

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

Université Mentouri de Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biochimie et de Microbiologie

N° d'ordre : 006 / Mag / 2011

N° de série : 006 / SN / 2011

Mémoire

Pour l'obtention du diplôme de Magistère en Microbiologie Appliquée

Option : Biotechnologies Microbiennes

Présenté par : LAMMI Sarah

Thème

***Recherche de substances à activités antimicrobiennes
(antibactériennes et anticandidoses)
produites par des souches levuriennes isolées des sols sahariens***

Soutenu le : 23-01-2011

Devant le jury :

Président :	BOUSSEBOUA. H	Professeur	Univ. Mentouri Constantine
Rapporteur :	MERAIHI. Z	Professeur	Univ. Mentouri Constantine
Examineur :	MECHAKRA. A	M.C	Univ. Mentouri Constantine
Examineur :	KITOUNI. M	M.C	Univ. Mentouri Constantine

Année Universitaire 2010/2011

Remerciements

Mes remerciements les plus sincères s'adressent en premier lieu à mon encadreur Madame le Professeur MERAIHI Zahia , pour ses conseils judicieux, son jugement critique et son appui tout au long de cette étude . Votre sérieux, votre compétence et votre sens du devoir m'ont énormément marqués. Ce travail est pour moi l'occasion de vous témoigner ma profonde gratitude.

*Mes remerciements s'adressent également à Monsieur **BOUSSEBOUA H.**, Professeur à l'Université de Constantine pour le grand honneur de présider le jury.*

*A Madame **MECHAKRA A.** ainsi qu'à Monsieur **KITOUNI M.**, Maitres de conférences à l'Université de Constantine, je vous remercie d'avoir bien voulu examiner mon travail.*

*Un remerciement particulier et sincère à Madame **MEZIANI Z.**, pour ses conseils et son aide au laboratoire et de m'avoir transmis ses connaissances.*

*Je tiens à exprimer mes remerciements également aux Mademoiselles **BOUCHERIT Z.** et **LOUCIF K.** et à Monsieur **DJABALLAH C.**, pour leur encouragement. Merci pour ces échanges d'idées sur des sujets scientifiques.*

Sarah LAMMI

Table des matières

	page
Introduction	1
1. Revue bibliographique	3
1.1. Les maladies infectieuses	3
1.1.1. La flore microbienne normale de l'homme	3
1.1.2. Les infections nosocomiales	3
1.1.3. Principaux pathogènes hospitaliers	5
1.2. L'antibiothérapie et la résistance aux antibiotiques	11
1.2.1. Rappel succinct sur l'antibiothérapie	11
1.2.2. La résistance antimicrobienne	11
1.2.2.1. Origines de la résistance	11
1.2.2.2. Diffusion de la résistance	11
1.2.2.3. Mécanismes de la résistance	12
1.3. Les levures	15
1.3.1. Généralités	15
1.3.2. Reproduction	15
1.3.3. Habitat	15
1.3.4. Nutrition et besoins physicochimiques	17
1.3.5. Classification	19
1.3.6. Isolement des levures et identification	19
1.3.6.1. Etude des caractères cultureux	19
1.3.6.2. Etude des caractères morphologiques et cellulaires	19
1.3.6.3. Etude des caractères biochimiques et physiologiques	20
1.3.7. Applications des levures en biotechnologie	21

1.4. L'activité antimicrobienne des levures	24
1.4.1. Généralités	24
1.4.2. Origines de l'activité antimicrobienne	25
1.4.3. Mode d'action de la toxine killer	25
1.4.3.1. Production	27
1.4.3.2. Fixation et action toxique	27
1.4.4. Principales applications des levures killer	27
2. Matériel et méthodes	29
2.1. Matériel biologiques	29
2.1.1. Souches à tester	29
2.1.2. Souches tests	29
2.2. Méthodes et techniques	29
2.2.1. Recherche des activités antimicrobiennes	29
2.2.1.1. Préparation des levures à tester	29
2.2.1.2. Préparation des filtrats	30
2.2.1.3. Test des activités antimicrobiennes	30
2.2.2. Identification du genre de la souche de levure sélectionnée	31
2.2.2.1. Etude des caractères cultureux	31
2.2.2.2. Etude des caractères morphologiques et cellulaires	31
2.2.2.3. Tests biochimiques et physiologiques	32
2.2.3. Etude de l'influence de la température sur la production des substances antimicrobiennes.	33
2.2.3.1. Préparation des inocula des micro-organismes tests	33
2.2.3.2. Préparation des surnageants	33
2.2.3.3. Test des activités antimicrobiennes	33

2.2.4. Etude de l'influence du pH sur la production des substances antimicrobienne	34
2.2.4.1. Préparation des souches tests	34
2.2.4.2. Préparation des surnageants	34
2.2.4.3. Test des activités antimicrobiennes	34
2.2.5. Identification préliminaire de la (les) substance(s) bioactive(s)	34
2.2.5.1. Effet du chauffage sur le surnageant de la culture	34
2.2.5.2. Chromatographie sur couche mince	35
3. Résultats et discussion	37
3.1. Recherche des activités antimicrobiennes	38
3.2. Identification du genre de la souche de levure sélectionnée S19	45
3.3. Effet de la température sur la production des substances antimicrobiennes	47
3.4. Effet du pH sur la production des substances antimicrobiennes	48
3.5. Identification préliminaire de la (les) substance(s) bioactive(s)	50
Conclusion et perspectives	51
Références bibliographiques	53
Annexes	66
Résumés	

Liste des abréviations

ATCC: *American type culture collection.*

CCM : Chromatographie sur couche mince.

CMI : Concentration minimale inhibitrice.

g:Gravité.

K₂HPO₄ : Phosphate dipotassique anhydre.

KNO₃ : Nitrate de potassium.

M : Molaire.

Na₂HPO₄ : Phosphate disodique anhydre.

rpm : Rotation par minute.

S : Souche.

Liste des figures

	Page
Figure 1 : Exemple d'adhérence d'un microbe à une cellule cible	7
Figure 2: Mode d'action des agents majeurs chimiothérapeutiques antibactériens	10
Figure 3 : Sites d'action d'agents chimiothérapeutiques antifongiques	10
Figure 4 : Division d'une cellule de levure par bourgeonnement	14
Figure 5: Filamentisation des levures	14
Figure 6: Cellule de levure observée en microscopie électronique après cryodécapage	14
Figure 7 : Observations de levures au microscope électronique à balayage	26

Liste des tableaux

	Page
Tableau 1: Quelques membres représentatifs de la flore normale de diverses parties du corps humain.	4
Tableau 2: Microorganismes intervenant dans la majorité des infections nosocomiales.	6
Tableau 3: Mécanisme de résistance bactérienne aux antibiotiques.	13
Tableau 4 : Classification des levures	18
Tableau 5 : Utilisation des levures et de leurs produits.	22
Tableau 6 : Activité antimicrobienne des levures testées après 72 h d'incubation à 28°C dans le milieu YPG _(a) .	39
Tableau 7 : Activité antimicrobienne des levures testées après 7 jours d'incubation à 28°C dans le milieu YPG _(a) .	39
Tableau 8 : Diamètres (en mm) des zones d'inhibition de la croissance de la bactérie test <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603 par les levures testées, après 72 h d'incubation à 28°C dans le milieu YPG _(a) .	42
Tableau 9 : Diamètres (en mm) des zones d'inhibition de la croissance de la bactérie test <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603 par les levures testées, après 7 jour d'incubation à 28°C dans le milieu YPG _(a) .	42

Liste des photographies^(*)

	Page
Photographie 1 : Test d'activité sur le milieu Muller-Hinton contre la bactérie test <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603, après incubation des souches de levures (S6, S10, S18 et S19) dans le milieu YPG _(a) à 28°C. A : pendant 72 heures ; B : pendant 7 jours	37
Photographie 2 : Aspect cultural de la souche S19 après 72h d'incubation à 25°C dans le milieu YPG _(b) .	44
Photographie 3 : Aspect macroscopique de la souche S19 après 72h d'incubation à 25°C sur le milieu YPGA.	44
Photographie 4 : Aspect et contour des colonies de la souche S19 au grossissement X4.	44
Photographie 5: Aspect microscopique de la souche S19 (A : bourgeonnement des cellules) au grossissement X100.	44
Photographie 6: Aspect de filamentation de la souche S19 après une semaine d'incubation à 25°C sur le milieu PDA au grossissement X100.	46
Photographie 7: Test d'assimilation de l'azote par la souche S19 après trois jours d'incubation à 25°C sur un milieu synthétique (a: peptone ; b:source d'azote).	46
Photographie 8 : Fermentation des sucres (A : tubes témoins ; B : tubes tests) . Ordre des sucres : glucose – galactose – lactose – maltose – saccharose - raffinose.	46
Photographie 9 : Test d'activité sur le milieu Muller-Hinton de la souche de levure S19 contre la bactérie test <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603.(T : surnageant témoin de la culture de S19 ; S : surnageant de la culture de S19 chauffé à 90°C pendant 20 min).	49
Photographie 10: Chromatogramme obtenu après révélation à la ninhydrine. (Dépôts A : témoin ; dépôts B : surnageant de la culture de S19).	49

^(*) : Les photographies sont prises par un appareil photos numérique type SAMSUNG ES55 - 10,2 méga pixels. Les observations microscopiques sont effectuées à travers un microscope optique LEICA DM1000.

Introduction

Les bactéries et les champignons pathogènes ont développé des systèmes de défenses contre les agents antimicrobiens et une résistance aux nouveaux médicaments.

Actuellement, 80 à 95% des souches de *Staphylococcus aureus* produisent une pénicillinase qui inactive les β -lactamines dont, la Pénicilline G et l'Ampicilline ; rendant leurs indications obsolètes dans le cadre d'infections à *Staphylococcus aureus* (Daurel et Leclercq, 2008).

L'émergence de la résistance aux antibiotiques et la production des β -lactamases à spectre étendu par les multiples souches résistantes d'*Escherichia coli*, a provoqué une inquiétude croissante ces dernières années ; en raison des options thérapeutiques limitées si les infections par ces souches surviennent (Baum et Marre, 2005).

De plus, les substances chimiques antimicrobiennes qui peuvent agir efficacement sur les cellules eucaryotes, comme les levures, ne sont pas disponibles (Xianghong *et al.*, 2007). La plupart des antifongiques découverts à ce jour, utilisés en thérapie humaine, sont très toxiques car ils attaquent, en plus des champignons pathogènes, les cellules eucaryotes hôtes (Yashuda, 2001).

Selon le rapport de 2007, de l'organisation mondiale de la santé, les maladies infectieuses arrivent toujours au deuxième rang des principales causes de mortalité au monde (World Health Organization, 2007).

Devant cette situation, les efforts de recherches consacrées aux antimicrobiens se sont développés ces dernières années.

Le milieu naturel est à l'origine d'environ 70% des médicaments et anti infectieux actuels (Newman *et al.*, 2003). Presque tous les antibiotiques d'origine naturelle utilisés en médecine humaine et vétérinaire sont élaborés par des microorganismes vivant dans le sol (Davet, 1996) ; principalement, les bactéries et les moisissures (Guiraud, 1998).

La littérature rapporte de nombreux travaux sur l'isolement de levures à activités antimicrobiennes. Ils ont débuté sérieusement avec les découvertes de Bevan et Makover en 1963 et ne cessent de continuer jusqu'à ce jour (Polonelli *et al.*, 1991 ; Schmitt et Breinig, 2002 ; Izgu *et al.*, 2004 ; Xianghong *et al.*, 2007 ; Hernandez *et al.*, 2008 ; Polonelli et Conti, 2009).

Dans cette optique, on s'est intéressé à la recherche de nouvelles molécules bioactives d'origine levurienne comme alternative à l'antibiothérapie.

Cette étude a pour objectif essentiel de tester le potentiel antimicrobien (antibactérien et anti candidose) des souches de levures isolées des sols sahariens ; dans le but de contribuer modestement à la résolution du problème de résistance, développé par les microorganismes vis-à-vis des antibiotiques. La stratégie expérimentale consiste à :

1°- Rechercher, parmi les souches levuriennes isolées au niveau du laboratoire ; celles qui produisent des activités antimicrobiennes (antibactérienne et antilevurienne).

2°- Etudier l'effet de la température et du pH sur la production de ces substances toxiques.

3°- Séparer ces substances par CCM et faire des essais préliminaires pour déterminer leurs natures chimiques.

1. Revue bibliographique

1.1. Les maladies infectieuses

1.1.1. La flore microbienne normale de l'homme

Elle concerne les microorganismes hébergés par l'homme qui contribuent à sa bonne santé (Madigan et Martinko, 2007) (Tableau 1).

La flore normale après son développement, procure des avantages à son hôte en prévenant la croissance de microorganismes nuisibles. Ce phénomène, appelé antagonisme microbien ou effet de barrière, fait intervenir la compétition entre des microbes (Perry *et al.*, 2004).

La flore normale protège ainsi l'hôte contre l'implantation de microorganismes potentiellement pathogènes: elle entre en compétition avec ces derniers pour les nutriments, produit des substances susceptibles de leur nuire et influe sur les conditions ambiantes; tels que le pH et la quantité de dioxygène disponible.

Tout déséquilibre entre la flore normale et les microorganismes pathogènes engendre l'apparition d'une maladie infectieuse (Tortora *et al.*, 2003).

1.1.2. Les infections nosocomiales

Le milieu hospitalier est un environnement propice à la propagation des infections, depuis des malades infectés vers des malades non infectés. Dans les hôpitaux, 5% à 15% des personnes hospitalisées contractent une forme quelconque d'infections nosocomiales; du nom latin « *nosocomium* » pour hôpital. Leur taux a augmenté de 36% au cours des 20 dernières années (Madigan et Martinko, 2007).

Les infections nosocomiales diffusent facilement et rapidement à l'hôpital pour différentes raisons :

- Les malades sont moins résistants à l'infection (baisse des défenses immunitaires, hôtes déficients).
- Les malades infectés constituent un réservoir pour les pathogènes très virulents.
- La proximité des malades dans une même pièce et les plaies favorisent la transmission et la diffusion du pathogène.
- La contamination des nouveau-nés est plus grande à partir des plaies de la mère du faite d'une immunité immature.

Tableau 1: Quelques membres représentatifs de la flore normale dans diverses parties du corps humain (Tortora *et al.*, 2003)

Parties du corps	Principaux microorganismes
Peau	<i>Propionibacterium acnes</i> , <i>Staphylococcus epidermis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Corynebacterium xerosis</i> , <i>Pityrosporum spp.</i> <i>Candida sp.</i>
Yeux (Conjonctive)	<i>Staphylococcus epidermis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , diphtéroïdes.
Nez et pharynx (voies respiratoires supérieures)	<i>Staphylococcus epidermis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> et des diphtéroïdes anaérobies dans le nez ; <i>Staphylococcus epidermis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Haemophilus</i> et <i>Neisseria</i> , des diphtéroïdes dans la gorge.
Jéjunum et iléum	Divers espèces de <i>Staphylococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Actinomyces</i> , <i>Bacteroides</i> , <i>Haemophilus</i> , <i>Fusobacterium</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Treponema</i> non pathogène et <i>Candida sp.</i>
Gros intestin	<i>Staphylococcus</i> groupe D, <i>Bacteroides</i> , <i>Fusobacterium</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Bifidobacterium</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Citrobacter</i> , <i>Proteus</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Shigella</i> et <i>Candida sp.</i>
Système urogénital	<i>Staphylococcus epidermis</i> , micrococci aérobies, <i>Enterococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , diphtéroïdes aérobies, <i>Pseudomonas</i> , <i>Klebsiella</i> et <i>Proteus</i> dans l'urètre ; lactobacilles, diphtéroïdes aérobies, <i>Streptococcus</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Bacteroides</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Candida albicans</i> et <i>Trichomonas vaginalis</i> à l'occasion dans le vagin.

- Les interventions chirurgicales exposent les sites organiques stériles à la flore du sujet opéré et éventuellement aux pathogènes.
- Les traitements immunosuppresseurs (corticoïdes) augmentent le risque infectieux.
- L'utilisation intensive d'antibiotiques augmente la résistance des pathogènes circulants qui infectent préférentiellement les voies urinaires, respiratoires ainsi que le sang (Tableau 2).

1.1.3. Principaux pathogènes hospitaliers

Parmi les plus importants :

- *Staphylococcus aureus*

Les staphylocoques sont des germes ubiquistes (Delarras, 2007), largement présents dans les poussières dispersées dans l'air et les surfaces. C'est des cocci à coloration de GRAM positive, anaérobies facultatifs, qui s'assemblent en grappes caractéristiques. Ils se développent relativement bien dans des concentrations de pression osmotique élevées et de faibles taux d'humidité ; ce qui explique en partie leur croissance dans les sécrétions nasales et sur la peau (Minor et Marth, 1976).

En pathologie humaine, *Staphylococcus aureus* est l'espèce la plus virulente (De Buyser, 1991). Certaines caractéristiques des staphylocoques sont responsables de leur pathogénicité, qui revêt plusieurs formes par la production de nombreuses enzymes extra cellulaires ou des toxines :

Presque toutes les souches de *Staphylococcus aureus* produisent une coagulase qui favorise la formation du caillot de fibrine constitué autour des bactéries, susceptible de les protéger contre la phagocytose et de les rendre invulnérables à d'autres mécanismes de défense de l'hôte; le caillot de fibrine ainsi formé, peut être mis en circulation dans le sang et bloquer les petits vaisseaux.

En plus de la coagulase, *Staphylococcus aureus* produit la leucocidine ; une enzyme qui détruit les leucocytes phagocytaires. Elle produit également la staphylokinase, qui dégrade la fibrine défaisant ainsi les caillots formés par le corps pour isoler l'infection, entraînant la dissémination de la bactérie dans le sang ; synthétise l'hyaluronidase qui permet sa diffusion dans les tissus en clivant l'acide hyaluronique ; des protéases ; des lipases et des nucléases (Perry *et al.*, 2004).

