



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Ibn Khaldoun –Tiaret–
Faculté Sciences de la Nature et de la Vie
Département Sciences de la Nature et de la Vie



Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master académique

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Toxicologie et Sécurité Alimentaire

Présenté par :

- Kalloul Djouher
- Lahreche Naceur
- Zoubida Kheira

Thème

**Estimation de l'effet antifongique d'un conjugué
polyéthylène glycol-agent antifongique contre des
champignons mycotoxinogènes**

Soutenu le :

Jury :

Grade

Président : Dr. FETTOUHI B.

« MCB »

Encadrant : Dr. BENSALD M. O.

« MCA »

Co-encadrant: Dr. YEZLI W.

« MCA »

Examinatrice : Dr. BENGUIAR R.

« MCB »

Année universitaire 2020-2021

Remerciements

Avant tout, nous remercions Dieu qui nous a donné la force et la patience pour terminer ce travail et atteindre ce niveau

Premièrement, nous tenons à remercier notre cher promoteur **Dr. BENSAID Mohamed Ouassini** pour sa disponibilité constante pour nous, ses conseils, son expérience sans fin, sa grande patience avec nous et sa grande coopération. C'est l'occasion de vous témoigner notre profonde reconnaissance pour vos qualités humaines, l'ampleur de vos connaissances et la rigueur de votre enseignement. Vous êtes le parfait exemple de simplicité et d'humilité, nous avons eu l'honneur de travailler avec vous. Il n'y a vraiment pas de mots pour vous exprimer notre gratitude monsieur. Merci pour tous les moments privilégiés que vous lui avez donnés

Tout le respect et l'appréciation à notre co-promoteur **Dr. YEZLI Wassim** l'exceptionnel qui a toujours été à notre service et au service de tous les étudiants. Veuillez trouver ici, l'expression de notre grande estime. Vos qualités professionnelles et humaines nous sert d'exemple. Veuillez croire à l'expression de nos profondes reconnaissances et de nos grands respects. Merci beaucoup pour votre présence, vos conseils et votre communication constante avec nous.

Mille mercis et gratitude à vous pour avoir fait de nous une priorité.

Nos remerciements vont au président de jury **Dr. FETTOUHI Bekhaled**, c'est un grand honneur d'accepter la présidence de ce jury

Nos gratitude à **Dr. BENGUIAR R.** d'avoir l'accepté d'examiner ce travail.

Un remerciement spécial au l'ingénieur de laboratoire de microbiologie de notre faculté **Mr. SAID Abdelkader**, qui a été notre meilleur soutien, nous a accueilli à bras ouverts et nous a fourni tout le nécessaire pour réaliser ce travail, que ce soit à partir de matériaux ou de sa grande expérience dans ce domaine. Nous vous souhaitons plus de succès à l'avenir et une vie heureuse

Un merci spécial à l'exceptionnelle **Amal**. Nous apprécions vos efforts et votre travail acharné avec nous tout au long de ce travail et votre compréhension constante de nous. Nous vous souhaitons tout le bonheur tout au long de votre vie

Nos remerciements aussi à **Hanane** et **Amel** pour leurs coopérations.

Un merci spécial à tous ceux qui nous ont aidés à finaliser ce travail.



Dédicaces

Tout d'abord je remercie mon Dieu qui m'a inspiré, qui m'a guidé sur le droit chemin, il a tout le mérite d'avoir terminé ce travail,

*À mon très cher père **Amar***

Puisse ce travail symboliser le fruit de tes longues années de sacrifices consentis pour mes études. Puisse Dieu, le tout puissant, te protéger et t'accorder meilleure santé et longue vie afin que je puisse te rendre un minimum de ce que je te dois

*À ma très chère mère **Salih***

Que ce travail soit un hommage aux énormes sacrifices que tu t'es imposés afin d'assurer mon succès, et que Dieu tout puissant, préserve ton sourire et t'assure une longue vie afin que je te rende, même un peu, pour tout ce que tu m'as donné. Je t'aime maman

*À ma chère sœur **khaira***

Puisse ton âme reposer en paix, Que Dieu tout puissant vous couvre de sa sainte miséricorde. J'ai souhaité de tout mon cœur que vous soyez présent ce jour-là, mais le destin de Dieu est au-dessus de tout. J'espère que tu es fier de moi. Je ne t'oublierai jamais

*À mon grand-père et ma grand-mère : **Mokhtaria et Mohamed***

Je n'oublierai jamais ce que vous m'avez donné depuis mon enfance, Je n'oublierai jamais votre soutien et vos encouragements constants pour moi. J'espère que Dieu prolongera votre vie et vous protégera pour nous.

*À mes chères sœurs **zohra, faiza, noria, nawal** et leurs maris et leurs enfants, à **Hanan** et son mari **Jalloul**, et à **Mouna**, Je vous dis à tous que vous êtes tous une partie inséparable de ma vie. Je vous aime.*

*À mes très chères Frères: **Abdelkader, Yasser et Aymen**, et à tous mes oncles*

*À Mes adorables : **Malak, mohamed, amina, ritaj, kawthar**, je vous aime mes douceurs.*

*À toute la famille **KALLOUL** et **KHECHAB***

*À mes très chères amies : **Hajira, halima, malika, racha, kheira, fatiha, fatima** et **dounia***

Et à tous ceux qui me sont chères.

À tous mes collègues de promotion Toxicologie et sécurité alimentaire.

DJOUHER



Dédicaces

Je dédie ce travail à :

À mes chers parents : lahreche aek et thamer halima pour tous leurs sacrifices, leur amour, leur tendresse, leur soutien et leurs prières tout au long de mes études,

À ma chères sœur hadjer pour leurs encouragements permanents, et leur soutien moral,

À mes chers frères karim et fares pour leur appui et leur encouragement,

À toute ma famille et mes amis pour leur soutien tout au long de mon parcours universitaire,

Que ce travail soit l'accomplissement de vos vœux tant allégués, et le fruit de votre soutien infailible,

Merci d'être toujours là pour moi.

NACEUR



Dédicaces

Merci, Allah de m'avoir donné la capacité d'écrire et de réfléchir, la force d'y croire, la patience d'aller jusqu'au bout du rêve et le bonheur

Je dédie ce modeste travail à celle qui m'a donné la vie, le symbole de tendresse, qui s'est sacrifiée pour mon bonheur et ma réussite, ma mère MALIKA.

À mon père, Meddah école de mon enfance, qui a été mon ombre durant toutes les années des études, et qui a veillé tout à long de ma vie à m'encourager.

À mes sœurs khaldia, fatima, Ghalia

À mes frères, M'hamed, abdelkader, Djamel, Abderazzak et Ismail

À mes amis Halima, Kika, Djouher merci pour tous ces moments qu'on avait vécus ensemble.

À ma famille, mes proches et à ceux qui me donnent de l'amour Karima, Fatma et Djihad.

KHEIRA

TABLE DES MATIÈRES

| | |
|-----------------------|-----|
| LISTE DES TABLEAUX. | I |
| LISTE DES FIGURES | ii |
| LISTE DES ABRÉVIATION | iii |
| INTRODUCTION | |

CHAPITRE I : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

| | |
|---|---|
| I.1. Genre <i>Aspergillus</i> | 4 |
| I.1.1. Identification du genre <i>Aspergillus</i> | 4 |
| I.1.1.1. Morphologie | 4 |
| I.1.1.2. Identification macroscopique | 4 |
| I.1.1.3. Caractéristiques microscopique | 4 |
| I.1.1.4. Cycle de développement | 4 |
| I.1.2. Pouvoir pathogène | 4 |
| I.1.2.1. Facteurs de virulence | 5 |
| I.1.3. Les mycotoxines | 5 |
| I.1.3.1. Champignons producteurs | 6 |
| I.1.3.2. Facteurs influençant la croissance des mycotoxines | 6 |
| I.1.3.3. Toxicité des mycotoxines | 6 |
| I.1.3.4. Mode d'action du mycotoxines | 6 |

| | |
|---|----|
| I.1.4. Pathogénicité du genre <i>Aspergillus</i> | 7 |
| I.1.4.1. Les aspergilloses | |
| 1. Source | 7 |
| 2. Signes cliniques | |
| I.2. Genre <i>Candida</i> | 7 |
| I.2.1. <i>Candida albicans</i> | 8 |
| I.2.2. Pathogénicité du genre <i>Candida albicans</i> | 8 |
| I.2.2.1. Candidoses superficielles | 8 |
| I.2.2.2. Candidoses profondes | 9 |
| I.3. Traitement conventionnelle | 9 |
| I.3.1. Mécanisme d'action | 10 |
| I.4. Polyéthylène Glycol | 10 |
| I.4.1. Propriétés du PEG | 11 |
| I.4.2. Les applications du PEG | 11 |

CHAPITRE II : MATÉRIEL & MÉTHODE

| | |
|-------------------------------------|----|
| II. Matériel et Méthodes | 13 |
| II.1. Objectif du travail | 13 |
| II.2. Date et lieu de travail | 13 |
| II.3. Matériel et produits utilisés | 13 |
| II.3.1. Matériel biologique | 13 |

| | |
|---|----|
| II.3.3. Produits et appareillage | 14 |
| II.4. Protocole expérimental | 15 |
| II.4.1. Schéma du protocole | 15 |
| II.4.2. Caractérisation du PEG 3400 et du FCZ par spectroscopie infrarouge FTIR | 16 |
| II.4.2.1. Caractérisation du PEG 3400 et FCZ par spectroscopie Raman | 16 |
| II.4.3. Détermination <i>in-vitro</i> de l'activité antifongique du FCZ (méthode de CMI par diffusion en milieu solide) et du conjugué PEG-FCZ sur la souche <i>candida albicans</i> | 17 |
| II.4.3.1. Principe | 17 |
| II.4.3.2. Préparation de l'inoculum, identification, repiquage et standardisation | 17 |
| II.4.3.2.1. Identification | 17 |
| II.4.3.2.2. Repiquage | 18 |
| II.4.3.2.3. Standardisation | 18 |
| II.4.3.3. Détermination <i>in-vitro</i> de l'activité antifongique du fluconazole sur la souche <i>candida albicans</i> par méthode de CMI (diffusion en milieu solide) | 19 |
| II.4.3.3.1. Préparation de solution mère de l'agent antifongique (Fluconazole) | 19 |
| II.4.3.3.2. Préparation des dilutions de l'agent antifongique (FCZ) | 19 |
| II.4.3.3.3. Préparation des disques | 20 |
| II.4.3.3.4. Mode opératoire | 20 |
| II.4.3.4. Détermination <i>in-vitro</i> de l'activité antifongique du FCZ (méthode de CMI par dilution en milieu solide) et du conjugué PEG-FCZ sur la souche <i>Aspergillus flavus</i> | 20 |
| II.4.3.4.1. Préparation des fractions molaires PEG-FCZ | 20 |
| II.4.3.4.2. Mode opératoire | 21 |
| II.4.4. Détermination <i>in-vitro</i> de l'activité antifongique du FCZ (méthode de CMI par dilution en milieu solide) et du conjugué PEG-FCZ sur la souche <i>Aspergillus flavus</i> | 22 |

| | |
|--|----|
| II.4.4.1.Principe | 22 |
| II.4.4.2.Confirmation de la pureté de la souche fongique | 22 |
| II.4.4.3. Détermination <i>in-vitro</i> de l'activité antifongique du FCZ sur la souche <i>Aspergillus flavus</i> (méthode de CMI par dilution en milieu solide) | 23 |
| II.4.4.3.1.Détermination de la CMI du FCZ sur <i>Aspergillus flavus</i> | 23 |
| II.4.4.3.2.Préparation de milieu de culture | 23 |
| II.4.4.3.3.L'inoculum | 23 |
| II.4.4.3.4.Préparation de la solution mère de FCZ | 23 |
| II.4.4.3.5.Préparation des dilutions décimales | 23 |
| II.4.4.3.6.Mode opératoire | 23 |
| II.4.4.4.Détermination <i>in-vitro</i> de l'activité antifongique du PEG-FCZ sur la souche <i>Aspergillus flavus</i> | 24 |
| II.4.4.1.Préparation du conjugué PEG-FCZ | 24 |
| II.4.4.2.Mode opératoire | 24 |
| II.5. Test de solubilité | 25 |
| II.5.1.Taux de solubilisation | 25 |

CHAPITRE III : RÉSULTATS & DISCUSSION

| | |
|--|----|
| III. Résultats et discussions | 26 |
| III.1. Caractérisation du PEG et FCZ par spectroscopie FTIR et Raman | 26 |
| III.2. Détermination <i>in-vitro</i> de l'activité antifongique du FCZ et conjugué PEG-FCZ sur la souche <i>Candida albicans</i> | 32 |

| | |
|---|----|
| III.2.1. Préparation de l'inoculum, identification et standardisation | 32 |
| III.2.2. Standardisation | 33 |
| III.2.3. Détermination <i>in-vitro</i> de l'activité antifongique du FCZ sur la souche <i>Candida albicans</i> | 34 |
| III.2.4. Mesure des diamètres des zones d'inhibitions | 36 |
| III.2.5. Détermination de la CMI du FCZ de la souche <i>candida albicans</i> | 37 |
| III.2.6. Résultats et discussion | 37 |
| III.2.7. Détermination <i>in-vitro</i> de l'activité antifongique du conjugué PEG-FCZ sur la souche de <i>candida albicans</i> | 39 |
| III.2.7.1. Mesure des diamètres des zones d'inhibitions des proportions PEG-FCZ | 39 |
| III.2.7.2. Calcul des moyennes des zones d'inhibitions pour chaque proportion et leurs taux d'inhibitions respectifs | 41 |
| III.2.7.3. Résultats et discussion | 41 |
| III.3. Détermination <i>in-vitro</i> de l'activité antifongique de fluconazole et du conjugué PEG-FCZ sur la souche <i>Aspergillus flavus</i> | 43 |
| III.3.1. Préparation de l'inoculum, identification | 43 |
| III.3.2. Détermination <i>in-vitro</i> de l'activité antifongique de fluconazole sur la souche <i>Aspergillus flavus</i> | 43 |
| III.3.2.1. Déterminations de la CMI du fluconazole sur la souche <i>Aspergillus flavus</i> | 43 |
| III.3.3. Résultats et discussion | 45 |
| III.3.4. Détermination <i>in-vitro</i> de l'activité antifongique du conjugué PEG-FCZ sur la souche <i>Aspergillus flavus</i> | 46 |
| III.3.4.1. Mesure des diamètres des zones de croissances du l' <i>Aspergillus flavus</i> | 47 |

| | |
|---|----|
| III.3.4.2. Calcul des moyennes des zones de croissances pour chaque proportion et leurs taux d'inhibitions relatifs | 48 |
| III.3.4.3. Résultats et discussion | 49 |
| III.4. Test de solubilité | 50 |
| III.4.1. Calcul du taux de solubilité | 50 |
| Conclusion | 53 |
| Références bibliographiques | 55 |
| Annexes | 72 |

Liste des Tableaux

| | | |
|------------------------|---|----|
| Tableau N° 01 : | Mycotoxines et champignons responsables de leur production | 6 |
| Tableau N° 02 : | Utilisation du PEG dans les applications médicales | 12 |
| Tableau N° 03 : | Appareillage, verrerie et produits utilisés | 14 |
| Tableau N° 04 : | Préparation des dilutions du FCZ | 19 |
| Tableau N° 05 : | Préparation des fractions molaires du PEG-FCZ pour <i>candida albicans</i> | 21 |
| Tableau N° 06 : | préparation des fractions molaires du PEG-FCZ pour <i>Aspergillus flavus</i> | 24 |
| Tableau N° 07 : | Attribution des bandes d'absorptions infrarouges des spectres FCZ et PEG-3400. | 28 |
| Tableau N° 08 : | Attribution des bandes des spectres Raman du FCZ et PEG-3400 | 31 |
| Tableau N° 09 : | Mesure des diamètres des zones d'inhibitions du FCZ sur la souche <i>Candida</i> | 36 |
| Tableau N° 10 : | Mesure des diamètres des zones d'inhibitions sous l'effet du conjugué PEG-FCZ sur la souche de <i>candida albicans</i> | 40 |
| Tableau N° 11 : | La moyenne des zones d'inhibitions du conjugué PEG-FCZ chez le <i>candida albicans</i> avec leurs taux d'inhibitions respectifs | 41 |
| Tableau N° 12 : | Diamètre des zones de croissances d' <i>Aspergillus flavus</i> en présence du FCZ | 44 |
| Tableau N° 13 : | Diamètre des zones de croissances de l' <i>Aspergillus flavus</i> en présence des fractions molaires PEG-FCZ | 47 |
| Tableau N° 14 : | La moyenne des zones de croissances de l' <i>Aspergillus flavus</i> avec leurs taux de croissance relatifs | 48 |
| Tableau N° 15 : | Calcul du taux de solubilité des fractions molaires PEG-FCZ | 50 |

Liste des Figures

| | | |
|-----------------------|---|----|
| Figure N° 01 : | Structure du fluconazole | 9 |
| Figure N° 02 : | Structure d'une unité de répétition PEG | 10 |
| Figure N° 03 : | Schéma du protocole expérimental | 15 |
| Figure N° 04 : | Identification par spectroscopie infrarouge (FTIR) du FCZ et du PEG-3400 | 27 |
| Figure N° 05 : | Identification par spectroscopie Raman du FCZ et du PEG-3400 | 30 |
| Figure N° 06 : | Observation macroscopique de <i>candida albicans</i> | 32 |
| Figure N° 07 : | Observation microscopique de <i>candida albicans</i> | 33 |
| Figure N° 08 : | Observation microscopique de <i>candida albicans</i> sur lame Malassez. | 33 |
| Figure N° 09 : | <i>Candida albicans</i> (témoin- à droite, témoin+ à gauche). | 34 |
| Figure N° 10 : | Zones d'inhibitions de <i>candida albicans</i> en fonction des différentes dilutions du FCZ. | 35 |
| Figure N° 11 : | Variation des zones d'inhibitions du <i>candida albicans</i> en fonction des différentes dilutions de FCZ. | 37 |
| Figure N° 12 : | Zones d'inhibitions du <i>candida albicans</i> en fonction des fractions molaires PEG-FCZ. | 39 |
| Figure N° 13 : | Histogramme de variation des zones d'inhibitions en fonction des fractions molaires PEG-FCZ chez le <i>candida albicans</i> | 40 |
| Figure N° 14 : | Taux d'inhibition de la croissance de <i>candida albicans</i> | 42 |
| Figure N° 15 : | Observation macroscopique du genre <i>Aspergillus flavus</i> | 43 |
| Figure N° 16 : | Observation microscopique de l' <i>Aspergillus flavus</i> | 43 |
| Figure N° 17 : | Zones de croissances de l' <i>Aspergillus flavus</i> en fonction des différentes dilutions du FCZ. | 44 |
| Figure N° 18 : | Variation de la croissance de l' <i>Aspergillus flavus</i> en fonction des différentes dilutions du FCZ | 45 |
| Figure N° 19 : | Zones de croissance de l' <i>Aspergillus flavus</i> en fonction des différentes fractions molaires PEG-FCZ | 47 |
| Figure N° 20 : | Zones de croissance de l' <i>Aspergillus flavus</i> (PEG-FCZ) | 48 |
| Figure N° 21 : | Variation du taux d'inhibition de l' <i>Aspergillus flavus</i> en fonction des différentes fractions molaires PEG-FCZ | 49 |
| Figure N° 22 : | Evolution du pourcentage des masses solubilisées et non solubilisées en fonction des différentes fractions molaires PEG-FCZ | 51 |
| Figure N° 23 : | Test de solubilité des fractions molaires PEG-FCZ | 52 |
| Figure N° 24 : | Evolution du taux de solubilité en fonction des différentes fractions molaires PEG-FCZ | 52 |

Liste des abréviations

AAF: Agent Antifongique

FAO: Food and Agricultural Organisation

FDA: Food and Drug Administration

FCZ: Fluconazole

FTIR: Fourier Transform Infrared spectroscopy

IgG: Immunoglobuline G

IgM: Immunoglobuline M

PEG: Polyéthylène glycol

PDA: Potato Dextrose Agar

ARN: RiboNucleic Acid

INTRODUCTION

Aujourd'hui, les infections fongiques présentent un risque important pour la santé humaine, animale et aussi pour l'alimentation, ils sont causés par des champignons pathogènes particulièrement par le genre *Candida* provoquant des infections chez l'homme, subdivisés à des infections superficielles avec un pourcentage de 25% (**Havlickova et al., 2009**), et des infections invasives qui touchent un million et demi de personnes chaque année par ce genre et par le genre *Aspergillus* (**Brown et al., 2012**).

Ce dernier genre de champignons qui est classé aussi comme mycotoxinogène et qui affecte même le domaine agroalimentaire, par la sécrétion des mycotoxines produites par le genre *Aspergillus spp.* et certains genres de champignons tel que *Fusarium spp.* et *Penicillium*, ces substances secondaires entraînent des maladies graves et parfois mortelles chez les humains et les animaux (**Wagacha & Muthomi, 2008**), ils sont présents dans 25% des cultures vivrières mondiales selon FAO (**Eskola et al., 2020**), ce qui provoque une réduction du rendement et de la qualité des récoltes en plus des pertes économiques (**Adeyeye, 2016**).

Le traitement courant contre ces champignons pathogènes sont des antifongiques, des médicaments qui éliminent sélectivement les agents pathogènes fongiques, composés par des classes : polyènes « Amphotéricin », azoles « fluconazole », Fluorocytosine (**Dennis et al., 1996**)

Bien que les antifongiques ont un large spectre d'activité, du fait qu'ils sont utilisés dans le domaine médical et agricole, contre les différentes moisissures dans les céréales, les légumes et les fruits (**Hof, 2001**) ; leur profil d'innocuité reste médiocre à cause de leur comportement toxique sur la santé publique, spécifiquement la toxicité hépatique, liée à la dose quotidienne chez les patients immunodéprimés (**Tverdek et al., 2016**) ; la résistance de certains champignons aux antifongiques, car l'ergostérol n'est pas nécessaire dans leur membrane (**Hof, 2001**) ; leur coût élevé (**Grenouillet et al., 2013**) ; ainsi que leur faible solubilité.

Pour faire face à ces problèmes, de nouveaux efforts doivent être consacrés pour la découverte des nouvelles alternatives solubles, non toxiques pour réduire les effets secondaires, qui suivent le traitement avec ces antifongiques, biodégradables et moins coûteux pour améliorer ces formulations.

Le polyéthylène glycol est un polymère utilisé dans les applications médicales, pharmaceutiques et agricoles (**Haryanto et al., 2018**) grâce à leur biocompatibilité et leur

solubilité et sa stabilité chimique (**Baek et al., 2018**), sa non toxicité (**Dipalma et al., 2000**) et sa biodégradabilité (**D'souza et Shegokar, 2016**).

Cependant l'activité antimicrobienne de cette molécule n'a pas été suffisamment étudiée auparavant, à l'exception de quelques études bien restreintes (**Nalawade et al., 2015 ; Chirife et al., 1983**).

À travers cette étude nous essayerons de résoudre les problèmes causés au cours de l'utilisation des traitements antifongiques traditionnels en l'associant à une molécule très courante dans les applications biologiques et pharmaceutiques qui est le polyéthylène glycol de poids moléculaire 3400 (PEG-3400).

Ce travail a pour but d'étudier et d'estimer l'effet antifongique du conjugué polyéthylène glycol avec un agent antifongique de choix qui est le fluconazole contre des différentes souches fongiques. À travers nos recherches documentaires, nous n'avons pas rencontré des études qui s'intéressent à développer une thérapie antifongique contre des champignons pathogènes en incorporant la molécule de polyéthylène glycol.

La première partie de notre travail est consacrée à l'étude bibliographique relative aux champignons pathogènes *Aspergillus* et *Candida*

Ensuite, nous avons consacré une partie pour la définition du polymère PEG, ses propriétés et leur utilisation dans différents domaines alimentaire, agriculture et spécifiquement leur utilisation dans le domaine médical et pharmaceutique.

La deuxième partie est consacrée à l'étude expérimentale :

- Caractérisation du PEG 3400 et fluconazole par la spectroscopie infrarouge (FTIR) et Raman.
- Identification macroscopique et microscopique des souches fongiques utilisées.
- Estimation *in-vitro* du potentiel antifongique du FCZ sur les souches fongiques.
- Estimation *in-vitro* du potentiel antifongique du conjugué PEG-FCZ sur les souches fongiques.

La troisième partie est consacrée la présentation des résultats obtenus et leurs discussion.

Enfin, dans la dernière partie, nous terminons ce travail avec une conclusion générale et des perspectives.

