

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTRE 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-*Candida albicans* chez des souches de levures.**

Soutenu le :     /     / 2012

Présenté par :

**TAIBI Rouia**

**OKBA Wassila**

*Devant le jury :*

**Président : M<sup>lle</sup>. DOUAOUYA. L     M.A.A**

**Centre Universitaire de Khenchela**

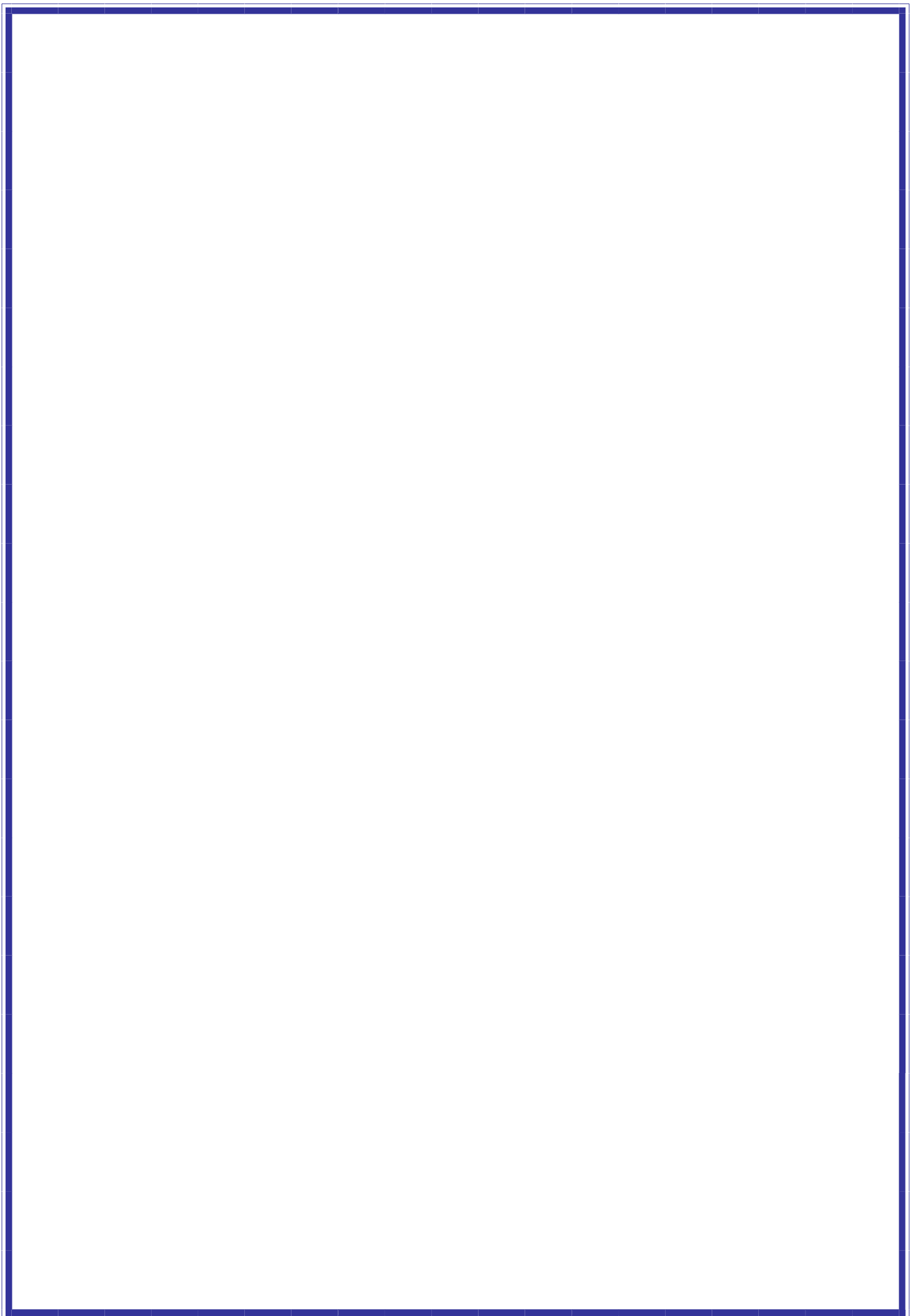
**Rapporteur : M<sup>lle</sup>. LABBANI. F-Z K     M.A.A**

**Centre Universitaire de Khenchela**

**Examineur : M<sup>lle</sup>. LEULMI. N     M.A.B**

**Centre Universitaire de Khenchela**

*Année Universitaire : 2011-2012*



# Sommaire

## INTRODUCTION GENERALE

Page

1

## PARTIE I. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

### CHAPITRE 1. Levures killer

1. Introduction	3
2. Fréquence du phénotype killer parmi les levures	3
3. Caractéristiques des protéines killer des levures	5
3.1. Poids moléculaire	5
3.2. pH optimum	5
3.3. Température optimale	5
3.4. Inhibiteurs	5
3.5. Activateurs	5
3.6. Présence de composés spécifiques	5
4. Bases génétiques de l'expression du phénotype killer chez les levures	6
4.1. ARN double brin	6
4.2. Plasmides linéaires à ADN double brins	6
4.3. Déterminants nucléaires	6
5. Structure et sécrétion des protéines killer des levures	7
6. Mode d'action des protéines killer	8
7. Applications du système killer des levures	10
8. Usage médical	11

### CHAPITRE 2. Levures pathogènes : *Candida albicans*.

1. Introduction	12
2. Classification de <i>Candida albicans</i>	12
3. Description et habitat naturel de <i>C. albicans</i>	13
4. Caractères morphologiques de <i>C. albicans</i>	14

4.1. Les blastospores ou blastoconidies	14
4.2. Le pseudo – mycélium	14
4.3. Le mycélium	14
4.4. Chlamydospores (= Chlamydoconidies = chromispores de Vuillemin)	14
5. Caractères biologiques de <i>C. albicans</i>	15
5.1. Milieu de vie	15
5.2. pH	15
5.3. Température	15
5.4. Nutrition	15
6. Examen macroscopique et microscopique de <i>C. albicans</i>	17
6.1. Aspect des colonies	17
6.2. Examen au microscope optique	17
7. Reproduction de <i>C. albicans</i>	18
8. Facteurs de virulence de <i>C. albicans</i>	19
8.1. Adhésines	19
8.2. Enzymes hydrolytiques	19
9. Pouvoir pathogène de <i>C. albicans</i>	19
10. Sensibilité de la levure <i>C. albicans</i> aux toxines killer	20

## **PARTIE II: MATERIEL ET METHODES**

1. Matériel	21
1.1. Matériel biologique	21
1.2. Milieux de culture	21
1.3. Tampon	23
2. Méthodes	23
2.1. Maintenance des souches de levures	23
2.2. Test de la mise en évidence de l'activité killer contre <i>C. albicans</i>	23
2.3. Effet de la concentration du NaCl sur l'activité killer	24

## **PARTIE 3. RESULTATS ET DISCUSSION**

1. Recherche de l'activité killer contre <i>Candida albicans</i>	26
2. Effet du NaCl sur la production des toxines killer	28
<b>Conclusion générale</b>	30
<b>Résumés</b>	31
<b>Références bibliographiques</b>	34

## Liste des figures

- Figure I.1** – Voie de sécrétion de la toxine killer K28 chez *Saccharomyces cerevisiae*.
- Figure I.2** – Représentation schématique de la structure moléculaire de la paroi cellulaire chez *Saccharomyces cerevisiae*
- Figure I.3** – Représentation des caractères morphologique de *c. albicans*.
- Figure I.4** – Blastospores et tubes germinatifs.
- Figure I.5** – Chlamydospores de *Candida albicans*.
- Figure I.6** – Observation macroscopique de *c.albicans*.
- Figure I.7** – Observation microscopique de *C.albicans*.
- Figure I.8** – Reproduction par bourgeonnement pseudomycelium.
- Figures I.9** – Infections liées à *C.albicans*.
- Figure II.1** – Aspect macroscopique des souches de levures à étudier après une culture sur milieu YPGA à 25°C pendant 24 heures. (A) : *Candida* sp. ; (B) : *Meyerozyma* sp. ; (C) : *Pichia* sp. ; (D) : *Saccharomyces* sp. ; (E) : *Candida albicans*.
- Figure II.2** – Test de la mise en évidence de l'activité killer des souches *Candida* sp. (A) ; *Meyerozyma* sp. (B) ; *Pichia* sp. (C) et *Saccharomyces* sp. (D), contre *Candida albicans*.
- Figure III.1** – Test de l'activité killer de la souche *Meyerozyma* sp. après cinq jours d'incubation à 25°C sur milieu YPGA-BM en absence de sels (0% NaCl). (Z) : zone d'inhibition.
- Figure III.2** - Test de la production l'activité killer contre *C. albicans*, après 5 jours d'incubation à 25°C sur milieu YPGA-BM à pH 4,5 et en présence des concentrations de 1% et 3% de NaCl. (A) : *Candida* sp. ; (B) : *Meyerozyma* sp. ; (C) : *Pichia* sp. (I): 1% NaCl ; (II): 3% NaCl. (Z): Zone d'inhibition.

## *Liste des Tableaux*

**Tableau I.1.** Espèces de levures dont l'activité killer a été reportée.

**Tableau I.2.** Bases génétiques de l'expression du phénotype killer.

**Tableau I.3.** Classification de *C. albicans*.

**Tableau III.1** – Résultat du test de la sélection de l'activité killer des souches levuriennes contre *Candida albicans* sur milieu YPGA-BM en absence du NaCl.

**Tableau III.2** – Activité killer des quatre isolats de levures sur milieu YPGA-BM, en présence des concentrations de 1% et 3% de NaCl.

## *Liste des abréviations*

**KDa** : Kilo Dalton

**M** : Molaire

**h** : heure

**sp** : espèce

**C** : Degrée Celsius

**L**: Levure.

**YPGA – BM** : Yeast Peptone Glucose Agar – Bleu de méthylène

**Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>** : Phosphate disodique anhydre.

**C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>** : Acide citrique

**VIH** : Virus de l'Immunodéficience Humain

## Introduction générale

Les levures sont des champignons unicellulaires eucaryotes se reproduisant par bourgeonnement ou par scissiparité. Elles se trouvent parmi trois classes de champignons, caractérisés par leur mode de reproduction : les Ascomycètes, les Basidiomycètes et les Champignons Imparfaites. Par ailleurs, les levures sont les organismes eucaryotes les plus simples ; leurs cellules comportent des enveloppes cellulaires, un cytoplasme contenant des organites et un vrai noyau, entouré d'une membrane et qui renferme des chromosomes (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2004).

Ces microorganismes sont mis en contribution dans divers secteurs des biotechnologies et de la recherche biomédicale. En effet, la levure *Saccharomyces cerevisiae* ainsi que d'autres levures, ont été largement utilisées dans le domaine médical puisque l'expression élevée de leurs protéines constitue un avantage pour la production de protéines médicalement importantes telles que les hormones, les facteurs de croissance, les enzymes, etc. (Türel, 2005).

D'autre part, de puissantes protéines antifongiques sont naturellement produites par divers groupes d'organismes comprenant des bactéries, des champignons, des insectes, des vertébrés, des invertébrés et des plantes (Vital *et al.*, 2002 ; Türel, 2005). De même, de nombreuses levures dites « killer » sécrètent des substances polypeptidiques ayant une action létale (protéines killer) contre des souches « sensibles » appartenant aux mêmes ou à d'autres espèces de levures y compris les espèces pathogènes (Hua *et al.*, 2010). Ces propriétés antilevuriennes confèrent donc aux protéines killer des potentialités d'application dans le domaine de la protection et du traitement des infections par des levures pathogènes, en particulier, contre l'espèce *Candida albicans* (Pommier, 2003 ; Lime & Tay, 2011).

