à la fois la vitesse et l'amplitude de l'action létale dans les systèmes killer/sensible sont la nature de la protéine killer en jeu et celle de la souche sensible. Ainsi, une hiérarchisation des souches de levures peut être établie selon leur sensibilité à une même toxine. Pour ce faire, différentes techniques de quantification de l'interaction ont été développées. On distingue deux catégories : les techniques en milieu solide basées sur le principe des antibiogrammes (Janderová *et al.*, 1999), et les techniques en milieu liquide, basées sur un suivi cinétique de la viabilité de cellules sensibles en contact avec la toxine (Pommier, 2004).

3.2. Quantité de toxine

L'effet killer est dépendant de la concentration en toxine dans le milieu, comme l'ont montré des tests de croissance de levures sensibles sur du milieu pré-fermenté par des levures killer plus ou moins dilué. Au-delà de la concentration absolue en protéine killer, c'est plus précisément le rapport entre la quantité de toxine et la quantité de cellules sensibles qui est fondamental (Pommier, 2004 ; Golubev & Péter, 2006). Plusieurs auteurs suggèrent ainsi que pour provoquer la mort d'une levure, il est nécessaire qu'un nombre minimum de molécules de toxine soient fixées sur sa paroi. Ce nombre minimum est variable d'une souche sensible à une autre. Palfree et Bussey (1979), annoncent par exemple un chiffre de 6000 molécules pour une souche sensible *S. cerevisiae* S6, alors que Bussey *et al.* (1979), annoncent un chiffre de 28000 molécules pour une souche sensible *S. cerevisiae* S14a. Il est à noter que même en conditions de large excès de toxine, il existe un temps minimum avant d'observer l'effet killer. Ce temps, court, correspond aux étapes de migration de la toxine vers la membrane plasmique et de formation de pores autorisant la fuite de composés intracellulaires (l'étape de fixation sur la paroi étant quasi-instantanée). Il a été estimé à 20 minutes pour la toxine K1 sur des cellules sensibles *Saccharomyces cerevisiae* S6 (Pommier, 2004).

3.3. Etat physiologique

Probablement en raison du lien existant entre les besoins énergétiques des cellules sensibles et l'ampleur des dégâts causés par la toxine killer, on constate que des levures en phase

exponentielle de croissance sont plus sensibles que des levures en phase stationnaire (Pommier, 2004).

3.4. Environnement

- **Température**

L'activité optimale des protéines killer se situe généralement entre 15°C et 25°C.

Au-delà de 30°C, la plupart des toxines sont totalement désactivées.

- **pH**

La gamme d'expression de l'activité killer est assez restreinte, puisqu'elle se situe entre pH 2,5 et pH 7 pour la plupart des toxines.

- **Présence de sels ou d'ions métalliques**

Il a été montré que les cations métalliques Ca^{2+} et Mg^{2+} ou le NaCl sont susceptibles d'augmenter l'activité de la protéine K1. En revanche, le KCl présent en quantité trop importante est néfaste à l'expression de l'activité killer.

- **Présence de composés organiques**

L'éthanol en concentration élevée atténue parfois l'effet killer, alors que les polyols assurent le maintien de l'activité toxique.

- **Présence de composés spécifiques**

La bentonite, les débris de parois cellulaires et les polyphénols, possèdent une capacité d'adsorption des protéines killer et peuvent réduire considérablement la toxicité au sein des milieux de fermentation (Golubev & Péter, 2006).

4. Intérêt du phénomène killer

Le phénomène killer des levures trouvent des applications dans différents domaines. En biologie cellulaire, les recherches sur le mode d'action des toxines killer ont conduit à des avancées dans l'étude des parois et des membranes plasmiques chez les champignons et les levures, des mécanismes de transcription protéique et de l'interaction virus-hôte (Marquina *et al*, 2002). Aussi, il pouvait avoir des applications biotechnologiques à la fois dans les processus de fermentation et de conservation des aliments et en médecine (Tableau I.2). Dans la technologie de l'ADN recombinant, les plasmides killer de *S. cerevisiae* et *K. Lactis* servent de vecteurs de clonage pour l'expression de polypeptides (Meneghin *et al*, 2010).

Tableau I .2 - Applications potentielles des toxines killer (Sunee *et al*, 2009).

Domaines biotechnologiques d'application	Applications
Contrôle biologique en Agriculture. Recherches en Biologie Cellulaire sur les cellules eucaryotes. Technologie Alimentaire Génétique Médecine Taxonomie	Activité antifongique contre les champignons phytopathogènes. Etudes de la biosynthèse, la transformation cellulaire et la sécrétion des protéines. Conservation des aliments. Technologie de l'ADN recombinant (plasmides vecteur) Activité contre les souches pathogènes. Les tests de sensibilité aux toxines killer

4. Intérêt médical du phénomène killer

Le phénomène killer peut présenter des applications dans le domaine médical, l'utilisation de ce phénomène a été également révélé pour l'élaboration de nouveaux agents antifongiques dans le traitement des mycoses humaines et animales, a été également révélé (Lim & Tay, 2011). Aussi, les trois dernières décennies ont assisté à une augmentation dramatique des infections fongiques en raison de l'augmentation de la population immunodéprimée. Par exemple, la méningite cryptococcose, causée par la levure pathogène *Cryptococcus neoformans*, peut provoquer une mortalité de 30% au sein de patients immunodéprimé. D'un autre coté, le nombre d'agents antifongiques, actuellement disponibles, avec une faible potentialité d'action. De plus, ils peuvent présenter une toxicité pour l'homme hôte (Türeli, 2005). Par conséquent, la recherche pour de nouveaux agents antifongiques avec un spectre d'action plus large est devenue nécessaire pour le contrôle de la propagation des mycoses.

1 .Introduction

Chez les champignons, selon le mode de reproduction sexuée, on distingue les levures ascomycètes (par exemple : *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Hansenula*) et les levures basidiomycètes (par exemple le genre *Filobasidiella*). Les levures sont des organismes eucaryotes unicellulaires appartenant au règne des champignons. Toutes les levures du genre *Cryptococcus* sont des basidiomycètes microscopiques (environ 4 -8 µm) ayant pour particularité d'être entourées d'une capsule.

A l'heure actuelle, on référence 58 espèces différentes de *Cryptococcus*. Ces levures capsulées sont très répandues dans le monde mais très peu d'entre elles sont pathogènes pour l'homme : *Cryptococcus neoformans* (2 variétés) et *Cryptococcus gattii* (2 sérotypes) sont les deux espèces pathogènes majeures (Dorothee, 2010).

2. Taxonomie

C. neoformans (Tableau II.3) a été décrit par Vuillemin en 1901, il remplace ainsi l'espèce *Saccharomyces neoformans* dans le genre *Cryptococcus*. Puis en 1935, Benham démontre des réactions antigéniques différentes sur 2 souches de *C. neoformans*. En 1949, Evans répartit les souches en 3 groupes A, B et C en fonction de leur profil antigénique. L'année suivante, Neill puis Evans et Kessel mettent en évidence le rôle de la capsule dans la sérospécificité.

En 1968, Wilson décrit le sérotype D grâce à des réactions d'agglutination et peu de temps après, Vanbreuseghem et Takashio décrivent une souche de *C. neoformans* atypique qu'ils nommeront *C. neoformans* variété *gattii*. A partir de 1975, les travaux majeurs de Kwon-Chung et de son équipe ont permis de révéler l'existence d'une forme sexuée (téléomorphe) en croisant deux souches de sérotype D : *Filobasidiella neoformans*. Dès l'année suivante, elle décrit un téléomorphe différent : *Filobasidiella bacillispora* en croisant des souches de sérotypes B et C.

En 1999, Franzot propose de créer une nouvelle variété pour le sérotype A qui devient *C. neoformans* variété *grubii*.

Enfin, en 2002, Kwon-Chung et collaborateurs suggèrent finalement de séparer les deux espèces *neoformans* et *gattii* (Freney, 2009).

A ce jour, la nomenclature officielle reconnaît deux espèces et en résumé le sérotype A correspond à *C. neoformans* variété *grubii*, le sérotype D à *C. neoformans* variété *neoformans* et les sérotypes B et C sont regroupés sous l'espèce *C. gattii* (Institute for International Cooperation in Animal Biologics, 2005).

Tableau II.3 - Classification de l'espèce *Cryptococcus neoformans* qui décrite par Vuillemin en 1901 (Coproweb.free.fr/mycoweb/texte/163.htm).

