



Université des Frères Mentouri, Constantine 1
Faculté des sciences de la nature et de la Vie
Département de Biologie appliquée



Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Microbiologie et Hygiène Hospitalière

Intitulé :

Optimisation de la production de protéase par
Bacillus sp. ayant un effet contre
Candida albicans

Présenté et soutenu par : Mlle MAKONGE Flora Edward le 24/07/2019

Jury d'évaluation:

Président : Mr BELMAHI H.

Pr. CHU Constantine.

Reporteur : Mme YOUCEF-ALI M.

Dr. UFM Constantine 1.

Examinatrice: Mme BENHAMDI A.

Dr. UFM Constantine 1.

Année universitaire

2018/2019

Remerciements

Je tiens exprimer mon remerciement et ma profonde gratitude avant tout au bon Dieu qui nous a donné la force et la volonté d'élaborer ce modeste travail.

Je tiens à adresser nos remerciements les plus sincères et chaleureux à Mme YOUCEF-ALI M ; docteur à l'université frères Mentouri d'avoir assuré mon encadrement.

Je tiens aussi à exprimer toute ma gratitude à Mr BELMAHI H ; Professeur au centre Hospitalo-Universitaire de Constantine pour avoir accepté la présidence de ce jury.

Mes vifs remerciements s'adressent aussi à Mme BENHAMDI ; docteur à l'université frères Mentouri, qui a accepté d'examiner mon travail avec bienveillances.

Enfin, je remercie toute l'équipe du laboratoire LaMyBAM et tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à :

Mes chers parents

Mes frères et mes sœurs

Mes amis

Toute ma famille.

Liste des abréviations

CVV	Candidose vulvovaginale
GN	Gélose nutritive
IFI	Infection fongique invasive
IN	Infection nosocomiale
Co	Candidose orale
SAB	Sabouraud
TSI	Triple sugar iron

Liste des figures

Figure 1 : Phylogénie des principales espèces pathogènes du genre <i>Candida spp</i>	3
Figure 2 : <i>C. albicans</i> : reproductions asexuée et parasexuée.....	5
Figure 3 : Morphologie de <i>C. albicans</i>	5
Figure 4 .Représentation schématique de la paroi de <i>Candida albicans</i>	7
Figure 5 : Les cibles des antifongiques.....	11
Figure 6 : Représentation schématique des stérols et de l'amphotéricine B.....	11
Figure 7 : Structure des antifongiques triazolés.....	12
Figure 8 : Les Structures chimique des echinocandiens.....	12
Figure 9 : les étapes de germination des endospores chez <i>Bacillus</i>	14
Figure 10 : Inhibition, <i>in vitro</i> , du développement de <i>C. albicans</i> par l'isolat SoB.....	29
Figure 11 :Etude macroscopique des colonies bactérienne sur milieu GN et 868.....	30
Figure 12 : Aspect microscopique de l'isolat SoB sous microscope optique avec un grossissement X100, (A) observation à l'état frais ; (B) coloration de Gram.....	30
Figure 13 : Spores d'isolat SoB observées sous microscope optique (GX40).....	31
Figure 14 : Résultat positive catalase.....	31
Figure15 : Resultat négative d'oxydase.....	32
Figure 16 : Test de nitrate réductase, la bactérie SoB produit les nitrites après ajout des réactif NR ₁ et NR ₂	32
Figure 17 : Détermination de la voie d'attaque des glucides, la souche SoB possède un métabolisme oxydative	33
Figure 18 : Voie d'utilisation des sucres par la souche SoB. Le milieu est devenu jaune signifiant la fermentation du lactose (ou le saccharose) et le glucose.....	33
Figure 19 : Détection de l'activité protéase développée par l'isolat SoB.....	34
Figure 20 : Courbe montrant l'activité protéolytique à différent pH.....	35
Figure 21 : Courbe montrant l'activité protéolytique à différents températures.	36
Figure 22 : Courbe montrant l'activité protéolytique à différentes concentrations en glucose.....	37

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification du genre <i>Bacillus</i>	15
Tableau 2 : Principales classes d'enzymes.....	17
Tableau 3 : Classification des protéases	18
Tableau 4 : Valeurs de l'activité protéolytique et de la densité optique dans différents pH.....	35
Tableau 5 : Valeurs de la densité optique et de l'activité protéolytique dans différentes températures.....	36
Tableau 6 : Variation de l'activité enzymatique et de la densité optique en fonction de la concentration en glucose.....	37

Table des matières

1. Introduction	1
2. Revue bibliographique	2
2.1- Généralités sur <i>Candida spp.</i>	3
2.2- <i>Candida albicans</i>	3
2.2.1- Généralité.....	4
2.2.2- Taxonomie.....	4
2.2.3 –Morphologie.....	6
2.2.4- Ecologie.....	6
2.2.5 - La structure cellulaire.....	6
2.2.6 -La paroi.....	7
➤ Rôles de la paroi cellulaire.....	8
2.3-Epidémiologie et pouvoir pathogène.....	8
2.3.1- Facteurs intrinsèques (liés à l'hôte).....	8
2.3.2-Facteurs extrinsèques (iatrogènes).....	8
2.4- les candidoses.....	9
2.4.1- Candidose superficielle.....	9
2.4.2- Candidose invasive.....	10
2.4.3 -Candidose profondes.....	10
2.5- Traitements des candidoses ; Mode d'action des antifongique.....	10
2.5.1 Cibles cellulaire.....	10
2.5.2 – les mécanismes de résistance.....	12
2.6- Généralités sur <i>bacillus</i>	13
2.6.1- Taxonomie du genre <i>Bacillus</i>	13
2.6.2-La germination des endospores.....	14
2.6.3- Habitat de <i>Bacillus sp</i>	14
2.6.4- Identifications du genre de <i>Bacillus</i>	15
2.7- Généralités sur les enzymes pour la dégradation de la paroi fongique.....	16
2.7.1 -les enzymes.....	16

2.7.2- Les enzymes protéolytiques.....	16
2.7.2.1 Classification des protéases.....	18
2.8- les protéases d'origine microbienne.....	19
2.8.1- protéases des moisissures.....	19
2.8.2 -Protéase des levures.....	19
2.8.3-Protéase des bactéries	19
2.9-Intérêt des souches des souches de <i>Bacillus</i>	20
2.9.1- Production des composés antimicrobiens.....	21
2.9.2 - La lutte biologique	21

3-Matériel et méthodes

3.1-Origine des souches utilisées.....	22
3.2 - Réactivation de souche bactérienne.....	22
3.3-Etude de l'activité anti- <i>C.albicans</i> par l'isolat SoB (test d'antagonisme).....	22
3.4- Etude morphologique de l'isolat SoB.....	22
3.4.1- Observation macroscopique.....	23
3.4.2-Observation microscopique.....	23
3.4.2.1-Observation à l'état frais.....	23
3.4.2.2- Coloration de Gram	23
3.4.2.3-Test de sporulation.....	23
3.5- Etude de quelque caractère biochimique de l'isolat SoB....	23
3.5.1 Le test catalase.....	23
3.5.2-Test d'oxydase.....	24
3.5.3- Test de nitrate réductase.....	24
3.5.4-Détermination de la voie d'attaque des glucides.....	24
3.3.5-Détermination de la voie d'attaque des sucres (TSI).....	25
3.6 Test de production de protéase.....	26
3.7- Dosage de l'activité enzymatique.....	26
3.7.1- Principe.....	26
3.7.2 -La réaction enzymatique.....	26

3.7.3 - Protocole de dosage.....	27
3.8- Optimisation de la production d'enzyme protéase par l'isolat SoB.....	27
3.8.1- Optimisation du pH	27
3.8.2- Optimisation de la température.....	28
3.8.3- Optimisation de la composition milieu de culture.....	28

4. Résultats et discussion

4.1-Réactivation des souches.....	29
4.2 –Etude de l'activité <i>anti</i> – <i>Candida albicans</i>	29
4.3- Etude morphologique.....	29
4.3.1- Observation macroscopique.....	29
4.3.2 -Observation microscopique.....	30
4.3.3 -Test de sporulation.....	31
4.4- Caractérisation de quel que caractères biochimiques permettent de l'isolat SoB.....	31
4.4.1-Test catalase.....	31
4.4.2- Test d'oxydase.....	32
4.4.3 - Test de nitrate réductase.....	32
4.4.4 -Détermination de la voie d'attaque des glucides.....	33
4.4.5 -Détermination de la voie d'utilisation des sucres (glucose, lactose, saccharose) et du sulfate ferreux (TSI).....	33
4.5-Test de production de protéase	34
4.6 -Optimisation de la production d'enzyme protéase par <i>Bacillus sp.</i>	35
4.6.1 Optimisation du pH	35
4.6.2 Optimisation de la température.....	36
4.6.3 Optimisation de composition de milieu de culture.....	36
5- Conclusion et perspectives.....	38

Résumé

Abstract

ملخص

6-Références bibliographiques

7-Annexes

Introduction

1. Introduction

Depuis plusieurs années, la fréquence des infections fongiques à connu une augmentation dramatique en se classant au quatrième rang des infections nosocomiales (IN). Cette émergence est liée aux insuffisances encore perceptibles constatées lors des traitements des mycoses, la recrudescence des maladies microbiennes et la résistance de plus en plus rapide des microorganismes aux antibiotiques (Nafis *et al.*,2017).

Avec l'augmentation des situations d'immunodéficience, les infections fongiques sont devenues aujourd'hui à travers le monde une cause importante de mortalité. Ces infections sont déterminées par deux types de micro-organismes, les champignons filamenteux et les levures. Parmi ces dernières,

Le *Candida albicans* est plus couramment impliqué dans les infections fongiques chez l'homme, représente aujourd'hui un problème sérieux pour la santé publique (Papon *et al.*,2013) ,allant des candidoses superficielles aux candidoses profondes ou systémiques(François *et al.*.2013).

Tout cela révèle, la nécessité de recherche de nouvelles substances pour lutter contre ce genre d'infections, et ce, en accordant un intérêt à l'étude des microorganismes du sol qui peuvent former un réservoir de substances bioactives, en particulier, les enzymes de dégradation de la paroi fongique.

De ce fait, l'objectif de notre travail repose sur la mise en évidence et la caractérisation de l'activité anti-*Candida albicans* par une souche bactérienne d'origine tellurique, ainsi que mise en évidence de son pouvoir producteur d'enzyme protéase.

En effet le travail porte sur :

- 1- L'étude, *in vitro*, de l'activité anti- *C. albicans* par l'isolat bactérien SoB sur milieu solide ;
- 2- L'identification morphologique et biochimique de l'isolat SoB ;
- 3- La production de l'enzyme protéase sur milieu spécifique par la bactérie SoB ;
- 4- Le dosage de l'activité protéolytique ;
- 5- L'optimisation de la production d'enzyme protéase par la bactérie SoB, en se basant sur le pH, la température et la composition du milieu de culture.

Revue Bibliographique

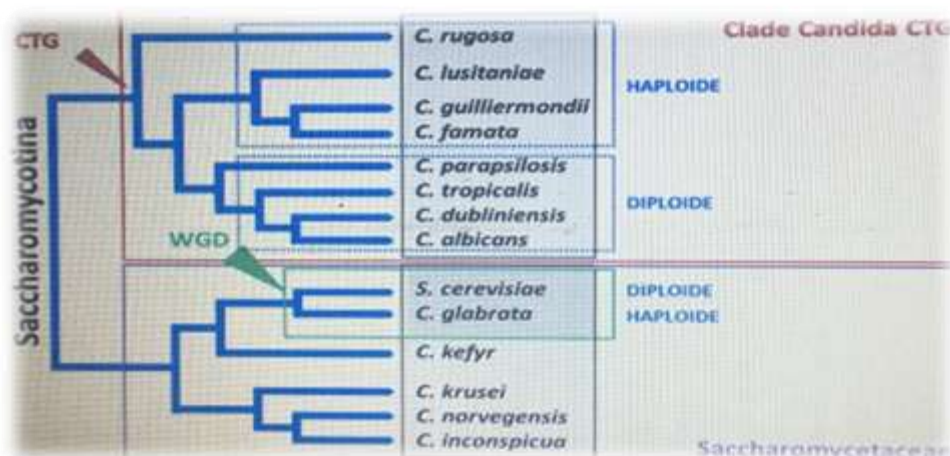
2. Revue bibliographique

2.1- Généralités sur les *Candida spp.*

Les champignons ou mycètes sont des organismes eucaryotes, uni-ou pluricellulaires, thallophytes, non chlorophylliens. Ces organismes sont immobiles et hétérotrophes : incapables de photosynthèse, ils se développent à partir d'une source extérieure de carbone en tant que saprophytes, parasites ou par symbiose. La structure du thalle ou appareil végétatif permet de distinguer deux types de micromycètes les champignons filamenteux (thalle pluricellulaire, sous forme de filament ou hyphes) regroupant les moisissures et les dermatophytes, et les levures (thalle unicellulaire, circulaire ou ovoïde). Certains champignons dits dimorphiques possèdent des morphologies différentes à l'état saprophytique (forme filamenteuse) et à l'état pathogène (forme levure) (Bouchara J-P *et al.*,2010).

Le genre *Candida spp.*, appartient au phylum des ascomycètes (Ascomycota) et au sous-phylum Saccharomycotina regroupant les "levures vraies" (James TY *et al.*,2006).

Il comprend plus de 350 espèces de levures ubiquitaires. La plupart d'entre elles n'ont pas la capacité de croissance à 37°C, et seule une minorité d'espèces (environ 10%) est impliquée en pathologie humaine. Le genre *Candida spp.* est un groupe polyphylétique (Figure 1). La plupart des espèces de *Candida spp.* impliquées en pathologie humaine appartiennent à un même clade, le clade CTG, caractérisé par un code génétique alternatif : le codon CUG est traduit en sérine et non en leucine. Ce clade *Candida* peut être divisé en deux sous-clades : l'un contenant des espèces diploïdes fréquentes en pathologie humaine comme *Candida albicans*, *C. tropicalis* et *C.parapsilosis*, l'autre contenant des espèces haploïdes plus rares parmi lesquelles *C. lusitaniae*. L'espèce *C.glabrata* appartient au Saccharomycetaceae, et plus précisément au clade WGD (whole-genome duplication) : cette levure haploïde est génétiquement plus proche de *Saccharomyces cerevisiae*, que des autres espèces du genre *Candida spp.* (Bennet RJ et Papon et Al., 2010 et 2013).



Phylogénie des principales espèces pathogènes du genre *Candida spp.* (Papon, 2013)

2.2- *Candida albicans*

2.2.1- Généralité

Les levures sont des champignons microscopiques unicellulaires se multipliant par bourgeonnement. Le *candida albicans*, souvent associé à un champignon microscopique, est un microorganisme de la famille des levures qui se trouvent normalement dans l'organisme humain en quantité relativement limitée (Pfaller et Diekema, 2007) Cette levure représente la cause de pathologies graves et dont la fréquence reste constante malgré le développement de nouveaux moyens thérapeutiques, en particulier chez des patients immunodéprimés (Anofel, 2007).

Candida albicans fait partie de notre microflore naturelle - ou des micro-organismes qui vivent habituellement dans ou sur notre corps. On peut le trouver dans le tractus gastro-intestinal, la bouche et le vagin. La plupart du temps, cela ne pose aucun problème, mais il est possible que des surcroissances et des infections se produisent. *Candida albicans* est la cause la plus répandue d'infections fongiques chez l'homme. Son nom d'espèce, *Albicans*, vient du mot latin

"blanc". La levure apparaît blanche lorsqu'elle est cultivée sur une plaque. Et dans le cas de certaines infections, comme le muguet, cela peut créer des plaques blanches. (Jill Seladi-Schulman., 2018)

2.2.2.- Taxonomie

Le genre *Candida* comprend environ 154 espèces. Parmi ceux - ci, six sont le plus souvent isolées dans les infections humaines. Bien que *Candida albicans* est l'espèce la plus abondante et importante, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* et *Candida lusitaniae* sont également isolés comme agents pathogènes de *Candida* infections ; (<https://drfungus.org/knowledge-base/candida-species/>) *Candida* peut être divisé en deux sous-clades : l'un contenant des espèces diploïdes fréquentes en pathologie humaine comme *Candida albicans*, *C. tropicalis* et *C. parapsilosis*, l'autre contenant des espèces haploïdes plus rares parmi lesquelles *C.lusitaniae*.