Tableau 2: Microorganismes intervenant dans la majorité des infections nosocomiales
(Tortora *et al.*, 2003)

Microorganismes	Pourcentage du nombre total d'infections	Infections
<i>Staphylococcus aureus</i> , staphylocoques à coagulase négative et entérocoques.	34%	Infections de plaies chirurgicales, pneumonie, septicémie et infections des voies urinaires.
<i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Enterobacter sp</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> .	32%	Pneumonie et infections de plaies chirurgicales.
<i>Clostridium difficile</i> .	17%	Presque la moitié des diarrhées nosocomiales.
Mycètes (principalement <i>Candida albicans</i>).	10%	Infections des voies urinaires et septicémies.
Autres bactéries à GRAM négatif (<i>Acinetobacter</i> , <i>Citrobacter</i> et <i>Haemophilus</i>).	7%	Infections des voies urinaires et plaies chirurgicales.

Cette bactérie sécrète une entérotoxine qui ingérée avec la nourriture, affecte l'intestin et perturbe l'activité du tube digestif en déclenchant l'apparition des symptômes associés à l'intoxication alimentaire.

Staphylococcus aureus peut causer des infections de la peau, en se liant aux cellules de l'épiderme par un mécanisme d'adhérence (Tortora *et al.*, 2003).

Ce germe est également la cause d'une endocardite aiguë, par l'altération rapide des valves cardiaques entraînant souvent la mort en quelques jours ou quelques semaines si le malade n'est pas traité (Madigan et Martinko, 2007).

○ *Escherichia coli*

C'est un bacille à coloration de GRAM négative, mobile, aérobie, résident normal du tube digestif de l'homme (Delarras, 2007).

Cette bactérie est utile parce qu'elle favorise la production de certaines vitamines et dégrade certains aliments qui seraient autrement impossible à digérer. Toutefois, il existe des souches virulentes qui causent des troubles quand elles croissent dans les intestins. On soupçonne que 50 à 85% des diarrhées sont dues à *Escherichia coli* entérotoxigènes.

Les souches entéropathogènes d'*Escherichia coli* possèdent des adhésines (Figure 1) qui se fixent seulement à des types spécifiques de cellules de certaines régions de l'intestin grêle et après avoir adhérer aux cellules hôtes, provoque ainsi l'endocytose ; ce qui permet sa pénétration dans ces cellules et de s'y multiplier.

Escherichia coli est l'agent causal des inflammations touchant les reins par la destruction des néphrons ce qui nuit grandement au fonctionnement de ces derniers (Perry *et al.*, 2004).

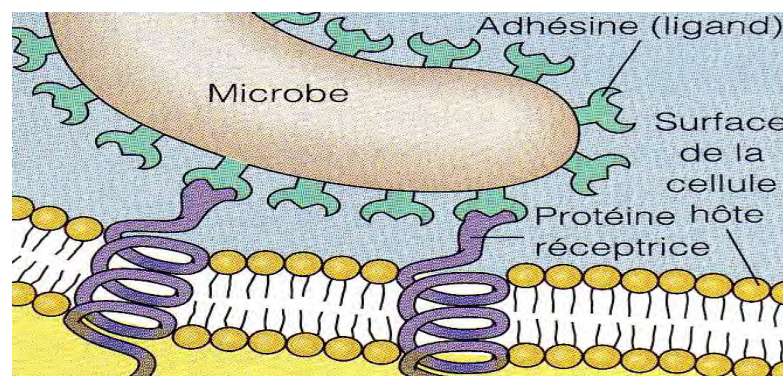


Figure 1 : Exemple d'adhérence d'un microbe à une cellule cible (Tortora *et al.*, 2003)

○ *Klebsiella pneumoniae*

Les *Klebsiella* sont des bactéries immobiles en diplobacilles généralement capsulées, à coloration de GRAM négative, très fréquentes dans la nature, commensales de l'homme et responsables d'infections opportunistes hospitalières chez les malades fragilisés.

Parmi les espèces couramment rencontrées ; *Klebsiella pneumoniae* : agent de pneumopathies aiguës, d'angines et d'otites, parfois retrouvée dans les infections urinaires nosocomiales (Madigan et Martinko, 2007).

Ce genre causal de la pneumonie bactérienne présente une virulence liée à la capsule de polysaccharides qui permet à la bactérie d'adhérer aux voies respiratoires et de les coloniser. La production de la capsule fait aussi obstacle aux défenses de l'hôte en perturbant la phagocytose (Perry *et al.*, 2004).

○ *Candida albicans*

Cette levure vit à l'état saprophyte dans le tube digestif humain où elle est présente dès les premiers mois de la vie, transmise par contact maternel (Agbo-Godeau et Guedj, 2005). Elle existe sous la forme d'éléments unicellulaires bourgeonnants ou d'un pseudomycélium (Feigin et Cherry, 2004). Certaines conditions favorisent son passage à un stade pathogène (Bonn et Blanc, 2008 ; Hopp et Blatensweiler, 2009).

L'infection découle habituellement de la prolifération opportuniste du microorganisme, lorsque la flore normale est détruite par des antibiotiques à large spectre ou par d'autres facteurs (humidité, pH acide, personnes immunodéprimées) (Regnault, 2002).

Cette levure est responsable de candidoses humaines touchant principalement les muqueuses, les phanères et peuvent même atteindre les organes internes (Boiron, 1999 ; Pfaller, 2002).

Sur la centaine de *Candida* connue, une dizaine d'espèces seulement sont pathogènes pour l'homme. Parmi celles-ci, on distingue *Candida albicans* le pathogène de loin le plus fréquemment isolé 90% (Feigin et Cherry, 2004).

La pathogénicité de *Candida albicans* est liée à la phase filamenteuse (Perry *et al.*, 2004). Elle se fixe aux cellules épithéliales humaines sous forme de levure mais doit généralement produire un pseudomycélium pour envahir les tissus sous jacents (Whitenay et Bachewich, 2007).

Elle provoque des infections cutanées et secrètent des protéases qui modifient la membrane des cellules hôtes de façon à permettre l'adhérence du microorganisme puis sa croissance.

Entraîne le plus souvent le muguet ou candidose cutanéomuqueuse de la bouche qui atteint souvent les nouveau-nés, dont la flore normale n'est pas encore développée. Elle peut prendre aussi la forme d'une infection vaginale et plus fréquemment, des infections nosocomiales du sang (Develoux et Bretagne, 2005).

Candida albicans occupe une place prédominante parmi les candidoses (Figarella et Leyral., 1998). Cependant, dans certaines conditions, en particulier chez les personnes immunodéprimées, les candidoses sont très graves voir mortelles si elles deviennent systématiques et s'attaquent aux systèmes respiratoire, circulaire et nerveux (Regnault, 2002 ; Carle et Pharm, 2003).

Le taux de mortalité des candidémies s'est élevé de 57% à 72% chez l'adulte et de 20% chez l'enfant (Stamos et Rowley, 1995).

Ces microorganismes, sous la pression de la sélection thérapeutique, sont de plus en plus résistants aux antibiotiques. En milieu hospitalier, 99% des souches isolées présentent des résistances et rendent ainsi problématique la mise en œuvre contre les infections (Meyer *et al.*, 2004).

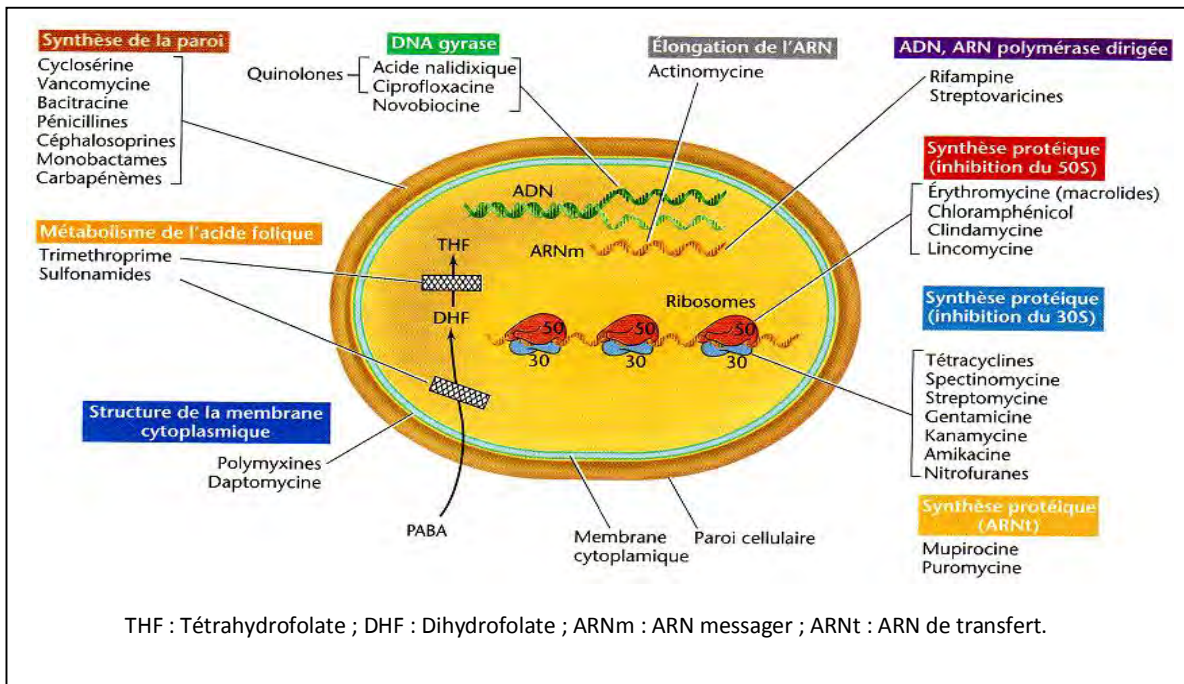


Figure 2: Mode d'action des agents majeurs chimiothérapeutiques antibactériens.
(Madigan et Martinko, 2007)

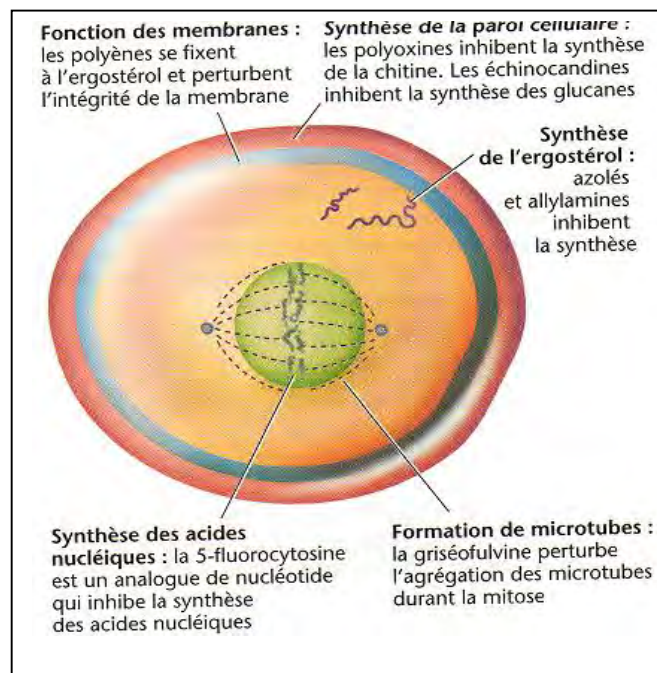


Figure 3: Sites d'action d'agents chimiothérapeutiques antifongiques.
(Madigan et Martinko, 2007)

1.2. L'antibiothérapie et la résistance aux antibiotiques

1.2.1. Rappel succinct sur l'antibiothérapie

On appelle antibiotique, toute substance chimique agissant de manière spécifique sur une étape du métabolisme des bactéries (antibiotiques antibactériens) ou des champignons (antibiotiques antifongiques) (Figures 2 et 3). Ces substances sont d'origine naturelle, semisynthétique ou synthétique (Delarras, 2007).

1.2.2. La résistance antimicrobienne

1.2.2.1. Origines de la résistance

La résistance aux antibiotiques peut être fréquemment codée par le microorganisme au niveau chromosomique ou plasmidique.

La plupart des bactéries résistantes aux molécules antimicrobiennes, contiennent des gènes de résistance situés sur les plasmides R, plutôt que sur des chromosomes (Perry *et al.*, 2004).

Les souches bactériennes possédant ce plasmide, peuvent produire des enzymes qui modifient chimiquement ces antibiotiques par phosphorylation, acétylation ou adénylation. La molécule modifiée perd alors son activité antibiotique (Meyer *et al.*, 2004).

1.2.2.2. Diffusion de la résistance

La résistance héréditaire aux agents antibactériens est souvent portée par des plasmides ou par des petits fragments d'ADN appelés transposons : qui se déplacent d'une région de la molécule d'ADN à une autre.

Certains plasmides y compris les facteurs R, peuvent être transférés entre les cellules bactériennes. Ces derniers possèdent souvent des gènes de résistance à plusieurs antibiotiques.

L'utilisation répandue des antibiotiques médicaux, vétérinaires et agricoles continue à fournir des conditions sélectives pour la diffusion des plasmides R avec des gènes de résistance aux antibiotiques, en sélectionnant et en favorisant les bactéries contenant ces plasmides (Tortora *et al.*, 2003).

1.2.2.3. Mécanismes de la résistance

Aucun antibiotique n'inhibe l'ensemble des microorganismes et quelques microorganismes sont naturellement résistants à certains antibiotiques (Meyer *et al.*, 2004).

Il y a plusieurs raisons pour lesquelles un microorganisme peut avoir une résistance naturelle à un antibiotique (Madigan et Martinko, 2007): (Tableau 3)

- Il peut ne pas posséder la structure ciblée par l'antibiotique. Par exemple, certaines bactéries ne possèdent pas de paroi bactérienne typique et sont donc résistantes aux pénicillines.
- Le microorganisme peut être imperméable à l'antibiotique. Ainsi, la plupart des bactéries à GRAM négatif sont imperméables à la pénicilline G.
- Il peut modifier la structure chimique de l'antibiotique en une forme inactive. Beaucoup de staphylocoques contiennent des β -lactamases qui peuvent couper le cycle β -lactame de la plupart des pénicillines.
- Il peut modifier la cible de l'antibiotique.
- Le microorganisme peut développer une voie biochimique résistante. Par exemple, de nombreux microbes pathogènes développent la résistance aux molécules de sulfamides, empêchant la production d'acide folique chez les bactéries. Les souches résistantes modifient leur métabolisme pour assimiler l'acide folique présent dans l'environnement, évitant l'utilisation de la voie métabolique bloquée par les sulfamides.
- Le microorganisme peut être capable de relarguer un antibiotique entré dans la cellule (mécanisme d'efflux), comme décrit dans la résistance de *Pseudomonas aeruginosa* à de nombreux antibiotiques.

Tableau 3: Mécanisme de résistance bactérienne aux antibiotiques

(Madigan et Martinko, 2007)

Mécanisme de résistance	Exemple d'antibiotique	Origine génétique de la résistance	Mécanisme présent chez
Réduction de la perméabilité	Pénicilline	Chromosomes	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Bactéries entériques
Inactivation des antibiotiques (par exemple, pénicillinase)	Pénicillines	Plasmides et Chromosomes	<i>Staphylococcus aureus</i> Bactéries entériques <i>Neisseria gonorrhoeae</i>
	Chloramphénicol		<i>Staphylococcus aureus</i> Bactéries entériques
Modification de la cible (par exemple, ARN polymérase)	Aminoglycosides	Plasmides Chromosomes	<i>Staphylococcus aureus</i>
	Erythromycine		<i>Staphylococcus aureus</i>
	Rifamycine		Bactéries entériques
	Streptomycine		Bactéries entériques
	Norfloxacin		Bactéries entériques
Développement de résistance des voies métaboliques	Sulfonamides	Chromosomes	<i>Staphylococcus aureus</i>
Excrétion (pompage vers l'extérieur de la cellule)	Tétracycline	Plasmides	Bactéries entériques
	Chloramphénicol	Chromosomes	<i>Staphylococcus aureus</i>
	Erythromycine	Chromosomes	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Staphylococcus sp.</i>

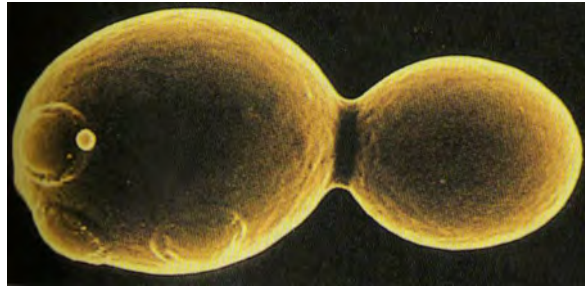


Figure 4 : Division d'une cellule de levure par bourgeonnement (Madigan et Martinko, 2007)

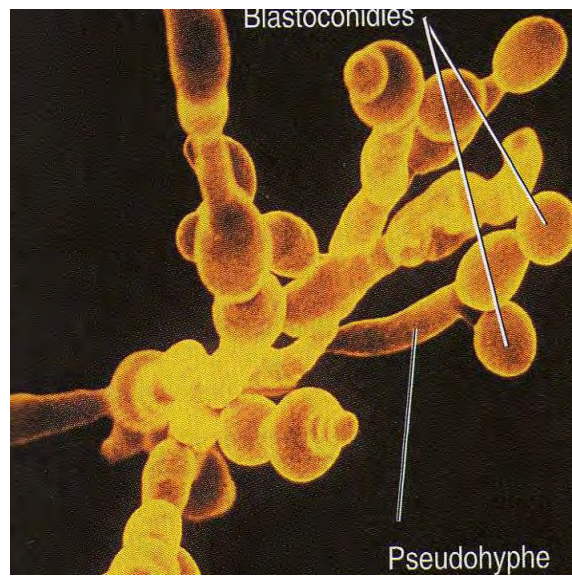


Figure 5: Filamentation des levures (Tortora *et al.*, 2003)



Figure 6: Cellule de levure observée en microscopie électronique après cryodécoupage (Madigan et Martinko, 2007)

1.3. Les levures

1.3.1. Généralités

Le terme levure provient du mot latin « *levare* » qui se traduit par le verbe « lever » comme levain (Oteng-Gyang, 1984), rappelle l'attitude de certaines d'entre elles à provoquer la « levée » des pâtes panifiables (Bouchet *et al.*, 2005).