Règne	<i>Fungi</i>
Division	<i>Basidiomycota</i>
Classe	<i>Tremellomycetes</i>
Ordre	<i>Tremellales</i>
Famille	<i>Tremellaceae</i>
Genre	<i>Cryptococcus</i>
Espèce	<i>Cryptococcus neoformans</i>

3. Morphologie

Cryptococcus neoformans est une levure sphérique ovoïde encapsulée de taille variable (moyenne de 3-10 μm). Cette levure est entourées d'une capsule polysidique, La capsule est facilement observable en microscopie optique après coloration à l'encre de chine, en effet les particules de l'encre sont repoussées par la capsule entraînant l'apparition d'un halo autour de la cellule (Figure I.3) (Pauw *et al.*, 2008).

Les levures du genre *Cryptococcus* sont généralement de forme ronde, parfois allongée ou en forme de citron et certaines espèces de *C. gattii* peuvent être elliptiques. Un aspect de vide (halo) autour des levures peut s'observer, et celles-ci peuvent avoir une forme en croissant ce qui rend leur identification plus difficile. Parfois, des levures bourgeonnantes peuvent former des chaînes faisant penser à des pseudomycéliums.

C. neoformans et *C. gattii* possèdent une capsule qui peut être parfois beaucoup plus grande que la cellule elle-même, mais certaines levures possèdent une capsule de petit diamètre la rendant difficile à voir (Freney *et al.*, 2009).

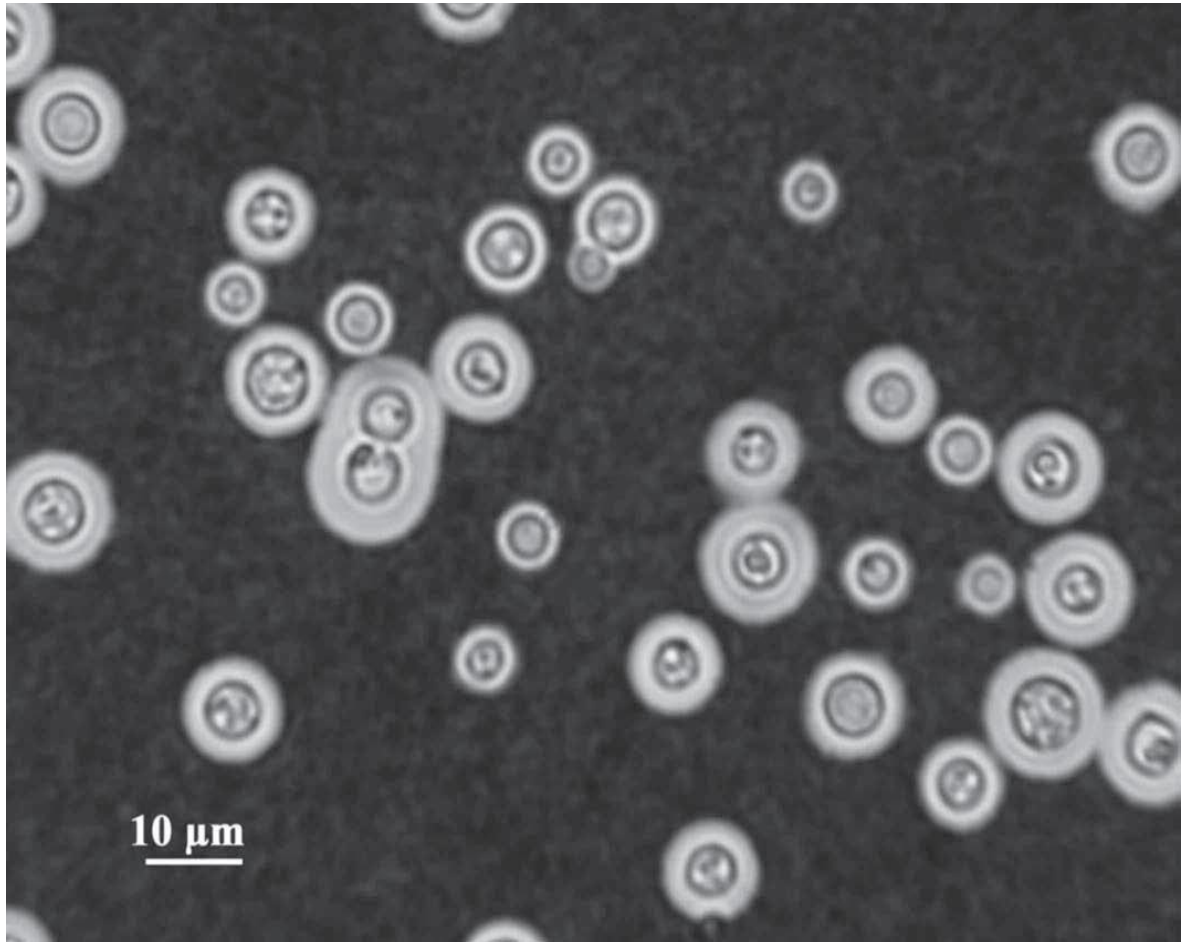


Figure I.3 - Visualisation par coloration à l'encre de Chine de la capsule polysaccharidique de *Cryptococcus neoformans* (Laborlux x40) (Freney *et al.*, 2009).

4. habitat

Les 4 sérotypes de *C. neoformans* (A, B, C et D) ont une répartition géographique et un pouvoir pathogène différents : le sérotype A est ubiquitaire et majoritaire (Franzot *et al.*, 1999), le sérotype D est principalement retrouvé en Europe où il est responsable de 20 % des infections en France (Dromer *et al.*, 2007) et les sérotypes B et C sont isolés dans les régions tropicales et subtropicales (Litvintseva *et al.*, 2005). De plus, une épidémie due à un clone hyper-virulent de sérotype B à été récemment décrite à Vancouver et dans le nord ouest des États-Unis (Datta *et al.*, 2009).

La levure *Cryptococcus neoformans* se retrouve dans le sol, les débris végétaux et les excréments d'oiseaux principalement de pigeons (Casadevall A, 1998). *Cryptococcus gattii* a été isolé des feuilles, des fleurs, d'écorces, des débris végétaux et de l'air environnant de plusieurs espèces d'Eucalyptus (*Eucalyptus camaldulensis*, *E. tereticornis* et *E. gomphocephala*) (Randhawa *et al.*, 2006) et aussi d'amandiers (*Terminalia catappa*) pour les souches de sérotype C (Callejas *et al.*, 1998). Mais il a été récemment démontré que le sol serait le réservoir principal pour cette espèce (Kidd *et al.*, 2007).

5. Multiplication

Les souches de *C. neoformans* et de *C. gattii* sont généralement haploïdes. Elles se multiplient de façon asexuée par bourgeonnement. Les 2 espèces ont aussi une reproduction sexuée hétérothallique c'est-à-dire nécessitant le croisement de deux cellules de « mating type » (ou signe sexuel) opposé (MAT a et MAT alpha).

Les deux cellules fusionnent, formant un mycélium dicaryotique ce qui aboutit à la production de basides. Après caryogamie, méiose et mitoses successives la sporulation entraîne la production de basidiospores échinulées en chaînes qui germeront pour donner des levures. Mais ce mode de reproduction semble peu fréquent dans la nature du fait de la faible proportion de cellules MAT a.

Toutefois, il existe un autre mode de multiplication observée uniquement chez les levures MAT alpha : des levures haploïdes deviennent diploïdes après endoduplication ou fusion de deux levures (same-sex mating) puis fructifient après méiose produisant ainsi des spores haploïdes sans intervention directe de souches MAT a. Ce mode de fructification est aussi appelé « haploid, monokaryotic ou homokaryotic fruiting » (Lin *et al.*, 2005).

Les basidiospores issues de fructifications monocaryotiques seraient les principaux agents infectieux. Des croisements entre variétés et même entre espèces sont aussi possibles aboutissant notamment à des cellules hybrides de sérotypes AD le plus souvent, mais aussi BD ou AB (Bovers, *et al.*, 2008 ; Bovers *et al.*, 2006 ; Lin *et al.*, 2007 ; Viviani, *et al.*, 2006).