Chapitre I :

ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1. Genre *Aspergillus*

Les espèces d'*Aspergillus* sont des moisissures cosmopolites ubiquistes, se trouvent dans le milieu rural, tel que les céréales ou les fruits moisis. Appartiennent au règne du Fungi, au phylum des Ascomycota, à la classe de l'Eurotiomycetes, à l'ordre des Eurotiales et à la famille des trichocomaceae (Dauchy et al., 2016). Ce sont les champignons les plus retrouvés dans l'environnement humain (Kousha et al., 2011).

I.1.1. Identification du genre *Aspergillus*

I.1.1.1. Morphologie

Aspergillus produit un aspergillum, un conidiophore et un stipe asepté qui terminant par une vésicule qui portées les phialides. Ces derniers produisent des conidies (Samson, 1994).

I.1.1.2. Identification Macroscopique

Après 24 à 48 h de culture, une formation de colonies plates à des courts filaments aériens blancs est constatée. Leur fructification fait par repiquage de la colonie sur gélose Malt et Czapek, Après 48 à 96 h, les colonies prennent une teinte essentielle pour le diagnostic. (Chabasse et al., 2002).

I.1.1.3. Caractéristiques microscopique

L'examen microscopique de l'*Aspergillus* permet l'identification de la tête aspergillaire, l'élément principal qui caractérise ce genre et un thalle végétatif formé de filaments mycéliens qui produit les conidiospores et se termine par une vésicule sur laquelle sont disposées les phialides qui forment la tête aspergillaire. (Chabasse et al., 2002).

I.1.1.4. Cycle de développement

Dans des conditions optimales, deux phases réalisées pour le développement, l'une la production de mycélium et l'autre la formation des conidiophores qui produisent des conidiospores (Adams, 1995).

I.1.2. Pouvoir pathogène

Les espèces d'*Aspergillus* qui peuvent être pathogène sont classées par ordre suivant : *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus nidulans*. (Chabasse et al., 2002).

I.1.2.1. Facteurs de virulence

Des adhésines sont localisés à la surface des conidies (Upadhyay et al., 2009) qui ont adhérer à la surface de l'épithélium respiratoire et donne au champignon une résistance aux défenses immunitaire (Simon, 2011), ainsi que des hydrophobines empêcher la reconnaissance des conidies par le système immunitaire (Aimanianda et al., 2010)

D'autre part, l'*Aspergillus*, produisent des enzymes qui ont une activité élastinolytique qui facilitent l'invasion du tissus pulmonaires (Hogan et al., 1996), et le RNases cliver les ribosomes de cellules eucaryotes, (Ok et al., 2009).

l'*Aspergillus* synthétisent aussi des mycotoxines qui modifier *in-vitro* des cellules de l'épithélium respiratoire de l'homme, (Khoufache et al., 2007) inhiber la phagocytose par les macrophages de rongeurs, affecté le métabolisme du glucose (Eichner et al., 1986) et inactiver les lymphocytes B (Sutton et al., 1994) et les lymphocytes T (Mullbacher et al., 1985).

Ces dernières sont définit comme suivant :

I.1.3. Mycotoxines

Les mycotoxines ce sont des contaminants ou des métabolites secondaires produits par certains champignons, les mycotoxines les plus connus sont : Aflatoxines, ochratoxine A, trichothécènes : la zéaralénone, alcaloïdes de l'ergot (Marin et al., 2013).

Il sont carcinogènes pour l'homme (McKean et al., 2006), elle peuvent cependant saboter le système immunitaire et provoquer une réduction des IgG et niveaux d'IgM ainsi qu'une réduction de la réponse anticorps (Hussein & Brasel, 2001) et l'inhibition de la croissance animal et humaine (Boulenouar, 2011).

Ces métabolites secondaires restent dans l'aliment fini car elles ne sont pas détruites par la cuisson ou par stérilisation, donc elles sont thermostables (Cast, 2003).

La présence des concentrations élevées de mycotoxines dans les aliments, ainsi que le type et le mécanisme d'action de chaque mycotoxine, sont classés comme des facteurs de gravité pour la santé humaine et animale. (Hussein & Brasel, 2001).

I.1.3.1. Champignons producteurs

Plusieurs espèces de champignons appartenant aux genres *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria* et *Claviceps* produisent les mycotoxines (**Frisvad et al., 2005**).

Tableau N°01 : *Mycotoxines et champignons responsables de leur production*

| Champignons | Toxines |
|--------------------|---|
| <i>Aspergillus</i> | Aflatoxine (Klich, 2007) Ochratoxine A (Bayman et al., 2002) |
| <i>Penicillium</i> | Patuline (Sommer et al., 1974) Citronine (Ciegler et al., 1977) Acide cyclopiazonique (Pitt et al., 1986) |
| <i>Fusarium</i> | Trichothécènes, nivalérol(VNI), Zéaralénone, fusarénon-X (Lee et al., 1986) |
| <i>Alternaria</i> | Alternariol AOH et alternariol méthyléther AME (Tournas & Stack, 2001), Acide Ténuazonique, altenuène, altétoxine I (Li et al., 2001) |
| <i>Claviceps</i> | Alcaloïdes de l'Ergot (Paul et al., 2007) |

I.1.3.2. Facteurs influençant la croissance des mycotoxines

La teneur en eau, la température, l'anaérobiose (**Boudra, n.d.**), l'instabilité des propriétés toxigènes, la spécificité de la souche fongique et le climat sont des facteurs influençant la croissance des mycotoxines dans les aliments (**Zain, 2011**), avec d'autres facteurs comme la biodisponibilité des micronutriments (**Milani, 2013**).

I.1.3.3. Toxicité des mycotoxines

Après la consommation des aliments contaminés par des mycotoxines, ils provoquent la maladie appelée mycotoxicose chez l'homme et l'animal (**Richard, 2007**).

Les quatre types de toxicité des mycotoxines sont : aiguë, chronique, mutagène et tératogène, ils provoquent des maladies allergiques, des immunosuppression et le cancer chez l'homme (**Pitt, 2000**).

I.1.3.4. Mode d'action des mycotoxines

Les mycotoxines ont une action sur la synthèse de l'ARN ribosomal, elles affectent la synthèse de toutes les catégories de nucléaires de haut poids moléculaire ARN, dégradent les polysomes, (**Lafarge & Frayssinet, 1970**), et inhibent la synthèse des protéines dans les cellules humaines (**Wei et al., 1974**).

I.1.4. Pathogénicité du genre *Aspergillus*

Les mycotoxines produites à partir du genre *Aspergillus*, et qui se trouvent dans les denrées alimentaires sont représentées sur le Tableau n°02 en annexe n°04 (**Jarvis & Miller, 2005**).

I.1.4.1. Les aspergilloses

1. Source

L'aspergillose intervient à cause d'inhalation de spores d'*Aspergillus* (**Desoubeaux & Chandener, 2010**).

2. Signes cliniques

L'aspergillose invasive touche beaucoup les poumons, le tractus gastro-intestinal et la peau. Les symptômes sont : fièvre, douleur pleurétique et hémoptysie, touche aussi les patients de transplantation des organes et surtout les patients transplantés pulmonaires souffrent de la trachéobronchite dont les symptômes de la dyspnée, et de la toux (**Fortún et al., 2012**).

Après une colonisation des cavités préexistantes par le champignon, une masse enchevêtrée d'hyphes cloisonnés, des éléments sanguins et un mycétome sont produites par une infection opportuniste appelée l'aspergillome pulmonaire. Les symptômes peu : l'hémoptysie massive, La fièvre et la perte de poids, parfois ça sera une hémoptysie massive. Peut se développer en cancer (**Thorac, 1986**).

Une réponse immunitaire allergique à *Aspergillus* provoque l'aspergillose bronchopulmonaire allergique surtout chez les patients asthmatiques (**Patterson & Strek, 2010**).

I.2. Genre *Candida*

Candida est une levure, caractérisé par l'absence de forme sexuelle (**Barns et al., 1991**) comprenait des espèces ascomycète et basidiomycète (**Viljoen & Kock, 1989**).

Ce genre commensale de tube digestif et sur la peau, peut provoquer des lésions sur les muqueuses (**Rhoda, 1957**).

I.2.1. *Candida albicans*

Candida albicans est une levure diploïde opportuniste, elle a la capacité de passer d'une morphologie cellulaire de levure à une morphologie cellulaire mycélienne, provoque des infections surtout chez les patients immunodéprimés (**Chu et al., 1993**), elle a la capacité aussi de former des pseudohyphae et des vrai hyphes (**Sullivan et al., 1996**), reproduit asexuellement par bourgeonnement (**Drouhet, 1976**), non capsulées, non pigmentées (**Alkurjiya et al., 2018**), classée parmi les Ascomycètes (**Papon et al., 2013**).

Candida albicans se présente aussi sous trois formes :

La forme blastospore (**Chattaway et al., 1968**), la forme pseudomycélium (**Borgers et al., 1979**) et la forme mycélienne vraie (**Gow & Gooday, 1982**).

Candida albicans est la plus isolée en pathologie humaine par un pourcentage de 64% et 68% (**Marchetti et al., 2004**), et leur développement fait par des facteurs internes, physiopathologiques et des facteurs externes dus à l'environnement et aux traitements médicamenteux (**Drouhet, 1976**).

I.2.2. Pathogénicité du genre *Candida albicans*

Il existe deux types de candidose l'une des candidoses superficielles et l'autre des candidoses profondes (**Parker et al., 1975**).

I.2.2.1. Candidoses superficielles

1. Candidose buccale : peut-être aiguës, chroniques (**Akpan & Morgan, 2002**)
Candidose pseudomembraneuse ou muguet, candidose atrophique et chéilite angulaire.
2. Candidose cutanée : la plus fréquente c'est l'intertrigo (**Nobles & Miller, 2020**).
3. Candidose vulvo-vaginale : touche beaucoup plus les femmes (**Anane et al., 2010**).
4. Balanite candidosique : est une inflammation du gland du pénis (**Stary et al., 1996**).

I.2.2.2. Candidoses profondes

1. Candidoses viscérales : chez les patients de la leucémie et les cancers solides (**Yamazaki et al., 1999**).
2. Candidémie : *Candida albicans* responsables de 67% des cas de candidémie (**Richet et al., 1991**).
3. Candidoses systémiques : un hémoculture pour les espèces de *Candida* (**Leleu et al., 2002**).
4. Candidoses disséminées : les facteurs iatrogènes ou nosocomiaux courants sont les principaux facteurs de risque de candidose disséminée (**Spellberg et al., 2006**).

I.3. Traitement conventionnelle

La famille Azole est parmi les antifongiques les plus utilisées dans le traitement des infections fongiques, ils sont classés en deux groupes selon leur structure chimique : les imidazoles et les triazoles. Les imidazoles contiennent deux cycles azolés, ils sont moins efficaces dans l'inhibition de synthèse des stérols humains que les triazoles qui possèdent trois cycles azolés. Parmi cette dernière classe ; le fluconazole dont sa structure chimique est illustré dans la figure N°01, est un antifongique efficace contre les espèces de *Candida* (**Zonios & Bennett, 2008**) et dans le traitement des mycoses profondes, disponible par voie orale et intraveineuse (**Richardson et al., 1990**). Cet antifongique fera l'objet de notre étude, va nous servir à estimer son pouvoir antifongique contre quelques souches fongiques.

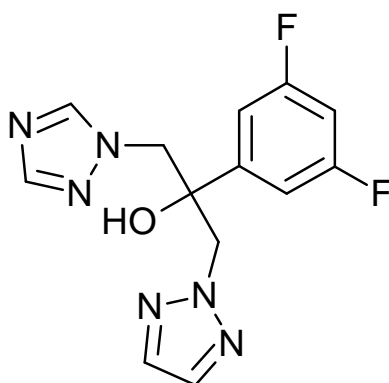


Figure N°01: Structure de fluconazole.

I.3.1. Mécanisme d'action

Le fluconazole basé sur l'inhibition du lanostérol 14 α -déméthylase dépendante du cytochrome P-450 qui est responsable de la synthèse de l'ergostérol, l'élément le plus essentiel dans la membrane cellulaire fongique (**Hay, 2003**) ce blocage provoque un perd de stabilité de la membrane cellulaire fongique et une diminution de la production de la chitine et le transport des nutriments, ce qui compromet l'intégrité de la membrane cellulaire (**Hof, 2006**)

La toxicité des médicaments antifongiques (**Somchit et al., 2002**), ainsi que leur faible solubilité dans l'eau (**Corrêa & Salgado, 2011**) en plus de leur coût relativement élevé, reste des aspects les plus difficiles à améliorer.

Afin de surmonter ces obstacles et de réduire les dommages du traitement avec ces antifongiques, et dans le but de protéger l'être humain et de protéger sa consommation alimentaire contre ces champignons pathogène et mycotoxinogènes, on veut réaliser des essais dont le principe est de combiner l'agent antifongique fluconazole et le polymère PEG 3400 afin d'en profiter de certaines caractéristiques bénéfiques de ce dernier comme sa solubilité élevée, son coût relativement bas et sa biodégradation.

I.4. Polyéthylène Glycol

Le polyéthylène glycol est l'ensemble de sous-unités répétitives d'oxyde d'éthylène (figure N°02) avec des poids moléculaires de 44 Da, c'est un polymère amphiphile contient deux groupes hydroxyle terminaux, il s'agit des chaînes PEG linéaires et ramifiés (**Bailon et al., 2001**), leur fabrication fait par une réaction anionique d'ouverture de cycle de l'oxyde d'éthylène (**Hermanson, 2013**)

Le nom chimique : alpha-Hydro-omega-hydroxypoly (oxy-1,2-ethanediol) (**Soltanpour & Jouyban, 2013**)

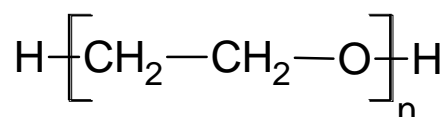


Figure N°02: Structure d'une unité de répétition PEG (**Turecek et al., 2016**).

I.4.1. Propriétés du PEG

Le PEG est utilisé dans nombreux application particulièrement dans les applications biomédicales grâce à leur biocompatibilité (**Thanh et al., 2020**).

Sa biodégradation dans un milieu aérobie est de 88% en 4 jours qui est prouvée grâce aux travaux de (**Huang et al., 2005**).

Sa Solubilité dans l'eau, et sa non toxicité qui est approuvé par la FDA pour la consommation interne, ce qui le rend utilisable dans de nombreuses applications comme la fabrication des médicaments et la production cosmétique, (**Abuchowski et al., 1977**). Sa Faible volatilité, il est moins coûteux et recyclable aussi il est respectueux de l'environnement (**Upadhyay et al., 2009**). En plus de son hydrophilicité supérieure (**Alcantar et al., 2000**), il permet aussi de renforcer l'effet de bioactif (**Winnacker & Rieger, 2017**).

I.4.2. Les applications du PEG ; (**Zalipsky & Harris, 1997**)

1. Conjugués PEG-enzyme pour le traitement industriel.
2. Conjugués PEG-protéine pour applications pharmaceutiques.
3. Hydrogels PEG pour l'administration de médicaments.

Si le PEG lié de manière covalente : (**Harris Milton, 1992**)

- Réduire le taux de clairance rénale.
 - Solubiliser d'autres molécules.
4. Utilisé aussi comme laxatif dans les cas de constipation chez les enfants (**Candy & Belsey, 2009**) et la réalisation d'une coloscopie réussie (**Vejzovic et al., 2016**)
 5. A une activité antimicrobienne important contre certaines bactéries pathogènes comme le PEG 400 (**Chirife et al., 1983**).
 6. Autres utilisation du PEG, comme additifs alimentaires, véhicules dans des applications dermatologiques, aidé à la séparation et à la purification, utilisé en tant que stabilisateur stérique classique capable d'échapper au système de défense immunitaire de l'hôte (**D'souza & Shegokar, 2016**).

Tableau N°02: Utilisation du PEG dans les applications médicales (Modjarrad & Ebnesajjad, 2014).

| Polymère | Applications médicales |
|-------------------------|---------------------------|
| Polyéthylène glycol PEG | La reconstruction |
| | Prévention des adhérences |
| | Cicatrisation des plaies |
| | Les lentilles de contact |
| | Hémostase |

Chapitre II :

MATÉRIEL & METHODES

II. Matériel et Méthodes

II.1. Objectif du travail

Le but de notre travail est d'examiner l'effet antifongique du fluconazole, et d'estimer l'effet antifongique d'un polymère connu pour ses applications biomédicales et pharmaceutiques qui est le polyéthylène glycol PEG de poids moléculaire 3400 ainsi que l'effet synergique entre eux (Fluconazole+PEG) sur des souches fongiques les uns sont pathogènes (*Candida albicans*) et les autres sont pathogènes et mycotoxinogènes (*Aspergillus flavus*), et de comparer l'effet de ce conjugué à celle du fluconazole.

Pour réaliser ce travail nous avons :

- ✓ Estimer l'effet antifongique *in-vitro* de fluconazole sur les souches fongiques utilisées (*Candida albicans*, *Aspergillus flavus*)
- ✓ Estimer l'effet antifongique *in-vitro* de conjugué PEG-FCZ à l'égard des souches utilisés (*Candida albicans*, *Aspergillus flavus*).
- ✓ Comparer l'effet antifongique *in-vitro* du conjugué PEG-FCZ celui au fluconazole sur les deux souches

II.2. Date et lieu de travail

Le travail s'est étalée durant la période du 24/04/2021 jusqu'au 13/06/2021 au niveau de laboratoire de Microbiologie de la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie à l'université Ibn Khaldoun, Tiaret.

II.3. Matériel et produits utilisés

II.3.1. Matériel biologique

La souche de *Candida albicans* utilisé dans ce travail a été obtenue du laboratoire d'analyses médicales de Dr. Ghلام Allah à Tiaret, la souche est issue d'un prélèvement buccal provenant d'un patient, et elle a été conservée au réfrigérateur.

Pour la deuxième souche mycotoxinogène ; l'*Aspergillus flavus* obtenir à partir du groupe (Boubabouri Dounia, Benhenni fatima encadrées par Dr. Yezli W. après un isolement à partir des pâtes alimentaire).

II.3.2. Produits et appareillage

- Polyéthylène glycol de poids moléculaire 3400.
- Médicament antifongique : fluconazole à 150mg, disponible chez les pharmacies.

Tableau N° 03 : Appareillage, verrerie et produits utilisés

| Verreries | Appareillages | Produits | Autres |
|---|--|---|--|
| -Bécher -Flacons -Pipette pasteur -Tubes à essai | -Spectroscopie FTIR -Spectroscopie Raman -Balance magnétique « KERN EW » -Agitateur « IKA RCT BASIC » -Autoclave « WOLF » -Vortex « VIBROFIX ELECTRONIQUE VF1 » -Incubateur de 28°C « BINDER » -Incubateur de 37°C « MEMMERT » -Lame de Malassez -Microscope optique « OPTIKA B350 » -Centrifugeuse « SIGMA 203 » -Balance de précision « KERN ALS 120-4N » | -Eau distillée stérile -Bleu de méthylène -Antibiotique (Céfazoline) -Eau de javel | -Boîtes de Pétri -Bec Bunsen -Ance de platine -Pince de platine -Portoir de tube à essais -Ruban adhésif -Pissettes -Tubes sec -Seringes -Lame et lamelle |

II.4. Protocole expérimental

II.4.1. Schéma du protocole

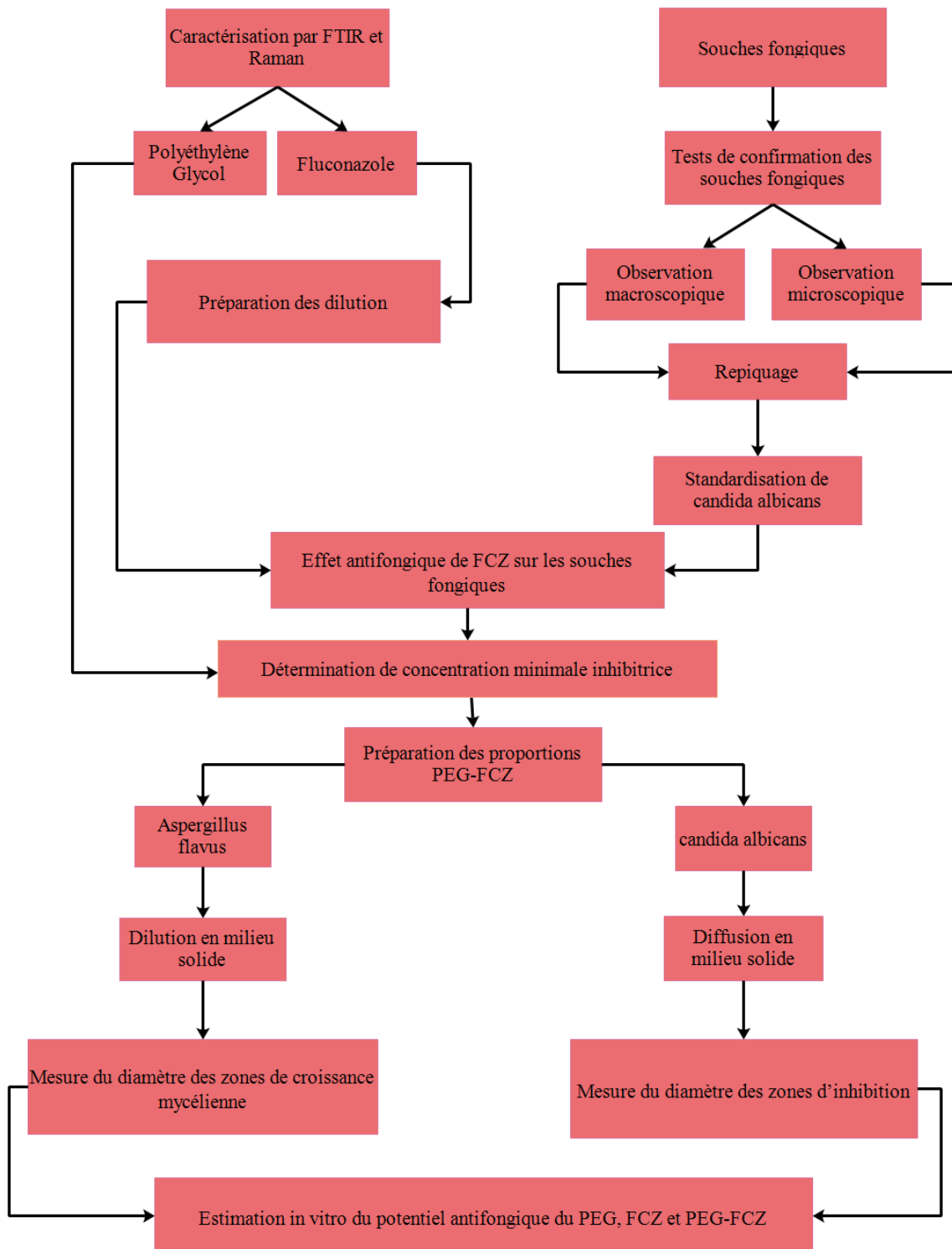


Figure N°03: Schéma du protocole expérimental.

II.4.2. Caractérisation du PEG 3400 et du FCZ par spectroscopie infrarouge FTIR

La spectroscopie infrarouge IR est une technique d'analyse non destructive permet de savoir des informations vibrationnelles, l'identification des groupements moléculaires et la caractérisation des fonctions biochimiques (**Gault et al., 2001**) basée sur l'absorption d'un rayonnement infrarouge par un matériau, lorsque la longueur d'onde du faisceau est égale à l'énergie de vibration de la molécule, cette absorption des vibrations signifie des liaisons chimiques dans la matière (**Gueye, 2018**), basée aussi sur l'interaction du rayonnement électromagnétique avec la matière. Il existe deux instruments pour la caractérisation des polymères IR et Raman spectroscopie (**Yuniarto et al., 2016**)

II.4.2.1. Caractérisation du PEG 3400 et FCZ par spectroscopie Raman

La spectroscopie Raman est une méthode d'analyse non destructive basée sur le phénomène des vibrations des liaisons entre les atomes, il fournit un spectre unique caractéristique à chaque matériau. Le principe physique de cette méthode repose sur la lumière qui est renvoyée lorsqu'elle arrive sur la surface de l'objet, une partie de cette lumière est réfléchi par la première couche d'atome, une deuxième est absorbée et transformée en chaleur et une troisième est diffusée dans toutes les directions de l'espace (**Bouchard et al., 2007**), c'est une technique complémentaire à la spectroscopie infrarouge permet de connaître les états transitoires de vibrations et de rotations d'une molécule excitée par une puissance source lumineuse monochromatique du type laser, il est indépendant de la longueur d'onde de la source utilisée ce qui permet d'éliminer certains phénomènes indésirables (**Sanjin, 2014**), basée aussi sur la présence d'une variation de la polarisabilité de la molécule lors de la vibration, et utiliser le principe de la diffusion inélastique de la lumière par la matière qui permet la création par l'onde électromagnétique excitatrice d'un dipôle induit qui rayonne (**Daher, 2012**). Donc un faisceau de lumière monochromatique produit par un laser continu de fréquence, est focalisé sur l'échantillon à analyser. La zone d'intérêt est sélectionnée à la surface de l'échantillon visualisé grâce à une caméra vidéo, elle est divisée en pixels de taille définie, le laser est focalisé sur le premier pixel et le spectre Raman correspondant est enregistré (**Maslova et al., 2015**).