Embranchement	Fungi
Division:	Ascomycota
Sous-division	Ascomycotina
Classe	Ascomycètes
Sous classe	Hémiascomycètes
Order	Saccharomycète
Famille	Saccharomycetaceae
Genus	<i>Candida</i>
Espèce	<i>Candida albicans</i>

La classification généralement admise de *C.ablicans* (Bialkova et Subik, 2006)

2.2.3-Morphologie

➤ Caractéristique morphologique

Le genre *Candida* compte un peu moins de 200 espèces et regroupe des levures non pigmentées, non capsulées, à bourgeonnement multilatéral, produisant sauf pour *C. glabrata* des filaments. (Anofel., 2014)

Le *C. albicans* peut se présenter sous trois formes principales : levure, pseudo-filament et filament (Figure 2). La forme levure est une cellule ronde à ovale de 4-6 x 6-10 µm, ayant la capacité de se multiplier par bourgeonnement. La forme filament (ou hyphe) se développe à partir d'une levure non bourgeonnante (ou blastopore) : aucune constriction n'est observée au niveau de la jonction

avec la cellule-mère. Le filament possède des bords parallèles sur toute sa longueur. A l'inverse, la forme pseudo-filament est caractérisée par la présence d'une constriction au niveau de la jonction avec la cellule-mère, ainsi qu'à chaque jonction secondaire. De plus, la largeur et la longueur des pseudo filaments sont très variables (Noble et Al., 2017, Sudbery *et al.*, 2011, Sudbery P *et al* 2004).

La transition morphologique levure-filament est associée à la capacité d'invasion et à la virulence de *C. albicans* (Sudbery et Al., 2011, Gow *et al* 2012).

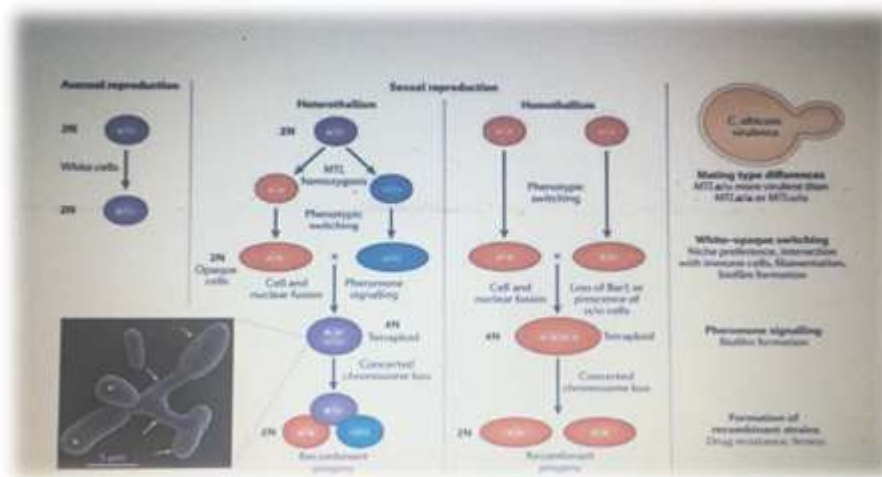


Figure 2 : *C. albicans* : reproductions asexuée et parasexuée (Ene, 2014)

Enfin en conditions hostiles comme l'hypoxie ou la privation de nutriments, *C. albicans* peut Produire des chlamydospores, cellules sphériques caractérisées par la présence d'une paroi épaisse. Ces formes n'ont toutefois jamais été observées in vivo.

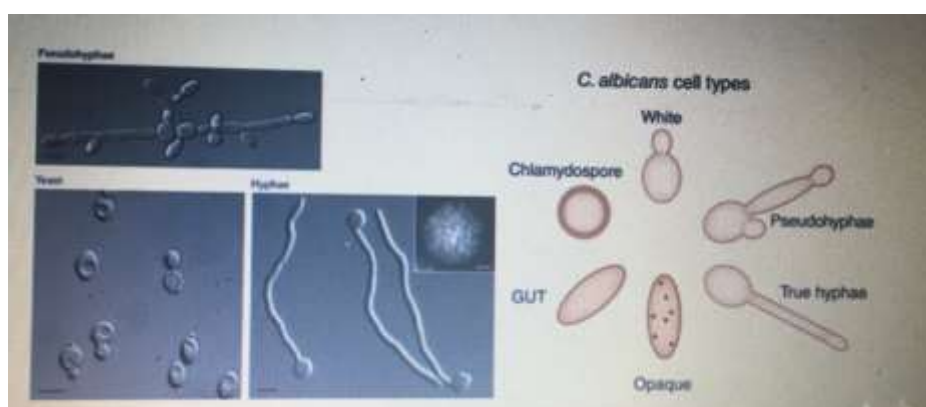


Figure 3 : Morphologie de *C. albicans*(Sudbery, 2011 et Gow, 2013)

2.2.4-Ecologie

Les levures *Candida* sont utilisées pour obtenir une grande variété de substances biotechnologiques. des composés intéressants comme les alcools supérieurs, les acides organiques, les esters, le diacétyle, les aldéhydes, les cétones, acides dicarboxyliques à longue chaîne, xylitol et glycérol. *Candida* domine dans une grande variété d'habitats riches en nutriments. Ces habitats sont associés avec des plantes, de la végétation en décomposition et des insectes qui se nourrissent de plantes. Insectes (drosophiles, abeilles et bourdons, etc.) agissent en tant que vecteurs et les levures sont une source de nourriture importante pour les stades larvaire et adulte de nombreux insectes. Certaines espèces de *Candida* telles que *C. famata*, *C. guilliermondii*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* et d'autres peuvent être isolés d'eaux ou de sédiments naturels et pollués. Autres espèces comme *C. glabrata* et *C. parapsilosis* sont souvent isolés des fruits de mer; (García *et al* 2018).

Le *Candida* couvre de nombreux habitats qui déterminent un large éventail de propriétés physiologiques. La plupart de *Candida* est mésophile et pousse bien à des températures de 25 à 30 ° C, avec des extrêmes inférieurs à 0 ° C et plus à 50 ° C. Le genre *Candida* n'a pas de capacité photosynthétique ni d'azote fixe et ne peut normalement pas grandir anaérobiquement.

2.2.5- La structure cellulaire

Candida albicans est un eucaryote avec un noyau, une double membrane nucléaire, des chromosomes, des mitochondries et des inclusions lipidiques. Il existe également dans ces cellules des enzymes de type phosphatase, oxydase et peroxydase (Bourée,2001). La seule structure différenciant la levure d'une cellule eucaryote « classique » est la présence d'un système vaculo-vésiculaire, évoluant en relation avec le cycle cellulaire et la division et impliqué en majeure partie dans la synthèse de la paroi (Barelle *et al.*,2006). Cette dernière donne à la levure sa forme et sa stabilité mécanique. Elle est aussi une zone de contact entre la cellule et son environnement (Ruiz-Herrera, 2006).

2.2.6 -La paroi

La paroi et ses constituants (Figure 04) jouent un rôle important dans les mécanismes de reconnaissance de la levure par l'hôte (Jouault *et al.*,2009). En effet, elle est le point de contact/d'échange avec l'hôte, mais aussi de communication avec l'extérieur. C'est un déterminant antigénique puissant responsable de l'adhérence de la levure à l'hôte (Sundstrom, 2002 ;Gozalbo *et al.*,2004, Ruiz-Herrera, *et al.*,2006).

C'est une structure complexe et dynamique représentant 15 à 20% du poids sec de la cellule. Sa composition particulière lui fournit une protection contre les agressions physiques, chimiques, biologiques, et détermine sa morphologie. Elle est formée en grande partie de polysaccharides (90%), protéines et lipides (Reiss *et al.*, 1992).

Plusieurs couches ont été identifiées :

- Une couche interne constituée de mannoprotéines enzymatiques et structurales - Une couche intermédiaire composée de β -glucanes et de chitine (Klis,1994), ainsi que de protéines ancrées GPI et de protéines Pir (Proteins with Internal Repeats) (Kapteyn *et al.*, 1999).
- Une couche externe formée de mannoprotéines enzymatiques, structurales, du phosphopeptidomannane (PPM ou mannane) et du phospholipomannane (PLM) (Poulain *et al.*, 2002)

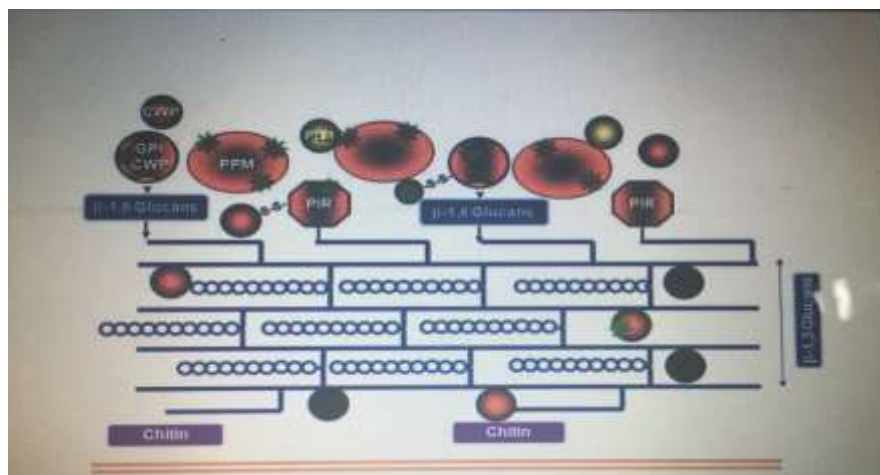


Figure 4 : Représentation schématique de la paroi de *C. albicans* adaptée de (Smits *et al.* 2001 par D. Poulain)

➤ Rôles de la paroi cellulaire

La surface de la cellule a deux rôles essentiels: maintenir l'intégrité de la cellule et interagir avec l'environnement. Une paroi cellulaire rigide fournit la surface qui entoure la cellule. La surface est le point de contact entre la surface du microbe et celle de l'hôte, y compris les cellules phagocytaires. Il peut également être la cible de la réponse anticorps. De plus, les microbes commensaux présents dans les biofilms situés à la surface des muqueuses ou les microbes présents dans les biofilms formés sur des dispositifs médicaux et des prothèses présentent des interactions de surface.

2.3 -Epidémiologie et pouvoir pathogène

Les *Candida* sont des levures, micro-organismes endogènes ou exogènes, dont le pouvoir pathogène ne s'exprime qu'en présence de facteurs favorisants locaux ou généraux. Les candidoses peuvent donc être des infections opportunistes dont les causes sont très variées. Le spectre clinique s'étend des formes localisées (cutanées et/ou muqueuses), d'une grande fréquence en médecine générale, aux atteintes invasives rencontrées chez les patients hospitalisés cumulant de nombreux facteurs de risque et dont le pronostic est souvent réservé. La seule présence de ces levures n'est pas synonyme de maladie, car l'isolat responsable de l'infection est le plus souvent celui que le malade héberge spontanément. Les atteintes invasives sont un exemple d'infections nosocomiales (Anofel., 2014)

L'épidémiologie des candidoses, aussi bien superficielles que profondes, a été marquée par une augmentation majeure de leur fréquence durant les 25 dernières années, liée en grande partie à l'accroissement du nombre des patients à risque.

Les facteurs favorisants des candidoses Les facteurs favorisants peuvent être décomposés en facteurs intrinsèques ou extrinsèques.

2.3.1-Facteurs intrinsèques (liés à l'hôte)

Les facteurs liés à l'hôte sont multiples. Ils peuvent être physiologiques (Nouveau-né, vieillard, surcharge pondérale, grossesse), locaux (transpiration, macération, irritations...) ou liés au terrain du patient (diabète, immunodépression en particulier au cours de l'infection à VIH, d'une hémopathie maligne ou d'un cancer) (Anofel,2014).

2.3.2-Facteurs extrinsèques (iatrogènes)

Les facteurs iatrogènes sont également très divers et comprennent l'usage de corticoïdes, immunosuppresseurs, l'antibiothérapie à large spectre et les antiseptiques, la toxicomanie intraveineuse, les gestes chirurgicaux (chirurgie digestive, cardiaque) ; la transplantation d'organes ou bien encore la pose de dispositifs intravasculaires (cathéters veineux centraux notamment) (Anofel,2014).

2.4-les candidoses

La candidose est une infection courante de la peau, de la cavité buccale et de l'œsophage, du tractus gastro-intestinal, du vagin et du système vasculaire de l'homme. *Candida albicans* est l'agent le plus impliqué dans la candidose humaine. Habituellement, cette levure agit comme un

microorganisme saprophyte commun de la microflore humaine normale (Calderone *et al.*,2001). Cependant, il peut soumettre une transition de phase commensale à une phase pathogène pour devenir un agent pathogène opportuniste (Papon *et al.*,2013) Bien que la plupart des infections surviennent chez des patients immunodéprimés, elles vont d'infections mineures à graves et fatales (McCullough *et al.*,1996).

2.4.1 -Candidose superficielle

Les champignons (levures) du genre *Candida* peuvent provoquer des infections superficielles touchant les muqueuses et la peau et des infections viscérales : elles peuvent se limiter à un organe ou disséminer à travers l'organisme. (Françoise Dromer ,2013) ;

Ces formes cutanéomuqueuses sont le plus souvent bénignes. Cependant des formes graves, chroniques ou récidivantes peuvent être observées. La levure *Candida albicans* est responsable de presque tous les cas de candidoses buccales et oesophagiennes et de plus de 80 % des candidoses vaginales (Ruhnke, 2002). En effet, les *Candida* sont les plus fréquemment isolés de la cavité buccale et sont détectés chez environ 31 à 55 % des individus sains; (Gudlaugsson *et al.*,2003).

2.4.2- Candidose invasive

Le genre de *Candida* peut occasionner des candidoses invasives. On parle généralement de ce type de candidose lorsqu'il se produit un passage des *Candida* au travers de la barrière cutanéomuqueuse .L'émergence des infections fongiques invasives (IFI) dans les pays industrialisés est une conséquence des techniques de soins modernes, qui permettent la prise en charge de patients très fragilisés. Les candidoses sont les plus fréquentes des IFI. Elles sont en majorité endogènes, à partir de la flore commensale du patient. (Alain Bonnin.,2012).

Les candidoses invasives ont des signes cliniques peu spécifiques par la fièvre résistante aux antibiotiques, choc septique avec des manifestations cutanées (maculo-papules), cardiaques (endocardite),cérébro-méningées,ostéo-articulaires(ostéomyélites,spondylodiscites), oculaires (choriorétinite, endophtalmie avec vitrite), hépatospléniques, ..., chez des patients de réanimation, d'onco-hématologie (aplasies), dans les transplantations d'organes, les grands brûlés, ... Les aspects particuliers de l'infection à VIH/Sida sont les candidoses oro-pharyngée et oesophagienne (Professeur Pierre Aubry *et al.* ,2018).

2.4.3- Candidose profondes

Le nombre de candidoses profondes telles que les bactériémies à *Candida* (candidemies) a été multiplié par 12 entre 1981 et 1992, et elles occupent le quatrième rang des bactériémies nosocomiales aux USA (Pittet et Wenzel, 1995; Edmond *et al.*, 1999; NNIS, 2002). Du fait de leur survenue au cours des traitements des pathologies lourdes chez des patients fragiles ou immunodéprimés, les candidoses profondes se déclarent le plus souvent à l'hôpital et sont donc considérées comme des infections nosocomiales (appelées aussi, infections liées aux soins). *C. albicans* est responsable d'environ 50% des candidoses profondes devant *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* et *C. krusei*.

2.5 -Traitements des candidoses ; Mode d'action des antifongiques,

Les antifongiques sont des molécules capables d'affecter spécifiquement les différents champignons impliqués en mycologie médicale, ou au moins, de réduire leur prolifération. Contrairement au grand nombre d'antibiotiques et malgré d'importants progrès, la quantité d'antifongiques disponibles reste limitée à un petit nombre de produits (Anofel, 2007).

Il existe actuellement plusieurs antifongiques systémiques appartenant à quatre classes pharmacologiques, chaque famille possédant un mode d'action particulier (Dannaoui, 2013).