6. Mode de transmission

Les spores sont inhalées à l'extérieur, car l'organisme est présent dans le sol (Lin, X. 2009). L'infection est acquise par inhalation, et les personnes infectées peuvent afficher une gamme de symptômes allant de la colonisation des voies aériennes sans aucun symptôme à une pneumonie sévère. Propagant dans le cerveau peut se produire, entraînant une méningo-encéphalite, qui est mortelle si non traitée (Institute for International Cooperation in Animal Biologics, 2005).

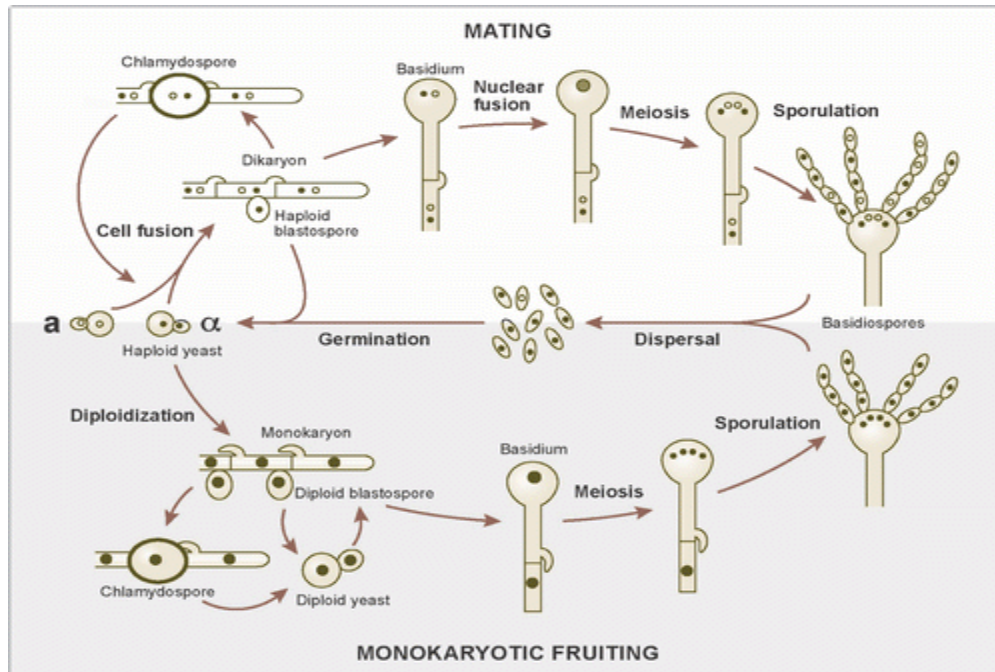


Figure I.4 - Cycle sexuel de *C. neoformans* (Heitman, 2006).

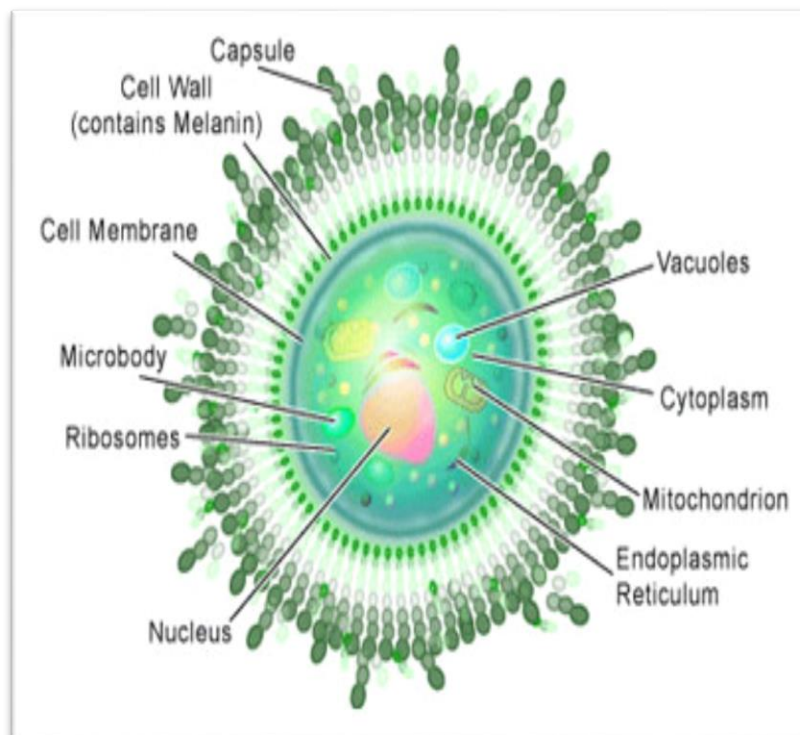


Figure I.5 - Représentation idéalisée d'une cellule *C. neoformans* notez que la mélanine se trouve dans la paroi (Simmer & Secko, 2003).

7. Les facteurs de virulence

Les facteurs de virulence augmentent le degré de pathogénicité d'un microbe. *C. neoformans* a un certain nombre de facteurs de virulence comme la capsule et la production de mélanine. Mais, il existe d'autres facteurs de virulence comme la capacité de croître à température physiologique de 37°C et la production de certaines enzymes (uréase, phospholipase, protéinase).

7.1. La Capsule

La capsule, d'une épaisseur quelquefois supérieure au diamètre de la cellule, est formée soit de microfibrilles enroulées, soit de points; le type "points" se trouve à la périphérie avec ou sans filaments radiés de type ciliaire. Une zone claire sépare souvent la capsule de la paroi cellulaire.

La Capsule est de nature polysaccharidique en réponse à de faibles niveaux de fer dans son environnement et les niveaux physiologiques de CO₂. *C. neoformans* peut synthétiser une capsule polysaccharidique épaisse. La capsule interfère avec l'action de cellules spéciales du système immunitaire appelées macrophages qui dévorent les cellules qui envahissent, protégeant ainsi les cellules de *C. neoformans* au système immunitaire.

En outre, si les macrophages parviennent à engloutir les cryptocoques, la capsule permet de survivre et de reproduire à l'intérieur du macrophage (Simmer & Secko, 2003)

7.2. La mélanine

La mélanine est un pigment foncé qui est produit par la polymérisation de composés appelés polyphénols. C'est un composé semblable à celui qui fait les taches de rousseur brun foncé. Pour *Cryptococcus*, la mélanine offre une protection contre un processus appelé oxydation meurtre. Dans les cellules immunitaires de l'hôte comme les macrophages, la destruction des cellules étrangères est accomplie en exposant les cellules englouties étrangères à des molécules hautement réactives appelées radicaux libres, qui réagissent avec les molécules comme l'ADN et les protéines. Ces réactions incontrôlées sont souvent fatales. La mélanine sert à protéger les cellules de *Cryptococcus* en neutralisant les radicaux libres (Simmer & Secko, 2003).

8. Pathogénicité

Les deux espèces levuriennes: *Cryptococcus neoformans* et *Cryptococcus gattii* provoquent une maladie opportuniste, répandue dans le monde entier, appelée Cryptococcose.

La contamination se fait essentiellement par voie respiratoire, en inhalant des levures présentes dans l'environnement (Dromer & Lortholary, 2003). Après pénétration dans les alvéoles pulmonaires, le pathogène entre en dormance, probablement dans les macrophages alvéolaires et ce pendant de nombreuses années (Garcia-Hermoso *et al.*, 2001). Lors de l'apparition d'un déficit immunitaire, elles pourraient se « réveiller », se multiplier dans les poumons provoquant une pneumopathie (Lortholary *et al.*, 2004). Dans la majorité des cas, le pathogène passe alors dans la circulation sanguine et dissémine dans l'organisme provoquant une méningo-encéphalite et l'infection d'autres tissus (peau, foie, reins, etc...) (Dromer *et al.*, 2007). Une méningite cryptococcique non traitée est fatale dans 100% des cas et même après traitement, le taux de mortalité reste de 10 à 15% (Drothée, 2010).

1. Matériel

1.1. Matériel biologique

Quatre souches de levures appartenant au genres : *Cryptococcus* sp., *Meyerozyma* sp., *Pichia* sp., et *Saccharomyces* sp., sont utilisées pour le test de la production des toxines killer. Les souches sont obtenues à partir d'un isolement du sol de la région de Constantine (Nord-est algérien), au niveau du laboratoire de Génie Microbiologique et Applications, Université MENTOURI – Constantine.

Une souche levurienne pathogène appartenant à l'espèce *Cryptococcus neoformans*, est également utilisée dans ce travail pour tester sa sensibilité vis-à-vis de l'action killer des quatre souches levuriennes. La souche pathogène est récupérée auprès du Centre Hospitalo-universitaire (CHU) BENDADIS de Constantine.