II.4.3. Détermination *in-vitro* de l'activité antifongique du FCZ (méthode de CMI par diffusion en milieu solide) et du conjugué PEG-FCZ sur la souche *candida albicans*

II.4.3.1. Principe

L'effet antifongique du fluconazole et le conjugué PEG-FCZ a été déterminé par la méthode de diffusion en milieu solide, leur principe est l'utilisation des disques imprégnée avec un gradient de concentrations de l'antifongique utilisé (fluconazole FCZ) déposée sur le gélose Sabouraud préalablement ensemencée avec l'inoculum préparé à partir d'une souche fongique pure de *candida albicans* d'un prélèvement buccal.

Après 18-24 heures d'incubation, une zone d'inhibition de croissance fongique doit être formée autour de disque, cette technique permet de déterminer la CMI qui est la plus faible concentration de l'antifongique capable d'inhiber toute croissance visible de la souche fongique (Huet, 2007).

La détermination de cette CMI, s'effectue après la mesure des diamètres des zones d'inhibitions autour de chacun des disques (Ouraini et al., 2007)

II.4.3.2. Préparation de l'inoculum, identification, repiquage et standardisation

II.4.3.2.1. Identification

Pour confirmer l'identité de la souche *candida albicans*, un examen macroscopique et microscopique a été réalisé.

Examen macroscopique : ce genre caractérisé par des colonies visibles arrondies mesurant de 3-30 µm de diamètre (Coronado-Castellote & Jiménez-Soriano, 2013), crémeuses, lisses et blanches après l'incubation sur milieu Sabouraud.

Examen microscopique : caractérisé par la présence des colonies ovoïdes à bourgeonnement multilatéral mesurant de 3-10µm (Caraës, 2016).

Cette dernière observation a été réalisée à l'état fixée, par l'utilisation d'un colorant de bleu de méthylène.

Pour leur réalisation en suit les étapes suivantes :

- ✓ Le prélèvement de la souche fongique *candida albicans* sur une lame, puis fixé par la chaleur.

- ✓ Refroidir la lame.
- ✓ Verser quelques gouttes de bleu de méthylène sur la lame.
- ✓ Rincer la lame et puis la faire sécher.
- ✓ L'observer microscopique à grossissement $\times 40$.

II.4.3.2.2. Repiquage

Dans des conditions d'asepsie ;

- ✓ Liquéfier le milieu sabouraud à 121°C pendant 10 min.
- ✓ Ajouter 1ml de l'antibiotique Céfazoline avec sabouraud pour éviter la contamination bactérienne.
- ✓ Couler les boites de pétri par le milieu et on laisse solidifier.
- ✓ À l'aide d'une anse de platine on gratte une quantité de *candida albicans* et on fait l'ensemencement par des stries.
- ✓ Incubation à 30°C pendant 48 à 72 heures.

II.4.3.2.3. Standardisation

Dans une zone stérile, on évolue de la manière suivante :

- **Préparation de l'inoculum**

Dans un tube à essai contient 9.9 ml de l'eau distillée stérile, on ajoute une quantité de la souche fongique *candida albicans* et on l'agite avec un vortex.

- **Observation**

À l'aide d'une lame Malassez déposé sur le microscope optique avec une lamelle au-dessus, on prélève deux goutte de l'inoculum avec une pipette pasteur et on l'ajoute entre la lame de Malassez et la lamelle, pour déterminer la charge microbienne par dénombrement.

- **Dénombrement :**

La lame Malassez composée de quatre cadrant, chaque cadrant contient vingt carrés. L'observation microscopique avec l'objectif $\times 40$ clarifie des sphères. On compte le nombre de cellules dans chaque cadrant avec l'élimination des cellules qui sont situés dans les extrémités du cadrant. La suspension fongique est préparée de façon à obtenir un inoculum de 10^6 UFC/ml (UFC = unités formant colonies).

II.4.3.3. Détermination *in-vitro* de l'activité antifongique du fluconazole sur la souche *candida albicans* par méthode de CMI (diffusion en milieu solide)

II.4.3.3.1. Préparation de solution mère de l'agent antifongique (Fluconazole)

Le Fluconazole est sous forme d'une gélule, dans des conditions de manipulation stérile, on la découpe et on verse la poudre dans un tube à essai qui contient 1 ml de l'eau distillée stérile. C'est donc la solution mère = 150mg (fluconazole pure)/1ml

II.4.3.3.2. Préparation des dilutions de l'agent antifongique (FCZ)

Pour faire les dilutions nous avons suivi ce protocole :

- ❖ Dans une zone d'asepsie, nous avons préparés des tubes à essai contenant 9ml d'eau distillée et les faire stérilisés par autoclave à 120°C pendant 15 min.
- ❖ Prenez le FCZ en gélule (150mg) et le dissoudre dans un volume de 1ml d'eau distillée stérilisé.
- ❖ Pour les dilutions, on réalise une série de dilution jusqu'à 10^{-6} , on prélever 1ml de la solution mère et on l'ajoute dans le premier tube à essai qui contient 9ml de l'eau distillée stérilisé, pour obtenir une dilution de 10^{-1} .
- ❖ À partir de la dilution 10^{-1} , on prélever 1ml et on l'ajoute dans le deuxième tube à essai pour obtenir une dilution de 10^{-2} .
- ❖ On répète cette dernière opération jusqu'à l'obtention de la dilution 10^{-6} .

Tableau N° 04 : Préparation des dilutions du FCZ

| | Les dilutions de fluconazole | | | | | |
|---------------------------------------|------------------------------|-----------------------|----------------------|---------------------|----------------------|-----------------------|
| Solution mère | 10^{-1} | 10^{-2} | 10^{-3} | 10^{-4} | 10^{-5} | 10^{-6} |
| Concentration 150 (mg/ml) | 15(mg/ml) | 1.5 (mg/ml) | 0.15 (mg/ml) | 0.015 (mg/ml) | 0.0015 (mg/ml) | 0.00015 (mg/ml) |
| Concentration 150000 (μ g/ml) | 15000 (μ g/ml) | 1500 (μ g/ml) | 150 (μ g/ml) | 15 (μ g/ml) | 1,5 (μ g/ml) | 0,15 (μ g/ml) |

II.4.3.3.3. Préparation des disques

Des disques sphériques de diamètre de 3mm ont été formés par papier filtre Whatman, après on les autoclaves à 121°C pendant 15 min pour qu'ils deviennent stérile.

II.4.3.3.4. Mode opératoire

Après la préparation de milieu de culture Sabouraud, on le verse dans des boîtes de pétri rondes de diamètre de 90 mm, et on laisse solidifier.

Ensuite nous avons ensemencé en surface deux gouttes de l'inoculum préparé à partir d'une souche *candida albicans* (révisé dans la section II.4.4.2) avec un râteau préparé par une pipette pasteur.

A l'aide d'un pince métallique on imbibes les disques dans la solution mère de l'antifongique et on les dépose au centre du boîte de pétri (on répète cette étape deux fois), et de la même manière on refait l'expérience pour tous les dilutions de l'agent antifongique FCZ (10^{-1} jusqu'à 10^{-6}). L'incubation se fait à 30°C, après 24h, on mesure les diamètres des zones d'inhibitions.

II.4.4. Détermination *in-vitro* de l'activité antifongique du PEG-FCZ sur la souche *candida albicans*

II.4.4.1. Préparation des fractions molaires PEG-FCZ

Nous avons préparé plusieurs fractions molaires de notre conjugués (PEG-FCZ), et en raison des faibles masses calculées dans des volumes 1ml et 10ml et qui dépasse la limite de sensibilité de notre balance électronique, on a préparé des volumes de 100ml correspondant à des masses mesurable par notre balance électronique, les équations utilisées pour faire les calculs des proportions (PEG-FCZ) sont données par (E.1) et (E.2).

$$m_{PEG} = \frac{M_{PEG} f \times (C_M \times v)}{(f+1)} \quad (\text{E.1})$$

$$m_{FCZ} = \frac{M_{FCZ} f \times (C_M \times v)}{(f+1)} \quad (\text{E.2})$$

$$M_{PEG} = \text{masse molaire du PEG} = 3400 \text{ g/mol}$$

$$M_{FCZ} = \text{masse molaire du fluconazole} = 306.271 \text{ g/mol}$$

C_M = concentration minimale inhibitrice du fluconazole (mol/l)

v = volume total de solution

Fraction molaire d'un composant d'un mélange est le rapport du nombre de moles de ce composant par le total des nombres de moles de tous les composants du mélange.

Pour les substances pures c'est-à-dire soit PEG pure ou FCZ pure les masses en (g) sont déterminées directement par les équations (E.3) et (E.4)

$$m_{PEG} = n_{PEG} \times M_{PEG} \quad (\text{E.3})$$

$$m_{FCZ} = n_{FCZ} \times M_{FCZ} \quad (\text{E.4})$$

Tel que ; $n_{PEG} = C_M \times V$ et $n_{FCZ} = C_M \times v$

Où n_{FCZ} : est le nombre de moles contenus dans un volume de 100ml de l'agent antifongique (FCZ) en mol.

n_{PEG} : est le nombre de moles contenus dans un volume de 100ml du PEG en mol.

Le tableau N°05 récapitule les masses utilisées pour un volume de 100ml pour préparer nos solutions de conjuguées (PEG-FCZ).

Tableau N° 05 : Préparation des fractions molaires du PEG-FCZ pour *candida albicans*

| Fraction molaire (PEG-FCZ) | 1:0 | 9:1 | 4:1 | 3:2 | 1:1 | 0:1 |
|----------------------------|-------|---------|--------|--------|--------|--------|
| m PEG (g) | 0.017 | 0.015 | 0.013 | 0.01 | 0.08 | 0 |
| m FCZ (g) gélule | 0 | 0,00035 | 0,0069 | 0,0014 | 0,0017 | 0,0015 |

Après avoir déterminé chaque masse correspondante aux différentes proportions PEG-FCZ, on dissout les masses de chaque proportions dans un volume de l'eau distillée stérile de 100 ml et les homogénéise par un vortex jusqu'à l'obtention d'une solution homogène à l'œil nu.

II.4.4.2.Mode opératoire

Dans des conditions d'asepsie, nous avons coulé les boîtes de pétri par le milieu de culture Sabouraud à l'état liquide et laisse solidifier.

Ensuite, deux gouttes de suspension microbienne *Candida albicans* ont été ajoutées sur le milieu et étalées en surface à l'aide d'un râteau.

Les disques ont été imbibés dans les proportions de mélange PEG-FCZ (1:0), (9:1), (4:1), (3:2), (1:1) et (0:1) et déposer sur le milieu préalablement ensemencé par l'inoculum (à raison de trois disques dans la boîte pour chaque proportion). L'incubation se fait à 30° C pendant 72h.

II.4.4. Détermination *in-vitro* de l'activité antifongique du FCZ (méthode de CMI par dilution en milieu solide) et du conjugué PEG-FCZ sur la souche *Aspergillus flavus*

II.4.4.1.Principe

L'effet antifongique du fluconazole et du conjugué PEG-FCZ sur la souche fongique *Aspergillus flavus* a été déterminé *in-vitro* par la méthode de dilution en milieu solide, qui consiste à mélanger l'agent antifongique et le conjugué PEG-FCZ avec le milieu de culture PDA.

L'estimation de l'effet antifongique du FCZ et le conjugué PEG-FCZ sur le genre *Aspergillus flavus*, champignon qui affecte les plantes, les animaux et la santé humaine (Afzal et al., 2013), est révélé à partir de la détermination de la concentration minimale inhibitrice qui correspond à la plus faible concentration à partir de laquelle aucune croissance mycélienne de la souche fongique (*Aspergillus flavus*).

II.4.4.2. Confirmation de la pureté de la souche fongique

Pour confirmer l'identité de la souche *Aspergillus flavus*, en réalise simultanément une observation macroscopique et microscopique (Afzal et al., 2013).

❖ Observation macroscopique

Elle est caractérisée par la croissance de la colonie, la couleur des conidies, et après l'incubation des colonies de couleur verte apparaissent caractérisant l'espèce *Aspergillus flavus*.

❖ Observation microscopique

Elle est caractérisé par les conidiophores, les vésicules, les matules, les phialides et les conidies, après la réalisation de la méthode de drapeau qui consiste à mettre une goutte de bleu de méthylène sur une lame, et avec un ruban adhésif on prélever une quantité de la souche et l'ajoute sur la lame, l'observation montre la tête aspergillaire, Conidiophores incolores.

II.4.4.3. Détermination *in-vitro* de l'activité antifongique du FCZ sur la souche *Aspergillus flavus* (méthode de CMI par dilution en milieu solide)

II.4.4.3.1. Détermination de la CMI du FCZ sur *Aspergillus flavus*

II.4.4.3.2. Préparation de milieu de culture

- ✓ À l'aide d'une balance, on a pesé 39g de PDA, et on l'a ajouté dans un bécher contenant 1L de l'eau distillée.
- ✓ On a mélangé la solution à l'aide d'un agitateur magnétique sous une plaque chauffant jusqu'à l'ébullition.
- ✓ On a rempli les flacons par le milieu de culture.
- ✓ La stérilisation du milieu PDA a été effectuée par l'autoclavage à 121°C pendant 15min.

II.4.4.3.3. L'inoculum

Dans des conditions d'asepsie, et à l'aide d'une pipette pasteur stérile, on a formé des disques ronds de *Aspergillus flavus*.

II.4.4.3.4. Préparation de la solution mère de FCZ

Pour préparer la solution mère on a fait les deux étapes suivantes :

- Dissociation de fluconazole dans 1ml de l'eau distillée stérile.
- L'agitation de cette solution par un vortex.

II.4.4.3.5. Préparation des dilutions décimales

Dans des conditions d'asepsie, on prélève 1ml de la solution mère et la déposer dans un tube qui contient 9ml de l'eau distillée stérile pour obtenir une dilution de 10^{-1} .

À partir de la solution 10^{-1} , on prélève 1ml et l'ajoute dans un deuxième tube de 9ml de l'eau distillée stérilisé, pour obtenir une dilution de 10^{-2} .

On réalise ce protocole jusqu'à l'obtention de la dilution 10^{-6} .

II.4.4.3.6. Mode opératoire

Dans une zone stérile :

- ✓ On a liquéfié le milieu de culture PDA par l'autoclavage à 121°C pendant 10min.

- ✓ On a Ajouté dans le flacon 1ml de l'antibiotique Céfazoline pour éviter la contamination bactérienne.
- ✓ On dépose 1ml de la solution mère de Fluconazole dans les boites de pétri, puis on ajoute le milieu de culture PDA et l'homogénéiser par des mouvements de huit.
- ✓ À l'aide d'une anse de platine on prélève un disque de *Aspergillus flavus* et la déposer dans le centre de boite de pétri.

On réalise ce protocole pour toutes les dilutions, on rappelle que l'incubation a été effectuée à 28°C pendant 24 à 48 heures.

II.4.4.4. Détermination *in-vitro* de l'activité antifongique du PEG-FCZ sur la souche *Aspergillus flavus*

II.4.4.1. Préparation du conjugué PEG-FCZ

La dilution 10^{-1} correspond à une concentration pondérale de 15mg/ml équivaut à 15g/1L. À partir des équations (E.1), (E.2), (E.3) et (E.4), nous avons calculé les masses de conjugué PEG-FCZ et celle du FCZ et PEG pures introduites dans un volume de 10ml d'eau distillé stérilisé, le tableau (N°06) présente les résultats de ces calculs.

Tableau N° 06 : préparation des fractions molaires du PEG-FCZ pour *Aspergillus flavus*

| Fraction molaire (PEG-FCZ) | 1:0 | 9:1 | 4:1 | 3:2 | 1:1 | 0:1 |
|-----------------------------|-------|-------|-------|-------|--------|-------|
| m_{PEG} (g) | 1,665 | 1,499 | 1,332 | 0,999 | 0, 833 | 0 |
| M_{FCZ} (g) gélule | 0 | 0,035 | 0,069 | 0,138 | 0,173 | 0,346 |

III.4.4.2. Mode opératoire

Dans des conditions d'asepsie, on a adopté les étapes suivantes :

- ✓ Dans les boites de pétri, on a versé 1ml de chaque fraction molaire, puis on a ajouté le milieu PDA, et on procède par homogénéisation par des mouvements de huit.
- ✓ À l'aide d'une anse de platine on prélever un disque de *Aspergillus flavus* et le faire déposer dans le centre de boite de pétri.
- ✓ L'incubation a été effectuée à 28°C pendant 24 à 48 heures.

II.5. Test de solubilité

Pour réaliser le test de solubilité, nous avons utilisé une centrifugeuse 5G (5000 tours /min)

- ✓ On a rempli chaque tube sec par les proportions PEG-FCZ cité au tableau N°06
- ✓ On procède par centrifugation pendant 25 min, une décantation en deux parties visible sera observé : liquide en haut et les dépôts en bas pour les solutions de mauvaise solubilité, par contre pas de décantation n'est observé pour les solutions de bonne solubilité.
- ✓ On élimine de liquide de chaque tube et on garde seulement les dépôts solides, puis les faire sécher à l'air libre, ensuite à l'aide d'une balance électronique on pèse les masses non solubilisé. À cet étape on peut connaitre les masses solubilisées et non solubilisées.

II.5.1.Taux de solubilisation

Pour estimer la solubilité il faut chercher la masse de soluté dissoute dans un volume de solvant considéré.

On peut alors estimer la solubilité par calcul du taux de solubilité considéré par l'équation :

$$\text{taux de solubilité} = \frac{m}{v} \text{ (E.5)}$$

m = masse non solubilisé

v = volume total

La valeur obtenu c'est une meilleure estimation de la solubilité.

Chapitre III :

RÉSULTATS & DISCUSSION

III. Résultats et discussions

III.1. Caractérisation du PEG et FCZ par spectroscopie FTIR et Raman

Afin d'identifier la présence des différents groupements fonctionnels relatifs à chaque substances utilisées, nous avons utilisé la caractérisation par spectroscopie infrarouge (FTIR) et Raman.

La Figure N°04 montre les spectres FTIR du FCZ et celui du PEG-3400 dans la gamme fréquentielles allant de 450-3600 cm^{-1} . Les spectres infrarouges des deux substances (FCZ et PEG-3400) présentés par la figure N°04 montrent la présence de plusieurs bandes caractéristiques à différents groupements fonctionnels, en ce qui concerne le FCZ, on observe une bande large à 3555 cm^{-1} attribuée à l'élongation du groupement hydroxyle OH. Une fine bande à 3131 cm^{-1} qui correspond à l'élongation du C-H du cycle triazole. Une bande intense à 1631 cm^{-1} caractéristique à l'élongation du groupement C=C du cycle aromatique. Une bande intense à 1518 cm^{-1} correspondant à une élongation C=C du cycle aromatique. La bande à 1271 cm^{-1} correspond à une déformation OH, par contre, la bande à 1125 cm^{-1} est relative à une élongation C-F et enfin une bande située à 965 cm^{-1} caractéristique à une déformation C-H dans le plan du cycle triazole. On confirme que tous les groupements fonctionnels des molécules de FCZ sont retrouvés. Le spectre trouvé est compatible avec les données de la littérature **(Teleginski et al., 2015), (Fetih, 2016)**

Par ailleurs, le spectre infrarouge du PEG-3400 toujours représenté sur la figure N°04 a permis d'attribuer les modes de vibration caractéristiques du PEG-3400. Nous relevons des bandes caractéristiques de plusieurs groupements fonctionnels (CH_2 , OH, COC, CCO et COH) qui sont caractéristique de la chaîne moléculaire du PEG. Ces résultats ont été déjà confirmés par plusieurs études de la littérature particulièrement **(Pucić, I., & Jurkin, 2012), (Yoshihara et al., 1964)**

Les positions et attributions détaillés des bandes d'absorption des deux spectres FCZ et du PEG sont données dans le Tableau N°07

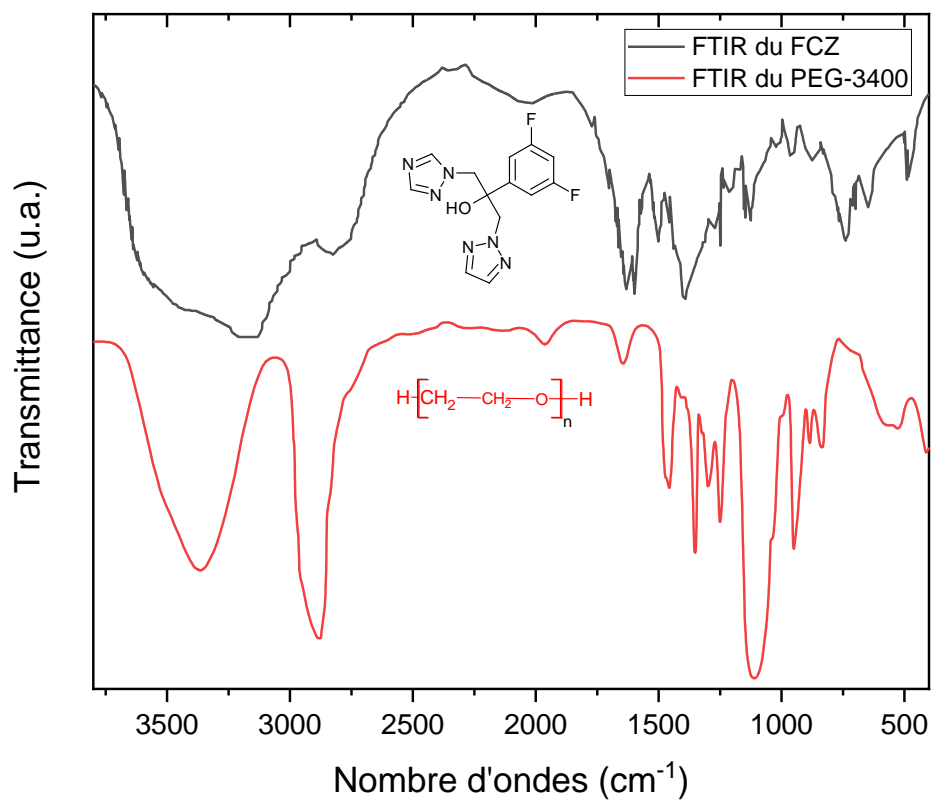


Figure N°04 : Identification par spectroscopie infrarouge (FTIR) du FCZ et du PEG-3400.

Tableau N°07 : Attribution des bandes d'absorptions infrarouges des spectres FCZ et PEG-3400.

| Nombre d'ondes (cm ⁻¹) (FTIR) FCZ | Nombre d'ondes (cm ⁻¹) (FTIR) PEG-3400 | Attributions |
|--|---|---|
| 3555 | 3361 | ν (O-H) _s |
| 3131 | - | ν (C-H) _{cycle triazole} |
| 2825 | 2880 | ν (CH ₂) _a hors plan |
| - | 2514 | γ_r (CH ₂) _s + ν_s (C-O-C) |
| - | 1967 | γ_r (CH ₂) _s + ν_s (C-O-C) |
| - | 1963 | δ (CH ₂) _a |
| - | 1643 | δ (CH ₂) _a + δ (CH ₂) _s |
| 1631 | - | ν (C=C) _{cycle aromatique} |
| 1518 | - | ν (C=C) _{cycle aromatique} |
| 1439 | 1456 | γ_w (CH ₂) _a |
| - | 1403 | γ_w (CH ₂) _s |
| - | 1352 | γ_w (CH ₂) _a |
| - | 1324 | δ (C-OH) |
| - | 1301 | γ_t (CH ₂) _a + γ_t (CH ₂) _s |
| - | 1249 | γ_t (CH ₂) _a |
| 1271 | - | δ (O-H) |
| 1147 | - | Vibration du cycle triazole |
| 1125 | - | ν (C-F) |
| - | 1112 | ν (C-O-C) _a |
| 1021 | - | β (C-H) _{cycle aromatique} |
| 965 | - | β (C-H) _{cycle triazole} |
| - | 950 | ν (C-O-C) _a |
| - | 885 | γ_r (CH ₂) _a + ν_a (C-O-C) |
| 851 | - | γ (C-H) _{cycle triazole} |
| - | 836 | ν (C-O) + γ_r (CH ₂) |
| 830 | - | γ (C-H) _{cycle aromatique} |
| 698 | - | δ (cycle aromatique) |

| | | |
|---|-----|---|
| - | 558 | $\delta(\text{C-O-C}) + \delta(\text{O-C-C})$ |
| - | 527 | $\delta(\text{O-C-C})$ |

- ν pour le mode d'élongation (stretching).
- δ pour le mode déformation (bending).
- γ_r pour le mode balancement (rocking).
- γ_w pour le mode agitation (wagging).
- γ_t pour le mode torsion (*twisting*).
- γ pour le mode déformation hors plan.
- β pour le mode déformation dans le plan.