Durant ces dernières années, la fréquence des infections à *Candida* a augmenté d'une manière considérable, en particulier, chez les patients immunodéprimés. Aussi, *Candida albicans*, parmi toutes les espèces du genre *Candida*, est responsable de la plupart des infections fongiques systémiques. Cette levure pathogène peut, en fait, attaquer tous les organes du corps puisqu'elle est l'espèce levurienne la plus communément isolée du sang (Türel, 2005 ; Lim & Tay, 2011). Les isolats non-*Candida albicans*, tels que *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* et *Candida parasilosis* sont considérés comme de nouveaux agents pathogènes émergents (Lim & Tay, 2011).

De plus, la plupart de ces agents pathogènes résistent aux agents antifongiques conventionnellement utilisés. Ces derniers sont limités aux dérivés azotés, l'amphotéricine B et le 5-fluorocytosine.

Cependant, de nombreux polypeptides naturels, semi-synthétiques et synthétiques sont capables d'inhiber la croissance ou tuer une large gamme de champignons pathogènes (Türeli, 2005).

Dans cette optique, le présent travail a pour objectif d'évaluer la production de protéines killer, par des souches de levures, contre l'espèce pathogène *Candida albicans*.

La première partie de ce mémoire est une Synthèse bibliographique comprenant deux chapitres. Le premier chapitre décrit le système killer des levures, sa fréquence parmi les espèces, les caractéristiques, les bases génétique, la sécrétion et le mode d'action des protéines killer ainsi que les différentes applications du système killer. Le deuxième chapitre représente une description générale de la levure pathogène *Candida albicans* : classification, habitat naturel, reproduction, aspect macroscopique et microscopique, facteurs de virulence et pouvoir pathogène.

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

En 1963, Bevan et Makover furent les premiers à constater, chez les levures, que quelques isolats de *Saccharomyces cerevisiae* pouvaient tuer d'autres souches de la même espèce (Bevan & Makover, 1963). Cet effet a été appelé « phénomène killer » et la substance produite « toxine killer ». Les levures « killer » sécrètent dans le milieu, des toxines polypeptidiques (Schmitt & Reiter, 2008), appelées protéines ou toxines killer, ayant une action létale contre d'autres souches qualifiées de « sensibles » qui appartiennent à la même espèce ou à d'autres espèces de levures sans contact direct d'une cellule à cellule (interaction indirecte) (Pommier, 2003). De plus, les toxines killer de certaines souches de levures peuvent inhiber aussi la croissance de certaines bactéries pathogènes à Gram positif et de champignons phytopathogènes (Türeli, 2005). Les souches sécrétrices d'une toxine donnée sont insensibles à celle-ci, mais peuvent être tuées par une toxine qu'elles ne produisent pas. Par ailleurs, d'autres souches dites « neutres » ne produisent pas de toxines, mais sont résistantes à celle-ci. La plupart des protéines killer sont glycosylées et leur production dépend strictement du pH et la température du milieu (Hernández *et al.*, 2008). Dans les dernières années, les levures killer ont été ainsi classées en 11 groupes (K1- K11) en fonction de leur spectre d'action et leur interaction avec d'autres souches de levures (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

## 2. Fréquence du phénotype killer parmi les levures

Le phénotype killer est très fréquent parmi les levures et il peut être trouvé à la fois chez les isolats naturels de levures ou dans les collections des souches de levures du laboratoire (Hua *et al.*, 2010). Jusqu'à présent, les levures productrices de toxines killer sont distribuées dans environ 100 espèces appartenant à plus de 20 genres de levures ascomycètes et basidiomycètes (Tableau I.1) (Golubev, 2006).

Plusieurs types de souches killer ont été identifiés chez certaines espèces (*Cryptococcus laurentii*, *Issatchenkia orientalis*, *Pichia anomala*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Saccharomyces cerevisiae*) (Golubev, 2006 ; Lim & Tay, 2011).

**Tableau I.1** – Espèces de levures dont l'activité killer a été démontrée.

Espèces de levures	Références
<i>Bullera alba</i>	Golubev <i>et al.</i> (1997a, b)
<i>B. hanna</i>	Golubev <i>et al.</i> (1996)
<i>B. unica</i>	Golubev & Nakase (1998)
<i>Candida albicans</i>	Rogers & Bevan (1978)
<i>C. glabrata</i>	Sriprakash & Batum (1984)
<i>C. cacaoi</i>	Aguiar & Lucas (2000)
<i>C. berthetii</i>	Buzzini & Martini (2000b)
<i>Cryptococcus aerius</i>	Carreiro <i>et al.</i> (2002)
<i>C. podzolicus</i>	Golubev (1991a)
<i>C. flavus</i>	Buzzini & Martini (2000b)
<i>C. albidus</i>	Starmer <i>et al.</i> (1987)
<i>Curvibasidium pallidicorallinum</i>	Golubev (1992a)
<i>Cystofilobasidium bisporidii</i>	Kulakovskaya <i>et al.</i> (1996)
<i>Debaryomyces carsonii</i>	Polonelli <i>et al.</i> (1987)
<i>D. occidentalis</i>	Chen <i>et al.</i> (2000)
<i>D. castellii</i>	Vustin <i>et al.</i> (1993)
<i>Fellomyces penicillatus</i>	Aguiar & Lucas (2000)
<i>Filobasidium capsuligenum</i>	Golubev & Kuznetsova (1991)
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	Rosini & Cantini (1987).
<i>H. vineae</i>	Abranches <i>et al.</i> (2000)
<i>H. valbyensis</i>	Starmer <i>et al.</i> (1987)
<i>Issatchenkia orientalis</i>	Lehmann <i>et al.</i> (1987a)
<i>I. scutulata</i>	Buzzini & Martini (2000b)
<i>Kloeckera lindneri</i>	Abranches <i>et al.</i> (2000)
<i>K. polysporus</i>	Kono & Himeno (1997)
<i>Pichia acacia</i>	Bolen <i>et al.</i> (1994)
<i>P. anomala</i>	Sawant <i>et al.</i> (1989)
<i>P. ciferrii</i>	Nomoto <i>et al.</i> (1984)
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Aguiar & Lucas (2000)
<i>R. glutinis</i>	Aguiar & Lucas (2000)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Wickner (1996).
<i>S. paradoxus</i>	Naumov (1985)
<i>S. unisporus</i>	Nagornaya <i>et al.</i> (1989)
<i>Tilletiopsis albescens</i>	Golubev (1998b)
<i>T. flava</i>	Golubev & Churkina (2001)
<i>Williopsis pratensis</i>	Vustin <i>et al.</i> (1991)
<i>W. saturnus</i>	Kimura <i>et al.</i> (1995); Komiyama <i>et al.</i>
	(1995)
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	Weiler & Schmitt (2003)
<i>Z. florentinus</i>	Aguiar & Lucas (2000)
<i>Z. fermentati</i>	Buzzini & Martini (2000b)

### **3. Caractéristiques des protéines killer des levures**

#### **3.1. Poids moléculaire**

Toutes les toxines killer qui sont étudiées jusqu'à présent possèdent des poids moléculaires variant de 5 – 10 jusqu'à 100 kDa ou plus élevés dans certains cas (Meneghin *et al.*, 2010).

#### **3.2. pH optimal**

Les toxines killer des levures ont un pH d'action qui varie de 3 à 8, tandis que le pH optimum se situe entre 4 à 5 (Golubev, 2006 ; Hernández *et al.*, 2008 ; Hua *et al.*, 2010).

#### **3.3. Température optimale**

L'activité optimale des protéines killer se situe entre 15°C et 25°C. Au-delà de 30°C, la plupart des toxines sont totalement désactivées à cause de leurs nature protéique (Pommier, 2003 ; Golubev, 2006).

#### **3.4. Inhibiteurs**

L'éthanol en concentration élevée atténue parfois l'effet killer. Aussi, le KCl présent en quantité trop importante est aussi néfaste à l'expression de l'activité killer (Pommier, 2003).

#### **3.5. Activateurs**

Les cations métalliques et les sels comme  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  et le NaCl sont susceptibles d'augmenter l'activité de la protéine K1 (Pommier, 2003 ; Hernández *et al.*, 2008 ; Lopes & Sangorin, 2010).

#### **3.6. Présence de composés spécifiques**

La bentonite, les débris des 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 (Pommier, 2003).

#### 4. Bases génétiques de l'expression du phénotype killer chez les levures

Les déterminants du phénomène killer sont à la fois cytoplasmiques et nucléaires. Ainsi donc la synthèse des protéines killer est assurée soit par une information génétique portée sur des molécules à ARN double (ARN db) brin soit sur un plasmide linéaire à ADN double brin (ADN db) ou bien sur un chromosome (Türelı, 2005).

##### 4.1. ARN db

Les virus à ARN double brin (ARN db) sont les premiers agents, qui ont été étudiés, responsables de l'activité killer. L'infection des levures par les virus à ARN db n'est possible que via la fusion cellulaire. Ces molécules d'ARN db se trouvent dans le cytoplasme et elles sont entourées par une couche protéique ce qui les qualifie donc des virus de levures. Les virus à ARN db M sont responsables de la production de toxine et de l'immunité.

D'autre part, il existe trois types de virus à ARN db M : M1 M2 et M3 qui sont responsables de la production des protéines killer K1, K2 et K3 respectivement (Türelı, 2005).

Par ailleurs, un autre ARN db nommé virus helper L-A, qui est trois fois plus grand que M, est responsable de l'encapsidation et de la réplication de l'ARN db M (Türelı, 2005 ).

##### 4.2. Plasmides à ADN db linéaire

Chez certaines levures killer, le caractère killer est codé par des plasmides linéaires à ADN db. Ces plasmides ont été identifiés dans différents genres de levures tels que *Debaryomyces*, *Wingea*, *Kluyveromyces* et *Saccharomyces*. Le meilleur exemple est caractérisé par les plasmides pGKL1 et pGKL2, Présents chez *Kluyveromyces lactis*. La protéine killer de *K. lactis* est codée par le plasmide pGKL1 et sa masse moléculaire est de 180 kD. Le plasmide pGKL2 semble jouer un rôle dans la réplication de pGLK1 (Türelı, 2005).

##### 4.3. Déterminants nucléaires

Chez certaines levures killer, telles que les souches de *Williopsis*, *Pichia*, *Candida*, *Debaryomyces* et *Torulopsis*, le caractère killer n'est codé ni par des virus à ARN db ni par des plasmides à ADN db, mais il est suggéré que les gènes responsables du caractère killer sont situés sur le chromosome (Türelı, 2005). Ainsi donc dans, l'une des souches killer de *Saccharomyces cerevisiae*, le caractère killer se trouve codé par deux gènes différents qui sont situés sur les chromosomes V et IX.

La base génétique de l'expression des protéines killer chez différentes souches killer de levures, est donnée dans le tableau (Türelı, 2005).