1.2. Milieux de culture

Le milieu YPGA (1.0% extrait de levure, 1.0% peptone, 2.0% glucose et 2.0% agar) est utilisé pour la culture et la maintenance des souches de levures étudiées (Figure II.1).

Le milieu YPGA-BM (1.0% extrait de levure, 2.0% peptone, 2.0% glucose, 2.0% agar, 0,003% bleu de méthylène, tamponné à pH 4,5 avec un tampon citrate-phosphate 0.1 M) est utilisé pour le test de la mise en évidence de l'activité killer sur boîtes de Pétri (Lim & Tay, 2011).

L'extrait de levure et la peptone apportent à ces milieux de culture des sources d'azote, de carbone, de vitamines, de minéraux et d'acides aminés. Quant au glucose, il constitue à la fois une source d'énergie et de carbone.

Concernant le bleu de méthylène, celui-ci constitue un colorant spécifique pour les cellules levuriennes mortes dans le milieu YPGA-BM.

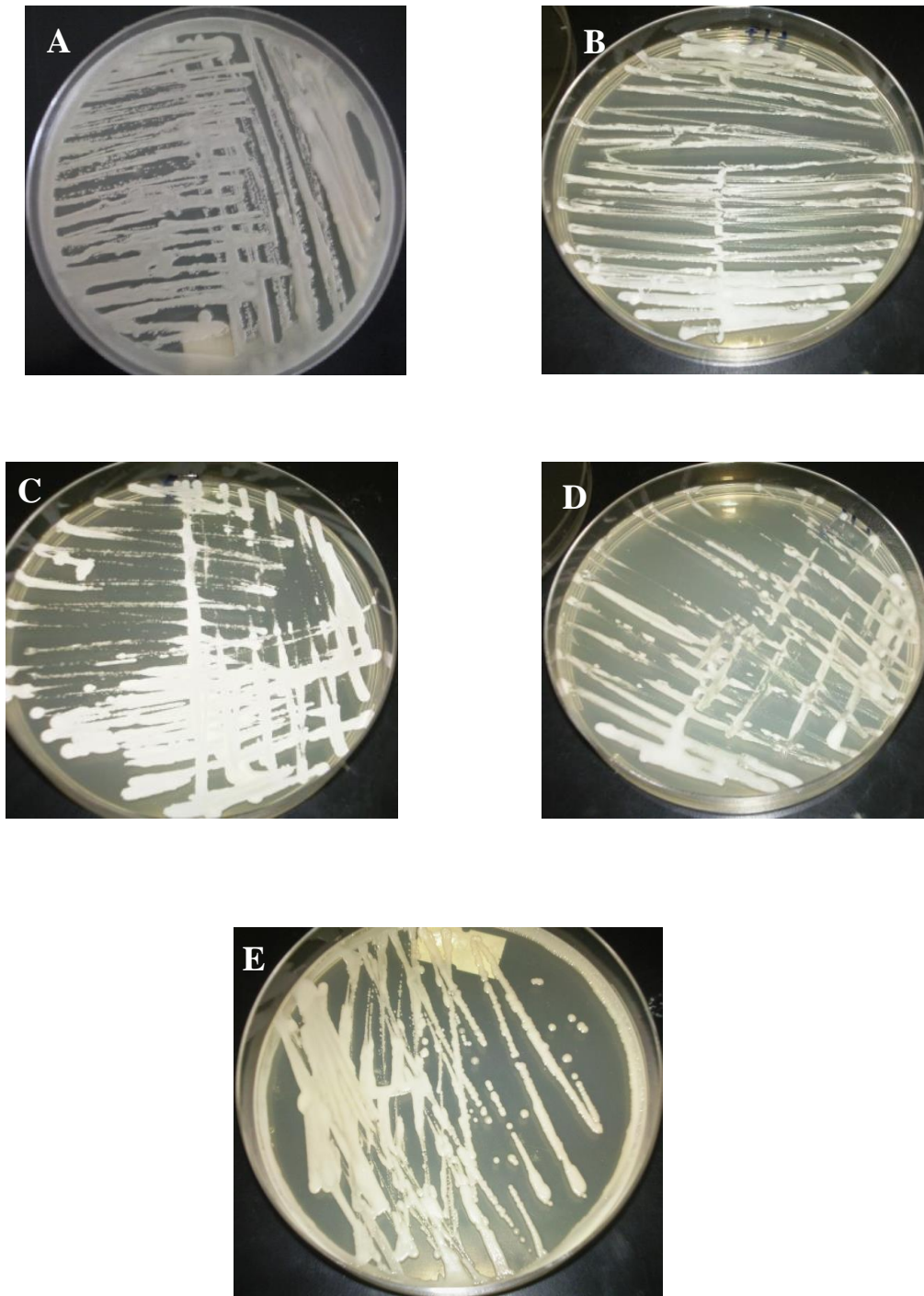


Figure II.1 – Aspect macroscopique des souches de levures étudiées après culture sur milieu YPGA à 25°C pendant 24 heures. (A) : *Cryptococcus* sp. ; (B) : *Meyerozyma* sp. ; (C) : *Pichia* sp. ; (D) : *Saccharomyces* sp. ; (E) : *Cryptococcus neoformans*.

1.3. Tampon

Le tampon citrate – phosphate 0.1M, pH 4,5 est composé de l'acide citrique ($C_6H_8O_7$) 0,1 M et du phosphate di-sodique (Na_2HPO_4) 0,2 M.

- **Préparation du tampon**

- **Solution A** : 0,1 M acide citrique, anhydre 19,2 g/L
- **Solution B** : 0,2 M Na_2HPO_4 , anhydre 28,4 g/L

1. Mélanger 270 ml de la solution A avec 230 ml de la solution B.
2. Vérifier le pH (4,5) et ajuster le.
3. Compléter avec de l'eau distillée jusqu'à un volume total de 1 L.

2. Méthodes

2.1. Maintenance des souches de levures

Les différentes souches de levures utilisées dans ce travail de mémoire sont cultivées et maintenues sur milieu YPGA à 4°C.

2.2. Mise en évidence de l'activité killer contre *Cryptococcus neoformans*

Les cellules de la levure pathogène *Cryptococcus neoformans*, potentiellement sensibles, sont cultivées à 25°C sur milieu YPGA pendant 24 heures ensuite, elles sont suspendues dans l'eau distillée stérile pour obtenir une suspension de cellules avec une densité d'environ 10^5 cellules/ml (Hua *et al.*, 2010). Après, 100 µl de cette suspension est mélangé parfaitement avec 20 ml du milieu YPGA – BM, qui est maintenu fondu à une température de 45°C dans un bain-marie puis coulé dans une boîte de Pétri (100 x 15 mm).

Après la solidification du mélange gélose – suspension, les souches des levures potentiellement killer, *Cryptococcus* sp., *Meyerozyma* sp., *Pichia* sp., et *Saccharomyces* sp., sont ensemencées en spots à la surface du milieu de culture après avoir été cultivées sur milieu YPGA pendant 24 heures et à 25°C.

Les quatre souches étudiées sont ensemencées dans une même boîte de Pétri (Figure II.2). Les cultures sont incubées à 25°C pendant 5 jours avec une observation quotidienne. Après croissance, l'apparition d'une zone claire d'inhibition entourée par de petites colonies bleues autour des cultures des souches potentiellement killer, révèle la production d'une activité killer contre la levure pathogène *Cryptococcus neoformans*.