Les levures sont des eucaryotes hétérotrophes faisant partie du groupe de champignons unicellulaires (Meyer *et al.*, 2004) ; certaines font des bourgeons qui ne se détachent pas, il se forme alors une courte chaîne de cellules appelée pseudohyphe (Tortora *et al.*, 2003) (Figure 5). Ces structures sont immobiles (Guiraud, 1998).

Les cellules de levures ont des formes plus au moins sphériques ou ovoïdes, parfois cylindriques ou de formes plus spécifiques (Bourgeois et Larpent, 1996). Elles sont généralement plus grandes que celles des bactéries et présentent une structure plus complexe (Perscott *et al.*, 2007), notamment par la présence de noyau et d'organites divers (Larpent, 1991) (Figure 6).

Elles se trouvent isolées, en paires, en chaînes ou en petits amas; leur taille est très variable suivant les espèces: 2,5-10,5µm de largeur contre 4,5-21µm de longueur. Ces dimensions et aspects dépendent fréquemment des conditions de culture et l'âge des cellules (Scherr et Weaver, 1953).

1.3.2. Reproduction

Les levures se reproduisent aussi bien par un cycle asexué (végétatif) que par un cycle sexué, en fonction des conditions nutritionnelles favorables ou défavorables du milieu. La reproduction végétative se fait par bourgeonnement ou fission (Larpent, 1992) (Figure 4) ; dans certaines conditions de cultures les levures sporogènes peuvent se reproduire par voie sexuée (Bourgeois et Larpent, 1996).

1.3.3. Habitat

Les levures sont très répandues dans les milieux riches en glucides (Larpent, 1992). Elles se présentent sous forme de poudre blanche sur les fruits et les feuilles et sont saprophytes du nectar de fleurs (Scriban, 2003). D'autres se développent au niveau des eaux douces et profondes associées au plancton (Ahearn, 1973 ; Van Uden et Fell, 1986), certaines espèces

sont présentes dans le tube digestif des animaux et des insectes ; comme elles peuvent persister libres dans le sol (Mangenot, 1966; Phaff et Starmer, 1987).

1.3.4. Nutrition et besoins physicochimiques

Les levures comme tous les champignons, sont hétérotrophes exigent donc des sources azotées et carbonées pour se nourrir et se développer (Thuriaux, 2004):

○ *Source de carbone et d'énergie*

Le carbone est le composé majeur de la cellule levurienne, environ 50% du poids sec (Rivière, 1970). Les sources carbonées sont d'une grande importance pour la biosynthèse des constituants cellulaires variés (les glucides, les lipides, les protéines et les acides nucléiques), leur oxydation fournit l'énergie à la cellule (Larpen, 1991). Certaines levures peuvent utiliser une large gamme de substrats carbonés, mais d'autres assimilent seulement un petit nombre de composés (Bourgeois et Leveau, 1991). Des levures particulières utilisent des sources de carbone non conventionnelles (éthanol, glycérol) (Tamaki et Hama, 1982).

○ *Source d'azote*

La synthèse des composés azotés structuraux et fonctionnels de la cellule, dépend de l'assimilation des formes oxydées ou réduites car les levures ne peuvent pas fixer l'azote libre. Différentes sources d'azote organique peuvent être assimilées par la plupart des levures : sels d'ammonium ou de nitrate, acides aminés, farine de soja, peptone, extrait de levures, etc. (Walker *et al.*, 1995); permettant la synthèse des protéines, des acides nucléiques et des vitamines (Guiraud, 1998).

○ *Oligoéléments et facteurs de croissance*

Ces facteurs interviennent lors des réactions enzymatiques, comme éléments constitutifs de coenzymes variés (Rivière, 1975). Il s'agit de sels minéraux et d'oligoéléments nécessaires à de très faibles concentrations (Larpen et Sanglier, 1992; Boiron, 1996). Ils agissent en complément des protéines comme activateurs ou stabilisateurs d'enzymes et peuvent stimuler la croissance. Parmi les métaux alcalins indispensables, se trouvent les cations monovalents K^+ , Na^+ , Li^+ , Cs^+ , Rb^+ et les cations bivalents Mg^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} et Mn^{2+} (Pommier, 2003).

○ *Besoins physicochimiques*

Les levures sont généralement adaptées à des environnements qui seraient hostiles aux bactéries. Toutefois, elles se distinguent par certains besoins que le milieu doit satisfaire (Perry *et al.*, 2004) :

Normalement, les levures croissent dans leurs environnements naturels à des températures variant de 25°C à 30°C. Ces températures ne sont pas rigoureusement les valeurs optimales de croissance, certaines levures sont thermophiles et d'autres psychrophiles (Delarras, 2007).

Des gammes très larges de pH allant de 2,4 à 8,6 sont tolérées par les levures. Cependant, l'optimum est compris entre 4,5 et 6,5 (Bouix et Leveau, 1991).

La plupart des souches peuvent se développer à des activités de l'eau entre 0,62 et 0,93 (Delarras, 2007). Généralement, les levures résistent mieux que les bactéries à la pression osmotique : en accumulant des polyols comme osmoprotecteurs (Bourgeois et Leveau, 1991). Par conséquent, certaines espèces sont osmophiles mais avec un métabolisme lent (Bouix et Leveau, 1991).

Toutes les levures se développent en présence d'oxygène. Certaines sont aérobies strictes d'autres sont aéro-anaérobies facultatives (Davis, 1990). Elles peuvent utiliser la molécule du dioxygène (O₂) ou un composé organique comme accepteur d'électrons final; cette adaptation est précieuse parce qu'elle leur permet de vivre dans divers environnements. S'il y a des molécules de dioxygène dans le milieu, les levures se servent de la respiration aérobie pour métaboliser les glucides en dioxyde de carbone (CO₂) et en eau; si elles en sont privées, elles fermentent les glucides et produisent de l'éthanol et du dioxyde de carbone (Bourgeois *et al.*, 1996).

1.3.5. Classification

Grâce au développement des techniques d'analyses, Lodder (1971) a pu établir une classification des levures basée sur les critères morphologiques, culturels, sexuels et physiologiques; mais l'isolement de nouvelles souches, ainsi que l'avènement des biotechnologies, ont permis par la suite à Kreger-Van Rij en (1984) de réactualiser cette classification qui, en outre les critères cités plus haut repose sur l'étude de certains organites (exemple : le noyau, séquençage de l'ADN). Cette classification est devenue actuellement une référence et comprend une soixantaine de genres et près de 500 espèces (Kreger-Van Rij, 1984).

Les levures se divisent en 3 grandes classes (Tableau 4):

- Les ascomycètes : également appelées levures ascosporegènes, forment dans certaines conditions des ascospores à l'intérieure de la cellule .
- Les basidiomycètes : capables d'élaborer des spores externes apparentées aux basidiospores.
- Les deutéromycètes ou levures imparfaites: genres asexués, qui se multiplient par reproduction végétative.

Tableau 4 : Classification des levures (Kreger-Van Rij, 1984).

Les levures ascomycètes	Les levures basidiomycètes	Les levures imparfaites
Saccharomycetaceae 1.Schizosaccharomycetoideae <i>Schizosaccharomyces</i> 2.Saccharomycetoideae <i>Ambrosiozyma</i> <i>Arthroascus</i> <i>Arxiozyma</i> <i>Citeromyces</i> <i>Clavispora</i> <i>Cyniclomyces</i> <i>Debaryomyces</i> <i>Dekkera</i> <i>Guilliermonedella</i> <i>Hansenula</i> <i>Issatchenkia</i> <i>Kluyveromyces</i> <i>Lodderomyces</i> <i>Pachysolen</i> <i>Pachytichospora</i> <i>Pichia</i> <i>Saccharomyces</i> <i>Saccharomycopsis</i> <i>Schwanniomyces</i> <i>Sporopachydermia</i> <i>Stephanoascus</i> <i>Torulaspora</i> <i>Wickerhamiella</i> <i>Wingea</i> <i>Yarrowia</i> <i>Zygosaccharomyces</i> 3.Lipomycetoideae <i>Lipomyces</i> 4.Nadsonioideae <i>Hanseniaspora</i> <i>Nadsonia</i> <i>Saccharomycodes</i> <i>Wickerhamia</i> Spermophthoraceae <i>Coccodiascus</i> <i>Metchnikowia</i> <i>Nematospora</i>	Levures formant des teliospores <i>Leucosporidium</i> <i>Rhodosporidium</i> <i>Sporidiobolus</i> Filobasidiaceae <i>Filobasidiella</i> <i>Filobasidium</i> Levures non classées <i>Sterigmatosporidium</i>	Sporobolomycetaceae <i>Bullera</i> <i>Sporobolomyces</i> Cryptococcaceae <i>Aciculoconidium</i> <i>Brettanomyces</i> <i>Candida</i> <i>Cryptococcus</i> <i>Eniella</i> <i>Fellomyces</i> <i>Kloeckera</i> <i>Malassezia</i> <i>Oosporidium</i> <i>Phaffia</i> <i>Rhodotorula</i> <i>Schizoblastosporion</i> <i>Sterigmatomyces</i> <i>Symposiumyces</i> <i>Trichosporon</i> <i>Trigonopsis</i>

1.3.6. Isolement des levures et identification

Différents milieux gélosés peuvent être utilisés, ces milieux sont rendus sélectifs vis à vis des bactéries par acidification à pH 4 ou 3,5. Toutes fois, cette sélectivité est sans effet sur les bactéries acidophiles et sur les moisissures; dans ce cas, seuls des antibiotiques et des antifongiques peuvent inhiber leurs développements (De Jong et Put, 1980).

Des milieux organiques complexes sont employés, contenant des ingrédients comme l'extrait de malt, l'extrait de levure, la peptone en combinaison avec le glucose (Hagler et Mendoca, 1981).

L'identification des levures est basée à la fois sur l'examen et la détermination des caractères cultureux, morphologiques, sexuels et physiologiques (Guiraud, 1998). Elle ne peut s'effectuer que sur une souche en culture pure, préalablement isolée sur un milieu gélosé pour levures (Bouix et Leveau, 1991).

1.3.6.1. Etude des caractères cultureux

Cette étude est réalisée à partir d'ensemencement en milieu liquide et solide, dont le but est de déterminer la zone de la culture et son aspect général (milieu liquide) et d'examiner l'aspect, la forme, la couleur et la consistance des colonies (milieu solide) (Guiraud, 1998).

1.3.6.2. Etude des caractères morphologiques et cellulaires

○ Morphologie cellulaire normale et mode de multiplication végétative

Ces caractères sont examinés sur des préparations microscopiques, permettant de définir la morphologie des cellules, leur arrangement et le mode de reproduction végétative (Bouix et Leveau, 1991).

○ Aptitude à la Filamentation

Dans certaines conditions de culture, les levures peuvent donner des formes mycéliennes qui sont parfois mises en évidence par un examen microscopique. La recherche systématique de l'aptitude à la filamentation d'une souche doit cependant s'effectuer sur un milieu spécifique comme le milieu PDA (Guiraud, 1998).

○ *Etude de la sexualité*

La reproduction sexuée est à la base de la distinction des genres (Kreger-Van-Rij, 1984). La formation d'ascospores est un caractère très informatif pour l'identification des levures. L'observation de la forme de l'asque, de la forme et le nombre des ascospores, apportent des éléments souvent caractéristiques d'espèces ou de genres (Larpen, 1991).

○ *Morphologies particulières*

Dans des milieux pauvres et sous tension d'oxygène réduite, l'observation des chlamydospores et des ballistospores est possible, elle s'effectue à partir de milieux spécifiques (Guiraud, 1998).

1.3.6.3. Etude des caractères biochimiques et physiologiques

Selon Kreger-Van-Rij (1984) et Lodder (1971), l'identification des levures est basée essentiellement sur la fermentation et l'assimilation de différents substrats carbonés et azotés.

○ *Fermentation des sucres*

Cette étude a pour but de tester la possibilité des levures à fermenter les sucres ; sa mise en évidence se fait généralement dans un liquide, par piégeage du dioxyde de carbone produit dans un tube de Durham (Larpen, 1991).

○ *Utilisation des substrats carbonés*

Il s'agit d'étudier les possibilités d'oxydation des différentes sources de carbone. Des hexoses, des pentoses, des di et tri saccharides, des polysaccharides, des alcools, des acides organiques et des hétérosides peuvent être ainsi testés (Bouix et Leveau, 1991).

○ *Utilisation des substrats azotés*

Les levures assimilent généralement l'ammonium, les peptones, les acides aminés et parfois l'urée. Cependant, certaines utilisent d'autres sources azotées comme les nitrates, l'éthylamine, la cadaverine, etc.; propriété exploitable pour leur identification (Guiraud, 1998).

1.3.7. Applications des levures en biotechnologie

Les levures ont été utilisées par l'homme depuis des millénaires sans le savoir, en particulier dans la fabrication des boissons alcoolisées et de pain (Bouix et Leveau, 1991).

Au cours de la préparation du pain, la levure se développe en aérobiose. Ce type de développement, augmente la production de CO₂ et diminue l'accumulation d'alcool ; ce qui donne la texture légère de nombreux pains et les traces de fermentation contribuent au goût final (Prescott *et al.*, 2007). Ce pendant, en conditions anoxiques, les levures dirigent leur métabolisme vers la fermentation avec une production significative d'alcool (Madigan et Martinko, 2007).

Au-delà de leur importance en panification et en brasserie, les levures sont utilisées pour leurs cellules elles mêmes ou pour les composés extraits de ces cellules (Tableau 5).

La transformation du sucre en alcool pour la production de biocarburant, se fait grâce à la fermentation éthanolique à partir de plantes cultivées riches en sucre ou en amidon comme la canne à sucre, la betterave sucrière, le maïs ou le blé. Selon le degré de transformation, plusieurs dérivés peuvent être obtenus comme le bioéthanol, qui est produit par la fermentation de sucres simples ou de l'amidon hydrolysé grâce à des levures du genre *Saccharomyces*. L'éthanol ainsi obtenu, peut remplacer partiellement ou totalement l'essence dans les moteurs à explosion et peut servir de complément au gasoil (Anonyme, 2007).

Dans la fabrication d'un fromage, l'action des levures commence dès les premières heures de l'égouttage et se poursuit pendant tout l'affinage (Jacobsen et Poulsen, 1995 ; Leclercq-Perlat *et al.*, 2004). Elles contribuent au développement des qualités organoleptiques du fromage par leurs implications aux phénomènes tels que la protéolyse, la lipolyse, la consommation d'acide lactique et la fermentation du lactose (Addis *et al.*, 2001).

L'industrie alimentaire étant constamment en recherche de développement de nouveaux produits, les levures présentent de nouvelles pistes d'exploitation (Mansour, 2009).

La levure diététique, vendue comme complément alimentaire est riche en vitamine B et en protéines, mais est carencée en acides aminés soufrés (Perry *et al.*, 2004). Elle peut être par exemple ajoutée à la farine de blé ou de maïs pour augmenter la valeur nutritionnelle (Madigan et Martinko, 2007).

Tableau 5 :Utilisation des levures et de leurs produits

Utilisations	Quelques exemples
Production de levures	Levure de boulanger (fabrication du pain) Levure sèche (supplément nutritionnel humain et animal) Extrait de levure (milieux de culture de microorganismes) Vitamines B et D
Produits des levures	Enzymes: invertase, galactosidase (Industrie agroalimentaire) Produits chimiques pour la recherche : ATP, NAD ⁺ , ARN
Produits de fermentation de levure	Ethanol (chimique, industriel, carburant), Glycérol

Enfin, les bonnes connaissances de la biologie moléculaire des levures et la mise au point de techniques de génie génétique, permettant de programmer les levures de façon qu'elles expriment des protéines humaines et animales recombinantes ; constituent une grande réussite des biotechnologies surtout d'intérêt médical (par les productions d'enzymes, d'hormones peptidiques, de facteurs de croissance, d'hémoglobine, de ferritine, l'érythropoïétine, etc.) (Bouix et Leveau, 1991 ; Edelstein, 2002).

1.4.L'activité antimicrobienne des levures

1.4.1.Généralités

Alors que les antibiotiques et les bactériocines ont été découverts dans la première moitié du vingtième siècle, il a fallu attendre les années soixante pour qu'un principe équivalent soit mis en évidence chez les levures (Pommier, 2003). C'est ainsi, en 1963 que Bevan et Makover furent les premiers, à constater que certaines souches de *Saccharomyces cerevisiae* pouvaient tuer d'autres levures de la même espèce (Bevan et Makover, 1963; Polonelli *et al.*, 1991). Ils supposèrent que ces levures « tueuses » ou « killer » émettaient une toxine entraînant la mort des souches y étant sensibles et déterminèrent ainsi trois phénotypes pour un système « killer ».

- Killer (k) : la souche produit la toxine et y est résistante.
- Neutre (N) : la souche ne produit pas la toxine et y est résistante.
- Sensible (S) : la souche ne produit pas la toxine et y est sensible.

Cet effet, a été défini le phénomène « killer » et la substance, a été nommée « la toxine killer » (Izgu *et al.*, 2004 ; Polonelli et Conti, 2009) .

Le phénomène killer est très commun, il peut être trouvé aussi bien chez les isolats naturels de levures que dans des collections de laboratoires (Xianghong *et al.*, 2007).

Certains d'entre eux ont été isolés d'une grande variété de processus de fermentations d'aliments (Liovent *et al.*, 1997; Regodon *et al.*, 1997 ; Gulbinienė *et al.*, 2004) ; d'autre à partir d'environnements cliniques, industriels et agronomiques (Sawant *et al.*, 1989; Santos *et al.*, 2000; Marquina *et al.*, 2002).

Ce phénotype n'est pas limité au genre *Saccharomyces*. Il se trouve également chez d'autres levures comme *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Torulopsis*, *Ustilago*, *Williopsis* et *Zygosaccharomyces* (Kurtzman, 1984; Polonelli et Morace, 1986; Schmitt et Breinig, 2002).