**Tableau I.2** - Bases génétiques de l'expression du phénotype killer (Türelı, 2005).

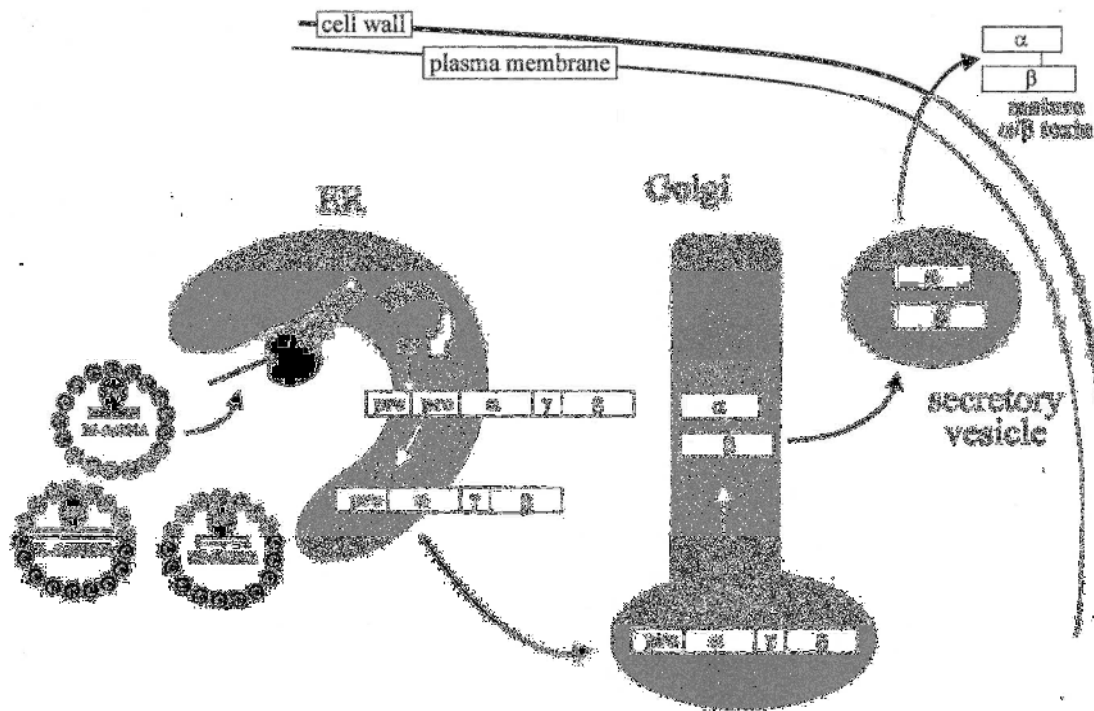
Levures killer	Bases génétique
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ARN db
<i>Zygosaccharomyces baillii</i>	ARN db
<i>Pichia acaciae</i>	Plasmide linéaire à ADN db
<i>Wiliopsis mrakii</i>	Chromosomique
<i>Pichia anomala</i>	Chromosomique

### 5. Structure et sécrétion des protéines killer

Les voies de sécrétion des toxines sont parfaitement identifiées pour les toxines K1 et K28 qui sont, toutes les deux, sécrétées par *S. cerevisiae*. Bien que ces deux protéines killer présentent une composition en acides aminés et un mode d'action différents, leur synthèse, leur transformation et leur sécrétion montrent des homologues significatives. Les toxines K1 et K28 sont codées par des virus à ARN db et elles sont composées de deux sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  (Breinig *et al.*, 2006).

Les toxines killer sont d'abord converties en pré-pro-toxine qui subit ensuite des modifications post-traductionnelles dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi, jusqu'à ce qu'elle soit finalement sécrétée sous forme d'une toxine protéique hétérodimérique ( $\alpha$  et  $\beta$ ) (Breinig *et al.*, 2006). En effet, la pré-pro-toxine pénètre dans le réticulum endoplasmique à l'aide d'un peptide signal hautement hydrophobe au niveau de son extrémité N-terminale. Ensuite, la séquence hydrophobe leader subit un clivage par une enzyme peptidase et la sous-unité  $\gamma$  est glycolysée au niveau de réticulum endoplasmique (Türelı, 2005).

Dans l'appareil de Golgi, l'enzyme Kex2p qui est le produit du gène KEX2, sépare la pro-région et supprime la séquence intramoléculaire  $\gamma$  (Figure I.1). Ensuite, une carboxypeptidase Kex1p, qui est le produit du gène KEX1, supprime la région di-peptidique de l'extrémité C-terminal de la sous-unité  $\alpha$ . Ainsi donc, la toxine mature est transférée à une vésicule de sécrétion et sécrétée à l'extérieur de la cellule (Türelı, 2005).



**Figure I.1** - Voie de sécrétion de la toxine killer K28 chez *S. cerevisiae* (Türel, 2005).

D'autre part, la levure killer est en même temps protégée, d'une manière efficace, contre sa propre toxine. Mais, le mécanisme détaillé de l'immunité reste inconnu. En effet, il peut résulter de la fixation d'une séquence immunitaire aux récepteurs toxine de la cellule productrice (Schmitt & Breinig, 2002).

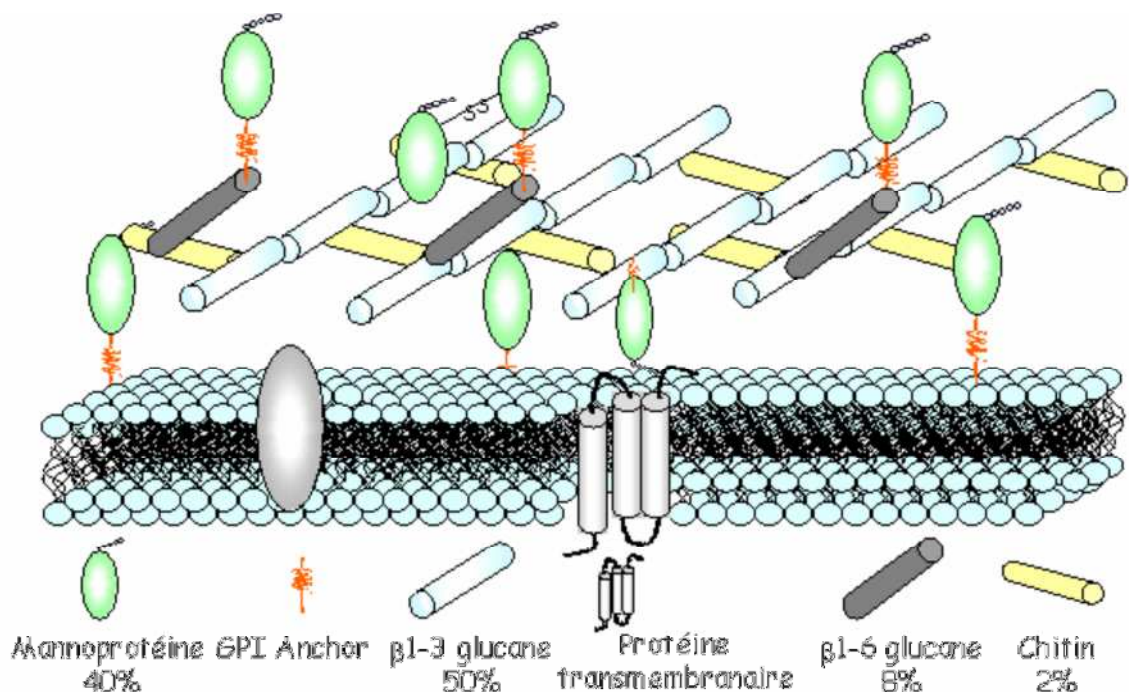
## 6. Mode d'action des toxines killer

L'activité killer des protéines de levures killer s'effectue en deux étapes. Bien que les mécanismes réels de l'action létale de ces toxines contre les cellules sensibles montrent des différences significatives, elles utilisent toutes les composés de la paroi cellulaire comme récepteurs. Ainsi donc, la liaison de la protéine killer au récepteur de la paroi cellulaire, constitue la première étape de cette activité killer. Cette étape est rapide et indépendante de l'énergie (Schmitt & Breinig, 2003).

D'autre part, la paroi cellulaire des levures (Figure I.2) présente quatre classes de macromolécules et elle est principalement composée de mannoprotéines qui sont retrouvées dans la couche externe. La couche interne, constituée de plusieurs sous-couches, est majoritairement

composée de deux classes de  $\beta$ -glucanes, le  $\beta$ -(1,3) et le  $\beta$ -(1,6) glucanes avec une quantité mineure de chitine. En plus, il a été montré que ces différents composants servent comme des sites de liaison primaire et de récepteurs cellulaires pour les toxines killer (Basmaji, 2005).

Les toxines killer des levures *Debaryomyces hansenii*, *Hanseniaspora uvarum*, *Pichia membranifaciens* et *S. cerevisiae* (K1, K2) se fixent aux résidus  $\beta$ -(1-6) glucanes de la paroi cellulaire de la cellule sensible, tandis que les toxines de *S. cerevisiae* (K28), *Schwanniomyces occidentalis* et *Zygosaccharomyces bailii* se lient aux mannoprotéines. Deux autres toxines killer sécrétées par *P. acaciae* et *Kluyveromyces lactis* utilisent les résidus de chitine comme récepteurs (Pommier, 2003).



**Figure I.2-** Représentation schématique de la structure moléculaire de la paroi cellulaire chez *Saccharomyces cerevisiae* (Basmaji, 2005).

L'étape réelle donc de l'action létale des toxines a lieu après leur fixation aux récepteurs de la paroi cellulaire. Les toxines killer tuent les cellules sensibles par différents mécanismes. Par exemple, la toxine killer de type K5, produite par la levure *P. anomala*, inhibe la croissance des cellules microbiennes sensibles par l'hydrolyse du principal composé de la paroi cellulaire, les résidus  $\beta$ -(1,3) glucanes, ce qui se traduit par l'éclatement de la cellule microbienne (İzgü *et al.*, 2006 ; Santos *et al.*, 2009). Un autre mécanisme qui affecte la paroi cellulaire des cellules fongiques est l'inhibition de l'enzyme  $\beta$ -(1,3) glucanes synthétase, qui est nécessaire

pour la synthèse des  $\beta$ -(1,3) glucanes. La protéine killer de la levure *Hansenula mrakii* provoque la formation de pores par l'inhibition de la synthèse de  $\beta$ -1,3-D-glucanes, ce qui se traduit par la fuite du matériel cellulaire et éventuellement la mort de la cellule sensible (Santos *et al.*, 2009).

D'autre part, l'action des protéines killer sur la membrane cellulaire est due à la formation de canaux ioniques non-sélectifs, ce qui se traduit par la fuite soudaine des ions  $K^+$  et d'ATP. Ces canaux ioniques, modifient le gradient de la membrane cellulaire ce qui aboutit à la mort soudaine de la cellule (Santos *et al.*, 2009). Aussi, la toxine killer produite par *P. kluyveri* exerce son action létale sur les cellules microbiennes sensibles par la formation d'un canal ionique. L'état énergétique des cellules cibles est parallèlement modifié et celles-ci finissent par mourir (Pommier, 2003).

Par ailleurs, les cellules levuriennes traitées dans leur phase S par certaines toxines killer comme celle de *K. lactis*, ne se diviseront pas, bien qu'elles complètent leur cycle cellulaire. En effet, la taille de cellules augmente car les activités métaboliques continuent et elles s'arrêtent dans la phase G1 (Türel, 2005 ; Santos *et al.*, 2009).

Certaines autres toxines inhibent la synthèse d'ADN, comme il a été observé pendant la division cellulaire, où l'ADN n'a pas été transféré aux spores des cellules sensibles exposées à la toxine. La toxine killer K28 produite par *S. cerevisiae* cause l'arrêt des cellules sensibles à la phase G2, ce qui aboutit à des cellules filles dépourvues de molécules d'ADN (Breinig *et al.*, 2006 ; Santos *et al.*, 2009).