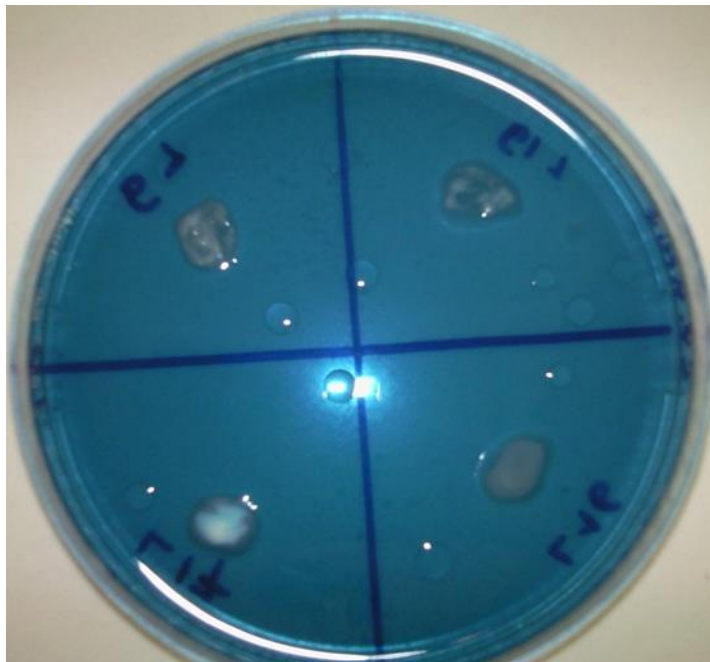


Figure II.2 - Test de la mise en évidence de l'activité killer des souches *Cryptococcus* sp. (A) ; *Meyerozyma* sp. (B) ; *Pichia* sp. (C) et *Saccharomyces* sp. (D), contre *Cryptococcus neoformans*.

2.3. Effet de la concentration du NaCl sur l'activité killer

La mise en évidence de l'activité killer des souches contre *Cryptococcus neoformans* est testée en absence du NaCl et en sa présence avec des concentrations de 1% et de 3% afin de tester l'effet de l'absence ou de la présence du NaCl sur la production de l'activité killer contre *Cryptococcus neoformans*.

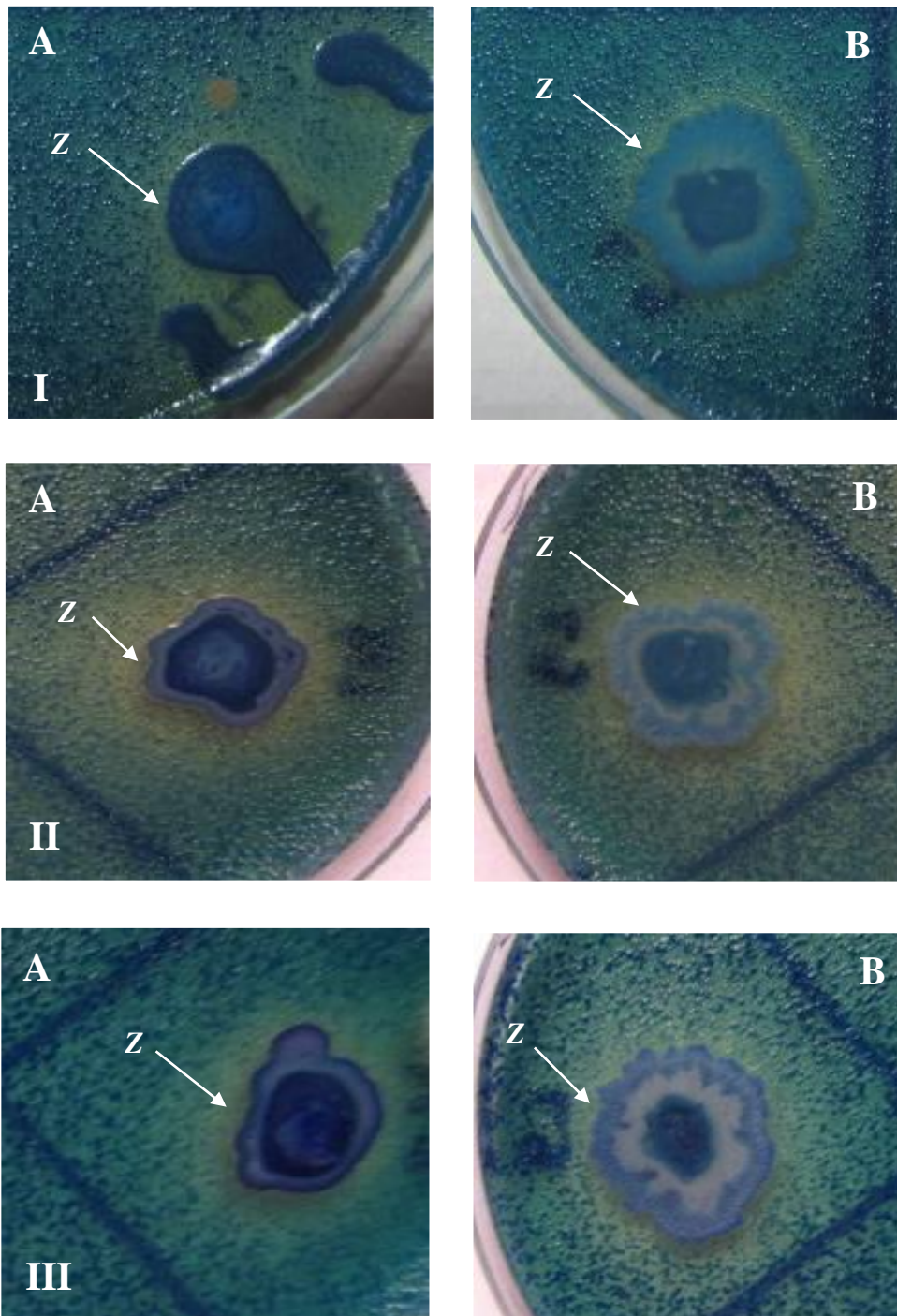


Figure III.1 – Test de l'expression du phénotype killer contre *Cryptococcus neoformans* sur milieu YPGA-BM (pH 4,5) après 5 jours d'incubation à 25°C. (I): 0% NaCl ; (II): 1% NaCl ; (III): 3% NaCl. (A): *Meyerozyma* sp. ; (B): *Pichia* sp. (Z) : Zone d'inhibition.

Résultat et discussion

Cette étude est menée dans le but de tester le potentiel killer de quatre souches levuriennes contre une souche clinique pathogène, *Cryptococcus neoformans*. Les quatre souches testées sont isolées à partir du sol de la région de Constantine (Nord-est Algérien), au niveau du laboratoire de Génie Microbiologique et Applications, Université MENTOURI – Constantine.

La mise en évidence de cette activité est réalisée par la technique de culture mixte des souches levuriennes, qui est une méthode de diffusion en milieu gélosé. Pour cela, un milieu de culture, YPGA-BM, tamponné à pH 4,5 avec un tampon citrate-phosphate (0,1 M) est utilisé dans ce travail. Le test de la production de l'activité anti-*C. neoformans* est également réalisé en présence des concentrations de 1% et 3% de NaCl afin d'évaluer son effet sur l'expression du phénotype killer.

Le résultat de ces tests montre qu'après 5 jours d'incubation à 25°C, les isolats appartenant aux genres *Meyerozyma* et *Pichia* développent une zone claire d'inhibition entourée par de petites colonies bleues. Cette zone d'inhibition devient plus claire en présence des concentrations de 1% et de 3% de NaCl dans le milieu (Figure III.1). Les souches *Meyerozyma* sp. et *Pichia* sp. Produisent donc une activité killer contre *C. neoformans*.

Cependant, les souches *Cryptococcus* sp. et *Saccharomyces* sp. ne développent aucune zone d'inhibition et par conséquent, elles n'expriment pas un phénotype killer (Tableau III.1).

Tableau III.1 - Activité killer des quatre isolats de levures sur milieu YPGA-BM, en présence des concentrations de 0%, 1% et 3% de NaCl.

Souches de levures testées	Expression du phénotype killer contre <i>C. neoformans</i> .		
	0% NaCl	1% NaCl	3% NaCl
<i>Cryptococcus</i> sp.	-	-	-
<i>Meyerozyma</i> sp.	+	+	+
<i>Pichia</i> sp.	+	+	+
<i>Saccharomyces</i> sp.	-	-	-

Différents travaux de recherche (Boekhout & Scorzetti, 1997 ; Crizeo *et al.*, 1999 ; Cenci *et al.*, 2004 ; Fuentefria *et al.*, 2005 ; Dubash *et al.*, 2010) rapportent l'expression du caractère killer contre des isolats cliniques de *C. neoformans* chez des souches de levures.

Selon Fuentefria *et al.*, (2006), des souches levuriennes, HB55 et HB88, appartenant à l'espèce *Pichia ohmeri* sont capable de produire une activité killer contre toutes les souches testées de *C. neoformans* (vars. *neoformans*, *grubii* et *gatii*). De plus, Dubash *et al.*, (2010) révèlent qu'une souche levurienne appartenant à l'espèce *Pichia anomala* montre un effet killer important contre *C. neoformans*.