2.5.1-Cibles cellulaire

Les antifongiques systémiques utilisés pour traiter les infections fongiques disséminées ou profondes se répartissent en quatre familles chimiques principales et possèdent globalement trois cibles cellulaires chez le champignon : les pyrimidines fluorées agissent sur la réplication d'ADN et la synthèse des protéines ; les polyènes et les azolés ont pour cible l'ergostérol et sa voie de biosynthèse ; les lipopeptides inhibent la biosynthèse de glucanes pariétaux. (accocebery *et al.*, 2006)

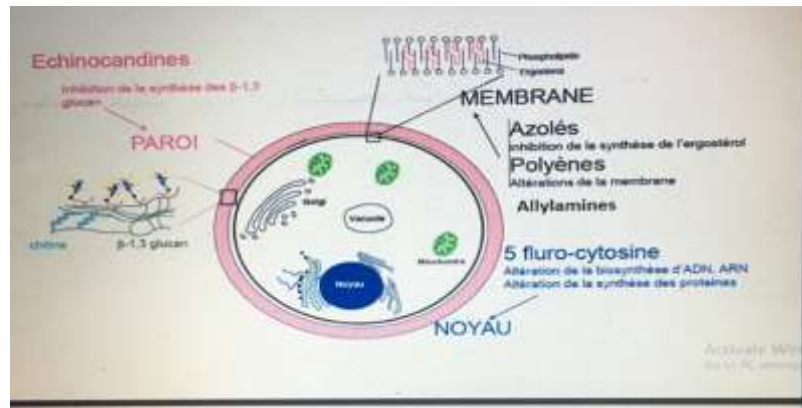


Figure 5 : Les cibles des antifongiques (Bellet, 2017)

- L'amphotéricine B agit en se fixant sur l'ergostérol, qui conduit à la formation des pores dans la membrane

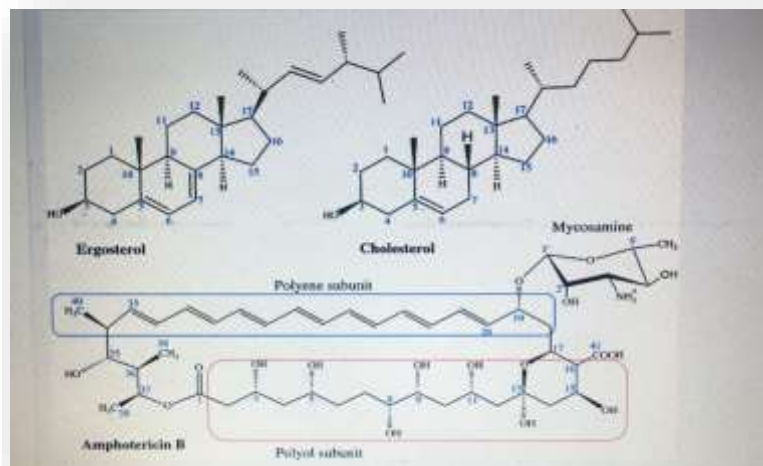


Figure 6 : Représentation schématique des stérols et de l'amphotéricine B (Kamin'ski, 2014)

- Les azolés inhibent la synthèse de l'ergostérol. Ces antifongiques sont fongistatiques sur *Candida spp.* : ils permettent d'inhiber la croissance des levures, sans les supprimer.

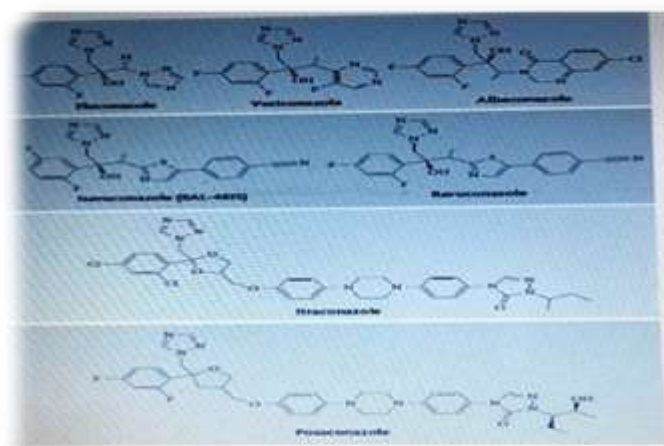


Figure7 : Structure des antifongiques triazolés (Ostrosky-Zeichner, 2010)

- Les échinocandines inhibent la synthèse des 1-3-bêta-glucanes de la paroi.

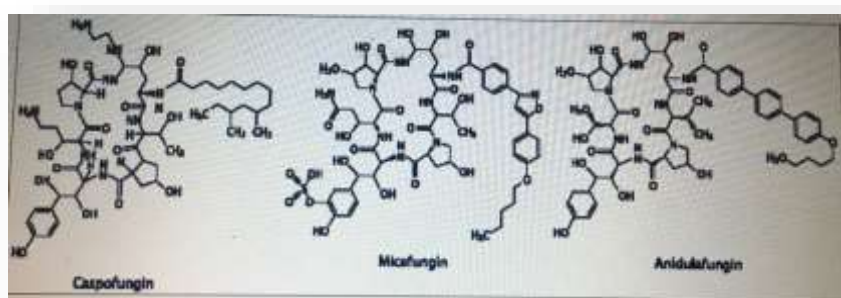


Figure 8 : Les Structures chimique des echinocandiens (Talarmin, 2010)

- La 5-fluorocytosine inhibe la synthèse d'ADN et la synthèse protéique

2.5.2 – les mécanismes de résistance

Les mécanismes de résistance mis en place par certaines souches de champignons sont maintenant mieux connus, en particulier chez les levures du genre *Candida*. Dans la majorité des cas, ces mécanismes reposent soit sur des mutations qui ont pour effet de modifier la cible de l'antifongique ou d'en bloquer l'accès, soit sur la surexpression de gènes codant pour la cible ou pour des transporteurs membranaires impliqués dans un rejet actif de l'antifongique. (Isabelle *et al.*,2006)

La résistance à l'amphotéricine B reste exceptionnelle et peut être liée à une disparition de l'ergostérol membranaire. La résistance à la 5-fluorocytosine peut apparaître rapidement et peut être due à un défaut de pénétration intracellulaire ou à un défaut de transformation en 5-fluorouracil

qui est la molécule active. La résistance aux azolés peut être liée à des mécanismes variés qui peuvent s'associer chez une souche donnée. On en distingue quatre grands groupes qui incluent (i) des modifications de la cible (la 14-alpha-déméthylase) par mutation du gène codant pour l'enzyme, (ii) une surproduction de la cible, (iii) des phénomènes d'efflux, par surproduction de transporteurs, (iv) des altérations d'autres étapes de la voie de synthèse de l'ergostérol. La résistance aux échinocandines est liée à une modification de la cible par mutations des gènes *fks* qui codent pour la bêta-1-3-D-glucane synthase.(Dannaoui,2013)

2.6-Généralités sur *Bacillus*

2.6.1-Taxonomie du genre *Bacillus*

Le genre *Bacillus* appartient au phylum des Firmicutes, découvert pour la première fois en 1872 par Ferdinand Cohn. Les membres ce genre sont des bactéries à Gram positif, formant des endospores. Ils se distinguent des autres bactéries formant des endospores par leur morphologie cellulaire (en forme de bâtonnet généralement), aérobies ou aéro anaérobie facultatifs, par la production de catalase et par leur distribution ubiquitaire (Nicholson, 2002).

Ce genre englobe une variété d'espèces phénotypiquement hétérogènes, présentant un large éventail de besoins nutritionnels, de diversité physiologique et métabolique ainsi que dans la composition en base d'ADN (Claus et Berkeley, 1986).

Historiquement, les espèces ont été regroupées en six grands groupes basés sur de nombreux caractères physiologiques, biochimiques et morphologiques), ainsi que sur la capacité à former des spores (Priest *et al.*,1993)

Les études de la taxonomie numérique ont été un succès pour l'analyse des *Bacillus* provenant des sols et ont contribué à la compréhension de la distribution des espèces de ce genre. La classification moderne est basée sur l'analyse comparative des séquences d'ARNr 16S. Des recherches récentes utilisant cette analyse ont confirmé des niveaux élevés d'hétérogénéité phylogénétique dans ce genre (Garveba *et al.*,2003).

(Rossler *et al.*,1991) regroupent neuf espèces du genre *Bacillus* en quatre groupes. (Ash *et al.*,1991) ont séparé 51 espèces du genre *Bacillus* en cinq groupes phylogénétiquement distincts.

Ce genre regroupe un grand nombre d'espèces très répandues dans la nature.

Les caractérisations génotypiques et phénotypiques complémentaires au niveau des espèces du genre *Bacillus* sélectionnées ont mené à la création de nouveaux genres multiples : *Amphibacillus*

(Niimura *et al.*,1990) ,*Alicyclobacillus* (Wisotzkey *et al.*,1992) ,*Paenibacillus* (Ash *et al.*,1993), *Aneurinibacillus et Brevibacillus* (Shida *et al.*, 1996) ,*Virgibacillus* (Heyndrickx *et al.*, 1998), *Gracilibacillus et Salibacillus* (Wäinö *et al.*, 1999), *Filobacillus* (Schlesner *et al.*, 2001), *Geobacillus* (Nazina *et al.*, 2001), *Ureibacillus* (Fortina *et al.*,2001),*Jeotgalibacillus et Marinibacillus* (Yoon *et al.*, 2001).

De ce fait, l'image finale de la taxonomie du genre *Bacillus* est encore loin d'être établie car de nombreuses espèces initialement décrites comme *Bacillus* ont été transférées vers des genres voisins. Néanmoins, Le genre *Bacillus* comprend plus de 200 espèces et est l'un des plus grands genres bactériens (Logan *et al.*2007).

2.6.2-La germination des endospores

Trois étapes sont impliquées dans le processus de conversion à partir d'une spore à une cellule végétative: activation, la germination et l'excroissance (figure9)

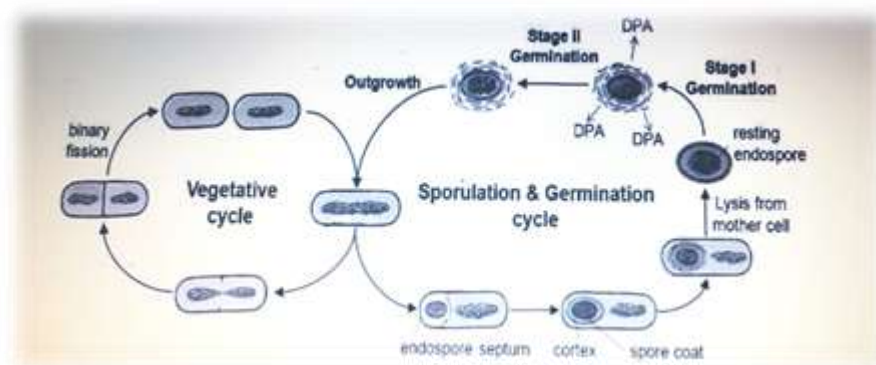


Figure 9 : les étapes de germination des endospores chez *Bacillus* (Ponte *et al.*,2008)

2.6.3- Habitat de *Bacillus sp* .

Leur habitat principal est le sol, pour lequel la variété de la flore en *Bacillus* sera fonction de la richesse en matières organiques (*B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B.cereus*, pour les sols les plus pauvres). La plupart de ces bactéries ont la capacité de désintégrer les protéines, à savoir l'activité protéolytique. Les enzymes protéases ont non seulement une importance industrielle utilisations, mais aussi les protéases de ces micro-organismes jouent un rôle important dans le cycle de l'azote, qui contribue à la fertilité du sol. Dans les sols de rizière, la plupart dès la source d'azote est stockée sous forme de protéine de biomasse et se décompose lentement en acides aminés de bas poids moléculaire par l'activité de la protéase du sol. On pense que la protéase du sol être principalement alimenté par des microorganismes du sol (Belma *et al.*,2000)

2.6.4- Identifications du genre *Bacillus*

Les membres du genre *Bacillus* se trouvent généralement dans le sol et représentent un large éventail de capacités physiologiques, permettant à l'organisme de se développer dans tous les environnements et de rivaliser de manière souhaitable avec d'autres organismes de l'environnement en raison de sa capacité à former des spores extrêmement résistantes et à effets antagonistes sur d'autres micro-organismes (Kuta ,2008).

Tableau 1 : Classification du genre de *Bacillus* (Priest *et al.*,1993).

Groupes	Espèces représentantes	Caractéristiques
Groupe I	<i>B. polymyxa</i> <i>B. subtilis</i>	<ul style="list-style-type: none"> Anaérobies facultatives, fermentent une variété de sucres. Besoins de croissance : vitamines et acides aminés. Sécrètent : amylases, glucanases pectinases et pullulanases.
Groupe II	<i>B. pumilus</i> , <i>B. licheniformis</i> <i>B. amyloliquefaciens</i>	<ul style="list-style-type: none"> Endospores ovales, aérobies stricts pour la plus part des espèces. Certaines espèces sécrètent de nombreuses enzymes extracellulaires : les β-glucanases et protéases
Groupe III	<i>Brevibacillus brevis</i>	Taxonomiquement moins définis.
Groupe 1V	<i>B. sphaericus</i> , <i>B.insolitus</i> , <i>et</i> <i>B.psychrophilus</i>	<ul style="list-style-type: none"> Groupe phylogénétiquement homogène. Tous aérobies stricts. <p>Méso-diaminopimélique du peptidoglycane est remplacé par de la lysine ou de ornithine.</p>
Groupe V	<i>B. stearothermophilus</i>	<p>Thermophiles. Groupe physiologiquement et morphologiquement hétérogènes.</p> <p>Métabolisme diverses allant de la aérobies stricts à des types microaérophiles.</p>
Groupe VI	<i>Alicyclobacillus (genre)</i>	Thermophiles acidophiles.

2.7-Généralités sur les enzymes pour la dégradation de la paroi fongique

2.7.1-Les enzymes

Les enzymes sont des protéines de hautes masses moléculaires (10 000 à 100 000 daltons) et sont constituées de longues chaînes d'acides aminés unis par des liens peptidiques. Ce sont des macromolécules qui appartiennent à la classe des protéines globulaires. Elles sont présentes dans les cellules de tous les organismes vivants où elles jouent un rôle essentiel en contrôlant les procédés métaboliques permettant aux nutriments d'être transformés en énergie et en matériaux cellulaires. Autre fonction importante, les enzymes sont responsables de la dégradation des molécules complexes en molécules plus facilement assimilables (Meunier, 1999).

Les enzymes agissent comme catalyseurs de plusieurs réactions chimiques. Une caractéristique importante des enzymes est leur très grande sélectivité à catalyser des réactions chimiques précises. En effet, contrairement aux agents chimiques qu'elles tendent à remplacer, les enzymes sont très spécifiques. De façon générale, la majorité des réactions enzymatiques peut être représentée de la façon suivante (Meunier,1999) :

Enzyme + Substrat ~ Complexe Enzyme-Substrat ~ Produit + Enzyme

2.7.2-Enzymes protéolytiques(les protéases)

Les *Bacillus* représentent une source d'enzymes industrielles telles les amylases, utilisées dans l'industrie du pain, ou encore des protéases et cellulases, dans l'industrie des détergents (Cho *et al.*,2011). aussi ces *Bacillus* sont d'intérêt pour l'industrie pharmaceutique par la produit un grand nombre de métabolites bioactifs, qui présentent une activité antibactérienne et / ou antifongique

Les enzymes peuvent être divisées en plusieurs classes selon leur action spécifique. Chacune des six classes principales est décrite dans le Tableau 3 (Meunier, 1999).

Tableau 2 :Principales classes d'enzymes selon Meunier (1999).

Classes	Réactions catalytiques
Oxydoréductase	Réactions de transfert d'électrons (ou d'atomes d'hydrogène)
Transférases	Transfert de radicaux (Groupements phosphates, amines, méthyle, etc.)
Hydrolases	Réactions d'hydrolyse (bris d'un lien chimique par addition d'une molécule d'eau)
Lyases	Addition de doubles liaisons à une molécule et enlèvement de groupements chimiques sans hydrolyse
Isomérases	Réactions d'isomérisation (réaction où un composé est transformé en un de ses isomères)
Ligases	Formation de liens chimiques couplés avec la rupture d'ATP

Au niveau industriel, la classe d'enzyme la plus importante est la classe des hydrolases ou enzymes hydrolytiques. En 1998, 75% des enzymes destinées à l'industrie étaient hydrolytiques (Rao *et al.*, 1998).

Les protéases, ou enzymes protéolytiques, font partie de cette classe. En effet, les protéases sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse des protéines, en scindant la liaison peptidique qui lie deux acides aminés dans une chaîne peptidique. Les protéases sont divisées en deux groupes selon leur site d'action, soit les protéases intracellulaires et extracellulaires. (Kalisz, 1988) .