## 7. Principales applications des levures killer

Les levures killer sont étudiées en vue de leurs exploitations pour des applications potentielles dans différents domaines :

- Dans les industries alimentaires et de fermentation, pour la lutte contre les levures indésirables de contamination (Lim & Tay, 2011).
- Dans le domaine de la conservation des aliments pour augmenter la durée de vie et préserver la qualité des aliments en inhibant les souches indésirables de contamination (Meneghin *et al.*, 2010).
- Dans la protection des plantes contre les champignons phytopathogènes (Ciani *et al.*, 2009).

- Les propriétés antifongiques et antilevuriennes des protéines killer, leur confèrent également des potentialités d'application dans le domaine de la protection et du traitement des infections fongiques humaines et animales, en particulier les infections à *Candida albicans* (Ciani *et al.*, 2009 ; Lim & Tay, 2011).

### **8. Usage médical du système killer des levures**

L'incidence des infections fongiques augmente d'un rythme élevé avec le défi des thérapies. Cette augmentation est directement reliée à la croissance de la population des patients immunodéprimés à cause de la chimiothérapie intensive.

Les infections fongiques superficielles surviennent dans la plupart des cas à l'extérieur des couches de la peau, des ongles, des cheveux et des muqueuses (Wingard, 1995 ; Türeli, 2005).

- Les dermatophytes, en particulier *Microsporum spp.*, et *Epidermophyton spp.* Sont responsables de la plupart des infections fongiques superficielles, bien que les levures et certaines moisissures non-dermatophytes peuvent également être des agents causatifs (Garber, 2001). Ces infections ont été d'abord traitées par des agents antifongiques toxiques tels que les dérivés azotés ou l'amphotéricine B depuis qu'ils infectent la couche externe de la peau (Hart S *et al.*, 1999).
- les toxines des genres *Hansenula*, *Pichia* et *Kluyveromyces* ont une large gamme de l'action killer contre les champignons pathogènes de l'homme et d'animaux (Magliani *et al.*, 1997).
- Certaines souches de levures killer possèdent une activité inhibitrice de la croissance de bactéries pathogènes gram positives telles que *Streptococcus pyogenes*, *Bacillus subtilis*, *Sarcina lutea* et *Staphylococcus aureus* (Izgü *et al.*, 1999).
- Nouveaux agents antimicrobiens dans le traitement d'infections humaines et animales (Buzzini *et al.*, 2004 ; Xianghong *et al.*, 2007).

## 1. Introduction

Les levures pathogènes sont des champignons microscopiques, commensaux de la peau et des muqueuses. Ce sont des microorganismes opportunistes qui ne deviennent pathogènes que lorsqu'il y a des conditions favorables au développement chez l'hôte. En conséquence, chez un sujet sain, Les levures peuvent être présentés dans certains prélèvements (selles, sécrétions vaginales) mais elles sont toujours en très petites quantités (Cardinale, 2001).

Le genre *Candida* apparaît actuellement comme un groupe complexe, hétérogène, rassemblant selon les auteurs un nombre variable de champignons lévuriformes.

Les champignons lévuriformes sont des espèces «opportunistes» c'est-à-dire normalement saprophytes et inoffensives mais qui peuvent devenir pathogènes lorsque l'organisme hôte présente des conditions favorables (intrinsèques ou extrinsèques) (Guignard J.L *et al.*, 1989).

*Candida albicans* n'est pas un germe cutané saprophyte de la peau saine. Il n'existe à l'état endosaprophyte que sur les muqueuses génitales et digestives qui en constituent le réservoir principal dès les heures qui suivent la naissance. *C. albicans* est un saprophyte exclusif des muqueuses. *C. albicans* est susceptible de persister en équilibre écologique avec la flore vaginale pendant des mois, voire des années, sans manifestations cliniques (saprophytisme). On le trouve chez 15 à 30 % des sujets sains au niveau des cavités naturelles: bouche, bronches, jejunum, iléon, selles, vagin. Pour de nombreux auteurs, environ 20 % des femmes hébergent *Candida albicans* au niveau vaginal sans symptôme (Cardinale, 2001).

## 2. Classification de *C. albicans*

Les *Candida* sont des micromycètes, c'est-à-dire des champignons microscopiques. Ce sont des organismes eucaryotes appartenant au règne des *champignons*, au phylum des *Eumycotae*, au sous-phylum des *Deuteromycotina*, (Ce phylum regroupe en fait, tous les champignons pour lesquels on ne connaît pas la reproduction sexuée, soit qu'elle ait disparu au cours du temps, soit que les conditions de culture ne permettent pas de l'obtenir), de la classe des *Blastomycète*, de l'ordre des *Saccharomycétales*, et du genre *Candida*, l'espèce *Albicans* (Beucher, 2007).

Le genre *Candida* comprend environ 200 espèces dont les plus rencontrées en pathologie humaine sont : *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis*, *C. kefyr* et *C. dubliniensis* (Tableau I.3) (Beucher, 2007).

**Tableau I. 3** - Classification de *C. albicans* (Barnett, 2000).

Règne	<i>Fungi, champignons, mycètes</i>
Division	<i>Eumycota</i>
Sous-division	<i>Deuteromycotina</i>
Classe	<i>Blastomycète</i>
Ordre	<i>Saccharomycetales</i>
Famille	<i>Candidaceae</i>
Genre	<i>Candida</i>
<b>Espèces</b>	
<i>Candida albicans</i>	
<i>Candida dubliniensis</i>	
<i>Candida glabrata</i>	
<i>Candida guilliermondii</i>	
<i>Candida kefyr</i>	
<i>Candida krusei</i>	
<i>Candida parapsilosis</i>	

### 3. Description et habitat naturel de *C. albicans*

*C. albicans* est une levure de forme allongée à ronde, qui se reproduit par bourgeonnement. Elle vit de façon commensale dans le tube digestif de l'homme, des mammifères et des oiseaux. C'est un opportuniste lors d'un déséquilibre digestif, d'une mauvaise hygiène corporelle, d'une prise de médicaments provoquant un déséquilibre hormonal ou des personnes en immunodéficience. Son pouvoir pathogène peut provoquer des lésions cutanées, des septicémies lors de gestes chirurgicaux (Beucher, 2007).

La levure *C. albicans* vit à l'état naturel sur la peau, dans la bouche et dans le tube digestif de l'être humain. On le retrouve chez 80 % de la population, et il n'entraîne habituellement aucune maladie ou symptôme en particulier. C'est un organisme commensal saprophyte (Murielle, 2006).

#### 4. Caractères morphologiques de *C. albicans*

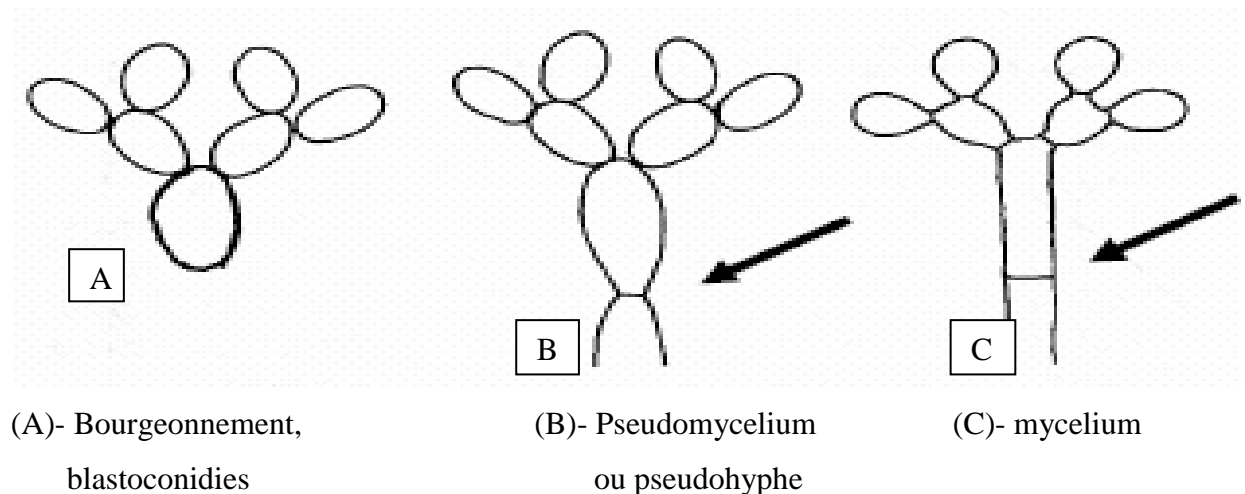
*C. albicans* peut exister sous quatre stades morphologiques différents:

##### 4.1. Les blastospores ou blastoconidies

Elles se présentent sous forme de petites cellules ovoïdes de 3,5 à 6 micromètres sur 6 à 10 micromètres. C'est la forme la plus courante de multiplication de *C.albicans* saprophyte. Cette cellule peut émettre un bourgeon qui donnera une cellule fille identique à la cellule mère (Guignard J.L *et al.*, 1989).

##### 4.2. Le pseudo – mycélium

Il se forme par croissance tubulaire à partir du bourgeon de la blastospore. Le pseudo - mycélium restera attaché à la cellule mère et les deux cellules seront individualisées par une zone d'étranglement sans cloison vraie (Figure I.4) (Cardinale, 2001).



**Figure I.3** - Représentation des caractères morphologique de *C.albicans* (Cardinale, 2001).

##### 4.3. Le mycélium

On peut en rencontrer dans les tissus infectés. Il s'agit de la blastospore qui a donné naissance à un tube germinatif pour former un vrai mycélium, dont chaque élément sera individualisé par de vraies cloisons (Figure I.5) (Cardinale, 2001).

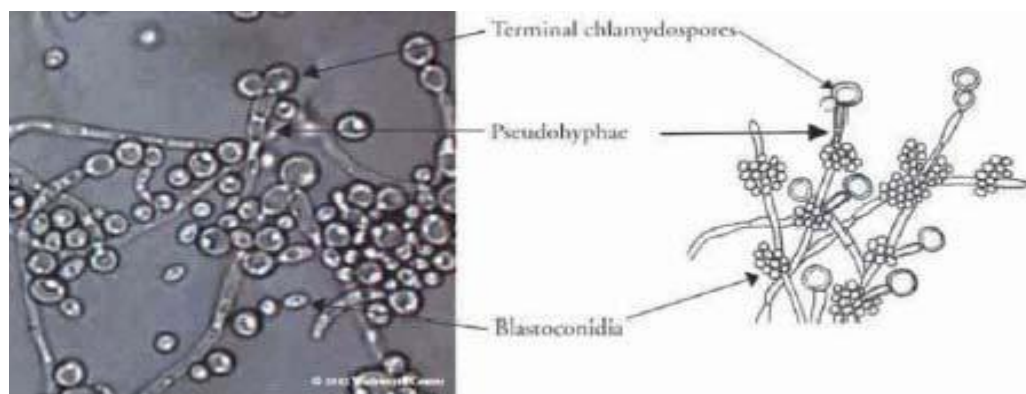


**Figure I.4-** Blastospores et tubes germinatifs (Murielle, 2006).

#### 4.4. Chlamydospores (= Chlamydoconidies = chromisporos de Vuillemin)

Ce sont de volumineuses cellules (10 à 15 micromètres), sphériques, à double paroi, réfringentes, le plus souvent terminales, mais pouvant être latérales. Elles sont particulières à l'espèce *Candida albicans*. Les chlamydospores ont la particularité d'être acidophiles et acido-résistantes.

In vitro, on les obtient facilement, après 48 heures de culture sur un milieu pauvre en éléments nutritifs (PCB). Du fait de leur spécificité à l'espèce *albicans*, leur recherche sert au diagnostic de l'espèce (Figure I.6) (Cardinale, 2001).