Les levures killer se caractérisent par la production et la sécrétion dans le milieu, de substances de natures protéiques ou glycoprotéiques (Schmitt et Reiter, 2008), appelées protéines ou toxines killer (Wickner, 1986 ; Radler et Schmitt, 1987) ; ayant une action létale sur les souches de levures sensibles de la même espèce ou d'autres espèces (Bussey *et al.*,

1990 ; Wikner, 1996) sans contact direct de cellule à cellule (interaction indirecte) (Pommier, 2003). Ces substances peuvent exercer des effets antibactériens et antifongiques (Suzzi *et al.*, 1995 ; Magliani *et al.*, 1997).

En effet, plusieurs rapports suggèrent que les toxines killer des levures montrent une activité contre les bactéries, mais on sait très peu sur le mode d'action des antibactériens des levures killer (Ochigava *et al.*, 2010).

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 (Breinig *et al.*, 2002 ; Vadasz *et al.*, 2003; Ivanovska et Hardwik, 2005) ; mais elles restent sensibles aux toxines produites par les autres souches (Izgu *et al.*, 2005).

Il a été établi que la production de toxines peut constituer un grand avantage, en cas de compétition avec des souches sensibles dans les conditions de limitation nutritive (Young et Yagiu, 1978 ; Starmer *et al.*, 1987; Abranches *et al.*, 1998).

Les levures killer profitent des substances nutritives libérées par les cellules sensibles (Gonzales-Pastor *et al.*, 2003) et peuvent dominer dans quelques temps leurs habitats naturels (Schmitt et Reiter, 2008).

1.4. 2. Origines de l'activité antimicrobienne

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 (Wickner, 1996 ; Vadasz, 2000) et un virus d'aide « *helper* » assurant la reproduction de l'ARN viral (Schmitt et Reiter, 2008). La protéine killer peut être aussi codée par des plasmides à ADN linéaire double brin (Gunge *et al.*, 1981; Tommasino, 1991) ou un chromosome (Goto *et al.*, 1990; Kimura *et al.*, 1993; Suzuki, 1999).

1.4.3. Mode d'action de la toxine killer

Les produits antimicrobiens sécrétés par les levures ne sont pas communs (Bilinski *et al.*, 1985). Dans les dernières années, les toxines killer sont classées en 11 groupes (k1-k11) en fonction de leurs spectres d'actions et leurs interactions avec d'autres levures killer (Wickner, 1979; Tipper et Bostian, 1984).

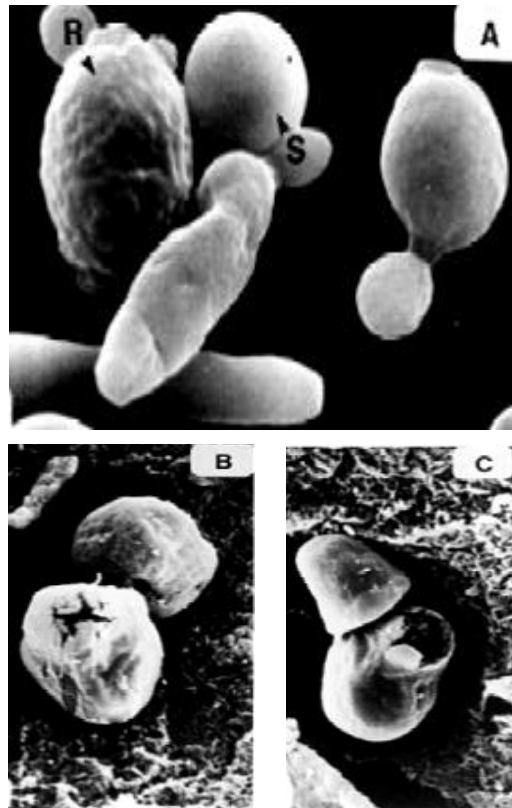


Figure 7 : Observations de levures au microscope électronique à balayage.

(Vadasz *et al.*, 2000)

A : Cellules intactes (*S*) et cellules endommagées par la toxine *K2* (*R*).

B : Cellule endommagée présentant des fissures.

C : Cellule endommagée présentant des pores.

1.4.3.1. Production

La cinétique de production des toxines killer s'est avérée couplée à la croissance des levures productrices (Alfenore, 1999; Barandica *et al.*, 1999).

1.4.3.2. Fixation et action toxique

La première étape de l'action toxique des protéines killer, consiste en une fixation sur la paroi cellulaire des cellules sensibles cibles. Elle se fait par formation d'une liaison (1-6)- β -D-glucane (Hutchins et Bussey, 1983).

Le nombre de sites récepteurs n'est pas abordé dans la littérature, sauf par Bussey *et al.* (1979) qui avancent le chiffre de 10^7 sites par cellule pour une souche sensible *Saccharomyces cerevisiae*. Les liaisons protéine-membrane qui en résultent provoquent à la fois des perturbations au niveau du métabolisme cellulaire et la formation de pores sur la membrane et sur la paroi (Figure 7). Ceci conduit notamment à un déséquilibre ionique entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule sensible (Skipper et Bussey, 1977), à la fuite de composés intracellulaires (ATP, K⁺), à l'acidification du cytoplasme et à l'inhibition des synthèses protéiques (De la Pena *et al.*, 1981). L'état énergétique des levures cibles est parallèlement modifié et celles-ci finissent par mourir.

Les mécanismes d'action à l'origine de l'effet killer sont plutôt variés (Guyard *et al.*, 2001); les toxines produites peuvent également :

- Bloquer la réplication de l'ADN (Schmitt *et al.*, 1996);
- Arrêter le cycle cellulaire dans la phase G1 (Stark *et al.*, 1990; Einfeld *et al.*, 2000; Heilignestein *et al.*, 2006).

1.4.4. Principales applications des levures killer

Les levures killer sont étudiées en vue de leurs exploitations pour des applications potentielles (Van Vuren et Wingfield, 1986; Boone *et al.*, 1990; Chen *et al.*, 2000; Ciani et Fatichenti, 2001) :

- Dans les fermentations industrielles, pour combattre les levures indésirables de contamination (Michalcakova *et al.*, 1993).
- Le contrôle biologique de levures qui perturbent la conservation des produits alimentaires (Lowe *et al.*, 2000).
- La protection des plantes contre les maladies fongiques (Droby *et al.*, 1989; Wisniewski *et al.*, 1991; McGuire, 1994) : *Candida sake* protège les pommes et les poires contre *Penicillium expansum* et *Botrytis cinerea* (De Curtis *et al.*, 1996 ;Vinas *et al.*, 1998 ; Kurtzman et Droby, 2001) ; la levure *Pichia guilliermondii* est efficace contre les pathogènes *Botrytis* et *Penicillium* (Mansouri, 2006).
- Comme une alternative à l'utilisation de fongicides chimiques dans le contrôle biologique de maladies de post-moisson (Janisiewicz, 1994 ; Nunes *et al.*, 2002) : *Candida oleophila* est utilisée dans la lutte contre les pathogènes fongiques transmis par le sol, elle est actuellement commercialisée sous le nom (Aspire) pour le contrôle du dépérissement d'oranges et de pommes de conservation (Mansouri, 2006).
- Nouveaux agents antimicrobiens dans le traitement d'infections humaines et animales (Buzzini *et al.*, 2004 ; Xianghong *et al.*, 2007).
- Les propriétés antifongiques et antilevuriennes des protéines killer, leur confèrent également des potentialités dans le domaine de la protection et du traitement des infections par des organismes pathogènes ; en particulier contre la levure *Candida albicans* (Walker *et al.*, 1995).

2. Matériel et méthodes

2.1. Matériel biologiques

2.1.1. Souches à tester

Les souches à tester pour la production de substances à activités antimicrobiennes, sont des souches de levures; isolées à partir des sols sahariens (ville de M'GHEIER dans la wilaya de BISKRA ; située au Sud-est Algérien) au niveau du laboratoire de Génie Microbiologiques et Applications: souches S6, S10, S18 et S19 ; conservées sur le milieu de culture YPGA (annexe 1) en gélose inclinée dans des tubes à essai à 4°C.

2.1.2. Souches tests

Les souches cibles, utilisées pour l'évaluation des activités antimicrobiennes des souches levuriennes; sont de nature clinique, récupérées au près du Centre Hospitalo-universitaire (CHU) Benbadis de CONSTANTINE.

Il s'agit des bactéries *Escherichia coli* 113A et *Klebsiella pneumoniae* 112, conservées sur le milieu Trypticase Soy Agar (TSA) à 30°C ; *Staphylococcus aureus* 118 maintenue sur le milieu de Chapman à 30°C ; la levure *Candida albicans* conservée sur la gélose de Sabouraud (annexe 1) à 30°C.

En plus des souches pathogènes, nous avons également testé des souches de collection : *Escherichia coli* ATCC 25922 ; *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

2.2. Méthodes et techniques

2.2.1. Recherche des activités antimicrobiennes

2.2.1.1. Préparation des levures à tester

Les quatre souches de levure à tester, sont repiquées sur la gélose de Sabouraud pH 5,6 puis, les boîtes sont incubées à 30°C pendant 24 h. Deux à trois colonies de chaque cultures, sont inoculées dans le bouillon YPG_(a) (annexe 1) ajusté à pH 4,5 par l'acide citrique 0,1M et le Na₂HPO₄ 0,2M (Polonelli et Conti, 2009). Les suspensions levuriennes sont ensuite placées dans une étuve réglée à 28°C d'une durée variable entre 72 h et 7 jours.

2.2.1.2. Préparation des filtrats

Après ces périodes d'incubations, les cellules de levures sont éliminées par centrifugation à 1500xg et 4°C pendant 10 min d'après Polonelli et Conti (2009) et les surnageants sont récupérés par filtration à travers le papier Whatman n°2.

2.2.1.3. Tests des activités antimicrobiennes

La recherche des métabolites antibactériens et anti *Candida albicans* est effectuée par deux tests :

- Premier test

A partir des cultures de 24 h à 30°C des souches cibles sur leur milieux appropriés, des suspensions microbiennes dont la turbidité est équivalente à 0,5 McFarland (annexe 2) sont préparées dans un volume de 10 ml du bouillon YPG_(a) pH 4,5 puis, incubées pendant 18 h à 25°C et sous agitation de 120 rpm. 1 ml de chaque culture est ensuite dilué dans 10 ml du bouillon YPG_(a) neuf, à pH 4,5.

1 ml de toute suspension diluée est transféré dans 20 ml de la gélose liquide YPG additionnée de 0,003% de bleu de méthylène (milieu YPGA-MB) (annexe 1) refroidit (45°C) et tamponné à pH 4,5 par l'acide citrique 0,1M et le K₂HPO₄ 0,2M. Le mélange est ensuite coulé dans une boîte de Pétri pour obtenir une suspension Agar-souche test ; conformément à la technique de Polonelli et Conti (2009). Les boîtes sont laissées à la température ambiante.

- Deuxième test :

Des suspensions en eau physiologique stérile (0,9% de NaCl) (annexe 2) de chaque souche test, sont préparées à partir d'une culture de 18 h à 30°C sur leurs milieux favorables. La concentration microbienne est ajustée à une valeur de 0,5 sur l'échelle de McFarland.

Les micro-organismes tests sont ensemencés par écouvillons stériles sur le milieu Muller-Hinton pour les bactéries tests et sur la gélose de Sabouraud pour la levure *Candida albicans*. Les boîtes sont laissées à température ambiante.

Après séchage à la température ambiante, pour permettre à la gélose de se solidifier ; des disques stériles en papier whatman de 6 mm de diamètre, imbibés avec 20µl des surnageants à tester (Brown *et al.*, 1993 ; De Oliva Neto *et al.*, 2004), sont aseptiquement déposés à l'aide d'une pince stérile à la surface des milieux YPGA-MB, Muller-Hinton et la gélose de Sabouraud, préalablement ensemencés avec les souches tests.

Les boites sont laissées deux heures à 4°C pour permettre une pré-diffusion du contenu de chaque disque (Chabbert et Terrial, 1963), puis incubées à 25°C (boites du premier test) (Polonelli et Conti, 2009) et 30°C (boites du deuxième test), pendant 2 à 3 jours selon chaque micro-organisme test (De Oliva Neto *et al.*, 2004). Successivement, la lecture est réalisée et toutes zones d'inhibition de croissance autour des disques même de faible diamètre, est considérée comme résultat positif. Les manipulations sont répétées trois fois pour s'assurer du bon déroulement de la méthode.

2.2.2. Identification du genre de la souche de levure sélectionnée S19

L'identification est effectuée sur une des souches de levures considérée à activité antimicrobienne intéressante. Tout le procédé est réalisé selon les techniques décrites par Lodder (1971) et Kreger-Van Rij (1984).

2.2.2.1. Etude des caractères cultureux

La levure sélectionnée est ensemencée en milieu YPG_(b) (annexe 1) liquide et gélifié puis incubée 3 jours à 25°C. Les cultures sont laissées une semaine à la température ambiante et examinées quotidiennement ; toutes les observations sont notées (Larpent, 1997).

2.2.2.2. Etude des caractères morphologiques et cellulaires

○ Morphologie cellulaire normale et mode de multiplication végétative

Un frottis est préparé à partir d'une culture jeune de 24 à 48 h de développement en milieu solide puis examiné au microscope, les formes observées sont mentionnées (Larpent, 1991).

○ Aptitude à la filamentation

Pour ce test, la levure est ensemencée en une strie longitudinale sur une lame recouverte de milieu PDA (annexe 1) et placée dans une boîte de Pétri en verre contenant un peu d'eau distillée stérile pour éviter la dessiccation du milieu ; recouvrir la lame d'une lamelle et incubé une semaine à 25°C. Après cette période d'incubation, la préparation est examinée au microscope (Larpen, 1997).

○ Caractéristiques sexuelles

La reproduction sexuée est influencée par les conditions d'environnement : température, aération, composition du milieu. Lorsque les conditions sont défavorables, les levures cessent de se multiplier par bourgeonnement ; certaines cellules se transforment en asques contenant des ascospores. Afin de mettre en évidence le pouvoir ascosporigène de notre levure, trois milieux de culture sont simultanément utilisés : le milieu de Mc Clary, de Fowells et de Gordkova (annexe 1). A partir d'une culture en phase exponentielle de 24 h sur milieu YPGA, la levure est ensemencée en surface sur les milieux de sporulation conditionnés en tubes inclinés puis incubée pendant une semaine à un mois à 25°C. Des observations microscopiques sont effectuées régulièrement afin de surveiller les cultures (Larpen, 1991).

2.2.2.3. Tests biochimiques et physiologiques

○ Fermentation des sucres

L'étude du métabolisme des glucides par la voie fermentaire, est réalisée en tube de Durham. Les différents sucres testés sont ceux cités par Larpen et Larpen (1985) et Larpen (1991) et sont : glucose, galactose, maltose, saccharose, lactose et le raffinose. Tous les sucres sont utilisés à la concentration de 2% dans 10 ml de milieu de fermentation (annexe 1), composé du carbohydrate à tester comme seule source de substance fermentescible. En présence de sources azotées (peptone, extrait de levure) et de facteurs de croissance.

Après incubation à 25°C, la lecture se fait sur une période de 15 jours à raison d'une observation tous les deux jours. La fermentation se traduit par l'observation d'un dégagement gazeux dans la cloche de Durham.

○ Assimilation des composés azotés

La source d'azote testée est le KNO_3 . Le milieu pour l'assimilation des nitrates (annexe 1) est distribué en boîte de Pétri. 1 ml d'une suspension de la levure dans l'eau physiologique est ajouté, le tout est bien homogénéisé. Une fois que le milieu a pris en masse, un disque stérile en papier Whatman imbibé d'une solution à 1% du composé à tester est déposé en surface ; la peptone est utilisée comme témoin positif et la boîte est incubée à 25°C deux à 3 jours (Larpent, 1997).

2.2.3. Etude de l'influence de la température sur la production des substances antimicrobiennes

2.2.3.1. Préparation des inocula des micro-organismes tests

Chaque micro-organisme test est inoculé dans l'eau physiologique stérile après une culture de 18 h à 30°C sur son milieu gélosé ; la suspension microbienne ainsi préparée, est ajustée à une turbidité qui correspond au 0.5 McFarland.

2.2.3.2. Préparation des surnageants

La levure sélectionnée est repiquée sur la gélose de Sabouraud pH 5,6 puis, incubée à 30°C pendant 24 h. A partir de cette culture, des tubes contenant 10 ml de bouillon YPG_(a) ajusté à pH 4,5 par l'acide citrique 0,1M et le Na_2HPO_4 0,2M ; sont ensemencés puis incubés aux températures 30 ; 40 et 45°C pendant 72 h.

Après incubation, les cultures sont centrifugées à 1500xg et 4°C pendant 10 min et les surnageants sont récupérés par filtration au papier Whatman n°2.

2.2.3.3. Test des activités antimicrobiennes

Des disques stériles en papier Whatman de 6 mm de diamètre imbibés de 20µl des surnageants à tester, sont déposés à la surface des boîtes de Pétri contenant le milieu Muller-Hinton préalablement ensemencé par écouvillonnage avec les bactéries tests et la gélose de Sabouraud pour la levure *Candida albicans*. Les boîtes sont placées pendant 2 h à 4°C puis incubées à 30°C pendant 48 à 72 h. Les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés au millimètre près.

2.2.4. Etude de l'influence du pH sur la production des substances antimicrobiennes

2.2.4.1. Préparation des souches tests

Des suspensions microbiennes d'une densité optique égale à 0.2 à une longueur d'onde de 620 nm dans l'eau physiologique stérile sont préparées à partir des cultures de 18 h à 30°C.

2.2.4.2. Préparation des surnageants

Le bouillon YPG ajusté aux valeurs de pH 3; 5 et 7 par l'acide citrique 0,1M et le Na_2HPO_4 0,2M conditionné dans des tubes à essai à raison de 10 ml par tube ; est inoculé par la souche sélectionnée préalablement cultivée sur la gélose de Sabouraud pH 5,6 pendant 24 h à 30°C. Les tubes sont incubés à 28°C pendant 72 h.

Les surnageants sont récupérés après centrifugation à 1500xg et 4°C pendant 10 min, suivie d'une filtration au papier Whatman n°2.

2.2.4.3. Test des activités antimicrobiennes

Ce test est réalisé par la technique des disques décrite plus haut. Les boîtes sont ensuite examinées et les résultats sont notés.