Les protéases intracellulaires sont importantes pour une variété de processus cellulaires et métaboliques comme la sporulation et la différenciation, la maturation d'hormones et d'enzymes, et la maintenance du pool de protéines cellulaires. Ce type de protéase est moins intéressant à utiliser en industrie car ces enzymes nécessitent une étape de lyse cellulaire pour en faire l'extraction. Les protéases extracellulaires, excrétées à l'extérieur de la cellule, sont importantes pour l'hydrolyse des protéines dans l'environnement extérieur de la cellule et aident ainsi la cellule à absorber et à utiliser les produits de cette hydrolyse (Kalisz, 1988).

2.7.2.1 Classification des protéases

La production de protéases par les micro-organismes est fortement influencée par les composants du milieu, en particulier les sources de carbone et d'azote, et par des facteurs physiques tels que la température, le pH, la durée d'incubation, l'agitation et la densité de l'inoculum (Abidi, Ferid *et al.*, 2008). Les protéases se différencient également selon leur mode d'action: les endopeptidases et les exopeptidases. Les deux types de protéases sont divisés en plusieurs classes et sous-classes. Le Tableau 3 présente les classes et sous-classes de protéases.

Tableau 3 : Classification des protéases (Rao *et al.*, 1998).

Types de protéase	
Exopeptidases	<p>Aminopeptidases</p> <ul style="list-style-type: none"> - Peptidyle peptidase - Dipeptidyle peptidases - Tripeptidyle peptidases <p>Carboxypeptidases</p> <ul style="list-style-type: none"> - Sérine carboxypeptidase - Metallo carboxypeptidase - Cystéine carboxypeptidase
Endopeptidases	<p>Protéases sérines</p> <p>Protéases cystéines ou protéases thiols</p> <p>Protéases aspartiques ou protéases acides</p> <p>Métallo-protéases</p>

2.8-Protéase d'origine microbienne

Les protéases se trouvent dans plusieurs microorganismes tels que les protozoaires, les bactéries, les levures et les champignons. Les protéases constituent 60 à 65% du marché industriel mondial, dont la plupart sont des protéases alcalines (Banerjee *et al.*, 1999 ; Ellaiah *et al.*, 2003). Parmi les diverses protéases, les protéases bactériennes sont plus importantes que les protéases animales et fongiques.

2.8.1-protéase des moisissures

Les enzymes fongiques représentent 40% du marché mondiale des enzymes industrielle. Les protéase constituent les enzymes les plus importantes qui peuvent être produites par genres fongique, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Geotrichum*, *Fusarium*, *Rhizomucor*, *Endothia* etc ; Ce groupe d'enzyme dispose de possibilités d'application biotechnologie très entendus, Actuellement elles sont de plus en plus utilisées en boulangerie, dans industrie alimentaire humaine et animale, dans les détergents pour lessives, dans l'industrie des tanneries et l'industrie pharmaceutique (Frazier, 1967 ; Ul,haq *et al.*, 2003)

2.8.2-Protéase des levures

Certaines levures produisent aussi des enzymes protéolytiques, ils s'agissent essentiellement des genres *Saccharomyces*, *Rhodotorula*, *Candida*, *Debaryomyce*., Par exemples produit trois types de protéase ; une aspartyl protéase, une sérine protéase et un métalloprotéase, l'activité protéolytique de ces genres utilisées particulièrement pour l'affinage des fromages (Kresze, 1991 ; Boiron, 1996)

2.8.3-Protéase des bactéries

il s'agit essentiellement de la subtilisine ou subtilase, une protéase produite *par Bacillus subtilis* et quelques genre apparentes, celles-ci est très stable et résiste bien à l'action des détergents, par ailleurs, elle est naturellement excrètes dans le milieu, ce qui facilite sa purification (Calk *et al.*, 2000 ; Fraizer, 1967).

Le genre *Bacillus* étant la source la plus importante, en raison de leur capacité à produire une grande quantité de protéase ayant une activité protéolytique et une stabilité significatives à des températures et un pH élevés. Les protéases microbiennes sont généralement produites par des cellules libres ou immobilisées. (Joo H S *et al.*, 2003) *Bacillus subtilis* est l'une des bactéries les plus largement utilisées pour la production des produits chimiques spécifiques et des enzymes industrielles et également une source majeure d'enzymes d'amylase et de protéase.

Les protéases de *Bacillus* sont des enzymes sécrétées dans le milieu extracellulaire. Parfois leurs productions sont réprimées par l'adjonction en milieu de culture d'un hydrolysate de protéines ou de mélange d'acides aminés (Arnaud et Guiraud, 1993).

Elles sont parmi les enzymes les plus anciennement connues et sécrétées par la plupart des espèces de *Bacillus* telles que : *Bacillus megaterium* et *Bacillus subtilis* (Sastray et Mathur, 1979).

La quasi-totalité des protéases extracellulaires du genre *Bacillus* sont :

➤ **Les protéases alcalines (sérines protéases) :**

Leur appellation est due à leur pH optimum d'action compris entre 9 et 11. Les sérines protéases ont un poids moléculaire compris entre 25 000 et 30 000 et sont caractérisées par la présence d'un résidu sérine au niveau de leur site actif.

Elles sont stabilisées aux hautes températures par les ions Ca^{2+} .

En fonction de leurs propriétés générales, elles peuvent être classées en deux groupes :

Subtilopeptidase A : enzymes sécrétées par *Bacillus licheniformis* et *Bacillus pumilus*.

Subtilopeptidase B : enzymes sécrétées par *Bacillus amyloliquefaciens* et *Bacillus subtilis*.

➤ **Les protéases neutres (métallo protéases)**

Elles ont un poids moléculaire variant entre 32,9 et 47,5 KDa. Les métallo protéases représentent le groupe du métallo endopeptidases ayant une activité maximale à un pH neutre ou se rapprochant de la neutralité.

Les protéases neutres ne présentent aucune activité estérasique. L'insertion de l'ion de zinc au niveau de la molécule enzymatique est primordiale pour son activité

2.9-Intérêt de souche du *Bacillus*

2.9.1-Production des composés antimicrobiens

Le genre *Bacillus* a le potentiel de produire plus de 45 molécules antimicrobiennes ; certains de ces composés ont une valeur clinique, d'autres sont testés in vitro pour contrôler les maladies des plantes et dans la conservation des denrées alimentaires. En fonction de leur voie de biosynthèse, ces métabolites peuvent être regroupés en deux catégories différentes : la première classe comprend les peptides ribosomiques synthétisés, y compris les bactériocines tandis que la seconde

classe comprend les petits peptides synthétisés par voie enzymatique ou par des voies non-ribosomiques (Stein, 2005).

➤ **Production des antibiotiques**

Face au problème de l'émergence de la résistance aux antibiotiques des bactéries pathogènes, Les bactéries qui offrent une grande production de ces molécules sont celles qui appartiennent au genre *Bacillus* (Pinchuk *et al.*,2001). En effet, ce genre est réputé par la production des antibiotiques contre les bactéries, les champignons et les levures. La synthèse de ces substances inhibitrices est décrite par différentes espèces, telles que *Bacillus subtilis*, *Bacillus polymixa*, *B. amyloliquefaciens*, *B. stearothermophilus*, *B. brevis*, *B. thuringiensis*, *B. megaterium*, *B. circulans* et *B. licheniformis* (Whipps,2001 ; Stein,2005) et sont généralement produites au début de la sporulation (Schallmey *et al.*, 2004).

2.9.2- La lutte biologique

L'intérêt pour la lutte biologique contre les agents pathogènes pour les plantes a augmenté au cours de cette dernière décennie dû à l'importance à utiliser des alternatives respectueuses pour l'environnement d'une part et éviter l'utilisation intensive des pesticides chimiques d'une autre part (Ongena et Jacques, 2008). Ce contrôle n'est pas seulement une alternative aux pesticides chimiques, mais il peut également assurer le contrôle des maladies qui ne peuvent être gérées (ou partiellement gérées) par d'autres stratégies (Cook, 1993).

La plupart des espèces du genre *Bacillus* sont bien connues pour leur capacité à contrôler les maladies des plantes et sont considérées comme des microorganismes sans danger. Les bactéries halotolérantes et halophiles de ce genre possèdent des capacités remarquables à synthétiser de nombreuses substances par le biais de divers mécanismes et qui ont été utilisées avec succès dans l'agriculture et pour l'industrie fine (Stein, 2005).

Les métabolites secondaires produits par ces souches ont montré une activité antifongique contre les différents phytopathogènes (Ongena et Jacques, 2008).

Matériel et Méthodes

3. Matériel et méthodes

Le présent travail porte sur l'optimisation de la production de protéase par *Bacillus sp.* utilisé comme agent de lutte contre les *Candidoses*. Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire de Mycologie, de Biotechnologies et de l'Activité Microbienne (LaMyBAM) Université des Frères Mentouri Constantine 1.

3.1- Origine des souches utilisées

La souche bactérienne utilisée dans ce travail, en l'occurrence SoB, est fournie par le LaMyBAM, elle a été isolée à partir du sol de palmeraie de la région de Tolgua et conservée au congélateur dans des cryotubes, tandis que la souche de *Candida albicans* est fournie par le laboratoire de Mycologie-Parasitologie, CHU Constantine, elle est originaire d'un prélèvement buccal d'un patient souffrant de *Candidoses* et conservée à +4°C dans des tubes contenant la gélose Sabouraud inclinée additionnée au Chloramphénicol.

3.2-Réactivation des souches

La bactérie SoB et la levure *C. albicans* ont été réactivées par ensemencement en stries sur la gélose Nutritive (GN) et sur le milieu Sabouraud (SAB) respectivement. Des repiquages consécutifs à 30°C pour SoB et à 37°C pour *C. albicans* ont permis de vérifier la pureté des deux souches.

3.3- Etude de l'activité anti- *C. albicans* par l'isolat SoB (test d'antagonisme)

Le test d'antagonisme de l'isolat SoB vis-à-vis du *Candida*, consiste à rechercher l'activité biologique de cet isolat sur le développement de *Candida albicans*. Ce test est réalisé par la méthode de diffusion sur gélose. Un écouvillon stérile trempé dans la suspension levurienne a servi à ensemercer uniformément toute la surface de la boîte contenant la gélose Sabouraud (annexe 1). Après un séchage de la surface (environ 5min), un disque de 5mm de colonies bactériennes réactivées préalablement sur GN est déposé sur la gélose SAB. Après un deuxième séchage, la boîte de Pétri est incubée à 30°C pendant 24 à 48h. Le diamètre de la zone d'inhibition est mesuré au millimètre près (Errakhi *et al.*, 2007).

3.4 - Etude morphologique de l'isolat SoB

L'identification de l'isolat SoB est effectuée par une observation macroscopique qui repose sur la détermination de l'aspect de la colonie, sa couleur et son revers, et une observation microscopique en considérant la taille, la forme, l'arrangement des cellules, leurs mobilités et leur pouvoir de sporulation.

3.4.1-Observation macroscopique

L'aspect macroscopique des colonies sur milieu gélosé, âgées de 24h, est observé directement à l'œil nu (Guiraud, 1998).

3.4.2- Observation microscopique

3.4.2.1- Observation à l'état frais

L'état frais permet l'observation des bactéries vivantes et la détermination de leur morphologie, de leur mode de regroupement, et surtout, de leur mobilité éventuelle. La méthode consiste à déposer une goutte d'eau distillée ou d'eau physiologique stérile sur la lamelle, puis apporter et dissocier dans la goutte un prélèvement bactérien de la colonie à observer; la lamelle est recouverte par une lame creuse de la manière à obtenir une goutte pendante et l'observation est faite à différents grossissements (40X puis à immersion) (Singleton., 2005).

3.4.2.2-Coloration de Gram

Un frottis est prélevé à partir d'une colonie de 24h, fixé à la chaleur, puis recouvert par le violet de Gentiane (annexe 2) pendant 1min, ensuite l'élimination de ce colorant est effectuée par l'ajout de lugol pendant 1 min. Le frottis est décoloré par de l'éthanol (environ 20 sec). Enfin, une contre-coloration est réalisée avec de la Fuschine (Madigan et Martinko, 2007). L'observation est faite au grossissement 40 X, puis à immersion 100 X.

NB : Les constatations faites à partir des études macroscopiques et microscopiques citées ci-dessus, nous ont orienté vers la possibilité de caractérisation d'une bactérie développant des endospores, ce qui justifie la nécessité de la réalisation d'un test de sporulation.

3.4.2.3-Test de sporulation

Le test consiste à cultiver l'isolat SoB pur dans un Erlen contenant le milieu de culture 863 (annexe 1) suivi d'incubation agitée à 30°C pendant 4 jusqu'à 7 jours. La présence de spores est détectée à l'aide d'une observation microscopique au grossissement (G X 40).

3.5-Etude quelques caractères biochimiques de l'isolat SoB

3.5-1 Test catalase

Le test catalase sert à déterminer si la bactérie possède l'enzyme catalase servant à transformer l'eau oxygénée en eau et oxygène. Elle est mise en évidence par contact de la culture bactérienne

avec une solution fraîche d'eau oxygénée. Une réaction positive se traduit par l'apparition de bulles (Singleton, 2005).

3.5.2-Test oxydase

Ce test permet de mettre en évidence l'enzyme cytochrome oxydase des bactéries. En présence d'oxygène atmosphérique et de cytochrome C, l'enzyme de la bactérie oxyde le réactif phénylènediamine pour former un composé violet, l'indophénol.

Ce test est mis en évidence par contact des colonies bactériennes avec un disque d'oxydase stérile pré-imprégné par le réactif de phénylènediamine (Bibirou,2016). La lecture de ce test est immédiate.

3.5.3- Test de nitrate réductase

La recherche de la nitrate réductase (NR) sur un bouillon nitraté par les réactifs de Griess permet (annexe 3) de mettre en évidence la production des nitrites .Or il y'a deux NR et la réduction des nitrates peut dépasser le stade nitrite (Meyer *et al.*,1994). La technique consiste à cultiver la bactérie à tester dans un tube contenant du bouillon nitrate, et l'incuber à 30°C pendant 48 à 72H. Après incubation, le milieu est examiné pour savoir si 'il y'a réduction des nitrates en nitrites, pour révéler la présence du nitrite, 0,5 ml de réactif 1 et 0,5 ml de réactif 2 de Griess sont ajoutés. Ces réactifs se combinent à tout nitrite présent pour former un colorant rouge azoïque soluble.

L'absence de coloration rouge peut signifier soit (a) que le nitrate n'a pas été réduit, soit (b) que le nitrite s'est formé mais a été ensuite réduit, par exemple en azote et ammoniac.pour distinguer entre ces deux possibilités, le milieu est testé pour la présence de nitrate et cela en ajoutant une trace de poudre de zinc qui réduit le Nitrate en nitrite,s'il y'a du nitrate (c'est-à-dire s'il n'a pas été réduit par la souche testé),l'addition de zinc fera apparaitre une coloration rouge car le nitrite nouvellement formé se combinera avec les réactifs du milieu (Singleton.,2005).

3.5.4-Détermination de la voie d'attaque des glucides

Cette technique est révélée sur milieu MEVAG contenant un indicateur de PH afin d'étudier l'assimilation de divers glucides et de connaître également la voie d'attaque des sucres (voie oxydative ou fermentaire) (Guiraud, 1998).

La méthode consiste à ensemencer deux tubes dont l'un recouvert d'une couche d'huile de paraffine, par une piqure centrale avec un fil de platine chargé de semence prélevée d'une culture de 18 à 24 heures. Après incubation, trois catégories de bactérie sont distinguées:les bactéries

fermentatives, qui donnent une acidification rapide et égale dans les deux milieux qui deviennent jaunes en 24h sur toute la hauteur de la piqure d'inoculation. Dans le cas où il y'a production de gaz,celui-ci est visible sous la couche de l'huile,les bactéries oxydative,qui révèlent dans le tube fermé peu ou pas de culture,et pas d'acidification (après plusieurs jours, même en l'absence de culture visible, la couleur du milieu peu virer vers des teintes orangées si la huile utilisée est acide, quant au tube ouvert il y'a acidification modérée et assez lente, débutant à la surface ,en 24-48 heures ou parfois d'avantage, jamais de gaz, enfin pour les bactéries inactives il y'a peu ou pas de culture dans le tube fermé, quant au tube ouvert, il y'a culture sans modification du pH(sans d'acidification) ou avec une alcalinisation plus ou moins fort en surface(virage au rouge violet) (Singleton,2005).