**Figure I.5-** Chlamydospores de *Candida albicans* (Murielle, 2006).

## 5. Caractères biologiques de *C. albicans*

### 5.1. Milieu de vie

Toutes les espèces du genre *Candida* sont aérobies. Il vit exclusivement sur les muqueuses, mais il peut cependant survivre dans le Milieu extérieur: 7 à 8 semaines sur le

---

sable des plages, même arrosé d'eau de mer. Mais il est détruit par le lavage du linge, la stérilisation du matériel médical et des Cathéters (Guignard J.L *et al.*, 1989).

### **5.2. PH**

In vivo, l'acidité gastrique ou vaginale n'altère pas sa vitalité. En effet, la croissance est possible pour des pH allant de 3 à 7. En revanche, en milieu alcalin, l'assimilation des nutriments par les *Candida* est Inhibée (Cardinale, 2001).

### **5.3. Température**

Croissance entre 20°C et 30° C pour la majorité des levures. Les espèces pathogènes sont capables de croître à 37 ° C (Guignard J.L *et al.*, 1989).

### **5.4. Nutrition**

Les champignons sont des organismes hétérotrophes, c'est à dire qu'ils sont incapables de synthétiser leurs molécules carbonées à partir du dioxyde de carbone atmosphérique. Ils vivent donc aux dépens de la matière organique préformée. Le passage des substances se fait par absorption (Cardinale, 2001).

#### **• Besoin en carbone**

Il utilise le carbone du glucose, du maltose, du saccharose, du galactose, du xylose, du tréhalose, du 2-cétogluconate, du méthyl-glucoside, et de la N-acétylglucosamine. Les capacités d'assimilation diffèrent selon les espèces et servent ainsi pour leur détermination. L'auxanogramme du carbone permet donc d'identifier une espèce selon sa capacité à assimiler certains sucres comme seule source de carbone (Cardinale, 2001).

#### **• Besoin en azote**

Il a besoin d'une source d'azote. Pour apprécier les besoins du champignon en dérivés azotés, on réalise l'auxanogramme de N où la source est un sel d'ammonium autre que le nitrate (Cardinale, 2001).

#### **• Besoin en vitamines**

Les vitamines du groupe B (notamment la biotine = vit B8 = vit H) mais aussi la thiamine (vit B1), et la vitamine B5, sont indispensables à la croissance et sont souvent incorporées dans les milieux de croissance (Cardinale, 2001).

#### **• Besoin en fer**

C'est un élément indispensable à la croissance du *Candida*. En effet, comme chez toute cellule vivante, le fer et d'autres métaux lourds, constituent chez les champignons un facteur de croissance essentiel. Une surcharge en fer a été décrite au cours d'infections bactériennes mais aussi fongiques (Cardinale, 2001).

## 6. Examen macroscopique et microscopique de *C. albicans*

### 6.1. Aspect des colonies

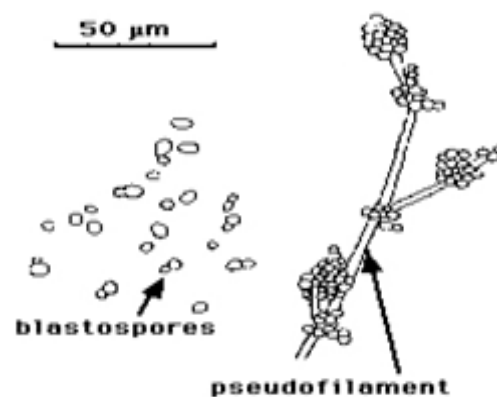
*C. albicans* : colonies blanches, crémeuses, lisses brillantes.



**Figure I.6-** Observation macroscopique de *C. albicans* (Cardinale, 2001).

### 6.2 Examen au microscope optique

On distingue *Candida albicans* par la présence de levures ovoïdes à bourgeonnement multilatéral mesurant de (3-6) x (6-10)  $\mu\text{m}$ . Après 5 à 15 jours, on voit la présence de pseudofilamentation et de vraie filamentation (Guignard J.L *et al.*, 1989).



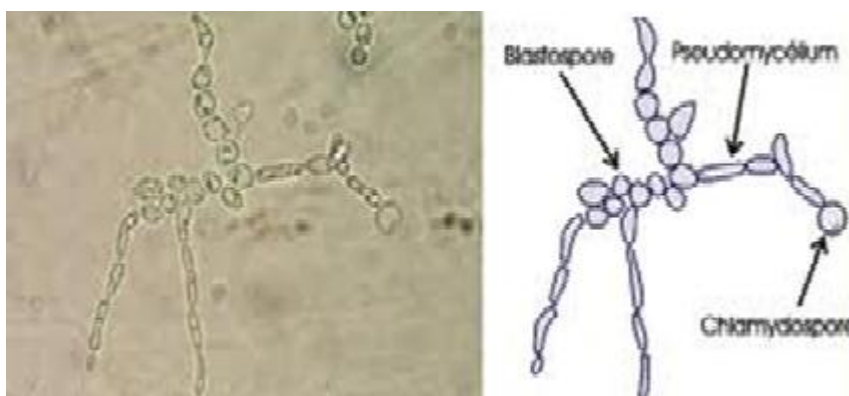
**Figure I.7-** Observation microscopique de *C. albicans* (Cardinale, 2001).

### 7. Reproduction de *C. albicans*

Le mode de multiplication de *C. albicans* est principalement de type asexué excepté pour *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. kefyr* et *C. lusitaniae* pour ne citer que les plus connues. La multiplication est assurée par bourgeonnement de la blastospore à un pôle particulier de la cellule, donnant naissance, après division du noyau par simple mitose et septation de la cellule, à une blastospore fille qui se dissocie ultérieurement de la blastospore mère (Beucher, 2007).

Sous certaines conditions (température, pH, composition du milieu de culture), la séparation ne se produit pas à la suite de la septation. Les cellules restent attachées les unes

aux autres et forment une chaîne plus ou moins ramifiée appelée pseudomycélium. Toutes les levures du genre *Candida* sont capables de former un pseudomycélium excepté *C. glabrata*. Les conditions favorisant la formation de pseudomycélium favorisent également la formation de mycélium vrai chez *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. dubliniensis*. Ce deuxième mode de multiplication végétative consiste en une croissance apicale, conduisant tout d'abord à la formation d'un tube germinatif puis d'un filament mycélien. Le filament mycélien se présente sous la forme d'articles cellulaires cylindriques uninucléés et séparés par des cloisons ou septa incomplets avec persistance d'un pore central assurant la continuité cytoplasmique (Beucher, 2007) (Figure I.8).



**Figure I.8-** Reproduction par bourgeonnement pseudomycélium (Cardinale, 2001).

## **8. Facteurs de virulence de *C. albicans***

A l'inverse des pathogènes hyperspécialisés qui expriment un facteur majeur et unique de virulence, le champignon pathogène opportuniste *C. albicans* exprime de nombreux facteurs qui contribuent à sa virulence. Parmi lesquelles (Murielle, 2006):

### **8.1. Adhésines**

Elles permettent à *C. albicans* de se fixer à de nombreuses cellules comme les cellules épithéliales, les plaquettes ou les leucocytes ; à des protéines comme le complément, le fibrinogène, le collagène ou l'hémoglobine ou à des corps étrangers en formant des biofilms. (Murielle, 2006).

### **8.2. Enzymes hydrolytiques : protéases, phospholipases et lipases**

Les enzymes lytiques sécrétées par *C. albicans* contribuent à la virulence en facilitant l'adhésion aux cellules hôtes, l'hydrolyse des membranes et la résistance aux mécanismes de défense (Murielle, 2006). La famille des protéines Sap (secreted aspartic proteinase) regroupe 10 protéines (Sap1-Sap10) responsables de l'activité protéolytique de *C. albicans*. (Murielle, 2006).

## **9. Pouvoir pathogène de *Candida albicans***

Chez l'Homme, les levures de *Candida* sont susceptibles de devenir pathogènes et d'envahir les tissus superficiels ou profonds sur certains terrains immunodéprimés comme chez les individus âgés, ou encore ceux traités par chimiothérapie, ou souffrant de désordre hématologique (HIV-positif, leucémie), ou chez les sujets ayant un traitement antibiotique à large spectre ou un déséquilibre endocrinien (diabète, grossesse) (Beucher, 2007).

Cette levure peut également affecter les nouveau-nés, les patients ayant subi une chirurgie profonde viscérale, ayant une alimentation parentérale ou bien ayant subi une radiothérapie (Beucher, 2007).

Le passage de l'état commensal à l'état pathogène est donc le plus souvent lié à une défaillance des systèmes de défense de l'hôte. *C. albicans* est capable de survivre comme commensal dans plusieurs sites anatomiques, chacun présentant ses propres pressions environnementales. Ceci explique les manifestations cliniques très diverses causées par ce champignon. Sur le plan clinique, il est habituel de distinguer les candidoses superficielles, invasives et allergiques (Figures I.9) (Beucher, 2007).



Candidose buccale : muguet



Intertrigo interdigital à



Intertrigo



Candidose unguéale

**Figures I.9-** Infections liées à *C.albicans* (Cardinale, 2001).

### 10. Sensibilité de *Candida albicans* aux antifongiques

*C. albicans* est généralement sensible à tous les antifongiques de contact préconisés pour traiter les mycoses (Fluconazole, Itraconazole, Voriconazole, Flucytosine, Amphotéricine B, Echinocandins) (Cardinale, 2001).

## 1. Matériel

### 1.1. Matériel biologique

Quatre souches de levures appartenant au genres : *Candida* 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 *Candida albicans*, 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.