N.B : Le signe (s) représente une vibration symétrique par contre le signe (a) représente une vibration asymétrique.

Les spectres Raman de deux échantillons (FCZ et PEG-3400) sur la plage de fréquences allant de 400 cm^{-1} à 4000 cm^{-1} sont comparés sur la figure N°05. Les bandes Raman observées sur les deux spectres confirment les modes de vibration déjà trouvés par spectroscopie infrarouge des différents groupements fonctionnels relatifs aux structures chimiques des deux substances. Ces résultats corroborent ceux obtenus dans la littérature particulièrement (**Gu, X. J., & Jiang, 1995**), (**Webster et al., 2011**). Les positions des bandes Raman et leurs attributions détaillées du FCZ et du PEG-3400 sont regroupés dans le Tableau N°08

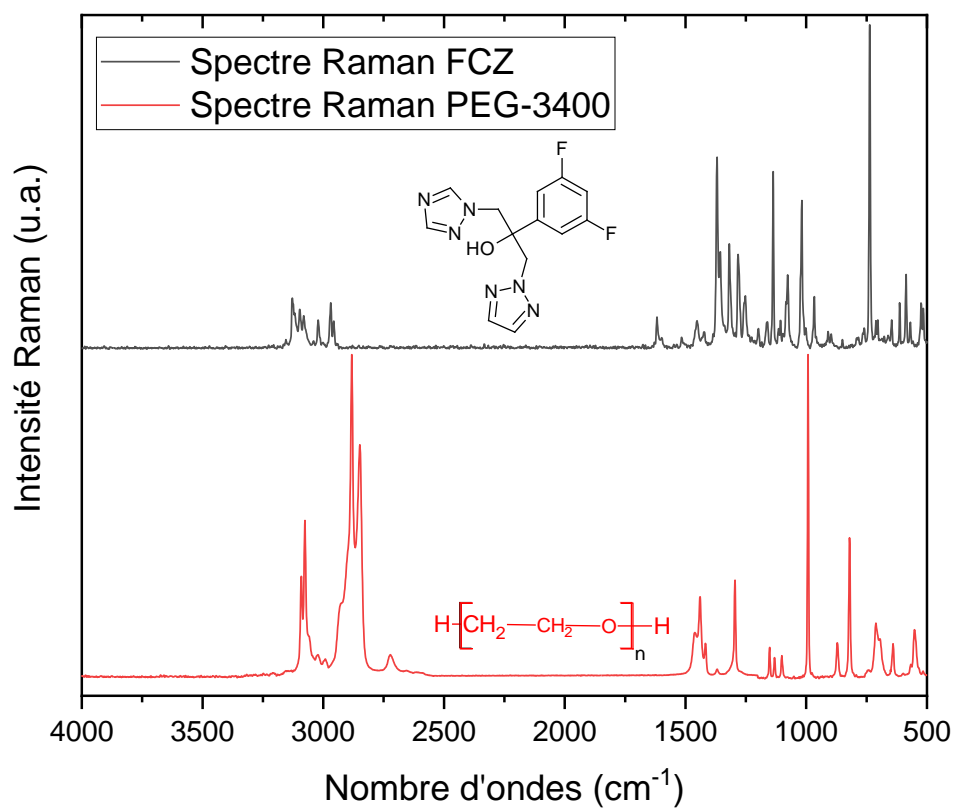


Figure N°05 : Identification par spectroscopie Raman du FCZ et du PEG-3400.

Tableau N°08: Attribution des bandes des spectres Raman du FCZ et PEG-3400

| Nombre d'ondes (cm ⁻¹) (Raman) FCZ | Nombre d'ondes (cm ⁻¹) (Raman) PEG-3400 | Attributions |
|---|--|---|
| 3129-3022 | 3091-3022 | ν (O-H)s |
| 2969.2956 | 2991 | ν (CH ₂)a hors plan |
| - | 2882-2848 | ν (CH ₂)s hors plan |
| - | 2722 | Vibrations combinées |
| 1618 | - | ν (C=C) cycle aromatique |
| 1452 | 1461 | δ (CH ₂)a + δ (CH ₂)s |
| - | 1440 | γ_s (CH ₂) |
| 1422 | - | ν (cycle triazole) |
| - | 1417 | γ_w (CH ₂)a |
| 1369 | - | ν (C=C) cycle aromatique |
| 1357 | - | ν (C=C) cycle aromatique |
| 1319 | - | ν (cycle triazole) |
| 1294 | 1295 | γ_t (CH ₂)a + γ_t (CH ₂)s |
| 1282 | - | δ (O-H) |
| 1252 | - | β (CH) cycle aromatique |
| 1198 | - | β (CH) cycle triazole |
| - | 1151 | ν (C-O) + ν (C-C) |
| 1137 | - | Vibration du cycle triazole |
| - | 1131 | ν (C-O-C)a |
| 1106 | - | ν (C-F) |
| - | 1101 | ν (C-O-C)a |
| 1077 | - | ν (C-OH) |
| 1018 | - | β (C-H) cycle aromatique |
| - | 992 | γ_r (CH ₂)a + ν a (C-O-C) |
| 966 | - | β (C-H) cycle triazole |
| 909 | - | δ (cycle triazole) |
| - | 872 | ν (C-C-O) |
| - | 821 | γ_r (CH ₂)a |

| | | |
|-----|-----|---|
| 760 | - | γ_r (CH ₂) |
| 737 | - | γ (C-H) cycle aromatique |
| - | 712 | ν (C-O) + γ_r (CH ₂) |
| 646 | - | δ (cycle triazole) |
| - | 640 | δ (O-C-C) + δ (C-O-C) |
| 613 | - | δ (cycle aromatique) |
| 586 | - | δ (cycles) |
| 569 | - | β (C-F) cycle aromatique |
| - | 552 | δ (C-O-C), δ (O-C-C) |
| 524 | - | δ (cycles) |

- ν pour le mode d'élongation (stretching).
- δ pour le mode déformation (bending).
- γ_r pour le mode balancement (rocking).
- γ_w pour le mode agitation (wagging).
- γ_t pour le mode torsion (twisting).
- γ_s vibration en ciseau (scissoring).
- γ pour le mode déformation hors plan.
- β pour le mode déformation dans le plan.

N.B : Le signe (s) représente une vibration symétrique par contre le signe (a) représente une vibration asymétrique.

III.2. Détermination *in-vitro* de l'activité antifongique du FCZ et conjugué PEG-FCZ sur la souche *Candida albicans*

III.2.1. Préparation de l'inoculum, identification et standardisation

L'observation macroscopique de notre souche a montré la présence des colonies blanches, crémeuses et lisses, ce qui confirme que notre souche est sûrement *candida albicans*

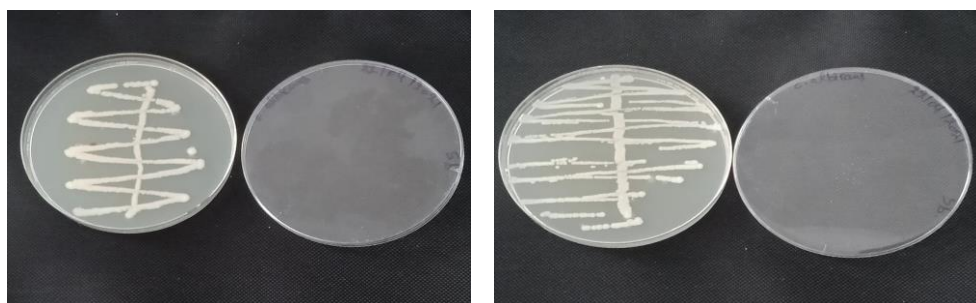


Figure N°06 : Observation macroscopique de *candida albicans*.

L'examen microscopique de la souche fongique après une coloration de bleu de méthylène en utilisant un microscope optique avec un objectif $\times 40$ a montrée des colonies ovoïdes, ce qui prouve l'identité de cette souche.

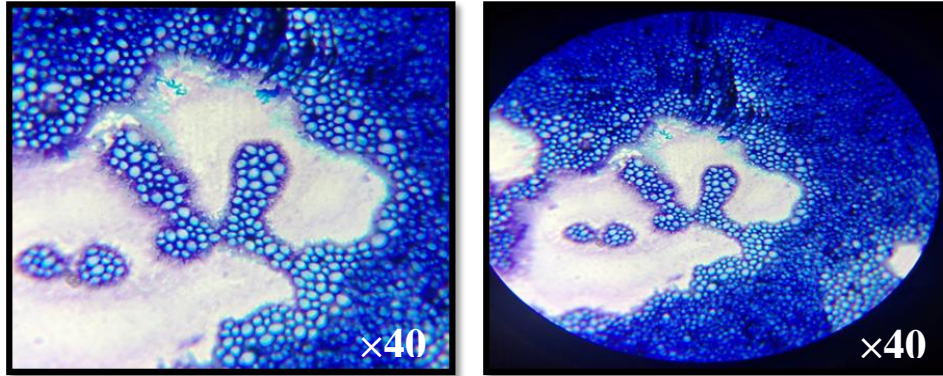


Figure N°07 : Observation microscopique de *candida albicans*.

III.2.2. Standardisation

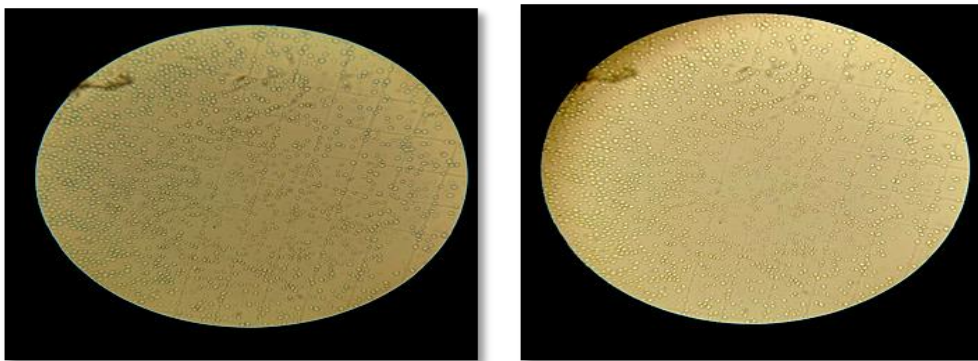


Figure N°08 : Observation microscopique de *candida albicans* sur lame Malassez.

Les résultats obtenus lors du dénombrement sont classés de la manière suivante :

Cadrant N°1 : 23 cellules

Cadrant N°2 : 25 cellules

Cadrant N°3 : 31 cellules

Cadrant N°4 : 28 cellules

La moyen des cadrant calculer par cette méthode

$$\text{moyen des cellules des cadrant} = \frac{Nc_{C1} + Nc_{C2} + Nc_{C3} + Nc_{C4}}{4} \quad (\text{E.6})$$

Nc C1 : Nombre de cellule dans le cadrant 1

Nc C2 : Nombre de cellule dans le cadrant 2

Nc C3 : Nombre de cellule dans le cadrant 3

Nc C4 : Nombre de cellule dans le cadrant 4

$$\text{la charge microbienne} = \frac{\text{la moyenne} \times \text{facteur de dilution}}{10^{-5}} \quad (\text{E.7})$$

Après les calculs on a constaté que la charge microbienne est de 10^6 .

III.2.3. Détermination *in-vitro* de l'activité antifongique du FCZ sur la souche *Candida albicans*

À partir du protocole qui a été cité dans le chapitre de matériels et méthodes dans la section II.4.3.). Nous avons réussi à obtenir les diamètres d'inhibitions des différents tests et ceci après incubation de 1 à 4 jours, les différents résultats sont représentés sur le tableau N°09.

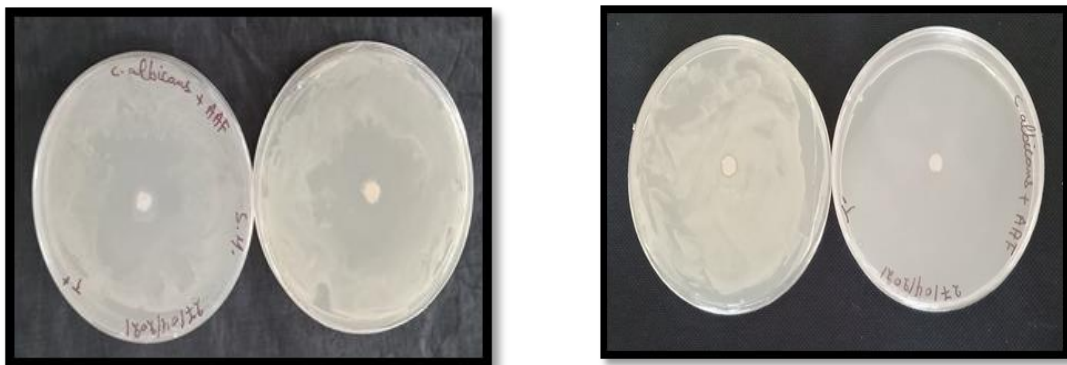


Figure N°09 : *Candida albicans* (témoin- à droite, témoin+ à gauche).

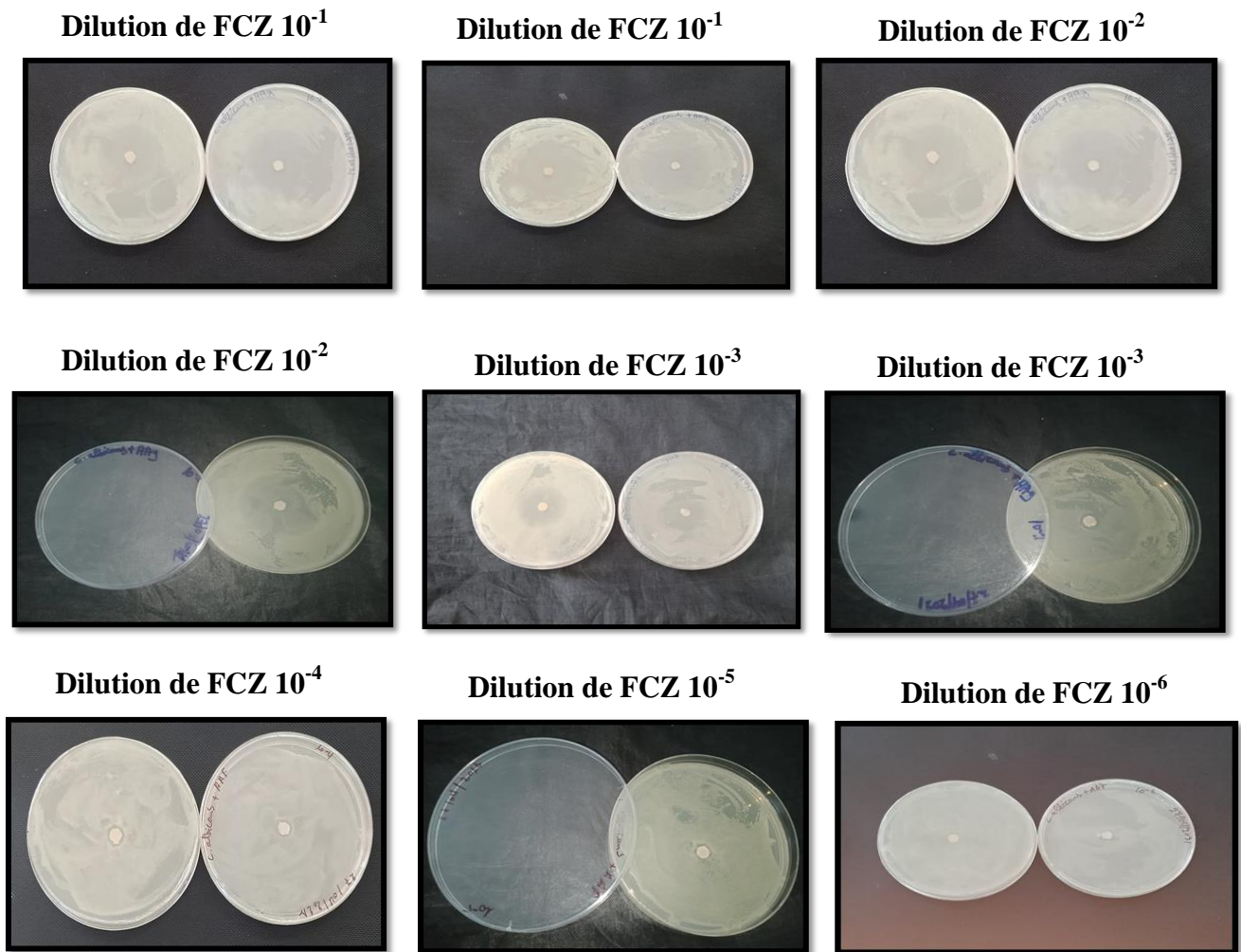


Figure N°10 : Zones d'inhibitions de *candida albicans* en fonction des différentes dilutions du FCZ.

III.2.4. Mesure des diamètres des zones d'inhibitions

Tableau N°09 : Mesure des diamètres des zones d'inhibitions du FCZ sur la souche *Candida albicans*

| Les dilutions du FCZ | Le diamètre (en millimètre mm) |
|------------------------|--------------------------------|
| Témoin+ (1) | 10 |
| Témoin+ (2) | 11 |
| Témoin- (1) | Négatif |
| Témoin- (2) | Négatif |
| Dilution 10^{-1} (1) | 10 |
| Dilution 10^{-1} (2) | 10 |
| Dilution 10^{-2} (1) | 8 |
| Dilution 10^{-2} (2) | 9 |
| Dilution 10^{-3} (1) | 8 |
| Dilution 10^{-3} (2) | 9 |
| Dilution 10^{-4} (1) | 8 |
| Dilution 10^{-4} (2) | 9 |
| Dilution 10^{-5} (1) | Négatif |
| Dilution 10^{-5} (2) | Négatif |
| Dilution 10^{-6} (1) | Négatif |
| Dilution 10^{-6} (2) | Négatif |

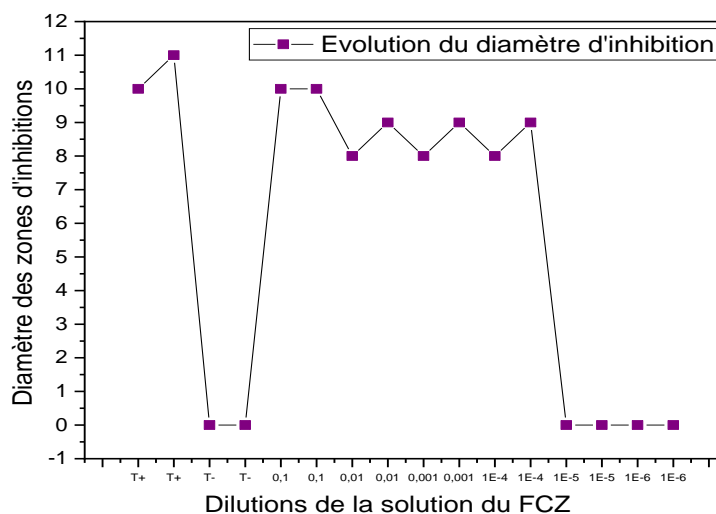


Figure N°11: Variation des zones d'inhibitions du *candida albicans* en fonction des différentes dilutions de FCZ.

III.2.5. Détermination de la CMI du FCZ de la souche *candida albicans*

D'après ces résultats obtenus, on a pu constater que la dilution 10^{-4} (correspondante à 0.015mg/ml de FCZ), correspond à la CMI de Fluconazole sur le genre *candida albicans*, c'est la dilution qui correspond à la faible concentration de FCZ avec un effet inhibiteur sur la souche fongique.

III.2.6. Résultats et discussion

D'après les résultats obtenus après incubation, nous avons relevé les points suivants :

- ❖ Une zone d'inhibition de diamètre 10 mm pour le témoin positif qui est correspond à la solution mère (150mg/ml) cette dilution est concentrée par le FCZ, ceci explique l'émergence d'une zone d'inhibition importante qui signifie la lutte de croissance, donc le FCZ a un effet sur *candida albicans*, qui se fait par un bloc de la synthèse de l'ergostérol l'élément principale dans la membrane fongique par l'inhibition de la 14 α -deméthylase, c'est l'enzyme cible qui responsable à la synthèse de l'ergostérol (Hay, 2003)

- ❖ On observe une croissance de la souche *candida albicans* chez le témoin négatif (sans aucun agent antifongique), ceci peut être expliqué par l'absence d'un indicateur d'inhibition de croissance fongique.
- ❖ Pour les dilutions de 10^{-1} jusqu'à 10^{-4} (correspond aux 15mg/ml, 1.5mg/ml, 0.15mg/ml, 0.015mg/ml respectivement) il y a des zones d'inhibitions remarquables, donc la souche est sensible au fluconazole, ceci s'explique par la concentration élevée du FCZ par rapport à la CMI c'est-à-dire, 10^{-1} jusqu'à $10^{-4} \geq$ à la CMI.

Nos résultats obtenus sur la sensibilité de *candida albicans* face au FCZ sont similaires à ceux rapportés par les études de la littérature, on peut citer (**Paugam, 2010**). Une légère différence de la CMI trouvée dans notre étude par rapport à celle rapportée par (**Arthington-Skaggs et al., 1999**) où ils suggèrent d'avoir trouvé dans leur essais de sensibilité des souches de *Candida albicans* au Fluconazole une CMI (90%) de 8 µg/ml, pour notre travail nous avons trouvé une CMI de 10^{-4} qui est équivalente de 15 µg/ml (taux d'inhibition de 10%), cette légère différence pourrait s'expliquer par le fait que les souches ne sont pas les mêmes.

D'autre part, nos résultats sont presque similaires à celles observées dans la recherche réalisé par (**Deporlah, 2016**) qui trouve une CMI (90%) est inférieure à 2 mg/l par un pourcentage de l'inhibition 96,4%.

- ❖ L'absence de zones d'inhibitions a été observé dans la gamme de dilutions entre 10^{-5} et 10^{-6} (correspond aux 0.0015mg/ml et 0.00015mg/ml) ce qui nous laisse dire que notre souche devienne résistante, cette résistance peut provenir d'une modification de la quantité de l'enzyme cible, soit un accès réduit de fluconazole à la cible ou d'une combinaison de ces deux mécanismes comme le suggère (**Ghannoum & Rice, 1999**), en plus (**Hitchcock et al., 1986**) a trouvé deux isolats de *candida albicans* résistants à cause de la grandes quantités de stérol non estérifié, toutefois, dans une autre étude, il est décrit que d'autres sites cibles pour le fluconazole peuvent être modifiés ou absents, la formation de biofilm par *candida albicans* aussi un indicateur de résistance, comme le décrit (**Quinton-Bouvier, 2019**) dans ses travaux.