3.5.5-Détermination de la voie d'attaque des sucres (glucose, lactose, saccharose) et du sulfate ferreux (TSI)

La gélose TSI Agar contient trois sucres (dextrose, lactose et saccharose), du rouge de phénol pour détecter la fermentation des glucides, et du sulfate ferreux pour détecter la production d'acide sulfhydrique (indiquée par le noircissement du culot dans le tube).Ce test consiste à ensemencer un tube contenant la gélose inclinée Trypticase Soy Agar avec une culture âgée de 18 à 24 h et ce, en piquant le culot et en striant la surface de la pente par une anse de platine. L'incubation est faite à 30°C Pendant 24 heures. Plusieurs cas peuvent se présenter après incubation; si le lactose (ou le saccharose) et le dextrose sont fermentés, une grande quantité d'acide est produite, ce qui fait apparaître l'indicateur rouge du phénol en jaune, en culot et en pente. Certains organismes génèrent des gaz qui produisent des bulles. Si le lactose n'est pas fermenté mais que la quantité de glucose est faible, le culot déficient en oxygène sera jaune (le culot a plus de glucose par rapport à la pente, c'est-à-dire qu'il contient plus de dextrose), si ni le lactose / saccharose ni le dextrose, ne sont fermentés, le culot et la pente seront rouges. La pente peut devenir rouge-violet plus foncé (plus alcalin) à la suite de la production d'ammoniac à partir de la désamination oxydative d'acides aminés. Enfin, si le H₂S est produit, la couleur noire du sulfure ferreux sera visible (Tariq *et al.*,2016).

NB : des répétitions pour tous les tests biochimiques sont effectuées afin de s'assurer des résultats obtenus.

Dans ce travail, l'isolat bactérien SoB a fait l'objet d'une production d'enzyme de dégradation de la paroi fongique à savoir, l'enzyme protéase puisque cette dernière est connue par son pouvoir antifongique (Manjula et Podile, 2005).

3.6-Test de production de protéase

Afin de révéler l'activité protéasique, des colonies bactériennes de 24h de l'isolat à tester ont servis à inoculer un erlen contenant le milieu Luria (annexe1). Après une nuit d'incubation agitée à 30°C, la culture bactérienne est centrifugée à 10000g pendant 20min, le surnageant récupéré est filtré à l'aide de filtres stériles de 0.2µm de diamètre. Le surnageant filtré est testé sur des boîtes de Pétri contenant le milieu protéase (annexe1). Ces boîtes sont incubées à 30°C pendant 24h. La détection de l'activité enzymatique est indiquée par la formation de zone d'hydrolyse (Degering *et al.*,2010).

3.7-Dosage de l'activité protéolytique

Dans le présent travail, l'activité protéolytique a été mesurée par la méthode décrite par Kembhavi *et al.*,(1993).Pour ce faire, et en se basant sur différentes références bibliographiques, un pH équivalent à 7 et une température de 60°C ont été fixées pour l'optimisation de la production de protéase par l'isolat SoB dans différentes conditions de culture bactérienne, à savoir ; pH, température et composition du milieu de culture.

3.7.1 -Principe

Les protéases catalysent l'hydrolyse des protéines en libérant des peptides simples et des acides aminés libres qui se trouvent dans la phase soluble, les molécules non hydrolysées sont précipitées par le TCA, ce qui permet de récupérer les fragments solubles dans le filtrat. Dans ce test, la caséine agit comme un substrat. Lorsque la protéase que nous testons digère la caséine, une tyrosine est libérée avec d'autres acides aminés ainsi que des fragments peptidiques.

3.7.2-La réaction enzymatique

Le mélange réactionnel a été préparé par addition des produits suivants :

- a/ Le surnageant de culture bactérienne, contenant l'enzyme protéase, décongelé juste avant le dosage enzymatique ;
- b/ Le tampon phosphate (KH_2P_04 / Na_2HPO_4 (0,1M), ajusté à pH 7 ;
- c/ La solution de caséine 1% (1g de caséine dans 100ml de tampon pH 7) ;
- d/ Le TCA 20% (20g de TCA dans 100ml de l'eau distillée).

3.7.3-Protocole de dosage

Une portion aliquote de 0,5 ml du surnageant de culture, convenablement diluée (480µl de tampon pH 7 additionné de 20µl de surnageant de culture) a été mélangée à 0,5 ml de tampon pH 7 (KH₂P0₄ /Na₂HPO₄) à 100 Mm contenant 1% de caséine. Le mélange réactionnel a ensuite été incubé pendant 15 min à 60° C. Après incubation, ce mélange a été complété par addition de 0,5 ml d'acide trichloracétique (TCA 20%) suivi d'une deuxième incubation à température ambiante pendant 15 minutes. Enfin, le mélange réactionnel a été centrifugé à 12500 rpm pendant 15 minutes afin d'éliminer le précipité. La matière soluble dans l'acide a été estimée par spectrophotométrie à 280 nm en utilisant un spectrophotomètre UV-visible. Une unité de protéase est définie comme la quantité d'enzyme qui hydrolyse la caséine pour produire une absorbance équivalente à 1µmol de tyrosine/min. La tyrosine servant de référence.

Le calcul de l'activité protéolytique se fait par l'équation suivante:

U/ml =Do x D x d / tps x α avec:

U/ml: activité protéolytique

DO: densité optique

D: facteur de dilution de l'enzyme

d : facteur de dilution des réactions

tps : temps d'incubation de la première réaction

α: pente de la courbe d'étalonnage de tyrosine

3.8- Optimisation de la production d'enzyme protéase par l'isolat SoB

Cette partie a pour but d'optimiser certaines conditions de culture bactérienne afin d'arriver à une meilleure activité protéasique de l'isolat SoB. Les paramètres à optimiser sont: le pH de culture, la température de culture et la composition du milieu de culture.

3.8.1- Optimisation du pH :

Un volume de 1ml de la culture bactérienne, âgée de 24 h, a servi d'inoculer des erlensMeyer contenant le milieu Luria (annexe1) avec différents pH à savoir : 5,6,7, 8, 9 ,10 et 11. Après une nuit d'incubation agitée à 30°C, les cultures bactériennes sont centrifugées à 10000g pendant

20min. Les surnageants récupérés sont filtrés à l'aide de filtres stériles de 0.2µm de diamètre afin de procéder au dosage enzymatique.

3.8.2- Optimisation de la température:

Un volume de 1ml de la culture SoB, âgée de 24 h, a permis d'inoculer quatre erlensMeyer contenant 50ml du milieu Luria à pH7. Les erlens sont incubés sous agitation permanente pendant une nuit à différentes températures en l'occurrence ; 20°C, 30°C, 40°C, et 50°C. Après incubation, les cultures bactériennes sont centrifugées à 10000g pendant 20min. Les surnageants récupérés sont filtrés à l'aide de filtres stériles de 0.2µm de diamètre afin de procéder au dosage enzymatique.

3.8.3-Optimisation de la composition du milieu de culture

Dans le présent travail, certaines modifications ont été apportées sur la composition du milieu de culture, afin d'optimiser la production de protéase par l'isolat SoB. Les modifications ont concerné la concentration du glucose contenue dans le milieu Luria. En effet, des concentrations allant de 0,1% jusqu'à 0,4% de glucose ont été choisies pour lancer les cultures bactériennes. Le choix du glucose a été fait en se basant sur certaines études préalables indiquant l'importance des sources de carbone dans le métabolisme bactérien comme étant une source d'ATP et par conséquent, sur la production d'enzymes par les bactéries (Manoj *et al.*, 1988 ; Ron et Phillips, 2015)

Pour ce faire, des erlens contenant le milieu luria avec différentes concentrations en Glucose à savoir ; 0,1% ,0,3% et 0,4% sont inoculés avec 1ml d'une culture jeune de l'isolat SoB. Le pH et la température sont fixés à 7 et 50°C respectivement. Après une nuit d'incubation sous agitation permanente, les cultures bactériennes sont centrifugées à 10000g pendant 20min. Les surnageants, ainsi, récupérés sont filtrés à l'aide de filtres stériles de 0.2µm de diamètre afin de procéder au dosage enzymatique.

Résultats et Discussion

4. Résultats et discussion

4.1- Réactivation des souches utilisées

Après 24h d'incubation, l'isolat SoB a montré un bon développement sur milieu GN, de même pour la levure *Candida albicans* et ce, après 2 à 3 jours d'incubation sur milieu SAB à 37°C. La pureté des deux souches a été vérifiée à l'aide du microscope à différents grossissement.

4.2- Etude de l'activité *anti* –*Candida albicans*

Ce test tend à étudier la capacité de l'isolat SoB à produire des substances biologiques actives contre *Candida albicans*. L'isolat SoB a montré un développement d'une importante zone d'inhibition de 25 mm de diamètre (figure 10).

En effet, les bactéries sont connues pour la production de substances antimicrobiennes (Prescott *et al.*,2007).Les genres *Acinetobacter*,*Bacillus*,*Pantoea* et *Pseudomonas* présentent une activité protectrice contre le champignon *Botrytis cinerea* (Trotel-Aziz *et al.*,2008),ainsi Badji *et al.*,(2005) ont démontré qu'une souche d'actinomycète isolée à partir du sol de la palmeraie d'Adrar,oasis du Sud-Ouest Algerian, a présenté une activité antifongique vis-à-vis du *Candida albicans* et de sept espèces d'*Aspergillus*, De plus, l'étude effectuée par Mounyr *et al.*,(2015) a révélée qu'une souche de *Bacillus* est capable d'inhiber la croissance de *C. albicans*.



Figure 10 Inhibition, *in vitro*, du développement de *C. albicans* par l'isolat SoB.

4. 3-Etude morphologique

4.3.1- Observation macroscopique

L'examen macroscopique de l'isolat SoB sur milieu GN a révélé un développement rapide après 24h d'incubation. Les colonies bactériennes présentent un aspect visqueux, une couleur crème, une forme et un contour irrégulier (figure 12). Ces observations sont faites directement sur gélose,

à l'œil nu. Ces résultats sont conformes aux caractères généraux du genre *Bacillus sp.* décrits par Madigan *et al.*,(2007).



Figure 11 Aspect macroscopique des colonies de l'isolat SoB sur milieu GN.

4.3.2- Observation microscopique

L'observation à l'état frais et la coloration de Gram ont permis de donner une idée sur la morphologie des cellules bactériennes, sur leur mobilité et sur la composition de leurs paroi. La figure (13, A) représente l'aspect microscopique de la souche après observation à l'état frais sous microscope optique. En effet, la souche se présente sous forme de bâtonnets mobiles tandis que la coloration de Gram (figure 13.B) montre que les bacilles sont de couleur violette, signifiant que la paroi est constituée d'une barrière imperméable à l'alcool à cause de sa composition en peptidoglycanes, ce qui nous a permis de conclure que la souche est de Gram positif. Ces résultats sont identiques à ceux de Madigan *et al.*,(2007), décrivant les différents caractères microscopiques du genre *Bacillus*.

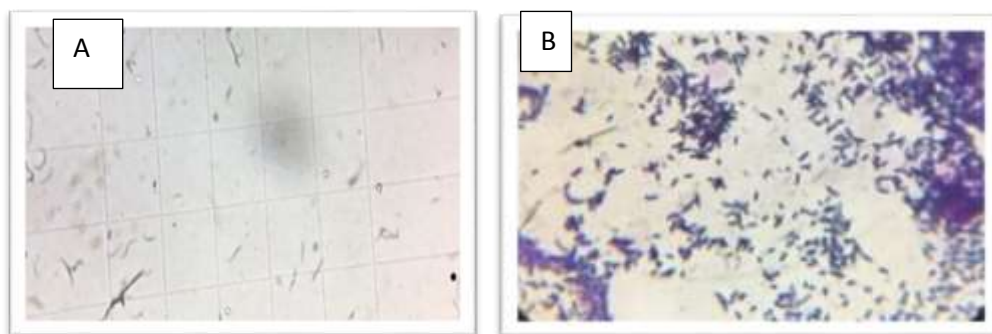


Figure 12 Aspect microscopique de l'isolat SoB sous microscope optique avec un grossissement X100, (A) observation à l'état frais ; (B) coloration de Gram.

4.3.3 Test de sporulation

Après 7 jours d'incubation à 30°C, un prélèvement à partir de la culture liquide obtenue a servi de procéder à une observation microscopique. La figure 14 montre la présence de spores dans la culture en question, ces spores représentent une forme de résistance et de protection pour l'isolat SoB face à des conditions drastiques et à de nombreuses perturbations environnementales comme le manque de nutriments (Ponte *et al.*,2008). En effet, les résultats obtenus correspondent à ceux de Ongena *et al.*, (2007) et Youcef-Ali *et al.*,(2013), qui ont détecté la présence de spores de *Bacillus* après incubation agitée dans le milieu 868. Ces constatations confirment l'appartenance de l'isolat SoB au genre *Bacillus*.



Figure 13 Spores d'isolat SoB observées sous microscope optique (GX40).

4.4 -Caractérisation de quelques caractères biochimiques de l'isolat SoB

4.4.1 -Test catalase

Le test de catalase a montré que la souche SoB est catalase positive (figure15), par la formation de bulles d'air après le dépôt du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 à 3%, Cette enzyme contient du Fer qui catalyse la décomposition du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 (Guiraud, 1998).



Figure 14 Résultat positive du test de catalase de la souche SoB.

4.4.2 –Test oxydase

Ce test a montré que la souche SoB est oxydase négative, car le disque de réactif d'oxydase n'a présenté aucun changement de couleur après son contact avec les colonies bactériennes (figure 16), signifiant que la bactérie en question est oxydase négatif. En effet, le test oxydase détecte un type particulier de chaîne respiratoire qui comporte en fin de chaîne un cytochrome C et l'oxydase associée. La bactérie SoB ne possède pas ce type de chaîne qui peut oxyder des composés chimiques comme le réactif de l'oxydase (diméthyl-paraphénylène diamine) (Bibirou, 2016). Selon Sagar, (2018) certains *Bacillus* notamment, *Bacillus subtilis* sont d'oxydase variable.



Figure 15 Résultat négatif du test d'oxydase de la souche SoB.

4.4.3- Test de nitrate réductase

Le test de la nitrate réductase a révélé que la bactérie en question possède une nitrate réductase positive après le dépôt des réactifs 1 et 2 de Griess, une couleur rouge azoïque apparaît (figure 17) ce qui signifie la présence d'ions nitrite (NO_2^-) combinés aux réactifs (Guiraud, 1998).



Figure 16 Test de nitrate réductase, la bactérie SoB produit les nitrites après ajout des réactif NR_1 et NR_2 .

4.4.4 -Détermination de la voie d'attaque des glucides

Le test du métabolisme des glucides révèle que la souche SoB possède un métabolisme oxydatif (figure 18) se traduisant par une acidification à la surface du milieu ouvert provoquant son jaunissement (Joffin et leyrat, 1998).



Figure 17 Détermination de la voie d'attaque des glucides, la souche SoB possède un métabolisme oxydatif.

4.4.5 -Détermination de la voie d'utilisation des sucres (glucose, lactose, saccharose) et du sulfate ferreux (TSI)

La culture de la bactérie sur milieu TSI pendant 24h à 30°C a montré une acidification du milieu de culture provoquant son jaunissement quelque soit au niveau du culot ou de la pente(figure 19) ce signifie, que la bactérie a fermenté le lactose (ou le saccharose) et le glucose (Joffin et leyrat, 1998).Cependant, l'apparition de la couleur noire au niveau du culot, ce qui signifiant la présence du sulfate ferreux, n'a pas été observée ce qui est expliqué par l'absence de la production de l'H₂S.



Figure 18Voie d'utilisation des sucres par la souche SoB. Le milieu est devenu jaune signifiant la fermentation du lactose (ou le saccharose) et le glucose.

En se basant sur les résultats des tests biochimiques et en les comparant à ceux de Guiraud, (1998) ;Joffin et Leyral, (1998) nous pouvons conclure et confirmer que la souche SoB appartient

effectivement au genre *Bacillus* car elle mobile, positive à la coloration de Gram, productrice de spores, dotée de l'enzyme catalase, dépourvue de l'enzyme oxydase, possède la nitrate réductase, son métabolisme vis-à-vis des glucide est par voie oxydative, et enfin, capable de fermenter le lactose (ou le saccharose) et le glucose. En effet, cette souche peut appartenir à l'une des différentes espèces du genre *Bacillus* en l'occurrence ; *Bacillus subtilis*, *B. anthracis* et *B. cereus* (Sagar, 2018)

4.5 -Test de production de protéase

Le test de l'activité enzymatique par le surnageant de culture de *Bacillus sp.* a été effectué sur le milieu à base de protéase. La figure 19 montre un développement d'une importante zone d'inhibition de 34 mm de diamètre dans le milieu en question par le surnageant de culture. En effet, les résultats obtenus correspondent à ceux de Gibb *et al.*,(1987) ;Kalisz,(1988) ,qui montrent que les protéases d'origine microbienne sont généralement capables à digérer des substances nutritives insolubles telles que la cellulose, les protéines et l'amidon. De plus, l'étude d'Ait Kaki *et al.*,(2013) a révélé que *Bacillus amyloliquefaciens*: 9SRTS et FZB42i, isolés à partir de la rhizosphère de la plante *Calendula officinalis*, sont dotés d'un pouvoir de sécrétion d'enzymes en l'occurrence, cellulase et protéase. Les *Bacillus* représentent un genre bactérien connu par sa capacité de production de substances biologiques actives, capables de dégrader la paroi des champignons (Tserkovniak *et al.*,2009), et les enzymes, sont considérées par conséquence, parmi les substances bioactives exerçant un effet inhibiteur sur les mycètes (Dunne *et al.*,1993). Dans une autre étude, il a été démontré que les souches de *B. subtilis* KC341751 et de *B.mojavensis* KC341749 sont dotées d'un pouvoir producteur de protéase et de cellulase, ces deux souches ont été investiguées par rapport à leur activité antifongique (Youcef- Ali *et al.*,2014).