2.2.5. Identification préliminaire de la (les) substance(s) bioactive(s)

Cette étude est effectuée par deux étapes réalisées en parallèle :

2.2.5.1. Effet du chauffage sur le surnageant de la culture

La souche de levure sélectionnée est repiquée sur la gélose de Sabouraud et incubée à 30°C pendant 24 h. Un volume de 10 ml du bouillon YPG_(a) pH 4,5 estensemencé à partir de cette culture, ensuite incubé à 28°C pendant 72 h.

Après cette période d'incubation, la culture est centrifugée à 1500xg et 4°C pendant 10 min. Le surnageant est récupéré par filtration puis, répartis dans deux tubes à essai stériles ; le premier tube est chauffé à 90°C pendant 20 min (De Oliva Neto *et al.*, 2004) ; le second est utilisé comme tube contrôle pour le test des activités antimicrobiennes, réalisé par la technique des disques décrite auparavant.

2.2.5.2. Chromatographie sur couche mince

○ *Principe*

La chromatographie sur couche mince est avant tout un outil d'analyse rapide (Moore et Dalrymple, 1976), qui utilise des phases stationnaires fixées sur des supports rigides maintenus verticaux dans une cuve à chromatographie (Hainque *et al.*, 2008).

Cette technique est basée sur des propriétés d'adsorption ou de partition ; la phase mobile composée d'un solvant pure ou d'un mélange de solvants, se déplace par capillarité le long de la phase stationnaire. Chaque constituant du mélange à analyser possédant un coefficient d'adsorption propre et une affinité déterminée pour le solvant, progresse avec une vitesse qui lui est caractéristique (Sine, 2003).

○ *Mise en œuvre*

a- Préparation des plaques

Une suspension homogène de la phase stationnaire est préparée. Dans cette étude, nous avons utilisé le gel de silice (60F₂₅₄).

A l'aide d'un dispositif approprié, le mélange est soigneusement étalé sur des plaques en verre (15x5 cm).Après séchage, la phase stationnaire devient prête à l'utilisation.

b-Dépôt des échantillons

Les échantillons à analysés sont : le surnageant de la culture levurienne obtenus après 72 h d'incubations à 28°C dans le milieu YPG_(a) pH 4,5 ; préalablement récupéré par centrifugation suivie d'une filtration comme on l'a exposé précédemment et le milieu de culture YPG_(a) non ensemencé préparé et incubé dans les mêmes conditions.

Ces échantillons sont déposés de façon ponctuelle avec des capillaires à une distance de 2 cm de l'extrémité inférieure de la plaque ; plusieurs dépôts du même échantillon sur le même point ont été réalisés, alternés par un séchage à l'aide d'un séchoir pour obtenir des produits séparés en grandes quantités.

c-Développement des plaques

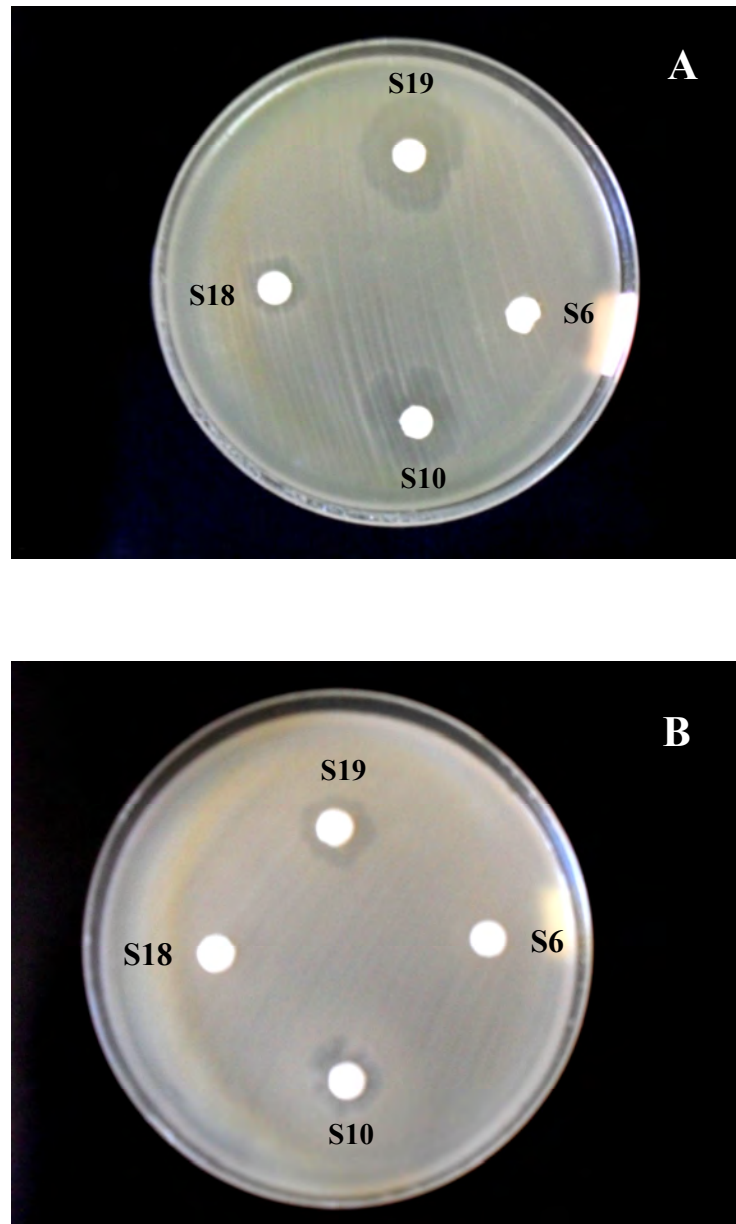
Les plaques ainsi préparées, sont introduites dans la cuve préalablement saturée par les vapeurs de solvants de la phase mobile composée de n-butanol - éthanol - acide acétique - eau (30 :70 :5 : 20) (Li *et al.*, 2006).La migration est arrêtée lorsque le front du solvant atteint une distance de 1 cm du bord supérieur de la plaque.

d- Révélation

Après migration, la plaque est retirée de la cuve puis séchée à l'air libre. On procède ensuite à la révélation, en pulvérisant à la surface du chromatogramme, un réactif convenable qui fait apparaître les substances recherchées sous forme de taches colorées : solution de Ninhydrine à 0,3% (annexe 2). Après pulvérisation, la plaque est séchée par un séchoir.

Les spots colorés sur la plaque de gel de silice, sont grattés et remis en suspension dans de l'eau distillée stérile. Après centrifugation à 15 000 x g pendant 10 min, les surnageants sont récupérés puis testés pour leurs effets antimicrobiens par la méthode décrite précédemment (Li *et al.*, 2006).

3. Résultats et discussion



Photographie 1 : Test d'activité sur le milieu Muller-Hinton contre la bactérie test *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, après incubation des souches de levures (S6, S10, S18 et S19) dans le milieu YPG_(a) à 28°C.

A : pendant 72 heures ; B : pendant 7 jours

3.1. Recherche des activités antimicrobiennes

Cette étude est menée dans le but de tester le potentiel antimicrobien des souches levuriennes isolées des sols sahariens. La mise en évidence de cette activité est réalisée par la technique des disques en papier, qui est une méthode de diffusion en milieu gélosé. Pour cela, trois milieux de culture sont utilisés à fin de tester l'action des substances bioactives.

Parmi les quatre souches de levures testées, trois souches présentent une activité antibactérienne sur une seule bactérie cible à Gram négatif *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603.

Les souches de levures actives contre cette bactérie sont S10, S18 et S19 incubées dans le milieu YPG_(a) à 28°C pendant 72h (Photographie 1A) et les souches S10 et S19 après 7 jours d'incubation dans le même milieu et à la même température (Photographie 1B). Les souches S10 et S19 ont un pouvoir antibactérien important vis-à-vis de la souche de *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 (Photographie 1 A et B).

Ces isolats de levures ne présentent aucune activité vis-à-vis des autres bactéries tests (*Escherichia coli* 113 A, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* 112, *Staphylococcus aureus* 118 et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923).

Aucun effet inhibiteur à l'égard de la levure *Candida albicans* n'a été détecté pour l'ensemble des isolats de levures testés.

Seule la gélose de Muller-Hinton a permis de détecter l'effet inhibiteur des surnageants des cultures de levures isolées. Les résultats sont consignés dans les tableaux 6 et 7.

Ces mêmes souches deviennent complètement inactives lorsqu'elles sont testées sur le milieu YPGA-MB. Ce milieu largement employé, est recommandé par la plupart des auteurs (Buzzini et Martini, 2001; Buzzini *et al.*, 2003; Satora et Tuszynski, 2005; Sangorrin *et al.*, 2007; Xianghong *et al.*, 2007 ; Hernandez *et al.*, 2008 ; Polonelli et Conti, 2009) pour la mise en évidence de l'action inhibitrice des levures vis-à-vis des bactéries ou des souches fongiques.

Tableau 6 : Activité antimicrobienne des levures testées après 72 h d'incubation à 28°C dans le milieu YPG_(a).

Souches tests	Souches de levures productrices de substances antimicrobiennes			
	S6	S10	S18	S19
<i>Candida albicans</i>	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> 113A	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 112	-	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	-	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i> 118	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	-	-	-	-

Tableau 7 : Activité antimicrobienne des levures testées après 7 jours d'incubation à 28°C dans le milieu YPG_(a).

Souches tests	Souches de levures productrices de substances antimicrobiennes			
	S6	S10	S18	S19
<i>Candida albicans</i>	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> 113A	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 112	-	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	-	+	-	+
<i>Staphylococcus aureus</i> 118	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	-	-	-	-

Nous avons également testé cette activité sur le milieu Muller-Hinton préconisé pour les tests d'activité antibactérienne, parce qu'il permet une meilleure diffusion des substances bioactives et la gélose de Sabouraud pour la recherche de l'activité anti *Candida albicans*.

L'activité antibactérienne de certains genres de levures a été aussi démontrée par Polonelli et Morace (1986) et De Oliva Neto *et al.* (2004).

Les résultats négatifs enregistrés envers les autres bactéries tests peuvent être probablement dû à la résistance de ces dernières aux antibiotiques, en particulier celles du CHU de Constantine où des infections nosocomiales, sont traitées par une antibiothérapie à large spectre pour laquelle, ces souches ont développé une résistance (Annexe 3). Ces résultats négatifs des levures isolées sur les microorganismes test peuvent être également expliqués par l'absence de récepteurs spécifiques aux substances bioactives produites par ces levures chez ces microorganismes. Cependant, d'après Heard et Fleet (1987), l'utilisation des conditions optimales ne garantit pas un criblage efficace des levures killer : parce que la caractéristique principale de leurs substances bioactives est la spécificité. Par conséquent, le choix de la souche cible est essentiel pour la détection des levures à activité antimicrobienne.

Une autre hypothèse plausible, est que la quantité de ces substances synthétisées par les isolats de levures ne soit pas suffisante pour atteindre le seuil d'inhibition, à savoir la CMI de chaque microorganisme test utilisé (De Oliva Neto *et al.*, 2004).

Par ailleurs, ces souches cibles, peuvent produire des substances hydrolytiques ou dénaturantes qui inhibent l'action des agents bioactifs des isolats de levures même si ceux-ci sont produits en quantités suffisamment importantes (Perry *et al.*, 2004 ; Madigan et Martinko, 2007).

Une équipe de chercheurs (Vadkertiova et Slavikova, 2007) approuve nos résultats par une démonstration qui étaye une plus faible activité chez les genres levuriens isolés du sol.

D'autre part, Golubev et Golubeva (2004) rapportent que les souches de levures productrices d'antifongiques sont beaucoup plus fréquentes dans un écosystème où la densité des populations levuriennes est relativement élevée, de sorte que la concurrence est plus intense.

De plus, Spencer et Spencer (1997) ont constaté que les sols arides et pauvres en éléments nutritifs hébergent un faible taux de communautés levuriennes, comparés aux sols humides et riches en nutriments. Ce qui justifie les résultats négatifs obtenus envers *Candida albicans*. Nos résultats trouvent une explication dans les travaux de Buzzini et Martini (2001) qui nous informent de l'existence des souches de *Candida albicans* avec une résistance vis à vis d'un éventail d'antifongiques produits par les levures.

Les résultats de l'activité antibactérienne produite par les souches de levures cultivées sur le milieu YPG_(a) pendant 72h à 28°C (Tableau 8), convergent parfaitement avec ceux exposés par Valerie *et al.* (1995), qui indiquent que les surnageants de cultures de *Candida nodansis*, ont une action inhibitrice importante après trois jours de croissance dans le milieu YPG_(a).

Conformément à Lynn Rowbottom *et al.* (2004), lorsque la période d'incubation est prolongée, l'activité inhibitrice des levures devient faible ou peut être perdue : expliquée par la réduction de la biomasse cellulaire ou la production d'enzymes hydrolytiques extracellulaires pouvant causer la dégradation des molécules bioactives. Cette observation expliquent la diminution du diamètre des halos d'inhibition (souches S10 et S19) ou l'absence d'inhibition (souche S18) après une semaine d'incubation des levures (Tableaux 8 et 9).

La photographie 1, montre que le milieu YPG_(a) favorise la production de substances antibactériennes par les trois isolats étudiés (S10, S18 et S19) après 3 jours d'incubation, période nécessaire pour l'élaboration de ce type de métabolites (Izgu *et al.*, 2004; Xianghong *et al.*, 2007 ; Liu et Tsao, 2009 ; Polonelli et Conti, 2009).

Cette photographie, fait également ressortir que la gélose Muller-Hinton est le meilleur milieu pour tester l'activité antibactérienne. Les résultats positifs obtenus sur ce milieu font l'originalité de notre travail. En effet, aucune référence ne cite l'utilisation de ce dernier pour tester l'activité antibactérienne des levures ; tous les travaux réalisés jusqu'à ce jour, font usage du milieu YPGA-MB.

Tableau 8 : Diamètres (en mm) des zones d'inhibition de la croissance de la bactérie test *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 par les levures testées, après 72 h d'incubation à 28°C dans le milieu YPG_(a).

	S6	S10	S18	S19
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	0	19	12	24

Tableau 9 : Diamètres (en mm) des zones d'inhibition de la croissance de la bactérie test *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 par les levures testées, après 7 jours d'incubation à 28°C dans le milieu YPG_(a).

	S6	S10	S18	S19
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	0	13	0	15

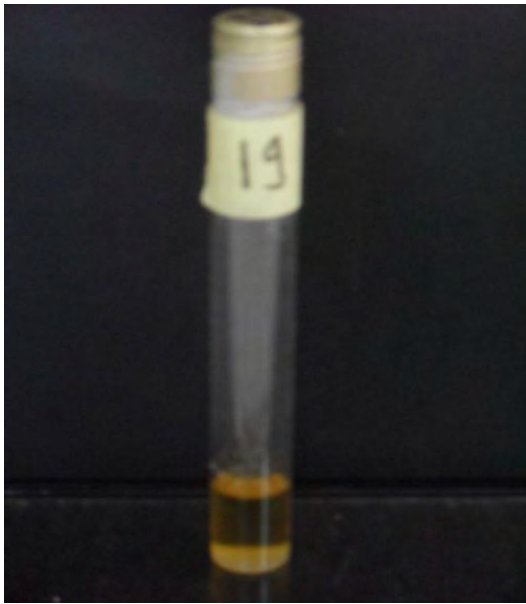
L'activité antibactérienne obtenue sur le milieu Muller-Hinton ; de pH 7,2 - 7,4, laisse supposer que la ou les substances bioactives responsables de cet effet, ne sont probablement pas des toxines killer ; autrement dit, elles ne sont pas de nature protéique ou glycoprotéique. Dans la littérature, l'action de ces dernières n'est observée que dans une gamme étroite de pH allant généralement de 4,2 à 4,8 (Xianghong *et al.*, 2007 ; Hernandez *et al.*, 2008 ; Polonelli et Conti, 2009) , condition offerte dans le milieu YPGA-MB.

Par ailleurs, Polonelli et Morace (1986) et Polonelli *et al.* (1989) suggèrent que l'inhibition observée par les levures pourrait ne pas être dû à des toxines killer, mais également à une variété de produits métaboliques.

Dans un autre registre, Bilinski *et al.* (1985) montrent que les toxines killer sont inactives sur la plupart des bactéries à coloration de Gram négative. Cette indication, ne fait qu'accentuer notre présomption, exception faite pour la bactérie à Gram négatif *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 (Photographie 1 A et B).

En conclusion, ces résultats incitent à sélectionner, le milieu Muller-Hinton et les souches S19 et S10 semblent intéressantes pour l'identification chimique des molécules antibactériennes qu'elles ont produites.

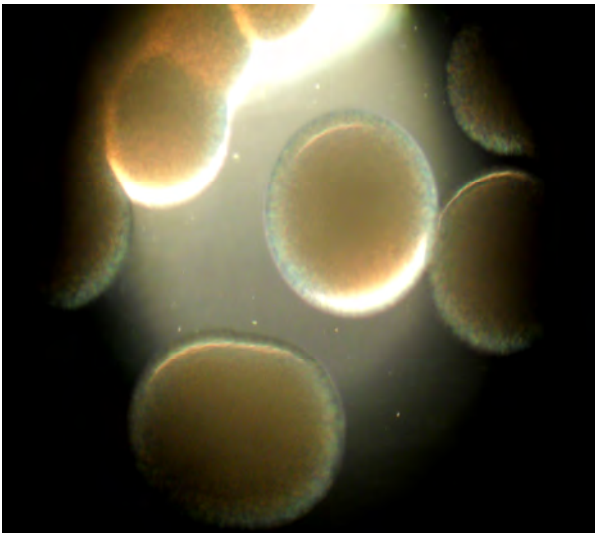
Pour la suite du travail, nous avons criblé la souche S19, car c'est la souche la plus performante dans l'activité antibactérienne.