D'autre part, Marquina (1997), Golubev (2006) et Hernández (2007) affirment que l'action antifongique des toxines killer produites par certaines levures halotolérantes (*Candida*, *Debaryomyces* et *Pichia* spp. etc.) peut être renforcée en présence du NaCl ce qui concorde avec nos résultats. Aussi, Llorente *et al.*, (1997) rapportent que l'activité killer de *Pichia anomala*, qui est testée en présence 0%, 3% et 6% du NaCl augmente avec l'augmentation de la concentration du NaCl. Ceci s'accorde donc avec notre résultat.

Par ailleurs, les résultats négatifs qui sont trouvés dans ce présent travail trouvent une explication dans les travaux de recherche de Dubash *et al.*, (2010) qui nous informent que la production du phénomène killer chez les levures peut dépendre de certains caractères écologiques tels que la région et l'habitat à partir duquel les levures killer sont collectées. En effet, les fruits semblent être l'habitat le plus important pour la production du phénomène killer au sein des communautés de levures. Cet habitat est caractérisé par un pH faible et une concentration élevée en sucres. De plus, les travaux de recherche de Cabral *et al.*, (2009) rapportent que le sol peut constituer aussi un réservoir pour les levures killer puisque les fruits pourris tombant dans le sol ainsi que les insectes vecteurs visiteurs des fruits peuvent jouer un grand rôle dans la propagation des souches killer dans le sol.

Dans cette optique, les souches, *Meyerozyma* sp. et *Pichia* sp. utilisées dans ce travail et qui sont trouvées productrices d'une activité killer, sont collectées à partir d'un sol agricole de la région de Constantine (Nord-est algérien), qui est riche en arbres fruitiers. Tandis que les souches *Cryptococcus* sp. et *Saccharomyces* sp. sont isolées à partir d'un sol forestier qui est riche en couvert végétal mais reste pauvre en arbres fruitiers.

Ces résultats négatifs peuvent être également expliqués par l'absence de récepteurs spécifiques aux toxines killer sur la paroi cellulaire de *C. neoformans* (Musthaq *et al.*, 2010).

Par ailleurs, le milieu de sélection de l'activité killer, YPGA-BM, utilisé dans ce travail est largement employé et recommandé par la plupart des auteurs (Golubev, 2006 ; Sangorrin *et al.*, 2007 ; Hernandez *et al.*, 2008). En effet, la composition du milieu ainsi que la solution tampon

(tampon citrate-phosphate) utilisés peuvent affecter la sensibilité du test. Cependant, les conditions optimales peuvent ne pas garantir l'efficacité du test car la caractéristique principale des toxines killer est la spécificité de leur action toxique. Par conséquent, le choix de la souche cible est donc essentiel pour la détection des levures killer (Golubev, 2006).

Selon De Oliva Neto *et al.*, (2004) l'effet killer dépend également de la concentration en toxine dans le milieu et pour provoquer la mort d'une levure sensible, il est nécessaire qu'un nombre minimum de molécules de toxine soit fixées sur ses parois.

En conclusion, nous pouvons dire que l'activité killer exprimée contre la souche pathogène *C. neoformans* prédispose les souches productrices, *Meyerozyma* sp. et *Pichia* sp. à des applications médicales. Cependant des études plus profondes sont nécessaires afin de réaliser des investigations sur la possibilité d'appliquer les toxines synthétisées comme nouveaux agents antifongiques.

Conclusion générale

L'objectif principal de ce travail est la recherche d'une activité anti-*Cryptococcus neoformans*, produite par des souches de levures isolées à partir du sol de la région de Constantine (Nord-est algérien). Les souches testées pour l'expression de l'activité killer sont : *Cryptococcus* sp., *Meyerozyma* sp., *Pichia* sp. et *Saccharomyces* sp.

Le test de la mise en évidence de l'activité killer contre *C. neoformans* sur le milieu YPGA-BM en présence des concentrations de 0%, 1% et 3% de NaCl a révélé que seules les souches *Meyerozyma* sp. et *Pichia* sp. expriment un phénotype killer. Tandis que les souches *Cryptococcus* sp. et *Saccharomyces* sp. n'en possèdent pas.

Ceci nous permet de dire que *Meyerozyma* sp. et *Pichia* sp. sont des souches halotolérantes et la présence du NaCl dans le milieu peut renforcer la production de leur caractère killer.

Enfin, nous pouvons dire que le potentiel killer des souches *Pichia* sp. et *Meyerozyma* sp. exprimé contre la souche pathogène *C. neoformans* semble être intéressant et peut qualifier les souches productrices à des applications médicales.

Cependant, des études plus profondes sont nécessaires afin de réaliser des investigations sur la possibilité d'appliquer les protéines killer synthétisées comme nouveaux agents antifongiques.

Références bibliographiques

- Acun, T. (2003). Isolation and characterization of the K4 type yeast killer toxin. Thesis to graduate school of natural and applied sciences of the middle east technical university.
- Antonio, S. ; Navascués, E. ; Bravo, E. ; Marquina, D. (2011). Ustilago maydis killer toxin as a new tool for the biocontrol of the wine spoilage yeast *Brettanomyces bruxellensis*. *Int. J. Food Biol.*, **47**(1): 147-154.
- Bevan, E.A. ; Makover, M. (1963). The physiological basis of the killer character in yeast. *Proc. XIth Int. Congr. Genet.*, Geers S.G. Editor, Pergamon Press, Oxford, 1 : 202-203.
- Bolen, P.L. ; Eastman, E.M. ; Cihak, P.L. ; Hayman, G.T. (1994). Isolation and sequence analysis of a gene from the linear DNA plasmid pPac1-2 of *Pichia acaciae* that shows similarity to a killer toxin gene of *Kluyveromyces lactis*. *Yeast* 10:403–414.
- Bovers, M., F. Hagen, E. E. Kuramae, M. R. Diaz, L. Spanjaard, F. Dromer, H. L. Hoogveld, and T. Boekhout. (2006). Unique hybrids between the fungal pathogens *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *FEMS Yeast Res* 6:599-607.
- Bovers, M., F. Hagen, and T. Boekhout. (2008). Diversity of the *Cryptococcus neoformans*-*Cryptococcus gattii* species complex. *Rev Iberoam Micol* 25:S4-12.
- Buzzini, P. ; Martini, A. (2000). Biodiversity of killer activity in yeasts isolated from the Brasil rain forest. *Can J Microbiol* 46:607–611.
- Cabral, A.S.; Barroso de Carvalho, P.M.; Pinotii, T.; Hagler, A.N.; Mendonça-Hagler, L.C.S.; Macrae, A. (2009). Killer yeasts inhibit the growth of the phytopathogen *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease. *Braz. J. Microbiol.*, **40**: 108-110.
- Carreiro, S.C.; Pagnocca, F.C.; Bacci, M.; Bueno, O.C.; Hebling, M.J.A.; Middelhoven, W.J. (2002). Occurrence of killer yeasts in leaf-cutting ant nests. *Folia Microbiol* 47:259–262.
- 7 - Casadevall A, P. J. (1998). *Cryptococcus neoformans*. ASM Press, Washington.

- Chen, W.B. ; Han, Y.F. ; Jong, S.C. ; Chang, S.C. (2000). Isolation, purification, and characterization of a killer protein from *Schwanniomyces occidentalis*. *Appl Environ Microbiol* 66:5348–5352.
- Datta, K., K. H. Bartlett, R. Baer, E. Byrnes, E.Galanis, J. Heitman, L. Hoang, M. J. Leslie, L.MacDougall, S. S. Magill, M. G. Morshed, and K. A.Marr. (2009). Spread *Cryptococcus gattii* into PacificNorthwest region of the United States. *Emerg Infect Dis* 15:1185-91.
- Dorothée, R, B. (2010). Mise au point d'une technique de serotypage des souches *de* *cryptococcus neoformans* .memoire de diplôme de l'École Pratique des Hautes Études.
- Dromer, F. and O. Lortholary (2003). Physiopathologie de la cryptococcose. *Annales de l'Institut Pasteur/actualités: Les Mycoses*. Dromer F. and Lortholary O, Elsevier: 147-159.
- Dromer, F., S. Mathoulin-Pelissier, O. Launay, and O. Lortholary. (2007). Determinants of disease presenta-tion and outcome during cryptococcosis: the CryptoA/Dstudy. *PLoS Med* 4:e21.
- Dubash, T.; Gupta, S.; Prakash, P.Y.; Bairy, I. (2010). Isolation of yeasts from various food products and detection of killer toxin activity *in vitro*. *J. Sci. Res.*, **2**(2): 407-411.
- Franzot, S. P., I. F. Salkin, and A. Casadevall. (1999).*Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: separate varietalstatus for *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates. *JClin Microbiol* 37:838-40.
- Freney,J; Renaud,F; Leclercq,R; Riegel,F; Paugam,A; Grillot,R; Favennec,L et Pozzetto,B.(2009). *Actualités permanentes en bactériologie clinique*.volume VIII.
- Fuentefria, A.M. ; Franskoviaki, I.M. ; Mercado, L.W. ; Vainstein, M.H. ; Valente, P. (2006). Inhibition of clinical and environmental *Cryptococcus neoformus* isolates by two Brazilian killer yeasts. *J. Basic Microbiol.*, **46**(2) : 87-93.