Dans le présent travail, l'activité anti *C. albicans* observée peut être expliquée par la capacité de *Bacillus sp.* à sécréter une des enzymes de dégradation de la paroi fongique en l'occurrence : l'enzyme protéase (Manjula et Podile, 2005), provoquant des altérations physiques directes sur les parois cellulaires (Cho *et al.*,2011 ; Praveen Kumar *et al.*,2012).



Figure 19 Détection de l'activité protéase développée par l'isolat SoB.

4.6-Optimisation de la production d'enzyme protéase par *Bacillus sp.*

4.6.1 -Optimisation du pH

La production de protéase par *Bacillus sp.* à été effectuée sur différents pH à savoir ; 5, 6, 7, 8,9, 10 et 11) dans le milieu liquide Luria, suivi du dosage enzymatique de l'activité protéolytique en utilisant les surnageants obtenus après centrifugation à 10.000g pendant 20min.

Après incubation à 30°C, il a été constaté une absence totale de croissance de *Bacillus sp.* dans les erlens contenant les milieux de culture à pH 9, 10 et 11. En effet, certaines espèce du groupe *Bacillus* n'arrivent pas à se développer au-delà du pH 8 citant par exemple;*B. subtilis* (Sarkar *et al.*,1993) ; *B.cereus* (Ghorbel *et al* ,2003) ;*B.licheniformis* (Olajuyigbe et Ajele ,2005) Cependant, un bon développement de *Bacillus sp.* a été remarqué à pH 5, 6, 7 et 8ce qui correspond aux observations de Baret, (1994).

Par ailleurs, les résultats du dosage de l'activité protéolytique ont montré que l'activité maximale est obtenue à pH 7 (45,24U/ml) (tableau 4 et figure 20), en effet ce résultat correspond à celui de Muthu et Christudhas, (2012) indiquant que l'activité protéolytique maximale d'une souche de *Bacillus subtilis* BT MASC 3, isolée à partir du sol, a été observée à pH 7.

Tableau 4 Valeurs de l'activité protéolytique et de la densité optique dans différents pH.

pH	DO	activité enzymatique (U/ml)
5	0,072	42,86
6	0,025	14,88
7	0,076	45,24
8	0,012	7,14

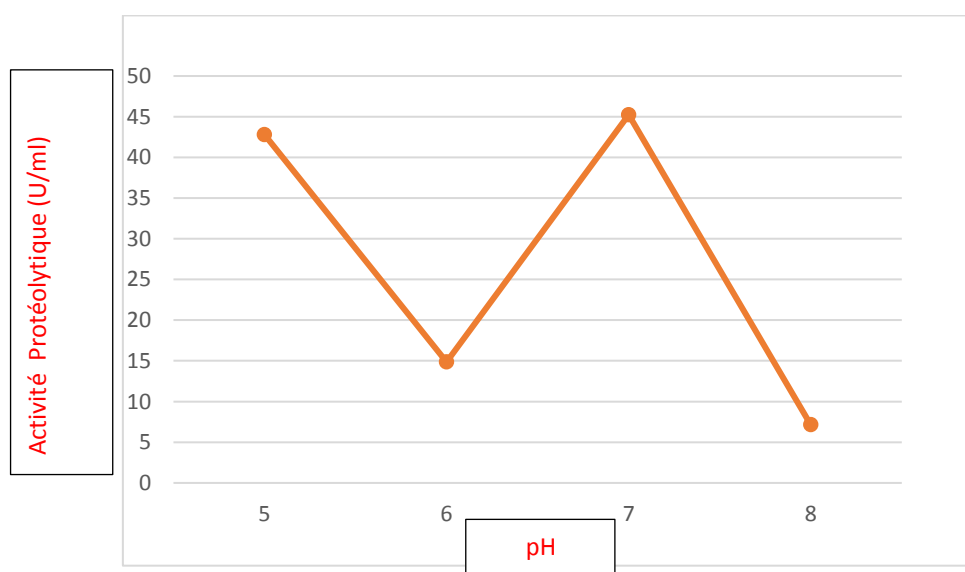


Figure 20 : Courbe montrant l'activité protéolytique à différents pH.

4.6.2-Optimisation de la température

Les résultats du dosage de l'activité protéolytique ont montré que l'activité maximale est obtenue à 50°C (17,85UL/ml) (tableau 5 et figure 21). En effet, l'étude effectuée par Kandasamy *et al.*, (2016) a révélé que l'activité protéolytique maximale d'une souche de *Bacillus sp.*BTMASC3 isolée à partir de sol contenant des déchets d'agriculture, a été obtenue à 50°C. De plus, Mussarat et ses collaborateurs, (2008) ont montré que *Bacillus* BS1 isolée à partir d'écume de sucre présente un optimum d'activité protéolytique à 50°C.

Tableau 5 Valeurs de la densité optique et de l'activité protéolytique dans différentes températures.

T°C	DO	activité enzymatique (U/ml)
20°	0,02	1,19
30°	0,008	4,76
40°	0,0015	11,30
50°	0,03	17,85

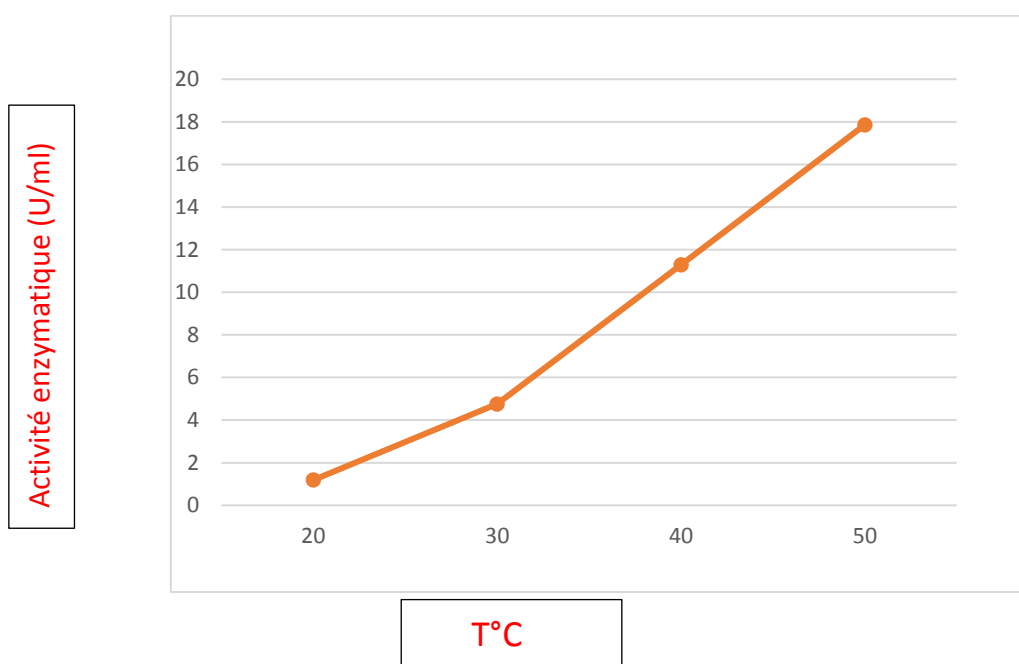


Figure 21 : Courbe montrant l'activité protéolytique à différentes températures.

4.6.3-Optimisation de la composition du milieu de culture

La production de protéase par *Bacillus sp.* a été effectuée sur le même milieu utilisé précédemment (luria) tout en augmentant la concentration du glucose: de 0.1% jusqu'à 0.4%. Les résultats du dosage de l'activité protéolytique ont montré que cette activité augmente en fonction de

l'augmentation de la concentration en glucose, notant une activité maximale de 13,69UL/ml à 0,4% de glucose (tableau 6 et figure 22).

Tableau 6 : Variation de l'activité enzymatique et de la densité optique en fonction de la concentration en glucose.

Concentration (%)	DO	Activité enzymatique (U/ml)
0,1	0,012	7,14
0,3	0,017	10,11
0,4	0,023	13,69

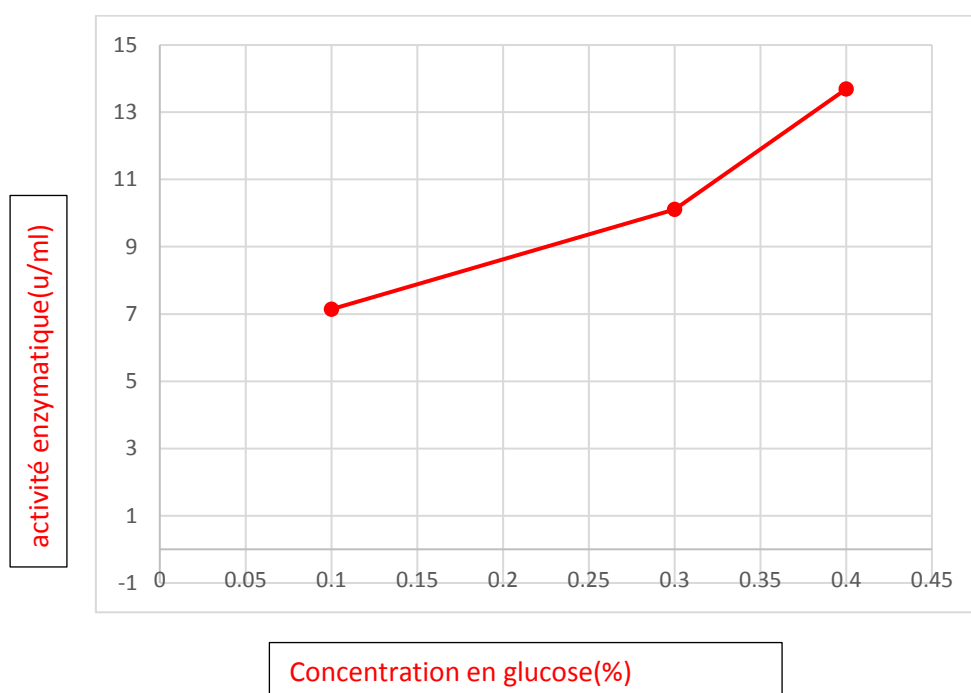


Figure 22 Courbe montrant l'activité protéolytique à différentes concentrations en glucose.

L'étude de Abidi *et al.*, (2008) montre que la production des protéases par les micro-organismes est fortement influencée par les composants du milieu de culture en particulier, les sources de carbone et d'azote. Les mêmes constatations sont faites par Qadar et ses collaborateurs, (2008), en effet, ces chercheurs ont montré que l'activité protéolytique de *Bacillus sp.* PCSIR EA-3augmente après l'ajout du glucose dans le milieu de culture et atteint son maximum (0,7U/ml) à 0,1%.

Conclusion et Perspectives

5. Conclusion et perspectives

L'objectif de ce travail consiste à l'étude de l'optimisation de la production de protéase par une souche de *Bacillus sp.*, d'origine tellurique, présentant un effet inhibiteur contre *Candida albicans*.

Le test d'activité antifongique de *Bacillus sp.* (code: SoB), qui consiste en la recherche de l'activité anti- *Candida albicans*, a révélé son pouvoir à développer un effet inhibiteur sur le développement de *Candida albicans*, par la présence d'une zone de lyse de 25mm de diamètre.

L'identification de la souche en question, basée sur un ensemble de tests macroscopiques, microscopiques (état frais, coloration de Gram et test de sporulation) et biochimiques (catalase, oxydase, nitrate réductase, voie d'attaque des glucides, test d'utilisation du glucose, lactose et saccharose), a montré l'appartenance de cette souche au genre *Bacillus*.

Par ailleurs, la capacité de *Bacillus sp.* à produire une enzyme de dégradation de la paroi fongique en l'occurrence ; l'enzyme protéase, a été mise en évidence sur un milieu de culture préparé à base de lait. En effet, *Bacillus sp.* a montré son aptitude à produire cette enzyme en développant une zone d'hydrolyse sur le milieu protéase.

En fin, l'étude menée sur l'optimisation de la production de l'enzyme protéase par *Bacillus sp.* a montré que cette souche arrive à une activité protéolytique optimale lorsque elle est cultivée à 50°C (17.86U/ml) dans un milieu de culture riche en glucose (13.69U/ml) et ajusté à pH 7 (45.24U/ml). Ces constatations indiquent que la protéase synthétisée dans ce travail, est classée parmi les protéases neutres présentant une thermostabilité élevée.

Au terme de cette étude nous pouvons nous fixer les points suivants comme perspectives :

- Identification complète de *Bacillus sp.* ayant développé une activité anti *candida albicans* par voie moléculaire (séquençage du gène 16S rDNA, gyrase....);
- Caractérisation de l'enzyme protéase par des méthodes biochimiques performantes ;
- Extraction et purification de l'enzyme protéase afin de confirmer l'effet inhibiteur de cette enzyme sur *C. albicans* ;
- Optimisation d'autres paramètres de production de l'enzyme protéase tels que; le temps d'incubation, la composition du milieu de culture particulièrement, la source d'azote.

Résumé

Résumé

Dans cette étude, une souche bactérienne codée SoB a fait l'objet d'une optimisation de la production d'enzyme protéase dans différentes conditions de culture. Cette souche est dotée d'un pouvoir antifongique vis-à-vis de la levure pathogène *Candida albicans*.

Le test d'antagonisme effectué, *in vitro*, sur *C. albicans* a dévoilé la formation d'une zone d'inhibition de 25mm sur la gélose sabouraud, préalablement étalé par la levure.

La caractérisation de la bactérie en question, basée sur une étude macroscopique, microscopique et biochimique, a montré qu'il s'agit d'un *Bacillus sp.* En effet, cette dernière est Gram+, catalase +, oxydase -, nitrate réductase positive, possède un métabolisme oxydatif, peut fermenter le lactose (ou le saccharose) et le glucose sur milieu TSI et enfin capable de produire des spores après une culture liquide agitée de 7 jours.

La capacité de *Bacillus sp.* à produire l'enzyme protéase sur milieu spécifique, via l'utilisation de son surnageant de culture, a montré son pouvoir producteur de cette enzyme en développant une zone d'hydrolyse de 34 mm de diamètre.

Enfin, la culture de *Bacillus sp.* dans de différentes conditions de culture, dans le but d'optimiser la production de protéase, a révélé que le pH et la température optimale sont 7 et 50°C avec une activité protéolytique de 45.24U/ml et 17.86U/ml respectivement. De plus, l'activité protéolytique augmente en fonction de l'augmentation de la concentration du glucose dans le milieu de culture à savoir ; 13.69U/ml pour 0,4% de glucose. Ces résultats expriment que la protéase produite dans la présente étude est de type neutre et thermostable.

Mots clés: *Bacillus sp.*, activité antifongique, *Candida albicans*, Protéase, dosage protéolytique, optimisation.

Abstract

Abstract

In this study, a coded bacterial strain SoB was optimized for protease enzyme production under different culture conditions. This strain is endowed with antifungal power against the pathogenic yeast *Candida albicans*.

The antagonism test carried out in vitro on *C. albicans* revealed the formation of a 25 mm inhibition zone on the sabouraud agar, previously spread by the yeast.

The characterization of the bacterium in question, based on a macroscopic, microscopic and biochemical study, showed that it is a *Bacillus sp.* Indeed, the latter is Gram +, catalase +, oxidase -, nitrate reductase positive, has an oxidative metabolism, can ferment lactose (or sucrose) and glucose on TSI medium and finally able to produce spores after a stirred liquid culture 7 days.

The capacity of *Bacillus sp.* to produce the protease enzyme on a specific medium, via the use of its culture supernatant, has shown its producing power of this enzyme by developing a hydrolysis zone of 34 mm in diameter.