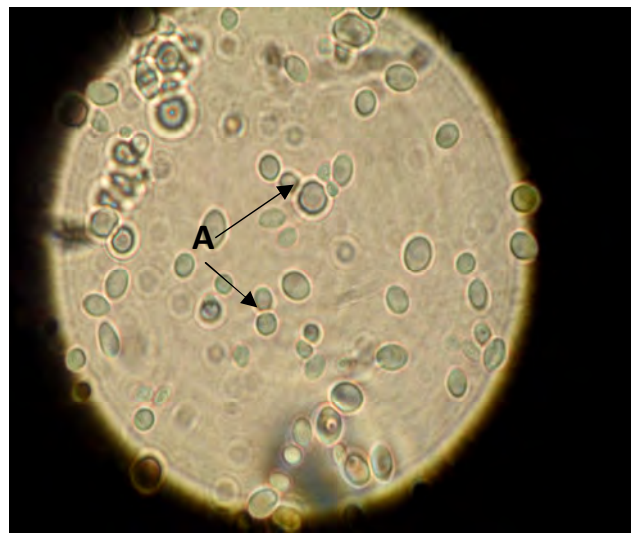
Photographie 2 : Aspect culturel de la souche S19 après 72h d'incubation à 25°C dans le milieu YPG_(b).



Photographie 3 : Aspect macroscopique de la souche S19 après 72h d'incubation à 25°C sur le milieu YPGA.



Photographie 4 : Aspect et contour des colonies de la souche S19 au grossissement X4.



Photographie 5 : Aspect microscopique de la souche S19 (A : bourgeonnement des cellules) au grossissement X100.

3.2. Identification du genre de la souche de levure sélectionnée S19

L'identification du genre de la souche levurienne sélectionnée S19, s'est effectuée selon le procédé de Lodder (1971) et de Kreger-Van-Rij (1984).

• *Etude des caractères culturaux*

L'observation macroscopique des cultures en milieu YPG_(b) liquide et gélosé YPGA, a pu révéler les caractères suivants : la culture en milieu liquide, présente un dépôt poussiéreux avec un trouble superficiel (Photographie 2) ; sur milieu solide, les colonies apparaissent sous forme circulaire de couleur beige clair légèrement opaque, avec une surface lisse, un contour régulier et une taille moyenne (Photographies 3 et 4).

• *Etude des caractères morphologiques et cellulaires*

L'observation microscopique de la souche S19, fait apparaître des cellules de formes sphériques à ovoïdes ; avec une reproduction végétative qui se fait par bourgeonnement monopolaire et bipolaire (Photographie 5).

La souche sélectionnée, montre une filamentation de type pseudomycélienne (Photographie 6) et semble être dépourvue de formes bien définies de spores sexuées.

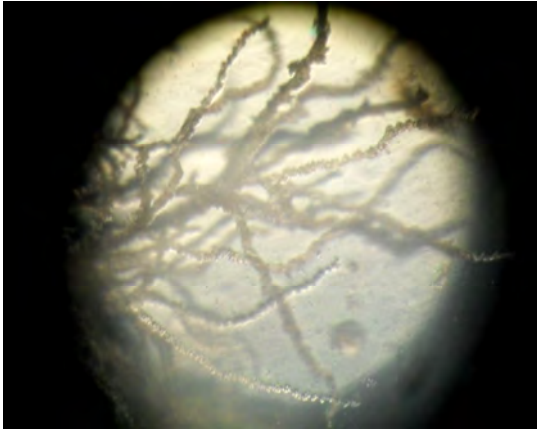
• *Tests biochimiques et physiologiques*

❖ *Fermentation des sucres*

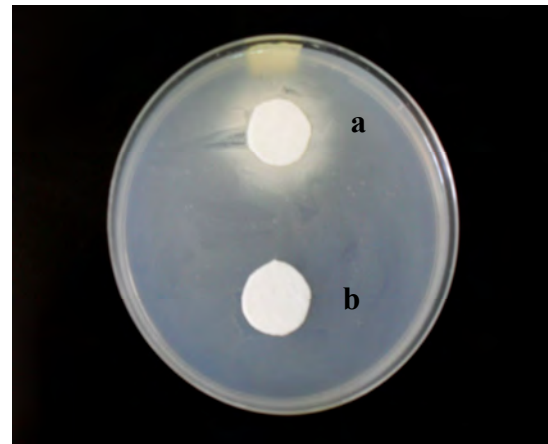
La souche S19 démontre l'attitude à fermenter l'ensemble des substrats glucidiques testés, à des niveaux différents comparés aux tubes témoins. Ces fermentations positives des sucres, se traduisent par la production des gaz dans les cloches de Durham (Photographie 8).

❖ *Assimilation des composés azotés*

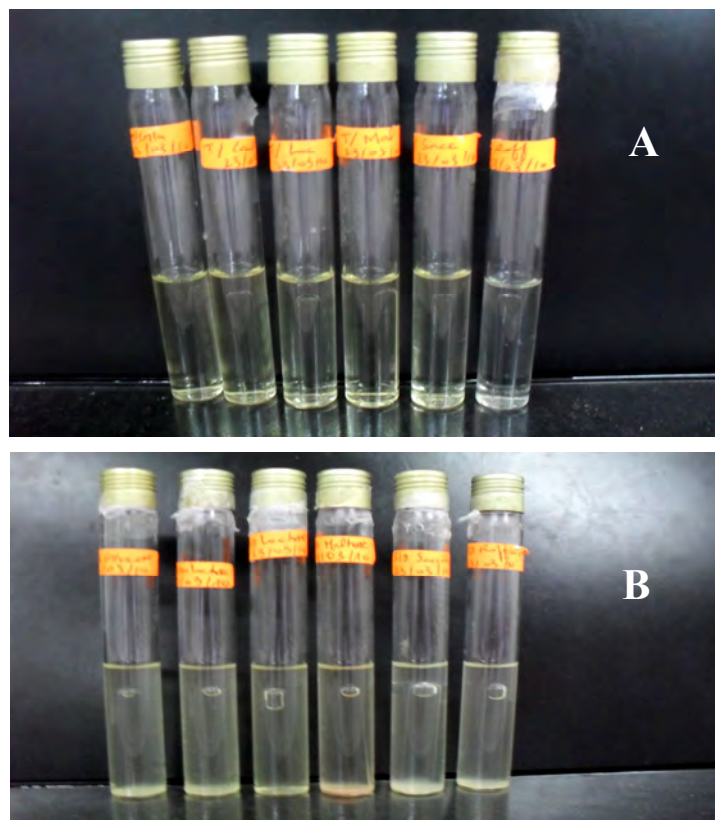
La souche indique une assimilation positive pour la peptone, avec une abondance de colonies autour de ce substrat utilisé comme source d'azote. Par ailleurs, le nitrate de potassium n'a pas été assimilé car aucun développement de colonies n'a été décelé autour de ce dépôt (Photographie 7).



Photographie 6: Aspect de filamentation de la souche S19 après une semaine d'incubation à 25°C sur le milieu PDA grossissement X100.



Photographie 7: Test d'assimilation de l'azote par la souche S19 après trois jours d'incubation à 25°C sur un milieu synthétique (a: peptone ; b: source d'azote).



Photographie 8 : Fermentation des sucres (A : tubes témoins ; B : tubes tests) ; ordre des sucres : glucose -galactose-lactose-maltose-saccharose-raffinose.

L'examen des résultats obtenus, indique que la souche levurienne sélectionnée semble appartenir au genre *Candida* ; selon les clés de détermination de Lodder (1971) et de Kreger-Van-Rij (1984).

Effectivement, le métabolisme fermentaire observé et la formation de pseudomycélium ; coïncident avec les informations rapportées par Oteng-Gyang (1984), Larpent et Larpent (1990) et Larpent (1991).

Par ailleurs, Alexander (1977) et Spencer *and* Spencer (1997) nous informent que ce genre de levure est fréquemment isolé du sol.

De plus, diverses recherches annoncent l'activité antimicrobienne du genre *Candida* (Magliani *et al.*, 1997 ; El-Tarabily et Sivasithamparam, 2006 ; Da Silva *et al.*, 2008 ; Hernandez *et al.*, 2008 ; Chi *et al.*, 2009).

3. 3. Effet de la température sur la production des substances antimicrobiennes

Aucune activité antimicrobienne n'a été affichée avec les différentes valeurs de température testées (30, 40 et 45°C) à l'égard des souches tests explorées.

Ces résultats s'accrochent parfaitement avec les travaux de Polonelli et Conti (2009), qui illustrent le maintien de ce caractère entre 25 et 30°C. Par ailleurs, Xianghong *et al.* (2007) rapportent que cette activité est maximale à 28°C pour le genre *Candida* .

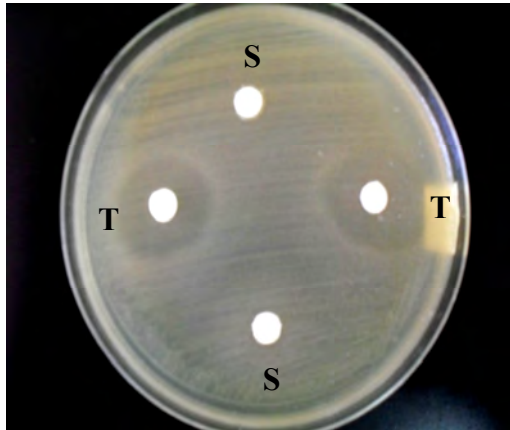
Fleet et Heard (1993), montrent que la température a une influence sur les voies métaboliques des levures ainsi, une modification de la température de croissance entraîne des différences dans la formation des métabolites secondaires. De plus, les températures élevées entraînent la dénaturation des enzymes impliquées dans le métabolisme cellulaire (Converti *et al.*, 1996).

3.4. Effet du pH sur la production des substances antimicrobiennes

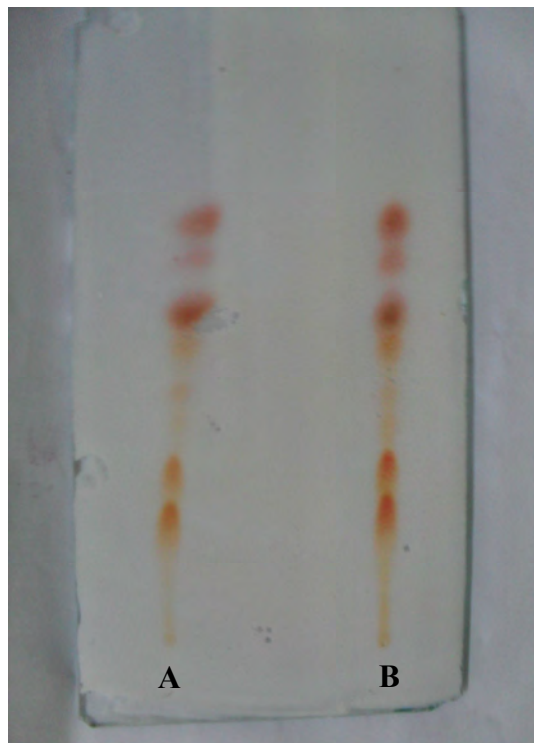
Les valeurs de pH étudiées (3, 5 et 7) ne révèlent aucun effet inhibiteur de la souche S19, contre les microorganismes cibles utilisés.

Ces résultats coïncident avec les travaux de (Buzzini et Martini, 2001 ; Buzzini *et al.*, 2003 ; Xianghong *et al.*, 2007), qui démontrent que la production de ces substances bioactives par les levures est maintenue au pH 4,5 ; au de là de cette valeur, ce caractère sera complètement perdu pour certains genres de levures, capables de produire ce type de métabolites.

Par ailleurs, d'après Sanchez *et al.* (1997) ; le pH est un autre facteur important de la croissance de levures . Ce dernier a un effet sur la solubilité des nutriments et sur la perméabilité de la membrane cellulaire déterminant ainsi, l'activité métaboliques des cellules.



Photographie 9 : Test d'activité sur le milieu Muller-Hinton de la souche de levure S19 contre la bactérie test *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603. (T : surnageant témoin de la culture de S19 ; S : surnageant de la culture de S19 chauffé à 90°C pendant 20 mn).



Photographie 10 : Chromatogramme obtenu après révélation à la ninhydrine. (dépôts A : témoin ; dépôts B : surnageant de la culture de S19).

3.5. Identification préliminaire de la (les) substance(s) bioactive(s)

La Photographie 9, montre que le surnageant chauffé à 90°C pendant 20 min n'a aucun effet inhibiteur vis-à-vis de *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 ; comparé au témoin dans les mêmes conditions.

Le chromatogramme révélé par la ninhydrine (Photographie 10), n'affiche aucune différence entre le témoin et la surnageant de la culture de S19. On remarque les mêmes spots sur les lignes de migrations.

Le test de l'activité antimicrobienne des spots obtenus, n'affiche aucun effet antimicrobien.

Cet essai est réalisé, à fin de vérifier la nature de ou des substances bioactives produites par la souche de levure S19 et faire correspondre à celles décrites dans la littérature ; ou au contraire, affirmer les spéculations citées au paravent.

Les travaux de De Oliva Neto *et al.* (2004), indiquent que l'agent responsable de l'effet inhibiteur est naturellement libéré dans le milieu durant la croissance des levures et il est instable à haute température. Davet et Rouxel (1997) montrent que la plupart des antibiotiques et des fongicides sont thermolabiles ; un traitement à la chaleur les dénaturerait. Ce qui explique probablement le résultat illustré par la Photographie 9.

Le chromatogramme ne montre pas l'existence de spots pouvant révéler la présence de métabolites de nature protéique synthétisés par la souche S19. De plus, le test d'activité ne fait que confirmer ce résultat.

Selon l'équipe de Golubev (2001), les levures disposent de produits variés à activité antimicrobienne ; résultat démontré par les souches *Ustilago maydis* et *Pseudozyma fusiformata* qui élaborent un composé antibactérien de nature glycolipidique et à large spectre antifongique.

Cet aboutissement, approuve notre supposition. Par ailleurs, des études complémentaires plus approfondies sont nécessaires, pour déterminer avec précision la nature de l'agent responsable de cet effet.

Conclusion et perspectives

L'objectif principal de ce travail est la recherche de substances à activités antimicrobiennes (antibactériennes et anti *Candida albicans*) produites par des souches levuriennes isolées des sols sahariens.

Quatre isolats de levures nous sont fournis par le laboratoire de Génie Microbiologiques et Applications (S6, S10, S18 et S19).

Le test d'activité antimicrobienne sur le milieu Muller-Hinton a révélé trois souches de levure (S10, S18 et S19) à activité antibactérienne contre *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603. Aucun effet inhibiteur vis à vis de la levure *Candida albicans* n'est retrouvé pour l'ensemble des isolats de levures testés.

La souche dénommée S19, s'avère intéressante par son effet inhibiteur envers cette bactérie cible. L'identification de cette dernière par des études morphologiques, biochimiques et physiologiques ; semble l'apparentée au genre *Candida*.

Les traitements aux températures 30, 40 et 45°C et les variations de pH aux valeurs 3, 5 et 7, inhibent la production des métabolites antimicrobiens par la souche *Candida sp.* La souche de levure exprime son caractère antibactérien à l'égard de *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 à 28°C et à pH 4,5.

Le chromatogramme montre un profil du surnageant (révélé par la ninhydrine à 0.3 %) identique à celui du milieu avant l'ensemencement. Les spots révélés ne possèdent aucune activité vis-à-vis de *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603.

Ces aboutissements, nous ont poussés à croire que l'agent bioactif n'est pas de nature protéique et probablement différent de ce qui a été trouvé jusqu'à ce jour ; chez les levures.

Les résultats obtenus, incitent à approfondir les études aussi bien sur les levures, que sur les activités biologiques de leurs métabolites secondaires. Ainsi, nous envisageons :

- De connaître la structure chimique détaillée de ces molécules bioactives par des études complémentaires, comme l'analyse de la résonance magnétique nucléaire, l'HPLC et la SM.
- L'identification de l'espèce de la souche sélectionnée par des techniques de biologie moléculaire ou par la génomique structurale (Test par les micro-pus à ADN).

- L'étude de l'activité fongique contre *Candida albicans* est d'une importance capitale, dans l'espoir de trouver des molécules intéressantes ; il apparaît clairement qu'il est nécessaire d'isoler de nouvelles souches de levures d'écosystèmes différents, pouvant présenter une bonne activité antifongique.

Il faut espérer que nous obtiendrons ainsi des résultats plus performants que ceux obtenus vis-à-vis des molécules plus anciennes pour lesquelles, la résistance est maintenant si élevée que leur utilisation est parfois problématique.

Références bibliographiques

A

Abranches J., Valente P., Nobrega H.N., Fernandez F.A.S., Mendonça-Hagler L.C et Hagler A.N. (1998).Yeast diversity and killer activity dispersed in fecal pellets from marsupials and rodents in a Brazilian tropical habitat mosaic. *FEMS Microbiol. Ecol.***26**:27-33.

Addis E., Fleet G. H., Cox J. M., Kolak D. et Leung T. (2001).The growth properties and interactions of yeasts and bacteria associated with the maturation of camembert and blue-veined cheeses. *International Journal of Food Microbiology* **69**: 25-36.

Agbo-Godeau S., Guedj A. (2005).Mycoses buccales.*EMC-Stomatologie* **1**:30-41.

Ahearn D.J. (1973).Estuarine microbial ecology.*Marine science* **1**:433-440.

Alexander M. (1977).Introduction to soil microbiology.Wiley, New York.

Alfenor S. (1999).Interaction de type « killer » chez *Saccharomyces cerevisiae*.Etudes physiologiques et cinétiques. Quantification et modélisation. Thèse INP Toulouse, France.

Anonyme. (2007).Développement des biocarburants et formulation des politiques agricoles futures en Afrique de l'Ouest et du Centre. Lettre de politique agricole de la CMA/AOC (LEPAC) - N°4.

B

Barandica J.M., Santos A., Marquín A.D., Lopez F., Acosta F.J. et Peinnado J.M. (1999).A mathematical model for toxin accumulation by killer yeasts based on the yeast population growth. *Journal Applied Microbiology* **86**:805-811.

Barnett J.A., Paine R .W et Yarrow D. (1990).Yeasts:characterization and identification, 2nd edn. Cambridge: Cambridge University Press. UK.

Baum H.V., Marre R. (2005).Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* and therapeutic implications. *International Journal of Medical Microbiology* **295**:503 -511.

Bevan E.A ., Makover M. (1963).The physiological basis of the killer character in yeast.*In: Genetics Today, XI Int.Congr. Gen.* (Geerts S.J. ed.), Pergamon Press, Oxford:202-203.