III.2.7. Détermination *in-vitro* de l'activité antifongique du conjugué PEG-FCZ sur la souche de *candida albicans*

Après l'incubation à 30°C pendant 1 à 4 jours, on a obtenu les résultats suivants :

III.2.7.1. Mesure des diamètres des zones d'inhibitions des proportions PEG-FCZ

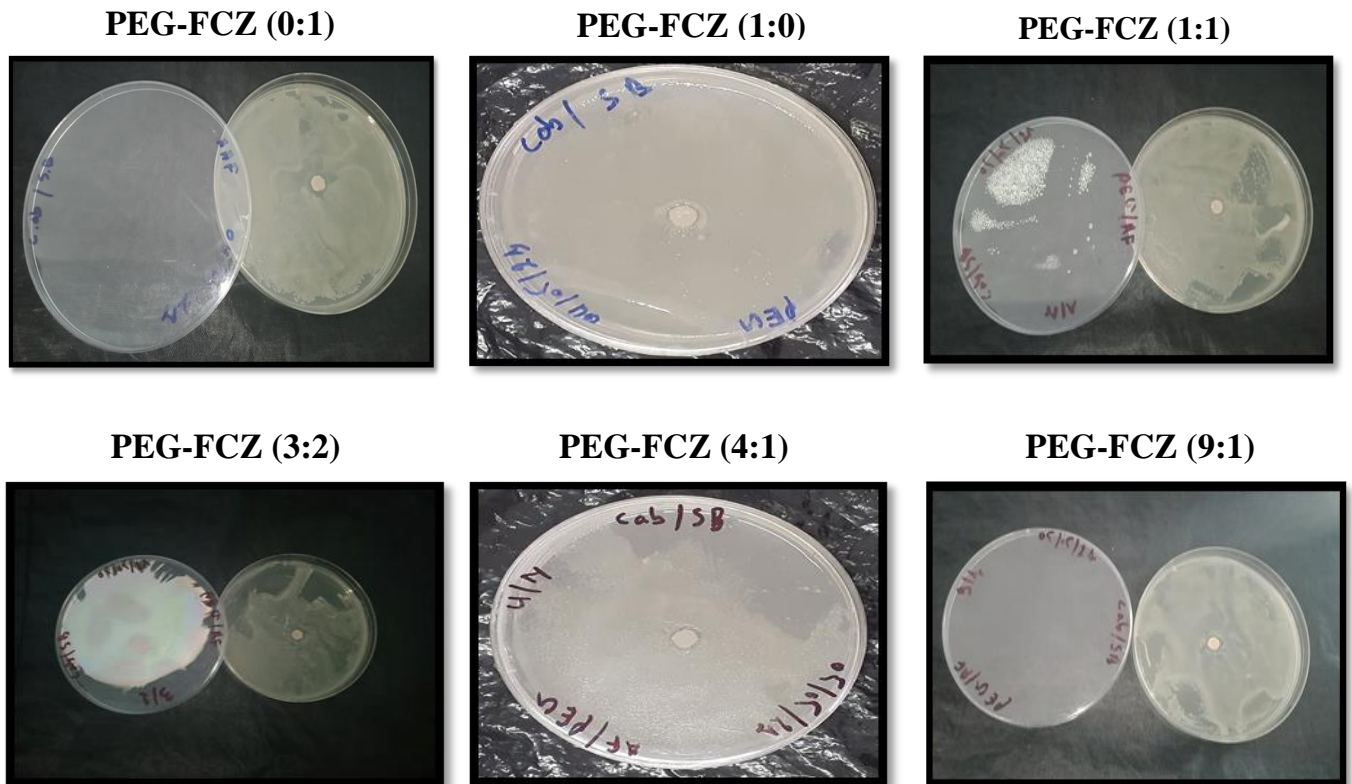


Figure N°12 : Zones d'inhibitions du *candida albicans* en fonction des fractions molaires PEG-FCZ.

Tableau N°10 : Mesure des diamètres des zones d'inhibitions sous l'effet du conjugué PEG-FCZ sur la souche de *candida albicans*

| Proportion PEG-FCZ | Diamètre Zones d'inhibitions en mm | |
|--------------------|------------------------------------|-----------|
| | Essai N°1 | Essai N°2 |
| 0:1 | 10 | 9 |
| 1:1 | 6 | 6 |
| 3:2 | 7 | 6 |
| 4:1 | 10 | 9 |
| 9:1 | 9 | 9 |
| 1:0 | 10 | 8 |

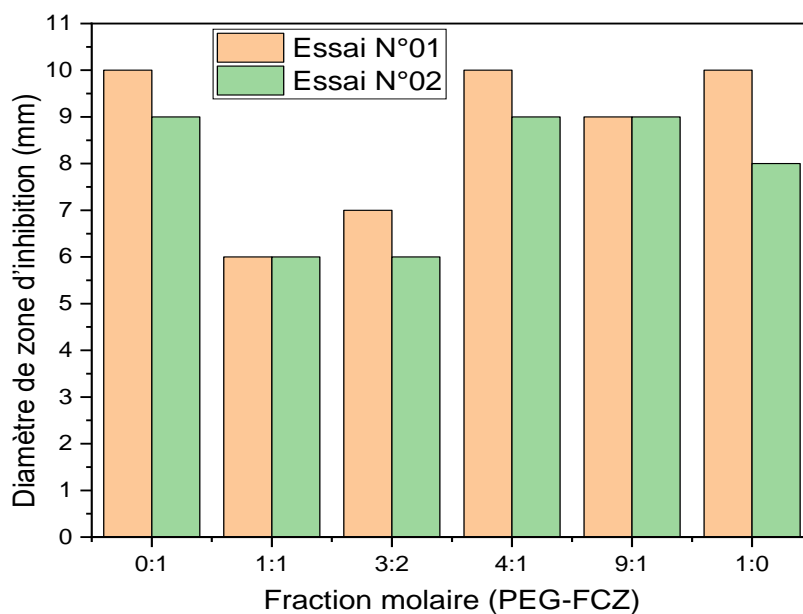


Figure N°13 : Histogramme de variation des zones d'inhibitions en fonction des fractions molaires PEG-FCZ chez le *candida albicans*.

III.2.7.2. Calcul des moyennes des zones d'inhibitions pour chaque proportion et leurs taux d'inhibitions respectifs

Tableau N°11: La moyenne des zones d'inhibitions du conjugué PEG-FCZ chez le *candida albicans* avec leurs taux d'inhibitions respectifs.

| Proportion PEG-FCZ | 0:1 | 1:1 | 3:2 | 4:1 | 9:1 | 1:0 | Témoin négatif |
|-------------------------------------|-------|------|------|-------|------|-------|----------------|
| Moyenne de la zone inhibition en mm | 9 | 6 | 6.33 | 9 | 8.33 | 9 | 0 |
| Taux d'inhibition en% | 10.58 | 7.05 | 7.44 | 10.58 | 9.8 | 10.58 | 0 |

$$\text{Taux d'inhibition} = \frac{\text{Moyen de zone inhibition}}{\text{zone d'inhibition totale}} \times 100 \quad (\text{E.8})$$

$$\text{Taux d'inhibition du fraction molaire (0:1)} = \frac{9}{85} \times 100 = 10.58\%$$

III.2.7.3 Résultats et discussion

D'après les résultats obtenus après l'incubation et qui sont présentés dans le tableau N°10 nous avons soulevés les point suivants :

- ❖ Une zone d'inhibition qui varie entre 8 à 10 mm pour la proportion PEG-FCZ (0:1), ce qui montre que le fluconazole exerce un effet antifongique sur la souche fongique *candida albicans*, donc la souche est sensible au fluconazole, le mécanisme d'action du fluconazole est déjà expliqué dans les résultats précédents en se basant sur les travaux de (Hay, 2003).
- ❖ On observe aussi presque les mêmes zones d'inhibitions pour les fractions molaires (4:1), (9:1) et (1:0), ces proportions contiennent des quantités importantes du PEG par rapport au fluconazole, qui signifie la présence d'une activité antifongique du PEG sur la souche *candida albicans* comme (Aoun, 2013) a été indiqué dans ces recherches sur le développement de nouvelles formulations d'antifongiques et évaluation de l'activité

sur *Candida spp.* et *Aspergillus spp* à base du PEG, indiquant que le PEG pourrait avoir un rôle très précis dans l'action antifongique, leur présence inhibe l'action des pompes d'efflux des champignons, aussi on indique qu'il y a une synergie entre le PEG et FCZ dans l'inhibition de la croissance fongique sur cette souche.

- ❖ Pour les proportions (1:1) et (3:2) on observe des zones d'inhibitions faible (la zone d'inhibition est inférieur à 8 mm), la souche de *candida albicans* donc est moins sensible, dans ce cas on suggère que cette résistance peut provenir d'une modification du champignon par une modification de la perméabilité membranaire par changement de la composition en phospholipides et en stérols, ce qui entraîne une diminution de la pénétration de FCZ et le PEG, comme (Biabiany, 2012) décrit dans ces recherches.

L'essai préliminaire réalisé indique que les fractions molaire PEG-FCZ (4:1) et (1:0) possède un meilleur effet inhibiteur sur la souche *candida albicans* comparativement au FCZ.

La proportion PEG-FCZ (9:1) présente un taux d'inhibition de 9.8% qu'est une valeur similaire au valeur de FCZ, ce qui nous permis d'avoir une idée préliminaire que ces fractions molaires présentent un effet antifongique identique que l'agent antifongique FCZ seul, et ce qui confirme l'existence d'un effet antifongique du PEG sur cette souche fongique, en plus de la synergie entre les deux molécule. Pour les fractions molaires PEG:FCZ (1:1) (3:2) possède un effet inhibiteur faible par rapport aux autres proportions avec un taux d'inhibition de 7.05, 7.44% respectivement.

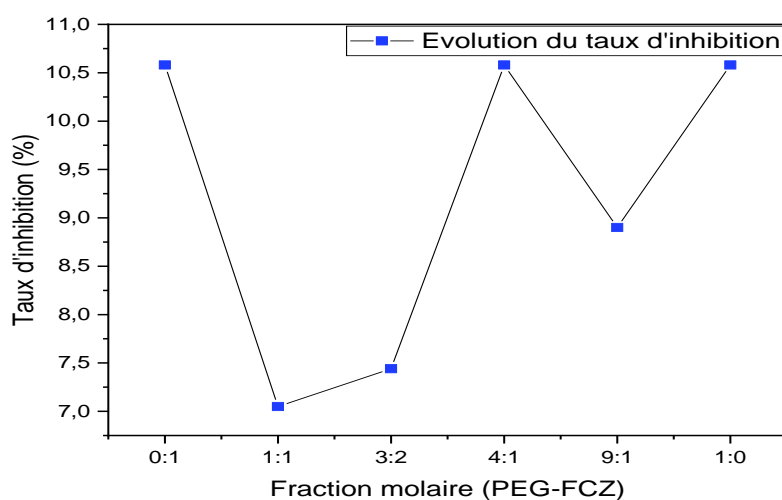


Figure N°14 : Taux d'inhibition de la croissance de *candida albicans*.

III.3. Détermination *in-vitro* de l'activité antifongique de fluconazole et du conjugué PEG-FCZ sur la souche *Aspergillus flavus*

III.3.1. Préparation de l'inoculum, identification

L'observation macroscopique a montrée des colonies vertes, ce qui confirme l'identité de l'*Aspergillus flavus*

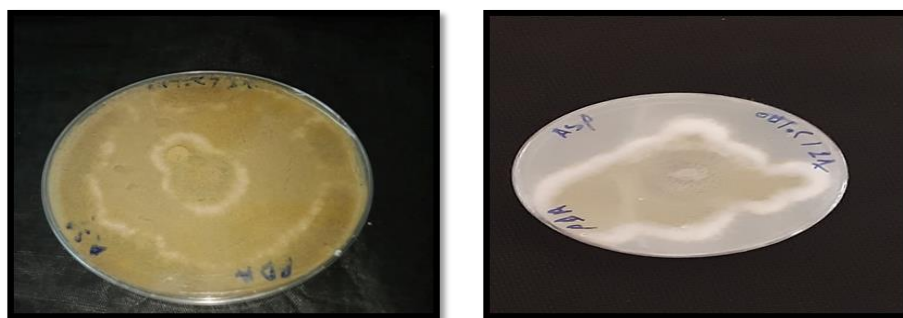


Figure N°15 : Observation macroscopique du genre *Aspergillus flavus*.

L'observation microscopique de cette souche fongique par objectif $\times 40$ à partir d'une coloration a montré la tête aspergillaire et un Conidiophores.

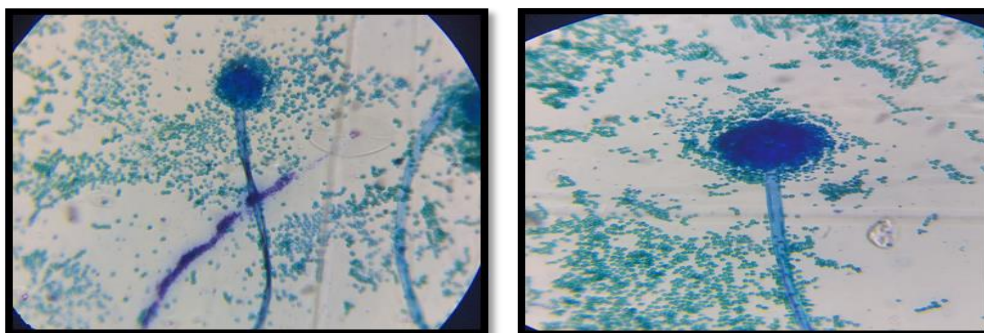


Figure N°16 : Observation microscopique de l'*Aspergillus flavus*.

III.3.2. Détermination *in-vitro* de l'activité antifongique de fluconazole sur la souche *Aspergillus flavus*

III.3.2.1. Déterminations de la CMI du fluconazole sur la souche *Aspergillus flavus*

Après l'incubation à 28°C pendant 24 à 48 heures, on a obtenu les résultats suivants :

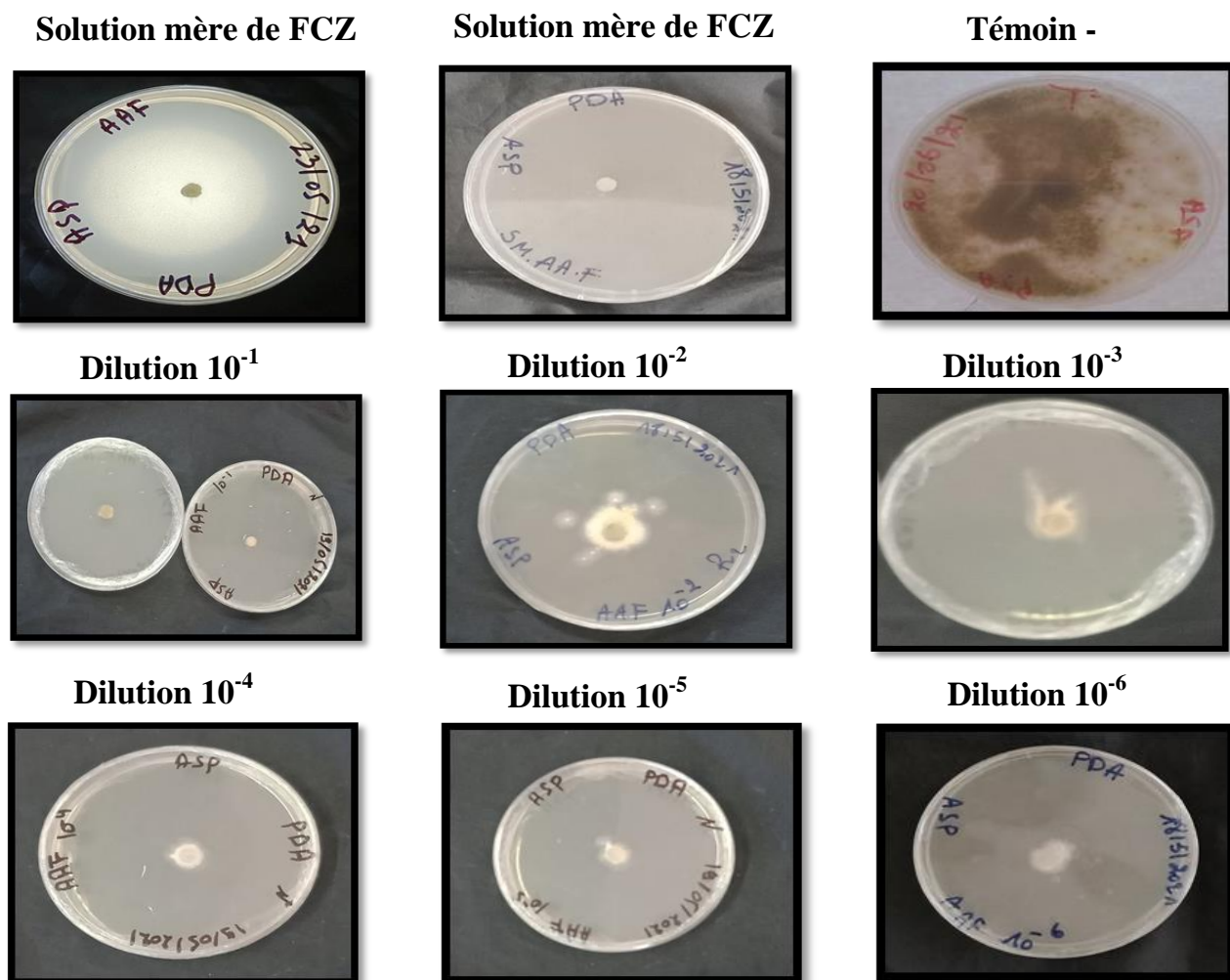


Figure N°17: Zones de croissances de l'*Aspergillus flavus* en fonction des différentes dilutions du FCZ.

Tableau N°12 : Diamètre des zones de croissances d'*Aspergillus flavus* en présence du FCZ

| | Diamètre des zones de croissance en mm | |
|------------------|--|---------------------------|
| | Après l'incubation de 24h | Après l'incubation de 48h |
| Solution mère | Négative | Négative |
| 10 ⁻¹ | Négative | Négative |
| 10 ⁻² | 12 | 16 |
| 10 ⁻³ | 13 | 15 |
| 10 ⁻⁴ | 15 | 15 |
| 10 ⁻⁵ | 16 | 20 |
| 10 ⁻⁶ | 23 | 25 |

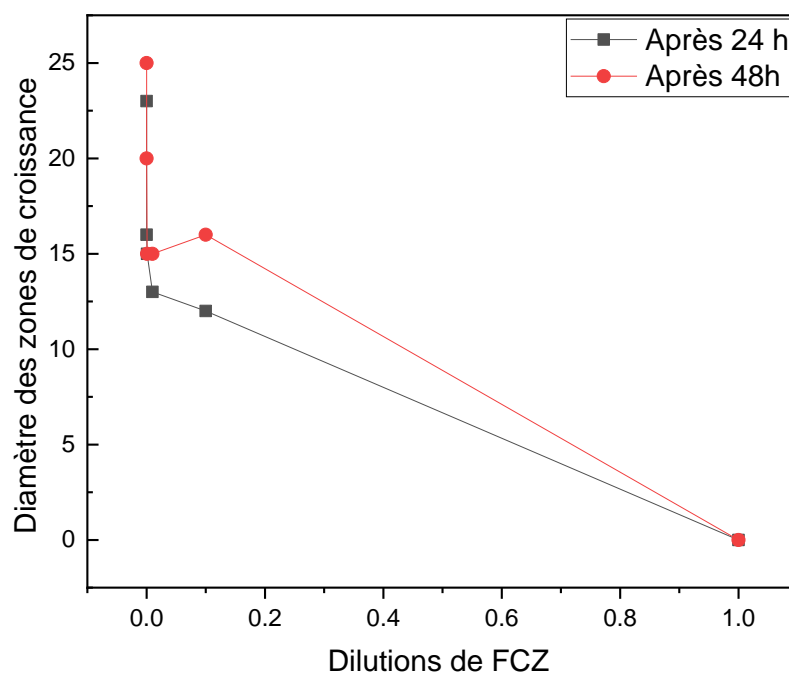


Figure N°18 : Variation de la croissance de *Aspergillus flavus* en fonction des différentes dilutions du FCZ.

III.3.3. Résultats et discussion

La figure N°21 représente la variation du diamètre des zones de croissances en fonction des dilutions, ces résultats montrent que la dilution 10^{-1} (correspond à 15mg/ml) donne un meilleur effet inhibiteur sur la croissance fongique de *Aspergillus flavus* avec une faible concentration de FCZ par rapport aux autres dilutions. Donc et à partir de la loi de la CMI, la dilution de FCZ 10^{-1} est la concentration minimale inhibitrice de FCZ sur *Aspergillus flavus*.

- ❖ Les résultats obtenus pour la solution mère (150mg/ml) et la dilution 10^{-1} ne présentent aucune zone de croissance, ceci explique que le fluconazole exerce une activité antifongique sur la souche *Aspergillus flavus* qui a été déjà cité dans la section I.3.1. Mécanisme d'action du FCZ, donc on dit que *Aspergillus flavus* est sensible au fluconazole.
- ❖ Nos résultats sont différents de ceux rapportés par plusieurs chercheurs travaillant sur la sensibilité de *Aspergillus spp.* au fluconazole, comme (Hulin et al., 2005),

D'autre part, nos résultats est presque proche aux résultats des travaux de **(Troke et al., 1987)**, qui confirment que le fluconazole présente une activité intermédiaire *in-vivo* entre celle des antifongiques kétoconazole et celle de l'amphotéricine B dans divers modèles animaux d'aspergillose.

- ❖ Les dilutions 10^{-2} jusqu'à la dilution 10^{-6} présentent des zones de croissance, donc la souche fongique *Aspergillus flavus* résiste à l'agent antifongique fluconazole, cette résistance peut provenir des altérations des composants de la paroi cellulaire du mycélium **(Seo & H Akiyoshi, 1999)**.

(Denning & Perlin, 2011) ont aussi trouvés dans leur recherches que le mécanisme de résistance de l'*Aspergillus* est fait par une modification du site cible le 14α -déméthylase le cible qui catalyse une étape centrale dans la biosynthèse du stérol membranaire critique ergostérol, en faisant des mutations dans *cyp51A* le gène codant pour des enzymes de type $14\text{-}\alpha$ stérol déméthylase, ces mutations entraînent des altérations structurelles dans cet enzyme, qui semblent bloquer la liaison de l'antifongique.

III.3.4. Détermination *in-vitro* de l'activité antifongique du conjugué PEG-FCZ sur la souche *Aspergillus flavus*

Après l'incubation à 37 °C pendant 24 à 48 heures des boites pétri qui sont coulés par le mélange de milieu de culture Sabouraud et les proportions PEG-FCZ avec les disques de souches fongiques *Aspergillus flavus* déposés au centre, les résultats obtenus sont comme suit :

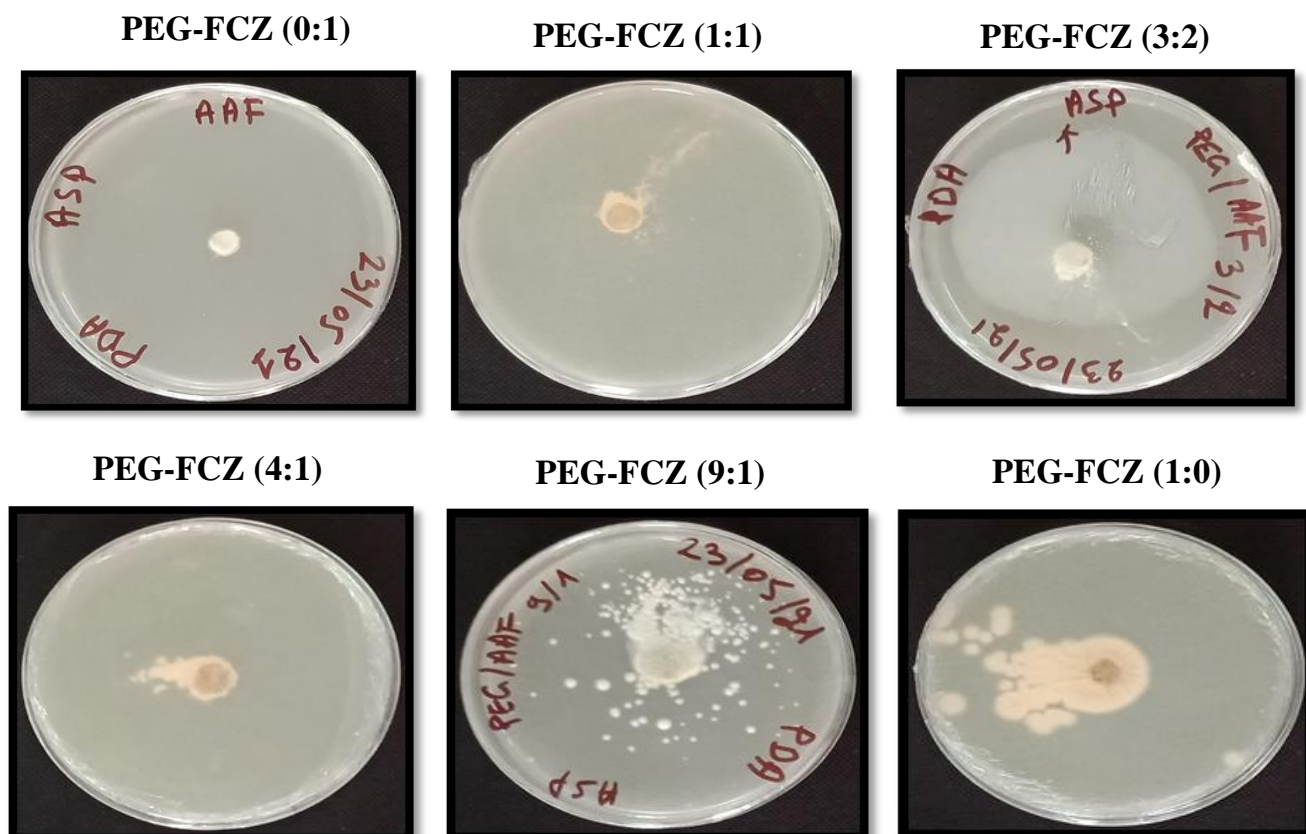


Figure N°19 : Zones de croissance de l'*Aspergillus flavus* en fonction des différentes fractions molaires PEG-FCZ.