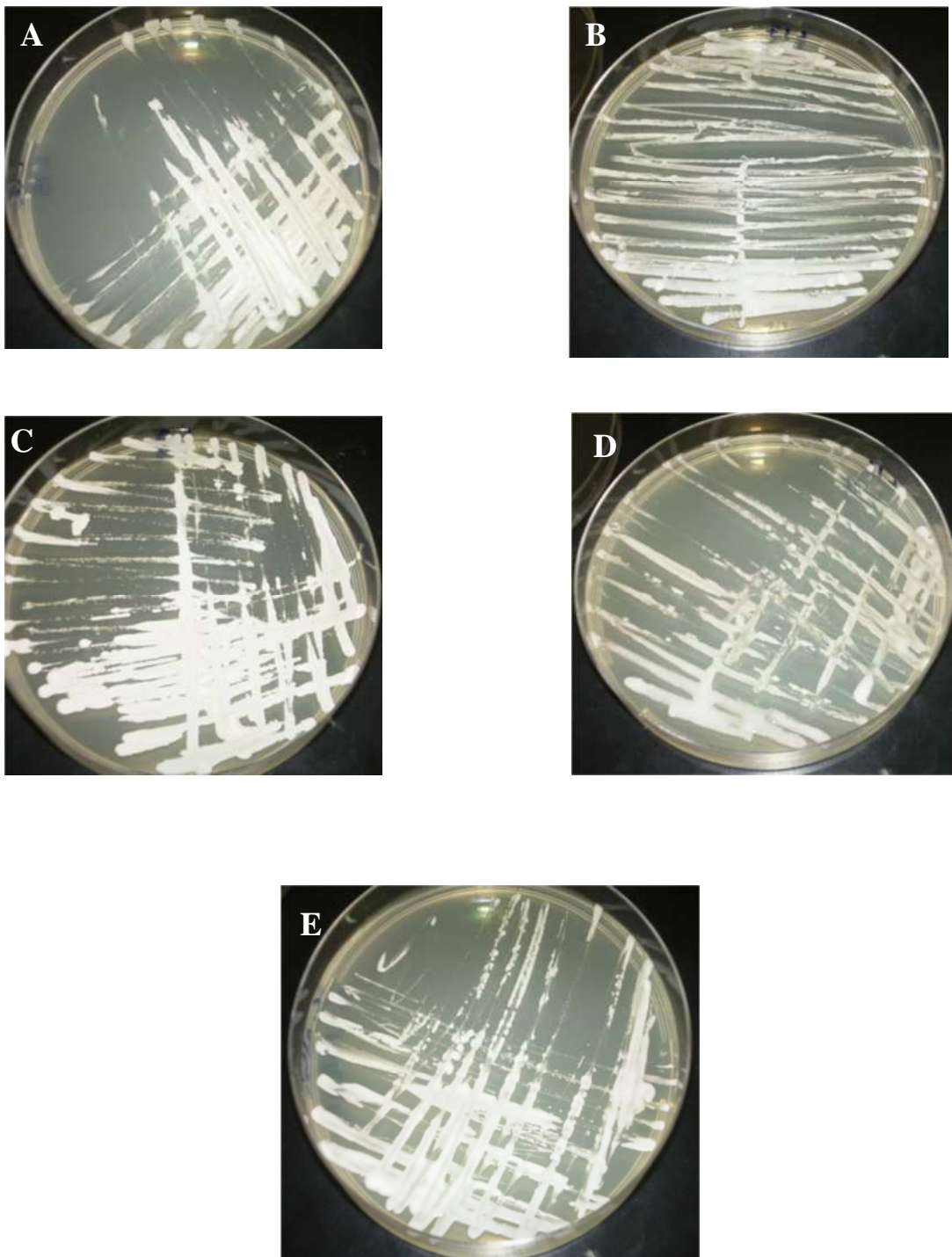
### 1.2. Milieux de culture

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 à étudier après une culture sur milieu YPGA à 25°C pendant 24 heures. (A) : *Candida* sp. ; (B) : *Meyerozyma* sp. ; (C) : *Pichia* sp. ; (D) : *Saccharomyces* sp. ; (E) : *Candida albicans*.

### 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

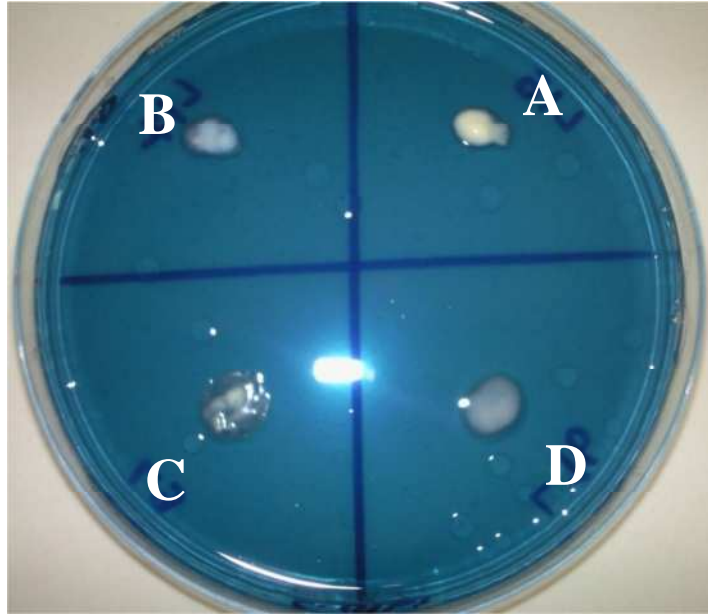
Les différentes souches de levures utilisées dans ce travail de mémoire sont cultivées et maintenues sur milieu YPGA à 4°C.

### 2.2. Test de la mise en évidence de l'activité killer contre *Candida albicans*

Les cellules de la levure pathogène *Candida albicans*, 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 (Lim & Tay, 2011). 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 milieu de culture – suspension, les souches des levures potentiellement killers, *Candida* 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 *Candida albicans*.



**Figure II.2** – Test de la mise en évidence de l’activité killer des souches *Candida* sp. (A) ; *Meyerozyma* sp. (B) ; *Pichia* sp. (C) et *Saccharomyces* sp. (D), contre *Candida albicans*.

### 2.3. Effet du NaCl sur la production de l’activité killer

La mise en évidence de l’activité killer des souches contre *Candida albicans* 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 *Candida albicans*.

## 1. Matériel

### 1.1. Matériel biologique

Quatre souches de levures appartenant au genres : *Candida* 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 *Candida albicans*, 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.

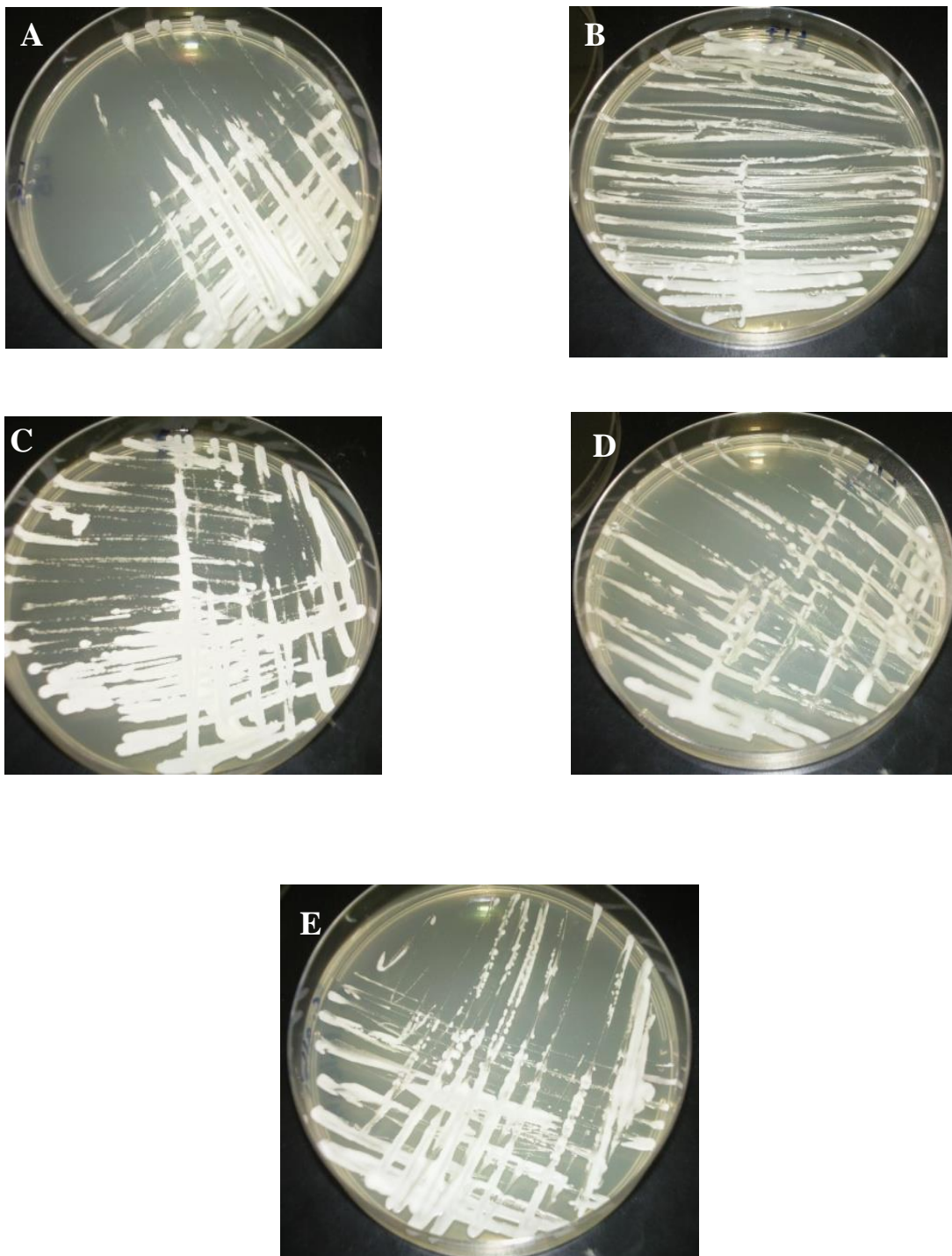
### 1.2. Milieux de culture

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 à étudier après une culture sur milieu YPGA à 25°C pendant 24 heures. (A) : *Candida* sp. ; (B) : *Meyerozyma* sp. ; (C) : *Pichia* sp. ; (D) : *Saccharomyces* sp. ; (E) : *Candida albicans*.

### 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

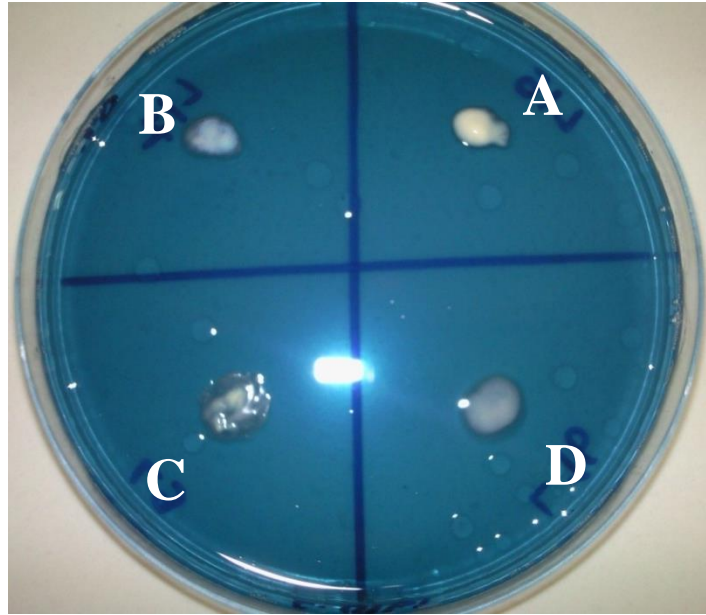
Les différentes souches de levures utilisées dans ce travail de mémoire sont cultivées et maintenues sur milieu YPGA à 4°C.

### 2.2. Test de la mise en évidence de l'activité killer contre *Candida albicans*

Les cellules de la levure pathogène *Candida albicans*, 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 (Lim & Tay, 2011). 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 milieu de culture – suspension, les souches des levures potentiellement killers, *Candida* 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 *Candida albicans*.



**Figure II.2** – Test de la mise en évidence de l’activité killer des souches *Candida* sp. (A) ; *Meyerozyma* sp. (B) ; *Pichia* sp. (C) et *Saccharomyces* sp. (D), contre *Candida albicans*.

### 2.3. Effet du NaCl sur la production de l’activité killer

La mise en évidence de l’activité killer des souches contre *Candida albicans* 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 *Candida albicans*.

## Conclusion générale

L'objectif principal de ce travail est la recherche d'une activité anti-*Candida albicans*, 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 : *Candida* sp., *Meyerozyma* sp., *Pichia* sp. et *Saccharomyces* sp.

Le test de la mise en évidence de l'activité killer contre *C. albicans* sur le milieu YPGA-BM a révélé que seule la souche *Meyerozyma* sp. exprime un phénotype killer en absence du NaCl. Cependant, en présence des concentrations de 1% et 3% de NaCl, les souches *Candida* sp. et *Pichia* sp. développent également une zone claire d'inhibition vis-à-vis de *C. albicans*, à côté de *Meyerozyma* sp. qui garde toujours son phénotype killer.

Ceci montre que *Meyerozyma* sp. et en particulier, *Candida* 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 *Candida* sp., *Pichia* sp. et spécialement *Meyerozyma* sp. exprimé contre la souche pathogène *C. albicans* 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.