Bilinski C.A., Innamorato G et Stewart G.G. (1985).Identification and characterization of antimicrobial activity in two yeast genera. *Applied Environmental Microbiology* **50**:1330-1332.

Boiron P. (1996).Organisation et biologie des champignons.Editions Nathan:13-35.

Boiron P. (1999).Etude des infections fongiques:des avancés multiples.Option/Bio 238 :4-5.

Bonn et Blanc J.M. (2008).Annales de dermatologie et vénéréologie,Item 87-Infections cutanéomuqueuses bactériennes et mycosiques :*Candida albicans*.**135**(115):42-48.

Boone C., Sdicu A.M.,Wagner J., Degre R., Sanchez C et Bussey H. (1990).Integration of the yeast K1 killer toxin gene into the genome of marked wine yeasts and its effect on vinification . *American Journal of Enology and Viticulture* **41**:37-42.

Bouchet P.,Guignard J.L., Pouchus Y.F et al. (2005).Les champignons mycologie fondamentale et appliquée.2^{ème} édition.Masson.

Bouix M ., Leveau J.Y. (1991).Les levures *Ds* :Bourgeois C.M., Leveau J.Y. Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires,édition 21 Lavoisier-Tec & Doc :206-229.

Bourgeois C.M., Larpent J.P. (1996).Microbiologie alimentaire.vol II:Aliments fermentés et fermentation alimentaire.(Ed).Lavoisier.Paris:523.

Bourgeois C.M., Leveau J.Y. (1991).Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agro-alimentaires.Vol III:le contrôle microbiologique.(Ed).Lavoisier.Paris :451.

Bourgeois C.M., Mescle J.F et Zucca J. (1996).Microbiologie alimentaire Tome 1.Les levures.Collection Sciences et Techniques Agroalimentaire.Lavoisier :222-233.

Breinig F.,Tipper D.J., Schmitt M.J et Krel P. (2002).The plasma membrane receptor for the yeast K1 viral toxin.*Cell* **108**:395.

Brown J.L., Roemer T., Lussier M., et al. (1993).The K1 killer toxin: molecular and genetic applications to secretion and cell surface assembly. *In*: Molecular genetics of yeast; a practical approach. 1st ed. New York, NY: Oxford University Press: 217-231.

Bussey H., Boone C., Zhu H., Vernet T., Whiteway M et Thomas D.Y. (1990) .Genetic and molecular approaches to synthesis and action of the yeast killer toxin .*Experientia* **46**: 193-200.

Bussey H., Saville D., Huntchins K et Palfree R.G.E. (1979).Binding of yeast killer toxin to a cell wall receptor on sensitive *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology* **140**: 888-892.

Buzzini P., Berardinelli S., Turchetti B., Cardinali G et Martini A. (2003). Fingerprinting of yeasts at the strain level by differential sensitivity responses to a panel of selected killer toxins. *Systematic and Applied Microbiology* **26**:466-470.

Buzzini P., Corazzi L., Turchetti B., Buratta M et Martini A. (2004).Characterization of the in vitro antimycotic activity of a novel killer protein from *Williopsis saturnus* DBVPG-4561 against emerging pathogenic yeasts. *FEMS Microbiology Letters* **238**: 359-365.

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.

C

Carle S., Pharm B. (2003). Les antifongiques dans le traitement des infections invasives. *Pharmactuel* **36**(1):25-41.

Chabbert Y., Terrial G. (1963). chapitre premier :Sensibilité des microbes aux antibiotiques. *Dans* :Techniques de laboratoire Tome II.(Loiseleur J.Secrétaire de rédaction).Masson : 377.

Chen W.B., Han Y.F., Jong S.C et Chang S.C. (2000).Isolation, purification, and characterization of a killer protein from *Schwanniomyces occidentalis*. *Aplied and environmental Microbiology* **66**:5348-5352.

Chi Z., Chi Z., Zhang T., Liu G., Li J et Wang X. (2009). Production, characterization and gene cloning of the extracellular enzymes from the marine-derived yeasts and their potential applications. *Biotechnology Advances* **27**:236-255.

Ciani M., Fatichenti F. (2001). Killer toxin of *Kluyveromyces phaffii* DBVPG 6076 as a biopreservative agent to control apiculate wine yeasts. *Aplied and environmental Microbiology* **67**:3058-3063.

Converti A., Bargagliotti C., Cavanna C., Nicoletta C et Delbarghi M. (1996). Evaluation of kinetic parameters and thermodynamic quantities of starch hydrolyse fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioprocess Engineering*.

D

Da Silva S., Calado S., Lucas C et Aguiar C. (2008). Unusual properties of the halotolerant yeast *Candida nodaensis* Killer toxin, CnKT. *Microbiological Research* **163**:243-251.

Daurel C., Leclercq R. (2008).L'antibiogramme de *Staphylococcus aureus*. *Revue Francophone des Laboratoires* **407**:80-90.

Davet P. (1996). Vie microbienne du sol et production végétale. édition INRA. Paris.

Davet P., Rouxel F. (1997). Détection et isolement des champignons du sol. édition INRA. Paris.

Davis B.D. (1990). *Microbiology* 4^{ème} édition. Philadelphie, J.B. Lipincott:476.

De Buyser M.L. (1991). Les staphylocoques coagulases-positifs. *In* :Bourgeois C et Leveau J.P(eds). Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires. Vol 3. Le contrôle microbiologique. 2^{ème} édition. Technique et documentation, Lavoisier:305-310.

De Curtis F., Torriani S., Rossi E et De Cicco V. (1996). Selection and use of *Metschnikowia pulcherrima* as a biological control agent for postharvest rots of peaches and table grapes. *Annals of Microbiology and Enzimology* **46**:45-55.

De Jong J., Put H.M.C. (1980). Enumeration of yeasts in the presence of moulds. *In*: Biology and activities of yeasts (Edité par Skinner F.A., Passmore S.M., Devenport R.R). Academic Press. London :289-292.

De La Pena P., Barros F., Gascon S., Lazo P.S et Ramos S. (1981). Effects of yeast killer toxin on sensitive cells of *Saccharomyces cerevisiae* . *Journal of Biological Chemistry* **256** : 10420-10425.

Delarras C. (2007). Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire. Edition TEC& DOC. Lavoisier.

De Oliva Neto P., Ferreira M.A et Yokoya F. (2004). Screening for yeast with antibacterial properties from an ethanol distillery. *Bioresource Technology* **92** :1-6.

Develoux M., Bretagne S. (2005). Candidoses et levures diverses. *EMC. Maladies infectieuses* **2**:119-139.

Droby S., Chalutz E., Wilson C.L et Wisniewski M.E. (1989). Characterization of the biological control activity of *Debaryomyces hansenii* in the control of *Penicillium digitatum* on grapefruit. *Canadian Journal of Microbiology* **35**:794-800.

E

Edelstein S.J. (2002). Des gènes aux génomes. édition ODILE JACOB. Paris :28.

Eisfeld K., Riffer F., Mentges J et Schmitt M.J. (2000). Endocytotic uptake and retrograde transport of a virally encoded killer toxin in yeast. *Molecular Microbiology* **37**:926.

El-Tarabily K.A., Sivasithamparam K. (2006). Potential of yeasts as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. *Mycoscience* **47**:25-35.

F

Feigin et Cherry. (2004). Text book of paediatric infectious diseases, 5th Edition, V.B. Sanders company. Canada.

Figarella J et Leyral G. (1998). Microbiologie techniques:2, Documentation technique. 2^{ème} édition-Biologie technique. Bordeaux:255.

Fleet G. H., Heard G. M. (1993).Yeast: growth during fermentation. *In*: Fleet G.M (ed) Wine microbiology and biotechnology. Harwood Academic Publishers, Chur Switzerland: 27-54.

G

Gaudy C., Buxeraud J. (2005).Antibiotiques:pharmacologie et thérapeutique. Collection Pharma.Elsevier.France.

Golubev W.I., Golubeva E.W. (2004).Yeast fungi in steppe and forest phytocenoses of the Prioksko-terrasny biosphere reserve. *Mykologi Phytopathologia* **38**:20-27.

Golubev W. I., Kulakovskaya T. V. et Golubeva E. W. (2001).The yeast *Pseudozyma fusiformata* VKM Y-2821 producing an antifungal glycolipid.*Microbiology* **70**(5): 553-556.

Gonzales-Pastor J.E., Hobbs E.C et Losick R. (2003).Cannibalism by sporulating bacteria. *Science* **301**:510.

Goto K., Iwase F., Kichise K., Kitono K., Totuka A., Obata T., et al. (1990).Isolation and properties of a chromosome dependent KHR killer toxin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Agricultural and Biological Chemistry* **54** (2):505-509.

Guiraud J .P. (1998).Microbiologie alimentaire.(Ed).Dunod.Paris:310-321.

Gulbinienė G., Kondratienė L., Jokantaite T., Serviėnė E., Melvydas V et Petkuniėnė G. (2004).Occurrence of killer yeast strains in fruit and berry wine yeast populations. *Food Technology and Biotechnology* **42**:159-163.

Gunge N.,Tamaru A., Ozawa F et Sakaguchi K. (1981).Isolation and characterization of linear desoxyribonucleic acid plasmids from *Kluyveromyces lactis* and the plasmid-associated killer character. *Journal of Bacteriology* **145**: 382-390.

Guyard C., Dehecq E. , Magliani W., Polonelli L et Cailliez J.C. (2001).Les récepteurs des toxines killer de levures.*Journal de mycologie médicale* **11**(2):79-86.

H

Hagler A.N., Mendoca H.L. (1981).Aplied and environmental Microbiology **41** :173.

Hainque B., Bandin B et Lefebvre P. (2008).Appareils et méthodes en biochimie et biologie moléculaire.Chapitre 15 :Chromatographie planaire.Flammarion.

Heard G.M.,Fleet G.H. (1987). Occurence and growth of killer yeasts during wine fermentation. *Aplied and environmental Microbiology* **53**:2171-2174.

Heiligenstein S., Eisfeld K., Sendzik T., Jimenez-Becker N., Breinig F et Schmitt M.J. (2006). Retrotranslocation of a viral A/B toxin from the yeast endoplasmic reticulum is independent of ubiquitination and ERAD. *EMBO Journal* **25**:4717.

Hernandez A., Martin A., Cordoba M .G., Benito M. J., Aranda E et Pérez-Nevaldo F. (2008). Determination of killer activity in yeasts isolated from the elaboration of seasoned green table olives. *International Journal of Food Microbiology* **121**:178-188.

Hopp U., Baltensweiler J. (2009). Mycoses-Mycoses cutanées-Candidoses-Moniliases ou Monilioses, causes et facteurs de risque. France.

Hutchins K ., Bussey H. (1983) .Cell wall receptor for yeast killer toxin: involvement of (1-6)- β -D-glucan. *Journal of Bacteriology* **154**:161-169.

I

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., Altinbay D et Derinel Y. (2004). Immunization of the industrial fermentation starter culture strain of *Saccharomyces cerevisiae* to a contaminating killer toxin-producing *Candida tropicalis*. *Food Microbiology* **21**:635-640.

Izgu F., Altinbay 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.

J

Jacobsen T., Poulsen O.M. (1995). Comparison of lipases from different strains of the fungus *Geotrichum candidum*. *Biochimica et Biophysica Acta-Lipids and Lipid Metabolism* **1257**:96-102.

Janisiewicz W.J. (1994). Enhancement of biocontrol of blue mold with the nutrient analog 2-deoxy-D-glucose on apples and pears. *Applied and environmental Microbiology* **60**:2671-2676.

K

Kimura Y., Kitamoto K., Matuoaka K., Nakamura K., Limura Y et Kito Y. (1993). Isolation and nucleotide sequences of the genes encoding killer toxins from *Hansenula mrakii* and *H. saturnus*. *Gene* **137**:265-70.

Kreger-Van Rij N.J. (1984). The yeast, a taxonomic study, Elsevier Biomedical.

Kurtzman C.P. (1984).Synonymy of the yeast genera *Hansenula* and *Pichia* demonstrated through comparisons of deoxyribonucleic acid relatedness.*Antonie Van Leeuwenhoek* **50**: 209-217.

Kurtzman C.P., Droby S. (2001). *Metschnikowia fruticola*, a new ascosporic yeast with potential for biocontrol of postharvest fruit rots. *Systematic and Applied Microbiology* **24**:395-399.

L

Larpent G.M., Sanglier J.J. (1992).Biotechnologies.Principes et méthodes.Editions Doin.Deren et Cie. :569.

Larpent J.P. (1991).Biotechnologie des levures.(Ed).Masson.Paris:426.

Larpent J.P. (1992).La microbiologie de la fermentation panaire.(Ed)Technologie et documentation.Cedex : 51.

Larpent J.P. (1997).Microbiologie alimentaire.Techniques de laboratoire.Les levures.Tec et Doc.Lavoisier :464-472.

Larpent J.P., Larpent G.M. (1985).Manuel pratique de microbiologie.Herman.Collection Méthodes.Paris.

Larpent J.P., Larpent G.M. (1990).Memento technique de microbiologie.2^{ème} édition.Techniques et Documentation.Lavoisier.

Leclercq-Perlat M.N., Buono F., Lambert D., Spinnler H. E. et Corrieu G. (2004). Production of camembert-type cheeses : Part I. Microbiological and physicochemical evolutions. *Journal of Dairy Research* **71**:346-354.

Li Q.Q., Meng X.Y., Wu X., Lin W., Duan C.J., Feng J.X et al.(2006).Purification of two antimicrobial substances produced by *Bacillus subtilis* Strain B11 and their properties. *Agricultural Sciences in China*.**5**(5):363-369.

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.

Liu S.Q., Tsao M. (2009).Inhibition of spoilage yeasts in cheese by killer yeast *Williopsis saturnus* var. *saturnus*. *International Journal of Food Microbiology* **131**:280-282.

Lodder J. (1971).The yeasts,a taxonomic study.2ème edition.North Holland .Amsterdam. Londres:1385.

Lowes K.F., Shearmen C.A., Payne J., MacKenzie D., Archer D.B., Merry R.J., et al (2000).Prevention of yeast spoilage in feed and food by the yeast mycocine HMK. *Aplied and environmental Microbiology* **66**:1066-1076.

Lynn Rowbottom T., Carol A., Munro., Neil A. R et Gow. (2004). *Candida albicans* mutants in the BNI4 gene have reduced cell-wall chitin and alterations in morphogenesis. *Microbiology* **150**: 3243-3252.

M

Madigan M., Martinko J. (2007). Brock-Biologie des micro-organismes. 11^{ème} édition. Pearson Education. France. 1047p.

Magliani W., Conti S., Gerloni M., Beretolotti D et Polonelli L. (1997). Yeast killer systems. *Clinical Microbiology Reviews* **10** :369-400.

Mangenot F. (1966). Etude microbiologique des litières (commentaires sur les données expérimentales). Dans :Pesso P (eds). (1971). La vie dans les sols.aspects nouveaux études expérimentales :442-443.

Mansour S. (2009). Etude de la levure *Yarrowia lipolytica* dans un écosystème fromager par une approche transcriptomique. Thèse de Doctorat. Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (Agro Paris Tech). France.

Mansouri B. (2006). Les champignons parasites des plantes cultivées. Biologie, Systématique, Pathologie, Maladies. Centre de publications Universitaires. Tunis. 456p.

Marquina D., Santos A et Peinado J.M. (2002). Biology of killer yeasts. *International Microbiology* **5** :65-71.

McGuire R.G. (1994). Application of *Candida guilliermondii* in commercial citrus coatings for biological control of *Penicillium digitatum* on grapefruits. *Biological Control* **4**:1-7.

Meyer A., Deiana J et Bernard A. (2004). Biosciences et techniques. Edition DOIN. France. 304p.

Michalcakova S., Sulo P. et Slavikova E. (1993). Killer yeasts of *Kluyveromyces* and *Hansenula* genera with potential application in fermentation and therapy. *Acta Biotechnologica*:341-50.

Minor T.E., Marth E.H. (1976). Staphylococci and their signification in food. Elsevier Scientific Publishing Company Amsterdam. 297p.

Moore et Dalrymple. (1976). Experimental methods in organic products chemistry. Second edition. London, Toronto:50-60.

Morace G., Manzara S., Dettori G., Fanti F., Conti S., Campani L. et al. (1989). Biotyping of bacterial isolates using the yeast killer system. *European Journal of Epidemiology* **5**:303-310.

N

Newman D.J., Cragg G.M. et Snader K.M. (2003). Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *Journal of Natural Products* **66**(7):1022-1037.

Nunes C., Usall J., Teixido N., Torres R et Vinas I. (2002). Control of *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* on apples and pears with the combination of *Candida sake* and *Pantoea agglomerans*. *Journal of Food Protection* **65**:178-184.

O

Ochigava I., Hakenbeck R., Collier P. J et Walker G. M. (2010). *Williopsis saturnus* yeast killer toxin does not kill *Streptococcus pneumoniae*. *Antonie van Leeuwenhoek* :1-8.

Oteng-Gyang K. (1984). Introduction à la microbiologie dans les pays chauds. (Ed). Lavoisier. Paris:43-46.

P

Perry J.J., Staley J.T et Lory S. (2004). Microbiologie. Edition Dunod. Paris. 891p.

Perscott L.M., Harley J.P et Kelein D.A. (2007). Microbiologie. 2^{ème} édition. De boeck:554,984.

Pfaller M.A. (2002). Focus on fungal infectious 3. Phonix Arizona March.

Phaff H.J., Starmer. (1987). Yeasts associated with plants, insects and soil. *In*: Rose A.H., Harrison J.S (eds) .The yeasts. Biology of yeasts, 2nd ed. London :123,180.

Polonelli L et Conti S. (2009). *Candida albicans* Methods and protocols. Chapter 11, Biotyping of *Candida albicans* and other fungi by yeast killer toxins sensitivity. Humana Press. **499**:97-115.

Polonelli L., Conti S., Gerloni M., Magliani W., Chezzi C. et Morace G. (1991). Interfaces of the yeast killer phenomenon. *Critical Reviews in Microbiology* **18**:47-87.