- Garcia-Hermoso, D., F. Dromer, S. Mathoulin-Pelissier and G. Janbon (2001). "Are two *Cryptococcus neoformans* strains epidemiologically linked?" *J Clin Microbiol* 39(4): 1402-6.
- Gintar, G ; Kondratiene ,L,Tautvile Jokantaite,Elena Serviene ,Vytautas Melvydas and Giedre Petkuniene .(2004) .occurence of killer yeast strains in fruit and berry wine yeast populations.Laboratory of genetics, institute of botany
- Golubev, W.I. (2006). Antagonistic interactions among yeasts. In : Rosa, C.A. ; Péter, G. (eds). *The Yeast Handbook, Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*. Springer, Berlin, p. 197-219.
- Golubev, W.I ; Kulakovskaya, T.V ; Kulakovskaya E.V ; Golubev, N.W. (2004). Fungicidal activity of extracellular glycolipid of *Sympodiomyces paphiopedili* Sugiyama et al. *Mikrobiologiya* 73:841–845.
- Goretti, M. ; Turchetti, B. ; Buratta, M. ; Branda, E. ; Corazzi, L. ; Vaughan-Martini, A. ; Buzzini, P. (2009). *In vitro* antimycotic activity of a *Williopsis saturnus* killer protein against food spoilage yeasts. *Int. J. Food Microbiol.* **131**: 178-182.
- Hernández, A.; Martín, A.; Córdoba, M.G.; Benito, M.J.; Aranda, E.; Pérez-Nevado, F. (2007). Determination of killer activity in yeasts isolated from the elaboration of seasoned green table olives. *Int. J. Food Microbiol.* **121**: 178-188.
- Hua, M.X.; Chi, Z.; Liu, G.L.; Buzdar, M.A.; Chi, Z.M. (2010). Production of a novel and cold-active killer toxin by *Mrakia frigida* 2E00797 isolated from sea sediment in Antarctica. *Extremophiles.*, **14**: 515-521.
- Institute for International Cooperation in Animal Biologics An OIE Collaborating Center Iowa State University College of Veterinary Medicine.(2005). Cryptococcosis.
- Ivanovska J., Hardwick J.M. (2005).Viruses activate a genetically conserved cell death pathway in a unicellular organism. *Journal of Cell Biology* 170:391.

- Izgu F., Altınbay D et Acun T. (2005). Killer toxin of *Pichia anomala* NCYC 432; purification, characterization and its exo- β -1,3-glucanase activity. *Enzyme and Microbial Technology* 39:669-676.
- Janderová B., Janouškova O., Flegelová H. et Vondřejš V. (1999) The groove assay for quantitative estimating the killer toxin activity or susceptibility of *S. cerevisiae* strains to killer toxins. *Biotechnol. Tech.*, 13,883-887
- Kidd, S. E., Y. Chow, S. Mak, P. J. Bach, H. Chen, A. O. Hingston, J. W. Kronstad, and K. H. Bartlett. 2007. Characterization of environmental sources of the human and animal pathogen *Cryptococcus gattii* in British Columbia, Canada, and the Pacific Northwest of the United States. *Appl Environ Microbiol* 73:1433-43.
- Kono, I. ; Himeno, K. (1997). A novel killer yeast effective on *Schizosaccharomyces pombe*. *Biosci Biotechnol Biochem* 61:563–564.
- _Lammi Sarah.(2011).Recherche de substances à activités antimicrobienne(antibactérienne et anticandidose) produites par des souches levuriennes isolées des sols sahariens.Mémoire de magistère en microbiologie appliquée.Université mentouri de Constantine.
- Lim, S.L. ; Tay, S.T. (2011). Diversity and killer activity of yeasts in Malaysian fermented food samples. *Tropical. Biomedecine.*, **28**(2) : 438-443.
- Lin, X., C. M. Hull, and J. Heitman. 2005. Sexual reproduction between partners of the same mating type in *Cryptococcus neoformans*. *Nature* 434:1017-21. Idnurm, A., Y. S. Bahn, K. Nielsen, X. Lin, J. A. Fraser, and J. Heitman. 2005. Deciphering the model pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Nat Rev Microbiol* 3:753-64.
- Lin, X., A. P. Litvintseva, K. Nielsen, S. Patel, A. Floyd, T. G. Mitchell, and J. Heitman. 2007. α AD α hybrids of *Cryptococcus neoformans*: evidence of same-sex mating in nature and hybrid fitness. *PLoS Genet* 3:1975-90.
- Lin, X. (2009). *Cryptococcus neoformans*: Morphogenesis, infection, and evolution. *Infection, Genetics and Evolution*, 9(4), 401-416.

- Litvintseva, A. P., R. Thakur, L. B. Reller, and T. G. Mitchell. 2005. Prevalence of clinical isolates of *Cryptococcus gattii* serotype C among patients with AIDS in Sub-Saharan Africa. *J Infect Dis* 192:888-92.
- Llorente, P. ; Marquina, D. ; Santos, A. ; Peinado, J.M. ; Spencer-Martins, I. (1997). Effect of salt on the killer phenotype of yeasts from olive brines. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 1165-1167.
- Lortholary, O., H. Nunez, M. W. Brauner and F. Dromer (2004). "Pulmonary cryptococcosis." *Semin Respir CritCare Med* 25(2): 145-57.
- Magliani, W. ; Conti, S. ; Gerloni, M. ; Bertolotti, D and Luciano Polonelli. (1997). Yeast killer system. *Clinical microbiology reviews*.p.369-400.
- Manyri. (2005). Analyse automatique d'image de population microbienne. Thèse de Doctorat. Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse.
- Meneghin, M.C. ; Reis, V.R and Sandra Regina Ceccato-Antonini. (2010). Inhibition of bacteria contaminating alcoholic fermentation by killer yeasts. Departamento de Tecnologia Agroindustrial e Sócio-Economia Rural; Centro de Ciências Agrárias; Universidade.
- Marquina D., Santos, A et Peinado, J.M. (2002). Biology of killer yeasts. *International Microbiology* 5. : 65-71.
- Mushtaq, M.; Nahar, S.; Hashmi, M.H. (2010). Screening of killer-sensitive-pattern (KSP) for biotyping yeast strains isolated from slime fluxes of trees and flowers' nectar. (2010). *Pak. J. Bot.*, **42**(6): 4313-4327.
- Pfeiffer, I.; Golubev, W.I.; Farkas, Z.; Kucsera, J.; Golubev, N. (2004). Mycocin production in *Cryptococcus aquaticus*. *Antonie van Leeuwenhoek* 86:369–375.