0



**Figure III. 1** - Test de l'activité killer de la souche *Meyerozyma* sp. après cinq jours d'incubation à 25°C sur milieu YPGA-BM en absence de sels (0% NaCl). (**Z**) : zone d'inhibition.

### 1. Recherche de l'activité killer contre *Candida albicans*

Cette étude est menée dans le but de tester le potentiel killer de quatre souches levuriennes 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.

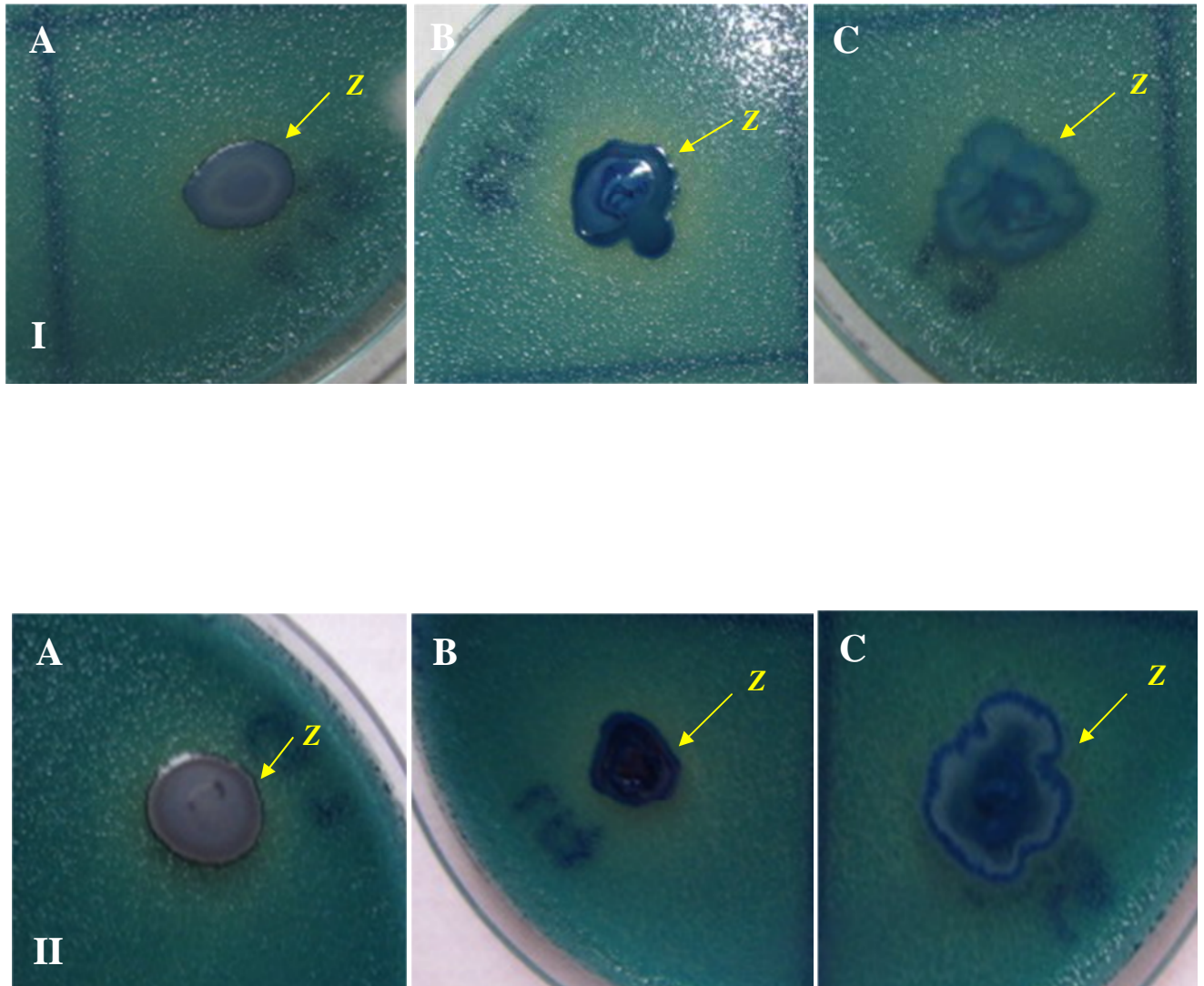
La mise en évidence de cette activité est réalisée par la technique de culture mixte des souches levuriennes, qui est une méthode de diffusion en milieu gélosé. Pour cela, un milieu de culture, YPGA-BM, tamponné à pH 4,5 avec un tampon citrate-phosphate (0,1 M) et sans addition de NaCl est utilisé dans ce test.

Le résultat de ce test montre qu'après 5 jours d'incubation à 25°C seule la souche *Meyerozyma* sp. (Figure III.1), développe une zone claire d'inhibition entourée par de petites colonies bleues. Elle présente donc un effet killer contre *Candida albicans*, tandis que les souches *Candia* sp., *Pichia* sp. et *Saccharomyces* sp. n'en possèdent pas (Tableau III.1).

**Tableau III.1** – Résultat du test de la sélection de l'activité killer des souches levuriennes contre *Candida albicans* sur milieu YPGA-BM en absence du NaCl.

Souches de levures testées	Expression du phénotype killer contre <i>Candida albicans</i> sur milieu YPGA-BM, en absence de sels.
<i>Candida</i> sp.	-
<i>Meyerozyma</i> sp.	+
<i>Pichia</i> sp.	-
<i>Saccharomyces</i> sp.	-

Différents travaux de recherche rapportent l'expression du caractère killer contre *C. albicans* chez diverses souches de levures. Ainsi, Hodgson *et al.*, (1995) affirment que la levure ascomycète, *Williopsis mrakii*, présente une intense activité killer contre des souches de *C. albicans*, isolées à partir de spécimens cliniques. Alors que Hua *et al.*, (2010) détectent que la levure psychrotolérante, *Mrakia frigida*, est capable de produire une toxine killer active contre *C. albicans* et *C. tropicalis*.



**Figure III.2** - Test de la production l'activité killer contre *C. albicans*, après 5 jours d'incubation à 25°C sur milieu YPGA-BM à pH 4,5 et en présence des concentrations de 1% et 3% de NaCl. (A) : *Candida* sp. ; (B) : *Meyerozyma* sp. ; (C) : *Pichia* sp. (I): 1% NaCl ; (II): 3% NaCl. (Z): Zone d'inhibition.

De plus, les souches de l'espèce *Hansenula anomala* sont capables de tuer plus de 97% des souches testées de *C. albicans* (Vadkertiová & Sláviková, 2006).

## 2. Effet du NaCl sur la production des toxines killer

L'activité killer des quatre isolats *Candida*, *Meyerozyma*, *Pichia* et *Saccharomyces* est également testée en présence des concentrations de 1% et 3% du NaCl dans toujours le milieu YPGA-BM, pH 4,5. Aussi, les cultures sont incubées à 25°C et après 5 jours la lecture des boîtes montrent qu'en plus de *Meyerozyma* qui garde toujours son phénotype killer, *Candida* et *Pichia* commencent à développer une légère zone claire d'inhibition en présence de 1% de NaCl. Cette zone devient plus claire dans le milieu contenant 3% de NaCl (Figure III.2). Cependant, la souche qui appartient au genre *Saccharomyces* ne présente aucune zone d'inhibition et elle ne présente pas donc une activité killer contre *C. albicans*. (Tableau III.2).

**Tableau III.2** - Activité killer des quatre isolats de levures sur milieu YPGA-BM, en présence des concentrations de 1% et 3% de NaCl.

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

Ces résultats s'accordent avec ceux de Marquina (1997) et Golubev (2006) qui révèlent que l'action antifongique des toxines killer produites par certaines levures halotolérantes (*Candida*, *Debaryomyces* et *Pichia* spp. etc.) est évoquée et renforcée en présence du NaCl.

Par ailleurs, Liorente *et al.*, (1997) rapportent que la souche *Saccharomyces cerevisiae* CYC 1115 n'exprime pas de phénotype killer en présence de concentrations de 0%, 3% et 6% de NaCl ce qui concorde avec notre résultat. De plus, Hernández *et al.*, (2007) déduisent que la production de l'effet killer chez les levures en présence de différentes concentration de NaCl dépend des souches. Ceci explique donc la différence entre les résultats trouvés.

D'autre part, les résultats négatifs qui sont trouvés dans ce présent travail trouvent une explication dans les travaux de recherche de Buzzini & Martini (2001) qui nous informent de l'existence des souches de *C. albicans* qui sont résistantes vis à vis d'un large spectre de protéines killer des levures.

Ces résultats négatifs peuvent être également expliqués par l'absence de récepteurs spécifiques aux toxines killer sur la paroi cellulaire de *C. albicans*. De plus, la présence des conditions optimales ne garantie pas l'efficacité du test parce que la caractéristique principale des protéines killer est la spécificité. 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 testée de *C. albicans* prédispose 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 toxines synthétisées comme nouveaux agents antifongiques.

---

- **Références bibliographiques**

- 1- 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.
- 2- Basmaji M.F. (2005). Caractérisation de la protéine Knr4 et recherche de ses partenaires fonctionnels pour la compréhension de son rôle dans la synthèse pariétale chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Thèse de doctorat. L'institut National des sciences Appliquées de Toulouse, France.
- 3- Boone C., Sommer S. S., Hensel A., et Bussey H., 1990. Yeast KRE genes provide evidence for a pathway of cell wall beta-glucan assembly. *J.Cell Biol.* 110:1833-1843.
- 4- Beucher B. (2007). Spécificité antigénique de l'Als3p de *Candida albicans* et implication de cette protéine dans l'interaction avec les constituants de l'hôte. Thèse de doctorat. Ecole Doctorale D'Angers, France.
- 5- Barnett J. A., Payne, R.W. and Yarrow, D. (2000). "Yeasts: Characteristics and Identification." Cambridge University Press 3rd edition.
- 6- Buzzini P and Martini A. (2001). Large scale screening of selected *Candida albicans*, *Debaryomyces hansenii*, and *Pichia anomala* toxin activity against pathogenic yeasts. *Medical Mycology* **39**:479-82.
- 7- Cardinale V. (2001). Les candidoses vaginales récidivantes à *Candida albicans*. Thèse de doctorat. Faculté de Pharmacie Université Henri Poincaré-Nancy I, France.
- 8- De Oliva Neto P., Ferreira M.A et Yokoya F. (2004). Screening for yeast with antibacterial properties from an ethanol distillery. *Bioresource Technology* **92**:16.
- 9- 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.
- 10- 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.
- 11- Guignard J.L., Bouchet P., Madulo G., Regli P. Mycologie générale et médicale. Abrégé Masson., 1989, 107-120,108-109.
- 12- Hernández, A. ; Martin, 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.