Polonelli L., Conti S., Magliani W et Morace G. (1989). Biotyping of pathogenic fungi by the killer system and with monoclonal antibodies. *Mycopathologia* **107**:17-23.

Polonelli L et Morace G. (1986). Reevaluation of the yeast killer phenomenon. *J. Clin. Microbiol.* **24**:866-869.

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.

R

Radler F., Schmitt M. (1987). Killer toxins of yeasts: inhibitors of fermentation and their adsorption. *Journal of Food Protection* **50** :232-38.

Regnault J.P. (2002). Elements de microbiologie et d'immunologie. Microorganismes eucaryotes. Canada:70-71.

Regodon J.A., Pérez F., Valdés M.E., De Miguel C. et Ramirez M. (1997). A simple and effective procedure for selection of wine yeast strains. *Food Microbiology* **14**:247-254.

Riviéer J. (1970). Microbiologie industrielle et genie biochimique , (edn) Masson et Cie.

Rivière J. (1975). Les applications industrielles de la microbiologie. Collection Sciences agronomiques. Masson et Cie(ed.):31,195.

S

Sanchez S., Bravo V., Castro E., Moya A. J et Camacho F. (1997). The influence of pH and aeration rate on the fermentation of D-xylose by *Candida shehatae*. *Enzyme and Microbiology Technology* **21**:355-360.

Sangorin M.P., Lopes C.A., Giraudo M.R. et Caballero A.C. (2007). Diversity and killer behaviour of indigenous yeasts isolated from the fermentation vat surfaces in four Patagonian wineries. *International Journal of Food Microbiology* **119**: 351-357.

Santos A., Marquina D., Leal J.A et Peinado J.M. (2000). (1-6)- β -D-glucan as cell wall receptor for *Pichia membranifaciens* killer toxin. *Applied and environmental Microbiology* **66**:809-813.

Satora P., Tuszynski T. (2005). Biodiversity of yeasts during plum wegierka zwykla spontaneous fermentation. *Biotechnology* **43** (3):277-282.

Sawant A.D., Abdelal A.T et Ahearn D.G. (1989). Purification and characterization of the anti-*Candida* toxin of *Pichia anomala* WC 65. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* **33**:48-52.

Scherr G.H. , Weaver R.H. (1953). The dimorphism phenom in yeast. *Bacterial Review* **17**:51-92.

Schmitt M.J., Breinig F. (2002). The viral killer system in yeast: from molecular biology to application. *FEMS Microbiology Reviews* . **26** (3):257-276.

Schmitt M.J., Klavehn P., Wang J., Schonig I et Tipper D. (1996). Cell-cycle studies on the mode of action of yeast K28 killer toxin. *Microbiology* **142**:2655-62.

Schmitt M.J., Reiter J. (2008).Viral induced yeast apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta* **1783** :1413 -1417.

Scriban R. (2003).Biotechnologie.4^{ème} édition Technologie et documentation- Lavoisier.
Paris :10-17.

Sine J.P. (2003).Biochimie-biologie séparation des biomolécules.Ellipses.Paris.

Skipper N., Bussey H. (1977).Mode of action of yeast toxins: energy requirement for *Saccharomyces cerevisiae* killer toxin. *Journal of Bacteriology* **129**:668-677.

Spencer J.F.T and Spencer D.M. (1997).Ecology:where yeasts live. In: Spencer J.F.T., Spencer D.M (eds) .Yeasts in natural and artificial habitats. Springer, Berlin: 33-57.

Stamos J.K., Rowley A.H. (1995).Candidemia in a pediatric population. *Clinical Infectious Diseases* **20**:571-575.

Stark M.J.R., Boyd A., Mileham A.J et Romanos M.A. (1990).The plasmid-encoded killer system of *Kluyveromyces lactis*. *Yeast* **6**:1-29.

Starmer W.T., Ganter P.F et Aberdeen V. (1987).The ecological role of killer yeasts in natural communities of yeasts. *Canadian Journal of Microbiology* **33**:783-796.

Suzuki C. (1999).Secretion of a protoxin post-translationally controlled by NaCl in a halo tolerant yeast, *Pichia farinosa*. *Yeast* **15**:123-131.

Suzzi G., Romano P., Ponti I et Montuschi C.(1995).Natural wine yeasts as biocontrol agents. *Journal of Applied Bacteriology* **78**:304-308.

T

Tamaki N., Hama T. (1982).In:Methods in enzymology.(Wood W.A.,ed.),Academic Press,London:285,306.

Thuriaux P. (2004).Les organismes modales:La levure.(Ed).Declin. Paris :114.

Tipper D.J., Bostian K.A. (1984).DsRNA killer systems in yeast. *Journal of Microbiological Reviews* **48**:125-156.

Tommasino M . (1991).Killer system of *Kluyveromyces lactis*: the open reading frame 10 of the pGK12 plasmid encodes a putative DNA binding protein. *Yeast* **7**:245-252.

Tortora G.J., Funke B.R. et Case C.L. (2003).Introduction à la microbiologie. Edition du renouveau pédagogique.Canada.945p.

V

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.

Vadasz A.S., Jagganath D.B., Pretorius I.S et Gupthar A.S. (2000).Electron microscopy of the K2 killer effect of *Saccharomyces cerevisiae* T206 on a mesophilic wine yeast. *Antonie van Leeuwenhoek* **78**:117-122.

Vadasz A.S., Vadasz P., Gupthar A.S et Abashar M.E. (2003).Theoretical and experimental evidence of extinction and coexistence of killer and sensitive strains of yeast grown as a mixed culture in water. *International Journal of Food Microbiology* **84**:157-174.

Vadkertiova R., Slavikova E. (2007).Killer activity of yeasts isolated from natural environment against some medically important *Candida* species.*Polish Journal of Microbiology* **56**:39-43.

Valerie J., Hodgson D. B et Graeme M.W. (1995). Anti-*Candida* activity of a novel killer toxin from the yeast *Williopsis mrakii*. *Microbiology* **141**:2003-2012.

Van Uden N., Fell J.W. (1986).Advances in Microbiology of the sea.*Academic Press,New York*.1:167-201.

Van Vuren H.J.J., Wingfield B.D. (1986). Killer yeasts cause of stuck fermentations in a wine cellar. *South Africa Journal of Enology and Viticulture* **7**:114-118.

Vinas I., Usall J., Teixido N et Sanchis V. (1998). Biological control of major postharvest pathogens on apple with *Candida sake*. *International Journal of Food Microbiology* **40**: 9-16.

W

Walker G., McLeod A.H. et Hodgson V.J. (1995).Interactions between killer yeasts and pathogenic fungi. *FEMS Microbiology Letters* **127**:213-222.

Whitenay M., Bachewich C. (2007).Morphogenesis in *Candida albicans*. *Annual Review of Microbiology* **61**:529-553.

Wickner R.B. (1979).The killer double stranded RNA plasmids of yeast. *Plasmid* **2**:303-322.

Wickner R.B. (1986). Double-stranded RNA replication in yeast. The killer system. *Annual Review of Biochemistry* **55**:373-395.

Wickner R.B. (1996).Double-stranded RNA viruses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological. Review* **60** (1) :250-265.

Wisniekwski M.E., Biles C.L., Droby S., McLaughlin, R.J., Wilson C.L et Chalutz E.(1991). Mode of action of the post harvest biocontrol yeast *Pichia guilliermondii*.

Characterization of attachment to *Botrytis cinerea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **39**:245-248.

World Health Organization. (2007).The world health report 2007. A safer future: global public health security in the 21 st century. Geneva, Switzerland: World Health Organization.

X

Xianghong W., Zhenming C., Lixi Y., Jing L., Meiju L et Longfei W. (2007).A marine killer yeast against the pathogenic yeast strain in crab (*Portunus trituberculatus*) and an optimization of the toxin production.*Microbiological Research* **162**:77-85.

Y

Yashuda J.M. (2001).An update on antifungal therapy.Afocus on Systemic Agents forinvasive fungal infection.*California Journal of Health System Pharmacy*:4-42.

Young T.W et Yagiu M. (1978).A comparison of the killer character in different yeasts and its classification. Antonie Van Leuwenhoek. *Journal of Microbiology and Serology* **44**: 59-77.

Annexes

Annexe 1 : Les milieux de culture**a-Milieu de repiquage et de maintenance des souches de levures à tester****YPGA (Yeast -extract Peptone Glucose Agar):**

Extrait de levure	5 g
Peptone	10 g
Glucose	20 g
Agar	20 g
Eau distillée	1000 ml

b-Milieux de repiquage et de maintenance des souches tests

Ces milieux sont fournis par l'institut Pasteur d'Alger, à part la gélose de Sabouraud qui est préparée au niveau du laboratoire.

TSA (Trypticase Soy Agar), Chapman.**Sabouraud:**

Glucose	20 g
Peptone	10 g
Agar	15 g
Eau distillée	1000 ml

c-Milieu pour la production des substances bioactives**Bouillon YPG_(a) (Yeast -extract Peptone Glucose) :**

Extrait de levure	10 g
Peptone	20 g
Glucose	20 g
Eau distillée	1000 ml

d-Milieus pour le test de l'activité antimicrobienne**YPGA-MB** (Yeast -extract Peptone Glucose Agar-Methylene Blue):

Extrait de levure	10 g
Peptone	20 g
Glucose	20 g
Bleu de méthylène	0.03 g
Agar	20 g
Eau distillée	1000 ml

Muller-Hinton, fournis par l'institut Pasteur d'Alger.

Infusion de viande	3000 g
Hydrolysate de caséine	17,5 g
Amidon	1,5 g
Agar	17 g
Eau distillée	1000 ml
pH 7,2 à 7,4	

e-Milieus d'identification de la souche de levure sélectionnée

- Etude des caractères cultureux

YPG_(b) (Yeast -extract Peptone Glucose):

Extrait de levure	5 g
Peptone	10 g
Glucose	20 g
Eau distillée	1000 ml

- Aptitude à la Filamentisation

PDA (Potato Dextrose Agar) :

Glucose	20 g
Agar	20 g
Extrait de pomme de terre	1000 ml

Préparation de l'extrait de pomme de terre : 200g de pomme de terre non pelée et vieille, sont lavés et coupés en petits dés, ensuite mis dans un litre d'eau distillée et porté à ébullition pendant une heure. Ils sont en fin écrasés, filtrés. Compléter à un litre d'eau distillée.

- Sporulation

Mc Clary

Glucose	1 g
KCl	1,8 g
Extrait de levure	2,5 g
Acétate de sodium	8,2 g
Agar	15 g
Eau distillée	1000 ml

Fowells

Acétate de sodium	5 g
Agar	20 g
Eau distillée	1000 ml

Gordkowa

Glucose	1 g
Peptone	10 g
NaCl	5 g
Agar	25 g
Eau distillée	1000 ml

- Fermentation des sucres

Extrait de levure	4,5 g
Peptone	7,5 g
Sucre	20 g
Eau distillée	1000 ml

- Assimilation nitrates

Glucose	20 g
KH ₂ PO ₄	1 g
MgSO ₄	0,5 g
Agar	20 g
Eau distillée	1000 ml

Le pH des milieux préparés au laboratoire est ajusté à une valeur comprise entre 5,2 et 5,6 par une solution d'HCl 1N, sauf les milieux YPG_(a) et YPGA-MB : leurs pH sont ajustés par les solutions tampon citrate-Na₂HPO₄ et citrate-K₂HPO₄ respectivement.

Les milieux de culture préparés sont autoclavés à 120°C pendant 20 min.

Annexe 2 : Les solutions

a- Solution McFarland

Les solutions McFarland servent de standards de turbidité pour préparer les suspensions de microorganismes. Le standard McFarland 0,5 est notamment utilisé lors de la préparation des inocula pour les tests de sensibilités aux agents antimicrobiens.

- Préparation d'une solution de McFarland 0,5 :

Solution d'acide sulfurique H ₂ SO ₄ (1%)	99,5 ml
Solution de dichlorure de baryum BaCl ₂ (1.17%)	0,5 ml

b-Solution d'eau physiologique

Chlorure de sodium (NaCl)	9 g
Eau distillée	1000 ml

c- Solution de Ninhydrine

La ninhydrine est un composé aromatique utilisé comme révélateur des acides aminés. Elle possède la particularité de former avec les amines, un produit générant une coloration pourpre. Cette réaction se fait à chaud.

- Préparation d'une solution de Ninhydrine à 0,3% :

Ninhydrine	0,3 g
n-butanol	100 ml
Acide acétique	3 ml

Annexe 3 : Les profils de résistance des souches pathogènes obtenus auprès du CHU de Constantine.

Bactéries Antibiotiques	<i>Escherichia coli</i> 113A	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 112	<i>Staphylococcus aureus</i> 118
Amoxiline	R ^a	R	
Amoxiline+Acide clavulanique	R	R	
Ticarcilline	R	R	
Piperacilline	R	R	
Cefazoline	R	R	
Cefoxitine	S ^b	S	R
Cefotaxine	S	S	
Imipénème	S	S	
Fosfomycine	S	S	S
Gentamycine	R	R	S
Acide nalidixique	R	S	
Pefloxaxine	R	S	S
Sulfamethoxazole+Trimethoprim	R	R	S
Penicilline			R
Oxacilline			R
Erythromycine+Spiramycine+Lincomycine			S
Vancomycine			S
Rifampicine			S
Acide fusidique			S
<i>a:resistante.</i> <i>b:sensible.</i>			

Résumés

Abstract

Four yeast strains isolated by our laboratory Microbiological engineering and Applications (S6, S10, S18 and S19) from the Saharan soil (M'GHEIER town in the wilaya of BISKRA; Southeast of Algeria) were tested for their antimicrobial potential.

The test of antimicrobial activity on the Muller-Hinton medium revealed three yeast strains (S10, S18 and S19) on antibacterial activity against *Klebsiella pneumoniae* strain ATCC 700603. The yeast S19 is the most efficient.

No inhibitory effect was detected against the yeast *Candida albicans* by all yeast isolates tested.

For identification, strain S19 was tested morphological, biochemical and physiological. Analysis of the results seems related to the genus *Candida*.

The study of the effect of temperature and pH on antimicrobial activity showed that bioactive substances are produced by this strain at 28 ° C and pH 4.5.

The chromatogram shows a profile of the supernatant (revealed by ninhydrin 0.3%) identical to that of the medium before planting. The spots, taken one by one, have no activity against *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603.

Conclusion: The antibacterial substance synthesized by the yeast S19 does not seem to be such peptide or protein.

Keywords: killer Yeasts -killer toxins-Antimicrobial Activity-Soil-pathogenic bacteria-*Candida albicans*.

ملخص

أربعة سلالات خميرة عزلت من طرف مخبر (S18,S10,S6) Génie Microbiologique et Applications و (S19) من التربة الصحراوية (مدينة مغير في ولاية بسكرة ؛جنوب شرق الجزائر) اختبرت لقدرتها المضادة للميكروبات.

اختبار النشاط البكتيري على الوسط Muller-Hinton كشف على ثلاثة سلالات خميرة (S19, S18, S10) ذات نشاط مضاد للبكتيريا *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, الخميرة S19 هي الأكثر فعالية لم يتم الكشف عن أي تأثير مثبت ضد خميرة *Candida albicans* من جميع العزلات المختبرة

عرضت السلالة S19 لاختبار مورفولوجي وبيوكيميائي وفسيلوجي لتحديد هويتها, بعد تحليل النتائج يبدو أنها تنتمي لجنس *Candida*.

دراسة تأثير درجة الحرارة ودرجة الحموضة على النشاط المضاد للميكروبات تبين أن إنتاج المواد النشطة بيولوجيا من هذا سلالة يتم في 28 درجة مئوية ودرجة الحموضة 4.5.

تظهر صورة chromatogram التي كشفت عنها النينهيدرين 0,3% بقع مماثلة للوسط قبل الغرس. البقع التي أخذت

الواحدة تلوى الاخرة لا تملك أي تأثير ضد *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603

الخلاصة : المادة المضادة للبكتريا المنتجة من طرف الخميرة S19، لا تبد أنها ذات طبيعة بيبنتية أو بروتينية.

الكلمات المفتاحية : الخميرة killer - السم killer- النشاط المضاد للميكروبات - تربة - البكتيريا المسببة للأمراض

Candida albicans-

Nom : LAMMI

Prénom : Sarah

Thème : Recherche de substances à activités antimicrobiennes (antibactériennes et anticandidoses) produites par des souches levuriennes isolées des sols sahariens.

Résumé

Quatre souches de levures, isolées au niveau du laboratoire de Génie Microbiologique et Applications (S6, S10, S18 et S19) à partir des sols sahariens (ville de M'GHEIER dans la wilaya de BISKRA ; Sud-est Algérien), sont testées pour leur potentiel antimicrobien.

Le test de l'activité antimicrobienne sur le milieu Muller-Hinton a révélé trois souches de levures (S10, S18 et S19) à activité antibactérienne contre *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603. La souche levurienne S19 est la plus performante.

Aucun effet inhibiteur n'est décelé vis à vis de la levure *Candida albicans* par l'ensemble des isolats de levures testés.

Pour son identification, la souche S19 a subi des tests morphologiques, biochimiques et physiologiques. L'analyse des résultats semblent l'apparenter au genre *Candida*.

L'étude de l'effet de la température et du pH sur l'activité antimicrobienne, montre que les substances bioactives sont produites par cette souche à 28°C et à pH 4,5.

Le chromatogramme affiche un profil du surnageant (révélé par la ninhydrine à 0.3 %) identique à celui du milieu avant l'ensemencement. Les spots, pris un à un, ne possèdent aucune activité vis-à-vis de *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603.

Conclusion : la substance antibactérienne synthétisée par la levure S19 ne semble pas être de nature peptidique ou protéique.

Mots clés : Levures killer-Toxines killer -Activité antimicrobienne-Sol-Bactéries pathogènes-*Candida albicans*.

Soutenu le : 23-01-2011

Devant le jury :

Président :	BOUSSEBOUA .H	Professeur	Univ. Mentouri Constantine
Rapporteur :	MERAIHI .Z	Professeur	Univ. Mentouri Constantine
Examineur :	MECHAKRA .A	M.C	Univ. Mentouri Constantine
Examineur :	KITOUNI .M	M.C	Univ. Mentouri Constantine