Finally, the culture of *Bacillus sp.* under different culture conditions, in order to optimize the production of protease, revealed that the pH and the optimal temperature are 7 and 50 ° C with a proteolytic activity of 45.24U / ml and 17.86U / ml respectively. In addition, the proteolytic activity increases as a function of the increase of the concentration of glucose in the culture medium namely; 13.69U / ml for 0.4% glucose. These results express that the protease produced in the present study is of neutral and thermostable.

Key words: *Bacillus sp.*, Antifungal activity, *Candida albicans*, Protease, proteolytic assay, optimization.

ملخص

في هذه الدراسة تم تحسين سلالة بكتيرية مشفرة SoB لانتاج انزيم البروتياز في ظل ظروف نمو مختلفة تتميز هذه

السلالة بقوة مضادة للفطريات ضد الخميرة المسببة للأمراض *Candida albicans*

كشفت اختبار العداء الذي اجري في المختبر على *C. albicans* تشكيل منطقة تثبيط 25ملم على اجار Sabouraud التي سبق ان مسحت بواسطة الخميرة.

اظهر توصيف البكتيريا المعنية بناء على دراسة مجهريية و كيميائية حيوية انه عبارة عن بكتيريا *Bacillus sp.* في الواقع هذه الاخيرة هي Gram+ Catalase+ Oxydase + Nitrate reductase تتميز بخاصية الايض المؤكسد و يمكن ان تخمر الاكتوز (او السكروز) و الجلوكوز في وسط TSI ويمكن اخيرا انتاج جراثيم بعد زرعية سائلة مع الرج لمدة 7 ايام.

قدرة *Bacillus sp.* على انتاج انيم البروتياز في وسط معين عن طريق استخدام طافية الزرعية اظهر قوته المنتجة لهذا النزيم من خلال تطوير منطقة التحلل المائي بقطر 34 ملم.

اخيرا فان نمو *Bacillus sp.* في ظل ظروف زرعية مختلفة من اجل تحسين انتاج البروتياز, كشفت ان درجة الحموضة و درجة الحرارة المثلى هي 7 و 50 درجة مئوية مع نشاط تحلل يقدر ب 45.24 وحدة/مل و 17.85 وحدة/مل على التوالي. بالاضافة الى ذلك, يزداد نشاط التحلل البروتيني بزيادة تركيز الجلوكوز في وسط النمو و هي 13.69 وحدة/مل لنسبة 0.4% من الجلوكوز. هذه النتائج تعبر عن ان الانزيم البروتيني المنتج في الدراسة الحالية له نوع محايد و مستقر للحرارة.

الكلمات المفتاحية: *Bacillus sp.*, نشاط مضاد للفطريات, *Candida albicans*, بروتياز, مقياسه الحلل

البروتيني، التحسين.

Références bibliographiques

6-Références bibliographiques

1. A.A. Kembhavi, A. Kulharni, A.A. (1993) Pant Salt-tolerant and thermostable alkaline protease
2. Ahmed nafis, Ibrahim Oubaha, Asma azmani, Salah eddin samri, Timo niedermeyer, Lahsen hassan, Mustapha barakate (2017) Journal de mycologie médicale
3. Aïmanianda V, Latge J-P, (2010) Problems and hopes in the development of drugs targeting the fungal cell wall. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 8(4):359–64
4. Ait Kaki A., Kacem Chaouche., Dehimat L., Milet A., Youcef-Ali M., Ongena M., Thonart P. (2013). Biocontrol and Plant Growth Promotion Characterization of Bacillus Species Isolated from *Calendula officinalis* Rhizosphere. *Indian. J. Microbiol.* DOI 10.1007/s12088-013-0395-y
5. Alain Bonnin (2012)Transition commensal-pathogène au cours des candidoses invasives à *Candida albicans* : approches moléculaires et cellulaires
6. Association Française des Enseignants de Parasitologie et Mycologie (ANOFEL)(2014), Candidose
7. Ash C., Priest F. G. and Collins D., (1993). Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. Proposal for the creation of a new genus *Paenibacillus*. *Antonie van Leeuwenhoek*; 64: 253–260
8. B.Ghorbel., A.Sellami-kamoun, M Nasri (2003), Stability studies of protease cereus BGI
9. Badji B., Riba A., Mathieu F., Lebrihi A ,and Sabaou N.(2005) .Activité antifongique d'une souche d'*actinomyces* d'origine saharienne sur divers champignons pathogènes et toxigènes .*Mycologie médicale* .15(3) :211-219
10. Barelle C.J., Richard M.L., Gaillardin C. Gow N.A and Brown A.J. (2006). *Candida albicans* VAC8 is required for vacuolar inheritance and normal hyphal branching. *Eukaryot. Cell.* 5: 359-367
11. Barrett A, J (1994), Protéolytique enzyme ;serine and cysteine peptidase, méthode enzymol, 244(1-15)
12. Bellet Virginie (2017) Mécanismes de résistance aux antifongiques, Faculté de Pharmacie Laboratoire de Parasitologie et mycologie médicale. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 38, pp. 83-92

13. Becton, Dickinson and Company. (2015), BBL TSI Agar Slants
14. Bennett RJ, (2010) Coming of age--sexual reproduction in *Candida* species. PLoS Pathog. e1001155
15. Bouchara J-P, Pihet M, de Gentile L, Cimon B, Chabasse D,(2010) Levures et levuroses. Cah Form Biol Médicale. ;(44).
16. Bourée P. (2001). Aide- mémoire de parasitologie et de pathologie tropicale. 3ème édition. Flammarion, Médecine-Sciences. Paris
17. Calderone RA, Fonzi WA. (2001) Virulence factors of *Candida albicans*. Trends Microbiol
18. Chauhan N., Li D., Singh P., Calderone R and Kruppa M. (2002). The cell wall of *Candida* spp. in *Candida* and Candidiasis, p159. ASM. Press, Washington DC
19. Cho E.K., Choi I.S., Choi Y.J. (2011). Overexpression and characterization of thermostable chitinase from *Bacillus atrophaeus* SC081 in *Escherichia coli*. BMB. Rep. 44: 193-8.
20. Claus D. and Berkeley R.C.W., 1986. Genus *Bacillus* Cohn (1872), 174AL. In Sneath P.H.A., Mair N.S., Sharpe M.E. and Holt J.G. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore, USA
21. Coultouly G., (1991) Génie enzymatique. Masson éditeur, Paris, France, 244 pages
22. Daniel Michał Kamin'ski (2014), recent progress in the study of the interactions of amphotericin B with cholesterol and ergosterol in lipid environments
23. Delarras C. (2007). Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire. Edition TEC et DOC, Lavoisier, Paris
24. Dunne C., Crowley J.J., Loccoz Y.M., Dowling D.N., De Bruijn F., Gara F.O. (1993). Biological control of *Pythium optimum* by *Stenotrophomonas maltophilia* W81 is mediated by an extracellular proteolytic activity. Microbiology 143: 3921- 3931
25. Edmond M.B., Wallace S.E., McClish D.K., Pfaller M.A., Jones R.N and Wenzel R.P. (1999). Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals: a three-year analysis. Clin. Infect. Dis. 29: 239-44.
26. Eric Dannaoui,(2013) Résistance des *Candida* aux antifongiques : détection et mécanismes

27. Errakhi R., Bouteau F., Lebrihi A and Barakate M. (2007). Evidences of biological control capacities of *Streptomyces* spp. against *Sclerotium rolfsii* responsible for damping-off disease in sugar beet (Beta 1608 Afr. J. Microbiol. Res. Vulgaris L.). World J. Microbiol. Biotechnol. 23: 1503–1509.
28. Fogarthy W.M. and Kelly C.T., (1990), Microbial enzymes and biotechnology, 2e Edition. Elsevier Science Publishing, New-York, États-Unis, 472 pages
29. Folasade M Olajuyibe, Joshua O Ajele, (2005) , Production dynamics of extracellular protease from *Bacillus* species
30. Fortina M. G., Pukall R., Schumann P., Mora D., Parini C., Manachini P.L. and Stackebrandt E., (2001) *Ureibacillus* gen a new genus to accommodate *Bacillus thermosphaericus*
31. Françoise Dromer (2013) Centre national de référence des mycoses invasives et antifongiques Candidose
32. Garveba P., Van Veen L.A. and Van Elsas J.D., (2003). Predominant *Bacillus* spp. In: Agricultural soil under different management regimes via PCR-DGGE. Microbial Ecology; 45:302- 31
33. Gibb, G. D. and Strohl, W. R. 1987. Physiological regulation of protease activity in *Streptomyces peucetius*. Can. J. Microbiol. 34: 187-190
34. Gow NAR, van de Veerdonk FL, Brown AJP, Netea MG. 2012, *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. Nat Rev Microbiol
35. Gozalbo D, Roig P, Villamon E & Gil ML (2004) *Candida* and candidiasis: the cell wall as a potential molecular target for antifungal therapy. Curr Drug Targets Infect Disord 4: 117-135
36. Gudlaugsson O., Gillespie S., Lee K., Vande Berg J., Hu J., Messer S., Herwaldt L., Pfaller M and Diekema D. (2003). Attributable mortality of nosocomial candidemia, revisited. Clin. Infect. Dis. 37:1172-1177.
37. Guiraud J.P (1998) microbiologie alimentaire, (edn) Dunod. Paris
38. Gupta, R., Beg, Q.K., Lorenz, P., (2000). Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. Appl. Microbiol. and Biotechnol. 59 (1): 15-32
39. Heyndrickx M., Lebbe L., Kersters K., De Vos P., Forsyth G. and Logan N.A., 1998. *Virgibacillus*: a new genus to accommodate *Bacillus pantothenicus* (Proom and Knight, 1950).

- Emended description of *Virgibacillus* pantothenicus. International Journal of Systematic Bacteriology; 4: 99-106
40. James TY, Kauff F, Schoch CL, Matheny PB, Hofstetter V, Cox CJ, et al, 2006 Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. Nature ;443(7113):818–22
41. Joffin J.N and Keller G.(1998).Microbiologie technique tome 1(4 edn),CRDP d'aquitaine.Bordeau
42. Jean-Philippe Talarmin, (2010),Nouvelles échinocandines
43. Jill seladi-schulman (2018) about *Candida albicans*, Natural yeast and problematic infections
44. Kapteyn JC, Van Den Ende H & Klis FM (1999) ,The contribution of cell wall proteins to the organization of the yeast cell wall. Biochim Biophys Acta 1426: 373-383
45. Keay L, Moseley M.H., Anderson R.G., O'connor R.J. and Wildi B.S., (1972). Production and isolation of microbial proteases. Biotechnology and Bioengineering. Symposium 3: 63-92
46. Klis FM (1994) Review: cell wall assembly in yeast. Yeast 10: 851-869
- 47..Koumoutsis, A. *et al.* (2004). Structural and Functional Characterization of Gene Clusters Directing Non ribosomal Synthesis of Bioactive Cyclic Lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* Strain FZB42. *J Bacteriol* **186**, 1084–1096 <https://doi.org/10.1128/JB.186.4.1084-1096.2004>
48. Kunitz M., 1947. Crystalline soybean trypsin inhibitor. Journal of General Physiology 30: 291-310
49. Kunst, N Ogasawara, Moszer, M Albertini, G Alloni, V Azevedo, M G Bertero, P Bessières, a Bolotin, S Borchert, R Borriss, L Boursier, a Brans, M Braun, S C Brignell, S Bron, S Brouillet, C V Bruschi, B Caldwell, V Capuano, N M Carter, S K Choi, J J Codani, I F Connerton, and a Danchin. (1997) the complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. Nature, 390(6657):249–56,
50. Kuta FA (2008). Antifungal effects of Calotropis Procera stem bank extract against *Trichoplyton gypseum* and *Epiderino plyton Flocosum*. Afr J Biotechnol. ;7(13):2116–8
51. Lazim, H., Mankai, H., Slama, N, Barkallah, I, imam, F. 2009 Production and optimization of thermophilic alkaline protease in solid-state fermentation by *Streptomyces* sp. CN902. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 36: 531-537

52. Latgé J-P,(2007) the cell wall: a carbohydrate for the fungal cell. *Mol Microbiol.* 66(2):279–90
53. Luis H.Cisneros, Raymond E.Goldstein, and Alex Cronin, (2008) the organized melee emergence of collective behavior in concentrated suspensions of swimming bacteria and associated in the graduate college for the degree of doctor of philosophy. PhD thesis, the University of Arizona.
54. Manoj M. Kole, Indira Draper, and Donald F. Gerson, (1988), Protease production by *Bacillus subtilis* in oxygen-controlled, glucose fed-batch fermentations
55. M. Chekiri-Talbi¹ & D. W. Denning, (201,Burden of fungal infections in Algeria
56. Mao, W.R.P. and D. Freedman. (1992). High production of alkaline proteases by *Bacillus licheniformis* in a fed-batch fermentation using a synthetic medium. *J. Ind. Microbiol.*, 11: 1-6
57. Madigan M.T. and Martino J.M., (2006). Brock Biology of Microorganisms, 11th ed.; Pearson Education. Upper Saddle River, NJ, USA
58. Maury M. (1987).milieux et réactifs de laboratoire Pasteur, Paris, France
59. McCullough MJ, Ross BC, Reade PC. *Candida albicans* (1996) A review of its history, taxonomy, epidemiology, virulence attributes, and methods of strain differentiation. *Int J Oral Maxillofac Surg* .
- 60.Meunier N., (1999). Évaluation du potentiel de production de protéases bactériennes à partir des boues d'épuration municipales. Mémoire de maîtrise. INRS-Eau, Université du Québec, Canada. 168 pages.
- 61.Mounia Youcef-Ali, Noredine Kacem Chaouche, Laid Dehimat, Asma Ait Kaki, Jacqueline Destain⁵ and Philippe Thonart (2013) Selection Of An Antifungal *Bacillus niabensis* From Algerian Salt Soil And Study Of Its Potential Of Surfactin Production
- 62.Mounia Youcef-Ali Noredine Kacem Chaouche, Laid Dehimat, Insaf Bataiche, Mounira Kara Ali, Hélène Cawoy and Philippe Thonart,(2014) .Antifungal activity and bioactive compounds produced by *Bacillus mojavenis* and *Bacillus subtilis*
63. Mussarat shaheen, AamerAli shah, Abdul hameed, Fariha Hassan mussarat, (2008) influence of culture conditions of production and activity of protease from *Bacillus subtilis* BSI

64. Muthu Padmapriya and *B. Christud has Williams (2012) Purification and characterization of neutral protease enzyme from *Bacillus Subtilis*
65. Nazina T.N., Tourova T.P., Poltarau AR, Novikova RV., Grigoryan AA., Ivanova AE., Lysenko, AM., Petrunyaka V.V., Osipov S.S., Balyaev S.S. and Ivanov M.V., (2001) Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: description of *Gebacillus subterraneus* gen. Nov. sp. Nov. and *Geobacillus uzenesis* sp. novo from petroleum reservoirs and transfer and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenuatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*,
66. Nicholson W.L., (2002). Roles of *Bacillus* endospores in the environment. Cellular and Molecular Life Science; 59: 410–416.
67. Niimura Y., Koh E., Yanagida F., Suzuki K.-I., Komagata K. and Kozaki M., (1990) *Amphibacillus xylanus* gen. nov., sp. nov., a facultative anaerobic spore forming xylan-digesting bacterium which lacks cytochrome, quinone, and catalase. International Journal of Bacteriology; 40: 297–301
68. Noble SM, Gianetti BA, Witchley JN, (2017) *Candida albicans* cell-type switching and functional plasticity in the mammalian host. Nat Rev Microbiol. 96–108
69. Ostrosky-Zeichner L, Casadevall A, Galgiani JN, Odds FC, Rex JH 2010. An insight into the antifungal pipeline: selected new molecules and beyond. Nat Rev Drug; 9(9):719–27
70. Papon N, Courdavault V, Clastre M, Bennett RJ, (2013) Emerging and emerged pathogenic *Candida* species: beyond the *Candida albicans* paradigm. PLoS Pathog.: e1003550
71. Pinchuk I.V., Bressollier P., Verneuil B., Fenet B., Sorokulova I.B., Graud F. and Urdaci M.C., (2001). In Vitro Anti-*Helicobacter pylori* Activity of the Probiotic Strain *Bacillus subtilis* 3 Is Due to Secretion of Antibiotics. Antimicrobial Agents and Chemotherapy; 45: 3156–3161
72. Pittet D and Wenzel R.P. (1995). Nosocomial bloodstream infections. Secular trends in rates, mortality, and contribution to total hospital deaths. Arch. Intern. Med. 155:1177-1184.
73. Ponce, Adrian, Stephanie A. Connon, and Pun to Yung. (2008) "Detection and viability assessment of endospore-forming pathogens." Principles of Bacterial Detection: Biosensors, Recognition Receptors and Microsystems. Springer New York 481523
74. Poulain D, Slomianny C, Jouault T, Gomez JM & Trinel PA (2002) Contribution of phospholipo mannan to the surface expression of beta-1, 2-oligomannosides in *Candida albicans*

and its presence in cell wall extracts. Infect Immune 70: 4323-4328.responses: elements for a decisive crosstalk. Curr. Opin. Microbiol. 7: 342-349

75. Poulain D and Jouault T. (2004). *Candida albicans* cell wall glycans, host receptors

76. Praveen Kumar D., Anupama P., Rajesh Kumar Singh D., Thenmozhi R., Nagasathya A., Thajuddin A., Paneerselvam A. (2012). Evaluation of extracellular lytic enzymes from indigenous Bacillus isolates. J. Microbiol. Biotech. Res. 2: 129-137

77.Prescott.,Harly.and Kelin (2007), Microbiologie ,(2th edn) De Boeck-wesmael Bruxelles.