III.3.4.1. Mesure des diamètres des zones de croissances du l'*Aspergillus flavus*

Tableau N°13 : Diamètre des zones de croissances de l'*Aspergillus flavus* en présence des fractions molaires PEG-FCZ

| Fraction molaire (PEG:FCZ) | Zone de croissance en mm | |
|-------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | Après l'incubation de 24h | Après l'incubation de 48h |
| 0:1 | Négative | Négative |
| 1:1 | Négative | Négative |
| 3:2 | Négative | Négative |
| 4:1 | 10 | 12 |
| 9:1 | 12 | 15 |
| 1:0 | 10 | 20 |
| Témoin – | 15 | 85 |

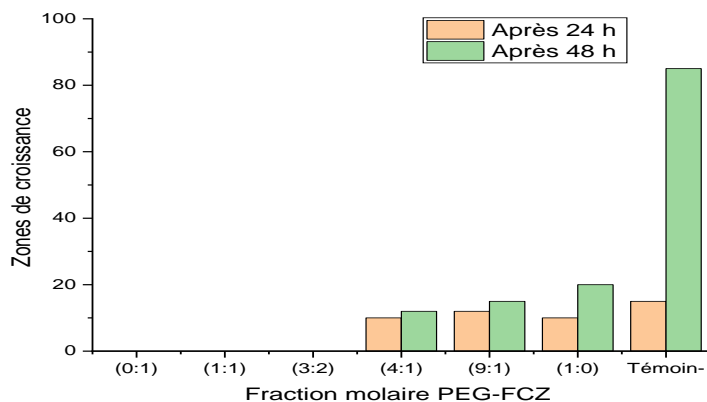


Figure N°20 : Zones de croissance de l'Aspergillus flavus (PEG-FCZ)

III.3.4.2. Calcul des moyennes des zones de croissances pour chaque proportion et leurs taux d'inhibitions relatifs

Tableau N°14 : La moyenne des zones de croissances de l'Aspergillus flavus avec leurs taux de croissance relatifs.

| Fraction molaire (PEG-FCZ) | 0:1 | 1:1 | 3:2 | 4:1 | 9:1 | 1:0 | Témoin négatif |
|--------------------------------|-----|-----|-----|-------|-------|-------|----------------|
| Moyen de zone inhibition en mm | 85 | 85 | 85 | 73 | 70 | 65 | 0 |
| Taux d'inhibition en% | 100 | 100 | 100 | 85.88 | 82.35 | 76.47 | 0 |

Moyen de zone inhibition= zone totale – zone de croissance

$$\text{Taux d'inhibition} = \frac{\text{Moyen de zone inhibition}}{\text{zone d'inhibition totale}} \times 100 \quad (\text{E.9})$$

$$\text{Taux d'inhibition en proportion (0 :1)} = \frac{85}{85} \times 100 = 100\%$$

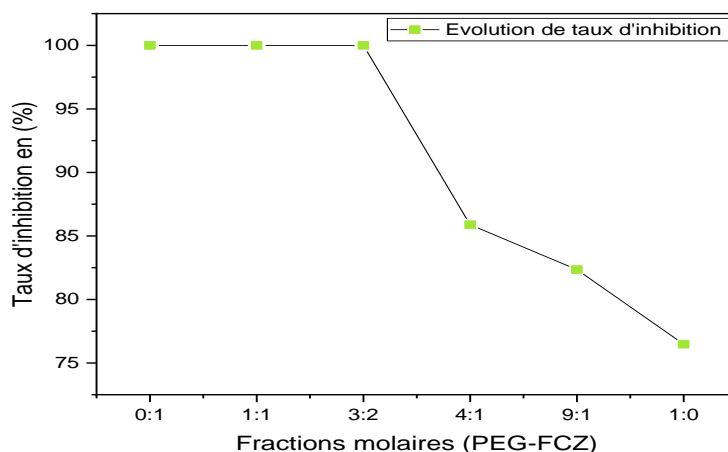


Figure N°21: Variation du taux d'inhibition de l'*Aspergillus flavus* en fonction des différentes fractions molaires PEG-FCZ.

III.3.4.3. Résultats et discussion

À partir de la figure N°19, nous constatons qu'aucune zone de croissance fongique de l'*Aspergillus flavus* n'a été observée pour la proportion PEG-FCZ (0:1) après l'incubation, ceci est dû à l'effet inhibiteur du fluconazole sur la croissance de cette souche, donc elle est sensible au fluconazole, comme nous l'avons expliqué précédemment dans le mécanisme d'action du fluconazole sur la croissance fongique de l'*Aspergillus flavus* (dans la section I.3.1. Mécanisme d'action).

- ❖ Dans la proportion PEG-FCZ (1:1) qui correspond à une diminution de la quantité de FCZ de 50% qui a été remplacé par le PEG, elle ne présente aucune zone de croissance après incubation, ce qui indique que le PEG exerce un effet inhibiteur sur l'*Aspergillus flavus*. (Aoun, 2013) a émis des hypothèses sur le mode d'action précis du PEG, ce dernier pourrait venir interférer dans l'action de l'ATP qui fournit de l'énergie pour assurer le fonctionnement de la pompe d'efflux, d'autre part le conjugué PEG-FCZ a un effet inhibiteur synergique sur cette souche fongique.
- ❖ La proportion PEG-FCZ (3:2) correspondante à une diminution de FCZ de 60% et qui a été remplacé par le PEG, encore ici, aucune zone de croissance après incubation, ces résultats confirme que le PEG a une activité antifongique sur cette souche, il pourrait perturber la membrane plasmique et affecter le fonctionnement de la pompe d'efflux

(Aoun, 2013), le même pour le conjugué PEG-FCZ qui présente un effet synergique sur cette souche.

- ❖ Les proportions PEG-FCZ (4:1), (9:1) et (1:0) présentent des zones de croissance fongique qui varient de 10-12 mm jusqu'à 12-15 mm. (Lupetti et al., 2002) affirme dans sa recherche, que la résistance des champignons face au fluconazole est due principalement que l'antifongique fluconazole et le PEG n'atteignent pas la cible

L'essai préliminaire réalisé indique que les fractions molaires PEG-FCZ (1:1) et (3:2) possèdent un meilleur effet inhibiteur contre la souche *Aspergillus flavus* comparativement au témoin négatif, on relève pratiquement le même effet de ces fractions comparativement à l'agent antifongique FCZ seul. Pour les conjugués PEG-FCZ (4:1), (9:1) et (1 :0), on remarque qu'ils possèdent un effet inhibiteur relativement faible par rapport aux autres proportions et important par rapport au témoin négatif.

Les résultats obtenus nous ont permis d'avoir une idée claire sur l'effet des différentes fractions molaires PEG-FCZ. Pour les fractions molaires PEG-FCZ (1:1), (3:2) leur effet antifongique est identique à celui de l'agent antifongique FCZ seul, donc la présence du PEG a contribué à l'amélioration de l'efficacité de FCZ face à la souche étudiée. Cela pourrait être dû à une synergie d'action complémentaire entre les deux composés.

III.4. Test de solubilité

III.4.1. Calcul du taux de solubilité

Tableau N° 15 : Calcul du taux de solubilité des fractions molaires PEG-FCZ

| Fraction molaire PEG-FCZ | 0:1 | 1:1 | 3:2 | 4:2 | 9:1 | 1:0 |
|--------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|------|
| Masse de FCZ initial | 0.346 | 0.173 | 0.138 | 0.069 | 0.035 | 0 |
| Masse de FCZ final | 0.262 | 0.093 | 0.059 | 0.025 | 0.014 | 0 |
| m (initial-final) | 0.084 | 0.08 | 0.079 | 0.044 | 0.021 | 0 |
| Masse solubilisée (%) | 24,27% | 46,24% | 57,24% | 63,67% | 60% | 100% |
| Masse non solubilisé (%) | 75,73% | 53,76 | 42,76% | 36,33 | 40% | 0% |
| Taux de solubilisation | 0.0168 | 0.016 | 0.0158 | 0.0088 | 0.0042 | 0 |

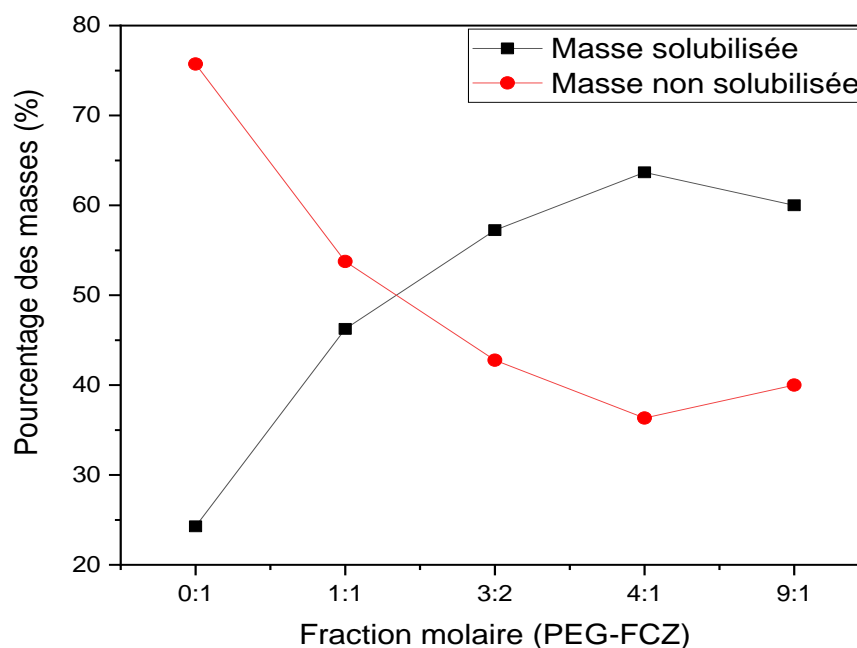


Figure N°22 : Évolution du pourcentage des masses solubilisées et non solubilisées en fonction des différentes fractions molaires PEG-FCZ.

- ❖ Concernant la proportion PEG-FCZ (0:1), nous avons obtenu une masse solubilisée avec un pourcentage de 24,27% et une masse non solubilisée de 75,73%, ce qui confirme que le fluconazole n'est pas totalement hydrosoluble. Nos résultats sont confirmés par les travaux de **(Corrêa & Salgado, 2011)**.
- ❖ La proportion PEG-FCZ (1:0) présente une solubilité de 100%, donc le PEG est totalement soluble dans l'eau, ces résultats corroborent avec ceux trouvés par **(Balès, 2014)** qui a trouvé que le PEG est totalement hydrosoluble et facilement miscible à l'eau.
- ❖ Des proportions PEG-FCZ (1:1), (3:2) et (4:2), le pourcentage de la masse solubilisée augmente avec l'augmentation du pourcentage de PEG, ce qui confirme que la présence du PEG dans la solution augmente davantage la solubilité de notre molécule. **(Harris Milton, 1992)** et **(Abdel-Mottaleb et al., 2009)** décrivent dans leurs études que l'ajout du PEG comme un excipient hydrophile en tant qu'activateur de libération du fluconazole augmente davantage sa solubilité. Donc le taux de solubilité diminue avec la diminution de la masse de FCZ et l'augmentation de la masse de PEG.
- ❖ Pour la proportion (9:1) on relève un pourcentage de la masse solubilisée de 60%.







| | | Test de solubilité | | | | | |
|-------------|--|---|---|---|--|---|---|
| Proportions | | 0:1 | 1:1 | 3:2 | 4:1 | 9:1 | 1:0 |
| Photos | |  |  |  |  |  |  |

Figure N°23 : Test de solubilité des fractions molaires PEG-FCZ

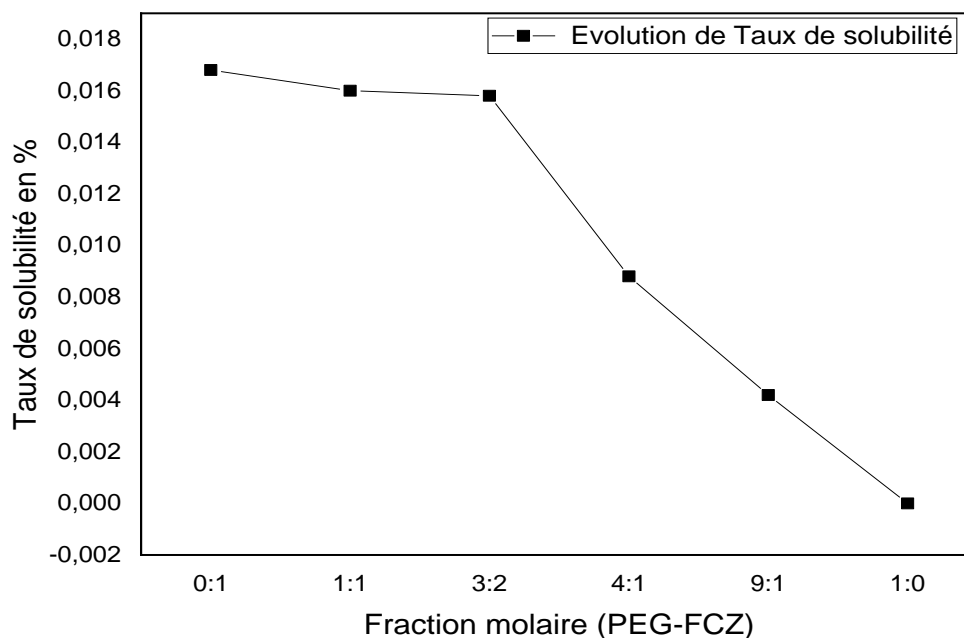


Figure N°24 : Évolution du taux de solubilité en fonction des différentes fractions molaires PEG-FCZ.

CONCLUSION

La fréquence des infections fongiques a augmenté au cours des dernières années, en raison des champignons pathogènes comme *Candida spp.* et *Aspergillus spp.* qui sont les principaux auteurs entraînent un taux de mortalité élevé chez les patients immunodéprimés,

Mais l'*Aspergillus* joue un double rôle, il provoque des maladies et parfois la mort chez les humains et l'animal et développe des substances toxiques appelées les mycotoxines au niveau des produits alimentaires, ceci nécessite de mettre au point des nouvelles formulations d'antifongiques sous forme de nanoparticules polymériques en vue d'améliorer l'efficacité et la spécificité des traitements antifongiques traditionnelles sur des souches sensibles et résistantes de *Candida spp.*, et d'*Aspergillus spp.* pour diminués la mortalité et la dévalorisation de la qualité des récoltes et réduire les pertes économique.

L'étude bibliographique a montré un manque flagrant de travaux scientifiques sur les conjugués (AAF-polymers) et certaines lacunes dans la connaissance de leurs modes d'actions sur les différentes souches fongiques et levures.

Cette recherche avait pour but d'améliorer les médicaments antifongiques existant par conjugaison avec un polymères non-toxiques, biodégradable, hydrosoluble et moins coûteux, nous avons utilisés le polyéthylène glycol 3400, cette combinaison a été réalisée pour but de diminuer de la toxicité du fluconazole et augmenter de sa solubilité, et bien entendu, réduire son coût.

L'estimation de l'effet antifongique de conjugué polyéthylène glycol 3400 avec l'agent antifongique fluconazole PEG-FCZ a été examiné dans cette étude sur les deux souches fongiques (*Candida albicans* et *Aspergillus flavus*).

La caractérisation de polyéthylène glycol 3400 et le fluconazole par spectroscopie infrarouge FTIR et Raman, a confirmé la présence de tous les groupements fonctionnels présents dans les structures chimiques des deux substances confirment ainsi la pureté de nos molécules.

Le test de l'effet antifongique du FCZ seul et son conjugué PEG-FCZ *in-vitro* face au *Candida albicans* a été déterminé par la méthode de diffusion en milieu solide.

L'effet antifongique du FCZ et son conjugué PEG-FCZ *in-vitro* face à la souche *Aspergillus flavus* a été déterminé par la méthode de dilution en milieu solide.

Les résultats obtenus ont révélé que l'effet antifongique du conjugué PEG-FCZ (les fractions molaires (4:1), (9:1) et (1:0) chez le *candida albicans*, et les fractions molaires (1 :1), (3.2) chez *Aspergillus flavus*) sont similaire à celui de l'agent antifongique FCZ seul. Il est à noter

que même que le PEG seul présente un effet antifongique significatif cependant, on a pu prouver que la présence du PEG a contribué significativement à l'amélioration de l'efficacité, de la solubilité de l'antifongique du FCZ pour sa lutte contre les différentes souches fongiques étudiées (*Candida albicans*, *Aspergillus flavus*). A travers les résultats que nous avons pu obtenus, on peut dire que notre travail a contribué positivement et nous a ouvert la voie vers le développement de nouvelles formulations pour lutter contre les champignons pathogènes qui sont responsables aux infections fongiques, et la lutte contre les champignons mycotoxinogènes responsables à la détérioration des produits alimentaires.

Ce travail comprenait une vision prospective pour le développement des médicaments antifongiques et de les rendre plus efficace encore tout en réduisant leur toxicité et augmenter leur solubilité à partir de l'incorporation d'un polymère PEG 3400.

Dans la continuité de cette étude, voici quelques perspectives à remplir :

- Réaliser d'autres tests sur d'autres champignons pathogènes et phytopathogènes
- Utiliser d'autres antifongiques et examiner les différentes combinaisons possibles.
- Utiliser d'autres poids moléculaires de polymère PEG comme PEG-400, PEG-1000.
- Utiliser d'autres polymères dont les propriétés approchent de PEG, comme POE.
- Compléter cette recherche *in-vivo* pour confirmer l'effet antifongique du conjugué PEG-FCZ sur les champignons.

**RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES**

- Abdel-Mottaleb, M. M. A., Mortada, N. D., El-Shamy, A. A., & Awad, G. A. S. (2009). Physically cross-linked polyvinyl alcohol for the topical delivery of fluconazole. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 35(3), 311–320.
<https://doi.org/10.1080/03639040802325893>
- Abuchowski, A., McCoy, J. R., Palczuk, N. C., van Es, T., & Davis, F. F. (1977). Effect of covalent attachment of polyethylene glycol on immunogenicity and circulating life of bovine liver catalase. *Journal of Biological Chemistry*, 252(11), 3582–3586.
[https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(17\)40292-4](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)40292-4)
- Adams, T. . (1995). Asexual Sporulation in Higher Fungi. In *The Growing Fungus* (pp. 367–382).
- Adeyeye, S. A. O. (2016). Fungal mycotoxins in foods: A review. *Cogent Food & Agriculture*, 2(1), file:///C:/Users/PC/Desktop/richard2007.pdf file:/.
<https://doi.org/10.1080/23311932.2016.1213127>
- Afzal, H., Shazad, S., & Nisa, S. Q. U. (2013). Morphological identification of *aspergillus* species from the soil of larkana district (Sindh, Pakistan). *Asian Journal of Agriculture and Biology*, 1(3), 105–117.
- Aimanianda, V., Bayry, J., Bozza, S., Knemeyer, O., Perruccio, K., Elluru, S. R., Clavaud, C., Paris, S., Brakhage, A. A., Kaveri, S. V., Romani, L., & Latgé, J. P. (2010). Erratum: Surface hydrophobin prevents immune recognition of airborne fungal spores (Nature (2009) 460 (1117-1121)). *Nature*, 465(7300), file:///C:/Users/PC/Desktop/richard2007.pdf file:/. <https://doi.org/10.1038/nature09134>
- Akpan, A., & Morgan, R. (2002). Oral candidiasis. *Postgrad Med J*, 78, 455–459.
- Al-kurjiya, D., Gheorjhei, I., Popa, M., Pircalabioru, G., Mihmihaescu, G., & Marutescu, L. (2018). *Characterization of non-albicans Candida species involved in human infections, Romanian biotechnological letters*.
- Alcantar, N. A., Aydil, E. S., & Israelachvili, J. N. (2000). Polyethylene glycol-coated biocompatible surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research*, 51(3), 343–351.
[https://doi.org/10.1002/1097-4636\(20000905\)51:3<343::AID-JBM7>3.0.CO;2-D](https://doi.org/10.1002/1097-4636(20000905)51:3<343::AID-JBM7>3.0.CO;2-D)
- Anane, S., Kaouech, E., Zouari, B., Belhadj, S., Kallel, K., & Chaker, E. (2010).

- Vulvovaginal candidiasis: risk factors and clinical and mycological characteristics. *Journal de Mycologie Médicale*, 20(No.1), 36–41.
- Aoun, V. (2013). *Développement de nouvelles formulations d'antifongiques et évaluation de l'activité sur Candida spp. et Aspergillus spp.*
- Arthington-Skaggs, B. A., Jradi, H., Desai, T., & Morrison, C. J. (1999). Quantitation of ergosterol content: Novel method for determination of fluconazole susceptibility of *Candida albicans*. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(10), 3332–3337. <https://doi.org/10.1128/jcm.37.10.3332-3337.1999>
- Baek, A., Baek, Y. M., Kim, H. M., Jun, B. H., & Kim, D. E. (2018). Polyethylene Glycol-Engrafted Graphene Oxide as Biocompatible Materials for Peptide Nucleic Acid Delivery into Cells. *Bioconjugate Chemistry*, 29(2), file:///C:/Users/PC/Desktop/richard2007.pdf file:/. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.8b00025>
- Bailon, P., Palleroni, A., Schaffer, C. A., Spence, C. L., Fung, W. J., Porter, J. E., Ehrlich, G. K., Pan, W., Xu, Z. X., Modi, M. W., Farid, A., & Berthold, W. (2001). Rational design of a potent, long-lasting form of interferon: A 40 kDa branched polyethylene glycol-conjugated interferon α -2a for the treatment of hepatitis C. *Bioconjugate Chemistry*, 12(2), 195–202. <https://doi.org/10.1021/bc000082g>
- Balès, N. (2014). *LES PEGS*.
- Barbesgaard, P., Heldt-Hansen, H. P., & Diderichsen, B. (1992). On the safety of *Aspergillus oryzae*: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 36(5), 569–572. <https://doi.org/10.1007/BF00183230>
- Barns, S. M., Lane, D. J., Sogin, M. L., Bibeau, C., & Weisburg, W. G. (1991). Evolutionary relationships among pathogenic *Candida* species and relatives. *Journal of Bacteriology*, 173(7), 2250–2255. <https://doi.org/10.1128/jb.173.7.2250-2255.1991>
- Bayman, P., Baker, J. L., Doster, M. A., Michailides, T. J., & Mahoney, N. E. (2002). Ochratoxin production by the *Aspergillus ochraceus* group and *Aspergillus alliaceus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(5), file:///C:/Users/PC/Desktop/richard2007.pdf file:/. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.5.2326-2329.2002>

- Biabiany, M. (2012). *Recherche et développement d'extraits antifongiques issus de la flore guadeloupéenne: caractérisations phytochimiques, pharmacologiques et formulation.*
- Borgers, M., De Brabander, M., Van Den Bossche, H., & Van Cutsem, J. (1979). Promotion of pseudomycelium formation of *Candida albicans* in culture: A morphological study of the effects of miconazole and ketoconazole. *Postgraduate Medical Journal*, 55(647), 687–691. <https://doi.org/10.1136/pgmj.55.647.687>
- Bouchard, M., De, C., Raman, M., & Bouchard-abouchacra, M. (2007). *Evaluation des Capacités de la Microscopie Raman dans la Caractérisation Minéralogique et physicochimique de Matériaux Archéologiques : Métaux , Vitraux Pigments . To cite this version : HAL Id : tel-00131055 MUSEUM NATIONAL D ' HISTOIRE NATURELLE Laborat.*
- Boudra, H. (n.d.). *Les Mycotoxines Des Fourrages Conservés Resume :*
file:///C:/Users/PC/Desktop/richard2007.pdf file:/.
- Boulenouar. (2011). *Thèse en vue de l ' obtention d ' un diplôme de Doctorat en Biologie SUBSTANCES NATURELLES A VISEE ANTIFONGIQUE : February 2011,*
file:///C:/Users/PC/Desktop/richard2007.pdf file:/.
<https://doi.org/10.13140/RG.2.2.33233.84325>
- Boulou Sibiri. (2015). *:Mise en cuCture sureéCose SabourawfpCus cfiIorampliénicoCfiesprélèvementspulmonairespour l'étudé clé Ca tfiversité clésportaees ou infections foneiques au Centre J-fospitaCier 'Universitaire Souro Sanou dé IJo60-ViouCasso.*
- Brown, G. D., Denning, D. W., Gow, N. A. R., Levitz, S. M., Netea, M. G., & White, T. C. (2012). Hidden killers: Human fungal infections. *Science Translational Medicine*, 4(165), file:///C:/Users/PC/Desktop/richard2007.pdf file:/.
<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3004404>
- Candy, D., & Belsey, J. (2009). Macrogol (polyethylene glycol) laxatives in children with functional constipation and faecal impaction: A systematic review. *Archives of Disease in Childhood*, 94(2), 156–160. <https://doi.org/10.1136/adc.2007.128769>
- Caraës, N. (2016). *Épidémiologie des candidoses profondes au Centre Hospitalier Universitaire de Rouen.* <https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01323570>

- Cast. (2003). *Mycotoxine: Risks in plant, animal, and human système*.
- Chabasse, D., Bouchara, J.P., de Gentile, L., Brun, S., Cimon, B., Penn, P. (2002). *Les Moisissures D Intérêt Médical*. file:///C:/Users/PC/Desktop/richard2007.pdf file:/.
- Chattaway, F. W., Holmes, M. R., & Barlow, A. J. (1968). Cell wall composition of the mycelial and blastospore forms of *Candida albicans*. *Journal of General Microbiology*, 51(3), 367–376. <https://doi.org/10.1099/00221287-51-3-367>
- Chirife, J., Herszage, L., Joseph, A., Bozzini, J. P., Leardini, N., & Kohn, E. S. (1983). In vitro antibacterial activity of concentrated polyethylene glycol 400 solutions. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 24(3), 409–412. <https://doi.org/10.1128/AAC.24.3.409>
- Chu, W. ., Magee, B. ., & Magee, P. . (1993). Construction of an sfil macrorestriction map of the candida albicans genom. *Journal of Bacteriology*, 175(20), 6637–6651.
- Ciegler, A. (1972). Bioproduction of ochratoxin A and penicillic acid by members of the *Aspergillus ochraceus* group. *Canadian Journal of Microbiology*, 18(5), 631–636. <https://doi.org/10.1139/m72-100>
- Ciegler, A., Vesonder, R. F., & Jackson, L. K. (1977). Production and biological activity of patulin and citrinin from *Penicillium expansum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 33(4), file:///C:/Users/PC/Desktop/richard2007.pdf file:/.
<https://doi.org/10.1128/aem.33.4.1004-1006.1977>
- Coronado-Castellote, L., & Jiménez-Soriano, Y. (2013). Clinical and microbiological diagnosis of oral candidiasis. *Journal of Clinical and Experimental Dentistry*, 5(5), 279–286.
- Corrêa, J. C. R., & Salgado, H. R. N. (2011). Review of fluconazole properties and analytical methods for its determination. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 41(3), file:///C:/Users/PC/Desktop/richard2007.pdf file:/.
<https://doi.org/10.1080/10408347.2011.588924>
- D'souza, A. A., & Shegokar, R. (2016). Polyethylene glycol (PEG): a versatile polymer for pharmaceutical applications. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 13(9), file:///C:/Users/PC/Desktop/richard2007.pdf file:/.