- 13- 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.
- 14- Hodgson, V.J. ; Button, D. ; Walker, G.M. (1995). Anti-*Candida* activity of a novel killer toxin from the yeast *Williopsis mrakii*. *Microbiol.*, **141**: 2003-2012.
- 15- Izgü F., Altınbat D., Sertkaya A., (2006). “Enzymic activity of the K5 type yeast killer toxin and its characterization”, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **69**, 2200-2206.
- 16- Jijakli H., Lepoivre P., Tossut P. (1993). “Biological control of *Botrytis cinerea* and *Penicillium* spp. on postharvest apples by two antagonistic yeasts Mededelingen van de Faculteit Landbouwwetenschappen, Rijksuniversiteit Gent”, **58**, 1349-1358.
- 17- Lim, S.L. ; Tay, S.T. (2011). Diversity and killer activity of yeasts in Malaysian fermented food samples. *Tropical. Biomedecine.*, **28**(2) : 438-443.
- 18- Liorent P., Marquina D., Santos A., Peinado J.M et Spencer-Martins I. (1997). Effect of salt on the killer phenotype of yeasts from olive brines. *Applied and Environmental Microbiology.***63**:1165-1167.
- 19- Lopez C.A. et Sangorrin M.P., (2010). “Killer behaviour in wild wine yeasts associated with Merlot and Malbec type musts spontaneously fermented from north western Patagonia (Argentina)”, *J. Basic Microbiol.*, **41**, 105-113.
- 20- Magliani W., Conti S., Gerloni M., Beretolotti D et Polonelli L. (1997). Yeast killer systems. *Clinical Microbiology Reviews* **10**:369-400.
- 21- Marquina, D. ; Toufani, S. ; Llorente, P. ; Santos, A. ; Peinado, J.M. (1997). Killer activity of yeasts isolates from olive brines. *Adv. Food Sci.*, **19**: 41-46.
- 22- 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.
- 23- Murielle G.C. (2006). Rôle des gènes RIM et VPS dans la signalisation du pH, la virulence et la résistance aux antifongiques chez la levure *candida albicans*. Institut National Agronomique Paris-Grignon. France.
- 24- Pommier S. (2003). Dynamique de populations microbiennes en cultures mixtes:etude expérimentale en bioréacteur à membranes et modélisation du phénomène killer chez *saccharomyces cerevisiae*. Thèse de doctorat. Institut national polytechnique de Toulouse. France.

- 
- 25- Radler F., Schmitt M. (1987). Killer toxins of yeasts: inhibitors of fermentation and their adsorption. *Journal of Food Protection* **50**:232-38.
- 26- Ribéreau-Gayon P., Dubourdieu D., Donèche B., Lonvaud A. (2006). Handbook of enology: the microbiology of wine and vinification, Vol. 1. John Wiley & Sons, Angleterre, p : 454.
- 27- Ribéreau-Gayon, P. ; Dubourdieu, D. ; Donèche, B. ; Lonvaud, A. (2004). *Traité d'oenologie*. Dunod, Paris. P : 4.
- 28- Schmitt M.J., Breinig F. (2002). The viral killer system in yeast: from molecular biology to application. *FEMS Microbiol. Rev.*, **26** (3), 257-276.
- 29- Schmitt M.J., Reiter J. (2008). Viral induced yeast apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta* **1783**:1413 -1417.
- 30- Santos MA, Keith G & Tuite MF., (2009). Non-standard translational events in *Candida albicans* mediated by an unusual seryl-tRNA with a 5'-CAG-3' (leucine) anticodon. *Embo J* **12**: 607-616.
- 31- Türeli A.E. (2005). Antimicrobial spectrum determination of the K5 type yeast killer protein and its kinetics of cell killing. Thesis for the degree of Master of Science.
- 32- Vital, M.J.S. ; Abranches, J. ; Hagler, A.N. ; Mendonça-Hagler, L.C. (2002). Mycogenenic yeasts isolated from Amazon soils of the Maracá Ecological Station, Roraima-Brazil. *Braz. J. Microbiol.*, **33**: 230-235.
- 33- Wickner R.B. (1986). Double-stranded RNA replication in yeast. The killer system. *Annual Review of Biochemistry* **55**:373-395.
- 34- Wingard J. R., (1995). "Importance of *Candida* species other than *Candida albicans* as pathogens in oncology patients", *Clin. Infect. Dis.*, 20, 115-125.

- **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 : *Candida*, *Meyerozyma*, *Pichia* et *Saccharomyces*, sont testées pour leur potentiel killer contre une souche pathogène de l'espèce *Candida albicans*.

Le test de la mise en évidence de l'activité killer sur le milieu YPGA-BM, tamponné à pH 4,5 avec un tampon citrate-phosphate (0,1 M) montre qu'après 5 jours d'incubation à 25°C seule la souche *Meyerozyma* sp. développe une zone claire d'inhibition vis-à-vis de *C. albicans*, tandis que les souches *Candia* sp., *Pichia* sp. et *Saccharomyces* sp. n'en possèdent pas. Cependant, en présence des concentrations de 1% et 3% de NaCl, les souches *Candida* sp. et *Pichia* sp. développent également une zone claire d'inhibition vis-à-vis de *C. albicans*, à coté de *Meyerozyma* sp. qui garde toujours son phénotype killer. Ceci montre que ces souches, potentiellement killer, sont des levures halotolérantes et la présence du NaCl dans le milieu favorise l'expression de leur phénotype killer.

En conclusion, nous pouvons dire que le potentiel killer des souches *Candida* sp., *Pichia* sp. et spécialement *Meyerozyma* sp. exprimé contre la souche pathogène *C. albicans* 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, mise en évidence, activité anti-*Candida albicans*, potentiel killer.

- **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 : *Candida*, *Meyerozyma*, *Pichia* and *Saccharomyces*, are tested for their potential killer against a pathogenic strain of the specie *Candida albicans*.

The test demonstrated the activity of the killer YPGA BM, buffered to pH 4.5 with citrate-phosphate buffer (0.1 M) shows that after 5 days of incubation at 25 ° C *Meyerozyma* only strain sp. develops a clear zone of inhibition vis-à-vis *C. albicans*, while strains *Candia* sp., *Pichia* sp. and *Saccharomyces* sp. have none. However, in the presence of concentrations of 1% and 3% NaCl, the strains *Candida* sp. and *Pichia* sp. also develop a clear zone of inhibition vis-à-vis *C. albicans*, next to *Meyerozyma* sp. who always keeps his killer phenotype. This shows that these strains, potentially killer, are halotolerant yeasts and the presence of NaCl in the medium promotes the expression of their killer phenotype.

In conclusion, we can say that the potential killer strains of *Candida* sp., *Pichia* sp. and especially *Meyerozyma* sp. expressed against the pathogenic strain *C. albicans* 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, highlighting, anti-*Candida albicans*, potential killer.

تلخيص -

أربعة سلالات من الخمائر، عزلت من طرف مخبر الميكروبيولوجي للهندسة والتطبيقات، جامعة منتوري - قسنطينة، من تربة مدينة قسنطينة (شمال- شرق الجزائر)، و التي تنتمي إلى أجناس: *Candida*، *Meyerozyma*، *Pichia* و *Saccharomyces*، وقد تم اختبار هذه السلالات لقدرتها المضادة للسلالة *Candida albicans*.

اختبار النشاط القاتل على الوسط YPGA -BM في درجة حموضة 4.5 مع سترات الفوسفات (0.1 مول) أظهرت أنه بعد 5 أيام من التحضين على 25 درجة مئوية *Meyerozyma* هي السلالة الوحيدة القادرة على تطوير منطقة مثبطة واضحة ضد *Candida albicans*، في حين أن السلالات *Candida*، *Pichia* sp و *Sacchromyces* sp. لم يتم الكشف عن أي تأثير مثبط ضد خميرة *Candida albicans*. ومع ذلك، في وجود التراكيز 1% و 3% من كلوريد الصوديوم، السلالات *Candida* sp، *Pichia* sp، *Candida* sp. أيضا أظهرت منطقة واضحة مثبطة ضد *Candida albicans*، ومن جهة *Meyerozyma* sp التي تبقى دائما محافظة على نمطها الظاهري القاتل. هذا يدل على أن هذه السلالات، قاتلة، و هي خمائر محتملة للملوحة الشديدة ووجود كلوريد الصوديوم في الوسط يشجع على التعبير عن هذا النمط القاتل.

الخلاصة: يمكننا القول أن القدرة القاتلة المحتملة للسلالات *Candida* sp، *Pichia* sp. وخاصة *Meyerozyma* sp. الموظفة ضد السلالة الممرضة *Candida albicans*، تبدو مثيرة للاهتمام، وربما تؤهل السلالات المنتجة للاستخدامات الطبية. ومع ذلك، هناك حاجة لدراسات أكثر عمقا لإجراء تحقيقات بشأن إمكانية تطبيق البروتينات القاتلة كعوامل مضادة جديدة.

كلمات مفتاحية: الخميرة، تسليط الضوء، نشاط ضد *Candida albicans*، القاتلة المحتملة.

<b>Nom</b> : Taibi	<b>Nom</b> : Okba	<b>Date de soutenance</b> : / /2012									
<b>Prénom</b> : Raouia	<b>Prénom</b> : Wassila										
<b>Thème</b> : Mise en évidence d'une activité anti- <i>Candida albicans</i> chez des souches de levures.											
<b>Nature du Diplôme</b> : Présenté pour l'obtention du diplôme de Master II En Microbiologie											
<p><b>Résumé :</b></p> <p>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 : <i>Candida</i>, <i>Meyerozyma</i>, <i>Pichia</i> et <i>Saccharomyces</i>, sont testées pour leur potentiel killer contre une souche pathogène de l'espèce <i>Candida albicans</i>.</p> <p>Le test de la mise en évidence de l'activité killer sur le milieu YPGA-BM, tamponné à pH 4,5 avec un tampon citrate-phosphate (0,1 M) montre qu'après 5 jours d'incubation à 25°C seule la souche <i>Meyerozyma</i> sp. développe une zone claire d'inhibition vis-à-vis de <i>C. albicans</i>, tandis que les souches <i>Candia</i> sp., <i>Pichia</i> sp. et <i>Saccharomyces</i> sp. n'en possèdent pas. Cependant, en présence des concentrations de 1% et 3% de NaCl, les souches <i>Candida</i> sp. et <i>Pichia</i> sp. développent également une zone claire d'inhibition vis-à-vis de <i>C. albicans</i>, à coté de <i>Meyerozyma</i> sp. qui garde toujours son phénotype killer. Ceci montre que ces souches, potentiellement killer, sont des levures halotolérantes et la présence du NaCl dans le milieu favorise l'expression de leur phénotype killer.</p> <p>En conclusion, nous pouvons dire que le potentiel killer des souches <i>Candida</i> sp., <i>Pichia</i> sp. et spécialement <i>Meyerozyma</i> sp. exprimé contre la souche pathogène <i>C. albicans</i> 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.</p>											
<p><b>Mots-clés :</b></p> <p>Levures, mise en évidence, activité anti-<i>Candida albicans</i>, potentiel killer.</p>											
<p><b>Membres de jury :</b></p> <table border="0"> <tr> <td><b>Président</b> : M<sup>lle</sup>. DOUAOUYA. L</td> <td>M.A.A</td> <td>Centre Universitaire de Khenchela</td> </tr> <tr> <td><b>Rapporteur</b> : M<sup>lle</sup>. LABBANI. F-Z K</td> <td>M.A.A</td> <td>Centre Universitaire de Khenchela</td> </tr> <tr> <td><b>Examineur</b> : M<sup>lle</sup>. LEULMI. N</td> <td>M.A.B</td> <td>Centre Universitaire de Khenchela</td> </tr> </table>			<b>Président</b> : M <sup>lle</sup> . DOUAOUYA. L	M.A.A	Centre Universitaire de Khenchela	<b>Rapporteur</b> : M <sup>lle</sup> . LABBANI. F-Z K	M.A.A	Centre Universitaire de Khenchela	<b>Examineur</b> : M <sup>lle</sup> . LEULMI. N	M.A.B	Centre Universitaire de Khenchela
<b>Président</b> : M <sup>lle</sup> . DOUAOUYA. L	M.A.A	Centre Universitaire de Khenchela									
<b>Rapporteur</b> : M <sup>lle</sup> . LABBANI. F-Z K	M.A.A	Centre Universitaire de Khenchela									
<b>Examineur</b> : M <sup>lle</sup> . LEULMI. N	M.A.B	Centre Universitaire de Khenchela									