- _Pommier S. (2003). Dynamique de populations microbiennes en cultures mixtes: étude expérimentale en bioréacteur à membranes et modélisation du phénomène killer chez *saccharomyces cerevisiae*. Thèse de doctorat. Institut national polytechnique de Toulouse. France.
- Randhawa, H. S., T. Kowshik, K. Preeti Sinha, A. Chowdhary, Z. U. Khan, Z. Yan, J. Xu, and A. Kumar. 2006. Distribution of *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans* in decayed trunk wood of *Syzygium cumini* trees in north-western India. *Med Mycol* 44:623-30.
- Sawant, A.D. ; Ahearn, D.G. (1990) .Involvement of a cell wall receptor in the mode of action of an anti-*Candida* toxin of *Pichia anomala*. *Antimicrob Agents Chemother* 34:1331–1335.
- Schmitt, M.J. and Breinig, F., (2002) “The viral killer system in yeast: from molecular biology to application”, *FEMS Microbiology Reviews* , 26,257-276.
- Schmitt, M.J., Reiter J. (2008). Viral induced yeast apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta* 1783 :1413 -1417.
- Sesti, F. *et al.* , (2001) “Immunity to K1 killer toxin: Internal TOK1 blockade”, *Cell* , 105,637-644.
- Simmer.M. ; Secko, D. (2003). A peach of a pathogen: *cryptococcus neoformans*.
- Starmer, W.T. ; Ganter, P. ; Aberddeen, V. ; Lachance, M.A. ; Phaff , H.J .(1987). The ecological role of killer yeasts in natural communities of yeasts. *Can J Microbiol* 33:783–796.
- Türeli,A.D.(2005) .Antimicrobial spectrume determination of the K5 type yeast killer protéin and its kinetics of cell killing.Thesis for the degree of master of science.[14 :23 :16].
- Viviani, M. A., M. Cogliati, M. C. Esposto, K.Lemmer, K. Tintelnot, M. F. Colom Valiente, D.Swinne, A. Velegraki, and R. Velho. 2006. Molecular analysis of 311 *Cryptococcus neoformans* isolates from a 30-month ECMM survey of cryptococcosis in Europe. *FEMS Yeast Res* 6:614-9.

-Vadasz, A.S. (2000).Modelling of the dynamical interactions of killer and sensitive yeast under nutritional stress.MSc Thesis, University of Durban-Westville, Westville.South Africa.

- Waema, S. ; Maneesri,J and Payap Masniyom . (2009). Isolation and indentification of killer yeast from fermented vegetables. Faculty of Science and Technology, Prince of Songkla University, Pattani, Thailand.

-Weiler, F. ; Schmitt, M .J. (2003). Zygotin, a secreted antifungal toxin of the yeast *Zygosaccharomyces bailii*, and its effect on sensitive fungal cells. FEMS Yeast Res 3:69–76.

-Wickner, R.B. (1996). Double-stranded RNA viruses of *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiol Rev 10:250–265.

Sites Web :

[Http// :www.Coproweb.free.fr/mycoweb/texte/163.htm](http://www.Coproweb.free.fr/mycoweb/texte/163.htm)

Bouacide Fouzia
Bouziane Rachida
Rim Monira

Thème : Mise en évidence d'une activité anti-*Cryptococcus neoformans* chez des souches de levures

Résumé

Quatre souches de levures, isolées à partir du sol dans la région de Constantine (Nord-est Algérien), au niveau du laboratoire de Génie Microbiologique et Applications, Université MENTOURI – Constantine et qui appartiennent aux genres : *Cryptococcus*, *Meyerozyma*, *Pichia* et *Saccharomyces*, sont testées pour leur potentiel killer contre une souche pathogène de l'espèce *Cryptococcus neoformans*.

Le test de la mise en évidence de l'activité killer est réalisé sur le milieu YPGA-BM, tamponné à pH 4,5 avec un tampon citrate-phosphate (0,1 M), en présence des concentrations de 0%, 1% et 3% de NaCl afin d'évaluer son effet sur l'expression du phénotype killer. Le résultat du test montre qu'après 5 jours d'incubation à 25°C les isolats appartenant aux genres *Meyerozyma* et *Pichia* développent une zone claire d'inhibition entourée par de petites colonies. Cette zone d'inhibition devient plus claire en présence des concentrations de 1% et de 3% du sel. Les deux isolats de levures testées produisent donc une activité killer contre *C. neoformans*, tandis que les souches *Cryptococcus* sp., et *Saccharomyces* sp. n'en possèdent pas. Aussi, le maintien de l'expression du phénotype killer chez *Meyerozyma* sp. et *Pichia* sp., en présence du sel, montre que ces dernières sont des levures killer halotolérantes.

En conclusion, nous pouvons dire que le potentiel killer des souches *Meyerozyma* sp., et *Pichia* sp. exprimé contre la souche pathogène *C. neoformans* semble être intéressant et peut qualifier les souches productrices à des applications médicales. Cependant, des études plus profondes sont nécessaires afin de réaliser des investigations sur la possibilité d'appliquer les protéines killer synthétisées comme nouveaux agents antifongiques.

Mots clés : Levures, phénomène killer, test, activité anti-*Cryptococcus neoformans*.

Soutenue le : 03.06.2012

Devant le jury :

Président : M ^r . DERBOUCHE. A	Professeur	Centre Universitaire de Khenchela
Rapporteur: M ^{lle} . LABBANI. F-Z K	M.A.A	Centre Universitaire de Khenchela
Examineur : M ^{lle} . LEULMI. N	M.A.B	Centre Universitaire de Khenchela

- **Abstract**

Four yeast strains, isolated from soil in the Constantine region (North-eastern Algeria), in the laboratory of Microbiological Engineering and Applications, University Mentouri - Constantine and belonging to the genera *Cryptococcus*, *Meyerozyma*, *Pichia* and *Saccharomyces*, are tested for their potential killer against a pathogenic strain of the species *Cryptococcus neoformans*.

The test of the identification of the killer activity is carried on YPGA- BM buffered to pH 4.5 with citrate-phosphate buffer (0.1 M) in the presence of concentrations of 0%, 1% and 3% NaCl to assess its effect on the expression of the killer phenotype. Result the test shows that after 5 days of incubation at 25 ° C isolates belonging to the genera *Pichia Meyerozyma* and develop a clear zone of inhibition surrounded by small colonies.

This inhibition zone becomes clearer in the presence of concentrations of 1% and 3% salt. The two yeast isolates tested thus produce a killer activity against *C. neoformans*, while strains *Cryptococcus sp.*, and *Saccharomyces sp.* have none. Also, the maintenance of killer phenotype in *Meyerozyma sp.* and *Pichia sp.* in the presence of salt, shows that they are halotolerant killer yeasts.

In conclusion, we can say that the potential killer strains *Meyerozyma sp.*, And *Pichia sp.* expressed against the pathogenic strain *C. neoformans* appears to be interesting and may qualify the producing strains for medical applications. However, deeper studies are needed to carry out investigations on the possibility of applying the killer protein synthesized as new antifungal agents.

Keywords: Yeast, killer phenomenon, test, anti-*Cryptococcus neoformans*.

المخلص

عزلنا أربع سلالات خميرة من التربة في منطقة قسنطينة (شمال شرق الجزائر).

في مخبر Génie Microbiologie et Application جامعة منتوري قسنطينة والتي تنتمي إلى السلالات *Cryptococcus*, *Meyerozyma*, *Pichia*, *Saccharomyces* نوع *Cryptococcus Neoformans*.

هذا الاختبار يسلط الضوء على النشاط القاتل في وسط YPGA-BM وذلك في درجة حموضة 4.5 مع سترات فوسفات (0.1 مول) ، في وجود تراكيز مختلفة % 0، 1، 3، من كلور الصوديوم من أجل تقييم تأثيره على النمط الظاهري القاتل.

أظهرت نتائج هذا الاختبار في درجة 25° مئوية بعد خمسة أيام أن السلالتين المعزولتين *Meyerozyma*, *Pichia* شكلتا منطقة تثبيط واضحة محاطة بمستعمرات صغيرة. منطقة التثبيط تكون أكثر وضوحا في وجود تراكيز 1% و 3% من كلور الصوديوم.

سلالتنا الخميرة اللتان اختبرناهما أنتجتا نشاطا قاتلا ضد *Cryptococcus Neoformans* في حين أن سلالتي *Saccharomyces.sp*, *Cryptococcus.sp* غير قادرة على إنتاجه.

أيضا، الحفاظ على النمط الظاهري القاتل عند *Meyerozyma.sp*, *Pichia.sp* في وجود الملح اظهر أن هاتين الأخيرتين هما : خمائر قاتلة تعيش في وسط مالح.

في الأخير يمتنا القول أن النشاط القاتل للسلالتين *Meyerozyma.sp*, *Bichia.sp* المستخدم ضد السلالة الممرضة *Cryptococcus Neoformans* يكون مهما وذلك من أجل استخدامه في المجال الطبي. لذلك هنالك حاجة لدراسات معمقة لإجراء بحوث حول إمكانية تطبيق البروتينات القاتلة المستخدمة ضد الفطريات الممرضة.

الكلمات المفتاحية : الخميرة ، ظاهرة Killer ، اختبار ، نشاط مضاد لـ *Cryptococcus Neoformans*