<https://doi.org/10.1080/17425247.2016.1182485>

Daher, C. (2012). *Analyse par spectroscopies Raman et infrarouge de matériaux naturels organiques issus d'objets du patrimoine : méthodologies et applications*. PIERRE ET MARIE CURIE Paris.

Dauchy, C., Bautin, N., Nseir, S., Reboux, G., Wintjens, R., Le Rouzic, O., Sendid, B., Viscogliosi, E., Gosset, P., Dei-Cas, E., Fry, S., & Fréalle, E. (2016). Emergence de la résistance aux azolés d' *Aspergillus fumigatus* chez les patients atteints de BPCO : circulation entre les réservoirs cliniques et environnementaux. *Journal de Mycologie Médicale*, 26(2), file:///C:/Users/PC/Desktop/richard2007.pdf file:/.
<https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2016.04.021>

De Koe, W. J., & Juodeikiene, G. (2012). Mycotoxin contamination of wheat, flour and bread. In *Breadmaking: Improving quality, Second Edition* (Second Edi). Woodhead Publishing Limited. <https://doi.org/10.1533/9780857095695.3.614>

Denning, D. W., & Perlin, D. S. (2011). Azole resistance in *Aspergillus*: A growing public health menace. *Future Microbiology*, 6(11), 1229–1232.
<https://doi.org/10.2217/fmb.11.118>

Dennis, M., Dixon, & Thomas, J. . (1996). Antifungal agents. In *Medical Microbiology* (4 th editi).

Deporlah, M. T. Z. (2016). *SENSIBILITE IN VITRO AUX ANTIFONGIQUES DES SOUCHES DE CANDIDA RESPONSABLES DE MYCOSES VULVO-VAGINALES RECIDIVANTES A ABIDJAN REPUBLIQUE*.

Desoubeaux, G., & Chandener, J. (2010). *Aspergillus* et maladies aspergillaires. *Feuillets de Biologie*, 51(293), 53–63.

Desoutter, A. (2008). INtérêt des modèles expérimentaux d'aspergillose. *Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Maison Alfort*.

Dipalma, J. A., Deridder, P. H., Orlando, R. C., Kolts, B. E., & Cleveland, M. V. (2000). A randomized, placebo-controlled, multicenter study of the safety and efficacy of a new polyethylene glycol laxative. *American Journal of Gastroenterology*, 95(2), file:///C:/Users/PC/Desktop/richard2007.pdf file:/. <https://doi.org/10.1016/S0002->

9270(99)00824-2

Drouhet, E. (1976). Biologie des Candida Rappel mycologique et physiopathologique. *Revue Francaise d'allergologie et d'immunologie Clinique*, 16(5), 233–235.

[https://doi.org/10.1016/S0335-7457\(76\)80015-9](https://doi.org/10.1016/S0335-7457(76)80015-9)

Eichner, R. D., Al Salami, M., Wood, P. R., & Müllbacher, A. (1986). The effect of gliotoxin upon macrophage function. *International Journal of Immunopharmacology*, 8(7),

file:///C:/Users/PC/Desktop/richard2007.pdf file:/. [https://doi.org/10.1016/0192-0561\(86\)90016-0](https://doi.org/10.1016/0192-0561(86)90016-0)

Eskola, M., Kos, G., Elliott, C. T., Hajšlová, J., Mayar, S., & Krska, R. (2020). Worldwide contamination of food-crops with mycotoxins: Validity of the widely cited 'FAO estimate' of 25%. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(16),

file:///C:/Users/PC/Desktop/richard2007.pdf file:/. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1658570>

Fetih, G. (2016). Fluconazole-loaded niosomal gels as a topical ocular drug delivery system for corneal fungal infections. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 35, 8–15.

Fortún, J., Meije, Y., Fresco, G., & Moreno, S. (2012). Aspergilosis. Formas clínicas y tratamiento. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 30(4), 201–208.

<https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.12.005>

Frisvad, J. C., Smedsgaard, J., Samson, R. A., Larsen, T. O., & Thrane, U. (2007). Fumonisin B 2 production by *Aspergillus niger*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*,

55(23), 9727–9732. <https://doi.org/10.1021/jf0718906>

Frisvad, J. C., Thrane, U., Samson, R. A., & Pitt, J. I. (2005). Important mycotoxins and the fungi which produce them. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 571,

file:///C:/Users/PC/Desktop/richard2007.pdf file:/. https://doi.org/10.1007/0-387-28391-9_1

Gault, N., Poncy, J.-I., Tourdes, F., Dumas, P., & Louis, J. (2001).

MICROSPECTROSCOPIE INFRA-ROUGE PAR TRANSFORME E DE FOURIER (FT-IR): UN NOUVEL OUTIL D'EVALUATION. *Commissariat à 'Energie Atomique*, 34(12).

- Ghannoum, M. A., & Rice, L. B. (1999). Antifungal agents: Mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4), 501–517. <https://doi.org/10.1128/cmr.12.4.501>
- Gizachew, D., Chang, C. H., Szonyi, B., De La Torre, S., & Ting, W. tsi E. (2019). Aflatoxin B1 (AFB1) production by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* on ground Nyjer seeds: The effect of water activity and temperature. *International Journal of Food Microbiology*, 296(October 2018), 8–13. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.02.017>
- Gow, N. A. R., & Gooday, G. W. (1982). Growth kinetics and morphology of colonies of the filamentous form of *Candida albicans*. *Journal of General Microbiology*, 128(9), 2187–2194. <https://doi.org/10.1099/00221287-128-9-2187>
- Grenouillet, F., Hénon, T., Kaiser, J.-D., Limat, S., Millon, L., & Leroy, J. (2013). Usage, impact écologique et économique des antifongiques systémiques en milieu hospitalier en France. 1 [Http://Ansm.Sante.Fr/Dossiers-Thematiques/Referentielsde-Bon-Usage-Des-Medicaments/Referentiels-de-Bon-Usagedes-Medicaments/\(Offset\)/0](http://Ansm.Sante.Fr/Dossiers-Thematiques/Referentielsde-Bon-Usage-Des-Medicaments/Referentiels-de-Bon-Usagedes-Medicaments/(Offset)/0), 117–120.
- Griffith, G. W., Easton, G. L., Detheridge, A., Roderick, K., Edwards, A., Worgan, H. J., Nicholson, J., & Perkins, W. T. (2007). Copper deficiency in potato dextrose agar causes reduced pigmentation in cultures of various fungi. *FEMS Microbiology Letters*, 276(2), 165–171. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00923.x>
- Gu, X. J., & Jiang, W. (1995). Characterization of polymorphic forms of fluconazole using Fourier transform Raman spectroscopy. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 84(12), 1438–1441.
- Gueye, M. (2018). *Caractérisation par infrarouge à transformée de Fourier des réactions chimiques entre post-décharges et précurseurs organosiliciés : cas du 3-aminopropyltriéthoxysilane (APTES)* Magamou Gueye To cite this version : HAL Id : tel-01754637 soutenance et mis.
- Harris Milton, J. (1992). *Poly (ethylene glycol) Chemistry Biotechnical and biomedical applications* (J. M. Hrris (ed.)). Department of chemistry, university of Alabama in HintsvilleAlabama 35899.
- Haryanto, Fani, & Mahardian, A. (2018). Biocompatible Hydrogel Film of Polyethylene

- Oxide-Polyethylene Glycol Dimetacrylate for Wound Dressing Application. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 288(1),
file:///C:/Users/PC/Desktop/richard2007.pdf file:/. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/288/1/012076>
- Havlickova, B., Czaika, V. A., & Friedrich, M. (2009). Epidemiological trends in skin mycoses worldwide (Mycoses (2008) 51, SUPPL. 4, (2-15)). *Mycoses*, 52(1),
file:///C:/Users/PC/Desktop/richard2007.pdf file:/. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2008.01668.x>
- Hay, R. J. (2003). Antifungal drugs used for systemic mycoses. *Dermatologic Clinics*, 21(3), 577–587. [https://doi.org/10.1016/S0733-8635\(03\)00038-X](https://doi.org/10.1016/S0733-8635(03)00038-X)
- Hitchcock, C. A., Barrett-Bee, K. J., & Russell, N. J. (1986). The Lipid Composition of Azole-sensitive and Azole-resistant Strains of *Candida albicans*. *Journal of General Microbiology*, 132, 2421–2431.
- Hof, H. (2006). A new, broad-spectrum azole antifungal: Posaconazole - Mechanisms of action and resistance, spectrum of activity. *Mycoses*, 49(SUPPL. 1), 2–6.
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2006.01295.x>
- Hogan, L. H., Klein, B. S., & Levitz, S. M. (1996). Virulence factors of medically important fungi. *Clinical Microbiology Reviews*, 9(4), file:///C:/Users/PC/Desktop/richard2007.pdf file:/. <https://doi.org/10.1128/cmr.9.4.469-488.1996>
- Huang, Y. L., Li, Q. B., Deng, X., Lu, Y. H., Liao, X. K., Hong, M. Y., & Wang, Y. (2005). Aerobic and anaerobic biodegradation of polyethylene glycols using sludge microbes. *Process Biochemistry*, 40(1), 207–211. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2003.12.004>
- Huet, C. (2007). Principes de mesure de la sensibilité aux antibiotiques. CMI/CMB. *EMC - Biologie Médicale*, 2(3), 1–3. [https://doi.org/10.1016/s2211-9698\(07\)71385-7](https://doi.org/10.1016/s2211-9698(07)71385-7)
- Hulin, A., Deguillaume, A. M., Bretagne, S., & Bézie, Y. (2005). The good use of antifungal drugs in the treatment of invasives candidosis and aspergillosis. *Journal de Pharmacie Clinique (Paris)*, 24(3), 125–138.
- Hussein, H. S., & Brasel, J. M. (2001). Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*, 167(2), file:///C:/Users/PC/Desktop/richard2007.pdf

- file://. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(01\)00471-1](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(01)00471-1)
- Jarvis, B. B., & Miller, J. D. (2005). Mycotoxins as harmful indoor air contaminants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 66(4), 367–372. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1753-9>
- Khoufache, K., Puel, O., Loiseau, N., Delaforge, M., Rivollet, D., Coste, A., Cordonnier, C., Escudier, E., Botterel, F., & Bretagne, S. (2007). Verruculogen associated with *Aspergillus fumigatus* hyphae and conidia modifies the electrophysiological properties of human nasal epithelial cells. *Verruculogen Associated with Aspergillus Fumigatus Hyphae and Conidia Modifies the Electrophysiological Properties of Human Nasal Epithelial Cells*, 7(1), file:///C:/Users/PC/Desktop/richard2007.pdf file://. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-7-5>
- Klich, M. A. (2007). *Aspergillus flavus*: The major producer of aflatoxin. *Molecular Plant Pathology*, 8(6), file:///C:/Users/PC/Desktop/richard2007.pdf file://. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00436.x>
- Kousha, M., Tadi, R., & Soubani, A. O. (2011). Pulmonary aspergillosis: A clinical review. *European Respiratory Review*, 20(121), 156–174. <https://doi.org/10.1183/09059180.00001011>
- Lafarge, C., & Frayssinet, C. (1970). The reversibility of inhibition of RNA and DNA synthesis induced by aflatoxin in rat liver. A tentative explanation for carcinogenic mechanism. *International Journal of Cancer*, 6(1), 74–83. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910060112>
- Lai, X., Zhang, H., Liu, R., & Liu, C. (2015). Potential for aflatoxin B1 and B2 production by *Aspergillus flavus* strains isolated from rice samples. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 22(2), 176–180. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2014.09.013>
- Lee, U. S., Jang, H. S., Tanaka, T., Toyasaki, N., Sugiura, Y., Oh, Y. J., Cho, C. M., & Ueno, Y. (1986). Mycological survey of Korean cereals and production of mycotoxins by *Fusarium* isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 52(6), file:///C:/Users/PC/Desktop/richard2007.pdf file://. <https://doi.org/10.1128/aem.52.6.1258-1260.1986>
- Leleu, G., Aegerter, P., & Guidet, B. (2002). Systemic candidiasis in intensive care units: A

- multicenter, matched-cohort study. *Journal of Critical Care*, 17(3), 168–175.
<https://doi.org/10.1053/jcrc.2002.35815>
- Li, F. Q., Toyazaki, N., & Yoshizawa, T. (2001). Production of *Alternaria* mycotoxins by *Alternaria alternata* isolated from weather-damaged wheat. *Journal of Food Protection*, 64(4), file:///C:/Users/PC/Desktop/richard2007.pdf file:/. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-64.4.567>
- Ling, K. H. (1994). Territrems, tremorgenic mycotoxins isolated from *aspergillus terreus*. *Toxin Reviews*, 13(3), 243–252. <https://doi.org/10.3109/15569549409089963>
- Lupetti, A., Danesi, R., Campa, M., Tacca, M. Del, & Kelly, S. (2002). Molecular basis of resistance to azole antifungals. *National Library of Medicine*, 8(2), 76–81.
- Marchetti, O., Bille, J., Fluckiger, U., Eggimann, P., Ruef, C., Garbino, J., Calandra, T., Glauser, M. P., Täuber, M. G., & Pittet, D. (2004). Epidemiology of Candidemia in Swiss Tertiary Care Hospitals: Secular Trends, 1991-2000. *Clinical Infectious Diseases*, 38(3), 311–320. <https://doi.org/10.1086/380637>
- Marin, S., Ramos, A. J., Cano-Sancho, G., & Sanchis, V. (2013). Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food and Chemical Toxicology*, 60, file:///C:/Users/PC/Desktop/richard2007.pdf file:/.
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.07.047>
- Maslova, O. A., Maslova, O. A., Université, A., Doctorale, É., & Maslova, O. A. (2015). *Spectroscopie et imagerie Raman de matériaux inhomogènes To cite this version : HAL Id : tel-01128067 Spectroscopie et imagerie Raman de matériaux inhomogènes.*
- McKean, C., Tang, L., Tang, M., Billam, M., Wang, Z., Theodorakis, C. W., Kendall, R. J., & Wang, J. S. (2006). Comparative acute and combinative toxicity of aflatoxin B1 and fumonisin B1 in animals and human cells. *Food and Chemical Toxicology*, 44(6), file:///C:/Users/PC/Desktop/richard2007.pdf file:/.
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2005.11.011>
- Milani, J. M. (2013). Ecological conditions affecting mycotoxin production in cereals: A review. *Veterinarni Medicina*, 58(8), 405–411. <https://doi.org/10.17221/6979-VETMED>
- Mills, J. T., & Abramson, D. (1986). Production of sterigmatocystin by isolates of *aspergillus*

- versicolor from western canadian stored barley and rapeseed/canola. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 8(2), 151–153. <https://doi.org/10.1080/07060668609501819>
- Modjarrad, K., & Ebnesajjad, S. (2014). *Handbook of Polymer Applications in Medicine and Medical Devices* (K. Modjarrad & S. Ebnesajjad (eds.)). William Andrew is an imprint of Elsevier.
- Mullbacher, A., Waring, P., & Eichner, R. D. (1985). Identification of an agent in cultures of *Aspergillus fumigatus* displaying anti-phagocytic and immunomodulating activity in vitro. *Journal of General Microbiology*, 131(5), file:///C:/Users/PC/Desktop/richard2007.pdf file:/. <https://doi.org/10.1099/00221287-131-5-1251>
- Nalawade, T., Sogi, S. P., & Bhat, K. (2015). Bactericidal activity of propylene glycol, glycerine, polyethylene glycol 400, and polyethylene glycol 1000 against selected microorganisms. *Journal of International Society of Preventive and Community Dentistry*, 5(2), file:///C:/Users/PC/Desktop/richard2007.pdf file:/. <https://doi.org/10.4103/2231-0762.155736>
- Nielsen, K. F., Mogensen, J. M., Johansen, M., Larsen, T. O., & Frisvad, J. C. (2009). Review of secondary metabolites and mycotoxins from the *Aspergillus niger* group. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395(5), 1225–1242. <https://doi.org/10.1007/s00216-009-3081-5>
- Nobles, T., & Miller, R. A. (2020). *Intertrigo*.
- Ok, M., Latge, J. P., Baeuerlein, C., Ebel, F., Mezger, M., Topp, M., Kurzai, O., Killian, D., Kapp, M., Grigoleit, G. U., Sennefelder, H., Arroyo, J., Einsele, H., & Loeffler, J. (2009). Immune responses of human immature dendritic cells can be modulated by the recombinant *Aspergillus fumigatus* antigen Asp1. *Clinical and Vaccine Immunology*, 16(10), file:///C:/Users/PC/Desktop/richard2007.pdf file:/. <https://doi.org/10.1128/CVI.00175-08>
- Ouraïni, D., Agoumi, A., Ismaïli-Alaoui, M., Alaoui, K., Cherrah, Y., Alaoui, M. A., & Belabbas, M. A. (2007). Activité antifongique de l'acide oléique et des huiles essentielles de *Thymus saturejoides* L. et de *Mentha pulegium* L., comparée aux antifongiques dans les dermatoses mycosiques. *Phytotherapie*, 5(1), 6–14.

<https://doi.org/10.1007/s10298-007-0201-2>

- Papon, N., Courdavault, V., Clastre, M., & Bennett, R. J. (2013). Emerging and Emerged Pathogenic Candida Species: Beyond the Candida albicans Paradigm. *PLoS Pathogens*, 9(9). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003550>
- Parker, J. C., McCloskey, J. J., & Knauer, K. A. (1975). Pathobiologic Features of Human Candidiasis. *Department of Pathology, University of Kentucky Medical Center, Lexington, Kentucky 40506, and Department of Pathology, Jackson Memorial Hospital, University of Miami School of Medicine, Miami, Florida 33152*, 65, 991–1000.
- Patterson, K., & Streck, M. E. (2010). Allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 7(3), 237–244. <https://doi.org/10.1513/pats.200908-086AL>
- Paugam, A. (2010). Le point sur l'antifongigramme. *La Lettre de l'Infectiologue*, 6, 222–227.
- Paul, B., Nicholas, S. ., & George, E. . (2007). Fate of ergot (Claviceps purpurea) alkaloids during malting and brewing. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 65(1).
- Peng, F. C., Ling, K. H., Wang, Y., & Lee, G. H. (1985). Isolation, chemical structure, acute toxicity, and some physicochemical properties of territrems B' from *Aspergillus terreus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 49(3), 721–723. <https://doi.org/10.1128/aem.49.3.721-723.1985>
- Pitt, J. . (2000). Toxigenic fungi and mycotoxins. *British Medical Bulletin*, 1(56), 184–192.
- Pitt, J. I., Cruickshank, R. H., & Leistner, L. (1986). *Penicillium commune*, *P. camembertii*, the origin of white cheese moulds, and the production of cyclopiazonic acid. *Food Microbiology*, 3(4), file:///C:/Users/PC/Desktop/richard2007.pdf file:/.
- [https://doi.org/10.1016/0740-0020\(86\)90022-5](https://doi.org/10.1016/0740-0020(86)90022-5)
- Pucić, I., & Jurkin, T. (2012). FTIR assessment of poly (ethylene oxide) irradiated in solid state, melt and aqueous solution. *Radiation Physics and Chemistry*, 81(9), 1426–1429.
- Quinton-Bouvier, M.-C. (2019). *Résistance d'Aspergillus fumigatus aux azolés, Mythe ou réalité.*
- Rhoda, W. (1957). *Isolated from identification man:*

- Richard, J. L. (2007). Some major mycotoxins and their mycotoxicoses-An overview. *International Journal of Food Microbiology*, 119(1–2), 3–10. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.019>
- Richardson, K., Cooper, K., Marriott, M. S., Tarbit, M. H., Troke, F., & Whittle, P. J. (1990). Discovery of Fluconazole, a Novel Antifungal Agent. *Reviews of Infectious Diseases*, 12(3), 267–271.
- Richet, H. M., Andreumont, A., Tancrede, C., Pico, J. L., & Jarvis, W. R. (1991). Risk Factors for Candidemia in Patients with Acute Lymphocytic Leukemia. *Reviews of Infectious Diseases*, 13(2), 211–215.
- Samson, R. A., Peterson, S. W., Frisvad, J. C., & Varga, J. (2011). New species in *Aspergillus* section *Terrei*. *Studies in Mycology*, 69, 39–55. <https://doi.org/10.3114/sim.2011.69.04>
- Samson, Robert A. (1994). Taxonomy—Current Concepts of *Aspergillus* Systematics. *Aspergillus*, file:///C:/Users/PC/Desktop/richard2007.pdf file:/. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2411-3_1
- Sanjin, R. (2014). Notice TP3 Spectroscopie Raman. *Technique de l'ingenieur*.
- Scharf, D. ., Heinekamp, T., Remme, N., Hortschansky, P., Barkhage, A., & Hertweck, C. (2012). Biosynthesis and function of gliotoxin in *Aspergillus fumigatus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93, 467–472.
- Seo, K., & H Akiyoshi, Y. O. (1999). Alteration of cell wall composition leads to amphotericin B resistance in *Aspergillus flavus*. *Microbiol Immunol*, 43(11), 1017–1025.
- Simon, T. (2011). *Etude de la diversité génétique d'aspergillus fumigatus et de chlamydophila psittaci chez les oiseaux et mise au point de modèles expérimentaux aviaires*.
- Soltanpour, S., & Jouyban, A. (2013). Solubility of lamotrigine in binary and ternary mixtures of pegs 200, 400, and 600 with ethanol, pg, and water at 298.2 k. *Chemical Engineering Communications*, 200(11), 1443–1456. <https://doi.org/10.1080/00986445.2012.751378>
- Somchit, N., Hassim, S. M., & Samsudin, S. H. (2002). Itraconazole- and fluconazole-induced toxicity in rat hepatocytes: A comparative in vitro study. *Human and Experimental Toxicology*, 21(1), 43–48. <https://doi.org/10.1191/0960327102ht208oa>

- Sommer, N. F., Buchanan, J. R., & Fortlage, R. J. (1974). Production of Patulin by *Penicillium expansum*. *Applied Microbiology*, 28(4), file:///C:/Users/PC/Desktop/richard2007.pdf file:/. <https://doi.org/10.1128/am.28.4.589-593.1974>
- Spellberg, B. J., Filler, S. G., & Edwards, J. E. (2006). Current treatment strategies for disseminated candidiasis. *Clinical Infectious Diseases*, 42(2), 244–251. <https://doi.org/10.1086/499057>
- Stary, A., Soeltz-Szoets, J., Ziegler, C., Kinghorn, G. R., & Roy, R. B. (1996). Comparison of the efficacy and safety of oral fluconazole and topical clotrimazole in patients with candida balanitis. *Genitourinary Medicine*, 72(2), 98–102. <https://doi.org/10.1136/sti.72.2.98>
- Sullivan, D. J., Henman, M. C., Moran, G. P., O'Neill, L. C., Bennett, D. E., Shanley, D. B., & Coleman, D. C. (1996). Molecular genetic approaches to identification, epidemiology and taxonomy of non-albicans *Candida* species. *Journal of Medical Microbiology*, 44(6), 399–408. <https://doi.org/10.1099/00222615-44-6-399>
- Sutton, P., Newcombe, N. R., Waring, P., & Mullbacher, A. (1994). In vivo immunosuppressive activity of gliotoxin, a metabolite produced by human pathogenic fungi. *Infection and Immunity*, 62(4), file:///C:/Users/PC/Desktop/richard2007.pdf file:/. <https://doi.org/10.1128/iai.62.4.1192-1198.1994>
- Taniwaki, M. H., Pitt, J. I., & Magan, N. (2018). *Aspergillus* species and mycotoxins: occurrence and importance in major food commodities. *Current Opinion in Food Science*, 23, 38–43. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.05.008>
- Teleginski, L. K., Maciel, A. B., Mendes, C., Silva, M. A. S., Bernardi, L. S., & Oliveira, P. R. (2015). Fluconazole–excipient compatibility studies as the first step in the development of a formulation candidate for biowaiver. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 120(1), 771–781.
- Thanh, T., Thi, H., Pilkington, E. H., Nguyen, D. H., & Lee, J. S. (2020). The Importance of Poly (ethylene glycol) Alternatives for Overcoming PEG Immunogenicity in Drug. *Polymers*, 12(2), 298.
- Thorac, J. (1986). Pulmonary *Aspergilloma*. *CardiowascSurg*, 92, 981–988.