78. Press, E.G., R.K. Shields and C.J. Clancy, (2014). *Candida* biofilm: Clinical implications of recent advances in research. Curr. Fungal Infect. Rep., 8: 72-80.

79. Priest F.G., Sonenshein A.L., Hoch J.A. and Losick R., 1993.Bacillus subtilis and Other Gram Positive Bacteria: Biochemistry, Physiology and Molecular Genetics. Washington D.C., American Society for Microbiology, USA

80.P.Y.Guillaume 2004, Les teste enzymatiques, antibiotiques et immunologiques

81.Rao M.B., Tanksale A.M., Ghatge M.S. et Deshpande V.V., (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. Microbiology and Molecular Biology Reviews 62 (3): 597-625

82.Reiss E, Hearn VM, Poulain D & Shepherd MG (1992) Structure and function of the fungal cell wall. J Med Vet Mycol 30 Suppl 1: 143-156

83. Rodríguez Couto, S. (2008). Exploitation of biological wastes for the production of value-added products under solid-state fermentation conditions. Biotechnol. J. 3: 859-870. 2008

84. Rohban R., Amoozegar M .A. and Ventosa A., (2009) .Screening and isolation of halophilic bacteria producing hydrolyses from Howz Soltan Lake, Iran. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology; 36: 333-34

85.Runkhe M. (2002). Skin and mucous membrane infections. In *Candida and candidiasis* p 307. ASM Press, Washington DC

86. Ruiz-Herrera J., Elorza M.V., Valentin E and Sentandreu R. (2006). Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans* and its relation to pathogenicity. FEMS. Yeast. Res. 6: 14-29

87.Sagar Aryal,Biochemical (2018) identification of *Bacillus subtilis*,

88. Sandhya, C, Sumantha, A, Szakacs, G., et Pandey, A (2005), Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid state fermentation, process biochemistry, 40(8), 2689-2694
89. Shah Ali Ul Qadar., Erum Shireen, Samina Iqbal and Abida Anwar (2009) Optimization of protease production from newly isolated strain of *Bacillus sp.*
90. Schallmeyer M., Singh A. and Ward O.P., (2004). Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. Canadian Journal of Microbiology; 50: 1-17
91. Schlesner H., Lawson P. A., Collins M .D., Weiss N., Wehmeyer U., Vo\$ lker H. and Thomm M., 2001. *Filobacillus milosensis* gen. Nov., sp. Nov., a new halophilic spore-forming bacterium with OrnD-Glu-type peptidoglycan. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology; 51: 425–431
92. Selvam Kandasamy., Govarthanan Muthusamy., Senthilkumar Balakrishnan., Senbagam Duraisamy., Selvankumar Thangasamy., Kamala-Kannan Seralathan., Sudhakar Chinnappan (2016), Optimization of protease production from surface-modified coffee pulp waste and corncobs using *Bacillus sp.* by SSF
93. Setlow, Peter, 2014 "Germination of spores of *Bacillus* species: what we know and do not know." Journal of bacteriology 196.7): 1297-130
94. Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J, 2012 *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. FEMS Microbiol Rev; 36(2): 288–305
95. Sookkeo, B., S. Sinchaikul, S. Phutrakul and S.T. Chen. (2000). Purification and characterization of the highly thermostable protease from *Bacillus stearothermophilus* TLS33. Protein Expr. Purify. 20(2): 142-5
96. Souza V.R., Silva A.C.G., Pinotti L.M., Araújo H.S.S. and Giordano R.L.C.C., (2005). Characterization of the penicillin G acylase from *Bacillus megaterium* ATCC 14945. Brazilian Archives of Biology and Technology; 48: 105-111
97. Stein T., (2005) *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. Molecular Microbiology; 56: 845-57.
98. Sudbery P, Gow N, Berman J ,(2004) the distinct morphogenic states of *Candida albicans*. Trends Microbiol. 317–24.

99. Sudbery PE, (2011) Growth of *Candida albicans* hyphae. *Nat Rev Microbiol.* (10):737–48
100. Sundstrom P (2002) Adhesion in *Candida* spp. *Cell Microbiol* 4: 461-469.
101. Tortel-Aziz P., Aziz A., Magnin Robert M., Gognies S. et Ait Baraka E. (2008) .Bactéries présentent une activité protectrice contre *Botrytis cineria* W0/2008/009795.
102. Tserkovniak L.S., Roi A.O., Kurdysh I.K. (2009). Synthesis of amino acids of *Bacillus subtilis* IMV V-7023 in the medium with glycerophosphates. *Mikrobiol. Z.* 71: 218-232
103. Vanittanakom, N., Loeffler, W., Koch, U. & Jung, G. (1986). Fengycin—a novel antifungal lipopeptide antibiotic produced by *Bacillus subtilis* F-29-3. *J. Antibiot.* 39, 888–901
104. Vishwanatha, K.S., Appu Rao, A.G., Singh, S.A. (2010) Acid protease production by solid-state fermentation using *Aspergillus oryzae* MTCC 5341: optimization of process parameters. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 37: 129-138.
105. Wainø M., Tindall B. J., Schumann P. and Ingvorsen K., (1999.) *Gracilibacillus* gen. Nov., with description of *Gracilibacillus* halotolerant gen. Nov., sp. .; transfer of *Bacillus dipsosauri* to *Gracilibacillus dipsosauri* comb. nov., and *Bacillus salexigens*
106. Whipps J. M., 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*; 52:487- 511.
107. Wisotzkey J.D., Jurtshuk P., Fox G.E., Deinhard G. and Poralla K., (1992). Comparative sequence analyses on the 16S rRNA (rDNA) of *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus*
108. Yoon J.H., Kim I.G., Kang K. H., Oh T.K. and Park Y.H., (2003). *Bacillus marisflavi* sp. Nov. and *Bacillus aquimaris* sp. Nov., isolated from sea water of a tidal flat of the Yellow Sea in Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*; 53: 1297–1303

Annexes

7-Annexes

Annexe 1

Composition des milieux de cultures

Gélose nutritive

Gélose nutritive ou gélose nutritive ordinaire (GNO) ou encore gélose ordinaire, est un milieu d'isolement non-sélectif dont la composition chimique théorique en g/L d'eau purifiée est :

Peptone	10
Extrait de viande	5
Chlorure de sodium	5
Gélose	15

pH 7.2, autoclave 20 minutes à 120°C (Guiraud, 1998).

Gélose Sabouraud

La gélose Sabouraud est un milieu recommandé pour la culture des champignons. La composition chimique théorique de ce milieu en g/L d'eau purifiée est :

Peptone de viande (bovin ou porcin)	3
Peptone de caséine (bovin)	3
Peptone de soja	3
Extrait de levure	2
Extrait de malt	1
Glucose	19
Phosphate monopotassique	0.5
Phosphate disodique	0.5
Agar	13

Le pH est de 6.4. La présence de trois peptones et du glucose, ainsi que le pH acide du milieu favorisent la croissance des levures et des moisissures (Delarras, 2007).

Milieu 868

La composition chimique du milieu en g/L est :

Glucose	20
Peptone	10
Extrait de levure	10

Agar 17

La préparation **du milieu 863**, liquide, est la même, sauf qu'il n'y a pas l'ajout de l'agar (Ongena *et al.*, 2007).

Milieu Luria

La composition chimique en g/l d'eau distillée est :

Peptone	10
Extrait de levure	5
NaCl	5
Glucose	1
Agar	17

Le pH est de 7. Autoclave à 121°C pendant 15min (Guiraud, 1998).

Milieu Protéase

La préparation du milieu s'effectue de la manière suivante : Flacon 1 : 13.5 g d'agar sont ajoutés à 600ml d'eau distillée et sont bien mélangés. Flacon 2 : 10.5 g de l'ait en poudre sont ajoutés à 350ml d'eau distillée et sont bien mélangés. Les deux flacons sont portés pour autoclavage à 121°C pendant 15min.

Après autoclavage et refroidissement, le contenu des deux flacons est bien mélangé et coulé sur des boîtes de Pétri.

Annexe 2

Colorants, antibiotiques et réactifs

Violet de Gentiane

Colorant utilisé pour la coloration de Gram, sa composition chimique par 100ml d'eau distillée est la suivante :

Violet de Gentiane	1g
Ethanol à 90%	10ml
Phénol	2g (Guiraud, 1998)

Lugol

Iode	1g
Iodure de potassium	2g
Eau distillée	300ml (Guiraud, 1998)

Fuschine

Fuschine basique	1g
Alcool éthylique à 90°	10ml
Phénol	5g
Eau distillée	100ml

(Guiraud, 1998).

Antibiotiques et réactifs

Chloramphenicol

Le chloramphénicol est un antibiotique de la famille des phénicoles, il a été isolé la première fois en 1947 de *Streptomyces venezuelae*, Une bactérie du genre *Streptomyces*, il est utilisé dans les milieux de culture en mycologie pour empêcher la croissance des bactéries

Réactif de Griess

Réactif 1

Acide sulfanillique..... 0,8g

Acide acétique 5N100ml

Réactif 2

Diméthyl alpha Naphtylamine ou alpha Naphtylamine.....0,5g

Acide acétique 5N100ml (Guiraud.,1998)

Annexe 3:

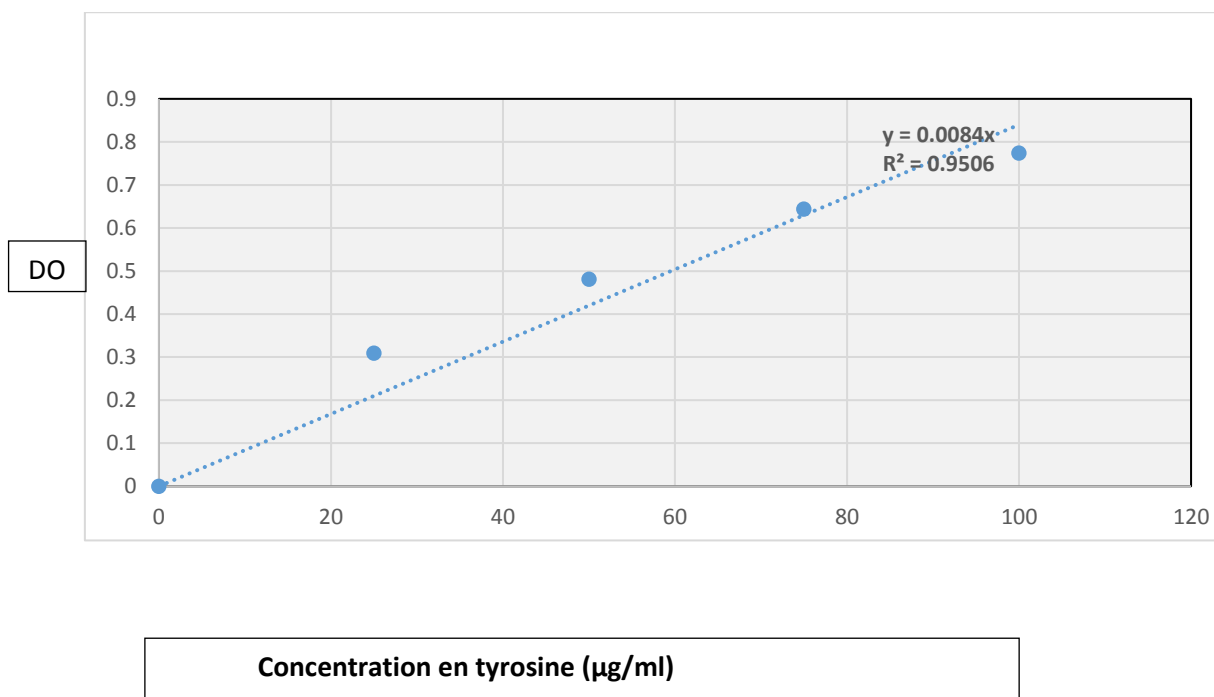
Dosage de l'activité enzymatique

Solution utilisées :

- Surnageant 0,5ml
- Tampon phosphate 50ml à 100 Mm a
- Caséine 1g dans tampon phosphate 100ml
- TCA 20%

Solutions/volume µl	Blanc B	Temoin enzyme TE	Temoin casein TC	Reaction 1 R1	Reaction R2
Tampon	1000	980	500	480	480
Enzyme	0	20	0	20	20
Caséine	0	0	500	500	500
TCA	500	500	500	500	500
Total	1500	1500	1500	1500	1500

Courbe d'étalonnage de la tyrosine.



N° /tube	1	2	3	4	5
Solute de tyrosine(μ l)	0	125	250	375	500
Tampon 7 (μ l)	500	375	250	125	0
Tyrosine (μ g/ml)	0	25	50	75	100
DO à 280 nm	0,085	0,394	0,566	0,729	0,859

<p>Nom : MAKONGE Prénom : Flora Edward</p>	<p>Date de soutenance : 24/ 07 / 2019</p>
<p>Thème : Optimisation de la production de protéase par <i>Bacillus sp.</i> ayant un effet contre <i>Candida albicans</i>.</p>	
<p>Résumé : Dans cette étude, une souche bactérienne codée SoB a fait l'objet d'une optimisation de la production d'enzyme protéase dans différentes conditions de culture. Cette souche est dotée d'un pouvoir antifongique vis-à-vis de la levure pathogène <i>Candida albicans</i>. Le test d'antagonisme effectué, <i>in vitro</i>, sur <i>C. albicans</i> a dévoilé la formation d'une zone d'inhibition de 25mm sur la gélose sabouraud, préalablement étalé par la levure. La caractérisation de la bactérie en question, basée sur une étude macroscopique, microscopique et biochimique, a montré qu'il s'agit d'un <i>Bacillus sp.</i> En effet, cette dernière est Gram+, catalase +, oxydase -, nitrate réductase positive, possède un métabolisme oxydatif, peut fermenter le lactose (ou le saccharose) et le glucose sur milieu TSI et enfin capable de produire des spores après une culture liquide agitée de 7 jours. La capacité de <i>Bacillus sp.</i> à produire l'enzyme protéase sur milieu spécifique, via l'utilisation de son surnageant de culture, a montré son pouvoir producteur de cette enzyme en développant une zone d'hydrolyse de 34 mm de diamètre. Enfin, la culture de <i>Bacillus sp.</i> dans de différentes conditions de culture, dans le but d'optimiser la production de protéase, a révélé que le pH et la température optimale sont 7 et 50°C avec une activité protéolytique de 45.24U/ml et 17.86U/ml respectivement. De plus, l'activité protéolytique augmente en fonction de l'augmentation de la concentration du glucose dans le milieu de culture à savoir ; 13.69U/ml pour 0,4% de glucose. Ces résultats expriment que la protéase produite dans la présente étude est de type neutre et thermostable.</p>	
<p>Mots clés : <i>Bacillus sp.</i>, activité antifongique, <i>Candida albicans</i>, Protéase, dosage protéolytique, optimisation.</p>	
<p>Laboratoire de recherche : Laboratoire de Mycologie, de Biotechnologies et de l'Activité Microbienne (LaMyBAM) Université des Frères Mentouri Constantine 1.</p>	
<p>Jury d'évaluation : Président de jury : Mr BELMAHI H. Pr. CHU Constantine. Reporteur : Mme YOUCEF-ALI M. Dr. UFM Constantine 1. Examinatrice: Mme BENHAMDI A. Dr. UFM Constantine 1.</p>	