- Tournas, V. H., & Stack, M. E. (2001). Production of alternariol and alternariol methyl ether by *Alternaria alternata* grown on fruits at various temperatures. *Journal of Food Protection*, 64(4), file:///C:/Users/PC/Desktop/richard2007.pdf file:/.
<https://doi.org/10.4315/0362-028X-64.4.528>
- Troke, P. F., Andrews, R. J., Marriott, M. S., & Richardson, K. (1987). Efficacy of fluconazole (UK-49,858) against experimental aspergillosis and cryptococcosis in mice. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 19(5), 663–670.
<https://doi.org/10.1093/jac/19.5.663>
- Turecek, P. L., Bossard, M. J., Schoetens, F., & Ivens, I. A. (2016). PEGylation of Biopharmaceuticals: A Review of Chemistry and Nonclinical Safety Information of Approved Drugs. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 105(2), 460–475.
<https://doi.org/10.1016/j.xphs.2015.11.015>
- Tverdek, F. P., Kofteridis, D., & Kontoyiannis, D. P. (2016). Antifungal agents and liver toxicity: a complex interaction. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 14(8), file:///C:/Users/PC/Desktop/richard2007.pdf file:/.
<https://doi.org/10.1080/14787210.2016.1199272>
- Upadhyay, S. K., Mahajan, L., Ramjee, S., Singh, Y., Basir, S. F., & Madan, T. (2009). Identification and characterization of a laminin-binding protein of *Aspergillus fumigatus*: Extracellular thaumatin domain protein (AfCalAp). *Journal of Medical Microbiology*, 58(6), file:///C:/Users/PC/Desktop/richard2007.pdf file:/.
<https://doi.org/10.1099/jmm.0.005991-0>
- Varga, J., Rigo, K., Molnar, J., Toth, B., Szencz, S., Teren, J., & Kozakiewicz, Z. (2003). Mycotoxin production and evolutionary relationships among species of *aspergillus section clavati*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 83, 191–200.
- Vejzovic, V., Wennick, A., Idvall, E., Agardh, D., & Bramhagen, A. C. (2016). Polyethylene glycol- or sodium picosulphate-based laxatives before colonoscopy in children. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 62(3), 414–419.
<https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000000978>
- Viljoen, B. C., & Kock, J. L. F. (1989). The Genus *Candida* Berkhout nom. conserv. —A Historical Account of its Delimitation. *Systematic and Applied Microbiology*, 12(2),

- 183–190. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(89\)80013-X](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(89)80013-X)
- Wagacha, J. M., & Muthomi, J. W. (2008). Mycotoxin problem in Africa: Current status, implications to food safety and health and possible management strategies. *International Journal of Food Microbiology*, *124*(1), file:///C:/Users/PC/Desktop/richard2007.pdf file:/. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.01.008>
- Webster, G. K., Elliott, A., Dahan, A., & Miller, J. M. (2011). Analysis of PEG 400 in perfusate samples by aqueous normal phase (ANP) chromatography with evaporative light scattering detection. *Analytical Methods*, *3*(3), 742–744.
- Wei, C. M., Hansen, B. S., Vaughan, M. H., & McLaughlin, C. S. (1974). Mechanism of action of the mycotoxin trichodermin, a 12,13 epoxytrichothecene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *71*(3), 713–717. <https://doi.org/10.1073/pnas.71.3.713>
- Winnacker, M., & Rieger, B. (2017). Copolymers of polyhydroxyalkanoates and polyethylene glycols: recent advancements with biological and medical significance. *Polymer International*, *66*(4), 497–503. <https://doi.org/10.1002/pi.5261>
- Yamazaki, T., Kume, H., Murase, S., Yamashita, E., & Arisawa, M. (1999). Epidemiology of Visceral Mycoses: Analysis of Data in Annual of the Pathological Autopsy Cases in Japan. *Journal of Clinical Microbiology*, *37*(No. 6), 1732–1738.
- Yoshihara, T., Tadokoro, H., & Murahashi, S. (1964). Normal Vibrations of the Polymer Molecules of Helical Conformation. IV. Polyethylene Oxide and Polyethylene d4 Oxide. *The Journal of Chemical Physics*, *41*(9), 2902–2911.
- Yuniarto, K., Purwanto, Y. A., Purwanto, S., Welt, B. A., Purwadaria, H. K., & Sunarti, T. C. (2016). Infrared and Raman studies on polylactide acid and polyethylene glycol-400 blend. *AIP Conference Proceedings*, *1725*(April). <https://doi.org/10.1063/1.4945555>
- Zain, M. E. (2011). Impact of mycotoxins on humans and animals. *Journal of Saudi Chemical Society*, *15*(2), file:///C:/Users/PC/Desktop/richard2007.pdf file:/. <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2010.06.006>
- Zalipsky, S., & Harris, J. M. (1997). Introduction to Chemistry and Biological Applications of Poly(ethylene glycol). *ACS Symposium Series*, *680*(2), 1–13. <https://doi.org/10.1021/bk->

1997-0680.ch001

Zhu, Y. X., Hu, W. W., Yao, L. Y., Yu, W. G., Jiao, R. H., Lu, Y. H., & Tan, R. X. (2015). Improvement of fumigaclavine C production in a two-stage culture of *Aspergillus fumigatus* with molasses as a cost-effective ingredient. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 20(6), 1106–1113. <https://doi.org/10.1007/s12257-015-0193-y>



Zonios, D. I., & Bennett, J. E. (2008). Update on Azole Antifungals. *Semin Respir Crit Care Med*, 29(2), 198–210.

ANNEXES

Annexe N° 01

| Composition du milieu de culture PDA | |
|--------------------------------------|---------|
| Pomme de terre | 200 g |
| Dextrose/ saccharose | 20 g |
| Agar agar | 20 g |
| Eau Distillée | 1000 ml |

| Composition du milieu de culture SABOURAUD | |
|--|---------|
| Peptones | 10.0 g |
| Glucose | 40.0 g |
| Agar | 15.0 g |
| Eau distillée | 1000 ml |

| | |
|---|--|
|  |  |
| Milieu de culture : PDA | Milieu de culture : Sabouraud |

Annexe N° 02



Souche candida albicans

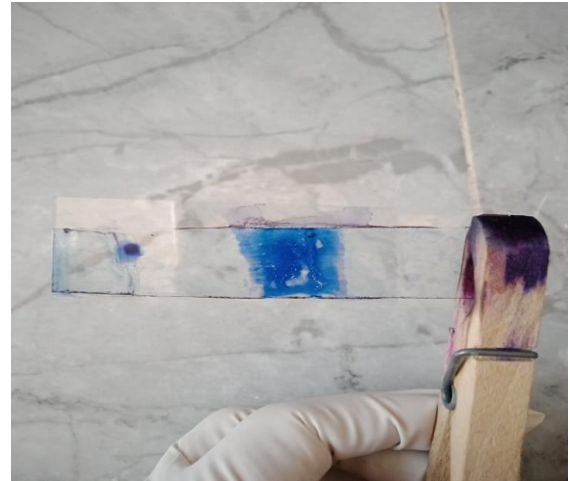


Fluconazole 150 mg

Annexe N° 3



Frottis de candida albicans à l'état fixé



Frottis de candida albicans par méthode de drapeau



Frottis de l'Aspergillus flavus par méthode de drapeau

| | | |
|--|---|--|
|  |  |  |
| <p>Balance de précision</p> | <p>Centrifugeuse</p> | <p>Balance magnétique</p> |
|  |  |  |
| <p>Incubateur</p> | <p>Agitateur électrique</p> | <p>Vortex électrique</p> |

Annexe N° 4

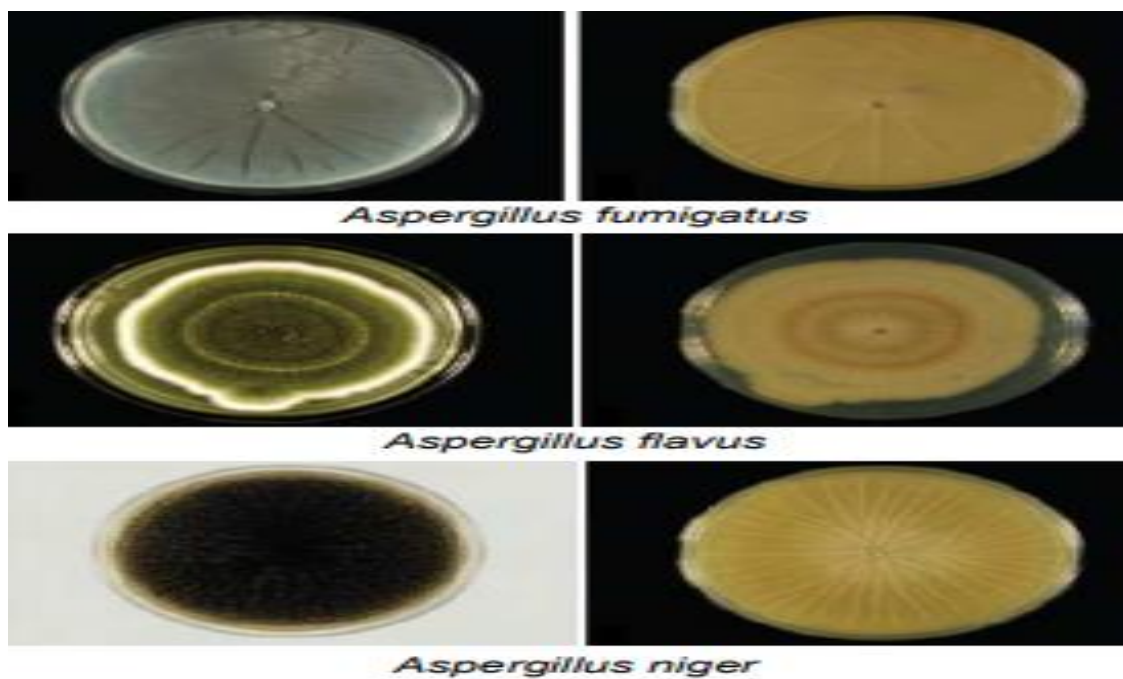


Figure N°01 : Aspect macroscopique de culture d'aspergillus sur milieu Sabouraud.

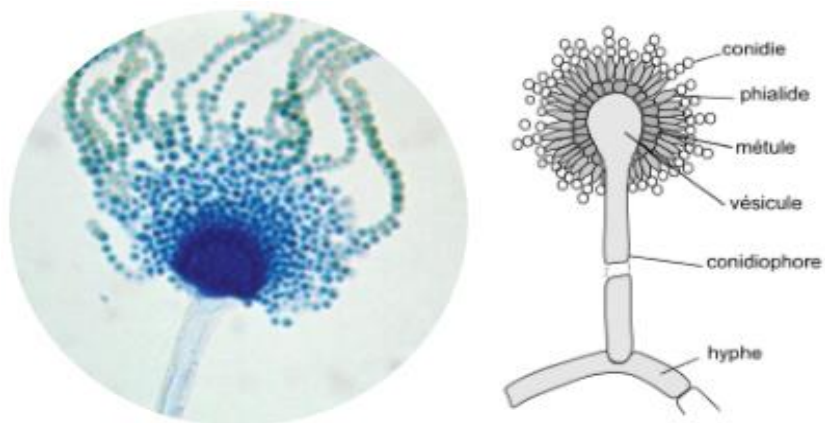


Figure N°02 : Vue microscopique d'une tête aspergillaire (gauche) et sa représentation schématique (droite).

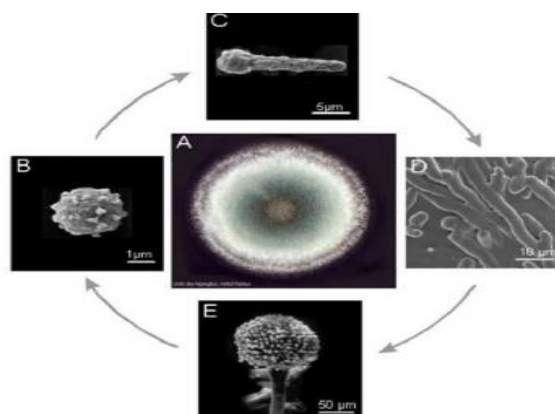


Figure N°03 : Cycle de développement des champignons du genre *Aspergillus* (Desoutter, 2008).

Tableau N°01: Les niveaux de mycotoxines autorisés par l'Union Européenne (UE) dans les aliments et les denrées alimentaires qu'elles contaminent et leurs effets possible sur la santé humain (De Koe & Juodeikiene, 2012)

| Mycotoxines | Variétés alimentaires | Concentration autorisée (µg/kg) | Effets possibles sur la santé humaine |
|---------------------|---|---------------------------------|--|
| Aflatoxins B1(AFB1) | Céréales et ces dérivés | 2.0 | Cancer du foie Immunosuppresseur Cancérigène |
| | Maïs | 5.0 | |
| | aliments pour bébés | 0.1 | |
| | Aliments à usage médical pour les nourrissons | 0.1 | |
| Ochratoxin A(OTA) | aliments pour bébés à base de maïs | 200 | Immunosuppresseur Néphrotoxique Cancer Neurotoxique |
| | Aliments à base de maïs pour consommation directe | 400 | |
| | Maïs non transformé | 2000 | |
| | huile de maïs raffinée, semoule de maïs, Farine de maïs | 1000 | |
| Zéaralénone(ZEA) | Céréales n'ayant subis aucun traitement | 100.0 | Dommages dans le système endocrinien |
| | Maïs non transformé | 200 | |

| | | | |
|------------------------|--|------|---|
| | Aliments transformés pour nourrissons à base de maïs | 20 | |
| fumonisines B 1 et B 2 | Céréales | 2 | disfonctionnement du métabolisme des sphingolipides Cancer de l'œsophage |
| Déoxynivalénol (DON) | Blé dur | 1750 | |
| | Céréales non transformées | 1250 | |
| | Pâtes | 750 | |

Tableau N°02 : Les différentes mycotoxines produisent par les espèces d'*Aspergillus*

| Espèce | Toxines produites |
|--------------------------------|--|
| <i>Aspergillus carneus</i> | Citrinine, aszonalénines, asteltoxine, acide terreique, décatourines (R. A. Samson et al., 2011) |
| <i>Aspergillus clavatus</i> | Cytochalasines, Acide kojique, Patuline (Varga et al., 2003) |
| <i>Aspergillus flavus</i> | Aflatoxines B1 et B2 (Lai et al., 2015) Acide aspergillique (Turecek et al., 2016) |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> | Fumigaclavine C (Zhu et al., 2015) Gliotoxine (Scharf et al., 2012) |
| <i>Aspergillus niger</i> | Fumonisine B2 (Frisvad et al., 2007) Malformine, Naptho- γ -pyrones (Nielsen et al., 2009) |
| <i>Aspergillus ochraceus</i> | Ochratoxines A (Taniwaki et al., 2018) Acide pénicillique (Ciegler, 1972) |
| <i>Aspergillus oryzae</i> | Acide cyclopiazonique, Acide kojique (Barbesgaard et al., 1992) |
| <i>Aspergillus parasiticus</i> | Aflatoxines B1 (Gizachew et al., 2019) |
| <i>Aspergillus terreus</i> | Trémorgénique (Territrem C) (Peng et al., 1985) Territrems A, B (Ling, 1994) |
| <i>Aspergillus versicolor</i> | Stérigmatocystine (Mills & Abramson, 1986) |



Figure N°04 : Candidose buccale. Manifestation clinique de candidose buccale chez un hôte humain caractérisée par des lésions blanches formées sur les surfaces de la muqueuse buccale: .(A) muqueuse buccale (B) palais et (C) gencive (Akpan & Morgan, 2002.)

Préparation des milieux de culture

Pour réaliser cette étude nous avons besoin de deux milieux de culture ;

- **PDA** : Le milieu PDA a été utilisé pour la culture des champignons (**Griffith et al., 2007**)

Pour leur préparation on suivre les étapes suivantes :

- Peser 39g de poudre de PDA à l'aide d'une balance et l'ajoute dans un bécher contenant de l'eau distillée de volume 1000ml.
- Laisse le mélange au-dessus d'un agitateur jusqu'à l'ébullition.
- Remplir le milieu obtenu dans des flacons en verre.
- Les milieux ont été stérilisés à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes
- **Sabouraud** : C'est un milieu utilisé pour la culture et l'identification des levures et des moisissures, (**Boulou Sibiri, 2015**) pour sa préparation, on adopte les étapes suivantes :
 - Peser 50g de Sabouraud poudre à l'aide d'une balance et l'ajoute dans un bécher contenant de l'eau distillée de 1000 ml
 - Laisse le mélange au-dessus d'une plaque chauffant d'un agitateur électrique jusqu'à l'ébullition.
 - Remplir le milieu obtenu dans des flacons en verre.
 - Les milieux ont été stérilisés à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

Résumé

Dans le cadre de la recherche des alternatifs des antifongiques conventionnels qui soient efficaces, hydrosolubles, non toxique et à bas prix, nous voulons tester l'activité antifongique *in-vitro* d'un conjugué PEG-FCZ à différentes fractions molaires. Dans ce contexte, cette étude a but d'estimation l'effet antifongique d'un conjugué polyéthylène glycol avec un agent antifongique qui est le fluconazole, choisi grâce à son disponibilité en Algérie, ainsi que son large spectre destiné au traitement des souches fongiques tel que le *candida albicans* et l'*Aspergillus flavus*.

Initialement, une étape d'identification d'une part spectroscopique par FTIR et Raman a été effectuée confirmant la pureté de nos molécules utilisées, en d'autre part une analyse morphologique sur les souches étudiées reposant sur des critères macroscopiques et microscopique confirmant l'identité des souches mises en examen.

L'estimation de l'effet antifongique *in-vitro* du conjugué PEG-FCZ à différentes fractions molaires comparée à celle du fluconazole pure a été réalisée sur les deux souches à savoir *candida albicans* et *Aspergillus flavus* par la méthode de la diffusion en milieu solide et la méthode de dilution en milieu solide respectivement. Les résultats obtenus révèlent que le conjugué PEG-FCZ à les proportions (4:1), (9:1) et (1:0) a un effet antifongique identique à celui l'agent antifongique sur la souche *candida albicans*, et (1 :1), (3.2) sur la souche *Aspergillus flavus*, ce qui signifie qu'un effet synergique s'établit entre le PEG et le FCZ. Il est intéressant à noter aussi que le PEG seul présente aussi un effet antifongique similaire à celui de fluconazole sur ces souches.

Ces résultats nous ont donnés une idée préliminaire sur l'efficacité du polymère polyéthylène glycol et ses conjugués sur les champignons pathogènes et mycotoxinogènes, et peuvent nous ouvrir la voie vers le développement et l'amélioration des nouvelles formulations ayant un meilleurs effet inhibiteur contre les différents champignons.

Mots clés : PEG, fluconazole, *candida albicans*, *Aspergillus flavus*, effet synergique du PEG-FCZ

Abstract

As part of the search for efficient, water-soluble, non-toxic and inexpensive alternatives to conventional antifungals, we want to test the *in-vitro* the antifungal activity of PEG-FCZ conjugate at different molar ratio. In this context, this study aims to estimate the antifungal effect of a polyethylene glycol conjugates with an antifungal agent which is fluconazole, chosen thanks to its availability in Algeria, as well as its broad spectrum intended for the treatment of fungal strains such as *Candida albicans* and *Aspergillus flavus*.

Initially, a spectroscopic identification step on the one hand by FTIR and Raman was carried out confirming the purity of our used molecules, on the other hand a morphological analysis on the strains studied based on macroscopic and microscopic criteria confirming the identity of the strains under examination. The estimation of the *in-vitro* antifungal effect of the PEG-FCZ conjugate at different molar ratio compared to that of pure fluconazole was carried out on the two strains namely *candida albicans* and *Aspergillus flavus* by the method of diffusion in a solid medium. The obtained results reveal that the PEG-FCZ conjugates in the proportions (4:1), (9:1) et (1:0) as an antifungal effect identical to that of the antifungal agent on the strain *candida albicans*, and (1:1), (3:2) on the strain *Aspergillus flavus*, which means that a synergistic effect is established between the PEG and the FCZ. It is also interesting to note that the PEG alone also exhibits an antifungal effect similar to that of fluconazole on these strains. These results given us a preliminary idea on the effectiveness of the polyethylene glycol polymer and its conjugates on pathogenic and mycotoxigenic fungi, and may pave the way for the development and improvement of new formulations having a better inhibitory effect against the different fungus.

Key words: PEG, fluconazole, *candida albicans*, *Aspergillus flavus*, synergistic effect of PEG-FCZ

الملخص

كجزء من البحث عن بدائل فعالة لمضادات الفطريات التقليدية ، قابلة للذوبان في الماء ، غير سامة وغير مكلفة ، نريد اختبار النشاط المضاد للفطريات في المختبر لمتقارن PEG-FCZ في أجزاء الكسور المولية المختلفة. في هذا السياق ، تهدف هذه الدراسة إلى تقدير التأثير المضاد للفطريات لمتقارن البولي إيثيلين جليكول مع عامل مضاد للفطريات وهو الفلوكونازول ، الذي تم اختياره بفضل توفره في الجزائر ، بالإضافة إلى طيفه الواسع المخصص لعلاج السلالات الفطرية مثل المبيضات. المبيضة البيضاء و *Aspergillus flavus* . في البداية ، تم إجراء خطوة تحديد من ناحية التحليل الطيفي بواسطة FTIR و Raman لتأكيد نقاء جزيئاتنا المستخدمة ، ومن ناحية أخرى ، تم إجراء تحليل مورفولوجي على السلالات المدروسة بناءً على معايير مجهرية وميكروسكوبية تؤكد هوية السلالات الموجودة تحتها. فحص تم تقدير التأثير المضاد للفطريات في المختبر لمقارن PEG-FCZ في أجزاء الخلد المختلفة مقارنةً بالفلوكونازول النقي على السلالتين وهما *Candida albicans* و *Aspergillus flavus* بطريقة الانتشار في وسط صلب. كشفت النتائج التي تم الحصول عليها أن اتحاد PEG-FCZ في النسب (4:1) ، (1:0) ، (9:1) له تأثير مضاد للفطريات مماثل لتأثير العامل المضاد للفطريات على سلالة المبيضات البيضاء، و(3:2) (1:1) على سلالة *Aspergillus flavus* ، مما يعني أنه تم تحقيق تأثير تآزري. بين PEG وFCZ. من المثير للاهتمام أيضًا ملاحظة أن PEG وحده يُظهر أيضًا تأثيرًا مضادًا للفطريات مشابهًا لتأثير الفلوكونازول على هذه السلالات. أعطتنا هذه النتائج فكرة أولية عن فعالية بوليمر البولي إيثيلين جليكول ومقارناته على الفطريات المسببة للأمراض والسموم الفطرية ، وقد تمهد الطريق لتطوير وتحسين تركيبات جديدة لها تأثير مثبط أفضل ضد أنواع الفطر المختلفة.

الكلمات المفتاحية: PEG ، فلوكونازول ، المبيضات البيضاء ، *Aspergillus flavus* ، التأثير التآزري لـ PEG-FCZ